2002 — Tome 186 — N° 5

BULLETIN DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

publié par MM.

Louis AUQUIER, Secrétaire perpétuel
et Jacques-Louis BINET, Secrétaire adjoint

Rédacteur en chef : Professeur Jean CAMBIER

Les sommaires du « Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine » sont reproduits dans les « Current Contents » de l'Institute for Scientific Information (Philadelphie). Les articles sont indexés dans le « Bioresearch Index » du Biosciences Information Service (Philadelphie), dans l'index Medicus, dans Excerpta medica et dans le « Bulletin Signalétique » du C.N.R.S. (Paris).

sommaire

Articles originaux

837 Sur l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine
About the epidemiology of human cryptosporidiosis
J. Euzéby

851 Résultats français de l'enzymothérapie substitutive dans la maladie de Gaucher
Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. The French study
G. Schaison, I. Caubel, N. Belmatoug, T. Billette de Villemeur, J.M. Saudubray

865 Le diagnostic génétique préimplantatoire : premier bilan du groupe parisien
Preimplantation Genetic Diagnosis : update
R. Frydman, G. Tachdjian, N. Achour-Frydman, P. Ray, S. Romana, S. Hamamah, S. Marcadet-Fredet, V. Kerbrat, R. Fanchin, J. Kadoch, T. Attie, M. Lelorc'h, M. Vekemans, A. Munnich

879 Le traitement de l'azoospermie excrétoire. La chirurgie face à la biologie
Excretory azoospermia. Current appraisal of the treatment
M. Cognat, J.F. Guérin, B. Keppi, S. Pilikian

895 De la génomique à la post-génomique : un retour aux origines ?
From genomics to post-genomics : back to the origins ?
Ph. Jeanteur

Informations

907 Fédération des Académies de Médecine et des Institutions Similaires de l'Union européenne
L. Auquier

911 L'évolution de l'imagerie médicale en 2001
J.D. Picard

Communiqué

913 Sur les cellules souches embryonnaires humaines en médecine « régénératrice »
On the use of human embryonic stem cells in regenerative medical activity
D. Pellerin

Vie de l'Académie

915 Actes

Recommandations aux auteurs

925 Instructions

Abonnements au Bulletin de l'Académie nationale de médecine

927 Tarifs et modalités

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 837-850, séance du 7 mai 2002

Sur l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine

About the epidemiology of human cryptosporidiosis

Jacques EUZÉBY *

RÉSUMÉ

L'émergence de la cryptosporidiose dans l'océan de la pathologie a suscité nombre de travaux. Nous proposons une synthèse de ceux qui ont étudié l'épidémiologie de la maladie : caractères des parasites, espèces et génotypes isolés chez l'Homme, modalités de la dissémination des éléments infectants et de la contamination, réceptivité et sensibilité des personnes exposées au risque. De cette étude, ressortent des mesures de prophylaxie.

MOTS-CLÉS : ZOONOSES. CRYPTOSPORIDIOSE, épidémiologie. IMMUNODÉPRESSION.

SUMMARY

Cryptosporidiosis, as an emerging disease, has generated a tremendous amount of research. Our purpose is a survey of the epidemiology of this disease, emphasizing : the features of the parasites and the species and genotypes that may infect Man, the most frequent of which is Cryptosporidium parvum *and its two genotypes « Cattle » and « Human » ; the means of dissemination of the infective stage and of human contamination ; the factors that put Man at risk of catching a severe infection ; the basis of a suitable control.*

KEY-WORDS (Index Medicus) : ZOONOSES. CRYPTOSPORIDIOSIS, epidemiology. IMMUNOSUPPRESSION.

Les cryptosporidioses sont des infections très généralement entérotropes, dues au parasitisme de ***coccidies*** du genre *Cryptosporidium*, dont certaines sont communes aux animaux et à l'Homme et ont un caractère zoonosique.

Habituellement bénignes, voire asymptomatiques chez les individus normaux, elles sont particulièrement graves chez les sujets présentant un déficit immunitaire et sont causes d'un défaut d'absorption intestinale, entraînant l'émission d'une diarrhée massive.

* *Membre de l'Académie nationale de médecine.*
École vétérinaire de Lyon, BP 83 - 69280 Marcy-l'Étoile.

Tirés-à-part : Professeur Jacques EUZÉBY, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 6 mars 2002, accepté le 29 avril 2002.

La cryptosporidiose de l'Homme**,** pour la première fois décrite en 1976 [1, 2] a pris une très grande importance [3] du fait de sa particulière gravité chez les sidéens, qui peuvent être atteints d'une forme fulminante, avec diarrhée cholériforme, mortelle dans 70 % des cas. Cette importance a été magnifiée par la survenue de vastes et sévères anadémies, dont la plus spectaculaire et la plus grave a été celle de Milwaukee (1993), rapportée en 1994 par Mac Kenzie et *al* [4] : plus de 400 000 cas, dont plus de 100 mortels. Toutes les maladies émergentes font l'objet de recherches intensives ; la cryptosporidiose n'a pas échappé à cette règle et de très nombreux travaux lui ont été dévolus, qu'il importe de synthétiser et de commenter. Tel est l'objet de la présente étude, que nous limiterons à l'épidémiologie de l'infection. Toute enquête épidémiologique sur une maladie infectieuse suppose la connaissance du (ou des) agent(s) de l'infection, de la dissémination des éléments contaminateurs, des modalités de la contamination et de la réceptivité et de la sensibilité des individus exposés au risque. De cette enquête, doivent découler des mesures de prophylaxie rationnelle. Tel sera le plan de la présente étude.

LES CRYPTOSPORIDIES

Ce sont des sporozoaires du sous-ordre des Eimeriorina (coccidies *stricto sensu),* famille des *Cryptosporidiidae* [5, 6], dont deux caractères doivent être retenus :

— développement en position marginale, sous la membrane des cellules-hôtes, mais toujours au sein d'une vacuole parasitophore ;

— sporulation endogène, aboutissant à la formation d'ookystes mûrs à 4 sporozoïtes nus, non contenus dans un sporocyste.

On a cité dans le genre Cryptosporidium Tyzzer 1910, *jusqu'à 23 espèces* [7] [1]

1. Aujourd'hui, la biochimie, l'immunologie, la biologie moléculaire et les études génotypiques ont apporté quelques précisions et permettent de ne retenir que 11 espèces, que nous citons, dans l'ordre chronologique de leur identification : *C. muris,* Tyzzer 1907 *; C. parvum,* Tyzzer 1912 ; *C. wrairi,* Vetterling, Jervis, Merill 1971 ; *C. felis,* Iseki 1979 ; *C. serpentis,* Levine 1980 ; *C. nasorum,* Hoover, Hoerr Carlton 1981 *; C. bayleyi,* Current, Upton, Haynes 1986 ; *C. meleagridis,* Slavin 1995 ; *C. saurophilum,* Koudela et Modry 1998 ; *C. andersoni,* binôme créé par Lindsay [8] pour désigner le « *C. muris* » de l'abomasum des bovins ; *C. canis,* Fayer, Trout, Xiao, binôme formé par Fayer et *al.* [9] pour désigner une espèce jusqu'alors innominée, *C. parvum* « type chien », isolée chez cet animal par Morgan et *al*. [10]**.** Ces espèces sont groupées sous sept génotypes : 2 génotypes pour *C. parvum* ; un génotype pour *C. felis*, non infectant pour la souris et le cobaye ; un génotype pour *C. wrairi,* infectant pour le cobaye, la souris et le veau ; un génotype pour *Cryptosporidium* sp. ; deux génotypes pour *C. muris*, mais le génotype A, parasite gastricole des bovins et des camélidés a été élevé au rang d'espèce par Lindsay [8] : il correspond à *C. andersoni* ; le génotype B, parasite les muridés, le hamster et les damans de rochers (*Procavia* spp). D'autre part, du point de vue de la localisation élective de ses espèces, on divise le genre *Cryptosporidium* en deux groupes : parasites gastricoles : *C. muris, C. andersoni* et *C. serpentis* ; parasites entérotropes : *C. parvum, C. felis, C. wrairi, C. meleagridis, C. baileyi, C. saurophilum. C. bayley* peut aussi infecter la bourse de Fabricius des galliformes.

De la morphologie des cryptosporidies, nous ne retiendrons que les caractères des formes de dissémination du parasite, qui sont aussi celles dont la découverte dans les fèces permet un diagnostic de laboratoire, les *ookystes sporulés :* éléments globuleux, à paroi épaisse, de 3,5 à 7 μm de diamètre, contenant 8 sporozoïtes non enfermés dans un sporocyste ; ces ookystes sont acido-résistants, ce qui permet leur mise en évidence directe par la coloration de Ziehl-Neelsen.

Le cycle évolutif des *Cryptosporidium* est semblable à celui des Eimeriorina monoxènes, avec cependant, deux particularités :

— sporulation endogène des ookystes, de sorte que les fèces des individus parasités évacuent des formes parasitaires directement infectantes, donnée importante du point de vue de l'épidémiologie de la cryptosporidiose ;
— existence de deux types d'ookystes : ookystes à paroi épaisse, qui seront évacués et ookystes à paroi mince, qui évoluent dans l'intestin et s'ouvrent dans la lumière intestinale au niveau du duodénum.

Les sporozoïtes libérés sont à l'origine d'un nouveau cycle endogène (auto-infection), qui aggrave le processus pathologique (cf. l'auto-infection observée au cours de la strongyloïdose). Les schizozoïtes résultant de cette modalité évolutive peuvent être disséminés par les macrophages en des localisations exentérales, ce qui rend compte de la possibilité d'une cryptosporidiose pulmonaire, qu'on a pu confondre avec la pneumocystose. Les schizozoïtes sont les agents de dissémination endogène des parasites (contagion intercellulaire) et de la gravité de la cryptosporidiose ; les ookystes à paroi épaisse sont responsables de la dissémination externe (contagion interindividuelle).

La *longévité* des cryptosporidies chez leur hôte se termine normalement avec la formation des ookystes, environ le 6e jour ; mais la possibilité d'auto-infection peut l'allonger considérablement, jusqu'à 120 jours.

La prolificité des parasites est très grande [11] et elle se traduit par l'excrétion de millions d'ookystes par gramme de fèces chez les animaux parasités (cf. *infra*).

***Les* ookystes sporulés des** *cryptosporidies, évacués avec les fèces, demeurent viables* pendant 4 à 12 mois sur les sols humides et dans l'eau, à des températures de 20° C à 4° C et pendant une semaine à 35° C [12-14]. Ils sont très sensibles à la dessiccation et sont détruits, en milieu sec, en 3 jours en été et en 1 jour en hiver. Dans l'eau, ils perdent leur vitalité en 30 minutes à la température de 60° C et en moins de 5 minutes à 65° C [15, 16]**.** Le froid exerce aussi un effet létal sur les ookystes, mais à des températures relativement basses et maintenues : -10° C, pendant 7 jours ; mais à -15° C, la survie ne dépasse pas 1 jour [17]**.** Cependant, 70 % des ookystes survivent en milieu sec pendant 21 heures à la température de -22° C, lentement obtenue ; au contraire, la congélation brutale les détruit. Le matériel fécal met les ookystes à l'abri de la dessication et augmente l'imperméabilité de leur paroi aux molécules de petite taille, ce qui les rend moins exposés aux facteurs létaux de l'environnement

[18, 19]. Dans l'eau de mer, où ils peuvent être entraînés par les effluents, les ookystes survivent pendant au moins 8 à 12 semaines aux températures de 10° C et 20° C, même en eaux très froides (4° C) [18, 20]. Cette survie est à considérer quand on sait que les huîtres et autres mollusques aquatiques euryhalins peuvent être vecteurs de l'infection.

Mais, comme ceux de toutes les coccidies, les ookystes de *Cryptosporidium* sont très peu sensibles à l'action des agents chimiques : seuls le formol à 10 %, l'ammoniaque à 10 %, l'eau de Javel à 70 % ou le glutaraldéhyde à 3 %, concentrations inutilisables en pratique, peuvent altérer leur vitalité. Dans les milieux où se dégage de l'ammoniac, la viabilité des ookystes est altérée, voire supprimée ; ainsi, les lisiers ne sont-ils pas très polluants [21, 22]**.** Lorsque l'eau est traitée par chloration (11-12 mg de chlore résiduel par litre), et maintenue à 10° C, le pouvoir infectant des ookystes ne persiste pas au-delà de 4 à 8 semaines. La chaux vive, le sulfate ferrique et le sulfate d'aluminium altèrent la vitalité des ookystes, si le pH du milieu n'est pas corrigé [18].

Plusieurs espèces de Cryptosporidium isolées chez les animaux peuvent évoluer chez l'Homme : *C. meleagridis, C. felis ; C. canis* (le type « chien » de *C. parvum*) ; *C. muris* — et même *C. bayleyi*. Ainsi, la cryptosporidiose de l'Homme peut avoir une origine zoonosique, signalée dès 1983 [23].

C'est essentiellement *Cryptosporidium parvum* qui est mis en évidence chez l'Homme. Cette espèce affecte aussi de nombreuses espèces animales : bovins, petits ruminants, porc, lapin, carnivores domestiques, mustélidés, marsupiaux ainsi que la souris et le rat gris, *Rattus norvegicus. C. parvum* n'infecte pas les oiseaux, mais conserve son pouvoir infectant pour les espèces réceptives, après passage chez ces animaux ; ainsi, des oiseaux aquatiques migrateurs peuvent-ils disperser le parasite et polluer les eaux de surface [25]. *C. meleagridis* est très proche des souches zoonosiques de *C. parvum ;* ainsi, les dindons peuvent-ils disséminer le parasite.

