



**HAL**  
open science

## Les défauts de fermeture du tube neural: intérêt diagnostic de l'acétylcholinestérase

Christophe Blancato

► **To cite this version:**

Christophe Blancato. Les défauts de fermeture du tube neural: intérêt diagnostic de l'acétylcholinestérase. Sciences pharmaceutiques. 1988. dumas-01908299

**HAL Id: dumas-01908299**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01908299>**

Submitted on 30 Oct 2018

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2<sup>e</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I  
SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

U.F.R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci  
La Tronche

ANNEE : 1988

N° D'ORDRE

7043

LES DEFAUTS DE FERMETURE DU TUBE NEURAL  
INTERETS DIAGNOSTIC DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

THESE

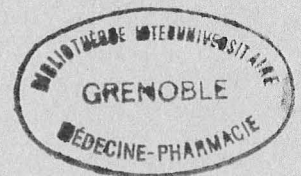
Présentée pour l'obtention du Grade de DOCTEUR EN PHARMACIE -DIPLOME D'ETAT-

par

Monsieur BLANCATO Christophe

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 27 juin 1988



devant le Jury composé de :

Monsieur le Professeur FAVIER A., Président du Jury  
Madame BOITARD M., Docteur en médecine  
Monsieur POUJET Ch., Docteur Es. Sciences Pharmaceutiques

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I  
SCIENTIFIQUE TECHNOLOGIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

U.F.R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci  
La Tronche

ANNEE : 1988

N° D'ORDRE

LES DEFAUTS DE FERMETURE DU TUBE NEURAL  
INTERETS DIAGNOSTIC DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

THESE

Présentée pour l'obtention du Grade de DOCTEUR EN PHARMACIE -DIPLOME D'ETAT-

par

Monsieur BLANCATO Christophe

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le    juin 1988



devant le Jury composé de :

- Monsieur le Professeur FAVIER A., Président du Jury
- Madame BOITARD M., Docteur en médecine
- Monsieur POUJET Ch., Docteur Es. Sciences Pharmaceutiques

Ce travail a été effectué dans le service de biochimie clinique de l'hôpital St François d'Assise de Québec, au Canada, sous la direction de Mr le Professeur Jean Claude FOREST que je remercie pour son accueil dans son service.

Je souhaiterais aussi remercier les personnes qui m'ont aidé :

- Monsieur le Docteur Jean ALAIN,
- toute l'équipe du laboratoire de biochimie de l'hôpital St François d'Assise

ainsi que les personnes qui ont bien voulu examiner le présent travail :

- Monsieur Le Professeur Alain FAVIER
- Madame M. BOITARD. Docteur en médecine
- Monsieur Ch. POUJET, Docteur Es. Sciences Pharmaceutiques

### Liste des abréviations utilisées dans le texte

- AChE : Acetylcholinesterase
- AFP : Alpha foeto protéine
- ChE : Cholinestérase
- DFTN : Défaut de Fermeture du Tube Neural
- LA : Liquide Amniotique
- LCR : Liquide Cépholorachidien
- SNC : Système Nerveux Central
- SB : Spina Bifida
- SM : Sérum Maternel.
- AFPSM : Alpha Foeto Protéine dans le Sérum Maternel
- AFPLA : Alpha Foeto Protéine dans le Liquide Amniotique
- Faux (+) : Faux positif
- Faux (-) : Faux négatif.

### Mots clés

- Acetylcholinesterase
- Alphafoetoprotéine
- Diagnostic prénatal
- Tube neural
- Anomalies
- Vitamines

## PLAN

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - LES MALFORMATIONS PAR DEFAUT DE FERMETURE DU TUBE NEURAL - HISTORIQUE ET DEFINITION	2
A - <u>Rappel embryologique du tube neural</u>	2
1. Evolution de l'ectoplaste : la neurulation	
1.1. Le tube neural	
1.2. Les crêtes neurales.	
B - <u>Malformations du tube neural</u>	5
1. Les malformations de la moelle	
1.1. Les formes majeures	
1.2. Les formes mineures ou inapparentes	
2. Les malformations de l'encéphale	
2.1. Troubles de fermeture de la gouttière neurale	
3. Hypothèse sur le mécanisme de ces malformations	
4. Résultats cliniques	
C - <u>Caractéristiques de ces malformations</u>	18
1. Fréquence de ces affections	
2. Récurrence	
3. Ethnologie - Epidémiologie	
CHAPITRE II - DIAGNOSTIC ET DEP ISTAGE	23
A - <u>Généralités</u>	23
B - <u>Le dépistage</u>	25
1. Schémas d'organisation	
2. Exemples de protocoles utilisés	
3. Populations à risque	
4. Caractéristiques souhaitables d'un programme	
5. Problème éthique et morale	

## C - L'échographie

38

1. Principe
2. Matériel
  - 2.1. Différentes techniques
  - 2.2. Différents appareils
3. Utilisation
4. Avantages et inconvénients
5. Evaluation ultrason de l'axe neural foetal normal et anormal
  - 5.1. Axe neural foetal normal
  - 5.2. Axe neural foetal anormal
6. Conclusion

## D - L'amniocentèse

50

1. Les analyses du liquide amniotique
2. Les indications
  - 2.1. La date
3. Technique
4. Risques

## E - L'alpha foeto protéine

63

1. Bases physiologiques
  - 1.1. Biochimie
  - 1.2. Rôle de l'AFP
  - 1.3. Taux physiologique
2. Méthodes de mesure de l'AFP
3. L'AFP du LA et les DFTN
  - 3.1. Valeur diagnostique
  - 3.2. Limite du dosage de l'AFP
  - 3.3. Réduction des faux positifs
4. L'AFP du sérum maternel
  - 4.1. Unité interlaboratoire
  - 4.2. Période optimum
  - 4.3. Sensibilité du test AFPSM
  - 4.4. Les faux-positifs
  - 4.5. Autres problèmes
5. Conclusions
  - 5.1. AFP SM
  - 5.2. AFP LA



## **F - Les autres tests biologiques du dépistage**

81

1. L'analyse discriminatoire
2. Tests biochimiques
  - 2.1. Analyse RAC
  - 2.2. Fraction concavalin A de l'AFP
  - 2.3. Protéines spécifiques
3. Conclusion

## **CHAPITRE III - L'ACETYLCHOLINESTERASE - AChE -**

85

### **A - Chimie, biologie, physiologie, physiopathologie**

85

1. Que sont les cholinestérases ?
  - 1.1. Définition
  - 1.2. Nomenclature
  - 1.3. Histoire des cholinestérases
2. Aspect enzymologique de l'AChE.
  - 2.1. Spécificité du substrat
  - 2.2. Activateurs et inhibiteurs
  - 2.3. Différents types d'anti ChE, mode d'action inhibitrice
  - 2.4. Principaux agents anti ChE utilisé en laboratoire
3. La molécule d'AChE
  - 3.1. Le poids moléculaire
  - 3.2. Isoenzymes
  - 3.3. Mécanisme d'action
4. Méthodes d'études des ChE
  - 4.1. Choix du substrat et de l'inhibiteur
  - 4.2. Différentes méthodes
5. Localisation, synthèse et transport de l'AChE
  - 5.1. Localisation subcellulaire
  - 5.2. Synthèse et transport
6. L'AChE dans la transmission nerveuse
  - 6.1. Le système nerveux moteur périphérique
  - 6.2. Le SNC
  - 6.3. Les ChE dans les membranes perméables
7. Pseudocholinestérases

<b>B - <u>Etudes quantitative de l'activité AChE</u></b>	110
1. Méthode	
2. Les résultats	
2.1. Grossesses normales	
2.2. Grossesses pathologiques	
3. Conclusion	
<b>C - <u>Méthode qualitative ou test qualitatif AChE</u></b>	116
1. Rappel sur l'électrophorèse	
2. Le gel de polyacrylamide	
3. Méthode	
3.1. Principe	
3.2. Lecture	
4. Résultats	
4.1. Dans les D.F.T.N.	
4.2. Les faux positifs	
4.3. La spécificité	
<b>D - <u>Etude personnelle</u></b>	132
1. Technique utilisée	
1.1. Préparation des tubes	
1.2. Préparation du gel	
1.3. Préparation de l'échantillon	
1.4. Réalisation et développement de l'électrophorèse	
1.5. Lecture	
2. Résultats	
3. Discussions	
<b>E - <u>La prévention primaire</u></b>	146
1. Etiologie multifactorielle	
2. Supplémentation	
2.1. Résultats	
2.2. Intérêt particulier de l'acide folique	
3. Supplément vitamine oui mais !	
4. Conclusion	
<b>F - <u>Conclusion</u></b>	155

## INTRODUCTION

Soigner les bébés avant la naissance ; Une spécialité révolutionnaire est en plein essor : la médecine anténatale. Le foetus est devenu un patient comme les autres.

Les défauts de fermeture du tube neural (DFTN) sont parmi les anomalies foetales les plus répandues, de 1 à 8 pour mille selon la distribution géographique. Ces malformations ont donné lieu à de nombreuses études épidémiologiques et génétiques.

La détection de ces malformations va se faire grâce à un diagnostic anténatal sûr et précis, il permettra d'interrompre éventuellement une grossesse pathologique en minimisant les traumatismes.

Dans les zones de fortes incidences, des programmes de dépistage systématique chez toutes les femmes enceintes ont été mis en place par la mesure de l'alphafoeto-protéine (A.F.P.) du sang maternel.

Par ailleurs le diagnostic est aujourd'hui possible grâce à l'examen du foetus par les ultrasons et conjointement à l'étude du liquide amniotique.

La recherche de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le liquide amniotique (LA) est l'un de ces moyens de diagnostic précoce.

**CHAPITRE I - LES MALFORMATIONS PAR DEFAUT DE FERMETURE  
DU TUBE NEURAL  
HISTORIQUE ET DEFINITION**

**A - Rappel embryologique du tube neural**

Au début de la troisième semaine survient un phénomène fondamental : la gastrulation. C'est la mise en place du troisième feuillet de l'embryon, le chordomésoblaste.

La mise en place relativement simple du mésoblaste latéral contraste avec le processus complexe qui aboutit à la formation de la corde dorsale.

On a trois stades :           - canal chordal,  
                                      - plaque chordale,  
                                      - corde.

(schéma 1)

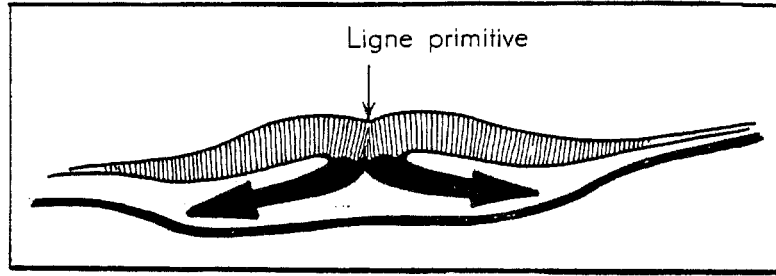
Le passage du stade plaque chordale au stade corde pleine commence à l'extrémité céphalique puis s'étend dans le sens cranio caudal.

A la fin de la gastrulation, les trois feuillets fondamentaux sont en place ; chacun d'eux va donner naissance à des tissus plus ou moins spécialisés puis formeront des organes ou des appareils.

La gastrulation termine la phase d'embryogénèse et inaugure deux processus étroitement intriqués : la morphogénèse et l'organogénèse.

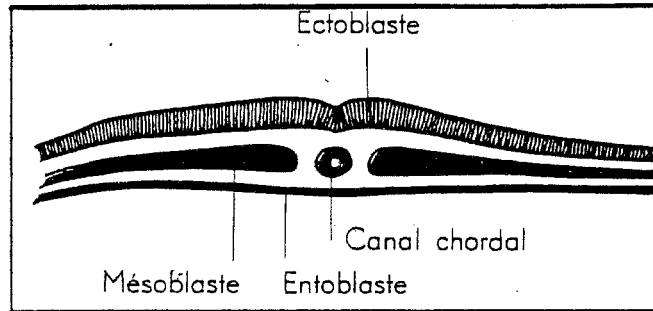
Schéma 1 d'après DAVID (26)

15ème jour environ



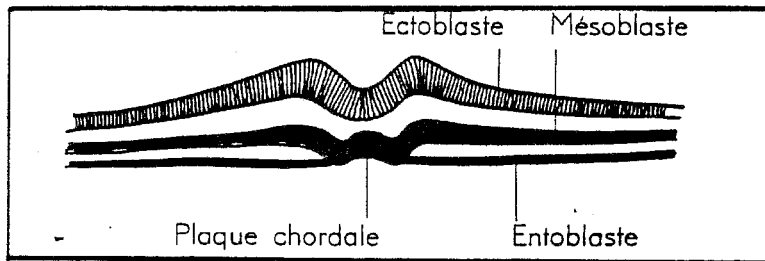
Mouvement cellulaire au niveau de ligne primitive (coupe transversale)

17ème jour environ



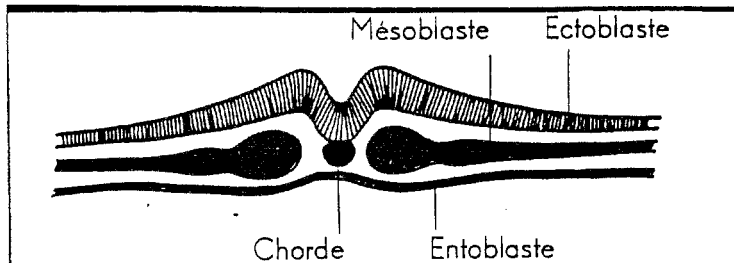
Canal chordal (coupe transversale)

19ème jour environ



Plaque chordale (coupe transversale)

21ème jour environ



Chorde pleine (Coupe transversale)

Schématiquement on a :

- l'ectoblaste → tissus nerveux  
épiderme
- mésoblaste → squelette  
muscles  
conjonctif  
appareil circulatoire  
appareil rénal
- entoblaste → glandes digestives  
épithélium digestif  
épithélium respiratoire.

### 1. Evolution de l'ectoblaste : la neurulation

Le principal dérivé de l'ectoblaste est le tissu nerveux ou neuroblaste. Sa différenciation constitue la neurulation. Le reste de l'ectoblaste prend alors le nom d'épiblaste.

#### 1.1. Le tube neural

La neurulation est la transformation de l'ectoblaste sus-chordal en un tube neural, flanqué de deux formations longitudinales, les crêtes neurales.

La formation du tube neural comporte trois stades successifs.

##### - la plaque neurale

résulte de la différenciation et de l'épaississement de l'ectoblaste sus-chordal. Plus large à l'extrémité céphalique qu'à l'extrémité caudale. Chez l'homme se forme aux environs du 17<sup>e</sup> jour.

##### - la gouttière neurale

résulte du soulèvement des bords latéraux, aux environs du 20<sup>e</sup> jour

##### - le tube neural

résulte de la soudure des bords de la gouttière, la fermeture commence vers le 21<sup>e</sup> jour, s'effectue d'abord à la partie moyenne de l'embryon et progresse ensuite de part et d'autre vers les deux extrémités. A ce moment se détachent des amas cellulaires latéraux qui forment les crêtes neurales.

Pendant un temps relativement court, persisteront deux orifices à chaque

extrémité du tube : les neuropores antérieur et postérieur qui se fermeront au 26e jour pour l'antérieur et 28e jour pour le postérieur.

L'extrémité céphalique est plus volumineuse que son extrémité caudale. La neurulation contribue à la délimitation de l'embryon.

### 1.2. Les crêtes neurales

Avant la fermeture complète de la gouttière nerveuse, des groupes cellulaires se détachent ~~de~~ les bords se raccordent à l'éctoblaste. Ce sont les crêtes neurales. Après la fermeture, elles forment des baudesettes longitudinales qui s'étendent de l'extrémité caudale aux zones mésencéphaliques du tube neural. Elles se fragmentent très vite pour donner les ébauches ganglionnaires (schéma 2).

Au cours de son évolution le tube nerveux induira la formation de l'arc postérieur des vertèbres et celle de la voûte crânienne. Il interviendra également dans le développement de la face, de l'oeil, et du nez.

### **B - Malformations du tube neural**

De multiples anomalies peuvent apparaître dans un mécanisme aussi complexe. A chaque étape, l'induction ou la compétence peuvent être défectueuse~~s~~.

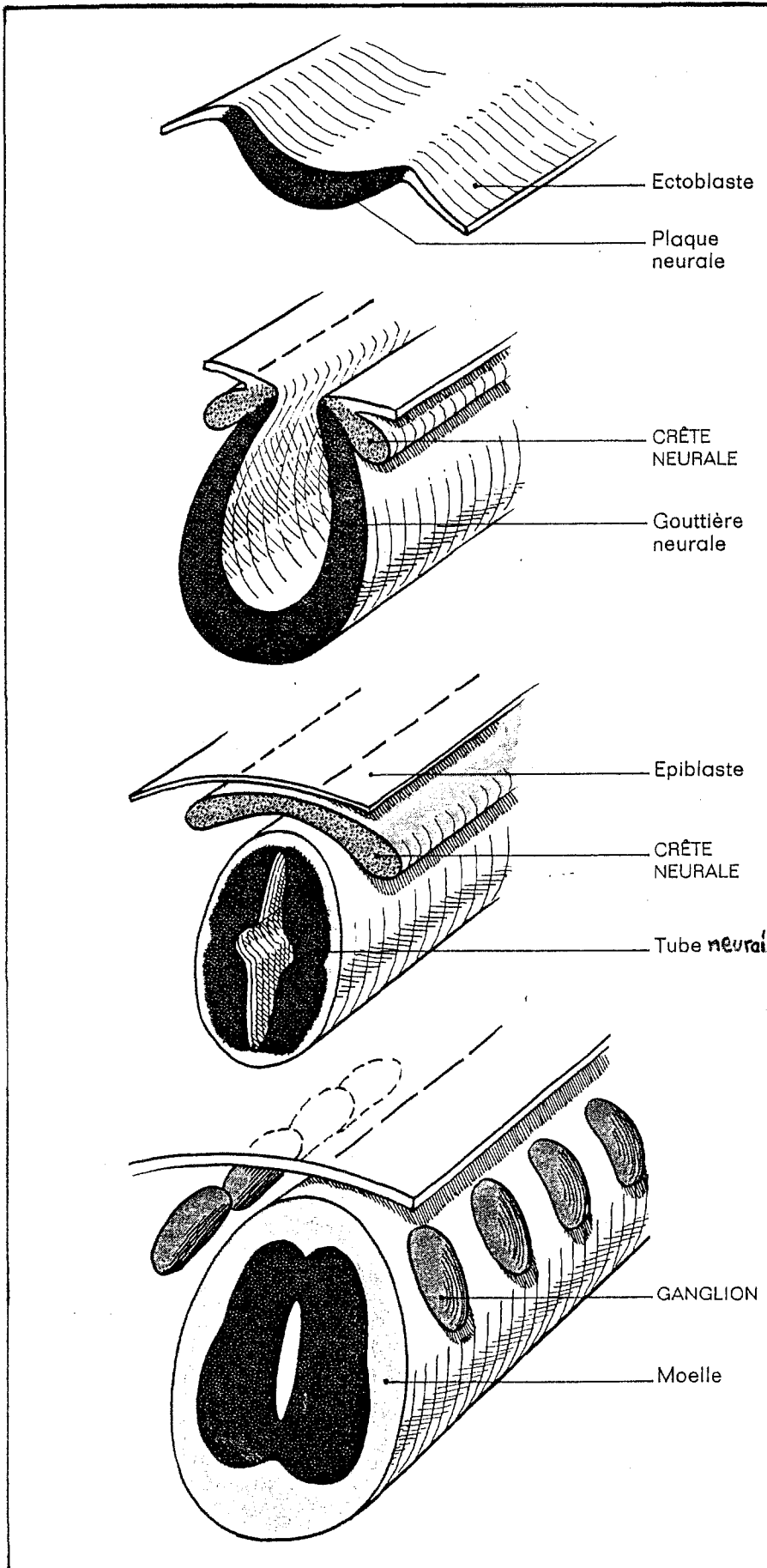
Il faut d'emblée distinguer deux types :

- les malformations ouvertes, mettant en contact directement le LCR avec le LA
- les malformations fermées, où il existe une membrane épithéloïde comme barrière.

Si l'anomalie est située dans le territoire médullaire, on parle de Spina Bifida (SB). Si elle siège dans le territoire céphalique, elle constitue l'anencéphalie.

- le S.B. est associé ou non à une hydrocéphalie,
- l'anencéphalie est associée ou non à un S.B.

Schéma 2 d'après AUROUX (3)



Les crêtes neurales



## 1. Les malformations de la moelle

Elles proviennent surtout des troubles de fermeture de la gouttière neurale ; il s'agit d'embryopathies précoces, puisque cette fermeture s'effectue entre le 21ème et 28ème jour de gestation.

La formation du tube neural conditionnant la formation de l'arc postérieur de la vertèbre, toute anomalie du tube peut entraîner une anomalie rachidienne.

Le Spina Bifida (S.B.) est caractérisé par le fait que le canal vertébral reste ouvert en arrière, l'arc postérieur osseux d'une ou de plusieurs vertèbres n'étant pas fermé, chaque corps vertébral se termine en arrière par deux épines osseuses en cachant la moelle. ("Spina Bifida" = épine dorsale bifide).

L'absence de portions dorsales des vertèbres est une des malformations la plus commune visible extérieurement (77). Toutes les parties de la colonne vertébrale pourraient être touchées, bien que les anomalies de la région cervicale sont plus rares que celles des régions plus basses : dorsales, lombaires ou sacrées. Les S.B. sont le plus souvent localisés à la région lombo-sacrée. Les vertèbres touchées sont généralement continues mais occasionnellement peuvent ne pas l'être et des ouvertures séparées peuvent être présentes dans les régions lombaires et sacrées.

### 1.1. Les formes majeures

"Spina Bifida aperta" - La moelle est ouverte. Le tissu est en continuité direct avec la peau, reproduisant ainsi l'architecture générale des stades plaque ou gouttière de la neurulation. La cavité épendymaire se trouve ainsi plus ou moins largement ouverte à l'extérieur. La distension des espaces sous-arachnoïdiens (en avant de la moëlle) détermine la projection postérieure de la moëlle. Le canal osseux reste naturellement ouvert en arrière. Les vertèbres touchées semblent toujours élargies à cause de l'aplatissement des corps et des parties latérales de l'éperon dorsal.

Du fait de l'absence de tubulation, la gouttière profilère librement à l'extérieur et la cavité épendymaire laisse écouler le liquide céphalorachidien (LCR). Les espaces méningés peuvent, par contre, être gorgés de LCR ce qui contribue à projeter le tissu nerveux en dehors des plans cutanés.

L'histogénèse est pratiquement normale. On distingue substance blanche et grise, ganglions rachidiens et racines. C'est l'organisation de ces éléments qui est bouleversée.

De sévères scoliozes souvent associés avec la formation anormale des autres vertèbres et des côtes est aussi commune. Le cordon spinal est toujours anormal. Il est aplati sur la surface de la vertèbre.

Le spina bifida à "moelle ouverte" s'accompagne d'une symptomatologie sensitive et motrice (paralysies) qui touche les régions situées au niveau et au dessous de la lésion. Leur traitement chirurgical est difficile voir impossible.

Cette malformation peut s'étendre à tous les rachis : rachischisis, et jusqu'au crâne constituant le cranio-rachischisis, dans ce cas, le cerveau est resté ouvert et a en partie dégénéré.

(schéma 3)      (schéma 4)

### 1.2. Les formes mineures ou inapparentes

Le tube neural s'est fermé mais de manière imparfaite. L'induction des plans postérieurs est défectueuse.

Si on a seulement une dilatation simple de la moëlle, c'est le **myélocèle**, on a accumulation de liquide dans les méninges ; la poche est généralement couverte par une peau normale et ne contient pas de fibres nerveuses.

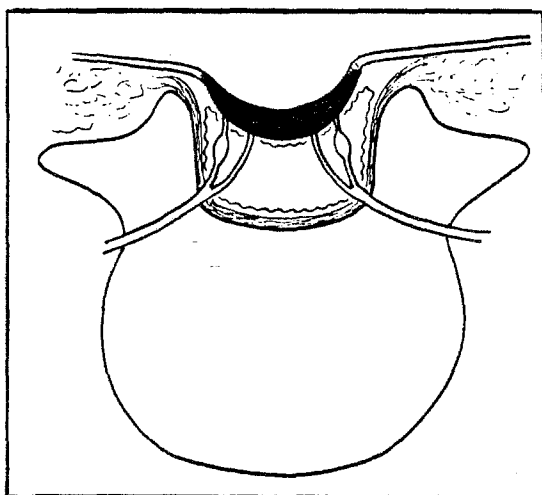
Si en plus la poche contient de la moëlle et des troncs nerveux c'est le **myéломéningocèle**.

La peau constituant la poche est parcheminée et fragile. Le traitement chirurgical est possible.

**Le SB occulta** : C'est une anomalie primaire osseuse. L'éperon dorsal d'un ou de plusieurs vertèbres, généralement dans la plus basse région lombaire, est pratiquement inexistant et le canal spinal reste ouvert. Il est recouvert par des muscles normaux et est invisible de l'extérieur sauf par une petite touffe de poils, un angiome ou des canaux de veines dilatés recouvrant la défection.

## Les formes majeures

Schéma 3 d'après AUROUX (3)



Coupe transversale  
Au niveau d'une lésion  
de Spina Bifida aperta

### Stade ultérieur

Les épines osseuses  
sont visibles

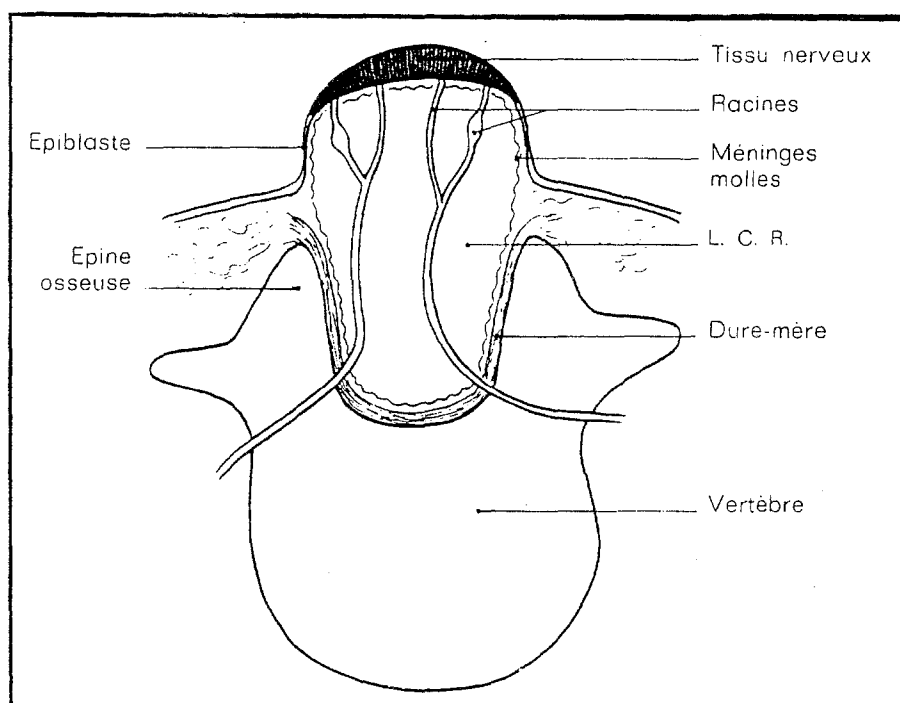


Schéma 4 d'après AUROUX (3)

Les formes majeures



Spina Bifida dit en cocarde



Spina Bifida large et ulcéré



— Profil de l'arc postérieur

← Absence d'arc postérieur

Spina Bifida avec  
télescopage des vertèbres  
dorso-lombaires

La chaîne spinale et les nerfs sont généralement normaux.

C'est la forme la plus fréquente qui touche 15 à 20 % de la population. Ces SB à "moëlle fermée"<sup>ne</sup> s'accompagne généralement d'aucun trouble.

(schéma 5)

## **2. Malformations de l'encéphale**

### **2.1. Troubles de fermeture de la gouttière neurale**

#### **2.1.1. L'anencéphalie - L'acranie.**

C'est l'absence totale (acranie) ou partielle (anencéphalie) du pôle céphalique. Elles résultent d'un arrêt de fermeture de la gouttière neurale encéphalique. La voûte crânienne est invariablement absente et les hémisphères cérébraux sont complètement absents ou sont réduits à de petites masses attachées à la base du crâne. Les os frontaux ne sont pas présents au dessus de la crête supraorbitale et les os pariétaux sont soit absents, soit consistent seulement en une crête étroite. La fosse antérieure crânienne est raccourcie. La selle turcique est aplatie et l'hypophyse peut rarement être identifiée. C'est un trouble très précoce.

La cause serait un défaut d'induction de la plaque préchordale ou du mésoblaste parachordal, ou alors une mauvaise réceptivité de la plaque neurale compétente.

De même que dans le S.B. typique, le tissu nerveux n'est recouvert d'aucune formation osseuse, ni d'aucune formation cutanée.

Cette malformation est toujours létale.

(Schéma 6)

#### **2.1.2. Encéphalocèles et méningocèles**

Ce sont d'autres troubles, plus localisés, de fermeture de la gouttière encéphalique.

## Schéma 5 :

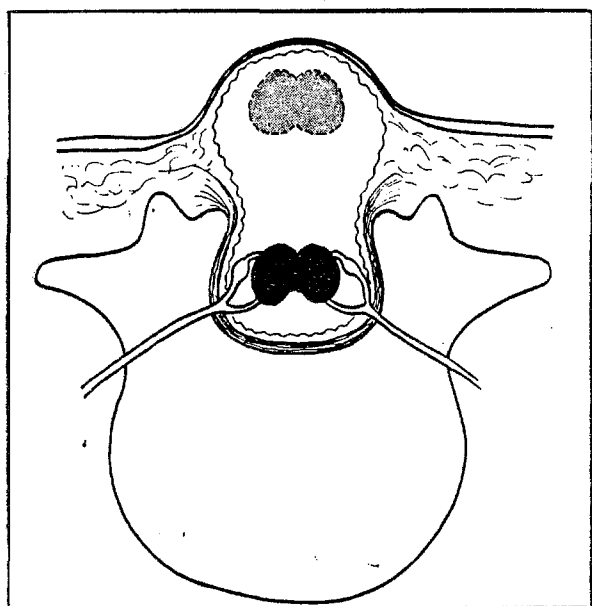
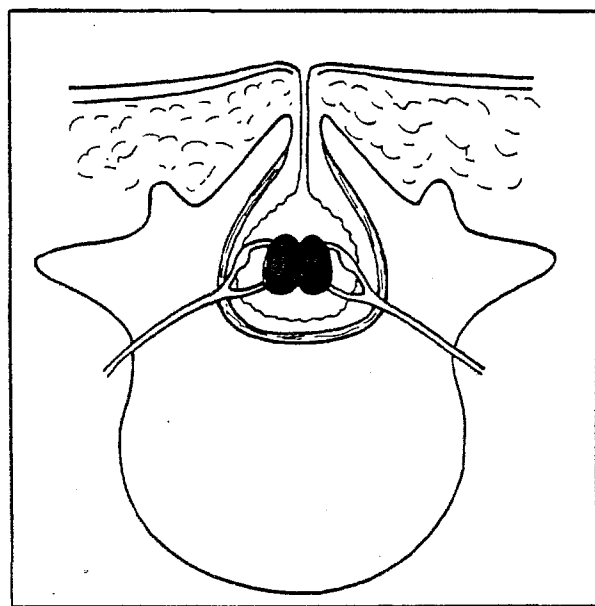
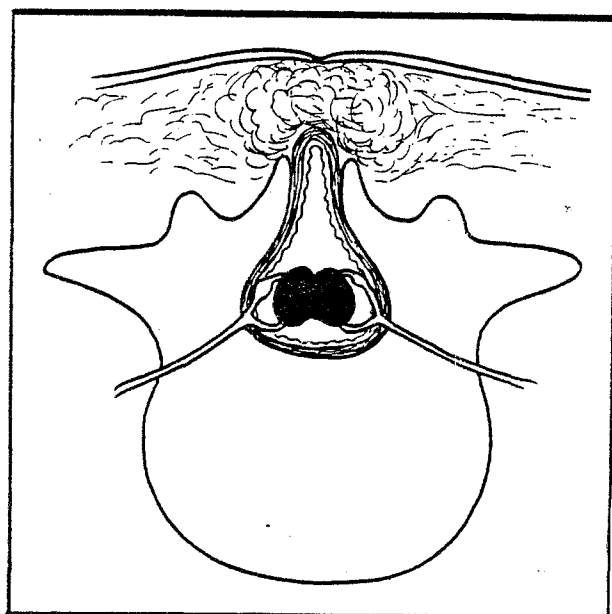
Formes mineures ou inapparentes d'après AUROUX (3)Méningocèle - MyeloméningocèleSinus dermiqueSpina Bifida occulta

Schéma 6L'anencéphalie d'après AUROUX (3)

Anencéphale humain  
à terme

craniorachischisis

Les encéphalocèles sont des formes majeures : une partie de l'encéphale fait hernie directement sous la peau, à travers un orifice cranien.

Les méningocèles sont des hernies des méninges, ils sont compatibles avec la vie. Les anomalies sont le plus souvent situées sur la ligne médiane.

(schéma 7)

### 2.1.3. L'hydrocéphalie

C'est une anomalie fréquente et compatible avec la vie, caractérisée par une accumulation de liquide céphalorachidien dans les cavités ventriculaires ou dans les espaces sous-arachnoïdiens. Trois causes sont possibles :

- obstacle à la circulation → Hydrocéphalie non communicante
- défaut de résorption } → Hydrocéphalie communicante
- excès de production }

### 2.1.4. Autres malformations (1)

Elles ne sont que citées soit à cause de leur rareté, soit ne sont pas directement en relation avec le sujet.

- microcéphalie,

Affections rares sans anomalies morphologiques spécifiques.

- Iniencephalie
- Hydranencéphalie
- Les hétérotopies :       les rosettes  
  le myxoedème congénital.
- les anomalies des surfaces corticales
- le syndrome de Dandy-Walker.

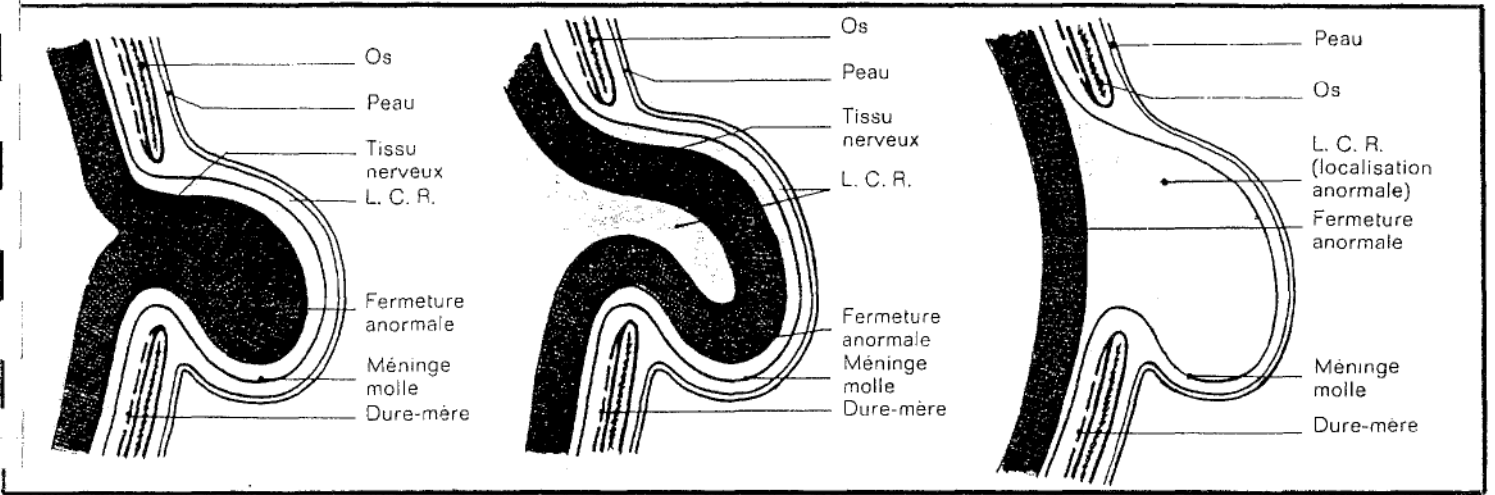
Toutes ces affections font partie des malformations du tube neural mais les plus importantes restent l'anencéphalie, toujours létale, et le spina bifida, responsable de graves handicaps chez les enfants survivants.



Schéma 7

Encephalocèles d'après AUROUX (3)

Méningocèles



Encephalocèles

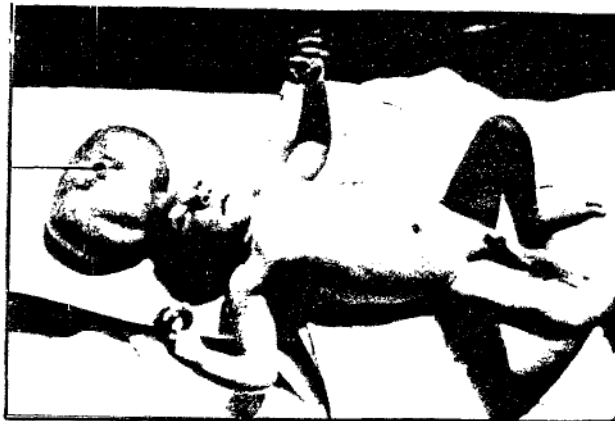
Une partie de l'encéphale fait hernie directement sous la peau

Méningocèle

Hernie des méninges seules  
Accessible à un traitement chirurgical

Zone ulcérée

Encéphale chez un fœtus à terme



### 3. Hypothèse sur le mécanisme de ces malformations

Le mécanisme est encore bien mal connu. Plusieurs hypothèses ont été émises.

L'hypothèse la plus classique est que, sous l'effet d'un défaut d'induction chordomésoblastique ou de facteurs intrinsèques au système nerveux lui-même, la gouttière neurale ne se ferme pas.

Une anomalie de l'arc nerveux entraînerait cette faillite des mécanismes d'induction ultérieurs et induirait la malformation des plans postérieurs.

Dans tous les cas, ces malformations surviendraient très tôt dans la vie foetale, avant la fin de la quatrième semaine.

Une hypothèse assez différente a été émise en 1980 ; ces malformations ne seraient pas une conséquence de la non fermeture du tube neural, mais d'une rupture de ce tube après la fermeture, rupture faisant suite à une surdistension. Ce fait serait peut être la conséquence d'une influence non identifiée autre que l'hérédité ou le hasard. Dans ce cas, le phénomène qui induit ces malformations n'interviendrait qu'après plus de vingt huit jours de vie embryonnaire, période à laquelle le tube neural est déjà fermé.

### 4. Résultats cliniques

Il est nécessaire de l'évoquer, même rapidement. En effet si un nombre relativement important de ces enfants ne survit pas à ces malformations, notamment dans les cas d'anencéphalie (mort-nés ou enfants nés vivants mais décédant quelques heures après l'accouchement) ou de S.B. grave ; une partie vivra mais dans quelles conditions ? (42) (43).

Parmi les malformations congénitales sévères, les défauts de fermeture du tube neural (DFTN) sont souvent dévastateurs. De nombreux nouveaux-nés meurent rapidement, d'autres meurent dans les quelques premières années de la vie et nombre de ceux qui survivent plus longtemps ont une incapacité permanente majeure.

La morbidité et la mortalité des patients avec S.B. varient, en particulier en accord avec la sévérité de la déflection spinale.

Le principal indice de sévérité est le fait d'avoir un SB "ouvert" c'est-à-dire complètement exposé ou juste recouvert d'une membrane transparente ou un S.B. fermé c'est-à-dire recouvert d'une peau ou d'une épaisse et opaque membrane.

Au Royaume-Uni on a 40 % de lésions ouvertes pour 65 % de fermées. La morbidité (hydrocéphales, retardés mentales, paralysés, incontients urinaires et fecaux, uropathie obstructive etc), classé en forte, modéré ou faible est de respectivement 85 %, 10 %, et 5 % de ceux avec lésions ouvertes. Les patients avec une défection fermée se portent un peu mieux de un tiers dans chaque catégorie. On estime que environ 80 % des patients avec un S.B. ont une lésion ouverte.

L'organisation médicale influence la survie des S.B. Environ un tiers des enfants avec des lésions ouvertes survivent à 5 ans dans un centre spécialisé avec un traitement. De ceux qui survivent au delà de 5 ans, 85 % sont sévèrement handicapés, 10 % modérément et le reste n'a pas d'handicap mais on a une moyenne de 6 mois d'hôpital et 6 opérations chirurgicales durant les cinq premières années.

Une forme grave d'encéphalocèle se traduira par un mauvais ou non développement du tissu cérébral, entraînant l'apparition de grosses séquelles à type de débilité et d'infirmité motrice cérébrale.