Cependant, l'analyse des isoenzymes ; la sérologie (profils antigéniques), la biochimie (protéines d'adhésion analogues de la thrombospondine : Thrombospondin Related Adhesive Proteins : TRAP) et surtout la biologie moléculaire ont mis en évidence l'*hétérogénéité* de *C. parvum* et sa dissociation en génotypes plus ou moins adaptés à l'Homme et aux animaux. Ortega [26] puis Morgan et *al* [27, 27bis]. reconnaissent un génotype « veau », mis en évidence chez les bovins, les ovins, la chèvre, l'alpaga péruvien — et un génotype « Homme », qu'ils différencient par leur phosphomutase et par leur glucose-phosphate isomérase [2]. Widmer et *al*. [28] isolent, au sein de *C. parvum* un génotype « C » (« **C**attle »), commun à l'Homme et aux animaux, notamment bovins et souris (= génotype II) et un génotype « H » (Human) ou génotype I, propre à l'Homme [29], mais avec quelques exceptions. Ces deux génotypes sont caractérisés par deux doubles chaînes d'ARN, qu'on ne trouve que chez *Cryptosporidium parvum* et par l'étude du polymorphisme de la séquence ADN. On connaît aussi des souches adaptées au porc, au cobaye, à divers singes ;

2. Certains auteurs considèrent *C. meleagridis* comme un génotype de *C. parvum* ; ce serait alors le génotype T (turkey).

certaines souches isolées chez l'Homme peuvent aussi infecter les porcelets. Hill et *al.* [30] et Morgan et *al*. [31] ont identifié le génotype humain chez un mammifère marin de l'ordre des Siréniens, le dugong (*Dugong dugon)*. Il ne semble pas exister de recombinaison génétique entre ces deux génotypes ; mais au sein de chacun d'eux, existent des sous-génotypes, mis en évidence par un marqueur microsatellite : deux sub-génotypes pour « H » et quatre sub-génotypes pour « C » [32]. Le sub-génotype H1 est connu en Europe et en Amérique ; le sub-génotype H2, beaucoup plus rare, a été isolé au Japon ; le sub-génotype C1 est en cause dans 61,5 % des cas de cryptosporidiose humaine et on l'observe aux Etats-Unis et au Japon chez le veau, l'agneau et le chevreau ; C3 et C4 ne sont connus, respectivement, qu'aux Pays-Bas et en Italie du Sud, chez l'Homme et les animaux. Le génotype « Bœuf » est le plus souvent observé chez l'Homme et, réciproquement, on a mis en évidence la réceptivité du veau au génotype « Homme » [33]. Dans l'environnement, c'est surtout le génotype 2 (= C) qui est représenté : 65 % des cas [34].

Ces diverses observations rendent compte du *caractère zoonosique* possible, et fréquent, de la cryptosporidiose humaine. Les bovins en sont les sources principales. Dans certaines régions des Etats-Unis, on a observé la présence de *Cryptosporidium parvum* dans 90 % des fermes d'élevage bovin, avec 50 % des veaux infectés [35], chez lesquels l'excrétion quotidienne d'ookystes peut atteindre dix millions [36]**.** L'excrétion commence, chez le veau, à l'âge de 4 jours ; le pic se situe entre la 2e et la 3e semaine, avec des teneurs fécales de l'ordre de 7 000 000 et jusqu'à 25 000 000 par gramme, ce qui équivaut à l'excrétion quotidienne de 2 à 24 milliards d'éléments infectants ; le déclin commence environ la 3e semaine, mais certains animaux continuent de rejeter des ookystes jusqu'au 4e mois de leur vie et en quantité encore importante jusqu'à l'âge de deux mois environ [37]. Les veaux peuvent évacuer quotidiennement jusqu'à 10^{10} ookystes pendant 14 jours. Chez les chevreaux, on a compté de 15 000 000 à 200 000 000 d'ookystes par gramme de fèces. Chez la chèvre et chez la brebis, mais pas chez la vache, on observe une élévation de l'évacuation ookystale après le part. Mais des isolats très pathogènes pour l'Homme le sont peu pour le veau, tandis que des isolats peu pathogènes pour l'Homme sont causes de cryptosporidiose sévère chez le veau. Ces différences permettent de considérer que la différenciation des souches animales et humaines de *C. parvum* est récente et que leur adaptation à l'Homme ou aux animaux est encore imparfaite : ainsi, observe-t-on que la période d'excrétion des ookystes est plus longue chez l'Homme, lorsque le parasitisme est le fait du génotype « H » que lorsque l'infection est l'œuvre du génotype « C » [38]. Il n'en demeure pas moins que des ookystes de *C. parvum* évacués par des animaux, particulièrement par les bovins mais aussi par les petits ruminants et le chien et le chat, sont agents possibles d'infection cryptosporidienne non seulement pour les animaux, mais aussi pour l'Homme. Ces sources de parasites sont d'autant plus dangereuses que les animaux parasités peuvent n'avoir qu'une infection crypto-symptomatique [39]. La vaccination des veaux contre la cryptosporidiose, qui inhibe le développement du parasite, serait donc de nature à protéger non seulement les animaux, mais aussi, indirectement, l'Homme ; un vaccin cons-

titué d'un nombre fixe d'ookystes (25 000 000), inactivés par lyophilisation, est utilisé aux États-Unis [40].

Mais il existe aussi une origine humaine intrinsèque de la cryptosporidiose, due au génotype « Homme » et rendue possible par les ookystes directement infectants évacués avec les fèces : un sujet parasité peut évacuer jusqu'à 10^7 ookystes par jour. Cette différence épidémiologique engage les taxinomistes à élever au rang d'espèces les deux génotypes « Bœuf » et « Homme » [41]. Cependant, le génotype humain intervient beaucoup moins souvent que le génotype zoonosique : 1 % des isolats [34]. Lorsqu'il est à l'origine de l'infection, il s'agit de contaminations d'origine fécale (cf. *infra*).

Du point de vue épidémiologique, et en vue de l'organisation d'une prophylaxie rationnelle, il peut être important de préciser l'origine des parasites contaminateurs par l'identification des génotypes en cause. Cette identification repose sur des investigations biochimiques (équipement iso-enzymatque) et antigéniques (sérologie) et surtout sur l'utilisation des méthodes de la biologie moléculaire.

La dissémination des ookystes infectants s'accomplit par les matières fécales des animaux parasités, surtout celles des jeunes veaux. Ainsi, l'épandage de lisiers et de fumiers non assainis peut-il entraîner la pollution des prairies. De même, on trouve des ookystes vivants dans les effluents non traités : jusqu'à 14 000 par litre et jusqu'à 150 000 par litre dans les effluents d'abattoirs [12, 42]. La submersion des terrains agricoles peut entraîner la pollution des cultures maraîchères par des ookystes de cryptosporidies [14, 22]. Cependant, la végétation exerce sur les oocystes un effet protecteur, leur évitant l'action létale des variations de température et d'humidité. De plus, les parasites peuvent être revêtus d'une couche de sol qui les protège, jusqu'à ce qu'un processus d'érosion (pluies, piétinement) les découvre et que les eaux de ruissellement les dispersent [43, 44]. Ainsi peuvent être souillés les végétaux cultivés sur des terrains fertilisés par des eaux résiduaires et des boues d'épandage. Dans la nature, les eaux de ruissellement disséminent le contage et ces eaux sont surtout dangereuses quand elles procèdent de fortes précipitations, qui désagrègent les fèces et en libèrent les ookystes [45]. Les eaux de ruissellement sont surtout contaminées par les génotypes humain et bovin de *C. parvum ;* elles peuvent polluer les nappes superficielles, surtout si leur ruissellement est rapide — et les nappes phréatiques voisines, surtout si la pente des terrains est faible et le ruissellement lent, ce qui permet une meilleure imprégnation des sols. Dans les régions littorales, la pollution peut atteindre la mer, qui sert parfois d'exutoire pour les stations d'épuration côtières ; il en résulte la contamination des estuaires [15] et des parcs de conchyliculture. C'est le génotype 2 (= C), le plus fréquent dans l'environnement, qui est ainsi dispersé et on le trouve dans les hémocytes et les branchies de mollusques dulçaquacoles : *Corbicula fluminea* et marins : huîtres (*Crassostrea virginica*) et moules (*Mytilus galloprovincialis)* [46], qui peuvent être des sentinelles de la pollution du milieu et, consommés crus, sont des vecteurs possibles de contamination pour l'Homme.

L'infection de l'Homme par les cryptosporidies procède de modalités différentes, selon l'origine des parasites.

Dans le cas d'une origine zoonosique, ce sont essentiellement des cryptosporidies d'origine bovine et ovine, qui sont à l'origine de la pollution : les souches zoonosiques de *C. parvum* représentent plus de 65 % des parasites isolés chez l'Homme [34]. La contamnation résulte : de *phytophagie*, de *carpophagie*, *de malacophagie* et *d'hydropinie.* En matière d'hydropinie, ce ne sont pas seulement les eaux sauvages de surface qui peuvent être vectrices d'ookystes, mais aussi les eaux finies, celles que distribuent les réseaux d'adduction urbains ; tel était le cas lors de l'anadémie de Milwaukee. En effet, les ookystes ne sont pas toujours arrêtés par les systèmes de filtration utilisés dans les stations de traitement des eaux de consommation ni détruits par les agents chimiques (Cl, O3) ou physiques (UV) mis en œuvre pour assurer l'assainissement. L'infection contractée par *inhalation* a été évoquée [48, 49]. Cette voie est très improbable et son implication résulte peut-être d'une confusion entre la localisation métastatique de la cryptosporidiose et la pneumocystose.

Dans le cas de contagion interhumaine, les ookystes évacués étant immédiatement infectants, l'infection peut se réaliser selon les modalités habituelles des infections liées au péril fécal ou résulter de pratiques homosexuelles. L'ingestion accidentelle d'eau des piscines publiques en est une autre modalité (« accidents fécaux ») ; cette eau peut avoir un taux de pollution de 50 à 80 ookystes par litre [50]. Dans les hôpitaux, l'infection peut procéder de l'utilisation de matériels d'exploration et de perfusion non stérilisés par la chaleur [3], ainsi que de toutes les manipulations effectuées avec des mains souillées.

La réceptivité de l'Homme à la cryptosporidiose dépend :

— de facteurs extrinsèques :

- *espèce* du parasite à laquelle il est exposé : c'est *Cryptosporidium parvum* qui se développe le plus souvent chez l'Homme. D'autre part, les sujets immunocompétents sont réceptifs aux génotypes « Homme » et « Bœuf » de *C. parvum,* tandis que les individus immunodéprimés sont réceptifs et sensibles non seulement à *C. parvum*, mais encore à *C. felis*, *C. canis* [51], *C. meleagridis*, *C. muris, C. baylei* et peut-être à *C. wrairi* et *C. saurophilum ;*
- *conditions de vie :* cf. le cas des animaliers en contact avec les déjections des jeunes veaux et chevreaux ; des personnes vivant ou voyageant en pays à hygiène générale déficiente ; des chercheurs et techniciens de laboratoire, appelés à travailler sur les effluents, les boues résiduaires, les échantillons d'eau à analyser ; des homosexuels ;

3. L'ouverture des ookystes infectants ne s'effectuant que dans le duodénum, seules les sondes gastro-duodénales peuvent être dangereuses, à l'exclusion du matériel utilisé pour les colonoscopies.

- de facteurs intrinsèques, notamment de l'âge : les jeunes enfants sont plus réceptifs que les adultes. Mais le facteur âge intervient moins chez l'Homme que chez les animaux où la cryptosporidiose est surtout une maladie néonatale.

Mais, outre la réceptivité, l'infection cryptosporidienne ne devient une maladie que si les individus réceptifs sont, aussi, sensibles au parasite.

La sensibilité

— est essentiellement fonction de l'état immunologique des individus contaminés. Normalement, la cryptosporidiose est une infection dont la durée est spontanément limitée (self limiting disease) : l'évolution des parasites se termine avec la fécondation et la formation des ookytes, et les schizontes de deuxième génération sont immunigènes (processus d'hypersensibilité de type IV, dépendant des lymphocytes intra-épithéliaux CD4$\alpha\beta$), de sorte que les schizozoïtes procédant de réinfections exogènes ou résultant du processus d'auto-infection précédemment signalé, sont rejetés par les individus immuns. Mais en cas d'immunodépression, ces schizozoïtes persistent et sont multipliés par l'auto-infection, d'où résulte une cryptosporidiose très sévère ;

— l'incidence de la dose infectante dépend de la compétence immunologique : en cas d'immunodépression, un seul ookyste peut déterminer une infection clinique chez la souris. Mais chez des sujets immunocompétents eux-mêmes, l'infection est possible, même avec de très faibles contaminations, de l'ordre de 30 ookystes ; elle est le plus souvent cryptosymptomatique, mais peut être cause d'un syndrome entéritique [52, 53].

Toutes les données ci-dessus évoquées nous conduisent à la formulation de quelques données rationnelles de **prophylaxie** [4].

— la prophylaxie offensive, comporte un contrôle très strict des stations d'épuration, des nappes phréatiques, des systèmes de distribution des eaux de consommation, des piscines publiques, etc. Plusieurs méthodes et techniques de recherche et numération des ookystes sont possibles, notamment en ce qui concerne les réseaux de fourniture d'eau potable, la méthode de séparation immunomagnétique, qui permet la concentration simultanée des ookystes de *Cryptosporidium* et de *Giardia lamblia* et, associée à l'immunofluorescence directe (anticorps monoclonaux), permet l'identification des parasites. L'AFNOR (2001) a précisé les modalités d'exécution de ces manipulations. Cependant, l'inactivation des ookystes, n'est pas toujours fiable, car ces éléments sont très résistants aux agents de destruction, physiques et chimiques, utilisés pour l'assainissement et, en raison de leur petite taille, ils ne sont pas toujours arrêtés par les filtres des stations de traitement.

4. Nous ne faisons qu'ébaucher les mesures de prophylaxie, qui ne sont qu'un appendice de la présente revue ; ces mesures sont exposées en détail dans une autre publication [54].

L'évitement de l'infection nosocomiale exige la désinfection par la chaleur ou par les radicaux oxygénés libres [5] des matériels exposés à la souillure ;

— mais c'est sur une prophylaxie défensive qu'il faut insister. Il importe que les personnes sensibles ne s'exposent pas aux risques de contamination : éviter la consommation de végétaux crus, de fruits poussant au ras du sol, d'eau de puits ou d'eau sauvage non stérilisée par la chaleur et même, parfois, en périodes d'inondation, d'eau du robinet (qu'il faudra assainir par ébullition) ; éviter les baignades dans les eaux de surface et même dans les piscines collectives. L'AFNOR (2001, *in* réf. 54) va jusqu'à recommander aux techniciens de laboratoire de grandes précautions, lors de l'analyse des eaux, voire de s'abstenir de procéder à ces analyses. Dans les hôpitaux, outre les précautions classiques pour éviter les risques liés au péril fécal, il faut tenir compte des recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (Circulaires n° 97/413 du 30 mai 1997 et n° 97/655, du 30 septembre 1997) et ne fournir aux malades immunodéprimés que de l'eau convenablement filtrée ou des eaux minérales provenant de sources agréées.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Nime F.A., Burek J.D., Page D.L. et *al.* — Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium. Gastroenterology*, 1976, *70,* 592-598.

[2] Meisel J.L., Perera D.L., Meligro C. et *al.* — Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosupressed patient. *Gastroenterology,* 1976, *70,* 1156-1160.

[3] Guerrant R.L. — Cryptosporidiosis : an emerging highly infectious threat. *Emerging Infectious Disease,* 1997, *3,* 51-55.

[4] Mac Kenzie XW.R., Neil M.D., Hoxie J. et *al.* — A massive potbreak of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New Engl. J. Med.,* 1994, *331,* 161-167.

[5] Leger L.— *Caryospora simplex*, coccidie monosporée et la classification des coccidies. *Arch. Protistenk*., 1911, *22,* 71.

[6] Poche F. — Das system der Protozoa. *Arch. Protistenk,* 1913, *30,* 125.

[7] O'donoghue P.J. — *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.*, 1995, *25,* 139-195.

[8] Lindsay D.S., Upton S.J., Owen D.S. — *Cryptosporidium andersoni,* n. sp. from cattle *Bos taurus. J. Eukaryot. Microbiol*., 2000, *47,* 91-95.

[9] Fayer R., Trout J.M., Xiao L. — *Cryptosporidiulm canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.*, 2001, *87,* 1415-1422.

[10] Morgan U.M., Xiao L., Monis P. — *Cryptosporidium* sp. in domestic dog, the « dog » genotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, *66,* 2220-2223.

[11] Xiao L.H. et *al*. — Quantification of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol*., 1993, *31*, 2994-2298.

5. Ces radicaux libres sont produits par l'ionisation de l'eau oxygénée, sous vide, dans une chambre à plasma.

[12] Smith H.V., Rose J.B. — Waterborne cryptosporidiosis. *Parasitology to day*, 1990, *6,* 8.

[13] Badenoch J. — *Cryptosporidium*, a waterborne hazard. *Letter in Appl. /Microbiol.,* 1999, *11,* 269-270.

[14] Casemore D.P. — The epidemiology of human cryptosporidiosis and the water route of infection. *Water Science Tech.,* 1991, *24,* 157-164.

[15] Tzipori S. et *al*. — Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev*., 1983, *47*, 84-96.

[16] Fayer R., Trout J., Nerad D. — Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 1996, *43,* 64.S

[17] Fayer R. et *al*. — Effect of low temperature on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, *62,* 1431-1433.

[18] Robertson L.J. et *al*. — Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, *58,* 3494-3500.

[19] Madore M.S. et *al*. — Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J. Parasitol.*, 1987, *73,* 702-705.

[20] Fayer R. — Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in sea water and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.,* 1998, *64,* 1070-1074.

[21] Jenkins M.B. — Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.,* 1998, *64,* 784-790.

[22] Ruxton G.D. — Mahematical modelling of ammonia volatilization from slurry and its effect on *Cryptosporidium parvum* viability. *J. Agric. Sc.,* 1995, *124,* 55-57.

[23] Prokopic J. — Cryptosporidiosis, a new zoonosis. *Med. Parasitol.,* 1983, *5,* 50-52.

[24] Graczyk T.K. et *al*. — Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Appl. Environ. Microbiol.,* 1996, *62,* 3234-3237.

[25] Ortega Y.R. et *al*. — Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovin and human origin. *Protozool.,* 1991, *38,* 40S-41.S

[26] Morgan U.M., Sargent K.D., Deplazes P. et *al*. — Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*, 1998, *117,* 31-37.

[27] Morgan U.M. et *al.* — Variation in *Cryptosporidium* : towards a revision of the genus. *Int. J. Parasitol.*, 1999, *29,* 1733-1751.

[28] Widmer G. et *al.* — A strudy of *Cryptosporidium parvum* genotypes and population structure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 1998, *93,* 685-686.

[29] Hill B.D., Fraser I.R. — *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). *Austral. Vet. Journal,* 1999, *75*, 670-671.

[30] Morgan U.M., Xiao L. — Detection of *Cryptosporidium parvum* human genotype in a dgong (*Dugong dugon*). *J. Parasitol.*, 2000, *86,* 1352-1354.

[31] Caccio S., Homan N.W., Camilli R. — A microsatellte marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum. Parasitology*, 2000, *120,* 237-244.

[32] Pozio E. et *al*. — Cryptosporidium : different behaviour in calves isolates of human origin. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*., 1992, *86,* 63-638.

[33] Slifko T., Huffman D.E., Rose J.B. et *al* — *Cryptosporidium* infectivity : current status, issues, and future prospects for the water industry, IWA Health-Related Water Microbiology Symposiulm, Paris, 2000.

[34] Juranek D.D. — Cryptosporidiosis sources of infection and guidelines for prevention. *Clin. Inf. Dis*., 1995, *21* (supplt), S.57-S.61

[35] Rose J.B. — Environmental ecolgy of *Cryptrosporidium* and public health implications. *Annu. Rev. Public Health,* 1997, *8,* 135-161.

[36] Anderdson B.C. — Pattern shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.,* 1981, *178,* 982-984.

[37] Xiao L., Bern C., Limon J. — Identification of five types of *Cryptosporidiulm* parasites in children in Lima, Peru. *J. Inf. Dis.*, 2001, *183,* 492-497.

[38] Noordeen F., Horzdagoda N.U., Faizal A.C. — Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. *Vet. Parasitol.*, 2002, *103,* 217-225.

[39] Harp J.A., Goff J.P. — Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum. J. Parasitol.*, 1995, *81,* 54-57.

[40] Xiao L., Morgan U.M., Fayer R. et *al.* — *Cryptosporidium* systematics and implication for public health. *Parasitology today,* 2000, *16,* 287-292.

[41] Poulton M. et *al.* — Thames water experiences with *Cryptosporidium. Water Sc. Techn.,* 1991, *4,* 21-26.

[42] Ellis J. et *al.* — Fate of pathogens in soils receiving animal wastes. *Trans. Am. Soc. Agric.,* 1999, *14,* 501-504.

[43] Mawsdley J.L. et *al.* — Pathogens in livestock wastes, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Appl. Soil. Ecol.*, 1995, *2,* 1-6.

[44] Xiao L., Aldersio K., Royer R. — Identification of species and sources of Crytodsporidium oocysts in storm waters with a small sdubunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, *66,* 5492-5498.

[45] Gomez-Bautista M. et *al.* — Detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts in mussdels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl. Environ. Microbiol.,* 2000, **6**6, 1866-1870

[46] Hojlyng N., Holten-Andersen W. et Jepsen — Cryptosporidiosis, a case of air-borne transmission. *Lancet*, 1987, *2*, 271-272.

[47] Fayer R., Morgan U., Upton S.J. — Epidemiology of *Cryptosporidium*, transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.*, 2000, *30,* 1305-1322.

[48] Puech M.C., McAnulty J.M., Lesjak M. et *al.* — A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales, associated with swimming at public pools. *Epidemiol. Infect, 2*001, *126,* 389 -396.

[49] Pedraza-Dias S. et *al.* — Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces : first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* « dog-type », from patients in England. *J. Med. Microbiol.*, 2001, *50,* 293-296.

[50] Hebert L. et *al.* — The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New Engl. J. Med.,* 1995, *332,* 855-859.

[51] Chalmers R., Elwin K., Thomas A.L. et *al.* — Infection with unusual types of *Cryptosporidium* is not restricted to immunocompromised patients. *J. Inf. Dis.*, 2002, *185,* 269-271.

[52] Euzéby J. — Les Risques parasitaires liés aux déjections humaines et animales, manipulées ou épandues. Romark Institute of Medical Research Tampa, Florida, USA, 307 p.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 837-850, séance du 7 mai 2002

DISCUSSION

M. Claude JAFFIOL

Pouvez-vous apporter des informations complémentaires sur l'épidémiologie, la répartition géographique de la maladie et le rôle des eaux de boisson dans la transmission de l'infection ?

La cryptosporidiose est cosmopolite, mais particulièrement fréquente dans les pays peu policés, où les règles élémentaires d'hygiène sont négligées et où on ne prend pas en considération le péril fécal ; avec l'isosporose, la giardiose, les dysenteries amibienne et bacillaires... elle est un des facteurs étiologiques du syndrome « Diarrhée des voyageurs ». Cependant, les pays développés n'en sont pas à l'abri, car l'« eau finie » des réseaux de distribution peut aussi être polluée, comme l'a montré l'anadémie de Milwaukee. Outre la contamination directe, à partir de l'Homme lui-même et des animaux, possible puisque les ookystes sont immédiatement infectants, la cryptosporidiose est surtout contractée par hydropinie. Les sujets à risque ne devraient boire que des eaux minérales provenant de forages autorisés.

M. Henri LECLERC

Cryposporidium parvum *est considéré comme un risque infectieux majeur lié aux eaux d'alimentation. Compte tenu des doses infectieuses très faibles de ce protozoaire, de sa répartition hétérogène dans les eaux d'alimentation, de sa résistance élevée au chlore et des difficultés de la détection à faible taux, ne pensez-vous pas qu'il existe assurément un risque endémique important en relation avec la consommation des eaux de distribution ?*

Ce risque est très réel et la très sévère anadémie survenue à Milwaukee après consommation d'une eau considérée comme potable, en a administré la preuve. Quant à la détection, elle est possible avec une grande précision et l'AFNOR a recommandé, dans une circulaire de 2001, l'analyse par ISM (ImmunoSéparationMagnétique) couplée à l'immunofluorescence directe utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques. Cette méthode permet l'identification, en une seule opération, de *Cryptosporidium parvum* et de *Giardia intestinalis* (=*Giardia lamblia*) .

M. Pierre AMBROISE-THOMAS

La cryptosporidiose est une des parasitoses émergentes dont on ignore les conditions d'apparition chez l'Homme. C'est une affection opportuniste dont la gravité dépend de la résistance immunitaire du sujet infesté. Comme vous le soulignez, la cryptosporidiose peut être transmise par l'eau de boisson, ce qui entraîne de très difficiles problèmes de dépistage et de désinfection. La transmission par le matériel médico-chirurgical a été soupçonnée ; elle est certainement très rare et on peut souhaiter que, étant donné son caractère exceptionnel, voire illusoire, elle ne donnera pas lieu à des contraintes réglementaires démesurées pour la stérilisation du matériel médicochirurgical, comme cela a été le cas pour le prion.

Il est certain que la contamination par hydropinie, même par consommation d' « eaux finies » est la cause majeure de l'infection. Les eaux de consommation sont généralement analysées et je viens d'évoquer l'activité de l'AFNOR. Quant à l'assainissement de l'eau,

elle est très aléatoire : les ookystes infectants peuvent traverser les filtres usuels (seule la microfiltration sur filtres de 0,25 μm est vraiment efficace) et ils ne sont pas toujours détruits par la chloration, sauf à concentration élevée (qui peut engendrer la formation de trihalométhanes et de halo-aécétonitriles, altérant les qualités organoleptiques de l'eau et pouvant la rendre toxique). L'ozonation est plus efficace et l'association ozone+chloramine exerce un effet synergique. En ce qui concerne le matériel médicochirurgical, seul celui destiné à l'exploration du duodénum devrait présenter un risque, puisque les ookystes ne peuvent s'ouvrir que dans le duodénum. La stérilisation chimique, particulièrement par le glutaraldéhyde, est inutilisable aux concentrations utilisables. La chaleur humide (30 minutes à 65° C) est efficace, comme les radicaux oxygénés libres, formés, dans une chambre à plasma, par ionisation sous vide de l'eau oxygénée.

M. Jean-Claude PETITHORY

Y a-t-il une explication au fait que les cryptosporidies ont été découvertes en 1907 et que les premiers cas de cryptosporidiose humaine n'ont été signalés qu'en 1976, soit soxante-six ans plus tard ? Quelles sont les possibilités de traitement de la cryptosporidiose ?