La majorité des enfants atteints de S.B. passeront le cap de la première semaine ; ils pourront présenter :

- une hydrocéphalie, complication du S.B. pouvant se manifester dès la naissance,
- des luxations congénitales de la hanche et des pieds-bots, conséquence de l'atteinte médullaire,
- une paraplégie,
- une perte de contrôle des sphincters.

De plus, de nombreuses malformations peuvent être associées avec des fréquences très supérieures à celles trouvées chez les enfants non atteints de DFTN comme :

- les fentes labiales ou palatines,
- les malformations vertébrales ou des membres,
- les anomalies de la face,
- les malformations du SNC, digestif ou cardiaque,

- une aplasie ou hypoplasie des surrénales.

On retrouve souvent une association SB - anencéphalie ou S.B.-encéphalocèle aggravée souvent par une malformation majeure du SNC.

Ce petit rappel clinique nous montrent à quel point les notions de dépistage anténatal, de diagnostique anténatal et de prévention prennent toutes leurs importances.

## C - Caractéristiques de ces malformations

### 1. Fréquence de ces affections

Les DFTN sont parmi les plus communes et les plus tragiques des malformations congénitales. Les variations de la fréquence de l'anencéphalie et du S.B. sont connues depuis de nombreuses années.

On a de fortes variations selon les pays, mais également dans un même pays selon les régions.

- **Les taux les plus élevés** se situent dans les Iles Britanniques et le continent Nord-américain.

On atteint des taux de 4 à 5 pour mille naissances vivantes avec de fortes variations régionales : par exemple, dans les années 1960 l'incidence à Belfast était de 8,7 pour mille alors qu'à Londres on a 3 pour mille.

- Edimbourg 3,4 pour mille, Glasgow 3,9 à 5,1 pour mille.
- **Au Etats-Unis** on a un taux moyen d'environ 1,7 pour mille à 2 pour mille (100) long Island 1,2 pour mille et Maine 3,4 pour mille. Le taux est deux fois plus grand d'Ouest en Est.
- **Au Canada** le taux d'incidence varie ; le plus élevé se situant au Québec 3,0 à 4,6 pour mille jusqu'à la Colombie Britannique 1,6 pour mille avec 0,68 pour mille d'anencéphalie dont 25 pour ~~cent~~ vivants et 0,87 pour mille de S.B. dont 89 pour ~~cent~~ vivants

- En Europe les taux sont très variables de l'Angleterre à la Finlande ou l'on a le taux le plus faible de 0,65 à 0,4 pour mille

. Danemark	1,6 ‰.
. Allemagne de l'Est	1,5 ‰.
. Allemagne de l'Ouest	1,1 ‰.
. Suède	1,0 à 1,2 ‰.
. Suisse	1,2 ‰.

Pour la France, la fréquence moyenne des anomalies de la gouttière neuroectodermique (63), est de 1,5 pour mille répartie en Spina Bifida 1 pour mille et anencéphalies 0,54 pour mille. Variation également selon les régions, on a une fréquence de 1,2 pour mille (4) dans la région Midi-Pyrénées. En Bretagne il existe un foyer s'étendant jusqu'au sud de la Normandie. Ce foyer étant plus net pour l'anencéphalie que pour le S.B.

Pour Rhône-Alpes (37) le taux de prévalence de 0,7 pour mille donné par l'Institut Européen des Génomutations de Lyon apparaît un peu sous-estimé, un taux de 1 pour mille devrait être plus réaliste.

## 2. La récurrence

Chiffrée empiriquement, elle varie suivant les régions à faible et forte fréquence. Ces désordres ne suivent pas les lois de l'hérédité de Mendel. Le taux de récidence (43) est lié au risque d'incidence ainsi une femme blanche aux U.S.A. (risque de DFTN de 2 pour mille) a un risque de récidence de 20 % alors qu'à Glasgow (risque de 5 pour mille) le risque de récidence est de 50 %.

Un autre caractère non mendélien, le risque de récidence devient plus fort chez un individu après chaque grossesse affectée successivement. Par exemple : une femme blanche aux U.S.A. avec deux grossesses affectées aurait un risque de récidence de 40 %.

- A Glasgow il devient 100 %.

Pour l'anencéphalie le risque de récidence est estimé à 4 % et augmente à 10 % après deux foetus affectés successifs (31)

### 3. Étiologie - Épidémiologie (66)

Certaines malformations sont causées par des gènes mutants hérités du classique modèle Mendélien. L'évènement antérieur d'un de ces désordres chez un membre clé de la famille prédit une grande chance d'un enfant affecté et appelle une analyse génétique attentive. Dans ce type de désordre on peut inclure de nombreuses maladies tel que le syndrome de Meckel, maladie récessive. Le syndrome de Holt-Oram est un exemple de désordre autosomal dominant ("X. linked").

De nombreux syndrômes et malformations ne suivent pas le modèle héréditaire mendélien, mais des observations empiriques documentent les cas élevés dans des familles. Un facteur environnant local ou une compilation de facteurs génétiques relativement minimes et de facteurs environnants chez un ou les deux parents, expliquent quelques unes de ces associations. Si le risque élevé est reconnu empiriquement et une technique de diagnostic prénatal est utilisable, les grossesses pour ces couples sont a priori candidats à étude. Les DFTN suivent ce modèle (74).

Leur étiologie apparaît être multifactorielle avec un facteur génétique important et une composante de l'environnement substantielle.

Des études familiales indiquent que l'incidence dépend de l'effet additif de plusieurs gènes mineurs anormaux et de facteurs environnants. Une accumulation de ces aberrations génétiques et des facteurs environnants peut être tolérée par le fœtus jusqu'à un point (seuil) au delà duquel il y'a risque de malformation.

Les mécanismes impliqués restent peu connus (67)

De nombreux chercheurs ont examiné les causes génétiques et environnantes possibles ; les observations épidémiologiques faites vont dans le sens d'une étiologie multifactorielle (60) (42).

On a une haute incidence chez les blancs, en dehors de l'Europe et de l'Amérique, chez les sud africains blancs, les australiens surtout chez les émigrants européens, chez les indiens et égyptiens. Cela suggère une ceinture de haute incidence s'étendant de l'est de la méditerranée à l'Inde.

Si un groupe ethnique avec un haut taux de DFTN émigre dans un pays à un taux plus faible, de nombreuses générations de ce groupe ont un taux intermédiaire.

Les DFTN sont rares chez les négroïdes, les asiatiques et ashkenazi, les juifs. Les plus hauts taux sont chez les blancs, les sikhs et égyptiens.

Dans ces régions on a des variations régionales dans l'ascendance U.S.A. et Canada, le taux est plus haut dans l'Est et plus faible dans l'Ouest.

Au Royaume Uni, les DFTN sont trois fois plus commun en Irlande septentrionale que dans le sud de l'Angleterre.

Plusieurs études suggèrent que les populations urbaines, surtout les communautés industrielles et plus particulièrement les districts les plus défavorisés, pourraient être plus fréquemment affectées que les populations rurales ; mais ceci n'est pas absolue.

On a des variations temporelles : dans l'Est des U.S.A. il y a une augmentation marquée du taux de DFTN durant le premier tiers de ce siècle avec des pointes à 10 pour mille dans certaines villes. Idem en Allemagne entre 1945 et 1950, ainsi qu'au Royaume Unis de 1920 à 1940. On aurait une relation inverse entre la prévalence et le statut socio-économique. Les facteurs nutritionnels pourraient contribuer à l'étiologie (voir plus loin). Ceci nous amène à conclure que les facteurs environnants associés avec le lieu géographique influencent l'incidence des D.F.T.N.. Ces facteurs pourraient inclure l'association entre incidence et bas status socio-économiques.

Des études ont également montré des variations saisonnières dans les naissances avec DFTN ; On a constaté des taux plus hauts si la conception se fait au printemps ou au début de l'été. Egalement il y aurait une association entre la distribution géographique et les différents nutriments et électrolytes : surtout le zinc (déficience dans les aires de haute incidence), les nitrates (si taux élevés), l'aminoptérine, et vitamines.

En fait, il semble qu'au printemps les réserves corporelles pour de nombreux nutriments sont au minimum.

Des facteurs maternels semblent aussi exister. Un taux plus élevé chez les primipares et une augmentation avec l'élévation de l'âge maternel. En terme de sexe, les femmes sont plus souvent affectées que les hommes, environ trois quart pour le S.B. et la moitié dans les anencéphalies.

De nombreux facteurs de risques ont été proposés comme les épidémies de grippe, les "patates moisies", l'alcool illicite, différentes drogues, la déficience en iode etc... ; mais l'incidence n'a pas toujours été prouvée.

Le poids de naissance aurait une relation : les anencéphales ont un poids de naissance significativement plus bas que les S.B., ceux-ci ayant eux-mêmes un poids de naissance plus bas que les témoins

Le rang de naissance, certains auteurs signalent un excès de premiers nés parmi les enfants atteints de ces malformations.

La déficience en vitamine comme facteur de risque dans la pathogénèse des DFTN est l'hypothèse la plus probable, de nombreuses études sont en cours,(voir plus loin).

Outre ces facteurs nutritionnels on a un groupe un peu mieux connu, celui des médicaments et des agents teratogènes. Il existe un médicament connu pour avoir causé des DFTN : l'aminoptérine, antagoniste des folates. On a également une augmentation de la fréquence par certains barbituriques, la phénytoïne (cause une déplétion des folates), certains anesthésiques et antidépresseurs, Valproate, une hypervitaminose A.

Les facteurs génétiques pourraient contribuer également aux variations géographiques dans l'incidence. Cela suggère que l'hérédité est au moins aussi grande dans les aires de haute que de basse fréquence.

En conclusion, l'hypothèse des facteurs multiples avec des effets individuellement petits mais cumulatifs constitue la voie de recherche la plus explorée parce que la plus probable. Toutes ces données étiologiques incertaines mettent le clinicien dans l'embarras, le seul moyen alors, de prévenir reste le dépistage et le diagnostic prénatal conduisant ou non à l'avortement thérapeutique. Jusqu'en 1970 cela était virtuellement impossible. Le seul groupe à haut risque clairement identifiable est constitué des mères qui ont eu un enfant avec un DFTN, il représente 5 à 10 % de toutes les naissances affectées. Dans 90 à 95 % des cas les défections sont complètement inattendues.



## CHAPITRE II - DIAGNOSTIC ET DEPISTAGE

### A - Généralités

La détection prénatale d'anomalie foetale est une donnée en pleine expansion dans la pratique obstétrique courante (85). Le diagnostic prénatal des DFTN repose sur un faisceau d'arguments échographiques et biologiques (72).

Historiquement Brock et Sutchiffe montrent la voie en 1972 avec un but théoriquement possible de prévenir la plupart des DFTN. Ils découvrent qu'il y aurait un marqueur moléculaire pour la détection prénatale des DFTN, ils trouvent une concentration anormalement haute d'alpha foeto-protéine (AFP) dans le liquide amniotique (LA) des grossesses conduisant à une anencéphalie, SB ou différentes combinaisons de celles-ci (42). Mais l'AFP du LA serait justifié seulement chez les patients déjà connus pour être à haut risque : plus de 95 % des enfants naissants avec un DFTN arrivent dans les familles sans histoire, on a donc besoin d'un protocole viable dans la population générale.

Un dépistage primaire plus facile, plus sain et meilleur marché est nécessaire. Ils proposent en 1973, la concentration en alpha foeto-protéine dans le sérum maternel (AFPSM). Plusieurs facteurs dont une histoire familiale, une histoire médicale maternelle ou le cours de la grossesse servent d'indicateurs d'un foetus anormal. De l'attention de ces facteurs suit la sélection du type de grossesses pour d'autres investigations.

L'information historique et l'examen physique attentif ont leur rôle de dépistage classique. Un dépistage additionnel, basé sur un simple examen de laboratoire pendant la grossesse a été aussi développé. Le dépistage par AFPSM est le meilleur exemple. Le but de ce type de dépistage est le même que le dépistage classique. Il permet de sélectionner parmi toutes les femmes enceintes celles qui ont un risque distinctivement élevé d'un foetus avec des anomalies et ainsi d'entreprendre des techniques spéciales.

Le test AFPSM peut être utilisé comme test de dépistage en dehors de la population à haut risque mais ce n'est pas un diagnostic .

Un grand programme de dépistage pilote utilisant l'AFPSM pour identifier les grossesses à haut risques a démontré que les grossesses avec une AFPSM élevée durant le 2ème trimestre peut avoir un risque de DFTN de 5 % ou plus.

De tels programmes ont établi que le dépistage prénatal par l'AFPSM peut identifier un sous-groupe avec le plus haut risque connu de DFTN.

Cependant la cause la moins vraisemblable d'un taux élevé de l'AFP reste la présence d'une anomalie type DFTN ; on a des taux élevés :

- dans les grossesses multiples normales,
- dans les cas d'âge gestationnel sous-estimé,
- comme un résultat de changement spécifique du placenta si transfusion foetomaternelle,
- en association avec des foetus normaux.

Bien que AFPLA élevé soit un diagnostic hautement sensible et relativement spécifique des DFTN, son interprétation dépend, entre autres, d'une date de gestation rigoureusement exacte.

On peut augmenter la spécificité et la sensibilité des résultats de l'AFP du LA à l'aide d'un test complémentaire : la recherche qualitative par électrophorèse sur gel de l'acétylcholinestérase (AChE) du liquide amniotique (LA).

La meilleure date pour le dépistage de toutes les DFTN se situe entre 16 et 18 semaines de grossesse, principalement parce qu'à cette période environ les trois quart des grossesses à SB ouverte ont l'AFPSM supérieur au 97ème percentil des valeurs normales.

L'ultrason est un autre outil utile pour le dépistage, les progrès des techniques échographiques permettent actuellement une visualisation des structures anatomiques intracrâniennes du foetus. Dès lors des malformations foetales intéressant le S.N.C. peuvent être dépistées précocément par un examen échographique attentif.

## B. Le dépistage

### 1. Schémas d'organisation

Dans tout programme de dépistage des DFTN, deux investigations simples continuent à être retenues : le diagnostique par ultrason,  
la mesure de AFPSM

Ces deux tests identifient un groupe de grossesse à haut risque, l'amniocentèse (procédure non sans risque pour le fœtus) sera faite sur moins de 4 % des femmes dépistées ; Ces tests réduisent le nombre d'amniocentèse en identifiant les grossesses multiples, les fœtus anencéphaliques, les nombreux morts intrautérins, ils suggèrent ainsi la présence d'un SB dans de nombreux cas.

Il est important de distinguer ces groupes puisque la probabilité d'un résultat élevé d'AFPLA d'être associé à un DFTN sera étroitement dépendant du résultat de l'AFPSM.

Le diagnostic spécifique de l'AFPLA est bien meilleur si AFPSM est aussi reconnu élevé.

Des schémas sont maintenant utilisables pour déterminer de façon raisonnable le risque de SB ouverte, en donnant les résultats de certains tests. (Schéma 8)

Il est apparent que la déficience majeure de ce schéma de détection des DFTN reste l'insensibilité et, à un degré moindre le manque de spécificité, du test AFPSM. Ce test serait négatif dans 20 à 30 % des mères avec une affection foétale. Comparé à ce diagnostic, les déficiences dans le test du L.A. sont insignifiantes.

Donc parmi les tests les plus employés dans le diagnostique des DFTN, le plus largement utilisé est l'examen ultrason, puis AFPSM et AFPLA avec enfin AChE LA.

Le dépistage par l'AFPSM identifie 88 % des cas de DFTN alors que le dépistage par le LA identifie 98 % d'anencéphalie et SB.

Le taux de faux positif se situe entre 0,48 % et 0,11 % selon les différents taux limites utilisés.

## Schéma 8

Schéma recommandé pour la détection prénatale des DFTN

1. Dépistage : taux élevé d'AFPSM
2. Cause sans rapport aux DFTN pour une amniocentèse
3. Enfant antérieur avec une D.F.T.N.



Diagnostic ultrason



Amniocentèse pour :



1. AFP LA.
2. Test AChE LA sur gel.
3. Autres tests.

La détermination de l'ACHé diminue le taux de faux positif ; on arrive à diagnostiquer 99,6 % pour l'anencéphalie et  
99,4 % pour le S.B.

Illustration du rôle possible du test AChE sur gel, on suppose l'incidence à la naissance de S.B. ouverte de 2 pour mille.

- Chez une femme avec AFPSM positif

- avant amniocentèse

Le risque d'avoir un foetus affecté est environ 1/13.

- après amniocentèse

. Si A.F.P. L.A. est élevé on passe à environ 18/1

. Si on a aussi AChE positif on arrive à 288/1

avec un LA non contaminé on passe à 1 000/1

avec un LA contaminé on passe à 36/1.

- Avec une amniocentèse faite pour une autre raison et si A.F.P.S.M. n'est pas connu, la probabilité que le foetus soit atteint par un S.B. est de 1/500 (soit autant que la population normale.(2 pour mille).

. Si AFP LA est élevé on a 1/2

. Si AChE est aussi positif on a 8/1.

L'interprétation des grossesses à risque est compliqué par un chevauchement marqué entre AFP chez les grossesses normales et AFP des grossesses affectées ; ce chevauchement est plus marqué dans le serum maternel que le liquide amniotique.

Il n'y a pas de transition claire entre le risque zéro et l'absolue certitude d'une affection.

Des taux limites ont été établis pour un dépistage de la population, ils minimisent le nombre de mauvaise classification et représente un compromis optimum entre le nombre de grossesses saines qui ont suivi la procédure et les grossesses affectées qui restent indétectées dans le programme de dépistage.

La mise en place de programme précis de dépistage systématique ou d'un protocole rigoureux est lié au taux d'incidence des DFTN d'un pays.

Le dépistage par AFPSM est recommandé chez les populations avec une incidence de 1 pour mille ou plus haute.

Au Royaume-Uni, le dépistage est un instrument bien établi, le programme de dépistage est bénéficiaire (87).

Aux U.S.A., la FDA a récemment approuvé une plus large utilisation des kits commerciaux pour le test radioimmunologique de l'AFP sans restriction.

Même en France un programme serait souhaitable et permettrait le dépistage de nombreuses malformations. La rentabilité d'un tel programme a été considérée dans certains pays (Canada), il s'est avéré dans tout les cas rentable mais de nombreux facteurs interviennent et la rentabilité dépend beaucoup du système de santé considéré.

## 2. Exemple de protocoles utilisés

### 2.1. 1er exemple dans un C.H.U. français (4) : (schéma 9)

Un premier dosage d'AFP est effectué en double, systématiquement, pour toutes les femmes consultant pour examens prénataux entre 10 et 30 semaines d'amenorrhée.

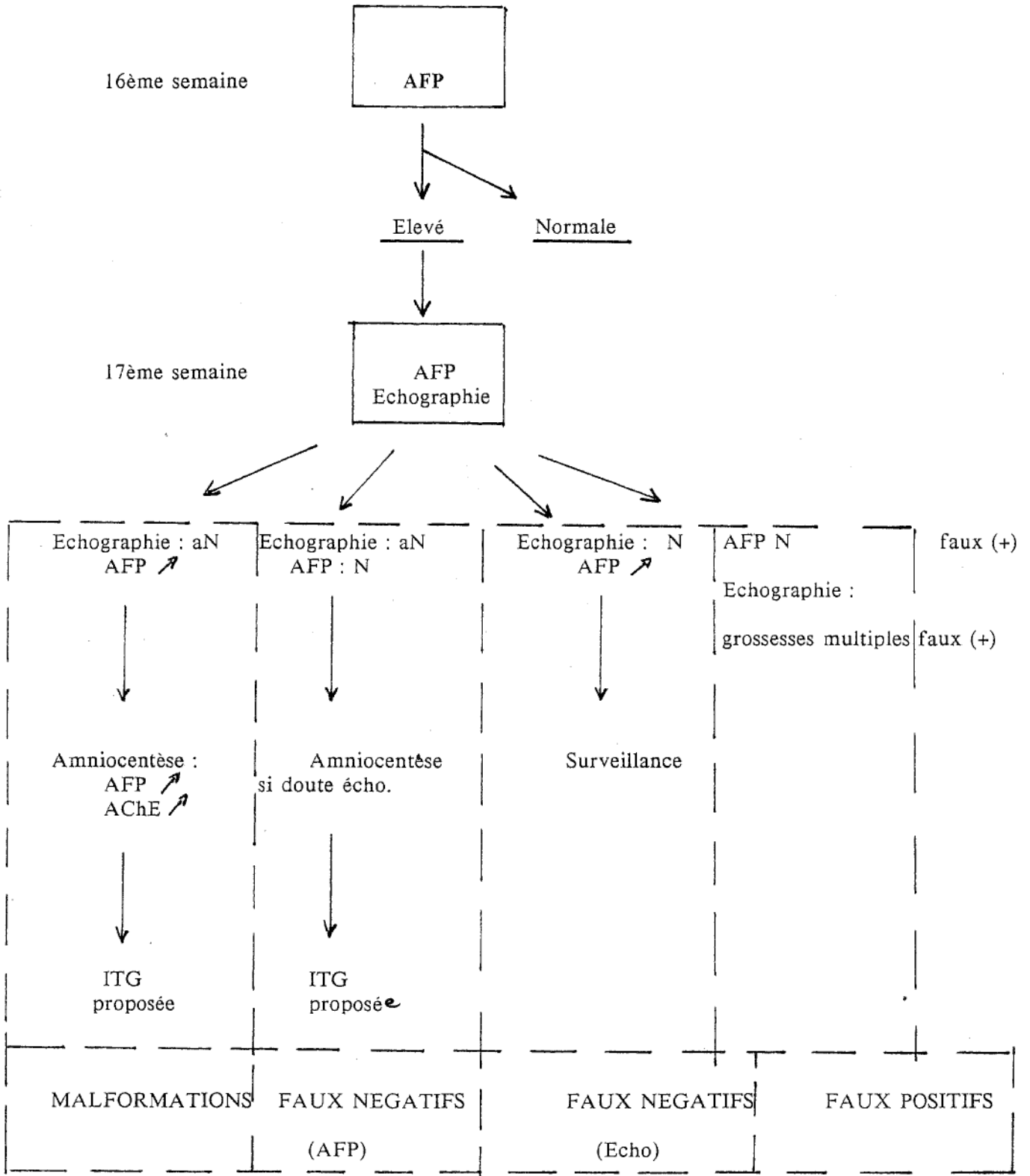
Si le premier résultat est élevé, un deuxième test est demandé dans les quinze jours qui suivent et en même temps qu'un examen échographique orienté.

Quatre situations peuvent alors être retrouvés :

- si le taux d'AFP se normalise et rien à l'échographie : on interrompt toute surveillance.

- si le taux d'AFP reste élevé et anomalie à l'échographie : on pratique une amniocentèse et l'interruption thérapeutique de grossesse est proposée (ITG)

Schéma 9



- Si l'AFP reste élevé mais pas d'anomalie à l'échographie : une surveillance et amniocentèse sont discutées.

- Si l'AFP se normalise et si l'échographie révèle une anomalie : une ITG est pratiquée.

Il faut noter le jumelage indispensable de l'examen échographique au dépistage, ce qui permet d'écarter rapidement un certain nombre de faux positifs (+) en reconnaissant les grossesses multiples et en redressant les erreurs où les imprécisions de terme qui faussent l'interprétation des résultats.

## 2.2. Autre exemple de schéma de dépistage utilisé en Angleterre (42)

### (Schéma 10)

Ici aussi l'ultrason est un outil utile pour réduire les faux positifs dans le dépistage par l'A.F.P.S.M. ; ceci par l'augmentation de l'exactitude de l'estimation de l'âge de gestation. Mais la certitude du SB par le diagnostic ultrason est possible seulement avec un équipement de haute résolution dans des mains expertes, ce qui n'est pratiqué que dans quelques centres.

Le diagnostic ultrason haute résolution pourrait remplacer l'AFP SM mais le coût et la nécessaire sophistication rendent cette approche irréalisable. L'examen ultrason a un rôle additionnel important et complémentaire de l'AFP en démontrant à la mère l'apparente normalité du fœtus.

### 3. Populations à risque

Les résultats de l'ultrason, les mesures de l'AFP dans le SM, le LA, donnent aux cliniciens deux populations à hauts risques :

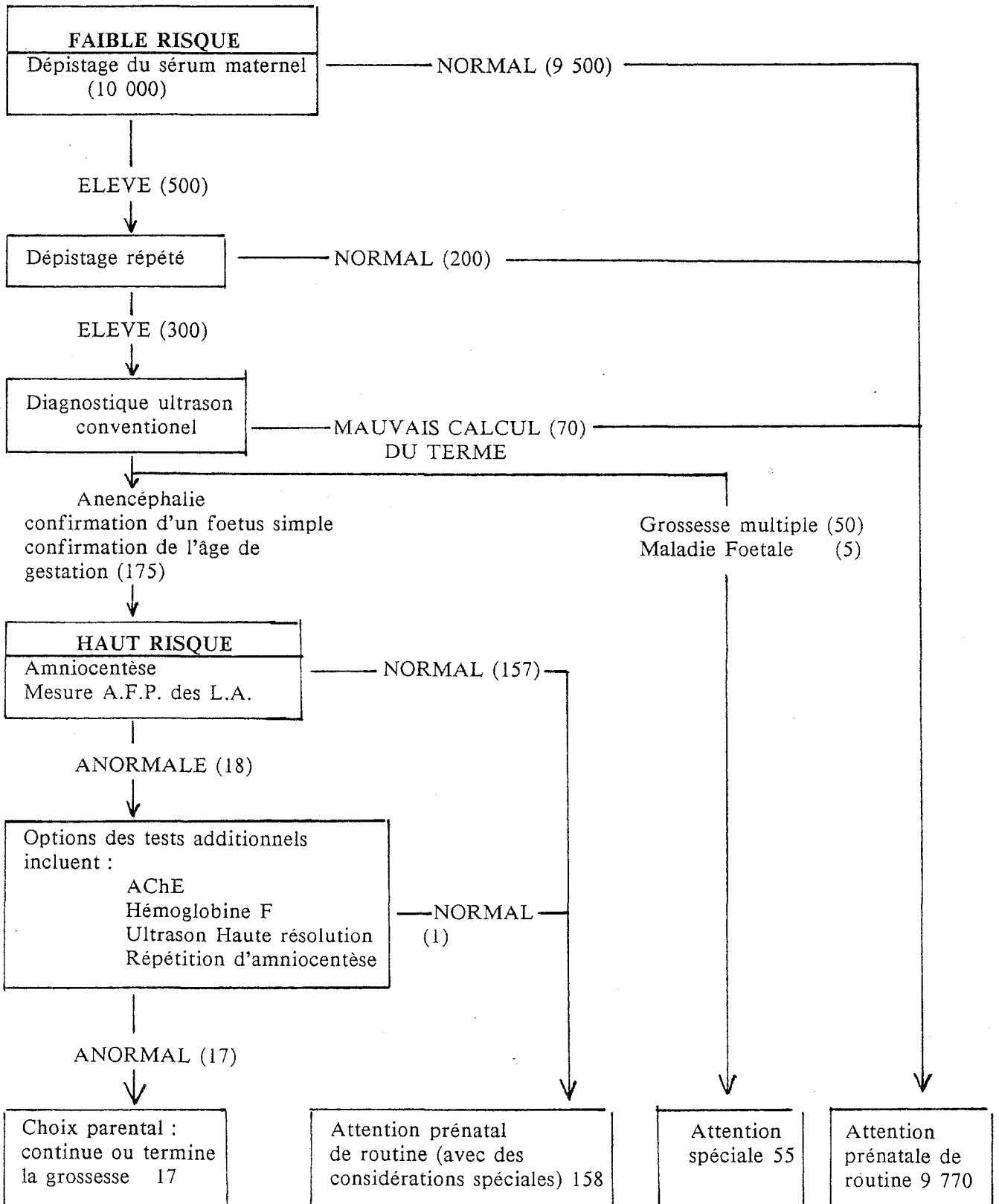
- Une dans laquelle les valeurs du SM sont hautes mais le LA est normal ; on a un risque bas mais le risque d'une sortie anormale tel que faible poids, fausse couche ou mort foetale reste.

- Une autre dans laquelle les deux valeurs sont hautes : ici le risque est haut, il faut savoir si l'information est assez sensible et spécifique pour justifier l'arrêt de la grossesse : la réponse dépend largement du facteur risque qui a poussé à l'amniocentèse en premier lieu.



Schéma 10

Dépistage des D.F.T.N. avec une incidence de 1 à 2 pour 1 000.



Cliniquement le risque actuel dans chaque cas dépend du nombre de facteurs :

- incidence des DFTN,
- amplitude de l'augmentation de l'AFP,
- étendue du screening de la grossesse dans les étapes antérieures,
- la raison de l'amniocentèse,
- la présence ou absence de sang foetal dans l'échantillon de L.A.

Pour rendre encore plus performant de tel schéma, il faut intégrer les données sur l'historique, la biochimie et les marqueurs physiques. Il faut développer non seulement un profil exact des grossesses à hauts risques, du faible poids à la naissance avec DFTN ouverte, mais aussi le profil exact des grossesses à faibles risques.

On a défini 5 groupes de sujets à hauts risques qui subissent un conseiller génétique et un ultrason haute résolution (58).

1. Mères qui ont eu antérieurement une ou plusieurs grossesses avec un DFTN
2. Pères qui, dans un mariage ou une liaison antérieurement ont un enfant avec un DFTN
3. Parents qui eux-mêmes ont un SB
4. Parents avec des cousins qui ont un DFTN
5. Parents dont les cousins ont eu une grossesse avec 1 DFTN ou si leur parents ou oncles ont un DFTN

Seul les trois premiers groupes à risques particulièrement hauts, justifient d'emblée l'option complète de l'ultrason haute résolution et de l'amniocente.

Le dépistage AFP SM permet de sélectionner un groupe rejoignant ceux précédemment cités, qui ont inconsciemment un haut risque de défection congénital sérieuse (13 %).

Un dépistage AFP SM devrait être envisagé comme médicalement approprié pour les femmes diabétiques malgré toute utilisation routinière de l'ultrason.

Dans toute méthode de dépistage dont l'AFP SM, pour qu'elle soit valable, elle ne doit être faite que si les techniques établies de l'obstréticien, du généticien clinique, du personnel de laboratoire sont associées et coordonnées.

Il faut que les services soient effectivement délivrés même si les problèmes logistiques font qu'il faut travailler avec de nombreux médecins.

La capacité de répondre au besoin d'un patient individuel doit être la considération primordiale. Ceci peut-être accompli de la façon la plus satisfaisante à travers un système régional organisé.

L'organisation au niveau régional semble être la plus adéquate pour minimiser tous les problèmes pouvant se poser (le transport des patients ou des échantillons par exemple).

#### 4. Caractéristiques d'un programme

Tout semble facile dans le dépistage, néanmoins un certain nombre de problèmes peuvent se poser.

La médecine collecte de plus en plus d'informations sur le fœtus ; de nombreuses techniques de diagnostic prénatal ont permis d'apprendre beaucoup sur l'état génétique, métabolique du fœtus, la constitution chromosomique, la structure osseuse et autre ; et ce, de plus en plus tôt dans la grossesse.

Ces techniques rapportent ces informations à temps pour faire légalement un avortement sélectif du fœtus. Néanmoins, cet avortement reste inacceptable pour de nombreuses personnes, il soulève de profondes et troublantes questions morales, sociales et légales que l'on doit toujours garder à l'esprit.

Aucune des différentes possibilités de diagnostic prénatal, que ce soit direct (ultrason, scanner en temps réel, foetoscopie) ou indirecte (amniocentèse et AFP, AChE, aspiration de sang par les vaisseaux placentaires) ne va sans poser des problèmes techniques. Beaucoup de techniques sont expérimentales et ne sont pas standardisées, toutes présentent des problèmes moraux, sociaux et légaux, autant que d'avantages.

Avec l'exception des diagnostics prénatals fait dans un but de recherche, les programmes de diagnostic doivent présenter au moins les critères suivants (78) :

1. Les programmes devraient être faits pour atteindre des groupes de femmes enceintes connues pour être à risque,
2. Le diagnostic prénatal ne devrait être entrepris que si les travaux de laboratoire sont de hautes qualité même si actuellement un manque de services de laboratoire adéquats est une barrière importante à l'utilisation de l'amniocentèse. Bien que le taux d'erreur soit bas, il est possible que la fréquence d'erreur augmente si les techniques sont plus largement utilisées par les praticiens, les nouveaux laboratoires et les travaux expérimentaux ; ce qui augmente le volume des tests.

Les tests de laboratoire doivent être standardisés et on doit utiliser un contrôle de qualité pour assurer l'exactitude des résultats. Des résultats inexacts ont une conséquence plus lourde dans le diagnostic prénatal que dans d'autres tests médicaux de routine. Une expansion incontrôlée du diagnostic prénatal et des travaux de laboratoire inadaptés seraient une étape désastreuse pour les techniques qui peuvent offrir espoir et réconfort à beaucoup de familles.

3. Les plus basses limites pratiques pour des résultats faux (+) et faux (-) doivent être établies. Des essais en continu pour améliorer la sensibilité des tests doivent être faits. Une erreur dans chaque direction serait la cause de peine et de souffrance pour les familles et devrait ouvrir le diagnosticien à des poursuites légales.
4. On doit déterminer à court terme et à long terme la sécurité pour la mère et le fœtus. Quoique les effets défavorables sur la santé, de l'amniocentèse et de l'ultrason apparaissent être minimes ou inexistantes, nous ne connaissons pas bien les conséquences à long terme.
5. Il faut donner une information correcte sur la procédure avant le diagnostic prénatal et des conseils adéquats après, pour faire prendre aux parents une décision responsable. Le médecin doit s'assurer que le patient est au courant des différentes opinions possibles dépendant des résultats du diagnostic (avortement ou alternatives possibles en prenant en compte la nature des conditions diagnostiquées et des présentes et futures possibilités de traitement prénatal et postnatal) ; la possibilité et la signification d'un diagnostic

inexact ; les conséquences pour la famille ; le mécanisme de l'intervention diagnostique aussi bien que les risques entraînés, le type d'information que la procédure peut ou ne peut plus fournir et le coût.

6. L'intimité du patient doit être scrupuleusement protégée ("patient" signifie mère du fœtus, et dans la plupart des cas aussi le père). Ceci présente de plus en plus de difficultés avec les registres génétiques, les banques de données médicales. Malgré tout, il existe une obligation morale et légale de protéger les patients. Un patient individuel ne devrait jamais être identifiable sur des collections de données épidémiologiques. Les désordres génétiques individuels sont souvent concentrés dans des races particulières; des soins spéciaux devraient être pris dans la présentation publique des données pour ne pas perpétuer les exemples passés de mauvaises informations et de stigmatisation de groupes particuliers.
7. La réalisation de l'amniocentèse chez un médecin privé, et l'utilisation de laboratoires commerciaux ne doivent pas entraîner une diminution du contrôle de qualité dans le diagnostic prénatal. Les médecins doivent démontrer une compétence dans la technique avant de l'appliquer à leurs patients.
8. La distinction entre des tentatives de diagnostic prénatal dans un but de recherche et le diagnostic prénatal comme un service relativement de routine devrait être claire dans l'esprit aussi bien des gens pratiquant la procédure que de leurs clients. Dans le cas de la recherche, les chercheurs sont sous une forte obligation morale et légale de faire que leurs patients comprennent qu'ils sont des sujets expérimentaux aussi bien que des patients qui pourraient bénéficier de la procédure.
9. Le droit au diagnostic prénatal est fondamental même si on exclut l'avortement ; de toute façon l'avis des parents doit être respecté et leur information doit être complète.
10. Le test de détermination du sexe doit être fait et encouragé dans le cas des maladies liés au sexe.
11. Il faut s'opposer fortement à chaque mouvement visant à faire du diagnostic du sexe et de l'avortement sélectif une sorte de pratique médicale ordinaire, il ne faut pas de restriction légales sur l'assurance du sexe foetal, ceci violerait les objectifs de non interférence avec le choix des parents.

12. La animation néonatale et le traitement des nouveaux-nés doivent être envisagé avant d'entrevoir l'avortement.
13. L'existence du diagnostic prénatal ne devra jamais être utilisée comme une justification pour l'arrêt du support et des services utilisés pour ceux qui sont nés avec des maladies diagnostiquables prénatalement.
14. Il faut une priorité d'utiliser le diagnostic prénatal aussi chez les patients au niveau d'éducation et de revenus inférieurs.
15. Le gouvernement, la profession médicale, les fondations et les agences pour la santé devraient faire plus pour rendre l'existence du diagnostic prénatal plus largement connu.  
Il faut également noter un point important, c'est l'utilisation de l'information après le diagnostic prénatal.

##### **5. Problème éthique et morale**

Le résultat désiré et projeté du diagnostic prénatal est l'information sur la présence ou l'absence d'une maladie possible ou d'une défection du foetus. En pratique le test est négatif dans 96 % des cas d'amniocentèse, ce qui diminue beaucoup l'anxiété pour les familles, de plus, les grossesses qui auraient dues être terminées pour un risque substantiel d'anomalie peuvent être portées à terme.

Les alternatives après un tel diagnostic comprennent soit l'avortement, soit le traitement du foetus dans les rares cas ou une thérapeutique prénatale est, ou pourrait être possible, soit porter la grossesse à terme et indiquer aux parents l'aide disponible après l'accouchement. Chacune de ces alternatives est en relation intime avec les vues individuelles de la morale de l'avortement. Les considérations morales font qu'il est impératif de séparer le fait d'un diagnostic positif du choix à prendre.

Ce que les parents décident de faire n'est pas automatiquement guidé par le diagnostic, mais doit aussi l'être par leurs vues morales et sociales.

De toute façon le diagnostic prénatal donne des informations qui peuvent réhausser la liberté et la responsabilité des parents dans la décision finale ; cependant le manque d'un consensus moral sur l'avortement est inapproprié.

Une étape plus loin, un des buts ultimes du diagnostic prénatal est : le traitement et éventuellement la guérison des maladies du fœtus et de l'enfant. Plusieurs dizaines d'années de travaux seront nécessaires pour faire des progrès, et pour le moment, l'avortement est une réponse limitée et imparfaite si une thérapeutique effective est manquante. L'avortement n'est jamais thérapeutique pour le fœtus, mais il est justifié normalement pour le soulagement de la souffrance et du fardeau de la famille et de la société.

De toute façon la base morale doit favoriser la protection du choix individuel et l'autonomie des parents même si l'on est en désaccord avec leur choix. Le profond conflit des valeurs, incorporé dans le débat de l'avortement ne peut pas être finalement résolu avec des lignes de conduites. Ces dernières ne peuvent pas, de toute façon, réconcilier les vues de ceux qui croient que l'avortement est réellement mauvais sans exception, avec les vues de ceux qui ne l'excluent pas comme palliatif. Ces lignes de conduites tentent de respecter le pluralisme des valeurs sur l'avortement qui existe dans la société, en offrant en même temps une conduite consciente dans les cas spéciaux qui sont causes de soucis.

Donc au début du deuxième trimestre où au cours du troisième trimestre de la grossesse l'obstétricien disposera éventuellement pour le dépistage d'une D.F.N. :

- de l'échographie,
- du dosage de l'AFP dans le sérum maternel,
- de l'amniocentèse pour le dosage de AFP et de AChE (AFP LA AChE)
- éventuellement autres examens tels que foetoscopie.

### C. L'échographie (ou échotomographie)

L'échographie est devenue la "plaque tournante" de la médecine avant la naissance (53). C'est une exploration indispensable pour le diagnostic des malformations foétales et en particulier pour les DFTN. L'échographie est devenue un extraordinaire moyen de connaissance de la vie foetale normale, non seulement de l'anatomie mais également de sa physiologie et surtout de sa pathologie (112).

Avec le dosage de l'AFPSM., elle est la plus prisée actuellement dans l'optique d'un dépistage de masse. Elle permet la recherche de malformations morphologiques et prépare l'amniocentèse précoce, la foetoscopie ou le prélèvement de sang in utero

C'est l'américain WILD le premier qui a utilisé en 1952 un écho ultrasonore en médecine. L'anglais Ian DONALD en 1958, entrevoit l'intérêt de cette nouvelle technique d'exploitation du corps humain en obstétrique. En 1970, ses indications commencent à s'étendre. Et ce n'est qu'en 1978, grâce aux formidables progrès accomplis dans l'appareillage et avec l'aide de l'informatique que l'on peut explorer les organes en temps réel et améliorer considérablement la qualité des images et de leur interprétation par la visualisation des échos ultrasonores sur écran. C'est grâce également à la restitution d'une "échelle de gris" pour visualiser les différents tissus.

#### 1. Principes

Plusieurs procédés sont utilisés pour constituer une image, entre lesquels il existe de nombreux points communs.

Dans tous les cas l'appareil comporte une sonde émettrice-réceptrice. Cette sonde est constituée d'une céramique piezo-électrique qui a la propriété de transformer un signal électrique en onde ultrasonore (émission) et inversement de transformer une onde ultrasonore en un signal électrique (réception).