Si la cryptosporidiose-maladie a été identifiée si tardivement, c'est que l'infection cryptosporidienne était asymptomatique ou ne se manifestait que par un syndrome banal, jusqu'à ce que les états d'immunodépression, d'origine pathologique ou thérapeutique, en révèlent la gravité. J'ai le souvenir des récriminations des étudiants lorsque, après avoir évoqué les cryptosporidies, j'ajoutais qu'on doutait de leur pathogénicité. Les coccidioses banales, dont la gravité repose sur la pathogénicité des schizontes de deuxième génération, ne sont pas justiciables d'un traitement spécifique, lorsque le diagnostic coproscopique a été établi, puisqu'à ce stade, les éléments pathogènes ont disparu ; ces coccidioses sont auto-stérilisantes et si leur symptomatologie se prolonge, c'est un traitement symptomatique qui peut leur être opposé. Dans la cryptosporidiose, la possibilité d'une auto-infection endogène, due à l'ouverture dans l'intestin des ookystes à paroi mince et qui persiste après l'évacuation des ookystes à paroi épaisse, impose une thérapeutique spécifique. Cette thérapeutique est celle des coccidioses : sulfamides à électivité intestinale, antibiotiques (spiramycine, paromomycine), quinazolinones (halofuginone), nitazoxanide, dérivés de l'acridine, β-cyclodextrines. On a, plus récemment, vanté l'efficacité de l'ivermectine. Mais ces médications sont d'effet incertain chez les sujets immunodéprimés. On a proposé, pour diminuer la sévérité de l'inflammation, un inhibiteur des sites d'action de la substance P, dipeptide histaminogène par dégranulation des mastocytes et résultant d'interactions neuro-immunologiques : le composé LY303870, une neurokinine. Quant à la vaccination, elle est utilisée en médecine vétérinaire, chez les veaux, dans les deux jours suivant la naissance : (administration orale d'ookystes lyophilisés). Expérimentalement, on a pu vacciner la souris avec un vaccin ADN, administré par instillation nasale. Mais, à ma connaissance, l'immunisation n'a pas fait l'objet d'études chez l'Homme. En revanche, il faudrait penser à la détection des porteurs cryptosymptomatiques de cryptosporidies : coproscopie (acido-résistance des ookystes), et recherche des antigènes fécaux (chez les veaux, des IgA salivaires sont décelables à J+36).

Mme Jeanne BRUGÈRE-PICOUX

Chez les jeunes bovins, ce n'est qu'à partir des années soixante-dix qu'on a démontré que la cryptosporidiose pouvait être fréquemment à l'origine d'une entérite. Ne peut-on pas penser

qu'il en est de même chez les jeunes enfants, où la cause d'une diarrhée bénigne n'est pas systématiquement recherchée. Seules l'épidémie du Wisconsin et les diarrhées sévères observées chez les sujets immunodéprimés ont démontré l'importance de la cryptosporidiose humaine.

Les enfants de moins de cinq ans, dont le système immunitaire est encore immature, sont particulièrement exposés à la cryptosporidiose, assez sévère chez eux pour justifier la recherche du parasite.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 851-863, séance du 7 mai 2002

Résultats français de l'enzymothérapie substitutive dans la maladie de Gaucher

Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. The French study

Gérard SCHAISON *, Isabelle CAUBEL, Nadia BELMATOUG, Thierry BILLETTE de VILLEMEUR, Jean-Marie SAUDUBRAY

RÉSUMÉ

La maladie de Gaucher est une affection génétique de transmission autosomique récessive liée à un déficit partiel en β glucocérébrosidase lysosomale. Le déficit enzymatique entraîne l'accumulation de glucocérébrosides dans les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse, avec apparition d'un hypersplénisme. Les patients atteints de maladie de Gaucher ont été classés en 3 types. Le type I est le plus fréquent, les troubles neurologiques sont l'apanage des types II et III. L'enzymothérapie avec une glucocérébrosidase extraite du placenta (cérédase) ou fabriquée par recombinaison génétique (cérézyme) est active dans les types I et représente le traitement de référence administré à plusieurs milliers de malades dans le monde. L'enzymothérapie permet d'éviter la transplantation médullaire et a pratiquement éliminé la nécessité de la splénectomie. Nous rapportons ici les résultats de l'étude française qui intéresse 108 patients de type I, adultes et enfants. La dose initiale est de 30 à 60 U/kg administrée tous les 15 jours. La fatigue, les manifestations viscérales ou hématologiques sont très améliorées chez les patients atteints de forme grave. Les améliorations osseuses sont beaucoup plus lentes à apparaître. Chez l'enfant, les symptômes sont d'autant plus sévères que la maladie se révèle tôt, justifiant un traitement précoce avant l'apparition de dommages irréversibles. L'enzymothérapie est inefficace dans le type II. Il est possible que les dégâts neurologiques dans le type III soient améliorés par le traitement enzymatique. La maladie de Gaucher est aussi une excellente candidate pour la génothérapie.

MOTS-CLÉS : LYSOSOME. MACROPHAGE. GAUCHER, MALADIE. GLUCOSYLCÉRAMIDASE, usage thérapeutique.

* Service de Pédiatrie à Orientation hématologique — Hôpital Saint Louis — 1, avenue Claude Vellefaux — 75475 Paris cedex 10.

Tirés-à-part : Professeur Gérard SCHAISON, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 20 mars 2002, accepté le 8 avril 2002.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 851-863, séance du 7 mai 2002

SUMMARY

Gaucher disease is an inborn recessive autosomal disease due to a partial deficiency of the lysosomal enzyme β glucocerebrosidase. The deficient activity leads to accumulation of the lipid glucocerebroside in the liver, the spleen and bone marrow with concomitant anemia and thrombocytopenia. Patients with Gaucher disease have been classified in three types : type I is the more common, neurological manifestations occur in types II and III. Enzyme replacement therapy (ERT) with modified placental human glucocerebrosidase (ceredase) or recombinant glucocerebrosidase (cerezyme) is effective in most type I Gaucher disease and has become the current standard care administered to thousand of patients worldwide. ERT has obviated the need for bone marrow transplantation and virtually eliminated the need for splenectomy. We report here the French study including adults and children. ERT of 30 to 60 U/K every two weeks as starting dose was administrated to 108 patients with severe type I Gaucher disease. ERT fully reverse many of the manifestations of the disease. ERT regimen alleviated fatigue, and hematological and visceral signs and symptoms in nearly all severely-ill patients. Skeletal responses to treatment develop much more slowly than hematological or visceral responses. Studies in pediatrics show that the disease is more severe in children. These children should be treated early in the course of their disease to avoid irreparable damage. Hematological manifestation in type II cannot be reversed with enzyme replacement. In type III treatment can rarely reverse neurological deficit. Gaucher disease is also an excellent candidate for gene therapy.

KEY-WORDS (Index Medicus) : LYSOSOMES. MACROPHAGES. GAUCHER'S DISEASE. GLUCOSYLCERAMIDASE, therapeutic use.

INTRODUCTION

En 1882, un étudiant en médecine, Philippe-Charles-Ernest Gaucher décrivit, dans sa thèse, l'observation d'une femme de 32 ans présentant une très grosse rate, qu'il pensait être un épithélioma primitif de la rate.

En 1934, le chimiste français E. Aghion précise la composition du lipide accumulé : le glucocérébroside (glucosyl céramide). Le glucocérébroside s'accumule dans de nombreux organes, et la surcharge est responsable des manifestations qui prédominent au niveau du foie, de la rate, de la moelle osseuse et de l'os. Le glucosyl céramide est un lipide complexe, constituant important de la membrane du globule rouge et des leucocytes. Les nombreuses perturbations biologiques sont la conséquence de l'infiltration viscérale, de l'atteinte du macrophage, de l'atteinte lysosomale, de la synthèse et de la libération locorégionale ou générale de cytokines.

En 1965, R. Brady et coll. montrèrent que la surcharge est liée à un défaut catabolique, par déficit en β glucosidase acide intralysosomale. Cette glucocérébrosidase permet le catabolisme du glucosyl céramide en céramide et sucre. L'action nécessite la présence d'une protéine activatrice, la saposine C. La maladie de Gaucher est un modèle d'affection liée à une anomalie d'un seul gène et représente la plus fréquente des maladies de surcharge.

Le gène de la glucocérébrosidase humaine a été localisé sur le chromosome 1 au locus q21 ; il a été cloné en 1985 [22]. Il est constitué de 11 exons. Plus de 150 mutations distinctes du gène ont été identifiées, mais un petit nombre seulement survient avec une fréquence notable [18]. Le type de la mutation permet, dans une certaine mesure, de prévoir la gravité [26]. Le diagnostic repose sur le dosage de l'activité de la glucocérébrosidase leucocytaire et renseigne dans 100 % des cas, sans faux-négatif [8]. Le diagnostic anténatal de la maladie est possible dans les cellules amniocytaires, mais la détection des hétérozygotes est impossible.

Un traitement de remplacement a été institué en 1991 avec une glucocérébrosidase, d'abord extraite du placenta puis synthétisée par la technique de l'ADN recombinant. Ainsi, une centaine d'années après la description de la maladie, une fois connu le déficit enzymatique et le clonage du gène, un traitement de remplacement a pu être proposé aux malades.

La maladie se rencontre dans toutes les populations, mais prédomine dans certaines ethnies. La prévalence est estimée à 1/100 000 naissances par an et 1/850 dans la population juive. Le nombre de patients, en France, est d'environ 400. La maladie a été classifiée en 3 types en fonction de la présence et de la sévérité des signes neurologiques [3] :

- Le type I, forme non neuropathique (dite forme adulte) est la présentation la plus fréquente (99 % des cas), et son évolution est chronique. Les troubles apparaissent dans l'enfance ou l'adolescence. L'association d'une hépatosplénomégalie, d'une thrombopénie et de manifestations osseuses, fait évoquer le diagnostic. L'atteinte osseuse est une complication majeure présente dans 75 % des cas. C'est la forme qui prédomine chez les juifs ashkénazes. La mutation N 370 S correspond au type I et cette mutation exclut les formes neurologiques. Les corrélations génotype/phénotype sont imparfaites. L'expression phénotypique est variable allant de la forme du nourrisson déjà affecté à un adulte asymptomatique. La mutation N 370 S est retrouvée dans 72 % des cas survenant chez les juifs et dans 43 % des cas des non juifs.
- Le type II est la forme la plus sévère et la plus rare. Elle survient dans les premiers mois de vie et évolue vers une régression psychomotrice sévère, aboutissant à un état grabataire et décès avant l'âge de 2 ans. La mutation L 444 P est retrouvée dans 50 % des cas.
- Le type III débute comme une maladie viscérale et se complique de troubles neurologiques secondaires, aboutissant au décès entre 20 et 40 ans. Cette forme se rencontre, plus particulièrement, dans la population du nord de la Suède ou Norrbottnie, et correspond à la mutation homozygote L 444 P [3-16].

LE TRAITEMENT SYMPTOMATIQUE

Il comporte des transfusions en cas d'anémie profonde. La prise en charge de la douleur, conséquence des lésions osseuses, nécessite bien souvent une immobilisa-

tion et le recours aux antalgiques de niveau I et II, voire de niveau III en cas de douleurs rebelles.

La splénectomie était, autrefois, effectuée en cas d'hypersplénisme important, de syndrome hémorragique ou lorsque la rate, très volumineuse, était à l'origine de troubles de compression. La splénectomie était souvent suivie d'une majoration du volume hépatique, ou d'une aggravation des lésions osseuses. La splénectomie est actuellement réservée aux échecs du traitement spécifique ou aux situations d'urgence [2].

LES TRAITEMENTS PAR MODULATION DU MÉTABOLISME DU GLUCOSYL CÉRAMIDE

1. L'enzymothérapie est la supplémentation des macrophages avec la glucocérébrosidase ; elle sera développée plus loin.
2. La greffe de moelle avec un donneur HLA identique a fourni des résultats encourageants, mais est grevée d'une notable morbidité et mortalité liée à la transplantation. Elle n'est plus réservée qu'à certaines formes neurologiques. La greffe a un effet favorable chez les patients norrbottniens [15, 20].
3. L'inhibition de la synthèse du glucosyl céramide est possible en diminuant l'activité de la glucosyl céramide synthétase qui intervient dans la première étape de la glycosylation du céramide sur la voie de la synthèse des glycosphingolipides. Elle pourrait permettre une diminution de la surcharge. L'étude préliminaire avec OGT 918 (Miglustat-Vevesca) chez 28 patients ayant une maladie de Gaucher de type I, a montré une réduction notable du volume du foie et de la rate, mais de nombreux effets secondaires, dont une neuropathie périphérique et une diarrhée sévère qui nécessitent l'arrêt du traitement. Au total, l'utilisation de OGT 918 apparaît inacceptable, aussi bien en monothérapie qu'en association ou en relais de l'enzymothérapie [12].
4. La thérapie génique [3, 13] consiste à introduire le gène de la glucocérébrosidase dans des cellules CD34. La transduction des cellules hématopoïétiques avec la glucocérébrosidase cDNA a été effectuée chez un nombre restreint de patients. Les cellules transduites sont retrouvées dans le sang plus de 3 mois après la réinjection, mais la quantité de glucocérébrosidase est trop faible pour observer un effet clinique. Les perspectives d'avenir de cette méthode semblent intéressantes.

ENZYMOTHÉRAPIE [4, 5, 7, 19]

Elle a complètement modifié le traitement de la maladie de Gaucher. Les premiers essais thérapeutiques avec une glucocérébrosidase placentaire extractive ont donné des résultats inconstants, probablement en raison d'une captation importante de

l'enzyme par les hépatocytes, alors que chez les patients l'enzyme ne s'accumule pas dans ces cellules.