L'onde émise est un signal très bref (un millionième de secondes) de fréquence élevé (par ex. 3 ou 5 MHz), qui se propage dans les tissus à la vitesse du son ( $c = 1\ 500\text{ m/s}$ ). A chaque séparation entre deux milieux (limite d'un organe, paroi d'un vaisseau, hétérogénéité d'un tissu) une partie de l'énergie ultrasonore incidente est réfléchiée et revient à la sonde. Ces échos reçus par la sonde et qui se succèdent au cours du temps correspondent donc à des "cibles" réfléchissantes de plus en plus éloignées. Le temps qui s'écoule entre l'émission et le retour d'un écho



est directement lié à la profondeur de la cible ( $t = 2 x/c$ ). Cette information de temps est exploitée pour présenter sur l'écran les échos le long d'une ligne à un emplacement défini par leur temps d'arrivée. Il y a une proportionnalité directe entre l'espace qui sépare deux échos sur l'écran et la distance réelle qui sépare les deux cibles ayant renvoyés ces échos. C'est ainsi que l'on peut facilement effectuer des mesures sur des images échographiques.

L'amplitude de l'écho sert à le représenter sous la forme d'un point plus ou moins brillant sur l'écran.

Lorsque tous les échos intéressants ont eu le temps de revenir (pour recevoir les échos de structures situées jusqu'à une profondeur de 20 cm, il faut moins d'un millième de seconde), on émet à nouveau une impulsion ultrasonore et ainsi de suite. Cela signifie qu'on peut explorer les structures situées sur la ligne de tir de la sonde ultrasonore plus de mille fois par seconde.

Pour former une image complète, il faut déplacer la sonde de telle sorte qu'un grand nombre de lignes soient explorées. Pour présenter ces lignes sur l'écran, on tient compte de la position de la sonde et de l'orientation de la ligne de tir afin que la géométrie des structures soit respectée.

## 2. Matériel

### 2.1. Différentes techniques

Parmi les différentes techniques ultrasonores utilisées en imagerie médicale, on peut citer :

- l'échographie A (Amplitude) qui retranscrit chaque écho dans la direction du faisceau ultrasonore,
- l'échographie B (Brillance), où chaque pic du tracé A est remplacé par un point. En déplaçant la sonde, on enregistre la structure échographique des tissus traversés, il s'agit donc d'une échotomographie.
- le mode D (Dynamique), quant à lui, fournit une image en temps réel. C'est le renouvellement continu des impulsions ultrasonores à partir, non plus d'une sonde unique, mais d'une "barrette" contenant plusieurs faisceaux, qui permet d'obtenir une image dynamique.
- Enfin le mode T.M. (Temps Mouvement), surtout utilisé en cardiologie.

## 2.2. Différents appareils

D'un autre côté, il existe plusieurs catégories d'appareils qui se différencient par la méthode utilisée pour le balayage.

a) **Echographes à balayage manuel** (fournissant des images statiques, la sonde est déplacée à la main sur la peau du patient). Elle est fixée sur un bras articulé qui impose que le mouvement ne se reproduise que dans un plan bien déterminé et qui permet à chaque instant de repérer la position de la sonde dans ce plan. Ainsi, la ligne où les échos sont représentés peut elle être orientée sur l'écran de façon semblable à la ligne de tir.

Au cours du "balayage", l'image se dessine peu à peu sur l'écran. Pour obtenir une coupe complète, il faut quelques secondes.

b) **Echographes en temps réel** (balayage automatique rapide). Le balayage manuel n'exploite pas au maximum les possibilités des ultrasons. Ils permettent d'explorer de l'ordre de 2 000 lignes/s. Or une centaine de lignes est un nombre suffisant pour obtenir une bonne image.

Dans ces conditions, le balayage doit être fait en 1/20ème de secondes, ce qui est trop rapide pour la main. Les principaux procédés utilisés pour accroître la rapidité du balayage sont les suivants :

- balayage sectoriel mécanique.

Un moteur fait tourner ou osciller la sonde autour d'un axe. Les lignes de tir sont donc orientées radialement autour de cet axe et l'image a la forme d'un secteur angulaire.

- balayage linéaire électronique.

Au lieu d'avoir une seule sonde à déplacer rapidement, on utilise un grand nombre de petites sondes juxtaposées le long d'un barreau rigide. Ces sondes sont sélectionnées électroniquement les unes après les autres pour fournir les lignes successives de l'image. Dans ce cas l'image est formée de lignes parallèles et a un format rectangulaire.

- balayage sectoriel électronique.

C'est le même procédé de balayage mais sur une sonde convexe, on obtient des images de format sectoriel.

### **Intérêt de l'échographie en temps réel.**

La possibilité d'obtenir une image dans le temps le plus bref possible (1/20es) a pour conséquence de permettre la présentation des images à cadence rapide (20 par seconde) et de voir les structures se déplacer au cours du temps.

Les mouvements apportent une bonne reconnaissance des organes. De plus, lorsque la sonde est déplacée, on voit défiler sur l'écran une succession de plans de coupe qui donnent l'information sur tout un volume ; cela permet d'explorer une zone difficile sous un grand nombre d'incidences jusqu'à l'obtention du meilleur plan de coupe.

La souplesse d'utilisation, la possibilité de voir bouger les organes, ainsi que l'excellente définition des images que l'on obtient aujourd'hui font que ces appareils "en temps réel" sont de plus en plus répandus.

### **3. Utilisation de l'échographie**

Incontestablement, ce sont la gynécologie, la gastroentérologie et la cardiologie qui sont les domaines privilégiés de l'échographie ultrasonore.

Ainsi, il est inconcevable aujourd'hui de surveiller une grossesse sans échographie, tant au point de vue de la santé publique que du point de vue de l'économie de santé. Des études l'on prouvé : la pratique minimum de deux échographies en cours de grossesse permet, sans augmenter les dépenses de santé, de réduire notablement la mortalité et la morbidité périnatales.

Les conditions sont ici tout à fait privilégiées : milieu aqueux sans interposition d'air, ni de structures osseuses.

Tout au long de la grossesse, on apporte ainsi des renseignements d'une grande précision :

- diagnostic de la grossesse dès la cinquième semaine d'aménorrhée
- diagnostic précoce des grossesses multiples ou pathologique (môle hydatiforme)
- évaluation de la vitalité foetale par l'observation des battements cardiaques (7e 8ème semaine) et des mouvements actifs de l'embryon.
- Détermination précise de l'âge gestationnel par la mesure de l'embryon (longueur crâne-sacrum) puis du diamètre bi pariétal.

- Dépistage des retards de croissance intra-uterins,
- Localisation du placenta,
- dépistage des malformations foetales qu'il s'agisse des DFTN, des membres, de la face, des reins ou du squelette identifiables lors d'un premier examen, à la 19e semaine de grossesse, ou qu'il s'agisse d'anomalie digestives ou cardiaques que l'on peut déceler lors d'un second examen à la 31e semaine.

La meilleure période d'exploration du rachis se situe entre 16 et 20 semaines d'aménorrhée car il est bien déroulé et rectiligne, et la quantité de LA permet en général l'obtention de bonnes images, de plus, cette période étant la même que celle préconisée pour l'amniocentèse, il est alors possible de coupler les deux examens. L'examen se fera dans le sens longitudinal et transversal, segment par segment, de manière à apprécier les lames vertébrales postérieures et l'arc postérieur.

#### 4. Avantage et inconvénients

Force est de constater aujourd'hui que l'échographie ultrasonore est devenue un examen complémentaire de première intention dans de nombreuses circonstances pathologiques et que ses indications sont extrêmement larges.

Plusieurs raisons expliquent cet essor de l'échographie.

Tout d'abord, son emploi est extrêmement simple : on peut l'utiliser aussi souvent que l'on veut sans la moindre intervention, ni anesthésie.

Surtout elle n'entraîne pratiquement aucun risque d'effets biophysiques dangereux pour la santé par rapport aux techniques d'imagerie médicale utilisant les rayons X ou gamma.

Le faible coût des appareillages et bien sûr l'amélioration importante de la qualité des images sont autant d'atouts pour l'échographie.

L'échographie est devenue le moyen le plus simple de compléter un examen clinique soigneux.

Néanmoins, surtout pour les DFTN, tout n'est pas détectable par échographie. La détection d'une grosse DFTN tel que l'anencéphalie devrait toujours être possible à la 16ème semaine de grossesse, mais une petite défection est souvent ratée ou détectée par erreur par l'ultrason.

Le dépistage n'a pas été minutieusement testé objectivement et son taux d'erreur dans la détection du SB n'est pas bien défini.

L'efficacité dans le diagnostic des SB ouvert est bien en dessous des espérances de 33 à 36 % jusqu'à 80 % si on a un centre spécialisé, d'autres résultats donnent 40 % de taux de détection et 100 % de spécificité (83).

Huit sur dix DFTN devraient être démontrés par un ultrason attentive, mais cela grâce à un taux élevé d'AFP dans le sérum maternel qui fait suspecter une malformation.

L'examen ultrason seul est d'une sensibilité insuffisante pour détecter de petites DFTN

On utilise le terme d'**échographie de routine** pour décrire l'examen fait par le radiologue ou un obstétricien seul, principalement pour établir l'âge gestationnel et pour détecter une grossesse multiple ; et le terme de **diagnostic ultrason**, l'examen entrepris par un radiologue expérimenté ou radiologiste pour démontrer ou exclure la présence d'un DFTN

Par ailleurs l'échographie reste un meilleur test que la répétition de l'amniocentèse surtout si la grossesse a dépassée 20 semaines.

En fait dans un programme de dépistage systématique des DFTN, il est clair qu'un bon support de diagnostic ultrason est essentiel (85).

Les utilisations spécifiques de l'ultrason dans ce but incluent :

- L'estimation exacte de l'âge gestationnel, pièce extrêmement importante de l'information car elle impose la signification du résultat de l'AFP SM et dans une moindre mesure, les résultats de l'AFP du LA
- L'ultrason permet également de réduire les faux positifs du dépistage par l'AFPSM en augmentant l'exactitude de l'estimation de l'âge de gestation. Les estimations conventionnelles basées sur le 1er jour de la dernière période menstruelle sous-estime parfois l'âge de la grossesse et, puisque le taux d'AFP est normalement élevé pendant le deuxième trimestre, l'effet de cette erreur peut être un taux d'AFP faussement haut dans une grossesse non affectée.

D'un autre côté, la détermination ultrason de l'âge est sujette à des "distorsions" dans la direction opposée en cas de SB ; des études ont montré que le diamètre bipariétal du crâne foétal tend à être petit pour l'âge de la grossesse.

Puisque les grossesses à SB peuvent être regardé comme moins mature, ceci peut augmenter la valeur de l'AFP, la faisant apparaître plus jeune parce que associé avec un âge plus jeune. Cela tend aussi à changer la courbe de distribution de l'AFP du SM. des grossesses à SB vers la droite, loin de la courbe des grossesses non affectées et réduisant le chevauchement des deux populations pour l'AFP

On exclut les grossesses multiples, avortements spontanés, conditions qui sont associés avec l'augmentation de l'AFP du sérum.

Les faux négatifs sont surtout de petites anomalies de la 5ème vertèbre lombaire et sacrée ; pas de faux positifs.

L'échographie et l'AFP devraient être regardées comme complémentaires plutôt que compétitives.

##### **5 - Evaluation ultrason de l'axe neural foetal normal et anormal**

Bien que l'ultrasonographie (USG) ait été appliquée au cerveau aux environs de 1942, la démonstration de l'anatomie et du développement du cerveau foetal est l'une des plus récentes acquisitions de l'USG. La technologie actuelle rend possible la différenciation visuelle de tissus très proches, grâce à une échelle étendue de tonalités ; à la focalisation des faisceaux sonores et à l'usage de fréquence élevée autorisé par la faible atténuation des sons par le crâne du foetus ; la pénétration d'énergie est suffisante pour atteindre le cerveau en entier.

L'usage d'équipements USG en temps réel aide au repérage rapide des structures cérébrales et à leur orientation, tandis que les systèmes automatisés en temps différé permettent d'obtenir de nombreuses sections à intervalles rapprochés dans tous les plans.

Les images du cerveau du foetus sont, dans l'ensemble, très semblables à celles du nouveau-né ; La comparaison entre les images foetales et néonatales est souvent fructueuse pour l'identification et la vérification des structures décrites.

L'examen échographique "in situ " a permis de montrer un grand nombre de parties du cerveau à la manière d'un atlas anatomique. Les images USG sont estimées normales quand elles sont similaires aux planches anatomiques publiées dans les ouvrages spécialisés. La connaissance de l'anatomie est le résultat d'une confrontation minutieuse entre les coupes anatomiques du cerveau disponibles dans de nombreux ouvrages et les échogrammes effectués dans des plans bien connus.

Une série d'observations clés ont amené à la délimitation claire du développement neuroanatomique normal vue par ultrason.

- La 1ère étant la réalisation que le plexus choroïde normal et les citernes subarachnoïdes étaient très échogéniques donc on peut localiser les ventricules latéraux avec certitude.
- La 2ème étant la délimitation de la tige cervicale, des pédoncules cérébraux et de la fissure de Sylvius en traçant la vascularisation artérielle normale cérébrale.
- La 3ème étant l'identification correcte de fentes apparentes sur le 3e ventricule séparant le noyau thalamique.

On a pu ainsi construire une charpente logique pour identifier plusieurs structures neurales fines.

### 5.1. Axe neural normal

Le développement du crâne foetal peut être reconnu à partir de 8 à 9 semaines après la conception. A cette étape, les constituants crâniens sont presque entièrement des vésicules cérébrales remplies de liquide qui deviendront des ventricules latéraux.

- A la 12e semaine les ventricules latéraux sont reconnus comme des cavités remplissant la majorité de la voûte crânienne et contenant le plexus choroïdique échogénique.
  - A la 15e semaine, ces frontières sont plus clairement définies ; les cornes antérieures des ventricules latéraux apparaissent "fluides", à l'opposé du corps du ventricule qui lui apparaît "solide". Le thalamus forme le mur latéral du 3e ventricule.
  - A la 17e semaine, prolifération rapide du cortex qui est reconnu par séparation progressive du mur latéral du ventricule latéral.
  - A la 20e semaine, les ventricules latéraux conduisent au modèle caractéristique qui est reconnu pendant tout le reste de la gestation.
- Entre la 24e semaine et le terme, le cerveau subit un petit changement structural qui augmente les circonvolutions corticales reconnues.

La majorité des anomalies foetales qui affectent le S.N. sont apparentes à ce stade, beaucoup sont reconnues plus tôt.

## 5.2. Axe neural foetal anormal

**L'anencephalie** : Le plus grand succès du diagnostic échographique des DFTN, ne pose plus aucune difficulté aujourd'hui. Elle est découverte le plus souvent échographiquement au moment de la détermination de l'âge foetal ; l'absence de contour céphalique normal est reconnaissable à 10 ou 12 semaines. Des anomalies associées peuvent être démontrées par ultrason et doivent être recherchées.

**Hydrocéphalie** : L'anomalie est décelable dès le début de ses manifestations anatomiques et à la fin du 1er trimestre parfois, la dilatation anormale des ventricules est décelable précocement, en mesurant la largeur de chaque ventricule latéral et de l'hémisphère cérébral correspondant ; le rapport entre ces deux largeurs VL (mm) DBP/2 varie avec l'âge gestationnel.

L'anomalie devrait être détectable avant que la distension ne provoque un élargissement du DBP, malgré tout le taux d'obstruction n'est pas sans utilité, maintenant que l'on peut faire des "shunts" thérapeutiques intrautérin.

**L'hydranencephalie** : Caractérisée par l'absence de cortex cérébral. Les hémisphères cérébraux sont réduits à des sacs membraneux remplis de liquide. Les structures intracérébrales ne sont pas bien visualisées ; la cavité centrale est souvent élargi ; on n'a pas d'écho central mais le 3e ventricule peut être délimité. Ce qui reste du tissu cérébral est visualisé au dessus de la tente du cervelet.

**L'encéphalocèle** : Classé selon la nature des tissus herniés, il ressemble à l'échographie d'un Spina Bifida kystique, d'un hygroma ou lymphangiome, à un hémangiome ou tératome. L'image échographique dépend aussi de la structure herniée : tissu cérébral, liquide céphalo-rachidien, ou ventricules. Leur identification demeure difficile.

**Myélomeningocèle, Spina Bifida** : La moelle foetale est clairement évaluée à 16 ou 17 semaines. Les centres d'ossification postérieurs normaux sont vus comme deux lignes d'écho parallèles espacées qui s'élargissent normalement dans la région cervicale. La distance entre les centres d'ossification postérieurs est équivalente aux distances interpédiculaires. Dans le plan transversal de coupe, trois centres d'ossification sont identifiés.



Dans le SB, il y a une séparation sur les plans transversaux et longitudinaux des centres d'ossification postérieur. Le SB peut être diagnostiqué si les centres d'ossification postérieurs s'étendent extérieurement ou déploie un U, la fente dans le tissu mou peut souvent être vue. Les déflections reconnues dans cette forme sont facilement diagnostiquées si plus de trois segments sont entraînés. Si deux ou moins sont concernés, le diagnostic devient plus difficile. Ces traits doivent être utilisés pour faire le diagnostic si le sac est atteint, s'il est intact, l'anomalie est plus facile à reconnaître comme une extension kystique de l'aspect dorsal de la moelle.

Des anomalies associées comme l'hydrocephalie, l'encéphalocèle et la malformation d'Arnold Chiari doivent être recherchés.

## **6. Conclusion**

La qualité de l'équipement, la connaissance de l'anatomie cérébrale et la reconnaissance des artéfacts sont les trois éléments essentiels de la description correcte de l'anatomie échographique normale et pathologique du cerveau. Parmi les qualités techniques, la fréquence (3.5-5 Mhz) et la mise au point parfaite sont des éléments qui apportent la résolution indispensable à l'acquisition d'excellentes images. Le système en temps réel présente de nombreux avantages dont le moindre n'est pas l'aisance de manipulation qui facilite le repérage des plans adéquats et le repositionnement rapide après que le fœtus ait changé de position. En revanche, l'utilisation de systèmes à balayage composé permet d'effectuer des coupes successives à des intervalles bien déterminés et même très rapprochés (de 1 à 20 mm). Ces équipements sont recommandés quand le fœtus bouge peu.

Possibilités échographiques de diagnostic anténatal des malformations du crâne et du cerveau d'après ALVAREZ (1)

**(1) Défaut de fermeture du tube neural**

acranie,  
anencéphalie,  
esencéphalie,  
encéphalocèle, \*  
iniencéphalie, \*  
Arnold-Chiari, \*  
Holoprosencéphalie. \*

**(2) Défaut de migration cellulaire**

microcéphalie,  
craniosténose,  
syndrome de Kleeblattschadel ou crâne et trèfle \* ou clover leaf.

**(3) Augmentation de la taille des ventricules**

hydrocéphalie,  
hydranencéphalie,  
malformation de Arnold-Chiani,  
syndrome de Dandy-Walker.

**(4) Tumeurs**

Tératome, \*  
kystes arachnoïdiens, \*  
kystes de la fosse postérieure.

**(5) Anomalies détectables mais pas décrites**

Malformations artério-veineuse,  
porencéphalie,  
fentes médor-faciales : (a) maladie de Crouzon  
(b) syndrome d'Arpet.

\* Peuvent s'accompagner d'un degré variable d'hydrocéphalie.

Ils ne montrent pas aussi bien les structures pulsatiles (polygone de Willis, artères sylviennes) qui sont des marqueurs pour l'interprétation de l'image.

La connaissance de l'anatomie résulte des coupes anatomiques disponibles dans les ouvrages.

Les artefacts qui perturbent l'image du cerveau foetale ont des causes nombreuses ; certaines images donnent l'impression qu'il y a pathologie alors que le sujet est normal ; par exemple en confondant la scissure de Sylvius avec la paroi d'un ventricule latéral, le caveum septum pellucidum avec le 3e ventricule, un faux diagnostic d'hydrocephalie est posé.

Autre exemple, un fœtus normal risque d'être décrit comme anencéphale quand la position du crâne est trop profonde dans le pelvis, tandis que la description trop hâtive des contours crâniens peut faire manquer le diagnostic d'anencéphalie.

Quelques anomalies présentent parfois des signes semblables. Par exemple, en présence d'une masse rétro et paracervicale non échogène, parfois de grande dimension, il faut évoquer l'hygroma kystique et le spina bifida avec méningocèle et myéломéningocèle : le premier résulte d'une malformation des canaux lymphatiques, le deuxième est dû à un rachischisis et contient habituellement quelques échos.

Inexpérience, qualité médiocre de l'instrumentation sont des facteurs qui retardent la détection d'anomalies mais l'expérience de l'examineur et la recherche systématique d'anomalie priment certainement l'excellence du matériel ; la précocité du diagnostic dépend de l'attention portée à la description des structures, aux signes et à la fréquence de l'affection.

De toute façon, la vérification des anomalies ainsi détectées par des procédés diagnostiques différents doit être envisagée.

La confrontation entre les données échographiques, et les résultats biochimiques du LA. s'avèrent nécessaires, rendant alors l'aminocentèse obligatoire dans certains cas de SB. En effet, même avec l'augmentation de la fiabilité de l'échographie, il n'en demeure pas moins que certains SB sont difficilement détectables avant 20 semaines, même en cas d'échographie orientée, dans ces cas la positivité des marqueurs biochimiques du LA. apparaît très précieuse (37).

## D. L'amniocentèse

Longtemps considérée comme première étape du diagnostic prénatal, elle est maintenant pratiquée le plus fréquemment après un dosage plasmatique maternel d'AFP et une échographie. Elle consiste à ponctionner le sac amniotique qui entoure le foetus (poche des eaux), pour prélever du liquide amniotique.

A-t-elle encore une place dans le diagnostic prénatal ?

L'amniocentèse est-elle sans danger ?

Ces questions continuent à être posées; mais elle reste la pierre angulaire du diagnostic tant que d'autres méthodes n'ont été parfaitement évaluées.

L'amniocentèse a été en usage à la moitié du siècle. Initialement on utilisait l'injection d'un contraste radio-opaque pour délimiter le foetus et le placenta par amniographie (1930).

La limite de la méthode est surtout sa non utilisation avant la 15<sup>ème</sup> ou 16<sup>ème</sup> semaine de gestation, ce qui a permis le développement des méthodes pouvant être utilisées au 1<sup>er</sup> trimestre. Cependant elle reste la principale méthode du diagnostic jusqu'à ce que des méthodes alternatives soient aussi saines, aussi sûres et aussi largement utilisables.

En Angleterre et au Pays de Galles 2 à 5 % de toute les grossesses en cours sont investiguées par l'aminocentèse du milieu du 1<sup>er</sup> trimestre (1984) (73).

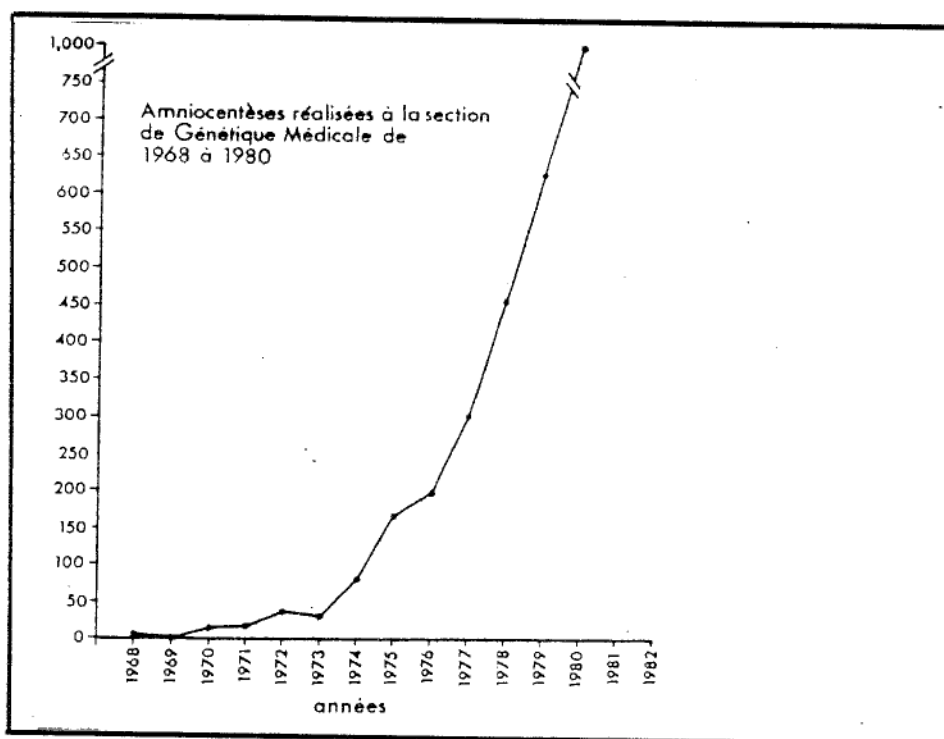
Dans la province de Québec (22) elle représente 1,5 % des naissances vivantes. De 1968 à 1980, la fréquence d'amniocentèse s'est accrue, dans une clinique de diagnostic prénatal (Hôpital Sainte Justine Montréal) de 5 à 954 par année. (Schéma 11).

### 1. Les analyses du liquide amniotique

La ponction de liquide amniotique n'est justifiée que lorsque l'étude des cellules foetales ou du liquide lui-même peut donner des renseignements utiles pour l'évaluation d'une grossesse à risque élevé.

Le LA. peut être analysé dans différentes voies en accord avec le désordre foetal pour lequel il est testé.

Schéma 11 d'après DALLAIRE (22)



Courbe indiquant l'accroissement annuel d'amniocentèse de 1968 à 1980 à la clinique de diagnostic prénatal de l'hôpital Sainte-Justine (Montréal).

Les plus largement utilisés :

- Des études biochimiques sur le surnageant pour la détection et la mesure de marqueurs de certaines anomalies foetales surtout les DFTN ouvertes.
- l'analyse chromosomique des cultures de cellules
- l'analyse des enzymes de ces cultures de cellules pour détecter des erreurs innées du métabolisme.

De récents progrès en technique de DNA et en carte génétique pourraient considérablement augmenter l'étendue des maladies pour lesquelles le diagnostic prénatal par amniocentèse est utilisable. (Schéma 12)

L'analyse du caryotype foetal et le dosage des AFP sont les épreuves les plus fréquemment utilisés. Les études enzymatiques, le dosage des disaccharidases et la mesure des mucopolysaccharides sont des épreuves spécifiques pour des maladies à incidence peu élevées. De routine, il est toujours procédé au dosage de AFP (incidence élevé des DFTN) quelque soit l'indication de l'amniocentèse et la disponibilité du liquide commande plus ou moins ce test systématique. S'il s'agit du dépistage d'une maladie métabolique. Le caryotype foetal n'est complété que si les éléments cellulaires sont encore en nombre suffisants après la mesure de l'activité enzymatique recherchée.

#### AFP - AChE (voir chapitre plus loin)

AFP est un antigène oncofoetal, sa présence a été rapportée pour la première fois dans le serum foetal par Berstrand et Czar (1956), le premier diagnostic prénatal d'une anencéphalie et d'un SB ouvert a été fait sur la supposition que si on a une communication entre circulation foetale et liquide amniotique, il en résulterait une augmentation du taux d'AFP du LA.. Les D.F.T.N. fermés ne peuvent pas être détectés par cette méthode. On a également rapporté des taux élevés d'AFP du LA. avec une variété d'autres malformations, (Schéma 13), en particulier :

- défection de la paroi abdominale,
- forme finale de néphrose congénitale.

Schéma 12 d'après Mc NAY (73)

Fluid component		Laboratory analysis	Examples of conditions diagnosed
Supernatant		Alpha fetoprotein, acetylcholinesterase	Neural tube defects
		enzyme deficiencies	Inborn errors of metabolism eg adrenogenital syndrome
Cells	Direct examination	Fetal sex	To identify male requiring further investigation in X-linked disease, eg haemophilia and Duchenne muscular dystrophy
		DNA analysis	Sickle cell disease Thalassaemia
	Cultured cells	Chromosomal analysis	Trisomy 21 (Down's syndrome) Trisomy 18 (Edward's syndrome) 45XO (Turner's syndrome)
		Enzyme deficiencies	Hunter's syndrome Hurler's syndrome Niemann-Pick disease Tay-Sachs disease
	DNA analysis	Sickle cell disease Thalassaemia	

## Les analyses du liquide amniotique

Schéma 13 d'après DALLAIRE (22)

Patientes chez qui une valeur élevée d'AFP a été retrouvée au second trimestre de la grossesse dans le liquide amniotique.			
Diagnostic	Nombre	Diagnostic	Nombre
Anencéphalie	48	Chorio hémangiome	1
Spina bifida	22	Hunter	1
Mort foetale	13	Ostéogénèse imparfaite	1
Malformations multiples	6	Hydramnios	1
Reins polykystiques	2	Syndrome d'Aldrich	1
Syndrome néphrotique	2	Turner	1
Gastrochisis	2	Nouveau-né normal	5

Patientes chez qui une valeur élevée d'AFP a été retrouvée au second trimestre de la grossesse dans le liquide amniotique.

et d'autres moins communes comme - syndrome de Turner, teratome sacrococcygien  
 - syndrome de Meckel  
 - choriohémangione.

Dans l'espoir d'améliorer l'exactitude de l'AFP comme marqueur singulier des D.F.T.N., la proportion de quelques uns de ces composants et d'autres constituants du LA. ont été évalués ; le plus intéressant est l'AChE.

### Analyse chromosomiale

A partir des cultures de cellules du LA. on a fait le caryotype (1966) donnant les moyens du diagnostic prénatal d'anomalie chromosomiale.

On peut reconnaître facilement un chromosome en plus. Une des plus récentes applications a été la détection du Syndrome du X fragile (Turner 1974) Webb (1973), un désordre récessif du X lié estimé affecte 1 mâle/5 avec un retard mental non spécifique.

### Sexe foetal

Si on a un risque sérieux de handicap par désordre récessif du X lié, on peut le voir par le caryotype des cellules du LA. en culture ou plus rapidement mais moins précisément par l'examen direct des cellules. Pour d'autres désordres un diagnostic spécifique est possible suivi d'un test définitif pratiqué sur la culture de cellule, exemple : syndromes de Hunter, de Hurler, ou sur le sang foetal obtenu par foetoscopie ex : hémophilie.

Si le test définitif est impossible (ex : dystrophie musculaire de Duchenne), les parents peuvent accepter l'avortement sélectif des foetus mâles.

### Les erreurs innées du métabolisme

Environ 70 des 200 erreurs métaboliques innées connues peuvent être diagnostiquées prénatalement de l'analyse enzymatique de la culture de cellules du LA.. Certaines peuvent être diagnostiquées de l'analyse biochimiques du liquide lui-même. Les recherches essaient d'établir des méthodes pour détecter directement la plupart de ces désordres. (Schémas 14 et 15).



Schéma 14 d'après DALLAIRE (22)

Maladie métabolique	Épreuve diagnostique
Acidémie méthylmalonique	Méthylmalonyl-CoA mutase
Cystinose	Captation de Cystine S <sup>35</sup>
Gangliosidose GM <sub>1</sub>	β-galactosidase
Gaucher	β-glucosidase
Hyperglycinémie	Glycine
Hyperphosphatasie	Phosphatase alcaline
Leucidose	Décarboxylase acide
Leucodystrophie métachromatique	Arylsulfatase A
Lesch-Nyhan (syndrome de)	HGPRT
Menkes	Captation du cuivre
Mucopolipidose type II	Hydrolases lysosomiales
Mucopolysaccharidose MPS I	α-iduronidase
Mucopolysaccharidose MPS II	Sulphoïduronate sulfatase
Nieman-Pick	Sphingomyélinase
Pompe	α-glucosidase
Sandhoff	Hexosaminidase A et B
Tay-Sachs	Hexosaminidase A
Tyrosinémie	Inhibition de la δ-amino-lévéulinate déshydratase
Wolman	Estérase acide
Zellweger	Acide pipécolique
Syndrôme néphrotique	AFP
Atrésie intestinale multiple	Disaccharidases
Maladie rénale polykystique	Tréhalase

Exemple de maladie métabolique ou syndrome héréditaire étudié sur le liquide amniotique

(Tests réalisés à la section de génétique médicale de l'hôpital Sainte-Justine de Montréal)

Schéma 15 d'après DALLAIRE (22)

Maladie	Épreuve diagnostique
<b>Métabolisme des lipides</b>	
Fabry	α-galactosidase
Krabbe	β-galactosidase
Farber	Céramidase
<b>Maladie de surcharge</b>	
Scheie (MPS IS)	α-iduronidase
San Filippo A (MPS III A)	Sulphamidase
San Filippo B (MPS III B)	α-acetyl-glucosaminidase
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arylsulfatase B
Mucopolipidose II et III	Hydrolases lysosomiales
Mucopolipidose IV	Microscopie électronique
Fucosidase	α-fucosidase
Mannosidose	α-mannosidase
Sialidose	Sialidase
<b>Métabolisme des acides aminés</b>	
Acidurie arginosuccinique	Arginosuccinase
Citrullinémie	Arginosuccinate synthétase
Homocystinurie	Cystathionine synthétase
Acidémie propionique	Propionyl CoA carboxylase
Tyrosinémie	Succinylacétone
<b>Métabolisme des hydrates de carbone</b>	
Glycogénose type IV	Transglucosidase
Galactosémie	Gal-1-Puridyl transférase
<b>Divers</b>	
Syndrôme immunodéficient	Adénosine déaminase
Xeroderma pigmentosum	Réparation du DNA
Hyperplasie des surrénales	Liaison au HLA-B
Déficience en phosphatase acide	Phosphatase acide

Autres maladies métaboliques  
décelables in utero

### Nouvelles techniques

La technologie du D.N.A. a progressé à grands bonds.

Le premier diagnostic prénatal utilisant les techniques de restriction enzymatique date de 1978 (Kam et Dozy) pour la "maladie des cellules falciformes".

Le potentiel de cette technique est énorme et reste à être précisé.

Egalement, on peut couper le D.N.A. et lier le locus en tenant le gène défectueux à un groupe du sang, H L O, ou autre marqueur que l'on peut reconnaître.

### 2. Les indications

A qui doit-on faire l'amniocentèse ? Question simple à poser mais il est difficile de répondre.

Néanmoins des guides peuvent être donnés.

Le conseil génétique joue un rôle majeur en permettant au couple de mesurer les risques d'avoir un enfant atteint et de décider si oui ou non il faut entreprendre un diagnostic prénatal.

La plupart des anomalies congénitales peuvent être considérées dans une des quatre catégories suivantes :

- a) celles associées à la défection d'un simple gène,
  - b) anomalies chromosomiques,
  - c) celles à origines multiples,
  - d) celles dues à l'environnement.
- a) Pour le gène soit l'un, soit les deux parents sont porteurs de la maladie à transmission connue. Les risques appropriés d'apparaître doivent être expliqués et si le diagnostic prénatal par amniocentèse est utilisable, il doit être offert.
  - b) La situation est également claire. Si un parent a une translocation connue ou en mosaïque, ou si le couple a déjà eu un enfant avec une anomalie chromosomique, (la Trisomie 21 est la plus fréquente).

Le risque d'avoir un enfant avec ce désordre augmente avec l'âge maternel. Différentes opinions sur l'âge à laquelle les mères devraient faire une amniocentèse pour analyse chromosomique. 37 ans est un compromis bien que d'autres évoquent 35 ans. En France la gratuité de l'examen est offert à 38 ans mais en raison du manque d'équipe spécialisée, la moitié d'entre elles y ont accès (schéma 16).

c) Pour les anomalies congénitales d'origine multifactorielle, les DFTN forment le plus grand groupe pour lequel le diagnostic est utilisable :

- Si on a déjà eu un enfant affecté, risque de récurrence de 1 à 20 augmente de 1 à 8 si 2 enfants affectés,
- Si l'un des parents a un SB, 1 "chance" sur 30 que foetus ait un DFTN,
- Si histoire familiale plus éloignée de cette déformation, risque plus bas,
- Si le patient est identifié à risque par le dépistage de l'AFP SM, le taux d'amniocentèse reste en dessous de 0,7 % des grossesses dépistées si on a deux échantillons de AFP MS avec 2,8 MOM

Un taux élevé dans le sérum en présence d'une concentration normale dans le LA peut être associée avec une sortie de grossesse défavorable (par exemple avortement, mort foetale, prématuré) ou une grossesse multiple, ou peut rester inexpliquée.

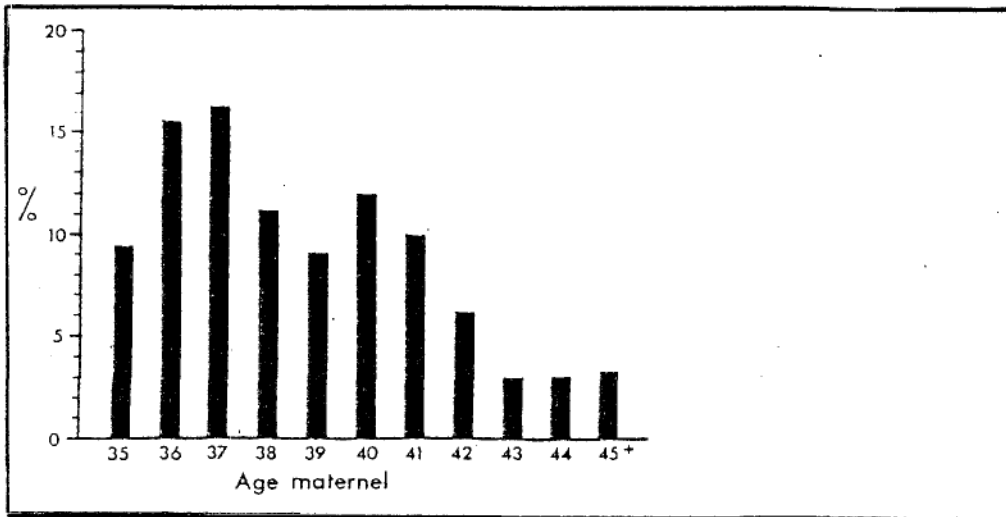
Tous ces cas nécessitent une amniocentèse pour AFP

La confiance à l'ultrason seule requiert un matériel très performant et une bonne expérience, ceci est rare alors l'amniocentèse reste le principal diagnostic dans de nombreux centres.

d) Anomalies liées à l'environnement. L'amniocentèse intervient pour une petite part dans le diagnostic d'anomalies dues à l'environnement comme les drogues, les radiations et les infections... Ces facteurs causent des dommages chromosomiques mais peuvent aussi être révélés dans les cultures de cellule du LA.

**En résumé :** Dans tous ces différents cas, l'amniocentèse doit être proposée. (Schéma 17).

Schéma 16 d'après DALLAIRE (22)



Histogramme illustrant le pourcentage de patientes qui ont subi une amniocentèse à cause d'un âge avancé.

Schéma 17 d'après DALLAIRE (22)

Raisons qui ont motivé une amniocentèse de 1971 à 1980

	1971-79 %	1979 %	1986 %
. Age maternel avancé.....	43	54	52
. Malformation du tube neural....	21	19	20
. T/21 antérieure.....	15	11	9
. T/21 familiale.....	6	7	6
. Maladie métabolique.....	2	2	3
. Autres (translocations chromosomiques, syndromes malformatifs.....)	13	7	10

### Pour les DFTN

L'amniocentèse est pratiquée s'il existe une notion de risque, représenté essentiellement par l'existence d'antécédents.

- antécédents dans la fratrie,
- antécédents parentaux,
- autres antécédents familiaux soit ascendants du couple,  
soit des collatéraux,  
soit des descendants des collatéraux.

également sous la rubrique "notion de risque" nous pouvons considéré la prise de valproate par la mère.

- L'amniocentèse est pratiquée car il existe une suspicion échographique et/ou un dépistage positive (2 AFP dans le SM élevé > 2.8 MOM) alors l'amniocentèse confirme les données précédentes.

#### 2.1. La date

La procédure elle-même est rapide et simple.

La date de l'amniocentèse, entre 15 et 17 semaines est imposée par différentes circonstances :

- la période des avortements spontanés par anomalies chromosomiques est alors révolue.
- le nombre de cellules vivantes provenant du foetus ou de l'amnios, desquamés dans le liquide amniotique, est suffisant pour réussir la culture ;
- l'oeuf occupe toute la cavité utérine,
- l'utérus est bien dégagé du pelvis
- le volume amniotique est suffisant (100 ou 180 ml)
- le cordon est suffisamment long pour que le foetus soit libre dans la cavité et puisse fuir éventuellement devant l'aiguille.

#### 3. La technique

Avant de pratiquer l'amniocentèse, il faut toujours prélever de 2 à 5 ml de sang pour le dosage des AFP sériques maternelles. Les AFP augmentent après la ponction et n'ont plus aucune valeur sur le plan diagnostique.

La technique est faite par un obstétricien expérimenté, sous contrôle échographique, ce qui permet de traverser le placenta sans encombre. C'est une technique aseptique. On introduit l'aiguille sous vision ultrason et sans anesthésie locale. L'échantillon est de l'ordre de 15 ml. Pour les femmes rhésus négatif, on recommande 250 UI d'immunoglobuline anti Rh pour éviter une isoimmunisation, surtout lorsque la ponction est transplacentaire. Il est essentiel que la ponction soit non traumatique. La présence de sang foetal ou maternel compromet de beaucoup le succès de la culture des cellules et du dosage de l'AFP et de l'ACHÉ.

L'adresse et l'expérience de l'opérateur est très importante. Le suivi ininterrompu avec l'ultrason en temps réel réduit au minimum le nombre de coups secs ou sanguins.

L'amniocentèse transplacentaire devrait être évitée pour minimiser les saignements. S'il n'y a pas d'espace apparemment clair pour l'aiguille, il faut atteindre l'étendue antérieure du placenta, on attend une semaine. (Schéma 18)

La qualité et le transport des échantillons est primordial.

La culture doit être immédiate après prélèvement et centrifugation.

L'échantillon de liquide doit être conservé à +4° C si on doit le transporter ; les cellules amniotiques peuvent conserver leur viabilité à 4° C pendant plusieurs jours mais elles se détériorent rapidement dès leur mise à température ambiante.

#### 4. Risques

Les bénéfices sont toujours en balance avec les risques, l'amniocentèse ne fait pas exception. C'est l'interprétation variable des risques entraînés qui conduit à différentes opinions sur l'amniocentèse.

Les complications maternelles sont rares. La principale considération est l'effet psychologique sur le père et la mère ; le degré du stress est lié à la raison de l'amniocentèse. (plus de stress si l'indication est une AFPS.M. élevé). Il peut être allégé par un conseil génétique.

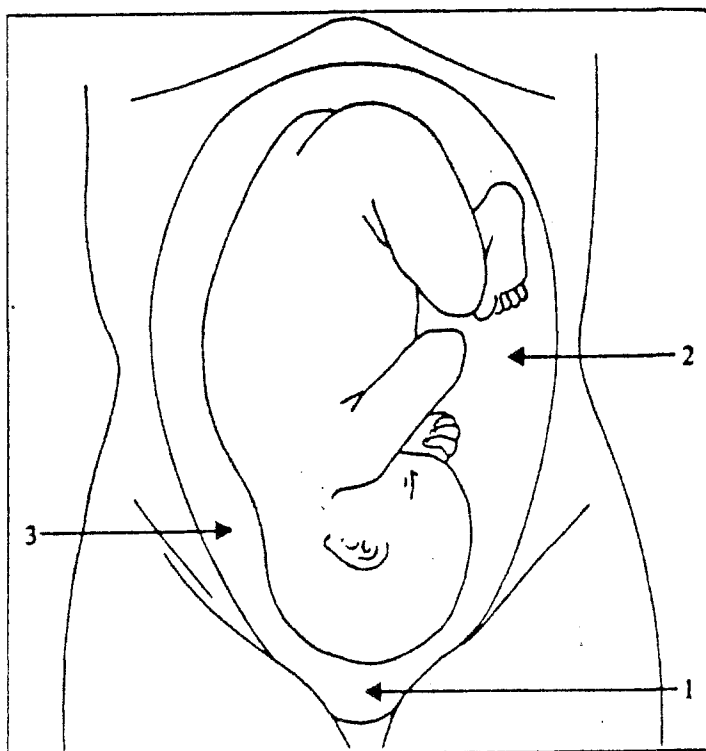
##### - Excès d'avortements liés à l'amniocentèse.

De 1 à 1,5 %, plus récemment on arrive à 0,3 %.

De grandes différences suivant les auteurs de 2,2 à 0,2 %.

Schéma 18 d'après MELLOWS (1980) *British Journal of Hospital Medecine* (Ref. 73)

Les trois sites possible de ponction pour une amniocentèse au 3ème trimestre



- Mort foetale et complications relatées avant 28 semaines.

Le saignement de la circulation foetale est usuellement le résultat de la ponction placentaire, maintenant évitable avec le contrôle ultrason. L'ex-sanguination foetale est une très rare complication, plus probable pour les amniocentèses tardives que celles d'un diagnostic prénatal.

L'infection est une complication rare, un cas mentionné.

- Taux de mortalité périnatale

Aucune des études collaboratives ne relève une augmentation significative du taux de mortalité qui serait attribué à l'amniocentèse.

- Perte totale attribuable à l'amniocentèse

En admettant que les risques d'avortement et de mort périnatale soient attribués d'abord à l'amniocentèse, il faut les relier à l'expérience de l'opérateur et il faut séparer les patients dont l'indication est une augmentation de l'AFP SM, de ceux qui ont un diagnostic pour une autre raison.

- Autres complications

Un travail prématuré n'arrive pas plus souvent chez les femmes qui ont subi une amniocentèse en milieu de 1er trimestre que chez les autres.

Une étude montre une augmentation des problèmes respiratoires néonataux inexplicables. On ne retrouve pas de trace dans les études américaines.

Autres complications suivant l'amniocentèse est une augmentation fréquente de sévères hémorragies antépartum résultant d'une rupture du placenta et une augmentation du nombre de déformation musculosquelettique chez les enfants, dû probablement à la compression in utéro due à la perte de LA. ; mais on a pas de relation systématique.

Des rapports isolés de traumatisme foetal, pouvant être reliés à l'amniocentèse du 1er trimestre, sont rapportés. Ils incluent des traumatismes tels que l'obstruction néonatale du petit intestin avec défection de la paroi abdominale épigastrique jusqu'à de petits traumatismes tels que cicatrices de peau.

Aujourd'hui les saignements foetomaternel n'arrive que dans 1 % des cas environ.



## E - L'alpha-foeto protéine (AFP)

L'AFP, isolé pour la première fois chez l'animal en 1944 par Pedersen, a été découvert dans le sang humain en 1956 par Berstrand et Czar. Chronologiquement Brock et Sutchliffe en 1972 publie la première étude rétrospective décrivant une association entre les DFTN foetales et un marqueur moléculaire : l'AFP ; Ils trouvent une concentration anormalement haute dans les LA. des grossesses qui conduisent à une anencéphalie, un SB ou différentes combinaisons de celles-ci.

Ceci a été confirmé dans de nombreuses études prospectives.

Puis Hino (1972) Brock (1973) et Leck (1973) ont reconnu en premier l'augmentation de l'AFP du sérum maternel dans les grossesses où le fœtus est porteur d'un DFTN ; Ce test sert de dépistage alors que AFP dans le LA est plus orienté vers le diagnostic .

### 1. Bases physiologiques

#### 1.1. Biochimie

L'AFP est une glycoprotéine, alpha globuline, contenant 4 % de sucre, le taux moyen d'acide sialique est de 2 résidus par molécule. L'AFP de fœtus normal et pathologique sont identiques même composition et même mobilité électrophorétique. Le poids moléculaire est environ de 40 000 ; la structure moléculaire de l'AFP et de l'albumine sont similaires mais de séquence différente et sont immunologiquement distinctes. L'AFP appartient à la catégorie des antigènes oncogènes. C'est une protéine montrant une forte expression dans les tissus fœtaux et une faible dans les tissus adultes correspondants mais qui peuvent réapparaître chez l'adulte (en présence de certains types de tumeurs telles que tumeurs malignes fœtales, teratocarcinomes, et tumeurs hépatiques primaires).

L'AFP est synthétisé par le sac hyalin (corps jaune), la détection est possible dans le sérum fœtal environ 30 jours après la conception. Puis comme il devient restreint à la fin du 1er trimestre, elle est synthétisée par le foie fœtal environ à partir de la 6ème semaine de gestation ; A la fin du premier trimestre elle est presque uniquement d'origine hépatique.

Elle est synthétisée également par le tractus gastro-intestinal ; L'AFP produite est immunologiquement identique mais celle dérivée du foie est glycosylée,

l'autre non. L'AFP est très stable dans le LA, confusion possible entre urine maternel et LA, le LA contient du glucose et des protéines.

L'AFP est hétérogène et séparable en deux fractions majeures :

- une fraction se liant fortement à la concanavalin A (ou ConA réactive) qui serait synthétisée par le foie, elle représente la forme majeure d'AFP dans la plupart des tissus humains.
- Une fraction AFP ConA non réactive, certains LA en aurait plus de 50 %, dériverait du sac hyalin (elle est trouvée dans certaines tumeurs)

### 1.2. Rôle de L'AFP

Le rôle biologique de l'AFP n'est pas connu ; elle diminue rapidement à la naissance pour être remplacée par l'albumine. Elle pourrait avoir une fonction de protéine de liaison des oestrogènes, ceci a été retrouvé seulement chez le rat. On parle aussi d'un rôle de protection du fœtus contre les déjections immunologiques de la mère. Comme l'albumine, AFP lie une grande variété de substances et les séquences rapportées homologues entre ces protéines suggèrent qu'il y ait un gène ancestral commun.

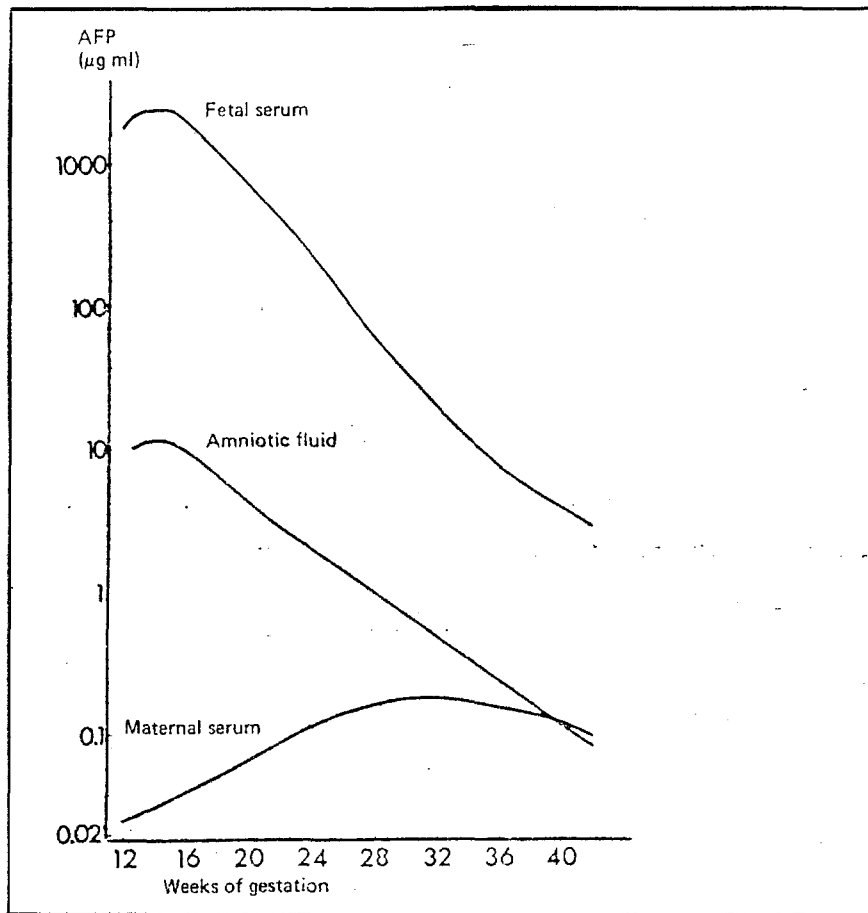
La mère ne produit pas d'anticorps contre cette protéine foetale. C'est le meilleur marqueur biochimique connu du fœtus. L'AFP peut être considéré comme foestospécifique.

### 1.3. Taux physiologique (schéma 19)

L'AFP est la protéine majeure du sérum foetal durant les premières semaines de grossesse arrivant à des concentrations aussi hautes que 3 mg/ml entre 10 et 13 semaines de gestation ; puis déclin régulier alors que le taux d'albumine commence à augmenter. A la naissance on a un taux de 10 à 50 µg/ml.

Le taux dans le sérum foetal atteint un pic entre 10 et 13 semaines, la diminution ne serait seulement qu'apparente et résulte de la dilution : la quantité totale continue à augmenter jusqu'à environ 20 semaines ; puis on a un plateau jusqu'à 32 semaines et diminution à la naissance, diminution rapide et plus lente pour atteindre le taux adulte de 1 à 2 ng pour deux ans d'âge.

Schéma 19 d'après SEPPALA (94)



Taux moyen d'AFP dans le sérum foetal, le sérum maternel, et le liquide amniotique.

La seule situation normale chez l'adulte, associée avec une augmentation d'AFP du sérum est la grossesse.

Des études avec de l'AFP marquée (AFP\*) confirment que l'AFP maternel est d'origine foetale.

AFP produite par le foie passe dans le sérum foetal, est excrétée dans l'urine foetale et passe dans le LA., un peu passe dans la circulation maternelle soit à travers les membranes foetales, soit le placenta, soit les deux.

On a un cycle : excrétion par les reins foetaux, ingestion par le foetus, digéré absorbé, resynthétisé et excrété à nouveau. L'AFP peut traverser l'amnios.

A 14ème semaine on a AFP du sérum foetal : 300 mg % environ,  
 AFP du LA : 1 mg % environ,  
 AFP du sérum maternel : 1 µg % environ

ou exprimé autrement : la concentration en A.F.P; dans le sérum foetal est : 150 fois celle du LA. qui est 200 fois celle du sérum maternel.

#### AFP foetale

Le taux le plus haut est atteint entre 10 et 13 semaines.

La concentration d'AFP est inversement proportionnelle à l'âge de la gestation. Le taux d'AFP dans le sérum foetal est affecté par certains désordres de grossesse.

Les taux tendent à être plus élevés que normale, chez les enfants rhésus immunisé ou de mère diabétique.

Les taux tendent à être plus bas que la normale chez les enfants nés de mère toxicomanes.

En cas d'hépatite néonatale, on a également des taux d'AFP élevés.

#### AFP du LA

La concentration du LA. est la plus haute à la 13ème semaine, elle diminue avec l'âge foetal. Il y a une corrélation significative entre l'AFP du LA et l'âge gestationnel. A 15 semaines on a un taux de 15 µg/ml environ.

- . Un taux de 70 ng/ml indique que la grossesse est à la 34e semaine,
- . Un taux de 50 ng/ml indique que la grossesse est à la 37e semaine.

Par contre, de hauts taux d'AFP dans le LA. ne peuvent pas être utilisés pour indiquer une gestation précoce car le taux normal est large et les anomalies foetales peuvent induire à l'erreur. L'AFP dérive du foetus via le tractus urinaire foetal ; De ce sens, l'AFP diffère de la plupart des autres protéines sériques ; la proportion d'AFP dérivant de la circulation maternelle est négligeable, la direction de l'AFP est du LA. vers le sérum maternel.

Cependant l'AFP est aussi trouvé dans le LA. avant la fin du 1er trimestre et il a été suggéré qu'une partie pourrait passer des capillaires foetaux avant la fin de la kératinisation de la peau. On a trouvé de grandes quantités d'AFP dans la peau et le muscle dans le foetus humain.

Sous des conditions normales, la plupart de l'AFP foetale rejoint la circulation maternelle indirectement, en premier lieu filtré par les reins foetaux dans le LA. et ensuite par diffusion transamniotique. L'amnios varie dans la porosité d'une grossesse à l'autre, parfois restreignant la diffusion, d'autre fois permettant un large passage. Le taux d'AFPS.M. augmentant au 2ème trimestre est couplé avec le taux d'AFP dans le sérum foetal qui diminue durant la même période.

On peut l'expliquer par une expansion rapide de la surface de l'amnios, ce qui permet à plus d'AFP de diffuser.

Les taux élevés d'AFP SM pour le foetus avec un DFTN sont plus probablement produits par diffusion transamniotique.

En absence de malformation, on explique les taux élevés d'AFPS.M. :

- . Soit par un amnios très poreux,
- . Soit par le fait que le passage transplacentaire de l'AFP foetale chez la mère survient en conjonction avec l'hémorragie foetomaternelle, spontanément ou comme le résultat de l'amniocentèse.

Le poids maternel influencerait la concentration en AFP SM, ceci en rapport du volume de sang maternel. La moyenne des valeurs d'AFP SM est d'autant plus basse que le poids maternel est élevé.

### AFP du sérum maternel

Les mesures du sérum maternel\* montre que le taux d'AFP augmente lentement jusqu'à un pic de 250 ng/ml à 32 semaines de gestation et diminue lentement. Au 2e trimestre, AFP du sérum maternel augmente d'environ 19 % par semaine.

### 2. Méthodes de mesures de AFP

- L'électroimmunodiffusion a été la première technique utilisée pour mesurer l'AFP dans LA (1966 Lawrell) et elle continue à être la méthode de choix dans beaucoup de laboratoire de diagnostic prénatal. On utilise des anticorps (AC) anti-AFP. Une relation linéaire existe entre la hauteur du pic de la rockette et la quantité d'AFP présente dans l'échantillon. Un coefficient de variation de  $\pm 8$  % peut être réellement atteint.

- Radioimmunoassay (RIA) : Méthode beaucoup plus sensible, utilisée pour les taux les plus bas. Pour la première fois on a montré qu'il y a des traces d'AFP présentent dans le sérum normal humain (sensibilité de l'ordre de 0.25 ng/ml) RIA est la méthode de choix pour l'estimation des taux d'AFP dans le sérum maternel durant le début de la grossesse.

- On a différentes techniques avec une phase liquide ou solide et double A.C. ou précipité organique comme P.E.G. ; l'AFP et les A.C. anti-AFP purifiés sont essentiels.

- La méthode Elisa a été appliquée à l'AFP, elle offre un avantage sur le RIA comme étant une méthode très convenable pour les laboratoires moins bien équipés. On utilise une préparation internationale de référence pour l'AFP, elle sert à faire des comparaisons entre différentes méthodes et différents laboratoires, mais ne permet pas d'échapper à l'estimation des taux normaux.

Le laboratoire doit établir ces propres valeurs normales d'AFP par semaine de gestation de 14 à 22 semaines.

(Schéma 20)

Schéma 20 d'après SEPPALA (94)Méthodes de mesure de l'AFP

Méthodes	Sensibilité
Double diffusion	25-5 µg/ml
Compteur électrophorèse	0.25-0.5 µg/ml
Immunoélectrophorèse par Rockette	0.5 -1 µg/ml
Agglutination sur latex	0.25 µg/ml
Inhibition de l'hémogglutination	0.10 µg/ml
Immunoautoradiographie	50 ng/ml
Radioimmunoélectrophorèse	20 ng/ml
ELISA	3 ng/ml
RIA	0.25 ng/ml

### 3. L'AFP du LA. et les défauts de fermeture du tube neural

Le dosage de l'AFP dans le LA. fait actuellement partie des tests de routine pour le dépistage d'une malformation. Il se pratique comme nous l'avons vu pour :

- 1) Les couples à risques pour une malformation du tube neural :
  - . Soit un risque de recurrence pour les SB et les anencéphalies,
  - . Soit si un taux sérique élevé d'AFP a été observé.
  
- 2) Lors d'une ponction de LA pour une autre indication (surtout âge maternel, génopathie métaboliques, aberrations chromosomiques).
  
- 3) La présomption d'une malformation majeure suite à l'examen échographique systématique ou motivé (hydramnios, oligocemnios, retard de croissance intra-utérin...).

Des taux anormalement élevés pourront être atteints si on a une fuite de liquide cébrospinal (DFTN ouverte) ou une fuite de sérum foetal (hémorragie foetale, omphalocèle foetal par exemple.

Moins communément l'AFP du LA pourrait être aussi augmenté s'il y a excrétion rénale foetale augmentée de globuline (néphrose congénitale).

Un autre mécanisme des taux élevés d'AFP du LA dans l'anencéphalie est l'abaissement de la déglutition foetale du LA. Ce défaut contribue à la formation d'un hydromnios, conduisant à une augmentation de la pression osmotique et à une fuite excessive de liquide. Dans l'anencéphalie, la sécrétion foetale de vasopressine est aussi absente et ceci pourrait être associé avec une polyurie foetale et hydramnios.

#### 3.1. Valeur diagnostique

La valeur diagnostique de la mesure de l'AFP du LA a été établie dans différentes études dont la plus importante est l'Etude Collaborative de 1979 (88).

Cette étude définit la sensibilité et la spécificité du test AFP du LA.

En 1974, on pensait que la distribution des taux d'AFP des grossesses avec et sans DFTN ouverte était largement séparée sans chevauchement, en fait ce n'est pas le cas ; on a défini le chevauchement dans les taux d'AFP entre les deux.



Il faut convertir les multiples d'unités standards en multiple de la moyenne (MOM = Multiple Of the Median) pour intégrer des résultats inter-laboratoires.

Le pourcentage de faux positifs avec AFP dans LA par rapport aux taux normaux donnés (exprimés en MOM) augmente avec l'âge de la grossesse. On obtient les mêmes pourcentages en utilisant des taux différents à différents âges.

Le pourcentage de grossesse normale avec un résultat positif augmente considérablement avec l'âge. Pour obtenir un pourcentage identique à chaque période il est nécessaire de sélectionner un taux limite différent pour chacune.

Les taux limites retenus dans la plupart des études sont les suivants :

2,5 MOM de 13 à 15 semaines,

3,0 MOM de 16 à 18 semaines,

3,5 MOM de 19 à 21 semaines,

4,0 MOM de 22 à 24 semaines.

On a seulement un petit effet sur le pourcentage des grossesses affectées avec un résultat positif.

On obtient un résultat (+) avec 98,2 % des anencéphalies,

97,6 % des S.B. ouverts,

0,79 % des grossesses normales.

La sensibilité passe à environ 60 % pour le 3ème trimestre (86)

### **3.2. Limites du dosage de l'AFP**

Un faux positif (faux +) est une valeur anormalement haute associée avec un foetus normal.

Un faux négatif (faux -) est une valeur normale associée avec un enfant affecté par une condition ou l'AFP est fréquemment élevé.

La spécificité est loin d'être parfaite puisque d'une part, d'autres anomalies foetales peuvent s'accompagner d'une élévation de l'AFP ; d'autre part le taux de faux (+) est assez élevé. Dans une population générale avec un risque d'atteinte de 0,1 %, on a 0,25 % de faux (+) normaux et de faux (+) pathologiques autres que DFTN soit un taux faussement alarmant d'environ une fois sur deux.

Avec les limites indiquées on a un taux pratique de faux (+) de :

- 0,48 % si les liquides contaminés sont inclus,
- 0,27 % s'ils ne le sont pas.

En fait on a 0,06 % de grossesses terminées avec un résultat faux (+) d'AFP, c'est-à-dire, que soit la limite la plus haute a été utilisée, soit que d'autres paramètres, cliniques ou diagnostiques ont été utilisés.

### 3.2.1. La contamination sanguine

#### **Origine**

La source majeure de ces fausses élévations est identifiée comme étant la contamination sanguine, c'est le principal problème technique.

La contamination par du sang maternel, qui arrive souvent si un placenta antérieur est traversé, n'est pas importante tant que les taux de l'AFP du sérum maternel sont plus bas que ceux du liquide lui-même.

Les difficultés arrivent si du sang foetal est trouvé dans le liquide.

Il est important, dans tout liquide contaminé ayant une valeur élevée d'AFP, d'établir la source de la contamination.

Le taux pratique de faux (+) est 9 fois plus haut dans les échantillons contaminés que clairs ; soit environ 40 % des échantillons d'anencéphalie, et environ 20 % de ceux des S.B. ouverte sont associé avec une contamination sanguine.

La contamination ne doit pas elle-même contrariée la terminaison de la grossesse.

Le problème pratique est de décider des femmes avec un résultat positif associé à un échantillon contaminé, lesquelles ont probablement un foetus atteint.

## Détection de la contamination sanguine

### - Globule rouge foetal contre maternel.

La différenciation est possible par la méthode de Kleinhauer-Betke (1957). On utilise le fait que l'hémoglobine (Hb) foetale est plus résistante à un environnement acide que l'Hb adulte ; un comptage est alors possible.

### - Mesure de l'Hb F.

Compté immunoélectrophorétiquement, c'est la méthode de choix.

C'est une technique qualitative dont le principe est la migration des IgG dans un champ électrique, en sens opposé à la plupart des autres protéines majeures. Si l'échantillon ne contient pas d'Hb foetale, même avec la technique immunologique sensible, le résultat peut-être considéré comme un vrai positif.

Si de Hb foetale est présente, aucune décision ne peut être prise, soit le saignement provient de l'aspiration, de l'aiguille, soit de la lésion elle-même.

Il est difficile de déceler une contamination si le liquide est clair ; certains auteurs recommandent de tester pour l'Hb foetale tous les échantillons avec une AFP élevé, ceci surtout pour les laboratoires testant des échantillons d'autres centres.

### 3.2.2. Problèmes de termes imprécis

L'interprétation diffère selon l'âge de la grossesse ; une datation imprécise pose un grand problème surtout pour les taux limites.

### 3.2.3. Manque de spécificité du test

On peut obtenir également un résultat positif dans de nombreux autres cas ;

Les plus courants étant la néphrose congénitale,

l'exomphalos,

l'atrésie oesophagienne,

la mort foetale intrautérine,

l'immunisation rhésus,

les anomalies chromosomiques.

(Schéma 21)



### 3.2.4. Problème des faux négatifs

Le dosage de l'AFP ne permet pas le diagnostic anténatal des malformations fermées du tube neural.

Le nombre de faux négatifs (-) augmente après 23 semaines de grossesse, le taux de faux négatif est approximativement de 2 % (80).

### 3.3. Réduction des faux positifs

- On peut augmenter la spécificité de la mesure de l'AFP LA en augmentant de 0.5 MOM le taux limite à chaque période ; on réduit alors le taux de faux (+), pour un liquide clair, de 0.24 % à 0.10 %.

On reste à 98 % de détection pour l'anencéphalie,  
on passe à 93 % de détection pour le S.B.

- On peut estimer (21) l'augmentation de l'AFP LA qui est directement attribué au sang foetal et le soustraire du taux observé.

Ceci peut être fait par une première mesure d'un compte de globules rouges (G.B.) dans l'échantillon (technique de Kleihauer), ensuite on multiplie ce nombre de globules rouges foetaux (exprimé en ml de LA) par un facteur (42. 10-9). Le résultat donne l'augmentation de la concentration d'AFP en MOM qui devrait être déduit des taux observés.

Cependant l'application pratique de cette procédure doit être utilisée avec précaution.

- On peut avoir recours à une deuxième amniocentèse et à un autre test AFP si le premier est soit contaminé, soit limite. Ceci devrait plus que réduire en deux le taux pratique de faux (+) et a un effet marginal sur le taux de détection (88). Néanmoins ceci augmente les risques liés à la procédure de l'amniocentèse, ajoute un délai excessif et augmente l'anxiété.

La meilleure option pour la réduction des faux (+) est l'utilisation de tests secondaires dont le principal est la mesure de l'acétylcholinestérase (AChE) du liquide amniotique. Ce test réduit considérablement le besoin d'une deuxième procédure d'amniocentèse.

#### 4. L'AFP du sérum maternel (AFPSM) (100) (43)

C'est Brock en 1973 qui rapporte le premier cas de malformation de la gouttière neurale avec un dosage anormal d'AFPS.M.

##### 4.1. Unité interlaboratoire

Il est recommandé que le test soit calibré contre le "WHO standard" et qu'un contrôle de qualité interne et externe soit appliqué.

Le contrôle interne sera réalisé par :

- l'utilisation régulière d'un standard, calibré contre le "WHO standard" à au moins deux concentrations.
- l'utilisation régulière de contrôles interassais.

Le contrôle externe sera réalisé par la participation à un plan de contrôle de qualité à intervalle régulier, avec échange d'échantillons avec des valeurs pathologiques comme garantie.

La définition de la moyenne et des valeurs limites doivent être basées sur un nombre suffisant de grossesses étudiées sous les mêmes conditions ; on recommande au moins 100 sérums chaque semaine entre 14 et 27.

La médiane et les valeurs limites doivent être surveillées et si nécessaire corrigées périodiquement ; cela requiert un minimum de 400 tests par mois comme base conseillée.

Toutes les données sont données en MOM, c'est un moyen d'expression d'un laboratoire individuel pour un but clinique.

##### 4.2. Période optimum

Le meilleur pourcentage de détection des DFTN ouvertes est obtenu entre 16 et 18 semaines ; après il y a diminution de la sensibilité et avant l'efficacité du diagnostic est très faible.

Les valeurs moyennes d'AFPS.M. s'élèvent en cours de 2ème trimestre, ce qui est directement en contraste avec les valeurs moyennes de l'AFP LA durant la même période.

#### 4.3. Sensibilité du test d'AFPS.M.

Pour les DFTN ouvertes entre 16 et 18 semaines on obtient :

- 88 % des cas d'anencéphalies,

et 79 % des cas de S.B. ouvert, associé avec un taux d'AFPS.M.  $\geq$  2.5. MOM

On arrive à 90 % et 91 % si on prend  $\geq$  à 2.0. MOM au dépend de l'augmentation du taux de faux positif.

#### 4.4. Les faux positifs

Le taux de non DFTN avec une AFPS.M. élevée à 16-18 semaines est d'environ 3.3 % avec un taux limite  $\geq$  2.5. MOM

On monte à 7,2 % si la limite est de 2.0. MOM

Une multitude de conséquences dépend du choix du taux limite. Il est recommandé que 100 échantillons de sérum maternel soient testés pour chaque semaine entre 14 et 22 semaines par un laboratoire pour établir les capacités du test. Ceci permet le calcul des moyennes avec confiances, ainsi les points limites peuvent être établis.

Encore une fois la datation juste est indispensable pour construire la courbe normale et pour interpréter les résultats cliniques.

Le diamètre bipariétal des foetus avec SB est plus petit, en moyenne, que les normes établies à une semaine donnée au 2ème trimestre. Cette caractéristique serait la cause de la sous estimation par ultrason des dates des grossesses à S.B.. Le taux d'AFP SM apparaît plus haut, conduisant à un pourcentage élevé de cas de SB ouvert identifié. Cet avantage sera perdu si la datation ultrason est aussi utilisée pour l'interprétation du LA mais sera maintenue si les dates menstruelles sont utilisées pour cette dernière interprétation .

#### 4.5. Autres problèmes

On a d'autres causes d'élévation de l'AFP SM

- soit d'autres malformations, omphalocèle et gastroschisis sont parmi les autres déflections majeures identifiées par l'élévation de AFP MS

Environ 80 % sont associés avec AFP SM  $\geq$  2.5. MOM

La néphrose congénitale est associée à un taux élevé d'AFP SM

Les grossesses avec AFP SM  $\geq$  3 MOM ont une chance sur 7 d'avoir une naissance à faible poids.

- soit des causes en dehors d'un contexte malformatif.

(Schéma 22)

Le fait de répéter si on a une valeur élevée peut diminuer les amniocentèses mais ceci n'est pas très effectif ; cela peut retarder le diagnostique final et augmenter l'anxiété. D'un autre côté c'est une sécurité contre une erreur de secrétariat ou autre. Un compromis raisonnable pourrait être de répéter AFPS.M. seulement dans les cas de résultat limite.

Si AFPM.S. est élevé au dessus des valeurs limites choisies (2 à 2.5. MOM) une ultrasonographie détaillée doit être faite. Si l'âge est confirmé, si on a pas de jumeau, ni d'autres raisons apparentes, l'amniocentèse est de rigueur.

5. Conclusions (97) (93) (105) (81) (80)

5.1. L'AFP du sérum maternel : c'est un test de dépistage uniquement, d'une bonne sensibilité environ 85 à 90 %, en prenant en considération les dosages supérieurs à la 95e percentile

Il existe malgré tout de nombreux faux (+) :

- des faux (+) dont il faut tenir compte.
- des faux (+) sans explication qui peuvent indiquer :

Pour la mère, la survenue d'une complication en fin de grossesse,

Pour le fœtus, la survenue d'une hypotrophie. La mortalité périnatale serait multipliée par quatre dans ces cas, par rapport à la population générale.

Dans ces cas comme dans les cas de malformations, c'est probablement dans la désignation des grossesses à haut risque que résiderait le plus grand intérêt du dosage de l'AFP sérique maternelle pour les régions de faible incidence.

Pour ce qui est du dosage lui-même, le risque majeur reste la mauvaise datation de la grossesse entraînant une fausse interprétation.



Schéma 22**Causes d'élévation de l'AFPS.M. en dehors d'un contexte malformatif**

---

1. Erreur dans la détermination du terme de la grossesse (10 % des femmes enceintes).
  2. Les grossesses multiples.
  3. La mort foetale.
  4. L'isoimmunisation *Rhesus*
  5. Les fausses-couches spontanées ou provoquées.
  6. Certaines grossesses normales (1.7 à 7.4 % des femmes enceintes, selon que l'on place la limite supérieure de la normale à 3 ou 5 MOM)
-

## 5.2. L'AFP du liquide amniotique

Le dosage dans les liquides de ponction amniotique fait actuellement partie des tests de routine.

La valeur diagnostique de cette mesure, après dépistage dans le sérum maternel, est maintenant établi, il faut savoir si l'information est assez sensible et spécifique pour justifier de l'arrêt de la grossesse.

L'AFP LA ne confirme pas absolument le risque mais c'est la méthode la plus sûre de diagnostic des DFTN

Le test est simple, bon marché et rapide ; sa sensibilité est excellente, mais la spécificité n'est pas parfaite.

Les inconvénients majeurs sont surtout :

- la dépendance importante du taux d'AFP avec l'âge de la grossesse.
- les nombreuses situations entraînant une augmentation de l'AFP
- la trop grande sensibilité de l'AFP à la contamination sanguine.

Dans ce contexte, l'intérêt du dosage en routine dans les populations à faible risque, peut être effectivement reconsidéré.

Le manque de spécificité de l'AFP pour les DFTN peut être pris comme un avantage ; on considère alors l'AFP comme un marqueur de plusieurs malformations foetales graves (néphrose congénitale par exemple).

En résumé, quatre points posent un problème lors de l'interprétation des taux d'AFP

1. Le chevauchement des taux d'AFP des grossesses normales et pathologiques pour le 2ème trimestre de gestation : d'où un taux de faux (+) et de faux (-) faible mais non négligeable. Malgré ce taux faible, si le test est fait sur des LA de femmes apparemment sans risque élevé de DFTN, la proportion de vrai (+)/ faux (+) peut être aussi haute que 1/1.

2. La date de gestation incertaine :

d'où faux (+) et faux (-)

3. La contamination possible par du sang foetale :

d'où faux (+)

4. Le diagnostic différentiel des malformations foetales, la spécificité n'est pas parfaite.

Toutes ces raisons ont poussé à la recherche d'une test supplémentaire plus spécifique au diagnostic des DFTN. Il fallait un test pouvant aider à la séparation des cas litigieux. Un test biochimique complémentaire au dosage de l'AFP, distinguant vrai et faux (+), augmentant la spécificité pourrait constituer un apport considérable ; il représenterait alors une avance médicale profitable.

Un certain nombre d'épreuves ont été essayées avec plus ou moins de succès, certaines sont, à l'heure actuelle, abandonnées, d'autres continuent à être utilisées.

## **F. Les autres tests biologiques de dépistage**

### **1. L'analyse discriminatoire**

Elle peut améliorer la détection anténatale des DFTN (75).

Il y a des différences significatives dans la composition biochimique du LA des grossesses compliquées de DFTN. Bien qu'aucune de ces constantes biochimiques ne soient suffisamment différentes pour être utilisées cliniquement, un index diagnostique peut être atteint par l'utilisation de l'analyse multivariable en appliquant l'analyse discriminatoire.

On utilise la mesure de Na, K, Cl, HCO<sub>3</sub>, urée et créatine. Une analyse discriminatoire est calculée, pour chaque variable on a une pondération puis, pour la somme, une variable autorisée.

L'avantage de cette approche est que toutes les variables incluses sont mesurées en routine. Une fois la fonction discriminatoire calculée par le programme, pour chaque laboratoire, un simple calcul, comportant une combinaison linéaire des concentrations des composants et le logarithme de l'AFP, suffit à classer un échantillon inconnu.

La capacité de classer les échantillons est bonne, le taux de mal classé est réduit.

Néanmoins le succès de la méthode est limité par la précision des tests individuels et l'exactitude de l'âge de la grossesse.

Cette méthode constitue un test confirmatoire usuel.

## 2. Tests biochimiques (43) (102) (11) (40) (39)

Trois processus analytiques ont été évalués comme compléments ou substituts à la mesure de l'AFP dans le LA.

Les deux premiers restent utilisés comme test auxiliaires dans certains centres.

Le troisième est utilisé au titre de la recherche.

### 2.1. Analyse R.A.C. ou Analyse de la Rapidité de l'Adhérence Cellulaire ou étude des macrophages à adhésion rapide.

Décrit la première fois par Sutherland en 1973.

La RAC étudie deux paramètres :

- . L'analyse morphologique des cellules du LA
- . Le pourcentage de cellules en culture rapidement adhérente après 24 h de contact.

Si les cellules du LA sont mises en culture in vitro, on remarque qu'elles adhèrent plus doucement au verre qu'au plastique.

Le LA des grossesses avec une DFTN contient une forte proportion de cellules qui s'attachent en 24 heures. Ces cellules ont un cariotype foetal et des propriétés phagocytaires ; elles sont reconnues comme macrophage.

On peut les diviser en 4 groupes sur la base de la rapidité d'adhérence cellulaire.

- a) longue cellule bipolaire,
- b) cellule avec de multiples excroissances,
- c) large cellule avec vacuolisation proéminente,
- d) cellule géante multinuclée.

Des anticorps (AC) spécifiques pour des types particulier de filaments ou de protéines intracellulaires aident la classification cellulaire.

Dans le LA normal, les cellules prédominantes sont de type épithéliales, le pourcentage d'adhérence est inférieur à 60 %.

En présence d'un DFTN ouvert, on a un polymorphisme cellulaire dont les deux types les plus fréquents sont c) et d) ; De plus, il y a des cellules additionnelles qui réagissent avec un antisérum dirigé contre une autre protéine gliale appelée S 100.

Si l'antisérum spécifique utilisable devenait largement disponible, l'identification du type cellulaire pourrait devenir un instrument puissant du diagnostic prénatal des DFTN.

L'existence de cellules à adhésion rapide, de morphologie différente, dans d'autres tissus (cavité péritonéale foetale, moëlle osseuse) serait intéressante pour le diagnostic d'autres malformations.

L'inconvénient majeur de cette technique est la nature subjective de l'analyse morphologique. Appliquée prospectivement, l'analyse R.A.C. est fastidieuse et chère ; la fiabilité reste discutée et l'existence de résultats équivoques et de faux (+) rend le test moins sûr que l'analyse de l'acétylcholinestérase (AChE). Cependant la connaissance de ces types cellulaires dans la culture du LA ouvre de nouvelles portes à la recherche.

Le développement des techniques pour la sélection et la culture de type cellulaire plus spécialisé, connu pour être présent dans les échantillons de LA, pourrait grandement étendre l'application de l'amniocentèse pour le diagnostic prénatal génétique.

## 2.2. Fraction concavalin A de l'AFP

On mesure la proportion d'AFP du LA liée à la concavalinA (ConA). Dans un LA normal le pourcentage de Con. A non lié à l'AFP diminue d'une valeur moyenne de 27 % à la 13e semaine à 8.5 % à la 21e semaine.

Si on a une malformation foetale avec AFP élevée, ce pourcentage est réduit.

Cette procédure implique la séparation des fractions glycosylées et non glycosylées de l'AFP par électrophorèse sur colonne ou bidimensionnelle.

Le problème majeur avec cette technique est que l'augmentation d'AFP causée par la contamination de sang foetal a un pourcentage bas d'AFP non glycolylé similaire à ce que l'on trouve quand on a un DFTN.

Peu d'équipes ont adopté cette méthode assez lourde sur le plan technique et qui s'avère, en pratique, incapable d'assurer la séparation complète entre LA normaux et LA de DFTN.

## 2.3. Protéines spécifiques

La majorité des protéines du LA viennent du sérum maternel. Cependant les protéines de très hauts poids moléculaires sont normalement exclus car elles ne peuvent pas traverser la barrière placentaire. La présence de telles protéines dans le

LA pourrait signaler une fuite de sérum foetal, conséquence d'une DFTN ou d'une autre lésion de communication.

Les protéines de hauts poids moléculaires utilisés sont :

- l'alpha 2 macroglobuline,
- l'Ig M
- la Béta lipoprotéine.
- fibrinogène et produits de dégradation de la fibrine (P.D.F.)
- la D2 protéine (S.M.P. D2) de la membrane synaptique, protéine neuronales dont un dérivé soluble est dosable par méthode immunochimique dans le LA

### **3. Conclusion**

De tous les tests biologiques précédemment décrits, seuls le R.A.C. et la concavalin A sont utilisés ; pourtant ni l'un, ni l'autre n'a de spécificité absolue pour le diagnostic des DFTN. Ce sont des tests complémentaires ou dosage de l'AFP.

## CHAPITRE III - L'ACETYLCHOLINESTERASE - AChE

Depuis 1972 l'AFP est devenu le principal marqueur biochimique des malformations du système nerveux. Néanmoins pour remédier au manque de spécificité et de sensibilité, on a proposé Chubb (17) et Smith (98), l'AChE comme autre marqueur.

Le rapport de l'étude collaborative internationale sur l'AChE publié en 1981 confirme la supériorité du test.

### A - Chimie, biologie, physiologie, physiopathologie (95) (97) (9)

#### 1. Que sont les cholinestérases ?

##### 1.1. Définition

Une définition incorporant les principales caractéristiques peut-être donnée. "Les cholinestérases (ChE) sont des hydrolases qui, sous conditions optimales, catalysent l'hydrolyse des esters de la choline avec une vitesse plus grande que d'autres esters et qui sont inhibés par de faibles concentrations ( $10^{-5}$  ou moins) de physostigmine ou composés organophosphorés".