Il a été nécessaire d'orienter l'enzyme vers les macrophages ou le lipide s'accumule. La modification de la partie glycosylée par un mélange de trois enzymes appelées glycosidases, s'est montrée la technique la plus efficace. L'enzyme est modifiée pour exposer des résidus mannose qui se lient au récepteur mannose présent à la surface de la membrane des macrophages [4, 17].

La première préparation utilisable a été la cérédase (alglucérase), une glucocérébrosidase extraite du placenta et qui a reçu son AMM aux Etats-Unis en 1991 et en France en 1994. L'enzyme recombinante, la cérézyme (imiglucérase) a reçu son AMM, aux Etats-Unis, dans les maladies de Gaucher en 1994 et en France en 1997. Cependant, l'utilisation de cultures cellulaires dont la croissance nécessite des milieux d'origine biologique, tels le sérum de veau fœtal, impose une surveillance rigoureuse.

Cérédase et Cérézyme catalysent l'hydrolyse du glucocérébroside à l'intérieur des lysosomes des macrophages. Cérézyme est biochimiquement équivalent à la cérédase, ne différant que par un seul aminoacide, une histidine, remplacée par une arginine en position 495.

L'efficacité de l'enzyme recombinante apparaît semblable à celle de l'enzyme extractive. L'origine synthétique de l'enzyme permet d'annuler le risque théorique (mais non observé à ce jour) de transmission virale qui existe avec les produits d'origine humaine. Les résultats rapportés ici sont ceux obtenus avec l'une ou l'autre de ces enzymes.

L'utilisation est encadrée par un comité national d'évaluation du traitement de la maladie de Gaucher (CETG). Les indications sont limitées aux formes sévères de la maladie de type I. Les types II ne sont pas traités en raison de l'inefficacité de l'enzymothérapie sur l'installation rapide de troubles neurologiques. Un protocole international évalue l'efficacité du traitement dans les types III [24].

Le CETG créé, en août 1992, est un comité uniquement consultatif qui a pour buts :

- de faciliter le dialogue entre médecins, patients, autorités de santé,
- de déceler d'éventuels effets secondaires,
- d'établir des règles de surveillance,
- de regrouper les dossiers des patients,
- de justifier les coûts investis auprès des organismes de tutelle.

Le CETG doit valider la demande car, si pour certains patients l'indication est claire, à l'opposé, le traitement n'est pas immédiatement justifié lorsque la maladie est peu évolutive ou non invalidante. Pour ces patients, la poursuite de la surveillance s'impose et l'indication du traitement doit être réévaluée si la maladie s'aggrave.

Le travail présenté ici est réalisé, essentiellement, à partir des dossiers du CETG ou des dossiers des services. Le diagnostic de maladie de Gaucher doit être certain et affirmé sur le dosage de l'activité β glucosidase et/ou sur la détermination du génotype.

MATÉRIELS ET MÉTHODE [23]

Trois mille douze patients ont été traités dans le monde, dont 135 en France. Le premier malade français a été inclus le 19 décembre 1991. Seuls les patients suivis, depuis au moins 1 an, seront présentés, soit 108 dossiers dont la moitié ont un recul supérieur à 4 ans. Les patients ont été traités par cérédase, puis cérézyme à partir de 1997. En France, le schéma thérapeutique est celui décrit par Brady en 1991, soit 60 U/kg tous les 15 jours, sous forme d'une perfusion lente de 2 à 3 heures [4, 5]. Le produit se présente en ampoule de 200 et maintenant 400 unités. Environ un tiers des patients français sont traités à domicile.

La dose de 60 U/kg par quinzaine peut être réduite au bout de six mois ou un an, en cas de bonne réponse à 45 puis 30, voire 15 U/kg. Le traitement doit être poursuivi indéfiniment, l'objectif étant de maintenir le patient à la dose efficace la plus réduite, permettant de contrôler les symptômes de la maladie [9]. Dans certaines formes sans atteinte viscérale majeure, le traitement peut être débuté à 30 U/kg.

À l'opposé, dans les formes très sévères ou dans les types III, la posologie peut être augmentée à 90 ou 120 U/kg, cependant il n'y a pas d'accord international sur la posologie initiale souhaitable. On s'accorde pour traiter avec des doses plus élevées, les enfants ou les malades avec atteinte osseuse sévère.

Les caractères principaux des patients de type I sont les suivants :

- l'âge moyen à la date des premiers signes cliniques est de 17 ans. L'âge moyen au diagnostic est de 20,8 ans, l'âge moyen au début du traitement est de 31 ans et la durée moyenne du traitement au dépouillement est de 3 ans. Le génotype montre la mutation N 370 S dans la majorité des cas. Dans 30 % des cas, il existe une autre atteinte dans la fratrie. Un tiers des patients avaient été splénectomisés auparavant, mais la notion de splénectomie ne semble pas intervenir sur le résultat, aussi est il actuellement déraisonnable de splénectomiser avant de débuter l'enzymothérapie. Les principaux signes cliniques et biologiques, au moment de l'évaluation, figurent sur le Tableau I ;
- trois patients avec un type III ont été aussi traités.

Certains ont proposé un score de gravité [25]. Ce score tient compte des critères anamnestiques, des symptômes cliniques, biologiques et radiologiques. Son utilisation sert à comparer les populations à celles d'autres études. Mais ne tenant pas compte de l'intensité des signes fonctionnels, ce score a peu d'intérêt évolutif.

TABLEAU I. — Principaux signes cliniques et biologiques chez 108 patients atteints de maladie de Gaucher de type I, avant le début du traitement.

Splénomégalie	100 %
Hépatomégalie	63 %
Asthénie	69 %
Douleurs osseuses	62 %
Fracture	14 %
Ostéonécrose	23 %
Lésions osseuses radiologiques	54 %
Hémoglobine g/dl :	
□ Splénectomisés	12,4
□ Non splénectomisés	11
Leucocytes/mm^3 :	
□ Splénectomisés	13 000
□ Non splénectomisés	3 800
Plaquettes/mm^3 :	
□ Splénectomisés	217 000
□ Non splénectomisés	62 000
Anomalies du bilan hépatique	40 %
Phosphatases acides tartrates résistante > 3,3 N	90 %
Enzyme de conversion angiotensine > 3,8 N	90 %
Ferritine > 3,8 N	80 %
Chitotriosidase > 800 N	100 %

RÉSULTATS

L'asthénie diminue de moitié à 6 mois ; elle est notée absente chez 18 des 68 malades qui présentaient une asthénie modérée ou sévère. A 12 mois, elle n'est plus signalée que chez 20 % des patients, et notée très diminuée pour la moitié d'entre eux. Très rapidement, ces patients indiquent une sensation de « mieux être ». La rapide disparition de l'asthénie est la première amélioration ressentie par les malades. Dans l'ensemble, les patients ont repris une vie professionnelle quasi normale. Les douleurs abdominales présentes chez 39 % des patients ont disparu, chez la moitié d'entre eux, à 6 mois et à 12 mois, elles ne persistent que chez 24 % et de façon très modérée. Les douleurs osseuses à 6 mois sont diminuées ou absentes chez la moitié des patients qui en présentaient et s'atténuent encore à 12 mois. Le retentissement fonctionnel s'améliore parallèlement. La rate diminue de 44 % à 6 mois et de 51 % à

12 mois. La flèche hépatique mesurée est réduite de 10 % à 6 mois, de 12 % à 1 an. Ces données sont confirmées en échographie. Signalons le décès d'une patiente de 15 ans qui présentait au début une atteinte hépatique sévère, avec une évolution cirrhogène et une atteinte osseuse très importante. Malgré l'amélioration des douleurs sous traitement, l'évolution cirrhogène a entraîné, 4 ans après le début, une hypertension portale compliquée de saignements qui ont conduit à réaliser une greffe hépatique [10].

Le taux d'hémoglobine augmente de 1 g à 6 mois, de 1,5 g à 12 mois, soit un gain de 24 % en moyenne par patient. Les leucocytes des patients non splénectomisés augmentent de 23 % à 6 mois, de 30 % à 1 an. Les plaquettes s'élèvent de 61 % à 6 mois, de 88 % à 12 mois. Seuls 8 patients non splénectomisés ont encore un taux inférieur à 50 000 à 12 mois. Les phosphatases alcalines tartrates résistantes, dont le taux est à 3,3 fois la normale, diminuent nettement à 6 mois et restent stables ensuite. Le bilan des fonctions hépatiques est normalisé chez tous les patients à 1 an. Le manque de renseignement chez un nombre suffisant de malades empêche de donner des résultats statistiques valables pour le taux de chitotriosidase, d'enzyme de conversion de l'angiotensine, des immunoglobulines, de la ferritine.

L'étude radiologique de l'atteinte osseuse est difficile [14]. Aucune aggravation n'est signalée sous traitement. Pour certains malades, l'atteinte osseuse est accessible au traitement avec reconstruction osseuse après 3 ans de traitement. L'amélioration nécessite un traitement prolongé sans diminution des doses [6]. Chez l'enfant, il y a une réponse osseuse plus rapide et plus importante que chez l'adulte.

Tous ces résultats sont identiques à ceux rapportés de la littérature [1].

La maladie de Gaucher de l'enfant

Quarante-deux pour cent des patients ont moins de 15 ans au diagnostic. En fait, seuls 17 ont été inclus dans la cohorte et 8 ont moins de 12 ans. Il est clair qu'il existe une corrélation entre l'âge au diagnostic et la sévérité de la maladie. Les formes à expression pédiatrique précoce correspondent aux formes les plus sévères. Les autres sont considérées comme moins ou peu sévères, mais l'évolution naturelle des cas non traités montre une aggravation certaine. Il apparaît donc logique de débuter rapidement le traitement lorsque le diagnostic est porté avant l'âge de 5 ans, pour éviter la constitution de lésions irréversibles hépatiques ou osseuses [7]. Les formes qui ont un génotype L 444 P/L 444 P sont plus enclines à développer des troubles sévères et ceci invite, encore plus chez elles, à débuter précocement le traitement [7].

Dans l'ensemble, l'évolution sous traitement est la même que chez l'adulte, mais avec le problème d'un retard staturo-pondéral fréquent, qui peut atteindre – 2 DS. Dans la moitié des cas il y a, à 1 an, un gain statural qui va de 0,5 à 1 DS.

Pour les formes neurologiques (type III) un protocole européen en cours préconise une posologie plus élevée, avec des améliorations possibles. Deux de nos enfants

sont stables, le troisième avec anomalies neurologiques modérées, est actuellement asymptomatique avec une scolarité normale.

Arrêts thérapeutiques et effets secondaires

Dix patients ont interrompu le traitement pour des raisons variables (grossesse, amélioration très nette avec impression de guérison). Il est souvent repris ensuite. Il est à noter que 3 patientes ont présenté une grossesse. La grossesse est actuellement une contre-indication à la poursuite du traitement, l'innocuité a été observée dans les deux cas où la grossesse était initialement méconnue. Les enfants sont tous normaux.

Les effets secondaires sont peu nombreux et sans conséquence (nausées, urticaire, œdème). Seuls 2 patients ont présenté une réaction anaphylactique sévère. Il n'y a pas de différence en terme de tolérance entre cérédase et cérézyme.

Dix à 15 % des patients développent des anticorps non neutralisants, de type Ig G, contre l'enzyme dans les deux premières années de traitement [21]. La majorité de ces anticorps disparaît après plusieurs mois, alors que le traitement est poursuivi. L'apparition d'un anticorps n'entraîne pas une baisse d'activité du traitement.

Certaines lésions sont irréversibles malgré la poursuite du traitement, c'est le cas de la fibrose hépatique, de la sclérose osseuse, d'où l'intérêt de leur traitement préventif.

La splénectomie n'a plus d'intérêt, sauf en cas d'urgence thérapeutique liée à l'intensité des manifestations hémorragiques, ou secondairement devant d'exceptionnels résultats insuffisants.

CONCLUSION

La maladie de Gaucher est une maladie rare qui appartient au groupe des maladies orphelines. Le traitement substitutif par l'enzyme recombinante a transformé la vie des patients, mais au prix d'un coût annuel exorbitant (420 000 euros) pour un sujet de 65 kg). Le coût annuel ultérieur est moins important si la posologie peut être réduite. Il existe des patients dont la maladie est stable sans handicap et qui, de ce fait, ne justifient pas un traitement contraignant. Une surveillance régulière permettra de mettre secondairement en route le traitement.

Pour tous les patients adultes, le CETG suggère de mettre en route le traitement chez le sujet atteint de maladie de Gaucher, démontrée par une étude enzymatique et présentant au moins une des manifestations cliniques invalidantes : accès de douleurs osseuses ou abdominales, manifestations osseuses, grande fatigabilité, hépatosplénomégalie majeure, retard de croissance, ecchymoses fréquentes et des perturbations marquées à la formule sanguine (anémie inférieure à 8 g/dl et thrombopénie inférieure à 50 000/mm^3).

Au début, le traitement en hôpital de jour est nécessaire pour apprécier la tolérance, permettre la surveillance rapprochée, mais un des buts est le traitement bimensuel à domicile, justifié par le peu d'effets secondaires, la lourdeur de la prise en charge et par la chronicité de la maladie [25].