Mais il existe des exceptions, plus particulièrement en regard avec la susceptibilité aux inhibiteurs. Ce manque de conformité souligne un point important, les ChE ne sont pas identiques dans toutes les espèces.

Elles constituent une famille d'enzyme qui se découpe en deux types :

- ceux qui hydrolysent préférentiellement les esters de l'acétyl tel que l'acétylcholine (ACh).
- ceux avec une préférence marquée pour les autres types d'esters tel que Butyrylcholine (BuCh).

## 1.2. Nomenclature

Le nom de cholinestérase représente une longue controverse.

Stedmen (1932) a isolé un enzyme coupant l'Ach du sérum de cheval, il l'a appelé "cholinestérase".

Mendel (1943) a montré que le sérum contenait deux enzymes différents : la plus grande part de l'activité était dû à un enzyme non spécifique, c'est à dire coupant aussi des esters non choliques.

Le reste de l'activité dû une deuxième enzyme spécifique sur les esters de la choline, ressemblant aux "spécific Enz" trouvés dans le cerveau, et que Alles et Harves (1940) ont trouvé dans le globule rouge (GR).

En 1964 "l'Enzyme Commission" a proposé pour la ChE vraie le nom d'Acetylcholine hydrolase (EC 3.1.1.7.) comme nom systématique Acetylcholinestérase (AChE) comme nom usuel.

Pour la Pseudocholinestérase, les types non spécifique d'enzyme, la commission a recommandé acylcholine acylhydrolase (EC 3.1.1.8.) comme nom systématique "cholinestérase" comme nom usuel.

Le terme général de Cholinestérase est utilisé, par certains auteurs, pour désigner l'ensemble des Enzymes acetyl-et pseudoChE.

En résumé et de façon quasi générale on a :

- cholinestérase (ChE) pour couvrir ces enzymes dans l'ensemble.
- acetylcholinestérase (AChE) (E.C. 3.1.1.7.) pour la cholinestérase vraie.
- cholinestérase non spécifique (ChEns) ou pseudocholinestérase ou de façon plus explicite en accordant une préférence à leur substrat tel que Butyryl (BuChE) ou propionyl (PrChE) pour les types non spécifiques.

Lors de la classification des cellules sur une base fonctionnelle plutôt qu'anatomique (Dale 1934), les neurones qui libèrent de l'ACh de leur terminaison sont appelés "cholinergiques", et ceux qui libèrent de l'adrénaline "adrénergiques". L'utilisation de "cholinergique" comme un synonyme de contenant de l'AChE, bien que convenable peut être perturbante. Bien que toutes les cellules connues qui utilisent de l'ACh comme transmetteur contiennent de l'AChE, toutes les cellules contenant de l'AChE ne sont pas fonctionnellement cholinergique. (Schéma 23)



## Schéma 23

Propriétés comparées de l'AChE avec la pseudochoolinestérase  
d'après SILVER (95)

Property	AChE (EC 3.1.1.7)	Pseudochoolinestérase (EC 3.1.1.8)
Substrate specificity		
Preferred substrate	ACh	BuCh or PrCh
Activity towards:		
MeCh	+	-
BzCh	-	+
Acetylcarnitylcholine	+	-
Carbamylcholine (carbachol)	-	-
Inhibitors		
Physostigmine	* Inhibited by $10^{-5}$ M	Inhibited by $10^{-5}$ M
DFP	Inhibitory conc: $10^{-5}$ - $10^{-6}$ M	Inhibitory conc: $10^{-7}$ - $10^{-8}$ M
Iso-OMPA	Resistant	Susceptible
Ethopropazine	Resistant	Susceptible
BW 284c51	Susceptible	Resistant
Effect of ions		
Ni & Zn	Strong inhibition	Weak or no inhibition
Mn & Mg	Mg the more effective activator	Mn the more effective activator
Inhibition by excess substrate	Yes. Most active towards substrate in low concen- tration	No. Most active towards substrate in high con- centration

\* Eserine-resistant AChE found in frog (Hawkins and Mendel 1946).

### 1.3. Histoire des cholinestérases

Leur existence a été présentée par Dale 1914.

- . 1900 Dudley-Dale montrent que ACh est un constituant naturel
- . 1926 Lewi et Navratil prouvent la théorie de Dudley
- . 1932 Stedman obtient le 1er extrait de cholinestérase à partir de sérum de cheval
- . 1935 Steedman trouvera ChE dans le cerveau de chat ; la concentration du ganglion basal est deux fois celle du cortex cérébral
- . 1935 Dale essaye d'établir l'ACh comme un neurotransmetteur : ACh doit être détruite pendant la brève période réfractaire.
- . 1937 Mornay et Nachmanson montrent que toute la ChE présente dans le tissu est localisée aux terminaisons nerveuses.
- . 1939-44 Les ChE acquièrent une signification spéciale dans le contexte de la guerre chimique. De très nombreux agents développés comme gaz de guerre potentiels sont de puissants inhibiteurs de ces enzymes.
- . 1950 Koelle : L'étude des ChE prend un nouvel essor avec l'introduction de méthodes histochimiques pour leur détection.

### 2. Aspects enzymologiques de l'AChE

Les ChE hydrolysent la choline plus vite que les autres esters, sont inhibés par la physostigmine (ésérine) à des concentrations de  $10^{-5}$  M, Les arylestérases (EC 3.1.1.2.) et les carboxylestérases (EC 3.1.1.1.) ou aliestérases sont plus résistants à l'ésérine.

La distinction entre AChE et ChEns est basée sur des différences dans le substrat, l'inhibiteur spécifique, et les constantes cinétiques. Ces disparités reflètent une différence dans la structure moléculaire des divers types de ChE, plus particulièrement dans le centre actif.

#### 2.1. Spécificité du substrat

Le substrat naturel, pour les vertébrés, de l'AChE est l'ACh qui est l'ester prédominant de la choline trouvé dans les tissus.

AChE des GR de taureau coupe l'acétylcarnitylcholine.

l'acétyl B méthylcholine (MeCh) est spécifique de certaines espèces.

Avec les esters aliphatiques, la nature du groupe acyl détermine la vitesse d'hydrolyse, acétate donne la réaction optimale puis propionate, formiate, butyrates, les esters aromatiques tels que phénylacétate ou naphtylacétate sont aussi hydrolysés par AChE.

La choline alimentaire, base d'ammonium quaternaire, affecte les taux d'ACh dans le cerveau et les tissus périphériques.

L'ACh, médiateur chimique du système nerveux, est produite à partir de la choline et de l'acide acétique. (Schéma 24)

L'AChE hydrolyse l'ACh en choline et acide acétique.

Les G.R. peuvent synthétiser l'ACh, ils contiennent à la fois de la choline acétylase et de l'AChE. La présence de la choline acétylase dans des tissus sans réseaux nerveux (erythrocytes, placenta) suggère que le rôle de l'ACh ne se limite pas au seul tissu nerveux. La formation et la dégradation de l'ACh peuvent s'associer à la perméabilité cellulaire.

La choline en circulation est une source importante de vitamine pour le cerveau. La choline alimentaire peut affecter la fonction cérébrale en contrôlant non seulement la quantité d'ACh libérée, mais aussi la densité du récepteur avec lequel elle peut réagir ; elle peut aussi affecter les récepteurs membranaires de l'ACh.

La corrélation existant entre le taux du transmetteur et la densité du récepteur a des implications importantes pour la relation entre les neurones cholinergiques et le comportement.

Le rôle exact de la choline comme vitamine ou facteur de croissance apparenté n'est pas totalement établi.

## 2.2. Activateurs et inhibiteurs

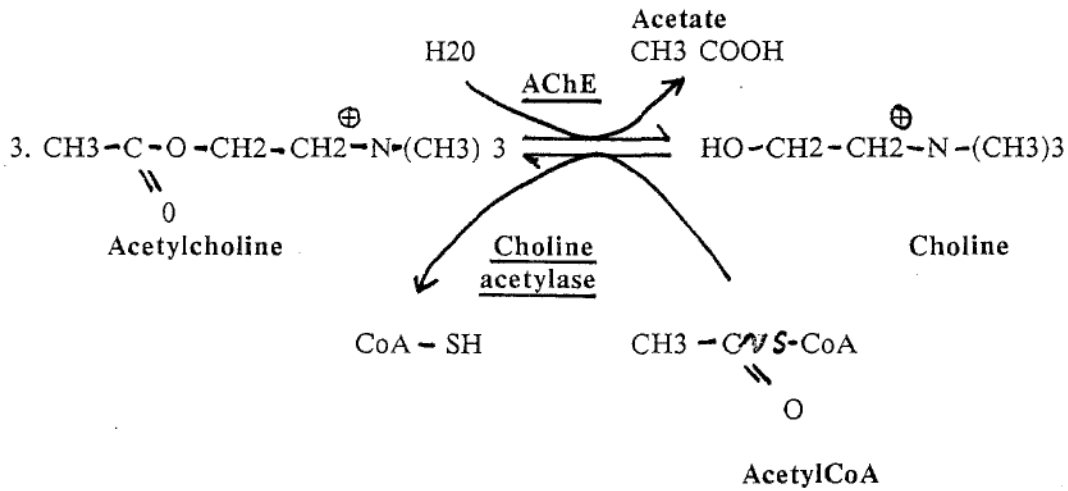
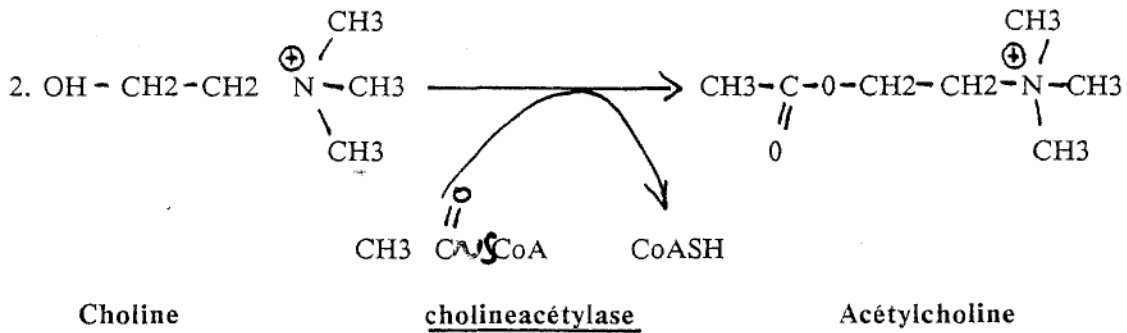
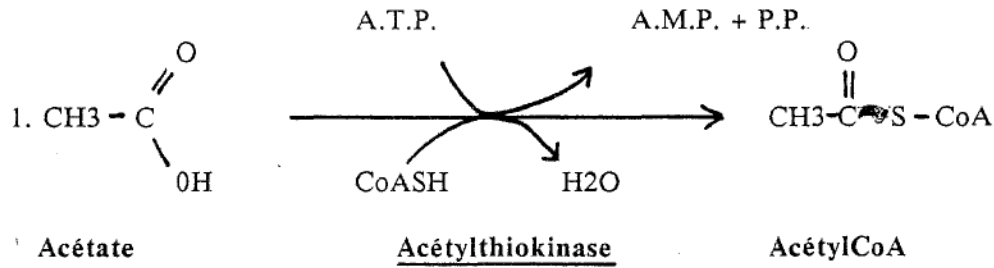
### 2.2.1. Les activateurs

Les substances qui activent l'AChE incluent le Cadmium, Lithium, Potassium, Sodium et le Magnésium. Ce dernier s'est montré le plus puissant mais on a de grandes variations avec les conditions d'analyse.

Une caractéristique importante de l'AChE est sa sensibilité à l'inhibition par un excès de substrat. C'est un des traits qui le distingue de la pseudoChE.

L'AChE est plus active contre de faible concentration de substrat (ACh) et est inhibé par de hautes concentrations ; inversement pour la pseudoChE.

## Schéma 24

L'acétylcholinestérase et son substrat

L'activité de l'AChE est affectée, comme tout les enzymes, par le pH et la température. La température est optimum entre 37 et 40°C (Augustinsson 1948).

L'inactivation se produit pour une température supérieure à 56°C.

Le pH optimum varie avec le substrat. Avec l'ACh, il est voisin de 8.0 à 8.5.. Avec certains substrats incluant l'acétylthiocholine et le phénylacétate, l'activité est dépendante du pH seulement sur le côté acide.

### 2.2.2. Les inhibiteurs

La sensibilité à l'inhibition est un des caractères distinctifs des ChE.

Un certain nombre d'agents diminuent l'activité de l'enzyme. On a par exemple, l'acétone, le zinc, le nickel, le fluorure, et différents anions.

Les agents qui inhibent les cholinestérasés doivent être comptés en millier plutôt qu'en centaine et, par conséquent, ils forment un vaste champ d'étude qui incluent plusieurs disciplines. (biochimie, physiologie, pharmacologie, toxicologie, écologie). Ceux cités, sont les plus utilisés dans les investigations. Beaucoup de ces composés ont été synthétisés comme pesticides.

On a deux effets de l'action inhibitrice sur les enzymes.

- on a une action soit directement sur la membrane postsynaptique soit comme le curare en bloquant les récepteurs d'ACh (ésérine) soit excitatrice (néostigmine)
- une autre caractéristique de certaines antiChE est qu'elles interfèrent avec le mécanisme par lequel ACh peut être éliminé d'un milieu d'incubation.

### 2.3. Différents types d'antiChE et mode d'action inhibitrice

La réaction normale implique la production d'une forme acétylée de l'enzyme qui subit une hydrolyse pour rendre l'enzyme réutilisable.

L'antiChE interfère dans cette séquence ordonnée, le point d'attaque dépend de la nature de l'inhibiteur. Ils peuvent bloquer :

- le site anionique,
- le site anionique et le site estérasique
- le site estérasique.

On les classe en AntiChE "sélectives" ou "non-sélectives" et en "réversibles" ou "non réversibles".

- Composés qui se lient au site anionique

Ils interfèrent avec la liaison substrat-enzyme en occupant le site anionique. Par exemple, les composés quaternaires tels que Décaméthonium, (TEA) Tétra etylammonium. Ils rendent le site anionique inutilisable par le substrat. On n'a pas de réaction directe avec le site estérasique, il peut être juste masqué et peut, par exemple, protéger l'enzyme d'une phosphorylation par un autre type d'inhibiteur.

- Composés liés à la fois au site anionique et estérasique

La réaction est ici qualitativement analogue à la réaction entre l'enzyme et ACh.

L'action inhibitrice se produit à cause de la relative lenteur avec laquelle l'enzyme est régénéré par hydrolyse du complexe intermédiaire.

C'est le taux d'hydrolyse de ces intermédiaires qui détermine la durée et la réversibilité du système.

Par exemple la physostigmine (eserine) a une courte action inhibitrice, elle est liée au site anionique par son groupement aminé et en même temps par le carboxyl au site estérasique.

- Composés liés au site estérasique

C'est le cas de la majorité des composés organophosphorés. L'enzyme phosphorylés est extrêmement résistant à l'hydrolyse mais le degré exacte de stabilité dépend du type et de la source de la ChE aussi bien que de la nature du groupe alkyl attaché.

**Durée de l'action**

L'hydrolyse spontanée de l'enzyme phosphorylé ou carbamylé arrive en théorie dans tous les cas. En pratique, une réaction inhibitrice peut être irréversible si le taux d'hydrolyse spontané de l'enzyme intermédiaire est trop faible pour produire un effet significatif.

#### 2.4. Principaux agents antiChE utilisés en laboratoire

##### - Physostigmine (Eserine)

Le mieux connu de tous les antiChE. Obtenu à partir des haricots Calabar, c'est un alcaloïde avec un groupement carbaminométhyl.

C'est une très puissant antiChE. Cliniquement utilisé dans le traitement du glaucome (ou néostigmine, composé plus stable).

##### - Diisopropylphosphorofluorure (DFP)

Synthétisé en 1941 par Saunders. C'est un des nombreux organophosphorés qui a été dépisté comme gaz à potentiel nerveux. Usage difficile car très toxique, volatil et absorbé par la peau. Il est "irréversible", on utilise le DFP marqué au P.32 dans l'autoradiographie des synapses et on le lie au GR.

##### - Echothiophate

Inhibiteur irréversible non sélectif des ChE, composé quaternaire, il ne pénètre pas le SNC.

##### - Iso-OMPA (DPDA) (Tétramonoisopropylpyrophosphortétramide)

C'est un inhibiteur sélectif irréversible des PseudoChE mais il y a de grandes différences d'espèces dans le degré de sélectivité.

##### - Ethopropazine (Lysiviane)

Méthosulfate ou dérivé hydrochloré c'est le lysiviane, Dibutil, Parsidol, Rodipal. C'est un inhibiteur sélectif des PseudoChE, il est réversible, il entre dans le SNC et est utilisé dans le traitement du tremblement parkinsonien.

Cette action est attribuable à un blocage "atropine-like" des récepteurs et non aux effets anti-pseudoChE.

##### - BW284C51 - BW297C50 - BW62C47

Ces trois composés sont des inhibiteurs sélectifs de AChE. Tous sont substitués bis-phénylcétone. Ils se lient au site anionique. Ces composés n'ont ni carbamates, ni composés organo-phosphorés, les oximes sont inefficaces.

Le BW284C51 est largement utilisé. La concentration idéale pour avoir un maximum d'inhibition de l'AChE et un minimum d'inhibition de la BuChE est de l'ordre de  $10^{-5}$ . Son injection intrartérielle produit des effets centraux.

(Schéma 25)

### Réactivation des ChE inhibés

La réaction entre une ChE et un organo-phosphoré donne un complexe enzyme phosphorylé stable au lieu d'un très instable complexe acylé intermédiaire normal de la réaction enzyme et ester carboxylique.

Le complexe phosphorylé se coupe très lentement donc l'enzyme est inactivé pour longtemps.

On a développé des agents qui sont capables de déphosphoryler l'enzyme et de renverser ainsi l'inhibition. Ce sont des composés nucléophiles avec une haute affinité pour le phosphore. Les plus efficaces sont ceux avec un groupement oxime (NOH) fortement ionisables. Ils sont toutefois inefficaces contre les inhibiteurs non phosphorylés tels que le BW254C51.

### Potentiel catalytique

L'AChE réagit très rapidement, sa vitesse d'activité est parmi les plus hautes. Ex : 1 gr d'Enzyme de membrane extractible d'anguille peut hydrolyser plus de 30 kgs d'ACh./heure.

### 3. La molécule d'AChE

Le site actif est la partie la plus connue.

#### 3.1. Le poids moléculaire

La molécule peut être divisée en sous-unités mais on ne connaît pas ce qu'elles représentent en terme de fonction d'enzyme.

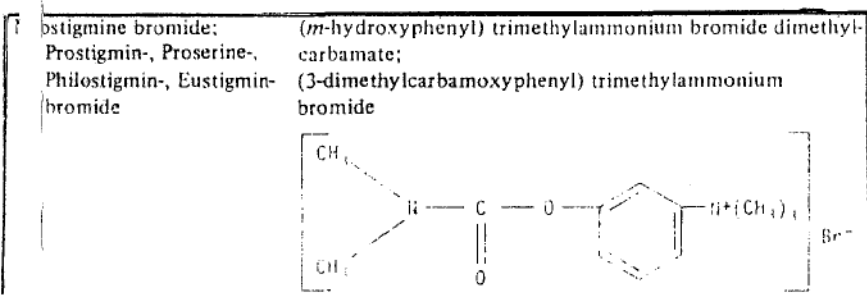
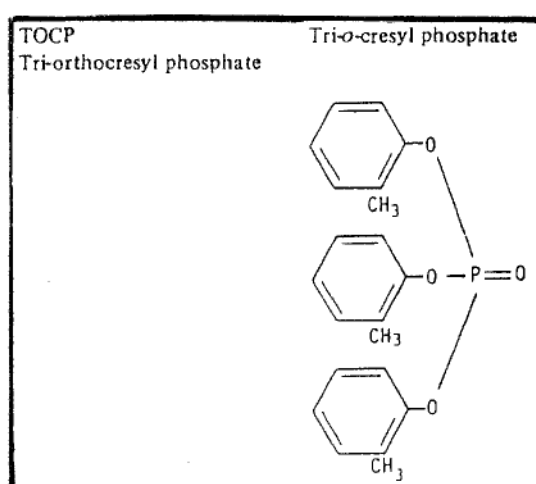
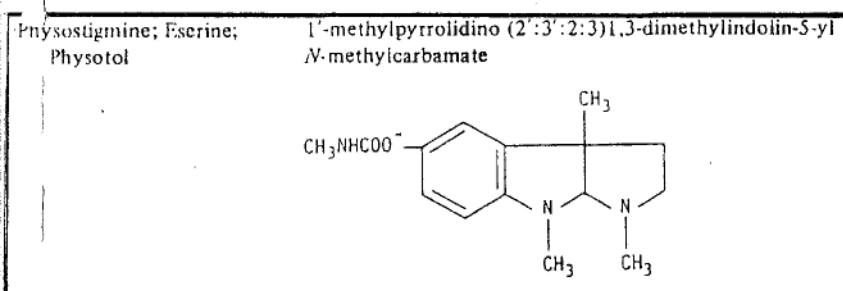
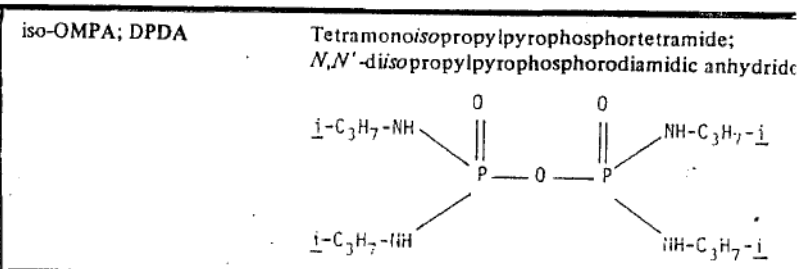
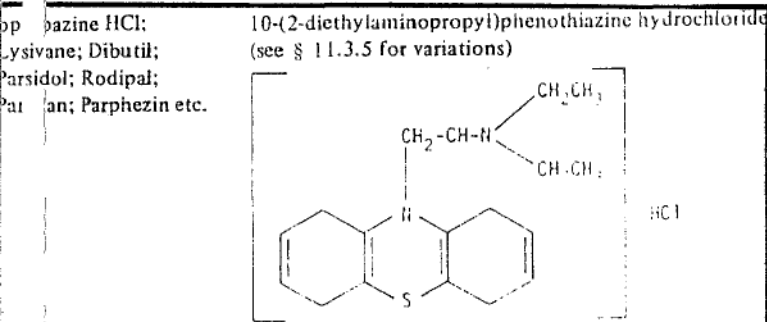
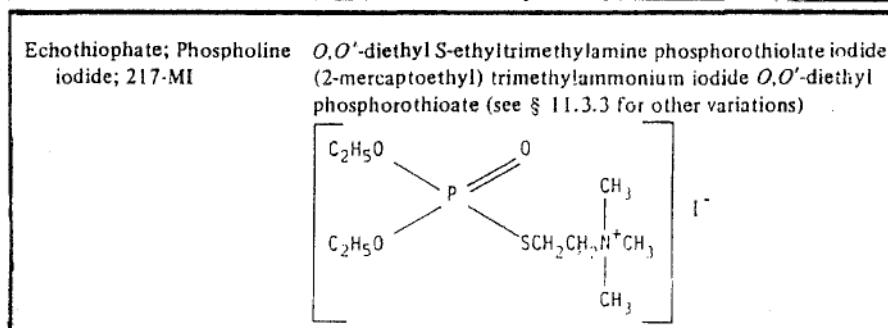
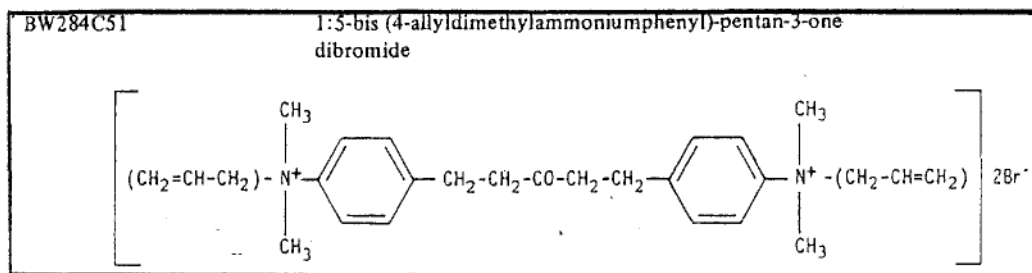
Lenzinger (1971) a suggéré que AChE était un ensemble formé de deux parties, chacune d'elles composées de deux chaînes polypeptidique non identique ; on a un PM = 260 000. Chaque molécule d'AChE possède seulement deux sites actifs.

Wilson suggère lui que l'enzyme active pourrait être composé de quatre sous-unités de plus ou moins même PM dont chacune porterait un site actif. De toute



Schéma 25 d'après SILVER (95)

Différents anticholinestérases communément rencontrés dans la littérature



façon jamais les sous unités large (102 000 de PM) ou petite (49 000 de PM) ne sont enzymatiquement actives seules.

### 3.2. Isoenzymes ou Isosymes

Un enzyme peut exister sous plus d'une forme moléculaire, ces formes multiples d'enzymes ont été détectés primitivement sur la lacticodéshydrogénase en 1957.

Les enzymes oligomères constitués de deux protomères différents ou plus peuvent exister sous différentes formes distinctes. Si ces protomères peuvent se combiner de diverses façon pour former un enzyme actif (ex Tétramère), on dit qu'il se forme des isozymes de cette activité enzymatique.

Ce sont des formes physiquement distinctes, de la même activité catalytique. Ils catalysent donc la même réaction. Seul un examen minutieux peut révéler de subtiles différences physiques, chimiques et immulogiques entre les isozymes.

Pour l'AChE, la signification fonctionnelle des différentes formes isozymiques n'est pas toujours claire.

Le SNC des animaux contient principalement des tétramères (G4) et monomères (G1) avec une petite proportion de dimères, et seulement des traces de formes assymétriques liées au collagène.

Le développement du SNC suit certains principes généraux : (71) en particulier le développement majeur des cellules gliales vient après les neurones ; le système cholinergique se développe avant la maturation générale des neurones, bien que les neurones cholinergiques apparaissent après les neurones monoaminergiques.

La maturation du cerveau humain suit une course distincte dans le temps dans les différentes régions et surtout dans les régions corticales.

La proportion de G1 à G4 est essentiellement identique dans toutes les régions du cerveau, mais ces proportions varient dans certains cas pathologiques.

Ils sont de l'ordre de 70 à 75 % pour G4

5 % pour G2

20 à 25 % pour G1.

Pour les patients atteind de la maladie d'Alzheimer, on a un taux réduit de G4 et parfois un taux élevé de G2. Pour le cerveau humain les proportions adultes sont atteintes à la 11ème semaines de grossesses. Avant, les deux formes G1 et G4 sont solubilisées dans la même proportion. La maturation de l'AChE est complète très tôt

dans le développement, avec le respect des formes moléculaires et leur différente solubilité.

Pour la BuChE, G4 prédomine à 7 ou 8 semaines et est essentiellement la seule forme chez l'adulte.

G4, forme moins soluble, n'est pas nécessairement une forme mature de ChE. La variation de solubilité durant le développement reflète soit une transition entre les différentes molécules ACHE, G1 et G4 ne pouvant pas être distinguées par analyse de sédimentation, soit dû à un changement dans la composition de la membrane conduisant à une modification dans les interaction qui attachent l'enzyme.

La recherche des différentes formes moléculaires de l'AChE et la voie par laquelle elles sont altérées en présence d'une malformation foetale se fait aujourd'hui largement par l'analyse de la sédimentation en gradient de saccharose (9). Dans les cas de DFTN on retrouve une AChE qui sédimente à 10.1 S ( $\pm 0.4$ ) ; cette forme spécifique est absente chez les non DFTN ; elle est la forme majeure présente dans les LA des DFTN responsable de 36 à 50 % de l'activité AChE totale.

Une grande partie de l'activité AChE des LA normaux est particulière, certainement dérivé de fragments de membranes peut être à l'origine des faux (+) dans le test quantitatif (voir plus loin).

La sédimentation détecte les espèces solubles. L'AChE soluble se présente sous différentes formes moléculaires distinctes :

On a un monomère avec l coefficient de sédimentation de : 3.5 à 7.5. S

On a un dimère avec l coefficient de sédimentation de : 6.0 à 6.7 S

On a un tétramère avec l coefficient de sédimentation de : 10.0 à 11.0 S

Le dimère est la forme caractéristique de la membrane érythrocytaire humaine alors que le tétramère est la forme majeure dans les troncs nerveux et pourrait être une production sécrétoire.

La présence d'AChE 10.1 S, correspondant sûrement au tétramère dans les cas de DFTN ; sa présence indique que le tissu nerveux est associé au DFTN. ; une absence dans les LA normaux où d'exomphalos.

Les problèmes associés à la contamination sanguine du LA et de la positivité en présence de malformations foetales non DFTN, sont une source de difficulté aussi bien dans les tests qualitatifs que quantitatifs (voir plus loin).

Le dépistage de la forme tétramère 10.1 S "DFTN. spécifique", facilement repérable de la forme dimère érythrocytaire, ouvre une bonne application diagnostique.

### 3.3. Mécanisme d'action

La fonction primaire de l'AChE dans les tissus animaux est de catalyser l'hydrolyse de l'ACh.

Le site actif de l'enzyme (défini par Dixon et Webb en 1964) est responsable des propriétés enzymatiques de la molécule.

Le site actif présente deux sous-sites :

- 1 site anionique chargé négativement (-),
- 1 site estérasique contenant un groupe acide (électrophile) et un basique (nucléophile) respectivement H et G.

Lors de l'hydrolyse on a :

1. L'azote quaternaire de l'ACh lié par des forces de Van der Waals et de Coulomb au site anionique et oriente le groupe carbonyle au site estérasique : formation d'un complexe Enzyme-Substrat.
2. Changements électroniques au site estérasique laissant un complexe Enz.-acyl et de la choline.
3. Enz-acyl rapidement hydrolysé.

En fait le processus catalytique est plus compliqué que cette représentation bidimensionnelle ; les structures tertiaires et quaternaires des protéines, ainsi que des changements conformationnels au site actif interviennent.

#### Structure du site actif

La dimension entre les deux sites va de 2,5 à 5,0 Å selon les espèces.

C'est la possession du site chargé (-) (anionique) qui donne aux cholinestérases leur spécificité pour les substrats cationiques et les distingue des autres estérases. La charge est portée par un groupe co-carboxyle d'un acide glutamique.

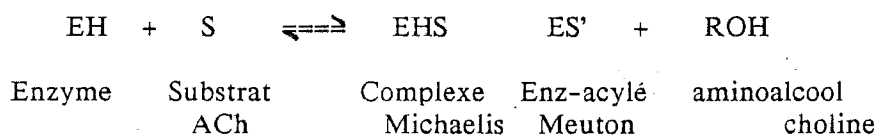
Pour le site estérasique, c'est le O.H. de la serine qui constitue le récepteur acyl nucleophilique ; le groupe imidazole de l'histidine joue un rôle capital de base générale de catalyse et réhausse la nucléophilie de la serine.

Tous ceci ne doit pas être regardé comme un arrangement statique. La réactivité des groupes est liée à leur proximité et le degré d'interaction peut changer durant la catalyse comme le résultat de changements conformationnels de l'enzyme.

(Schéma 26)

### Cinétique de l'AChE

L'enzyme suit les lois de l'enzymologie soit la formation d'un complexe enzyme-substrat.



Le pH influence VMax et KM du fait des groupes ionisés dans l'enzyme.

L'augmentation de l'AChE à la jonction neuromusculaire est juste adéquate pour se combiner à l'ACh libérée à chaque impulsion, il n'y a pas de surplus (Barnard 1971).

### Relation AChE et ACh récepteur

C'est un problème encore très controversé ; que représente les changements de perméabilité en termes de structures ?.

Une des théories les plus couramment acceptée est celle des ionophores qui sont en relation spatiale fermée avec les récepteurs qui s'ouvrent ou se ferment en fonction de la conformation du récepteur.

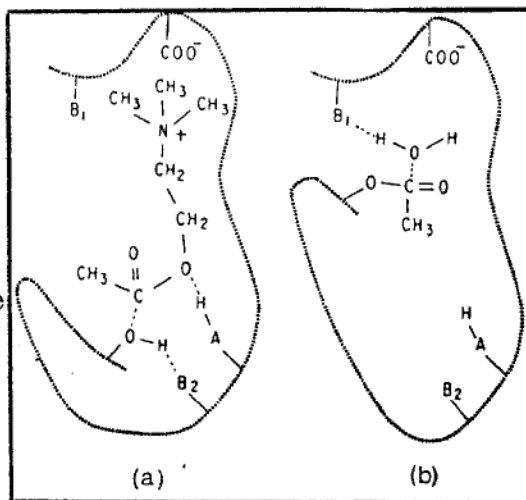
L'AChE et ACh, bien que ayant une relation spatiale fermée, formant même une mosaïque dans la membrane post-synaptique, ce sont néanmoins des



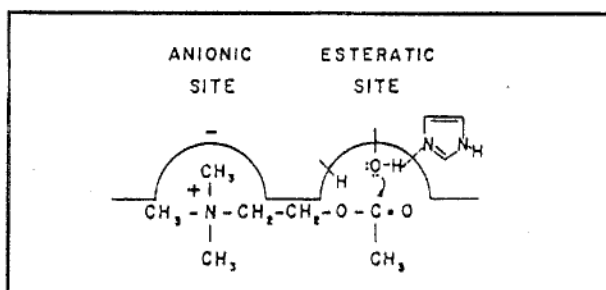
Schéma 26 d'après SILVER (95)

Structure du site actif Krupka (1966)

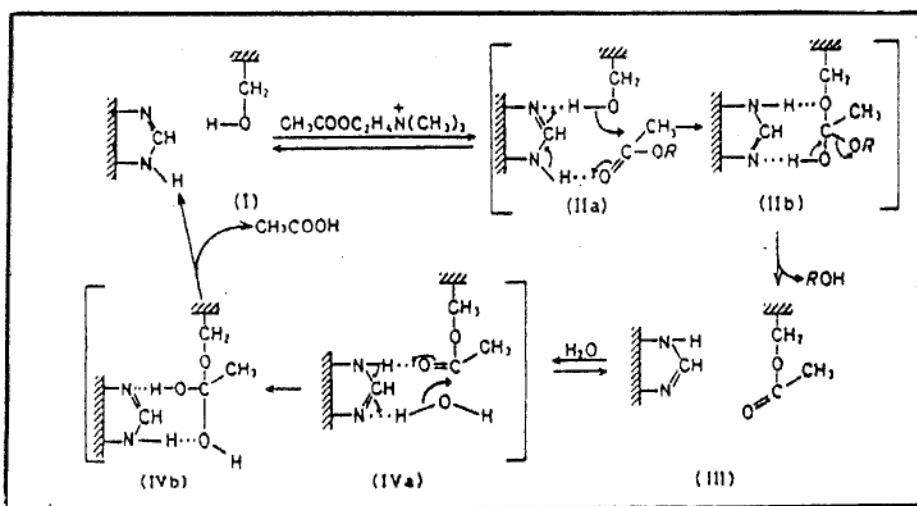
B1 et B2 sont des groupes basiques  
 AH le groupe acide  
 OH et COO<sup>-</sup> l'hydroxyl de la serine et le site anionique  
 (a) montre le complexe enz-subot. pour l'ACh  
 (b) montre le produit de la réaction



Représentation schématique de l'interaction entre les groupes actifs de AChE et le substrat (WILSON 1967)



Rôle proposé de l'imidazole dans le site estérastique (Bretkin et Rozengart 1965)



macromolécules séparées. Le site récepteur et le site hydrolysant de l'ACh sont présents sur la même molécule mais sur des parties différentes, peut être des chaînes polypeptidiques différentes.

### Effets allostériques

On peut classer l'AChE comme une protéine allostérique, elle possède d'autre site de liaison pour des ligands ou effecteurs allostériques.

Ils entraînent des modification réversibles de la structure moléculaire tertiaire modifiant ainsi les propriétés du site actif en changeant un ou plusieurs paramètres cinétiques.

Les sites jouent un rôle dans la régulation de l'activité par des "feed-back" via les sites allostériques.

## **4. Méthodes d'étude des ChE**

Les méthodes utilisées dans le cadre du diagnostic des DFTN. (voir plus loin) découlent toutes de ces méthodes d'étude.

### **4.1. Choix du substrat**

Le choix final dépend de l'étude ; quelque soit le problème et la méthode, il est nécessaire d'établir la spécificité de ou des enzymes avant examen.

Les ChE doivent être distingués des estérases non spécifiques

L'AChE de la BuChE ou d'autres pseudoChE.

Ces distinctions sont faites par l'utilisation de combinaisons appropriées d'un substrat "spécifique" et d'un inhibiteur "spécifique" mais spécifique relative plutôt qu'absolue.

Par exemple : ACh, substrat naturel c'est le substrat de choix pour tester les propriétés de l'AChE purifié mais pas pour l'histochemie car les produits d'hydrolyse sont solubles.

On utilise souvent l'acétyl Beta méthylcholine (MeCh) pour des mesures biochimiques de l'AChE.

Les thioesters de la choline, introduits d'abord en histochemie, sont aussi utilisés en biochemie ; ils sont hydrolysés plus vite que ACh.

On n'a pas de substrat réellement spécifique pour AChE. L'AcThCh est relativement spécifique des cholinestérases par rapport aux estérases simples. Moins de 1 % de l'hydrolysate d'AcThCh est du à la pseudoChE.

#### Choix de l'inhibiteur

Le plus utilisé pour la distinction des ChE est l'ésérine.

En histochimie les plus utilisés sont l'ISO.OMPA et le Mipafox, inhibiteur organophosphoré irréversible de la pseudo ChE.

La lysivane est plus sûre à utiliser que les organo-phosphorés. Le plus satisfaisant des différents inhibiteurs "sélectifs" de l'AChE est le BW 284C51.

### **4.2. Différentes méthodes**

#### Méthodes biochimiques

L'AChE est dans un complexe lipoprotéique à la différence de la PseudoChE qui est soluble dans l'eau donc l'extraction est plus difficile.

- méthodes gazométriques,
- méthodes pHmétriques,
- méthodes titrimétriques,
- méthodes spectrophotométriques,
- méthodes fluorimétriques.

#### Méthode histochimiques

Les ChE peuvent être déterminés avec la microscopie électronique ou optique. L'enzyme dans le tissu hydrolyse un substrat présent dans le milieu d'incubation et le produit d'hydrolyse réagit avec d'autres composés pour former un précipité insoluble. Le précipité peut être visualisé.

Exemple : technique de la thiocholine de Koelle.

L'AcThCh comme substrat, du Cuivre et de la glycine qui chélate le cuivre et minimise les effets inhibiteurs sur l'enzyme.

La thiocholine de cuivre qui est précipitée est blanche et le sel insoluble peut-être examiné par contraste.



Pour prévenir la diffusion de la thiocholine, elle doit être immédiatement précipité en un sel insoluble avec  $\text{Cu}^{2+}$ , il faut une forte concentration en  $\text{Cu}^{2+}$  au voisinage de l'enzyme.

(Schéma 27)

Pour éviter les artefacts :

- il faut que le cuivre est le temps de pénétrer le milieu réactionnel
- on ajoute également  $\text{MgCl}_2$  qui active les cholinestérases
- le pH du tampon est réduit de 8.05 à 6.5 ou 6.0

La localisation plus précise du produit final est dû à la réduction de l'activité enzymatique, celle-ci est dû à deux facteurs :

- un pH plus acide, l'enzyme est bien en dessous de son pH optimum,
- la glycine chélate le Cu moins efficacement quand le pH est bas, ainsi l'inhibition de l'enzyme par les ions cuivriques libres serait augmenté.

A un pH bas, le dépôt précis du produit final se fait sous des conditions de faible hydrolyse.

On préconise donc une incubation à la température ambiante, à un pH voisin de 6.0 ; Plus on réduit le pH, plus le temps d'incubation doit être élevé.