La maladie de Gaucher est la première des maladies orphelines pour laquelle il existe un traitement enzymatique substitutif. Son exemple permet d'envisager de traiter d'autres maladies lysosomales, pour lesquelles des traitements semblables sont en cours ou à l'étude. Cinquante-cinq patients, atteints de maladie de Fabry, sont traités depuis un an avec une galactosidase obtenue par génie génétique. Le traitement de la maladie de Hurler doit débuter en 2003, celui de la maladie de Pompe est envisagé dans des délais similaires.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tous les membres du Comité d'Évaluation et de Traitement de la maladie de Gaucher : N. Baumann, N. Belmatoug, T. Billette de Villemeur, C. Broissand, C. Carbon, P. Guibaud, J.M. Guillard, R. Herbrecht, P. Kaminski, I. Maire, L. Poenaru, G. Ponsot, J.M. Saudubray, G. Schaison, M.T. Vanier, M. Vidailhet et l'association Vaincre les Maladies Lysosomales (VML).

BIBLIOGRAPHIE

[1] Aerts J.M., Hollack C.E. — Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher disease. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 691-709.

[2] Ashkenazi A., Zaizov R., Matoth Y — Effects of splenectomy on destructive bone changes in children with chronic (type I) Gaucher disease. *Eur. Journ. Ped.,* 1986, *145,* 138-141.

[3] Baranger J.A., Rice E.O., Dunigan J. et *al.* — Gaucher disease : studies of gene transfer to haematopoietic cells. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 765-838.

[4] Barton N.W., Brady R.O., Dambosia J.M. et *al*. — Replacement therapy of inherited enzyme deficiency macrophage targeted glucocerebrosidase for Gaucher disease. *N. Engl. J. Med.*, 1991, *324,* 1464-1510.

[5] Barton N.W., Brady R.O., Dambrosia J.M. — Treatment of Gaucher disease. *N. Engl. J. Med.*, 1993, *328,* 1564-1565.

[6] Belmatoug N., Billette de Villemeur T. — Skeletal response to enzyme therapy of type I Gaucher disease. *Seminars in Hematol.*, 1995, *32*, 28-32.

[7] Beutler E. — Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 751-763.

[8] Beutler E., Grabowski G.A. — Gaucher disease *In* Scriver C.R., Beaudet A., Sly W.S., Valle D. Eds — The metabolic and molecular bases of inherited diseases. New-York : Mc Graw-Hill I., 1995, 2641-2670.

[9] Brady R.O. — Gaucher disease. Past, present and future. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *4*, 62-134.

[10] Caubel J. — La maladie de Gaucher de l'enfant. Paris : Thèse, 1999.

[11] Cox T.M. and Schofield — Gaucher disease : clinical features and natural history. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 657-689.

[12] Cox T.M., Lachman R., Hollar C et *al*. — Novel oral treatment of Gaucher disease with N. butyl deoxy nojorimycin OGT 918 to decrease susbstrate biosynthesis. *Lancet*, 2000, *355*, 1481-1485.

[13] Dunbar C.E., Kohn D.B., Schifmann R. et *al* — Retrovirus transfer the glucocerebrosidase gene into CD34 cells from patients with Gaucher disease without myeloablation. *Human Gene Ther.*, 1998, *9*, 2629-2640.

[14] Elstein D., Itzchaki M., Mankin H.J. — Skeletal involvement in Gaucher disease. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 793-816.

[15] Erikson A. — Gaucher disease. Norrbottnian type III. Neuro pediatric and neuro biological aspects of clinical patterns and treatment. *Acta Paediat. Scand.*, 1986, *326*, 42.

[16] Erikson A., Bembi B., Schifmann R. — Neuronopathy forms of Gaucher disease. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 711-723.

[17] Grabowski G.A., Barton N.W., Pastore S. et *al* — Enzyme therapy in type I Gaucher disease : comparative efficacy of mannose terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann. Intern. Med.*, 1995, *122,* 33-39.

[18] Grabowski G.A., Horowitz M. — Gaucher disease molecular genetic and enzymological aspects. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 635-656.

[19] Grabowski G.A., Nesli C.R., Wenstrup R. — Enzyme therapy for Gaucher disease. The first 5 years. *Blood Rewiews*, 1988, *12*, 115-133.

[20] Mistry P.K., Abrahamov A. — A practical approach to diagnosis and management of Gaucher disease. *Baillere's Clinical Haematology,* 1997, *10*, 817-838.

[21] Ponce E., Moskowitz J., Grabowski G. — Enzyme therapy of Gaucher disease type 1. Effect of neutralizing antibody to acid β glucosidase. *Blood,* 1997, *90,* 43-48.

[22] Sorje J., West C., Westwood B., Beutler E. — Molecular cloning and nucleotide sequence of the human cerebrosidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, *82*, 7289-7293.

[23] Stirnmann J., Belmatoug N. — La maladie de Gaucher chez l'adulte. *Rev. Med. Interne*, 2001*, 22 suppl. 3,* 374-383.

[24] Vellodi A., Bembi B., Billette de Villemeur T. et *al*. — Management of neuropathic Gaucher disease : A European consensus. *J. Inherir. Metab. Dis.*, 2001, *24*, 319-327.

[25] Zimran A., Hollak C.E.M., Abrahamov A. et *al*. — Home treatment with intravenous enzyme remplacement therapy for Gaucher disease. *Blood*, 1993, *82*, 1107-1109.

[26] Zimran A., Gross E., Beutler E — Prediction of severity of Gaucher disease by identification of mutation of DNA level. *The Lancet*, 1889, *2*, 349-352.

DISCUSSION

M. Roger NORDMANN

Pouvez-vous nous faire part des raisons pour lesquelles cette thérapie se révèle inefficace dans les types II et III. Les mécanismes en cause sont-ils différents de ceux impliqués dans

le type I ? Cette question concerne en particulier le type II, qui apparaît particulièrement sévère.

Le mécanisme des types II et III n'est pas parfaitement compris bien que le déficit en glucosyl cérébrosidase y soit certain. Dans le type II, les lésions neurologiques sont particulièrement précoces, apparaissant dans les premiers mois de la vie. Le cerveau du nourrisson est particulièrement fragile. On ne sait si la mise en route d'un traitement dès la naissance (à condition que le diagnostic ait été porté *in utero*) permettrait d'éviter les dégâts neurologiques. Dans le type III, il semble que le début du traitement, dès l'apparition des signes neurologiques, puisse stopper l'aggravation. Un des trois patients avec une atteinte neurologique minime a actuellement un développement psychomoteur et une scolarité normaux. Un protocole international, auquel la France participe, s'adresse aux maladies de Gaucher avec atteinte neurologique, sans préciser s'il s'agit d'un type II et III. La dose utilisée est plus importante : 120 U/kg toutes les deux semaines.

M. Jacques-Louis BINET

Quel est le mode de transmission de la maladie de Gaucher ? Quel est l'avenir de la thérapie génique, qui n'a pas encore donné des résultats spectaculaires mais qui, seule, permettrait d'éviter les problèmes financiers posés par le traitement enzymatique ?

La maladie de Gaucher se transmet sur le mode récessif autosomique. Les deux parents sont hétérozygotes pour la tare. La thérapie génique n'a pas encore donné de résultat satisfaisant car le taux d'enzyme est insuffisant. On sait que cette thérapeutique est possible avec survie des cellules transduites. La maladie de Gaucher de type I est sûrement un excellent modèle pour ce type de thérapeutique et on peut fonder sur cette méthode de légitimes espoirs pour remplacer le traitement enzymatique intraveineux. Cela s'avèrera sûrement réalisable avec de nouveaux vecteurs.

M. Denys PELLERIN

Je me réjouis du fait qu'il n'y a plus d'indication à la splénectomie dans la maladie de Gaucher du jeune enfant. J'en ai gardé le souvenir de l'ablation de rates énormes, dont la suppression ne suffisait pas à apporter la guérison de l'enfant et qui souvent aggravait même la situation après une brève amélioration. Le financement du traitement, si onéreux, bénéficie-t-il de la dotation spécifique aux maladies orphelines ? Compte tenu de la gravité et du coût de cette maladie le plus souvent familiale, y aurait-il place pour un diagnostic préimplantatoire ?

Vous avez parfaitement raison de souligner la gravité du geste chirurgical sur ces énormes splénomégalies et l'aggravation des lésions hépatiques et osseuses après un court répit apporté par la splénectomie. Il existe une dotation spécifique pour le financement du traitement comme cela existe pour d'autres traitements particulièrement onéreux et comme cela existera probablement pour d'autres thérapeutiques enzymatiques en cours de développement. Je ne crois pas qu'il y ait eu à ce jour un diagnostic préimplantatoire. Le diagnostic anténatal biologique est aisément réalisable par mesure de l'activité β glucosidase, acide des villosités choriales à 10-12 semaines d'aménorrhée ou des cellules amniotiques en culture vers la 16ème semaine. Le diagnostic anténatal ne permet pas de dépister les hétérozygotes.

M. Christian NEZELOF

Sait-on si cette substitution enzymatique est efficace sur les macrophages de maladie de Gaucher « maintenus in vitro *» ? Une bonne source de macrophages, révélateurs ou non d'une maladie de surcharge, est représentée par le liquide de lavage alvéolaire.*

Une étude préclinique a mis en évidence une capture spécifique à haute affinité de l'iode 125 imiglucérase par des macrophages humains en culture, mais pas des cellules endothéliales en culture.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 865-878, séance du 14 mai 2002

Le diagnostic génétique préimplantatoire : premier bilan du groupe parisien

Preimplantation Genetic Diagnosis : update

René FRYDMAN , Gérard TACHDJIAN , Nelly ACHOUR-FRYDMAN**, Pierre RAY ***, Serge ROMANA***, Samir HAMAMAH**, Sabine MARCADET-FREDET*, Violaine KERBRAT*, Renato FANCHIN*, Jacques KADOCH*, Tania ATTIE***, M. LELORC'H***, Michel VEKEMANS***, Arnold MUNNICH***

RÉSUMÉ

Le travail rapporte l'expérience parisienne du diagnostic génétique préimplantatoire (DPI). Cinquante-neuf couples ont été pris en charge de janvier 2000 à juillet 2001 au cours de 71 cycles. Les ovocytes recueillis ont été inséminés par injection intracytoplasmique de spermatozoïde et les embryons biopsiés au troisième jour de leur développement. L'analyse génétique a été effectuée le jour de la biopsie et la majorité des transferts embryonnaires ont eu lieu le quatrième jour post fécondation. Au cours des 71 cycles, 872 ovocytes ont été recueillis dont 731 étaient compatibles avec une injection intracytoplasmique de spermatozoïde. Parmi les 505 embryons obtenus, 421 ont été biopsiés et un résultat génétique a été obtenu pour 312 (74 %) d'entre eux. Cent vingt-sept embryons ont été transférés au cours de 58 transferts. Dix-huit grossesses biologiques et 12 cliniques ont été obtenues (7 uniques, 4 gémellaires et une triple). Seize enfants sont nés. Le DPI prend désormais sa place parmi les choix proposés aux couples à risque de transmission d'une maladie génétique de particulière gravité et incurable au moment du diagnostic.

Mots-clés : Biopsie. Transfert embryon. Diagnostic préimplantatoire. Fragilité chromosomique.

* Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Antoine Béclère (AP-HP), 157, rue de la Porte de Trivaux — 92141 Clamart.

** Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique à orientation Biologique et Génétique de la Reproduction, Hôpital Antoine Béclère (AP-HP), 157, rue de la Porte de Trivaux — 92141 Clamart.

*** Département de Génétique, Hôpital Necker-Enfants malades — 75743 Paris cedex 15.

Tirés-à-part : Professeur René Frydman, à l'adresse ci-dessus.

Article reçu le 26 février2002, accepté le 11 mars 2002.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 865-878, séance du 14 mai 2002

SUMMARY

To report the birth of the first fourteen infants conceived after preimplantation genetic diagnosis (PGD) in our unit. Fifty-nine couples were enrolled between January 2000 and July 2001. They had a total of 71 oocyte pick-up cycles. The collected oocytes were inseminated by intracytoplasmic sperm injection. The resulting embryos were biopsied on the third day of development and the genetic analysis was performed on the same day. Most of the embryo transfers were carried out on the fourth day. The 71 oocyte pick-up cycles yielded 872 oocytes of which 731 were suitable for intacytoplasmic sperm injection. Among the 505 embryos obtained, 421 embryos were biopsied and genetic diagnosis was performed for 312 (74 %) of these. 127 embryos were transferred during the course of 58 transfer procedures. There were 18 biochemical and 12 ongoing (7 singles, 4 twins and 1 triple) pregnancies. Sixteen infants have been born and 2 are expected. PGD has gained a place among the choices offered to couples at risk of transmission of a serious and incurable genetic disease.

KEY-WORDS (Index Medicus) : BIOPSY. EMBRYO TRANSFER. PREIMPLANTATION DIAGNOSIS. CHROMOSOME FRAGILITY.

INTRODUCTION

Le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) est une alternative au diagnostic prénatal. Il consiste à réaliser une analyse génétique sur des embryons humains obtenus par fécondation *in vitro* et à ne procéder au transfert intra-utérin que des embryons sains ou porteurs sains.

Le DPI a été possible grâce au développement des techniques de biologie moléculaire permettant une analyse génétique sur cellule unique, principalement la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et l'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes (FISH).

Si l'annonce de la première grossesse obtenue après DPI fut relatée en 1990 en Angleterre [1], en France ce n'est qu'en été 1999 que l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP) (Hôpital Necker et A. Béclère) et le Centre Hospitalo-universitaire de Schiltigheim, bientôt rejoints par l'hôpital A. de Villeneuve de Montpellier, ont été autorisés à pratiquer le DPI.

Le législateur a encadré la pratique du DPI. Cet examen s'adresse aux seuls couples qui ont une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic.