On peut améliorer la spécificité avec l'or comme produit de captation, on utilise le dithiosulfate auro-sodique (  $(\text{Au Na}_3 (\text{S}_2 \text{O}_3)_2$  )

#### Note sur les thiocholines comme substrats

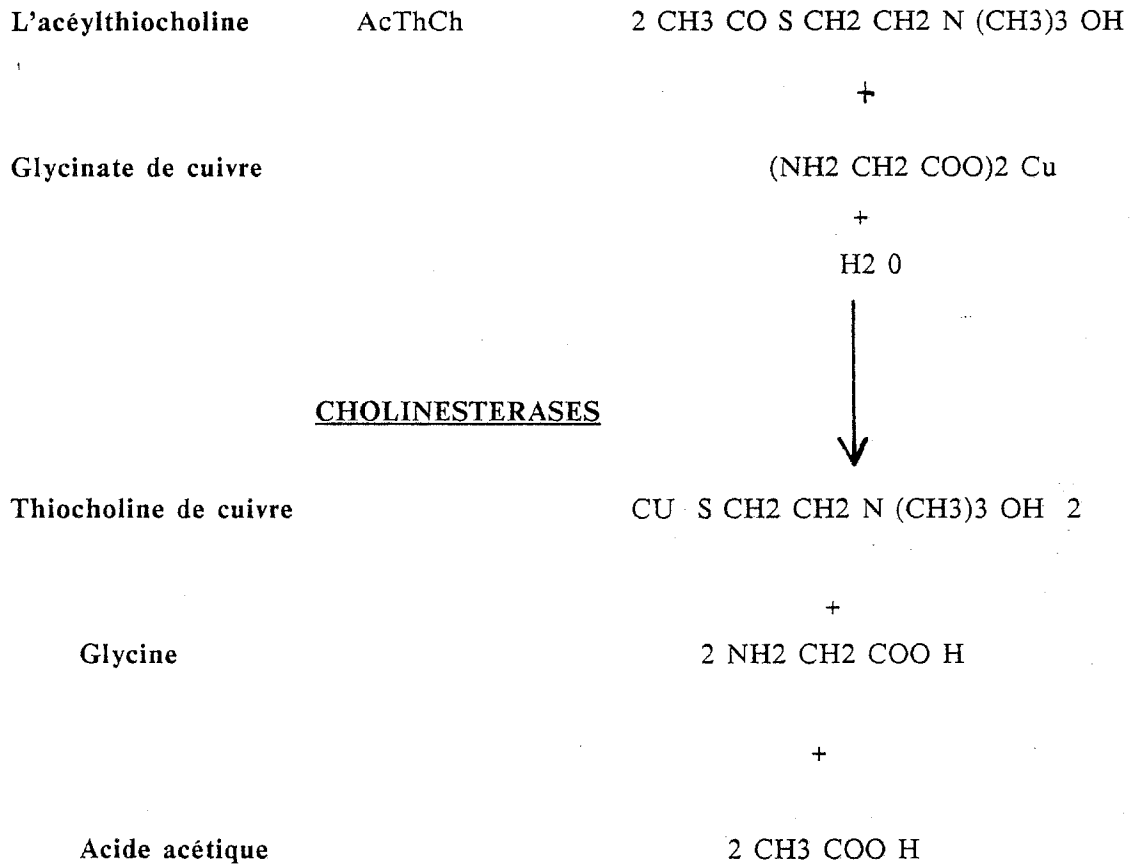
Elles sont usuellement utilisées comme substrats sous forme iodées.

Dans la méthode de Koelle, l'iode est précipité avec du sulfate de Cu (ou acétate)

$$2 \text{Cu}^{2+} + 4\text{I}^- \longrightarrow 2 \text{CuI} + \text{I}_2$$
 (l'iode libre formé est absorbé sur le précipité de iodure cuivrique).

L'ordre d'addition des constituants a de l'importance et doit être respecté.

Les solutions réactifs sont stockés pour quelques semaines au réfrigérateur, mais le milieu final n'est stable que quelques heures.

Schéma 27La réaction thiocholine

## 5. Localisation, synthèse et transport de l'AChE

Ceci reste une partie très controversée.

### 5.1 Localisation subcellulaire (schéma 28)

Les fibres motrices contiennent une grande concentration de vésicules, le type prédominant dépendant du type de nerf. Les vésicules contenant de l'ACh sont caractéristiques des terminaux cholinergiques, alors que des vésicules à noyau dense seront les indices de la présence de fibres catécholaminergiques. Enfin certains terminaux contiennent des vésicules des deux types.

La grande part de l'AChE est lié aux composants des membranes (ceci est différent des pseudoChE qui eux sont solubles) surtout les membranes des éléments synaptiques. Par contre le rôle de l'AChE contenue dans le corps cellulaire est peu connu.

L'AChE existerait dans un état intermédiaire entre celui du complexe lipoprotéique qui est rattaché aux membranes "in vivo" et la forme pure. Les fractions cellulaires riches en AChE ont une haute concentration en gangliosides, il y aurait une signification fonctionnelle entre les gangliosides et la protéine réceptrice, ils pourraient activer parfois l'AChE. La vésicule synaptique contient l'ACh mais pas AChE. C'est l'AChE externe qui est responsable de l'hydrolyse de l'AChE. On parle d'enzyme externe comme "fonctionnel", et d'enzyme interne comme "réserve enzyme". Le plus souvent la réserve d'enzyme est située à l'intérieur des fibres présynaptiques.

Plusieurs voies nerveuses agissent par l'intermédiaire d'une substance chimique ; beaucoup de médiateurs sont encore inconnus. Toutefois, il est évident que l'ACh est le médiateur chimique de toutes les synapses entre les fibres pré-ganglionnaires et postganglionnaires du SNA ; De même qu'aux jonctions myoneurales et à toutes les terminaisons nerveuses postganglionnaires para-sympathiques et à quelques terminaisons nerveuses postganglionnaires sympathiques.

L'activité de l'AChE dans l'organisme est contrôlée par l'action inhibitrice de l'AChE. La dégradation de l'AChE est une réaction exergonique.

Schéma 28 d'après SILVER (95)

Diagramme généralisé de l'ultrastructure d'un neurone

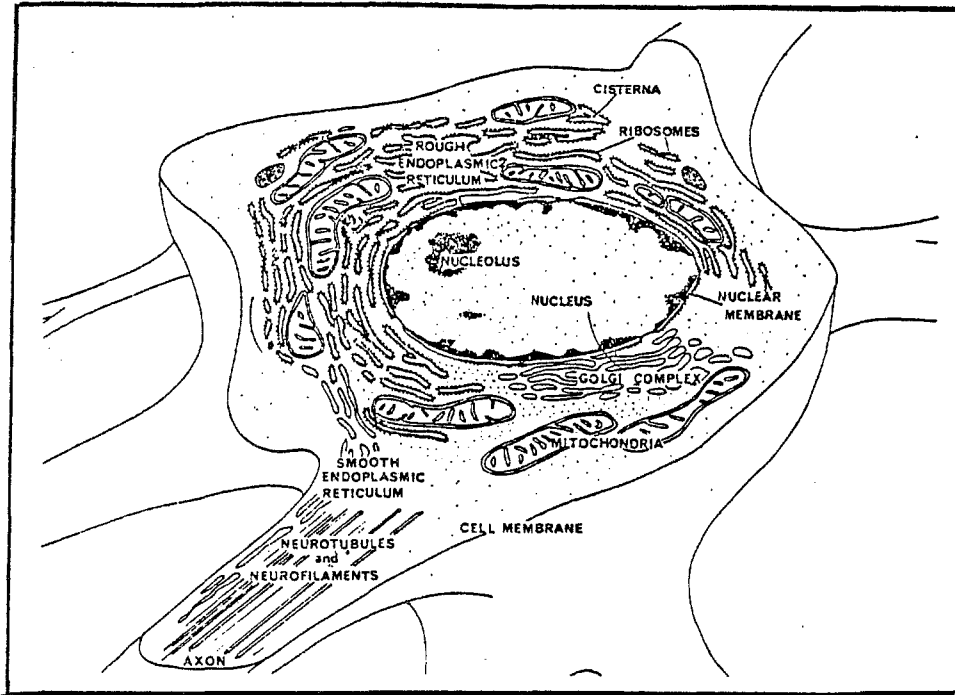
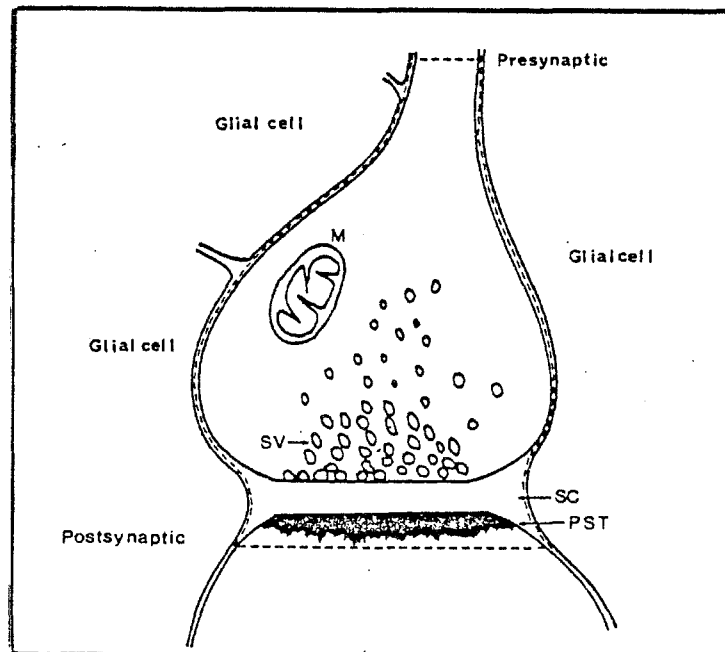


Diagramme illustrant les composants pré- et post synaptique

M = mitochondrie

SC = fente synaptique

PST = épaissement post-synaptique.



## 5.2. Synthèse et transport

L'AChE semble élaboré dans le réticulum endoplasmique sous l'influence du RNA ribosomal. La plus grosse part de l'enzyme est associée avec l'axone et ses parties terminales dans la cellule. On a une synthèse au niveau du péricaryon et également une synthèse locale dans l'axone.

L'AChE transit du corps cellulaire à la périphérie, l'enzyme voyage soit par diffusion passive, soit par un mécanisme actif, soit translocation de l'enzyme, la vitesse est de 30 à 60 mm/jour mais jusqu'à 260 mm/jour. Elle varie selon les tissus et les espèces. On a un mécanisme rapide et un lent.

La composante rapide est en prédominance liée à la membrane et la composante lente semble représenter la protéine soluble.

Les neurotubules interviennent dans le transport, l'enzyme non lié serait dans des vésicules et avancent dans les neurotubules.

Au niveau de la jonction neuromusculaire l'AChE est localisée surtout post synaptiquement, surtout, dans la membrane sarcoplasmique post jonctionnelle. L'inervation exerce une influence considérable sur les taux d'enzyme.

Il reste encore beaucoup d'incertitude dans la synthèse, le transport et la localisation de l'enzyme.

## 6. L'AChE dans la transmission nerveuse

### 6.1. Le système nerveux moteur périphérique

#### - Les fibres somatiques

L'AChE est présente dans le corps cellulaire, l'axone, et aussi dans la jonction neuromusculaire.

La plupart de l'AChE est situé post-synaptiquement sur la surface des plis de la jonction. Elle est en bonne position pour hydrolyser ACh libérée par les terminaisons des nerfs présynaptiques. La ChE, en terminant l'action de l'AChE sur la membrane post synaptique, joue un rôle vital dans la transmission ordonnée des impulsions à la jonction neuromusculaire.

#### - Le SNA - Les ganglions

L'AChE est généralement accepté comme le transmetteur aux ganglions sympathiques et parasympathiques et aussi aux terminaisons des fibres post-synaptiques. L'AChE est associé aux éléments cholinergiques pré et post

ganglionnaires.

## 6.2. Le SNC

L'AChE présente dans le SNC, accomplit le même rôle qu'au niveau de la plaque motrice. La présence d'AChE aux jonctions cholinergiques du SNC et à la périphérie est une des pierres angulaires sur laquelle est basée notre compréhension de la transmission cholinergique.

## 6.3. Les cholinestérases dans les membranes perméables

Les cholinestérases sont associées avec de nombreuses membranes pour le transport de l'eau et des ions. Elles ont un rôle dans le processus de contrôle de la perméabilité et du transport, surtout sodium, au travers des membranes. Le S.N. est important dans la maintenance de l'équilibre osmotique.

L'AChE dans les érythrocytes, les plaquettes, le tissu vasculaire, le placenta existe mais le rôle est mal connu.

L'AChE dans le tissu nerveux aurait un rôle métabolique autre que dans la transmission, ceci consolide le fait que la présence d'AChE ne peut pas être acceptée comme preuve de l'existence de mécanisme cholinergique.

## 7. Pseudocholinestérases

Ils forment une famille entière d'enzyme ; ils hydrolysent les esters de la choline tel que BuCh ou PrCh plus rapidement que ACh. Un enzyme peut être identifié comme une pseudoChE soit sur la base de sa susceptibilité aux inhibiteurs spécifiques des pseudoChE, soit sur la base de sa résistance aux inhibiteurs de l'AChE.

Une autre caractéristique distinctive avec l'AChE est leur comportement envers différentes concentrations d'ACh. Un excès d'ACh inhibera l'AChE mais pas la pseudoChE.

Les pseudoChE sont des glycoprotéines, ces enzymes sont très solubles dans l'eau et donc beaucoup plus facilement extractibles que AChE.

Dans le sérum, la protéine est de type  $\alpha$  2 globuline et  $\gamma$  globuline, l'enzyme

est associé avec l'acide sialique. L'AChE n'apparaît pas comme une sialoprotéine.

La différence dans le comportement de l'AChE et la pseudoChE est maintenant attribuée aux différences dans ou autour de leurs sites anionique bien que de mineures différences entre les sites estérasiques pourraient y contribuer.

La pseudoChE a des isozymes et des variants atypiques, résistants. Dibucaine , Fluorure résistant, type gène silencieux.

Chez l'homme, la pseudoChE est produite dans le foie, de ce fait le taux d'activité sanguin est un bon index de la fonction hépatique. Sa fonction n'est pas très connue, elle pourrait potentialiser les inhibiteurs de l'AChE qui sont dans le sang.

### En résumé

Les esters de la choline peuvent être hydrolysés par :

- des estérases non spécifiques,
- la cholinestérase non spécifique ou pseudocholinestérase,
- l'acétylcholinestérase.

L'AChE est une des cholinestérases dont l'activité peut être différenciée des autres pseudoChE par l'utilisation de substrats et d'inhibiteurs spécifiques.

Les AChE représentent un groupe d'isoenzymes localisés à l'origine dans les cellules du cerveau et du SNC

L'AChE est sécrétée par différentes cellules excitables :

- les cellules chromaffines et ganglionnaires,
- les neurones moteurs,
- les neurones du SNC
- les cellules musculaires in vivo et in vitro.

Le mécanisme de sécrétion active fait intervenir le sodium et le calcium extracellulaire. Il existe différentes formes moléculaires solubles, une seule forme est sécrétée dans les espaces extracellulaires et passe finalement dans le liquide cébrospinal. L'épendyme au niveau des ventricules cérébraux, n'est pas une barrière au passage des grosses molécules comme les protéines ; le liquide cébrospinal foetal contient une concentration relativement haute des substances présentes dans les liquides extracellulaires du cerveau dont l'AChE.

La sécrétion apparaît être une fonction de maturité si bien que des taux plus élevés d'AChE soluble sont trouvés dans le LCR et le sérum que dans les tissus adultes.

S'il existe une malformation ouverte du tube neural chez le fœtus, l'AChE pourra passer dans le LA, il pourra filtrer dans la circulation foetale mais sera absente du sérum maternel. Le serum adulte ne contient pas d'AChE, mais on y trouve des ChEns.

Du point de vue diagnostic anténatal l'AChE contenu dans le LA peut être considéré comme une foeto-protéine spécifique ayant son origine dans le liquide céphalorachidien ou tout autre terminaison nerveuse exposée avec une dérivation minimale dans la plasma foetal.

Lors d'un SB le passage se fait par communication direct du LCR et du LA, et par l'intermédiaire des plexus vasculaires lorsqu'il s'agit d'une anencéphalie.

Un taux élevé d'AChE dans le L.A. a également été observé dans les malformations de la paroi abdominale (omphalocèle), la sécrétion d'AChE se ferait à partir des plexus nerveux des organes herniés.

Smith (98) et Chubb (17) ont proposé séparément en 1979 le dosage de l'activité AChE du L.A. comme test diagnostique des DFTN. Smith a signalé aussi la séparation électrophorétique de l'AChE des autres ChE.

La mesure de l'AChE est compliquée par la présence dans la plupart des tissus de ChEns. Deux méthodes permettent actuellement d'aborder le problème de la mesure de l'AChE :

- un essai quantitatif avec mesure de l'activité AChE,
- un essai qualitatif par séparation électrophorétique.

## **B - ETUDE QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE AChE**

### **1. Méthodes**

(17) (39) (40) (41) (62) (63) (70) (86) (96) (97) (98) (103) (105) (108)

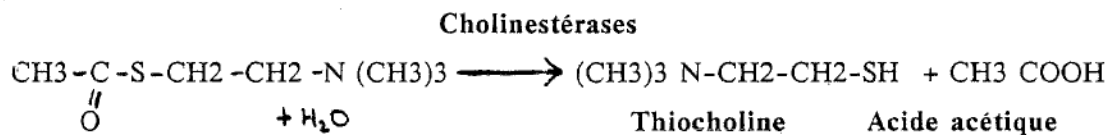
Smith et Chubb ont présenté une méthode de dosage originale en 1975 puis en 1979. Il s'agit de la méthode d'Ellman (1961) qui repose sur l'hydrolyse de l'actétylthiocholine et la détection des radicaux thiol libérés par le DTNB (acide dithiobisnitrobenzoïque). (Schéma 29)



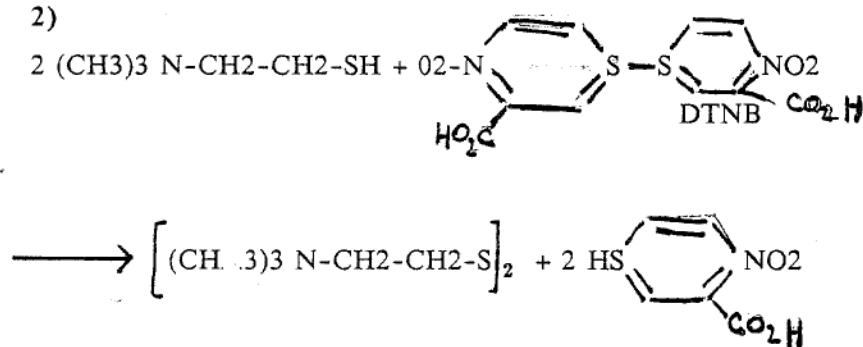
## Schéma 29

Méthode quantitative d'après la méthode d'Ellmann

## 1) Réaction d'Ellman.



2)



5 thio2 nitrobenzoate - Anion de couleur jaune

La lecture de l'absorbance du 5 dithiobioéniltrobenzoate formé est effectuée à 412 nm, l'activité cholinestérase totale est alors obtenue et exprimée en  $\mu$ mole de substrat hydrolysé par minute.

Il existe deux variantes pour déterminer l'activité spécifique de l'AChE.

1. Lecture de l'absorbance à 412 nm après incubation avec l'éthopropazine ou un autre inhibiteur des ChEnS. C'est la technique proposée par Dale (25). Cette méthode apparaît à l'auteur plus directe, plus rapide et surtout évite la toxicité du BW 284 C51 utilisé par Legge (62).

2. La lecture de l'absorbance à 412 nm après incubation avec le BW 284 C51, c'est la technique la plus utilisée dans les différentes études réalisées.

Dans les deux cas l'activité est calculée à partir de la différence entre l'activité cholinestérasique totale et l'activité ChEnS ou AChE dosé après action de l'inhibiteur spécifique. On peut établir une courbe étalon à partir d'enzyme (AChE) extrait par exemple d'érythrocytes bovins.

Tous les dosages doivent être réalisés en double.

Les conditions optimales ne sont pas tout à fait réunies et posent un problème quant à l'utilisation des inhibiteurs : en effet, le dosage quantitatif de l'activité AChE est dépendant de la concentration de l'inhibiteur BW 284 C51. Si elle est trop élevée, certaines des ChEnS seront inhibées et le taux d'AChE calculé sera trop élevé ; par contre, si la concentration en BW 284 C51 est trop faible, l'AChE sera incomplètement inhibé et un taux d'AChE trop faible.

Certains auteurs utilisent d'autres substrats comme l'ACh. ou l'acétyl B méthylcholine. D'autres proposent de doser uniquement l'activité ChE globale, ce qui éviterait l'emploi d'un inhibiteur toxique donc ne dépend pas de sa concentration et utilise un substrat naturel (69). Mais cette technique reste sensible à l'âge gestationnel et surtout à la contamination sanguine maternelle ou foetale.

## 2. Les résultats

### 2.1. Grossesses normales

Les résultats obtenus dans les différentes études sont relativement disparates

Smith et Wald arrivent pour les échantillons des grossesses normales, à une moyenne de 2,5 u/l à 3,7 u/l avec des extrême assez large de 0,2 à 9,0 u/l. D'autres sont plus faibles ou plus élevés.

Toutes les études se retrouvent toutefois pour convenir que les dosages établis pour des L.A. entre 16 et 24 semaines ne sont que peu influencés par l'âge de la grossesse. L'âge n'intervient pas de façon significative bien que responsable d'une baisse régulière.

Au delà de 24 semaines l'interprétation est très difficile. Au 3e trimestre Dale obtient une moyenne de 0.75 u/l entre 26 et 38 semaines.

Les différentes études sont difficilement comparables car les méthodes manquent de standardisation d'une part, et d'autre part, il n'est pas toujours précisé dans les résultats publiés si les échantillons contaminés par du sang sont inclus pour le calcul de l'activité moyenne.

## 2.2. Grossesses pathologiques

### **- Dans les grossesses DFTN**

La valeur moyenne est, dans toutes les études, plus élevée de 6 à 8 u/l ; elle se situe autour de 9 u/l.

On note en général des valeurs plus élevées dans les anencéphalies que dans les S.B.

Il existe très souvent une zone de chevauchement des résultats normaux et pathologiques, ce qui constitue un inconvénient majeur à la méthode.

### **- Dans les grossesses pathologiques sans DFTN**

Tous les auteurs ont retrouvés des résultats élevés, c'est-à-dire positifs dans d'autres circonstances, ce qui pose le problème de la spécificité du dosage pour le diagnostique des DFTN

- Les omphalocèles sont soit normaux,  
soit assez souvent élevés,

Bonham (10) (103) propose pour séparer omphalocèle et DFTN de doser également la butyrylcholinestérase (BuChE) et d'établir le rapport BuChE/AChE plus

discriminant s'il n'existe pas de contamination par du sang foetal, source importante de BuChE.

- Quelques cas de syndrome de Turner (Dale)
- de syndrome de Meckel (Seller)
- de mort foetale in utero.

se sont révélés également positifs selon les auteurs : (Schéma 30)

La contamination sanguine du L.A. entraîne, que le liquide provienne d'une grossesse normale ou pathologique, une élévation marquée du taux d'AChE. Il semble que la contamination par du sang foetal induit une élévation plus forte que celle par le sang maternel.

### 3. Conclusion

Il apparaît d'emblée que la mesure de l'activité AChE se heurte dans son application à certaines difficultés :

- celle de la valeur seuil au delà de laquelle le résultat devient pathologique, on a un chevauchement trop important des résultats des grossesses normales et des grossesses à DFTN.

- celle des résultats faux (+) :

taux que l'on détermine à environ 6 à 7 %. (108)

La majorité sont dus à la contamination sanguine foetale rendant l'interprétation douteuse voire impossible, la contamination par le sang maternel étant pratiquement indifférente. Seller indique toutefois, que la présence d'hémoglobine vieillie, peut également fausser les résultats (lors de saignements foeto-placentaires antérieurs à l'amniocentèse).

Le manque de spécificité peut entraîner des faux (+), d'autre source d'AChE peuvent affecter le LA : liquide d'hygroma, liquide d'ascite.

En pratique, c'est le problème de la contamination sanguine par sa fréquence qui constitue l'obstacle majeur à l'utilisation de la mesure de l'activité AChE comme test diagnostique des DFTN

## COMPARAISON DES TAUX D'ACHE RETROUVES PAR PLUSIEURS AUTEURS

AUTEURS	GROSSESSES NORMALES		MALFORMATIONS DU TUBE NEURAL						INHIBITEUR
			SPINA BIFIDA			ANENCEPHALIE			
			Moyenne	Extrêmes	Nb d'échantil.	Moyenne	Extrêmes	Nb d'échantil.	
SMITH 1979	2,6	0,8 -8,6	9	7,2	4,8 -11,7	8	9,9	6,2 -17,00	BW 284 C 51
CHUBB 1979	2,8	0,2 -8,9	2	6,2	4,5 -8,0	1	23,2		BW 284 C 51
DALE	2,56	0,4 -5,8	26	10,3 (SD <sup>+</sup> 3,53)	5,5 -20,4	7	15,3	10,2 -19,5	Lysivane

### Limites et avantages du test quantitatif

- **Avantages :** C'est un test simple, bon marché et rapide. (Mais le diagnostic prénatal des DFTN n'implique pas une notion d'extrême urgence).  
Si on exclut les échantillons contaminés par du sang, la comparaison des résultats avec et sans inhibiteur donne une information précise sur l'activité AChE.
- **Limites :** Trop sensible à la contamination sanguine surtout foetale.  
Il n'est pas totalement spécifique ;  
La sensibilité n'est pas absolue (chevauchement des résultats).  
Il dépend de la concentration en inhibiteur.

Le dosage de l'AChE, comme beaucoup d'autres dosages d'enzymologie clinique, souffre des changements subtiles des méthodes d'un opérateur à l'autre.

La mesure de l'activité AChE a sa place comme test préalable à l'étude qualitative sur gel afin de prévoir la quantité de LA à déposer sur le gel en fonction de l'activité, et également de mieux interpréter le profil électrophorétique. Il ne peut constituer qu'une étape préalable utile pour la réalisation et l'interprétation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des cholinestérases.

### C - LA METHODE QUALITATIVE OU TEST QUALITATIF AChE (61) (14) (16) (19) (41) (54) (69) (72) (79) (81) (86) (92) (98)

Le dosage quantitatif présente des inconvénients majeurs, c'est pourquoi a été proposé (Smith (98) en 1979) une analyse qualitative des échantillons.

Dans son rapport initial Smith a signalé la possibilité de séparer l'AChE des autres ChE par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et a rapporté la présence d'une bande AChE dans les LA de grossesses à DFTN. L'intérêt porté sur la séparation électrophorétique des isoenzymes de la ChE s'est rapidement confirmé et sa supériorité sur l'essai quantitatif a été reconnue de tous.

L'étude électrophorétique des cholinestérases du LA repose sur la présence dans le LA pathologique d'AChE d'origine neuronale normalement absente de ce milieu.

Si on a un DFTN, l'ACHé d'origine neuronale viendra s'ajouter à la BuChE normalement présente.

### 1. Rappel sur l'électrophorèse

C'est la migration de particules sous l'influence d'un courant électrique direct. Pour appliquer la technique, deux besoins simples doivent être réunis :

- les particules que l'on désire étudier, doivent être chargées ou être capables d'accepter une charge.
- le milieu d'électrophorèse doit être capable de conduire le courant électrique.

### Quelques dates

- 1809 Reuss découvre un phénomène de migration de grains de sable sous l'influence d'un courant électrique.
- 1892 Picton et Linder rapporte la première application consciente de la technique.
- 1937 Tiselius : Applications de la technique à la science et à la médecine avec ses expériences d'analyses de protéines sériques.
- 1946 Consden, Gordon et Martin utilisent un gel de silice comme milieu anticonvection pour la séparation des acides aminés et des peptides.
- 1950 Utilisation de l'électrophorèse en biochimie clinique avec l'électrophorèse sur papier pour les protéines du sérum
- 1955 et 1959 technique de haute résolution avec respectivement l'électrophèse en gel d'amidon et de polyacrylamide.

### La charge de la particule

La particule doit être chargée, mais une particule neutre peut se mouvoir dans un champ électrique par la formation de complexe avec un ion chargé. Avec les molécules organiques, le nombre de charge présentes s'apparente au degré d'ionisation qui compose la molécule.





d) La vitesse de migration = 
$$\frac{X.Q.}{6 n. r. \eta}$$

Pour les gels, le tamis moléculaire peut jouer un rôle de barrière.

#### La nature de l'électrolyte

C'est le milieu capable de conduire le courant électrique ; il influence la charge induite de la particule. Il peut former une double couche qui crée une force de résistance.

$$\mu = 1/2 \sum C : Z_1^2$$

Z = charge de l'ion  
C = concentration de l'ion  
 $\mu$  = force ionique.

Si la force ionique augmente, la mobilité diminue, et on a des zones de séparation d'un mélange.

#### La diffusion

C'est le mouvement des particules d'une région à haute concentration vers une basse concentration :  $D = R.T. / 6 \eta . r. N$ . C'est souvent le facteur limitant du degré de résolution.

Un milieu stabilisé est un milieu anti-convection, il réduit la dispersion des particules en limitant les courants de convection.

#### L'adsorption

L'adsorption sur le milieu stabilisant peut diminuer la mobilité mais peut aussi être exploitée.

#### Electro-endosmose

Les groupes chargés existant sur les surfaces du verre ou du milieu stabilisant créent une charge opposée induite. Exemple : sans pH alcalin, ces champs fixes sont négatives et il en résulte, un flot d'électrolyte à la cathode, c'est-à-dire, en opposition au mouvement des particules. Ce phénomène réduit la mobilité mais peut aussi être exploité pour aider à la séparation.

## Méthodes de séparation

- électrophorèse en solution libre,
- électrophorèse en milieu stabilisé ou anticonvection.

Une grande quantité de matériel a été employée : gélatine , Agar, papier, silices, poudre de verre, kieselguhr, acétate de cellulose, amidon, polyacrylamide.

### **1. Electrophorèse sur papier**

Etude de petit volume par rapport à l'électrophorèse libre (10 µl environ).

On l'utilise pour la séparation de composants de petits poids moléculaires. Meilleure séparation en utilisation bidimensionnelle ou couplé à une chromatographie.

En clinique, elle ne nécessite aucun déssalage.

### **2. Acétate de cellulose**

**Avantage :** Matériel sous forme d'un film fin pour séparer de très petites quantités.

- . Absorption minimale des protéines permettant des zones nettes
- . Dosage quantitatif car matériel facilement dissous

**Inconvénients :** . pas d'uniformité selon les lots et les fabricants,

- . produit plus cher que le papier.

### **3. Gel electrophorèse**

Le milieu stabilisant n'est pas "prêt à l'emploi", il requiert des préparatifs mais il est plus intéressant. Il permet l'immunoélectrophorèse.

Un gel consiste en une matrice de matériel hydrophile contenant une quantité d'eau, on peut induire la formation de vrai gel sous certaine condition. On a les gels thermiques si la transformation fait intervenir chaleur et refroidissement. Les gels thixotropiques, si on a un procédé catalysé chimiquement, (ex : polyacrylamide).

La densité limite le mouvement des particules.

#### **- Gel d'agar**

C'est un polysaccharide de composition chimique non défini, il est très endosmogène, ceci est exploité pour les Béta et gamma-globulines.

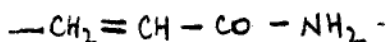
- Gel d'amidon

En plus de la séparation par la charge, l'endosmose et l'adsorption, on a un rôle de tamisage moléculaire. Soit la charge, soit le poids et la taille moléculaire prédomine dans la séparation, cela dépend de la composition du gel.

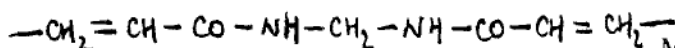
2 Gel de polyacrylamide

Introduit par Raymond en 1959.

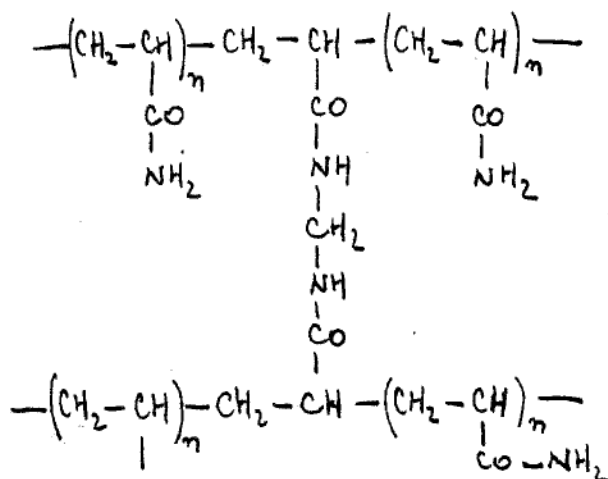
Le gel est formé par polymérisation de deux monomères : l'acrylamide et le méthylène bis acrylamide. On a des plages de polyacrylamide liées ensemble par l'agent de liaison le méthylène bis acrylamide.



acrylamide



Méthylène bis acrylamide



Gel de polyamylamide

Avantages sur le gel d'amidon :

La composition est bien définie, et permet en fonction des concentrations, la préparation de gel avec des pores de taille différentes et de propriétés physiques différentes.

La nature transparente du gel, en plus de l'absence de souillure, rend l'évaluation visuelle ou densitométrique facile.

Le gel forme une matrice idéale pour la détection enzymatique, permettant facilement l'accès du substrat et de solution colorée et empêchant la diffusion de protéines séparées.

Les gels sont relativement facilement adaptables pour une électrophorèse préparatrice et le gel peut être macéré pour permettre l'extraction.

Les gels sont durs et facilement maniabiles.

Raymond a d'abord utilisé un système tampon continu et un gel à une seule concentration.

Puis Ornstein et Davis ont utilisé des systèmes tampons, pH, et gel discontinus dans des tubes cylindriques en verre.

Pour être séparée, les particules doivent être concentrées dans une zone de départ.

Le sommet du gel de séparation doit être absolument lisse.

La polymérisation de l'acrylamide et l'incorporation de l'agent liant peut être effectué dans de nombreuses voies. Le système le plus connu implique l'initiation de la polymérisation par la formation de radicaux libres oxygénés par le persulfate d'ammonium catalysé par la base TEMED.

Alternativement des radicaux libres peuvent être produits par l'action de la lumière U.V. sur la riboflavine qui se substitue alors au persulfate. On a une solution stockable contenant les deux monomères dans la proportion désirée et mélangés avec le tampon TEMED et une solution de riboflavine ou d'ammonium persulfate. Il ne faut pas d'excès d'oxygène, les solutions sont dégazées. La polymérisation est inhibée par le froid, les solutions doivent être chauffées à la température de la pièce avant mélange.

Durant la polymérisation le contact avec l'air doit être évité, donc soit avec moule fermé, soit en plaçant une couche d'eau sur le sommet du gel (ce qui donne une surface lisse).

Le système de catalyse peut donner des artéfacts selon l'électrophorèse. Le système persulfate est le plus simple et le plus reproductible.

Pour explorer les propriétés de tamisage moléculaire, un gel avec une taille de pore déterminée doit être préparé. La quantité des deux monomères influence la taille des pores et est vitale pour la nature physique du gel.

Pour avoir un gel, il faut 2 grammes de monomère total pour 100 ml de solution, le diamètre des pores est minimum à 5 % de bis.

Le % de bis est donné par la formule de Richard :  $6.5 - 0.3 \cdot T$

$T =$  Monomère total en g/100 ml.

On utilise couramment 5 % de bis.

Pour les protéines sériques un gel à 7 g/100 ml est très satisfaisant. On peut modifier un gel avec des groupes chargés.

La séparation sur un gel modifié dépend partiellement de la charge et partiellement de la taille de la particule.

Des protéines de poids moléculaire identique et de charge différente donneront des lignes parallèles.

Des protéines de poids différent et de charge identique donneront des lignes avec intersection.

On peut calculer le poids moléculaire d'une protéine.

La dimension idéale des tubes est de 1.5 mm x 75 x 200 mm.

De nombreux systèmes tampon introduits pour d'autres types d'électrophorèse seront satisfaisants avec le gel de polyacrylamide : par exemple système tris-glycine et tris-borate de Smith pour protéine et isoenzyme.

Les considérations couvrant le choix du tampon pour le polyacrylamide sont en grandes parties identiques à celles des autres milieux, bien qu'un des avantages de la technique soit, qu'un large choix de pH reste possible.

(Schéma 31)

### 3. Méthode

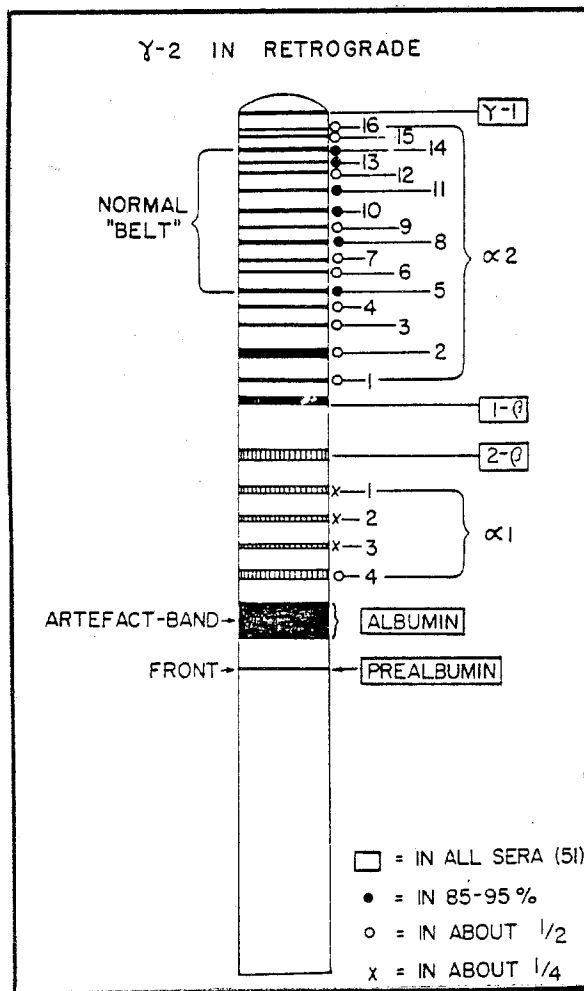
#### 3.1. Principe

Le principe consiste en la séparation des isozymes de la cholinestérase (ChEnS) et l'AChE par électrophorèse ; leur vitesse de migration n'étant pas la même.

En effet les ChEnS migrent plus lentement que l'AChE.

Schéma 31 d'après CLARCK (18)

Serum humain normal par électrophorèse sur gel de polyamide



Les nombreuses études réalisées utilisent pratiquement toutes l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique de Clarke (18). Cette technique, servant de référence, est applicable dans le cadre d'une semi-routine (voir plus loin pour la partie technique).

Dès réception, chaque échantillon de LA est centrifugé afin déliminer les débris cellulaires et éventuellement les érythrocytes en cas de contamination sanguine. La congélation des LA  $-20^{\circ}\text{C}$  est possible mais une durée n'excédant pas 8 jours est souhaitable. Chaque série comporte un témoin de migration de l'AChE, on introduit un échantillon de LA d'une grosseur à DFTN ou un échantillon de L.C.R.

Au niveau technique, certaines études ont utilisé les gels non pas en disque mais en plaque (6) (69). Les avantages qu'ils en décrivent peuvent selon les centres être pris en considération :

- le gel en plaque permet l'analyse simultanée de plus de 20 échantillons différents. Il faut être dans un centre nécessitant autant d'analyse ; on exclu ainsi l'erreur due à la polymérisation du gel ou à un arrêt artificiel de migration.
- une comparaison directe des échantillons et des contrôles est possible sur le même gel.
- les gels sont facilement photographiables.
- le test peut être quantifié par densitométrie rapidement.

On a essayé également différentes méthodes de révélation des enzymes (54).

- La méthode classique est la méthode de Koelle modifiée par Chubb et Smith ou méthode dite thiocholine-Cuivre.

La thiocholine réduit les ions cuivrique en cuivreux et elle est précipitée en thiocholate de cuivre iodé.  $\text{CH}_3\text{N}^{\oplus} - (\text{I})^{\ominus} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}^{\oplus}$

Une méthode histologique (Menten modifiée par Manheiner et Seligman) ou "Fast Red Method" : L'acétate d'alpha naptityl sert de substrat pour les cholinestérases. Le composant alcoolique, libéré du substrat pendant l'hydrolyse, entre dans un processus de couplage avec un colorant diazo et forme un produit de réaction coloré.

Cette technique rouge rapide a un milieu d'incubation simple, les résultats sont visibles 45 minutes après avec des bandes directement observables.

La méthode ne requière qu'un équipement standard, elle est rapide et d'un coût moindre.

Cette méthode demande à être plus approfondie quand à ces résultats.

Une méthode d'isoélectrofocalisation a également été développée sur gel de polyacrylamide suivant un gradient de pH de 3,5 à 9. La découpe du gel permet, avec la mesure conjuguée de l'activité spécifique au niveau des bandes focalisées, une quantification de l'AChE et des ChE révélées qualitativement par la présence des bandes, ce qui allie les avantages des deux tests.