Nous rapportons ici l'expérience du groupe parisien constitué des services de Gynécologie-Obstétrique, et de Biologie de la Reproduction (A. Béclère) et du Département de Génétique (Necker) réunis au sein d'une Fédération de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP).

PATIENTS ET MÉTHODES

Recrutement des couples

De janvier 1999 à juillet 2001, nous avons reçu en consultation 230 couples.

Parmi les 230 couples venus de toutes les régions de France, 136 demandes ont été retenues après accord de l'une des deux Commissions pluridisciplinaires du diagnostic prénatal de la FAMA Necker-Béclère, dont l'avis est statutairement requis selon la législation en vigueur.

Parmi les 94 couples récusés, 14 l'ont été en raison de non éligibilité de l'indication de DPI et 80 en raison de la non faisabilité du diagnostic sur cellule unique.

Au cours de cette consultation, les taux de succès, les aléas éventuels de la fécondation *in vitro* (FIV) ainsi que du DPI ont été abordés ainsi que l'éventualité du recours au diagnostic anténatal en cas de grossesse.

En cas d'acceptation de l'indication, un bilan pré-fécondation *in vitro* (FIV) a été prescrit.

Un entretien psychologique a été systématiquement évoqué au cours de la première consultation, 86 couples y ont eu recours.

Au total, parmi les 136 couples qui ont été acceptés par l'équipe médicale, 59 ont bénéficié de janvier 2000 à juillet 2001 de 97 cycles de FIV avec DPI (26 cycles ont été annulés soit 26,8 % des cycles débutés). Soixante et onze tentatives avec ponctions ovocytaires et biopsie embryonnaire ont été réalisées dans les services de Gynécologie Obstétrique et de Biologie de la Reproduction de l'hôpital Antoine Béclère. A ces 59 couples, il faut ajouter 3 couples ayant des embryons congelés provenant d'autres centres de FIV, qui ont bénéficié à Antoine Béclère d'une biopsie embryonnaire pour DPI sur les embryons congelés. L'analyse génétique du ou des blastomères a été effectuée dans le département de génétique de l'hôpital Necker.

Caractéristiques des couples

Nous distinguerons les maladies chromosomiques et les maladies monogéniques car les populations concernées et les techniques proposées ne sont pas identiques.

La répartition des affections pour lesquelles un DPI a été réalisé est indiquée dans les tableaux 1 et 2. Vingt-cinq couples (groupe 1) présentaient un risque de déséquilibre chromosomique (Tableau 1) et 34 couples (groupe 2) présentaient un risque de transmission d'une maladie monogénique (Tableau 2). Concernant le groupe 1, les porteurs de ces translocations sont répartis en 64 % d'hommes et 36 % de femmes.

Au sein du groupe 2, il existe une répartition équivalente des maladies géniques autosomiques ou liées à l'X. Parmi les maladies autosomiques, on note la place prépondérante de la mucoviscidose.

TABLEAU 1. — Désordres chromosomiques ayant fait l'objet d'une stimulation et d'une ponction en vue d'un DPI (groupe 1)

	Couples		
	Femmes porteuses	Hommes porteurs	Total
• **Anomalies de structure**			
Translocations Robertsoniennes			
der (13 ; 14) (q10 ; q10)	4	7	11
der (13 ; 22) (q10 ; q10)	1	0	1
der (14 ; 21) (q10 ; q10)	1	4	5
Translocations Réciproques			
t(13 ; 14) (q34 ; q13)	1	0	1
t(2 ; 22) (q24 ; q11)	0	1	1
t(8 ; 14) (q22 ; q23)	0	1	1
t(11 ; 22) (q25 ; q12)	1	0	1
t(14 ; 18) (q21 ; q12)	0	1	1
t(18 ; 21) (q21 ; q22)	0	1	1
t(5 ; 6) (q36 ; q24)	1	0	1
• **Anomalies de nombre**			
Trisomie 8 en mosaïque (50 %)	0	1	1
Total	9	16	25

Les principaux antécédents obstétricaux sont caractérisés, pour le groupe 1, par la présence d'une infertilité primaire ou secondaire associée et une fréquence élevée de fausses couches spontanées (42 pour 25 couples *vs* 12 pour 34 couples dans le groupe 2). A l'inverse, le nombre d'interruptions médicales de grossesse (IMG) est beaucoup plus élevé dans le groupe 2 (24 sur 27 IMG totalisées dans les deux groupes).

Diagnostic génétique préimplantatoire

Les ovocytes recueillis ont été inséminés par injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Au troisième jour de développement la biopsie embryonnaire a été réalisée, sous microscope inversé équipé de micromanipulateurs. A ce stade les embryons possèdent entre 6 et 8 cellules. Un orifice a été pratiqué dans la zone pellucide à l'aide d'un faisceau laser (Laser Fertilase, Société MTG, Altdorf, Allemagne). Une ou deux cellules ont ensuite été prélevées par aspiration dans une micropipette de 35 μm de diamètre interne. L'embryon a été alors replacé dans un milieu de culture jusqu'au moment du transfert [2].

TABLEAU 2. — Affections géniques ayant fait l'objet d'une stimulation et d'une ponction en vue d'un DPI (groupe 2)

	Couples
• **Autosomiques récessives**	
Amyotrophie spinale	5
Mucoviscidose	9*
• **Autosomiques dominantes**	
Myopathie de Steinert	3
• **Liées à l'X**	
Retard mental lié à l'X	3
Myopathie de Duchenne	6
Déficit en Ornithine Carbamyl Transferase	1
Dysplasie spondylo-épiphysaire tardive	1
Syndrome de Vactrel	1
Maladie de Pelizaeus Merzbacher	1
Myopathie de Becker	1
Maladie de Menkes	1
Hémophilie A	1
• **Pathologie mixte**	
Mucoviscidose et retard mental lié à l'X	1
Total	34

(*) 4 patients étaient porteurs d'une agénésie bilatérale des canaux déférents

Dans le cas où le diagnostic utilisait l'amplification d'une séquence d'ADN par réaction en chaîne PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la cellule a été placée dans un tube contenant un tampon de lyse permettant d'extraire l'ADN du noyau sous contrôle visuel sous loupe binoculaire. En revanche, lorsque le diagnostic utilisait l'hybridation *in situ* avec sonde d'ADN fluorescente ou FISH, la cellule a été placée sur une lame de verre contenant de l'acide chlorhydrique permettant de libérer le noyau à analyser [3, 4] (groupe 1).

La technique de FISH est utilisée pour les indications chromosomiques. Les sondes d'ADN utilisées sont spécifiques de la région du chromosome impliqué dans un remaniement de structure [5, 6] ou spécifiques des chromosomes X et Y lorsqu'il s'agit d'un diagnostic de sexe et dans certaines maladies liées à l'X.

Pour les autres affections géniques, la méthode utilisée est la PCR [7].

Transfert embryonnaire

Le résultat de l'analyse génétique a été rendu le soir même ou le lendemain de la biopsie, les transferts embryonnaires ont eu lieu dans la majorité des cas le quatrième jour de développement.

Les embryons sains ou porteurs sains surnuméraires ont été laissés en culture jusqu'au sixième jour et congelés s'ils avaient atteint le stade de blastocyste. Pour trois couples le DPI a été réalisé à partir d'embryons congelés obtenus dans d'autres centres au cours de FIV précédentes lorsque le DPI n'était pas encore autorisé.

RÉSULTATS

Les patientes étaient âgées de 32,7 ans en moyenne (24 à 40 ans).

De janvier 2000 à juillet 2001, 71 cycles ayant abouti à une ponction sont analysés. Une moyenne de 12,3 ovocytes a été recueillie, dont 84 % ont pu être inséminés. Quatre cent vingt et un embryons ont pu être biopsiés. Un résultat génétique a été obtenu pour 312 d'entre eux (74 %). Parmi ceux-ci 127 ont été transférés au cours de 58 transferts (soit une moyenne de 2,2 embryons par transfert). Treize transferts n'ont pas été réalisés car l'ensemble des embryons était atteint.

Le Tableau 3 indique le nombre de grossesses évolutives par ponction et par transfert, ainsi que les naissances obtenues après DPI. Ces résultats incluent les transferts d'embryons décongelés ayant bénéficié d'un DPI.

Au total, 61 transferts ont été effectués, 20 dosages positifs de l'hCG ont été notés (33 %), parmi lesquels 7 sont restés biochimiques (>100 et <1000 UI hCG), une fausse couche est survenue à 10 semaines d'aménorrhée, 12 grossesses ont été évolutives (19,7 %, avec 16 enfants attendus (26,2 %) dont 14 sont déjà nés.

Parmi les 132 embryons frais et décongelés transférés, 19 activités cardiaques ont été observées soit un taux d'implantation embryonnaire de 14,4 % et de 31,1 % par transfert.

Concernant la fausse couche qui s'est produite à 10 semaines d'aménorrhée : il s'agit d'un DPI pratiqué pour une translocation (13 ; 14) paternelle. Le produit de fausse couche a pu être récupéré, l'analyse chromosomique faite dans de bonnes conditions techniques n'a pas retrouvé d'aneuploïdie.

Parmi les 12 grossesses évolutives ayant dépassé 12 semaines d'aménorrhée, 7 grossesses étaient simples, 4 grossesses étaient gémellaires mais une s'est réduite spontanément en grossesse simple et une grossesse triple a été réduite médicalement en grossesse gémellaire au terme de 11 semaines d'aménorrhée.

C'est ainsi que nous pouvons à ce jour rapporter les 16 premières naissances issues de 4 grossesses gémellaires (dont la grossesse triple réduite) et de 8 grossesses simples.

TABLEAU 3. — Grossesses évolutives et naissance après DPI (janvier 2000 - juillet 2001)

Couples	Chromosomique (n=25)	Génique (n=34)	Total (n=59)	DPI après décongélation (n=3)	Total (n=62)
Ponction (n)	30	41	71	-	-
Cycle de transfert	22	36	58	3	61
hCG+	5	13	18	2	20
Activité cardiaque+	8*	10**	18	1	19
Grossesses évolutives > 12 SA	4	7	11	1	12
dont simple	2	5	7	1	8
dont gémellaire	2	2	4		4
Enfants nés	6	9	15	1	16

(*) Une fausse couche à 10 SA, une réduction médicale de triple à gémellaire
(**) Une réduction embryonnaire spontanée d'une grossesse gémellaire

Un prélèvement de sang de cordon a été effectué systématiquement à la naissance afin de confirmer le DPI. Aucune erreur de diagnostic n'a été notée. Tous les enfants ont été examinés par un pédiatre à la naissance. Une étude de suivi à 1 an et 3 ans est actuellement en place.

DISCUSSION

La liste des maladies génétiques ayant pu bénéficier d'un DPI a été récemment mise à jour [8].

Compte tenu des moyens limités dont nous disposons, nous avons concentré nos efforts de mise au point sur des mutations assez fréquentes, touchant un nombre important de patients (mucoviscidose, amyotrophie spinale, maladie de Steinert). Au sein du Groupe d'Etude et de Travail du DPI en France (GET-DPI) nous avons proposé une organisation en fonction des spécificités de chaque centre avec en particulier, pour le groupe parisien, la mise au point du diagnostic de la drépanocytose, du déficit en Ornithine Carbamyl Transférase (qui a abouti à la première naissance d'un enfant né en France après DPI [9]) et du syndrome de l'X fragile, le groupe strasbourgeois développant également la prise en charge de l'X fragile, de la maladie de Huntington et de l'achondroplasie. Le groupe parisien a par ailleurs initié en France la prise en charge des risques chromosomiques (25 cas).

La population des couples porteurs d'anomalies chromosomiques se singularise par l'existence fréquente d'une infertilité qui peut être notre biais de recrutement de cette population.

En effet au cours d'un bilan d'infertilité masculine relevant de l'injection intracytoplasmique (ICSI), le caryotype peut révéler une anomalie chromosomique. La fréquence des remaniements chromosomiques étant de 2 à 6 % dans la population infertile [10]. Cependant, comme l'ont montré certains auteurs [11, 12], dans un pourcentage de cas à peu près équivalent, la conjointe de l'homme infertile peut elle-même être porteuse d'un remaniement chromosomique. Ce qui rend absolument nécessaire la réalisation du caryotype du couple avant toute ICSI, afin de pouvoir bénéficier d'un conseil génétique qui peut aboutir soit à une demande de DPI soit à une prise en charge en diagnostic anténatal.

La population des couples porteurs d'un risque génique est dans notre expérience très différente. Ce ne sont pas des couples infertiles mais au contraire des couples fertiles éprouvés par la maladie de leurs enfants (1 ou 2) à charge ou ayant subi parfois plusieurs interruptions médicales de grossesse (IMG). S'il est vrai qu'une IMG est toujours traumatisante, nous avons été frappés, et c'est sans doute le biais du recrutement de la consultation de DPI, par le vécu difficile des couples qui se tournent vers le DPI en raison d'une prise en charge jugée comme insuffisante du diagnostic anténatal.

Parmi les 215 accouchements rapportés par le Consortium Européen du DPI, le taux et le type de complications gravidiques relevés après l'analyse de blastomères [8, 13, 14] apparaissent pour l'instant comparables aux données habituelles de la littérature, de même que les naissances après analyse du 1er globule polaire [15].

Ce premier bilan montre que la pratique du DPI s'est développée relativement rapidement dans notre groupe et qu'après 18 mois de fonctionnement, nous avons pu, en bénéficiant de l'expérience des plus anciens, offrir des résultats comparables aux données du Consortium Européen qui réunit 25 centres pour l'année 2001.