### 3.2. Lecture

Un résultat d'AChE du LA est considéré comme positif lorsque le gel met en évidence deux bandes : une bande de migration lente correspondant à la ChEn.S, et une bande de migration plus rapide correspondant à l'AChE. Pour être identifiée avec certitude à de l'AChE, cette deuxième bande doit répondre aux critères suivants :

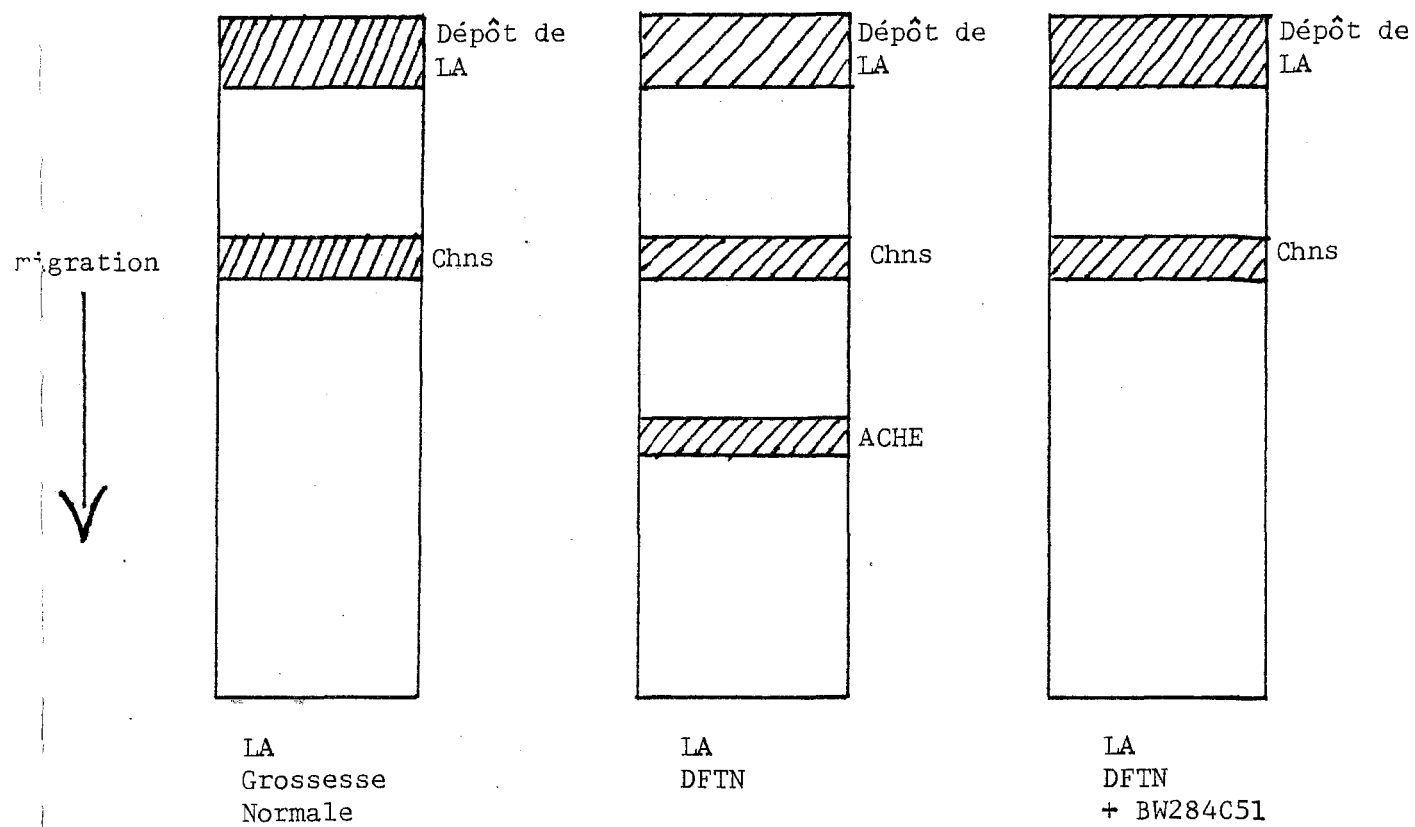
- Position électrophorétique identique à celle de l'isoenzyme AChE du témoin (DFTN ou LCR),
- Inhibition complète et sélective par l'inhibiteur choisi (en général le BW 284 C51).

Un résultat d'AChE est considéré comme négatif lorsque le gel montre une bande unique de migration lente correspondant à de la ChnS non inhibé par le BW 284 C51. L'appellation de ces bandes variant suivant les auteurs 1 et 2 pour Chns et AChE pour Smith, A et B pour Buamah, bande 6 et 7 pour Seller (92). L'utilisation dans chaque série de gel d'un échantillon de L.C.R. ou LA de DFTN permet de repérer facilement la position de la bande AChE de migration plus rapide que celle de la ChEns ; le recours à un inhibiteur spécifique permet d'identifier avec certitude cet isoenzyme.

(Schéma 32)



Schéma 32

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

## 4. Résultats

### 4.1. Dans les DFTN

Toutes les études analysées convergent vers le même résultat : le test qualitatif de l'AChe permet toujours de classer correctement les LA provenant de DFTN. Ceci pour les LA datant de 16 à 25 semaines. Les LA de fœtus avec un DFTN possèdent tous deux bandes : la bande lente et la bande rapide, le gel met alors en évidence habituellement une bande de ChnS plus nette que la normale, ainsi qu'une bande AChE large, très intense, à bords flous. On remarque très peu de différence d'aspect du gel suivant qu'il s'agisse d'anencéphalie ou de SB.

Les premiers résultats de Smith (98) publiés en 1979 donnent 100 % de spécificité pour les DFTN (17/17). De même tous les autres auteurs, Guibaud (41), Muller (72), Rorive (86), Crandall (19) 47/47 DFTN sont positifs, Brock (14) 30/30, Seller (92), Milunsky (69), Buamah (16), Read (79). Tous les LA d'un DFTN sont AChE (+) c'est-à-dire, qu'ils ont tous l'aspect électrophorétique de deux bandes ChE et ceci quelque soit le taux de l'AChe et de la BuChE, le taux de l'AFP, l'existence ou non d'un dépistage échographique et l'aspect clinique du DFTN. Les faux (-) sont rarissimes.

Une étude très importante reste l'étude multicentrique (1981) (81) dont le rapporteur est Wald. Cette étude porte sur 1 099 LA avec un taux élevé d'AFP : soit 813 avec DFTN et 286 sans.

La bande AChE est présente dans 99,6 % des cas d'anencéphalie,  
et 99,4 % des cas de S.B.

8 cas sur 125 grossesses sans DFTN ou autres malformations ont un test AChE (+) : ils constituent des faux (+)

Les résultats obtenus :

- l'interprétation du test est indépendante de l'âge gestationnel.
- la spécificité supérieure du test qualitatif, comparé au dosage de l'activité AChE et AFP.

Ces deux points se retrouvent en conclusion de toutes les études, néanmoins la spécificité du test n'est pas absolue, il existe des faux (+) et des faux (-).

#### 4.2. Les faux positifs

##### La contamination sanguine

L'Etude Collaborative à 8 résultats faux(+) : 7 sur 8 présentent une contamination sanguine soit foetale (5/8), soit inconnue (2/8).

La principale cause des résultats faux (+) reste la contamination sanguine (7) (8) (21). Les liquides des grossesses anencéphaliques tendent à être contaminés plus facilement avec du sang. Ceci est probablement dû à la présence, dans l'aire cérébro-vasculaire d'une structure spongieuse remplie de sang à la place du tissu cérébral directement baigné par le LA (92)

Les liquides contaminés avec du sang maternel ne sont jamais (+) du fait de l'absence de l'ACHE dans le sérum maternel, seul la présence de sang foetal peut entraîner un résultat faussement (+). Le nombre d'échantillons contaminés est positif pour l'AFP.

On a entre 15 et 18,6 % de risque d'être positif si le liquide est contaminé par du sang.

Un LA contaminé avec du plasma foetal donne des résultats positifs si la concentration en plasma foetal est  $> 2 \%$ .

La contamination avec du plasma maternel, des cellules lysées foetales ou maternelles, donne des résultats négatifs à toutes les concentrations ; les échantillons colorés, c'est-à-dire, contenant de l'hémoglobine vieillie sont rarement de faux (+).

On peut observer un résultat faux (+) avec une concentration située entre 42 et  $85 \cdot 10^6$  GR/ml soit une moyenne de  $60 \cdot 10^6$  GR/ml.

La fréquence des échantillons de LA contenant plus que la concentration critique de GR foetaux est faible ( $< 0.5 \%$ ). Ils sont suffisamment rouges pour être facilement repérés.

Il existe un cas particulier de contamination (7) :

C'est la contamination des LA par du sérum foetal de veau, un faux résultat positif d'ACHé peut être causé par du sang foetal mais aussi par du sérum de veau foetal (F.C.S.), les deux contiennent de l'ACHé, F.C.S. en plus haute concentration.

La contamination des LA avec du F.C.S. pourrait arriver sporadiquement pendant la manipulation des échantillons pour la préparation des cultures cellulaires et de la détermination du cariotype, même si des quantités minimales contaminent les LA.

Il existe un test, le test du sérum foetal de veau (F.C.S.C.I.E.) simple et rapide (1 à 2 heures), capable d'identifier des résultats faux (+) sans déclasser des résultats vrais (+) comme faux (+). Si F.C.S.C.I.E. est (+), le test AChE sur gel est un faux (+), mais dans tous les cas le diagnostique final doit être fait avec attention.

Les LA normaux contaminés par du sang donne une bande ChnS plus intense accompagnée parfois de bandes accessoires de migration plus lentes et plus rapide ; la présence de la bande AChE dépend de la nature du sang contaminant.

Le risque d'apparition d'une bande AChE en cas d'échantillon contaminé par du sang foetal dépend donc de 3 facteurs :

- du pourcentage d'érythrocytes foetaux,
- de leur nombre absolue dans l'échantillon analysé,
- enfin de la maturité foetale car l'activité AChE du sang foetal diminue avec l'âge de la grossesse.

#### L'âge de la grossesse

Une autre source de faux (+) est constituée par l'âge de la grossesse. On a un risque réel de faux (+) pour les échantillons de plus de 25 semaines.

Ce risque pose un problème pratique car l'amniocentèse fait partie du bilan réalisé en cas d'hydramnios dont la survenue se situe en général au-delà de 25 semaines. La découverte d'une bande AChE étroite et pâle permet en principe d'éliminer un DFTN qui donne lieu à une bande d'aspect différent, mais ne permet pas de trancher entre un faux (+) et une malformation de type défaut de la paroi abdominale, atrésie ou hydronéphrose.

De plus dans les LA normaux de plus de 25 semaines, la difficulté tient essentiellement à la faiblesse de l'activité cholinestérasique à cette période de la grossesse. Les contractions utérines, la diminution du volume du LA, les modifications placentaires du dernier tiers de la grossesse pourraient perturber l'équilibre des formes butyryl-cholinestérase-acétylcholinestérase.

Une ponction réalisée avec difficultés peut mettre en évidence des formes asymétriques de l'AChE qui sont spécifiques du tissu musculaire ; ce qui évoque une libération d'AChE par lésion musculaire ou par suite de contractions utérines.

#### 4.3. La spécificité

Le test qualitatif, tout comme le dosage de l'AFP ou la mesure quantitative de l'AChE, n'est pas spécifique. Un certain nombre de malformations autres que les DFTN, et certains états pathologiques donnent une réponse positive.

Dans tous les cas, autres que les DFTN, les réponses apparaissent de façon inconstantes. Tous les auteurs ont obtenu des tests (+) avec d'autres malformations, on a obtenu des réponses positives essentiellement avec les défauts de fermeture de la paroi abdominale, omphalocèle ou laparoschisis.

Wald a eu 6 positifs sur 9 cas avec le plus souvent un gel d'aspect particuliers présentant des bandes supplémentaires de migration plus rapide.

Le rapport de l'étude collaborative internationale signale une positivité dans 75 % des cas.

De plus, dans les cas de défauts de la paroi abdominale, la bande AChE est de faible intensité.

Le syndrome de Turner, le tératome sacro-coccygien, font état d'une positivité du test.

Egalement positif mais à un degré moindre on a trouvé :

- un cas de trisomie 18,
- un cas de foetus papyrus,
- deux cas d'estrophié du cloaque.

Par contre, le test a toujours été trouvé négatif dans la néphrose congénitale et l'hydrocéphalie.

Pour les ~~états~~ états pathologiques autres que malformatifs, on a trouvé des résultats positifs dans les cas de mort foetale in utéro et dans les grossesses à avortement spontané ; on a un taux de positivité de 47 %.

Il faut insister sur trois points :

- en pratique courante, l'AChE ne peut distinguer un foetus avec DFTN d'un foetus porteur d'omphalocèle.
- Pour l'instant, il n'est pas possible de relier la sévérité de la malformation à la positivité du test.
- L'essentiel des faux (+) est constitué par les LA contaminés par du sang foetal.

#### 4.4. Les faux positifs

Ils sont très rares ; l'étude collaborative cite deux cas sur 478 anencéphalies et 2 sur 335 S.B. où le test est négatif avec un taux d'AFP élevé.

Haddow (44) rapporte un cas de S.B. où le test AChE est négatif avec un taux d'AFP normal.

### **D - ETUDE PERSONNELLE**

Le but de ce travail a été de mettre au point une technique de dosage de l'AChE pouvant être utilisée en routine au laboratoire.

Le laboratoire de biochimie clinique de l'Hôpital St François d'Assise de Québec, lieu de l'expérimentation, réalise le dépistage anténatal des DFTN ; l'échographie approfondie et le dosage de l'AFP dans le sérum maternel en constituent les deux piliers.

L'amniocentèse avec le dosage de l'AFP du LA sont réalisés selon les cas, dans le cadre du processus de dépistage.

La détermination de l'AChE est, comme nous l'avons vu, le complément logique du dépistage. Ce test s'avère nécessaire étant donné la forte incidence des DFTN dans la région.

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, l'examen le plus adapté est le test qualitatif par électrophorèse sur gel de polyacrylamide : c'est celui qui a été choisi :

- c'est le test donnant les meilleurs résultats, les plus fiables.
- c'est le test le plus facilement réalisable compte-tenu de la fréquence (1 à 5 tests par semaines) ; il peut être mis en oeuvre à l'unité.
- c'est le test le plus souple pour sa technique, il est facilement reproductible.
- c'est le test nécessitant le moins de matériel et réactif : donc le moins cher.

#### Matériel d'étude

Il m'a été possible de tester 61 échantillons de LA

Tous les LA ont été congelés à  $-25^{\circ}\text{C}$  avant l'étude. Ils ont subi avant congélation une centrifugation de 3 minutes à 10 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires, et éventuellement les érythrocytes en cas de contamination sanguine.

Tous les échantillons proviennent de l'Hôpital St François d'Assise (aucun transport d'échantillon). Ils ont été prélevés tous sauf un au 2ème trimestre de la grossesse entre 16 et 24 semaines, l'âge gestationnel ayant été vérifié par échographie.

Les circonstances diagnostiques ayant conduit à l'amniocentèse sont précisées dans le schéma 33.

Les plus fréquentes sont :

1. l'âge maternel,
2. une suspicion échographique de malformation,
3. les antécédents de DFTN

Tous les échantillons ont eu un dosage d'AFP dans le sérum et le LA

Le laboratoire utilisant le dosage par R.I.A. dans les deux cas. Les limites utilisées sont celles préconisées dans la littérature :

Normale  $\pm 3$  écarts types

Schéma 33

INDICATIONS	Nombre d'échantillons	Pourcentage %
Antécédents de DFTN familiaux ou parturiantes.....	9	14,8
Suspicion d'une malformation à l'échographie.....	10	16,4
Age maternel avancé.....	36	59
Antécédents de malformations foetales autre que DFTN et cariotype anormal des parents....	2	3,2
Grossesse gemellaire.....	4	6,6

Indications cliniques de l'amniocentèse 61 échantillons



Sur les 61 échantillons on a eu 5 échantillons contaminés par du sang.

## 1. Techniques

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide : on a séparation des isoenzymes : ChnS d'une part, et AChE d'autre part. On utilise pour ce faire l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6 % selon la technique de HADDOW (44).

Cette technique dérive de la technique CLARKE (18), le développement est basé sur la méthode de KOELLE.

On utilise un système pour électrophorèse sur gel en disques (Biochrom 2 103 LKB instruments) (Schéma 34)

### 1.1. Préparation des tubes

On a des tubes en verre de 6.0. x 65 mm marqués à 10 mm. On les lavent 30 minutes dans une solution détergente, puis rinçage à l'eau distillée : la verrerie doit être soigneusement rincée à l'eau distillée, toute trace de détergent inhibant totalement l'activité cholinestérasique. Puis trempage plusieurs fois dans une solution de Photo-Flo 200 (Kodak Canada Inc M6MIV3) dilué 10 fois.

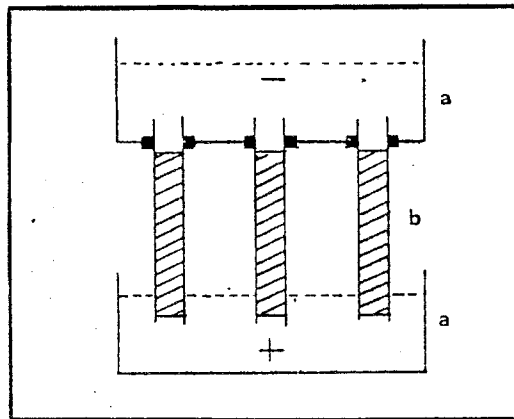
Les tubes doivent être parfaitement secs avant toute utilisation, ils sont installés avec la marque au sommet.

### 1.2. Préparation du gel

On a une solution (A) - 30 gr de monomère acrylamide (Bio-Rad lot 24 104)  
 - 1 gr de Bis (NN'méthylènebis-acrylamide BIORAD (lot 24 003)  
 - 123 ml d'eau distillée.

et une solution (B) - 1.5 gr de TRIS (Tris (hydroxyméthyl) aminométhane Biarad D.O 1 solution 1,0 M à 280 nm <0.05 lot 23 563)  
 - 7.25 gr de glycine (aminoacéticadi Biorad lot 23 624 D.O d'une solution 1.0 M à 280 nm < 0.15.)  
 - 245 ml d'eau distillée.

Pour 12 tubes de gel on a le mélange 6.5 ml de (A)  
 et 2.5 ml de (B)

Schéma 34

Appareil pour électrophorèse en gel de polyacrylamide utilisé

- a - réservoir de tampon,
- b - tube de verre,

Le gel de polyacrylamide est hachuré.

On ajoute extemporanément 14 mg de persulfate d'ammonium  
(BIORAD produit purifié pour électrophorèse lot. 23 231)

7  $\mu$ l de TEMED

(N N N' N' Tetraméthyléthylènediamine BIORAD lot 23 368)

Les tubes sont remplis jusqu'à la marque puis recouverts d'eau à l'aide d'une seringue sans les mélanger.

Au bout de 20 minutes, on peut enlever l'eau et placer les tubes dans l'appareil.

### 1.3. Préparation de l'échantillon

Chaque échantillon est réalisé en double, avec un contrôle positif (L.C.R. ou LA de DFTN) et un contrôle négatif (LA négatif) dans chaque série.

On prélève 50  $\mu$ l de l'échantillon + 25  $\mu$ l de solution Vol./Vol. glycérine-eau  
+ 25  $\mu$ l de solution de protéine marqueuse.

La solution marqueuse contient : 1 g de sérum albumine bovine  
+ 0.1<sub>3</sub> de bleue de bromophénol  
(Biorad n° lot 23 862)

### 1.4. Réalisation et développement de l'électrophorèse

C'est une modification de la méthode de Clarke.

- le tampon contient :

29 g de glycine
6 g de tris
975 ml d'eau distillée
5 ml d'HCl 1M/l

La solution est diluée 10 fois et ajustée à un pH de 7,5 avec HCl 1 m/l  
ou NaOH 1 m/l.

- Prétraitement des gels

Il se fait par électrophorèse à 1mA/tube pendant 1 heure, sans échantillon.

- Dépôt et migration

On dépose les 100  $\mu$ l en dessous du tampon.

La migration se fait 15 minutes à 0.5. mA/tube

puis 2 MA/tube jusqu'à ce que le sérum albumine arrive à la fin du gel.

Développement enzymatique

Les gels sont "démoulés" et placés dans des tubes test de 13 x 75 mm. Chaque échantillon étant en double, on sépare deux groupes distincts : dans un des groupes on rajoute 50  $\mu$ l de BW 284 C51 à 1 M/l

(n° A - 9013 lot 21 F - O111 Sigma Chemical Compagny)

- Milieu de développement (d'après la méthode de Koelle) :

On utilise trois solutions différentes : (sel monosodique app. 99 % 3 H<sub>2</sub>O/mole

Sigma lot 97 C50 46)

Solution C : 12,2 d'acide moléique dans 300 ml d'eau distillé

ajusté à un pH de 6,5 et dilué à 500 ml dans l'eau distillée.

Solution D : 3 g de sulfate de cuivre dans 100 ml d'eau distillée.

Solution E : 4,5 g de glycine dans 100 ml d'eau distillée.

On réalise une préincubation de 30 minutes dans la solution composée de :

[ 100 ml de la solution C  
+ 72 g de Na<sub>2</sub> S<sub>04</sub>  
+ 200 ml d'eau distillé. Solution ajusté à un pH de 6,0

puis on incube dans une solution à préparé extemporarement.

[ 20 ml de solution C  
2 ml de solution D  
2 ml de solution E  
0.2 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M/l  
36 ml d'eau distillée.  
14.4 g de Na<sub>2</sub> S<sub>04</sub>  
70 mg d'acétylthiocholine iodé (Sigma lot n° 42 F - 0165)

Le pH est ajusté à 6,0.

L'incubation se fait à température de la pièce, jusqu'à l'apparition des bandes du contrôle positif soit de 6 à 20 h (en général une nuit 12 à 13 heures).

La réaction est stoppée avec de l'eau distillée ; les gels sont rinçés abondamment pour permettre une bonne visualisation des bandes de cholinestérases.

### 1.5. Lecture

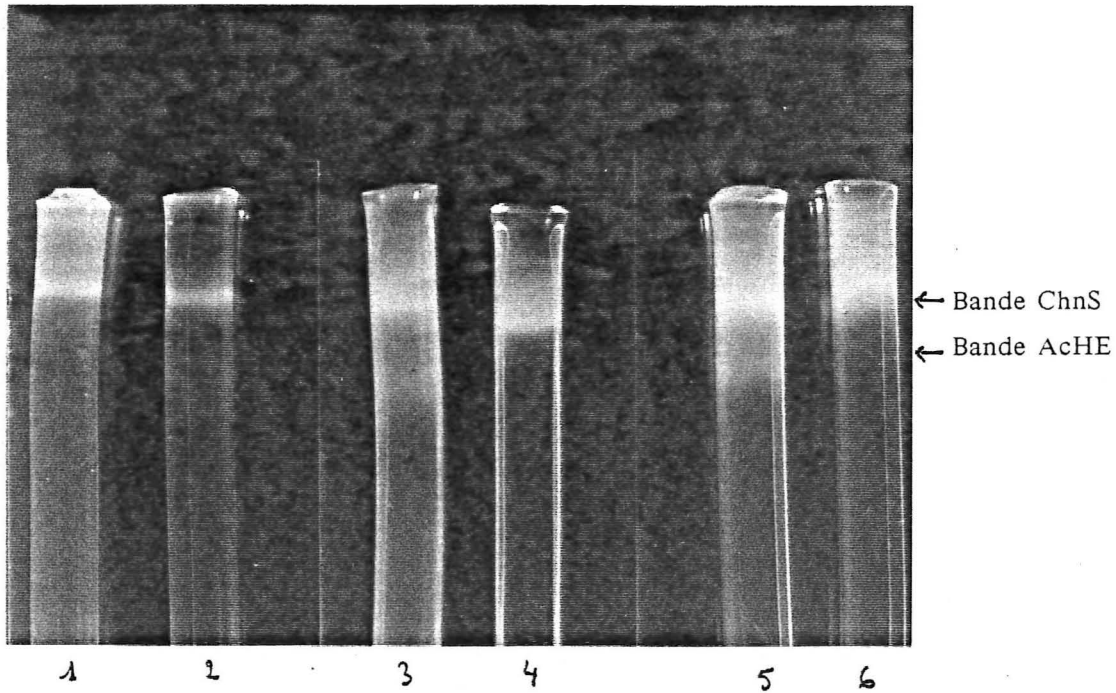
Il faut lire le nombre de bandes avec et sans inhibiteur. (Schéma 35)

Un résultat d'AChE est considéré comme positif lorsque le gel met en évidence deux bandes : - une bande de migration lente correspondante à la ChnS,  
- une bande de migration plus rapide correspondant à l'AChE.

Pour être identifié avec certitude à de l'AChE, cette deuxième bande doit répondre aux critères suivants :

- position électrophorétique identique à celle de l'isoenzyme AChE du L.C.R. ou contrôle (+)
- Inhibition complète et sélective par le BW 284 C51

	Groupe sans inhibiteur	Groupe avec inhibiteur
Contrôle (+).....	2 bandes (+)	1 bande
Contrôle (-).....	1 bande (-)	1 bande
IA + DFTN	2 bandes (+)	1 bande
IA normal.....	1 bande (-)	1 bande

Schéma 35Lecture du test AChE sur gel de polyacrylamide

1. LA testé normal

2. LA testé + BW 284 C51

3. LA testé pathologique

4. LA testé pathologique + BW 284 C51

5. Contrôle positif : LA d'un DFTN

6. Contrôle négatif : LA normal.

Résultat (-) : Absence d'AChE

Résultat (+) : Présence d'AChE  
p Possibilité de DFTN

## 2. Résultats (Schéma 36)

Les 61 liquides analysés ont été correctement classés par le test qualitatif de l'AChE.

Aucun résultat ne peut être considéré comme faux (+) AChE.

Tous les cas de DFTN sont AChE (+) ainsi que les cas de syndrome de Turneur et d'omphalocèle.

### Contamination sanguine

Les 5 échantillons contaminés sont classés correctement par le test :

Pour 2 des 5, la contamination était à l'origine d'une résultat d'AFP anormalement élevé, faux (+) ; tous les deux sont reclassés correctement par le test.

- Pour un échantillon contaminé, avec AFP normal, le résultat correct a été maintenu.

- Pour les échantillons de grossesses pathologiques, la contamination n'a pas influencé le résultat, ils ont tous été reclassés correctement. La contamination forte d'un LA de grossesse gemellaire et d'un LA d'hygroma pourrait être à l'origine du résultat anormal de l'AFP. Ces deux faux(+) AFP ont été correctement reclassés par le test AChE.

Le test AChE s'avère donc nettement moins sensible à la contamination sanguine que l'AFP.

### Grossesses pathologiques

Les échantillons de LA des grossesses avec un DFTN ont dans tous les cas révélés une AChE (+) (4 cas).

La bande AChE présente un aspect caractéristique facilement reconnaissable avec un peu d'expérience. Par contre, nous n'avons pas pu faire la différence entre S.B et anencéphalie.

Schéma 36

	Nombre de liquide	Bande AChE	Contamination sanguine
<b>AFP anormale</b>			
S.B ouverte.....	3	+	
Anencéphalie.....	1	+	
Syndrome de turneur....	1	+ (faible)	+ SgF.
Hygroma.....	1	- (taux limite AFP)	+ F
Gr. Gemellaine.....	1	-	+ F
Omphalocèle.....	1	+ (faible)	+ F
<b>AFP normale</b>			
Hydrocéphalie.....	1	-	
Hydrops.....	1	-	
Encéphalocèle occulta..	1	-	
Antécédent DFTN.....	5	-	
Trisomie 21/13.....	3	-	
Jumeaux.....	3	-	
Age avancé.....	39	-	1 + sgM

Résultat du test sur gel de polyacrylamide (61 échantillons)



Des résultats positifs ont été trouvés avec un cas de d'omphalocèle et de syndrome de Turner.

Par contre, tous les cas de grossesses gemellaires, d'hydrocéphalie, d'hydrops, d'encéphalocèle occulta, de trisomie 21/13 ont un résultat négatif.

#### 4. Discussion

Au niveau de l'expérience, il faut préciser que les résultats obtenus sont en parfait accord avec les données de la littérature.

Sur le plan technique, nous avons simplement constaté la nécessité de refaire les réactifs chaque semaine et de travailler avec une verrerie rigoureusement propre. Nous n'avons opéré qu'une légère modification de pH de la solution d'incubation (6.0 au lieu de 6.5) par rapport à la technique utilisée ; ceci a permis une meilleure visualisation des bandes.

Le test qualitatif confirme les objectifs attendus ; c'est le test complémentaire nécessaire au diagnostic prénatal des DFTN.

C'est un test précis, fiable, reproductible, facile à mettre en place et peu coûteux. Le test apporte une nette amélioration ; cette méthode permet de corriger pratiquement tous les résultats faux (-) et faux (+) de l'AFP du LA, elle prend aussi tous son intérêt lorsqu'il existe une contamination sanguine.

L'électrophorèse des cholinestérases du LA permet le diagnostic prénatal de 100 % des DFTN alors que l'échographie n'en détecte que 85 % et le dosage de l'AFP à peu près 90 %.

Ce test se révèle donc très probant quand il est appliqué aux échantillons de LA avec une AFP (+)

L'intérêt majeur du test en routine ou semi-routine reste toutefois de préciser le diagnostic et de réduire le nombre d'interruptions erronées de grossesse par rapport au seul résultat de l'AFP.

### Avantages et inconvénients du test

- C'est un test simple et bon marché ; ne nécessitant que très peu d'appareillage donc envisageable quelque soit l'importance du laboratoire.
- Il est rapide, le temps de réponse (24 h environ) est tout à fait correct pour ne pas rallonger le délai d'une éventuelle intervention.
- C'est un test d'une grande fiabilité, l'aspect du gel est caractéristique, on n'a pas de limite d'interprétation comme le test quantitatif.
- C'est un test très spécifique, le diagnostique est correct dans tous les cas de DFTN
- La connaissance d'un âge gestationnel précis n'est pas indispensable, dans les limites du deuxième trimestre (24 à 25 semaines).
- Le problème de la contamination sanguine n'est à considérer que lorsqu'il s'agit de sang foetal et en forte quantité. Ceci permet un diagnostic correct même lorsqu'il existe une élévation de l'AFP dans un échantillon contaminé par du sang : le taux de faux (+) après AFP est ainsi fortement diminué.

### Par contre :

- le test est ou bien positif ou bien négatif et le clinicien ne peut dès lors juger de ses limites.
- sa lecture reste liée à l'expérimentateur, l'analyse de l'électrophorèse dépend d'une inspection visuelle des gels.
- la spécificité est bonne mais non parfaite, le test peut-être positif également lors d'un omphalocèle, syndrome de Turner ou de façon incontestante lors de mort "in utéro".
- l'interprétation des liquides à partir de 25 semaines s'est révélée très difficile ; on a un risque réel de faux (+) pour ces échantillons. Le test n'est pas exploitable.

- Les substrats ou les inhibiteurs ne sont pas d'une spécificité absolue, soit pour les ChnS, soit pour l'AChE ; la méthode rencontre des difficultés si la bande AChE est défaillante ou déplacée, ou si la bande de ChnS migre anormalement. Ce problème technique de mesure de l'AChE en présence d'autres cholinestérases a limité les promesses d'analyse de l'AChE pour le dépistage des DFTN

L'utilisation d'un anticorps monoclonal de l'AChE (12), qui ne donne pas de réaction croisée avec ChnS est une réponse au problème du test qualitatif AChE.

La disponibilité d'un A.C. monoclonal (A.E.2.) obtenu contre l'AChE des G.R. et réagissant avec l'AChE des jonctions neuro-musculaires, présente l'opportunité de développer un test immunologique spécifique pour l'AChE dans le LA des DFTN. Une seule réaction croisée est possible avec l'AChE bovine (sérum foetal de veau).

En conclusion, il n'y a pas lieu de déterminer lequel des deux tests AFP ou AChE doit être considéré comme test diagnostique primaire, ces deux tests ne sont pas antagonistes mais apparaissent en pratique complémentaires dans les informations qu'il sont susceptibles d'apporter.

L'ensemble des éléments d'un programme de dépistage, comme nous l'avons vu, permettent au cours de la grossesse, de confirmer une suspicion de malformation ; ils ont l'avantage de permettre un diagnostic précoce et de proposer une thérapeutique active.

## E - LA PREVENTION PRIMAIRE (57) (60) (6) (107) (74) (109)

L'avortement sélectif, suite à un diagnostic précoce, représente déjà un progrès sur la voie de la prévention mais, la réelle solution n'est pas l'élimination d'un foetus anormal, mais l'assurance de la naissance d'un bébé en pleine santé. Ceci nous permet d'envisager la notion de prévention primaire.

### 1. Etiologie multifactorielle

Une prévention à l'échelle primaire nécessite la connaissance de l'étiologie de ces malformations. Comme nous l'avons vu, il est largement reconnu que les DFTN ont une étiologie multifactorielle, qu'ils ne sont pas forcément attribuables à un facteur génétique ou de milieu mais à l'incidence combinée de plusieurs éléments.

Cette théorie n'exclut pas la notion de prévention primaire, de nombreux auteurs pensent que la connaissance de tous les facteurs n'est pas nécessaire, l'identification et l'élimination d'un seul élément, en faisant intervenir un effet de seuil, pourraient être suffisantes pour réduire l'incidence de ces facteurs multiples et supprimer le risque de malformation. Des études familiales indiquent que l'incidence dépend de l'effet additif de plusieurs gènes mineurs anormaux et de facteurs environnants. Une accumulation de ces aberrations génétiques et des facteurs environnants peut être toléré par le foetus jusqu'à un point (le seuil) au delà duquel, il y a risque de malformation.

Donc une étiologie multifactorielle, avec un facteur génétique important.

Il y a peu de chance de modification de la composante génétique ;

Une composante de l'environnement substantiel : la prévention primaire devrait dépendre de l'identification des facteurs environnants pour qu'ils puissent être soit éliminé de l'environnement, soit évités.

De nombreux auteurs, à cause des hauts taux d'incidences dans les communautés pauvres et l'évidente association avec la classe sociale, ont suggéré que des facteurs diététiques pourraient être impliqués dans l'étiologie de ces malformations.

Les facteurs nutritionnels comme facteur déclenchant possible ont été suspecté depuis longtemps.

C'est Hale (1933) qui a démontré le premier une association entre une déficience nutritionnelle dans la grossesse (en vitamine A) et une malformation dans la descendance (malformation de l'oeil).

Puis Warkany et Nelson (1941) ont montré qu'une déficience nutritionnelle dans la grossesse notamment en vitamines pourrait donner des malformations congénitales.

Des études systématiques sur les vitamines utilisées individuellement ont montré que la plupart d'entre elles sont nécessaires pour un développement embryonnaire normal.

Il y a 20 ans, Hibbard et Smithells ont étudié la condition des folates chez la mère à la fin de la grossesse avec le FIGLU-test, (test d'excrétion urinaire de l'acide formiminoglutamique après une charge oral en histidine).

Il y a 15 ans, ils ont étudié de façon détaillé l'alimentation pendant le premier trimestre, pour comparer avec la ration journalière recommandée et s'il existe une différence significative en fonction de la classe sociale. Ils arrivent à une différence hautement significative entre les rations des mères des plus hautes classes et celles des plus basses. Les rations moyennes sont dans de nombreux cas en dessous de la ration journalière recommandée, mais la seule disparité frappante est pour la vitamine D (moins de 100 UI/jour pour le U.K contre 400 UI/jour recommandé).

Smithells (en 1976) réalise une étude prospective des taux de vitamines sanguines au 1er trimestre. On suit le taux de folates dans le plasma,

le taux de folates dans les hématies,

le taux d'acide ascorbique dans les G.B.,

le taux plasmique de vitamine A,

l'indice de saturation en riboflavine ;

On obtient des différences significatives quant à la qualité des aliments absorbés et quant aux taux de vitamines rencontrées à la suite de l'absorption de ces aliments, et ce, suivant les différentes classes sociales.

De là, on a inclu l'acide folique, l'acide ascorbique et riboflavine dans les essais de supplémentation. Ces essais commencent en 1976.

*Par ailleurs, une relation entre la carence en zinc chez la mère et un spina bifida foetal semble être de plus en plus probable (112). Il est encore impossible de savoir s'il s'agit d'un déficit d'apport, d'absorption ou la conséquence d'un trouble métabolique ; Néanmoins la supplémentation periconceptionnelle en zinc semble avoir autant d'arguments que celle en vitamine .*

## 2. Supplémentation

Si la carence vitaminique est un facteur étiologique des malformations du système nerveux central, un supplément vitaminique bien étudié pourrait contribuer à réaliser une prévention primaire de ces malformations en théorie.

De tels suppléments pourraient être administrés avant la conception aux femmes présentant un risque quelconque, notamment celles qui suivent un traitement contraceptif oral puisqu'il est reconnu que la "pilule" peut-être considérée comme un antagoniste des vitamines (Mynn 1975).

Laurence (1980) a démontré, qu'il y a une association entre un régime appauvri et DFTN ; Il a montré également que si les habitudes diététiques sont modifiées par Conseil, l'incidence des DFTN est réduite.

Différentes études de supplémentation ont été entreprises , notamment par Smithells en 1980.

Ces études sont réalisées sur des femmes réunissant les critères suivants :

- ont déjà eu au moins un foetus ou enfant avec un DFTN,
- considèrent une future grossesse,
- ne sont pas enceintes.

On compare avec un groupe de femmes non suppléées qui ont une histoire similaire d'antécédent et dont l'étude des grossesses arrive dans le même centre, à la même période.

On utilise comme supplément une préparation multivitaminique avec du cuivre et du calcium : Prégnavite forte F , de composition suivante :

Vitamine A : 4 000 UI,	Acide ascorbique 40 mg (Vic. C),
Thiamine 1,5 mg (Vit. B1)	Vitamine D 400 UI,
Riboflavine 1,5 mg (Vit. B2)	Acide folique 0.36 mg (Vit. L1, rattaché au
Pyridoxine 1 mg (Vit. B6)	groupe B),
Nicotinamide 15 mg (Vit. P.P.)	Sulfate de fer en quantité équivalente à
	75,6 mg de fer
	Phosphate de calcium 480 mg.

## 2.1. Résultats

Dans toutes les études, le supplément vitamines est associé avec une réduction de 7 à 8 fois du taux de récurrence, une différence qui est hautement significative (selon la méthode de Fischer).

Mères supplées ont un taux de 0.7 % de récurrence de DFTN,

Mères non supplées ont un taux de récurrence de 4.7. % de récurrence de DFTN.

Le lieu géographique étant un facteur intervenant dans le risque de récurrence, une étude en Irlande du Nord donne des résultats très comparables :

Mères supplées ont un taux de 0.7 %,

Mères non supplées ont un taux de 5.2 %.

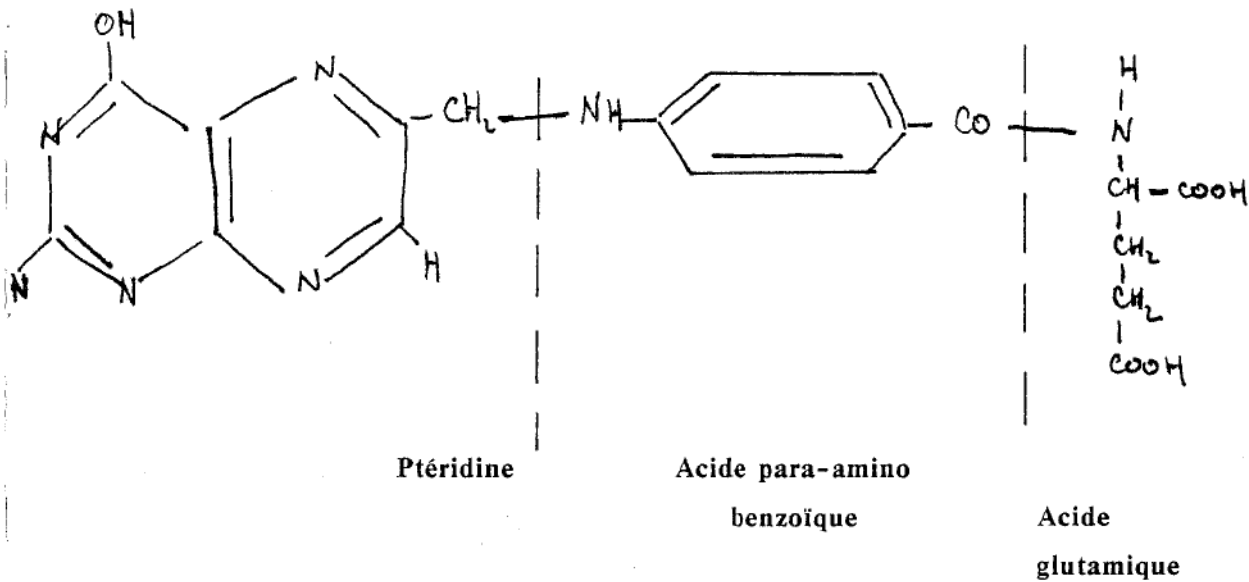
Le résultat positif de ces expériences ne fait aucun doute, mais il n'est malheureusement pas possible de faire la part des bénéfices due à l'administration périconceptionnelle de vitamines et celle des bénéfices due à d'autres facteurs (effet placebo, suppression de la prise de contraceptifs oraux etc...).

On peut toutefois affirmer que l'apport de vitamines avant la conception et pendant une partie de la grossesse a une influence nette sur la réapparition des malformations du tube neural. Ceci confirme l'hypothèse établissant une relation entre les malformations du tube neural et les carences vitaminiques.

## 2.2. Intérêt particulier de l'acide folique

Des études diététiques suggèrent que les femmes de régime pauvre, sont déficientes en nombreux nutriments et des études biochimiques ont montré, des déficiences en plusieurs vitamines. Il apparaît plus approprié, d'apporter une thérapie multivitamine que monovitamine. Cependant, on a suggéré que l'effet bénéfique pourrait être obtenu en utilisant l'acide folique seul.

Acide folique ou acide ptéroyl glutamique (forme monoglutamate).



On peut citer l'aminoptérine (cytostatique) antagoniste de l'acide folique par action sur la dihydrofolateréductase.

#### Origine, métabolisme, rôle, exploration

On le retrouve dans les légumes verts, le foie, la viande, les oeufs et la bière, par exemple, à l'état de polyglutamates très actifs, mais très fragiles.

L'apport par l'alimentation est suffisant (50 à 100 / 24 heures).

Il existe un acide folique endogène, synthétisé par la flore intestinale mais non absorbé.

- Il intervient dans :

- . le transfert des radicaux monocarbonés et leur biosynthèse, (intervention dans la synthèse de l'acide thymidilique, précurseur de la thymine).
  - . la synthèse des bases puriques en fournissant le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> atome de carbone du noyau.
  - . la synthèse des acides aminés.
- intervention dans la réaction homocystéine --> méthionine
  - intervention dans l'interconversion serine <--> glycine
  - catabolisme de l'histidine conduisant à l'acide glutamique.



Exploration : soit technique microbiologique,  
soit étude de l'absorption et de l'élimination,  
soit étude de l'excrétion urinaire (test du FIGLU)

Ce test est basé sur l'élimination d'acide formiminoglutamique (FIGLU) et s'appuie sur le rôle de l'acide folique dans le métabolisme de l'histidine conduisant à l'acide glutamique.

S'il existe une carence en acide folique, cette conversion n'a pas lieu et on assiste à l'élimination du FIGLU (métabolite intermédiaire).

Un test positif peut révéler soit une absorption défectueuse,  
ou un défaut du métabolisme,  
soit une carence en acide folique.

Il a été suspecté que l'indisponibilité de l'acide folique pour le développement embryonnaire durant les quatre semaines après la conception pourrait être le principal facteur dans l'alimentation. Ceci est basé sur une évidence tératologique, embryologique et clinique. Il semble y avoir une grande augmentation de la demande en folates par le foetus au moment de la fermeture du tube neural.

Le test de l'effet biologique du supplément d'acide folique a prouvé être hautement intéressant en réduisant le risque de rechute et en confirmant que l'indisponibilité de l'acide folique à l'embryon est certainement un facteur étiologique dans le développement des DFTN

C'est la principale, peut être pas la seule, substance active des polyvitamines utilisées. On n'exclut pas la possibilité qu'il y ait d'autres déficiences ou d'autres anomalies de l'absorption ou du métabolisme de l'acide folique qui puissent être "débordée" par une grande consommation de folates.

L'effet spécifique des folates doit être séparée de l'effet non spécifique de l'alimentation.

### 3. Supplément vitamine, oui mais...

La réduction du taux de récurrence est encore encourageante mais laisse de nombreuses questions :

#### 1. Le supplément vitamine agit-il réellement ?

Une réduction significative serait de traiter toute les grossesses, mais avant, il faut faire une longue étude multicentre randomisé avec un test placebo bien contrôlé qui pourrait prouver l'efficacité et l'inocuité du supplément vitamine ; aucun biais dû à la relation entre classe sociale et taux de récurrence ne devra intervenir ; il faut également que l'étude randomisée soit faite dans une région de haute incidence.

Malheureusement l'utilisation de placebo dans une étude randomisée pose de sérieux problèmes éthiques.

#### 2. Si les vitamines agissent, quel est le mécanisme ?

Il semble y avoir deux mécanismes. Le plus direct est que le supplément corrige un régime qui semblait adéquat pour la mère, mais pas pour l'embryon. C'est la vieille hypothèse de l'embryon et du foetus parasite qui sortent au mieux, si nécessaire au dépend de la mère, si ce mécanisme est le bon, un supplément tels qu'on le donne semble logique.

Alternativement, le supplément pourrait venir à bout de "bloques métaboliques", probablement génétiquement déterminé. Si c'est cela, une seule vitamine pourrait être responsable. L'acide folique pourrait rentrer dans ce cadre. Si les polyglutamates fournissent une part essentielle des folates, une déficience en conjugasefolate intestinale pourrait être importante (ces enzymes sont zincodépendantes). Ceci représente une nouvelle voie de recherche. La vitamine C aussi réclame une autre considération car non synthétisée. Les interactions entre vitamine C, acide folique, et vitamine B12 pourraient avoir une influence.

### 3. Le supplément vitamine est-il sain ?

En partant du fait qu'il est impossible de prouver une totale innocuité concernant la tératogénicité d'un produit administré lors de la grossesse, la réponse à cette question apparaît être oui. Les doses utilisées sont proches des doses recommandées quotidiennement.

On n'a pas eu d'effet adverse sur la croissance ou le développement prénatal et postnatal des enfants nés de mères suppléées. Il y a danger avec des doses beaucoup plus grandes, il ne faut donc pas de prescription spontanée.

### 4. Les suppléments vitamines peuvent-ils prévenir d'autres défection ?

On ne le sait pas. Ils ne devraient probablement pas affecté les affections congénitales cardiaques ; pourraient être effectifs dans la fente labiale et du palais qui comme les DFTN sont des défauts de fusion. Egalement d'autres défauts de fusion tel que l'omphalocèle et la vessie ectopique sont des candidats possibles.

Deux choses sont sûres :

- les suppléments en vitamines utilisés ne préviennent pas tous les DFTN.
- Ils ne préviennent pas toutes les autres défections.

Mais ils offrent l'espoir de faire un petit impact sur un grand et affligeant problème.

Toutes les études faites, pour le moment, aspire à la prévention de la récurrence des DFTN. Pour suppléer toutes les femmes, il faudrait un vaste accroissement des cliniques de pré-grossesses.

De toute façon le supplément doit être couplé avec une éducation sanitaire et diététique. L'amélioration de l'alimentation maternelle ne doit pas être oubliée. Un conseiller diététique devrait pouvoir suivre les femmes avant toute grossesse, surtout les femmes connues être à haut risque pour les DFTN.

On peut également envisager une généralisation de la supplémentation en ajoutant les vitamines et l'acide folique dans la chaîne alimentaire. Ceci serait facile, bon marché, et effectif : par exemple, il est envisagé de mettre des vitamines dans le pain blanc, dans le lait ou dans l'eau. Cela demande toutefois des connaissances supplémentaires sur les besoins du fœtus et de l'embryon.

#### 4. Conclusion

La prévention primaire des malformations du tube neural, n'est plus une notion abstraite mais presque une réalité.

L'influence des facteurs nutritionnels a été démontré, mais il est nécessaire que d'autres études plus importantes, randomisées, et multicentres en utilisant un placebo soient réalisées afin d'oter le doute qui existe encore sur la prévention par un supplément vitamine, également afin de prouver l'inocuité d'un tel traitement. En plus de la perspective d'un supplément effectif préconceptionnel, une amélioration de l'alimentation serait envisageable. De toute façon, malgré cela, il y a besoin à long terme d'une éducation diététique effective dans les écoles car même si l'alimentation maternelle pauvre et l'indisponibilité de l'acide folique pourraient être importantes, ils pourraient ne pas être les seuls facteurs déclenchants, d'autres pourraient être relativement plus importants.

Le traitement de toutes les grossesses entraînerait une réduction significative et réduirait les dépenses occasionnées par l'amniocentèse, les différents dosages biochimiques, les avortements thérapeutiques et surtout par l'entretien d'enfants atteints de malformations.

## F - CONCLUSION

Les spina bifida, anencéphalie et autres malformations du tube neural sont mieux connus aujourd'hui. Il découle de ces connaissances une meilleure information, un grand désir et une réelle possibilité de lutte contre ces atteintes. Tous ceci s'articule en deux volets :

### Dépistage et Prévention.

Avant d'évoquer ces deux éléments, il faut rappeler que la connaissance de ces affections a été réalisée grâce à de nombreuses études épidémiologiques et à leurs analyses minutieuses. On a mis ainsi en évidence l'existence des deux étiologies principales :

- une cause génétique,
- une cause relative au milieu.

On a pu ainsi définir les populations à hauts risques de façon plus précise :

- les couples ayant un antécédent,
- les femmes âgées de plus de 40 ans,
- les ethnies d'origine celte, etc...

Le dépistage a commencé avec la réalisation de diagnostics prénataux in utéro. De plus en plus fréquemment sont mis en place des protocoles de dépistage. D'après la littérature 90 % des DFTN apparaissent sans antécédent familiaux ; donc si l'on veut avoir un effet sur l'incidence des DFTN, c'est le groupe de femmes sans antécédents donc sans risque élevé, qui doit être la cible des efforts de prévention.

Les pays à faible incidence n'ont pas la volonté de mettre en place des programmes de dépistage ; néanmoins ceci devrait être étudié, la mise en place d'un protocole établi dans un centre spécialisé ne pourrait être certainement que bénéfique et profitable.

L'AFP plasmatique et l'AFP amniotique sont les deux principaux tests utilisés. S'ils permettent, dans une grande majorité des cas, un dépistage des malformations du tube neural, deux voies de recherche se précisent encore :

1. L'affinage des moyens de diagnostic dont le plus important est l'échographie: De nos jours aucun bilan de diagnostic prénatal ne peut être proposé sans un examen détaillé à l'échographie. La formation d'un personnel hautement qualifié en plus grand nombre serait également souhaitable.

L'examen échographique devient de plus en plus performant. Le but serait de pouvoir détecter les enfants viables mais sévèrement handicapés dont le dépistage reste le plus difficile dans l'état de nos connaissances.

2. L'utilisation de nouvelles molécules traceuses qui permettent une confirmation du diagnostic et surtout l'élimination des faux positifs et faux négatifs. A ce titre la détection de l'AChE dans le LA utilisé depuis 1979, est un test complémentaire de dépistage idéal.

Les résultats de ce test sont très fiables et la valeur diagnostique du test semble plus élevée que l'AFP du LA ; surtout lors d'une contamination sanguine d'origine foetale.

La recherche de l'AChE dans le LA apparaît comme un moyen complémentaire précieux pour le diagnostic des DFTN mais non spécifique. La séparation électrophorétique des ChE représente un test de haute spécificité pour les DFTN, qui augmente la sensibilité du dépistage (AFP du LA, échographie).

Cet examen trouve donc son utilité comme test complémentaire dans le diagnostic et non dans le dépistage des DFTN

En fait tous les éléments du diagnostic étudiés dans ce travail ne sont pas antagonistes mais complémentaires, ils permettent, au cours de la grossesse, de confirmer une suspicion.

Le dépistage anténatal permet :

- d'une part, chez les femmes exposées,
  - . soit par une notion familiale,
  - . soit par des antécédents personnels d'envisager de nouvelles grossesses jusque là refusées pour le risque malformatif.
- d'autre part, de permettre un diagnostic précoce et de proposer une thérapeutique active au deuxième trimestre. La découverte, au troisième trimestre, d'une malformation est toujours un drame psychologique et la conduite obstétrique demeure souvent délicate.

Dans ce cadre, l'association échographie AFP- AChE permet actuellement un diagnostic précis d'une DFTN dans pratiquement 100 % des cas.

Un élément primordial pour les chercheurs serait la connaissance du mécanisme de ces malformations. On voit poindre ce qui constitue le plus grand espoir de la recherche, la mise en place d'une prévention primaire prévue pour les prochaines années. On a établi, à ce sujet, que la connaissance de tous les facteurs ét iologiques n'est pas nécessaire, mais qu'il existe un effet seuil, permettant de diminuer ou d'annuler le risque d'une malformation du tube neural, par l'élimination d'un seul facteur causal. On a abouti à une limitation des directions de recherche au domaine "nutrition et diététique", s'attachant à l'aspect qualitatif de l'alimentation. C'est actuellement sur un supplément vitaminique dont l'acide folique est le centre que se reporte tous les espoirs de mise en place d'une réelle prévention primaire, simple et facile.

Si la normalisation du procédé appartient au domaine du futur, tous les espoirs sont permis car le stade expérimental de ces recherches est déjà quasiment franchi.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. **H. ALVAREZ, S. Levi**  
Ultrasonographie normale et pathologique du cerveau foetal.  
Ultrasound in Med. et Biol. ; 1984 ; 10 (1) : 61-77.
  
2. **A. ARCHIBALD, G. Dale**  
Amniotic fluid acetylcholinesterase.  
The Lancet, February 7, 1981 : pp. 330. Letter.
  
3. **M. AUROUX, P. Haegel**  
Embryologie : Travaux pratiques et enseignement dirigé, fascicule trois :  
Deuxième année.  
Ed. MASSON et Cie, Paris 1968.
  
4. **D. AUGIER, M.F. Sarramon, C. Rorive, G. Dutau, J.M. Reme, B. Sablayrolles,  
P. Rochiccioli**  
Résultats d'une expérience de dépistage prénatal systématique des malformations  
du tube neural par dosage de l'alpha-foeto-protéine dans l'éluat de sang séché  
(12 480 grossesses).  
J. Génét. Hum. 1985 ; 33 (3-4) : 325-336.
  
5. **M. BARAITSER, J. Burn**  
Brief Clinical Report : Neural tube defects as an X - linked condition  
AM. J. Med. Genetics 1984 ; 17 (1) : 383-385.
  
6. **RD. BARLOW, H.S. Cuckle, N.J. Wald**  
A simple method for amniotic fluid gel - acetylcholinesterase determination,  
suitable for routine use in the antenatal diagnosis of open neural tube defects  
Clinica Chimica Acta (1982) ; 119 : 137-142.
  
7. **R.D. BARLOW, H.S. Cuckle, N.J. Wald**  
The identification of false positive amniotic fluid acetylcholinesterase results due  
to fetal calf serum contamination  
Brit. J. Obstet. Gynecol. October 1984 ; 91 (10) : 986-988.



8. **R.D. BARLOW**, H.S. Cuckle, N.J. Wald, C.H. Rodeck  
False positive gel-acetylcholinesterase results in blood-stained amniotic fluids  
Bl. J. of obstetrics and gynecology October 1982 ; 89 : 821-826.
9. **J.R. BONHAM**, J.R. Atack  
A neural tube defect specific form of acetylcholinesterase in amniotic fluid  
Clinica Chimica Acta. 1983 Dec. ; 135 (2) : 233-237.
10. **J.R. BONHAM**, A.H. Gowenlock, J.A.D. Timothy  
Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase measurement in the prenatal  
detection of neural tube defects and other malformations  
Clinica Chimica Acta, 1981 ; 115 : 163-170.
11. **D.J.H. BROCK**  
Amniotic fluid tests for Fetal Neural Tube Defects  
Brit. Med. Bull (1983) ; 39 (4) : 373-377.
12. **D.J.H. BROCK**, L. Barron, V. Van Heyningen  
Prenatal diagnosis of neural-tube defects with a monoclonal antibody specific  
for acetylcholinesterase  
The Lancet, January 5, 1985 ; 1 (8 419) : 5-8.
13. **D.J.H. BROCK**, H.S. Cuckle, N.J. Wald  
Amniotic fluid acetylcholinesterase  
The Lancet, January 10, 1981 : pp. 95-96.
14. **D. BROCK**, C. Hayward  
Gel electrophoresis of amniotic fluid acetylcholinesterase as an aid to the  
prenatal diagnosis of fetal defects.  
Clinica Chimica Acta (1980) ; 108 : 135-141.
15. **D.J.H. BROCK**, R.G. Sutcliffe  
Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida  
The Lancet, July 29, 1972 : 197-199.
16. **P.K. BUAMAH**, L. Evans, A.M. Ward  
Amniotic fluid acetylcholinesterase isoenzyme patterns in the diagnosis of  
neural tube defects  
Clinica Chimica Acta (1980) ; 103 : 147-151.

17. **I.W. CHUBB**, H.J. Springell, P.M. Pilowsky, A.C. Pollard  
 Acetylcholinesterase in human amniotic fluid : an index of fetal development ?  
 The Lancet 31 March 1979 : 688-690.
18. **John T. CLARKE**  
 Simplified "Disc" (Polyacrylamide Gel) Electrophoresis  
 Annals New-York Academy of Sciences (1964) ; 121 : 428-436.
19. **B.F. CRANDALL**, W. Kasha, M. Matsumoto.  
 Prenatal Diagnosis of Neural Tube Defects : Experiences with acetylcholinesterase gel electrophoresis  
 Am. Journal of Medical Genetics (1982) ; 12 : 361-366.
20. **B.F. CRANDALL**, M. Matsumoto  
 Routine amniotic fluid alpha-fetoprotein measurement in 34 000 pregnancies  
 Am. J. Obstet. Gynecol. August 1, 1984 ; 149 (7) : 744-747.
21. **H.S. CUCKLE**  
 Interpreting alpha-fetoprotein acetylcholinesterase Results in Bloodstained Amniotic Fluid Samples  
 Prog. Clin. Biol. Res. 1985 ; 163 B : 213-217.
22. **L. DALLAIRE**, S.B. Melançon, M. Potier, M. Gagnon, J. Boisvert, G. Lortie.  
 Le Diagnostic Prénatal des Maladies Génétiques I et II.  
 Tiré à part de l'Union Médicale du Canada, Avril 1982 ; 111-4 : 1-16.
23. **L. DALLAIRE**, M. Morin-Gonthier, M. Potier, S.B. Melançon  
 Le diagnostic prénatal : Données sur la viabilité cellulaire et l'alpha foeto-protéine du liquide amniotique.  
 L'Union Médicale du Canada, Décembre 1975 ; 104 : 1782 - 1786.
24. **G. DALE**  
 Amniotic fluid acetylcholinesterase  
 The Lancet, November 1, 1980 ; pp. 975 letter.
25. **G. DALE**, A. Archibald, J.R. Bonham, P. Lowdon  
 Diagnosis of neural tube defects by estimation of amniotic fluid acetylcholinesterase  
 Brit. J. Obstet. Gynaecol. February 1981 ; 88 : 120-125.

26. **G. DAVID, P. Haegel**  
Embryologie : Travaux pratiques et enseignement dirigé, fascicule premier :  
Embryogenèse 3ème édition  
Ed. Masson et Cie Paris 1971.
  
27. **J.S. DAVIDSON, M.M. Nelson, E.M. Peterson**  
Amniotic fluid acetylcholinesterase electrophoresis in the prenatal diagnosis of  
neural tube defects  
S. Afr. Med. J. 1982 ; 62 : 441-442.
  
28. **P. DAVIES, C. Gosden, D.J.H. Brock**  
Acetylcholinesterase, bloodstained amniotic fluids and prenatal diagnosis of  
neural tube defects  
The Lancet, June 16, 1979 ; P. 1303. letter.
  
29. **M.L. DEMBERT, M.D., M.P.H., J.P. Harisiades, M.P.H.**  
Prenatal Diagnosis of Neural Tube Defects  
Am. Fam. Physician 1983 Feb. ; 27 (2) : 241-244.
  
30. **N. ELKHAZEN, J. Dodion, E. Vamos, N. Vanregemorter,  
M. Spehl, N. Perlmutter, F. Rodesch, M. Depierreux, J. Flament-Durand**  
Diagnostic anténatal des malformations du système nerveux central.  
J. Gynécol. Obstét. Biol. Reprod. 1984 ; 1 : 55-56.
  
31. **C.E. FISKE, M.D., R.A. Filly, M.D.**  
Ultrasound Evaluation of the Normal and Abnormal Fetal Neural Axis  
Radiologic Clinics of North America Vol. 20., n° 2, juin 1982.
  
32. **F.C. FRASER, A. Lippman**  
Preventing neural tube defects : ethics of Clinical trials.  
Can. Med. Assoc. J. May 1984 ; 130 (9) : 1 113-1 114.
  
33. **A.S. GARDEN, R.J. Benzie, E.M. Hutton, D.J. Gare**  
Valproic acid therapy and neural tube defects  
Can. Med. Assoc. J. April 15, 1985 ; 132 : 933-936.
  
34. **A. GIROUD, A. Lelievre**  
Eléments d'embryologie 8ème édition  
Ed. Librairie Le Français. Paris. 1969

**35. R. GORDON**

A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube birth defects.

J. Embryol. Exp. Morph. 1985 Supplement ; 89 : 229-255.

**36. A. GOSH, M.H.Y. Tang, D. Tai, G. Nie and H.K. Ma**

Justification of maternal serum alphafetoprotein screening in a population with low incidence of neural tube defects

Prenatal Diagnosis 1986 ; Vol. 6 (2) : 83-87.

**37. S. GUIBAUD, M. Capella-Bonnet, A. Simplot.**

Apport de l'amniocentèse au dépistage prénatal des défauts de fermeture du tube neural : Bilan de 10 ans d'expérience d'un centre lyonnais.

J. Genet-Hum. 1985 ; 33 (3-4) : 339-345.

**38. S. GUIBAUD, A. Simplot, M. Bonnet-Capela**

Letter to the editor : Difficulties in interpretation of a acetylcholinesterase gel results in third trimester pregnancies.

Prenatal Diagnosis 1985 ; Vol. 5 : 303.

**39. S. GUIBAUD, A. Simplot, M. Bonnet, J.F. Fara, J.M. Thoulon, M. Dumont, P. Guibaud, J.M. Robert**

Acetylcholinesterase : un test supplémentaire pour la détection des malformations foetales à propos d'une suspicion in utero de myelomeningocele

J. Genet-Hum. 1980 ; Vol 28 (5) : 207-211.

**40. S. GUIBAUD, A. Simplot, M. Bonnet, J.M. Thoulon, P. Guibaud, J.M. Robert**

Acetylcholinesterase du liquide amniotique :

Application au diagnostic prénatal des défauts de fermeture du tube neural

J. Genet-Hum 1982 ; Vol. 30 (1) : 51-59.

**41. S. GUIBAUD, A. Simplot, M. Bonnet, J.M. Thoulon, P. Guibaud, J.M. Robert**

Acetylcholinesterase du liquide amniotique : application au diagnostic prénatal des défauts de fermeture du tube neural. Test qualitatif

J. Genet-Hum 1982 ; Vol. 30 (2) : 119-134.

**42. J.E. HADDOW**

Screening for Spinal Defects.

Hosp. pract. 1982 Janv. ; 17 (1) : 128-138.

43. **J.E. HADDOW**, W.A. Miller  
Prenatal Diagnosis of Open Neural Tube Defects  
Methods in Cell Biology ; Vol. 26. Chap. 4 : 67-94.
44. **J.E. HADDOW**, M.E. Morin, M.S. Holman, W. Miller  
Acetylcholinesterase and Fetal Malformations : Modified Qualitative Technique  
for Diagnosis of Neural Tube Defects.  
Clin. Chem. 27/1, 1981 : 61-63.
45. **H.A. HARPER**, V.W. Rodwell, P.A. Mayes  
Précis de Biochimie 5e ed. Française, Les Presses de l'Univers.  
Laval 1982 p. 218. 221 et p. 791-794.
46. **R. HARRIS**  
Maternal serum alphafoetoprotein in pregnancy and the prevention of birth  
defect.  
British Medical Journal 17 May 1980 : 1 199-1 202.
47. **R. HARRIS**, A.P. Read  
New Uncertainties in Prenatal Screening for Neural Tube Defects  
Br. Med. J. 1981 May 2 ; 282 (6 274) : 1 416-1 418.
48. **B.E. HASHIMOTO**, B.S. Mahony, R.A. Filly, M.S. Golbus, R.L. Anderson,  
P.W. Calen  
Sonography, a Complementary Examination to Alpha-Foetoprotein Testing for  
Foetal Neural Tube Defects  
J. Ultrasound Med. June 1985 ; 4 : 307-310.
49. **R.J. HENRY** : D.C. Cannon, J.W. Winkelmann  
Hayer et Row Publishers  
Clinical Chemistry. Principis and Technics  
Bio science laboratories Ile édition (1974) : 94-105.
50. **A.J. HODGSON**, P.M. Pilowsky, E.F. Roberston, A.C. Pollard, I.W. Chubb  
Combined analysis of acetylcholinesterase and alphafoetoprotein improves the  
accuracy of antenatal diagnosis of neural tube defects.  
Med. J. Aust. 1981 ; 1 (9) : 457-460.

51. **D.A. HULLIN, G.H. Elder**  
Amniotic fluid acetylcholinesterase  
The Lancet, March 21, 1981, pp. 669 Letter.
52. **D.A. HULLIN, G.H. Elder, K.M. Laurence, A. Roberts, R.G. Newcombe**  
Amniotic Fluid Cholinesterase Measurement as a Rapid Method for the Exclusion  
of Foetal Neural Tube Defects.  
The Lancet, August 15 (1981) : 325-327.
53. **A. JEANBLANC**  
Soigner les bébés avant la naissance  
Le Point n° 707, 7 avril 1986.
54. **A. JESIOROWSKA, L. Jakubowski, A. Armatys, B. Kaluzewski**  
Comparaison of two methods for amniotic fluid cholinesterases identification in  
the qualitative test for prenatal diagnosis of neural tube defects  
Clin. Chi. Acta (1984) ; 143 (3) : 315. 320.
55. **P. KAMOUN**  
Appareils et Méthodes en Biochimie 2e ed.  
Ed. Flammarion Médecine-Sciences 1977.
56. **M. KOCH, W. Fuhrmann**  
Sibs of probands with neural tube defects  
A study in the Federal Republic of Germany  
Hum. Genet 1985 ; 70 : 74-79.
57. **K.M. LAURENCE**  
Prevention of Neural Tube Defects by Improvement in Maternal Diet and  
Preconceptional Folic Acid Supplementation  
Prog. Clin. Biol Res 1985 ; 163 B : 383-388.
58. **K.M. LAURENCE, G. Elder, K.T. Evans, B.M. Hibbard, M. Hooler, C.J. Roberts**  
Should women at high risk of neural tube defects have an amniocentesis ?  
J. Med. Genet. 1985 Dec ; 22 (6) : 457. 461

**59. K. LAWTON**

Amniotic fluid acetylcholinesterase in amniotic fluid to test for neural tube defects

The Lancet, February 28, 1981 ; pp. 503 Letter.

**60. I. LECK**

The geographical distribution of neural tube defects and oral clefts

Brit. Med. Bull. 1984 ; 40 (4) : 390-395.

**61. J.E.S. LEE, Won G., R.E. Falk, O. Alfi, L. Lopez, L. Platt**

False - positive Amniotic fluid Acetylcholinesterase Results

The need for a Multifacet Approach to the Prenatal Diagnosis of Neural Tube Defects

Obstet - Gynecol. September 1985 ; 66 (3) : 225-245.

**62. M. LEGGE, H.C. Potter**

Second trimester amniotic fluid acetylcholinesterase quantitation in the prenatal diagnosis of neural tube defects.

New Zealand Med. J. 1983 ; 96 : 648-650.

**63. B. LEGRAS, M. Kerbrat, A. Ruelland, C. Clerc, J.Y. Grall, B. Le Marec,**

L. Cloarec

Diagnostic anténatal des anomalies de la gouttière neuroectodermique

Path. Biol. 1985 ; 33 (3) : 169-172.

**64. N.J LESCHOT, C. Heyting, M.V. Scheirk, E.J.W. Redeker**

Amniotic fluid gel acetylcholinesterase determination in prenatal diagnosis : Dark field illumination as a method for improving the detection of precipitation bands

Prenatal Diagnosis 1985 ; Vol 5 : 237-241.

**65. J.N. MACRI**

Critical issues in Prenatal maternal serum alphafoetoprotein screening for gluetic anomalies

Am. J. Obstet - Gynecol. 1986 ; 155 (2) 240.246

66. **M.J. MAHONEY M.D.**  
Ch. 7 Genetics, Teratology and Drug Effects  
Prenatal diagnosis of congenital malformations  
Obstetrics 1981 : 165-174.
67. **R.A. MARTIN, R.M. Firemann, L.B. Jorde**  
Phenotypic heterogeneity in neural tube defects : A Clue to causal heterogeneity.  
Am - J. Med. Genetics 1983 ; 16 (4) : 519 - 525.
68. **A. MILUNSKY, E. Alpert**  
Results and Benefits of a Maternal Serum Alphafoetoprotein Screening Program  
JAMA. Sept. 21, 1984 ; Vol. 252 n°11 : 1 438-1 442.
69. **A. MILUNSKY, V.S. Sapirstein**  
Prenatal Diagnosis of Open Neural Tube Defects Using the Amniotic Fluid Acetylcholinesterase Assay  
Journal of the American College of Obstetricians and Gynecologists  
Vol. 59 (1) 1982 January 1-5
70. **F. MOREAU, C. Guermen, O.G. EKINDJIAN, J. YONGER, F. Papa, R. Heurion**  
Détermination des activités acétylcholinestérasiques du liquide amniotique sur analyseur centrifuge  
Path. Biol. 1983 ; 31 (1) : 17-22
71. **F. MULLER, Y. Dumez, J. Massoulié**  
Molecular Forms and Solubility of Acetylcholinesterase during the Embryonic Development of Rat and Human Brain.  
Brain Research 1985 ; 331 (2) : 295-302.
72. **F. MULLER, L. Cedard, J. Boué, P. Giraudet, J. Massoulié, A. Boué.**  
Diagnostic prénatal des défauts de fermeture du tube neural.  
Presse Med. 1986 ; 15 (17) : 783-786.
73. **M.B. Mc NAY, C.R. Whitfield**  
Amniocentesis  
British Journal of Hospital Medicine June 1984 ; 31 (6) : 406-416



74. **N.C. NEVIN**

The Role of Periconceptional Vitamin Supplementation in the Prevention of Neural Tube Defects

Prog. Clin. Biol. Res. 1985 ; 163 B : 389-396.

75. **B.R. PETTIT, G.S. King**

The Improvement of the Antenatal Detection of Foetal Neural Tube Defects using Discriminant Analysis.

Clinical Biochemistry Feb. 1984 ; Vol. 17 : 46-51.

76. **L.D. PLATT M.D., S.H. Golde M.D., R. Artral M.D., G. Frohlich M.S.,**

O. Alfi M.D., W.G. N.G., Phb

False negative maternal serum alphafoetoprotein determination in myelodysplasia : The role of ultrasound

Am. J. Obstet. Gynecol. October 1982 ; 144 (3) : 352-355.

77. **E.L. POTTER, J.M. Crang**

Pathology of the foetus and the infant 3e ed. (1975) -

Year book Medical Publishers Inc. Chicago p. 544-546.

78. **T.M. POWLEDGE, M.S., J. Fletcher PHD.,**

Guidelines for the ethical, social and legal issues in prenatal diagnosis

A report from the Genetics Research Group of the Center, Institute of Society, Ethics and the Life Sciences.

Reprinted by permission from the New England Journal of Medicine 300 : 168-172 (January 25, 1979).

79. **A.P. READ, S.J. Fennelf, D. Donnai, R. Harnis**

Amniotic fluid acetylcholinesterase : a retrospective and projective study of the qualitative method.

Brit. Journal of Obstetrics and Gynecology

February 1982, Vol 89 : 111-116.

80. **N. Van REGEMORTER, V. Defleur, D. Delbeke, E. Vamos et F. Rodesch**

Alphafoetoprotein (A.F.P.), concanavalin A non reactive A.F.P. and specific acetylcholinesterase in amniotic fluid from pathological pregnancies. Predictive values for open spina bifida :

Europ. J. Obstet. Gynec. reprod. Biol. 1983 ; 16 : 9-18.

81. **REPORT** of the Collaborative Acetylcholinesterase Study  
Amniotic fluid acetylcholinesterase electrophoresis as a secondary test in the diagnosis of anencephaly and open spinabifida in early pregnancy.  
The Lancet : 15 August 1981 : 321-324.
82. Imagerie Médicale **B. RICHARD**  
Les Monographies CHOAY n° 20.  
Ed. PIL 1984 Nov.
83. **C.J. ROBERTS**, B.M. Hibbard, E.E. Roberts, K.T. Evans, K.M. Laurenc,  
I.B. Robertson  
Diagnostic effectiveness of ultrasound in detection of neural tube defect  
The Lancet November 5, 1983 ; 2 (8 358) : 1 068-1069.
84. **J.O. ROBINSON**, B.M. Hibbard, K.M. Laurence  
Anxiety during a crisis Emotional effects of screening for neural tube defects  
J. of Psychosomatic Research Vol. 28 n° 2 (1984) : 163-169.
85. **ROBINSON H.P. M.D. V.D. HOOD**, A.H. Adam, A.M. Gibson, M.A. Fergusson  
Diagnostic Ultrasound : Early Detection of Foetal Neural Tube Defects  
Obstetrics and Gynecology : Vol. 56, 6, December 1980 : 705-710.
86. **C. RORIVE**, R. Schoos, C. Lambotte  
L'acétylcholinesterase amniotique : nouveau test pour le diagnostic anténatal des malformations neurales  
Revue médicale de Liège Mars 1982 ; 37 (6) : 201-208.
87. **A.D. SADOVNICK**, P.A. Baitd  
A Cost Benefit Analysis of a Population Screening Programm for Neural Tube Defects  
Prenatal Diagnosis 1983 ; Vol. 3 : 117-126.
88. **SECOND** Report of the U.K. Collaborative Study  
Amniotic fluid alpha-foetoprotein measurement in antenatal diagnosis of anencephaly and open spina bifida in early pregnancy.  
The Lancet, 1979 : September 29, 651-661

**89. M.J. SELLER**

Chercher les femmes (or the personal touch in the laboratory)

J. Med. Genet. Dec. 1981 ; 18 (6) : 463-464.

**90. M.J. SELLER**

Periconceptional vitamin supplementation to prevent recurrence of neural tube defects

The Lancet, June 15, 1985 ; 1 (8 442) : 1 392-1 393.

**91. M.J. SELLER, A.C. Berry**

False positive acetylcholinesterase gel test

The Lancet, February 21, 1981 ; pp. 444 Letter.

**92. M.J. SELLER, K.J. Kole**

Polyacrylamide gel electro phoresis of amniotic fluid cholinesterases. A good prenatal test for Neural Tube Defects.

British Journal of Obstetrics and Gynaecology ; Dec. 1980, Vol. 87 ; 1 103-1 108

**93. M.J. SELLER, K.J. Kole, A.M. Feuson, P.E. Polain**

Amniotic fluid acetylcholinesterase and prenatal diagnosis

British journal of Obst. and Gyneac. June 1980 ; Vol. 87 ; 501-505.

**94. M. SEPPÄLÄ M.D.**

Immunologic detection of alphafoetoprotein as a marker of foetal pathology

Clinical obstetrics and gynecology 1977 Sept. ; 20 (3) : 737-758.

**95. Ann. SILVER**

The Biology of cholinesterases 1974

North Holland Research Monographs

Frontiers of Biology-Vol 36. A. Neuberger E.L. Tatum

North Holland Publishing Compagny

Amsterdam Oxford and American Elsevies Publishing Compagny Inc N.Y.

**96. A.D. SMITH**

Amniotic Fluid Acetylcholinesterase and Neural Tube Defects, Plea for Standardisation

The Lancet, August 11, 1979 ; 307-308.

**97. A.L. SMITH**

Amniotic fluid acetylcholinesterase assay and the antenatal detection of neural tube defect

Clinica Chimica Acta 1982 ; 123 : 1-9

**98. A.D. SMITH ; N.J. Wald ; H.S. Cuckle ; G.M. Stirrat, M. Bobrow, M. Lagercrantz**  
Amniotic fluid acetylcholinesterase as a possible diagnostic test for N.T.D. in early Pregnancy.

The Lancet ; 31 March 1979. 685-688

**99. R.W. SMITHELLS**

Vitamins and Neural Tube Defects

Curr. Concepts. Nutr. 1985 ; 14 : 83-92.

**100. Special Report ; Results of a consensus meeting**

Maternal serum alpha-foetoprotein screening for neural tube defects ,

Prenatal Diagnosis 1985 ; 5 (1) : 77-83.

**101. P.W. STRIKE, J. Smith**

Neural tube defect risk assessment for individual pregnancies using alphafoetoprotein and acetylcholinesterase test results

J. Clin. Pathol. 1982 ; 35 : 1 334-1 339.

**102. K. TOFTAGER-LARSEN, J. Nandrup, B. Norgaard-Perdersen**

Amniotic fluid analysis in prenatal diagnosis of neural tube defects : a comparison between six biochemical tests supplementary to the measurement of amniotic fluid alpha-foetoprotein

Clinical Genetics 1984 ; 26 : 406-413.

**103. R.TROCCOLI, S. Biagoni, F. Stella, A. Pachi, M. Ermini, M. Toschi, G. Scarzella, M. Giorgi.**

Cholinesterase evaluation in the prenatal diagnosis of open neural tube defects.

Ric. Clin. Lab. 1985 ; 15 (1) : 53-62

**104. U.S. Department of Health, education and Welfare, Public Health Service**

National Institutes of Health

Antenatal diagnosis

1979 I 121 - I 128

105. **T. VOIGTLÄNDER**, W. Friedl, M. Grewer, W. Schmidt, M. Schroder  
Quantitative and Qualitative Assay of Amniotic Fluid Acetylcholinesterase in  
the Prenatal Diagnosis of Neural Tube Defects  
Human Genetics 1981 ; 59 (3) : 227-231.
106. **N.J. WALD**  
Amniotic fluid acetylcholinesterase  
The Lancet, August 23 1980 : pp. 407-408.
107. **N.J. WALD**, P.E. Polani  
Neural tube defects and vitamins : the need for a randomized clinical trial  
British Journal of Obstetrics and Gynaecology June 1984 ; 91 (6) : 516-523.
108. **B. WEBB**, S.J. Richardson, R. Garry, J. Atkins  
Particular acetylcholinesterase in amniotic fluid and its implication for neural  
tube defects screening  
Ann. Clin. Biochem. 1981, 18 : 299-303.
109. **J. WILD**, A.P. Read, S. Sheppard, M.J. Seller, R.W. Smithells, N.C. Nevin,  
C.J. Schorak, D.W. Fielding, S. Walker, R. Hanis.  
Recurrent neural tube defects, risk factors and vitamins  
Archives of Disease in Childhood 1986 ; Vol. G1 : 440-444.
110. **D.L. WILLIAMS**, R.F. Nunon, V. Marks edited.  
Scientific Foundations of Clinical Biochemistry  
Volume I, analytical aspects 1978 p.p. 258-274.  
William Heinemann Medical Books Publication.
111. **G.N. WILSON**, A. Raj., J.R. Waterson, M. Busch, E. Baty, J. Parker, J. Hamman,  
G. Lourswan, M. Barr  
Detection of Neural Tube Defects with Alphafoetoprotein  
Measurement in Amniotic Fluid  
J. Reprod. Med. March 1986 ; 31 (3) : 157-161.

112. **M. FAVIER**, FAVIER A. , ROBERT E, GILIGNER M, MALINAS Y.

La carence en zinc chez la mère peut-elle être responsable de l'apparition  
de spina bifida aperta chez le fœtus ? -

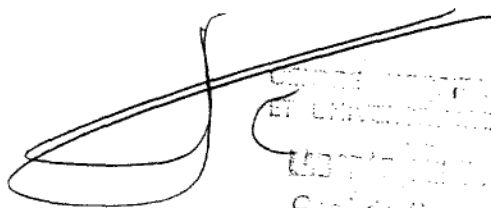
Rev. Fr. Gynecol, obstet. 1987 ; 82, 10 : 575-581.



A U T O R I S A T I O N   D ' I M P R E S S I O N

de la Thèse dont l'intitulé est : Les défauts de fermeture du  
 e neural, intérêt diagnostique de l'acétylcholinestérase

candidat : M BLANCATO Christophe



UNIVERSITÉ REGIONALE  
 ET UNIVERSITÉ DE GRENOBLE  
 FACULTÉ DE MÉDECINE  
 Chef de Service

Le Président du Jury

VU

GRENOBLE, le 29 Mai 1988

Le Président de l'Université

VU

GRENOBLE, le 3 Juin 1988



Le Président

J.J. PAYAN

## Résumé

Les malformations du tube neural par défaut de fermeture sont à l'origine d'affections gravissimes.

La mise en place de programmes de dépistage et de diagnostics anténataux constitue actuellement le moyen le plus efficace de lutter contre ces malformations.

Le dépistage comprend essentiellement un examen échographique du fœtus, sa précision est sans cesse grandissante mais il n'est pas infallible.

Selon la zone d'incidence, les programmes mis en place incluent un dosage de l'alpha foeto-protéine (AFP) du sérum maternel.

Le diagnostic se complète par une amniocentèse permettant, entre autre, un dosage d'AFP du liquide amniotique et un test qualitatif de l'activité acétylcholinestérase.

Ce dernier test s'est avéré être le test complémentaire le plus fiable dans ses résultats et le plus bénéfique pour le diagnostic.

L'avenir, c'est la mise au point d'une méthode efficace de prévention primaire ; Elle est fondée sur l'administration péri-conceptionnelle d'une thérapeutique à base de vitamines, en particulier l'acide folique.