Finalement, si le DPI a permis la naissance d'enfants indemnes de la maladie recherchée, il a permis, en récusant le transfert dans 13 cas où il n'y avait que des embryons atteints disponibles, d'éviter la survenue d'enfants atteints de maladies graves et incurables, ce qui est également l'objectif poursuivi. Dans l'analyse globale du bilan du DPI, ce point (absence de transfert) mérite d'être noté comme un élément positif.

Cependant, ce bilan positif doit être tempéré par le fait qu'un grand nombre de maladies orphelines ne peuvent être prises en charge rapidement du fait du manque de moyens pour effectuer les mises au point diagnostiques préalables.

De nouvelles perspectives diagnostiques s'ouvrent, telles les maladies mitochondriales, mais il faut noter l'apparition de deux indications qui existent à l'échelle européenne et ne sont pas autorisées en France : le DPI pour risque d'aneuploïdie et le DPI pour choix de sexe.

Pour le premier cas, il s'agit soit de patients en cours de FIV âgés de plus de 38 ans (n=101), soit de patients jeunes ayant eu déjà 3 échecs de FIV (n=45) ou plusieurs fausses couches (n=116) à qui l'on a proposé une FIV afin de diagnostiquer les

embryons aneuploïdes. Au total pour 2001, 331 cycles ont été réalisés en Europe par 11 centres pour cette indication. Cette indication vise à diminuer le taux de fausses couches spontanées [16].

Soixante-dix-huit couples ont été traités pour choix du sexe par 3 centres européens. Cette indication a soulevé de la part de notre groupe une réprobation [17] considérant que le DPI, comme le diagnostic anténatal (DAN), ne doivent pas être effectués à des fins de convenances hors de tout risque de pathologie médicale.

Ce dernier point pose de façon cruciale la cohérence des politiques de santé à l'échelle européenne.

Une troisième indication mérite réflexion c'est celle d'une demande de DPI pour éviter une maladie génétique (maladie de Franconi) associée à une identification du groupe HLA en vue de pouvoir greffer des cellules souches hématopoïétiques compatibles à un aîné (sans donneur compatible).

Le Comité National d'Ethique a été saisi de ces demandes aujourd'hui récusées en France et n'a pas encore donné de réponse.

Enfin, il ne faut pas perdre de vue la difficulté du diagnostic sur une cellule et le Consortium Européen relève 8 erreurs de diagnostic, dont 2 en postnatal. Afin de diminuer le risque d'erreur, de nouvelles attitudes peuvent être préconisées : biopsie sur deux cellules prélevées plutôt qu'une, et surtout développement de nouvelles techniques telles que la PCR multiplex, la PCR fluorescente [18], linkage analysis ou encore le développement de l'hybridation génomique comparative (CGH) [19].

Le DPI prend place dans les possibilités offertes aux couples à risque de transmission d'une maladie génétique. La lourdeur de la procédure, les incertitudes du résultat doivent toujours être mises en balance avec les alternatives, en particulier un diagnostic prénatal bien conduit.

Il n'en reste pas moins qu'une page est tournée, l'embryon humain « malade » d'invisible et d'intouchable qu'il était devient sujet d'étude et peut être demain deviendra un sujet qui bénéficiera d'un traitement.

REMERCIEMENTS

Ils vont à l'ensemble des médecins, ingénieurs, sages-femmes, techniciennes, infirmières, secrétaires, qui constituent les équipes de la F.A.M.A Necker-Béclère. Ils ont, par leurs activités, permis la réalisation du DPI.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Handyside A., Lesko J., Tarin J., Winston R., Hugues M. — Birth of a normal girl after *in vitro* fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1992, *327,* 905-9.

[2] Tarin J.J., Handyside A.H. — Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril,* 1993, *59*, 943-952.

[3] Griffin D.K., Handyside A.H., Penketh R.J., Winston R.M., Delhanty J.D. — Fluorescent in-situ hybridation to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod*, 1991*, 6,* 101-105.

[4] Griffin D.K, Handyside A.H., Harpert J.C., Wilton L.J., Atkinson G., Soussis I., Wells D., Kontogianni E., Tarin J., Geber S. et *al.* — Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent *in situ* hybridization. *J Assist Reprod Genet,* 1994, *11*, 132-143.

[5] Knight S.J., Lese C.M., Precht K.S. et *al.* — An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet,* 2000*, 67,* 320-332.

[6] Scriven P.N., Handyside A.H., Ogilvie C.M. — Chromosome translocations : segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn,* 1998, *18,* 1437-1449.

[7] Liu J., Lissens W., Silber S.J., Devroey P., Libaerts I., Van Steirthegem A. — Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis » F508 mutation by polymerase chain reaction. *JAMA,* 1994, *272,* 1858-1860.

[8] Eshre Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium — data collection III. *Hum Reprod,* 2002, *1*, 233-246.

[9] Ray P., Gigarel N., Bonnefont J.P., Attié T., Hamamah S., Frydman N., Vekemans M., Frydman R., Munnich A. — First specific PGD for ornithine transcarbanylase deficiency. *Pren Diagn*, 2000*, 20,* 1048-1054.

[10] Meschede D., Lemcke B., Exeler J.R., De Geyter C., Behre H.M., Nieschlag E., Horst J. — Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection-prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod,* 1998, *13(3*), 576-582.

[11] Van der Ven K., Peschka B., Montag M., Lange R., Schwanitz G., Van der Ven H.H. — Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998*, 13(1),* 48-54.

[12] Gekas J., Thepot F., Turleau C., Siffroi J.P., Dadoune J.P., Briault S., Rio M., Bourouillou G., Carre-Pigeon F., Wasels R., Benzacken B. — Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI : an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod,* 2001, *16(1),* 82-90.

[13] Eshre Preimplantation Genetic Diagnosis (pgd) Consortium — Preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod,* 1999, *14(12),* 3138-3148.

[14] Eshre Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium - data collection II (May 2000). *Hum Reprod,* 2000*, 15*, 2673-2683.

[15] Strom C.M., Strom S., Levine E., Ginsberg N., Barton J., Verlinsky Y. — Obstetric outcomes in 102 pregnancies after preimplantation genetic diagnosis. *Am J Obstet Gynecol,* 2000, *182(6),* 1629-1632.

[16] Gianarolli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. — The *in vivo* and *in vitro* efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, *183*, supl 1, S13-S18.

[17] Ray P.F., Munnich A., Nisand I., Frydman R., Vekemans M., Viville S. — The place of « social sexing » in medicine and science. *Hum Reprod*, 2002*, 17,* 248-249.

[18] Findlay I., Matthews P.L., Mulcahy B.K., Mitchelson K. — PCR to diagnose multiple defects from single cells : implications for PGD. *Mol Cell Endocrinol,* 2001, *183,* suppl 1, S5-S12.

[19] Wilton L., Williamson R., McBain J., Voullaire L. — Use of comparative genomic hybridization to Karyotype embryos prior to implantation : the achievement of a successful pregnancy. *Hum Reprod*, 2001, *16*, abstract book 1, 33.

DISCUSSION

M. Denys PELLERIN

Vous avez bien souligné les exigences, le coût matériel et psychologique du DPI, ses résultats limités, et bien indiqué que le DPI ne saurait se substituer au diagnostic prénatal. Cependant, je m'inquiète du risque de « banalisation » que prônent certains groupes d'opinion, sans doute mal informés, qui revendiquent l'utilisation du DPI bien au-delà de son cadre limité, dans les conditions strictes de la loi de 1994 que vous avez rappelée. Les demandes portent actuellement sur des indications bien particulières du DPI : diagnostic prédictif de la maladie de Huntington qui pose tout le problème du refus d'une situation tardive révélée 20, 30 ou 40 ans avant qu'elle se manifeste. Ce qui peut être admissible pour la maladie de Huntington le serait-il dans tous les diagnostics prédictifs aux conséquences individuelles ou sociales. J'évoque ici les 135 patients souffrant de la maladie de Gaucher, dont il nous a été parlé récemment ici-même, dont le pronostic est si sévère, mais aussi le coût du traitement si élevé (425 000 euros par patient et par an) ; utilisation du DPI pour permettre le choix – le tri – d'un embryon HLA compatible pour servir au traitement immédiat – ou futur – d'un enfant déjà né atteint de maladie de Fanconi. Cette utilisation du DPI pour obtenir un « enfant remède », comporte le rejet des autres embryons sains au motif qu'ils ne pourraient être utilisés pour soigner l'enfant malade. J'aimerais que vous nous donniez votre avis sur ces aspects et la dérive possible du DPI ?

Je ne pense pas que l'on puisse parler de banalisation pour une méthode qui reste un parcours difficile, et aléatoire quant à ses résultats. Par ailleurs, l'encadrement législatif est une garantie supplémentaire de ces indications, mais il est vrai qu'il peut y avoir des extensions de celle-ci. Mais ce n'est pas parce qu'il y a des extensions que celles-ci ne peuvent pas être encadrées. Vous évoquez le problème de la maladie de Huntington qui se révèle 20, 30 ou 40 ans plus tard, on peut comprendre les jeunes femmes qui ont vu mourir leur père, leur oncle, et qui se savent porteuses du risque de cette transmission, et qui ne veulent pas vivre avec cette épée de Damoclès pour leur enfant. La médecine est souvent faite au cas par cas, et se doit d'apprécier dans la sérénité l'ampleur d'une telle souffrance. En ce qui concerne le tri d'embryons HLA compatibles, je distinguerai le cas où il existe une maladie génétique transmissible de celle où il n'en existe pas. Pour cette dernière situation (enfant présentant une hémopathie non génétique et une volonté des parents de garder des cellules souches au cas où) je suis très dubitatif sur la légitimité de son indication. En revanche, lorsqu'il y a une maladie génétique comme la maladie de Fanconi, il est vrai que d'ajouter une recherche supplémentaire de compatibilité tissulaire au DPI nécessaire pour éviter la maladie me paraît plus compréhensible, car il faut là encore entendre les femmes qui demandent comment accueilleront-elles un enfant issu d'un DPI né HLA non compatible, quel regard lui porteront-elles alors que le frère la sœur s'éteindra faute de cellules compatibles. En fait, loin d'une banalisation, nous serons amenés sans doute à répondre à des demandes extrêmement précises qui concernent des cas quantitativement faibles, mais dont la charge émotive et la douleur sont intenses.

M. Roger HENRION

Je suis moins pessimiste que le professeur Denys Pellerin. En effet, nous avons entendu à peu près les mêmes discussions lorsque nous avons commencé à faire, il y a 30 ans, les premières amniocentèses précoces et les premiers diagnostics prénataux. Or, sauf exception, si nous avons observé en France une augmentation du nombre des amniocentèses, nous n'avons pas déploré de dérives ni assisté à une inflation dans les indications.

Je pense qu'il y a malgré tout une augmentation du nombre d'amniocentèse effectuée mais que, dans le diagnostic génétique préimplantatoire, nous sommes dans un cadre extrêmement différent car cela s'adresse à des patients qui se savent porteurs du risque de transmission d'une maladie et qui ont déjà subi pour eux-mêmes ou dans leur entourage proche cette loi du destin. Cela ne concerne donc pas le tout-venant, mais uniquement une population extrêmement ciblée.

M. Claude SUREAU

Le risque de banalisation qui vient d'être évoqué n'est pas très convaincant pour la simple raison que le DPI suppose une FIV dont le taux de succès ne dépasse guère 20 %. En ce qui concerne le problème éthique posé par le diagnostic de maladie de Huntington, avec son délai d'apparition, il n'est pas spécifique du DPI. Il est présent aussi dans le DPN et pour nombre d'affections dont la révélation peut être plus ou moins tardive, telle que l'épidermolyse bulleuse, la mucoviscidose ou la myopathie. Il en va de même du coût de la prise en charge de ces diverses affections, coût qui constitue un argument en faveur de l'interruption de grossesse pour raisons médicales ; cet argument est valable, mais non spécifique du DPI ; il vaut aussi pour le DPN ; en fait, il est inclus depuis longtemps dans des dispositions législatives admises depuis les lois de 1975 et 1994. Enfin, cet exposé nous apporte un élément de réponse à la question du moment où le fœtus devient un patient. Puisqu'il est soumis à la biopsie que représente le DPI, c'est donc dès la fécondation qu'il est un patient, ce qui est un concept médical et non juridique.

Je pense effectivement qu'il est important d'insister sur le concept médical de patient. Je dirais volontiers que l'on peut considérer l'embryon comme un patient et insisterais sur le mot « comme » pour ne pas faire de confusion avec la définition de personne.

M. Michel ARTHUIS

Concernant les 14 couples atteints d'amyotrophie spinale et de mucoviscidose, combien de couples avec amyotrophie spinale ?

Six couples présentaient une amyotrophie spinale dans le groupe étudié.

M. Georges DAVID

A propos des translocations, observez-vous une diminution du nombre des embryons porteurs de la translocation par rapport à ce que l'on pourrait normalement attendre ? Lorsque vous êtes conduit à pratiquer un DPI pour une des indications que vous avez précisées, et que

la femme a un âge tel que le risque de Trisomie 21 est élevé, envisagez-vous un dépistage supplémentaire par sonde dépistant la Trisomie 21 ?

Vous faites référence aux études qui évoquent la possibilité d'une autorégulation des embryons porteurs d'une translocation, mais maintenant nous savons qu'ils atteignent également le stade de blastocyste dans 25 à 30 % des cas au lieu des 50 % habituels. Le dépistage d'un risque de trisomie 21 chez une patiente devant bénéficier d'une fécondation *in vitro* se pose effectivement puisque ce dépistage sera habituellement pratiqué en cas de grossesse. Il serait plus logique de le faire avant plutôt qu'après afin d'éviter chez ces femmes âgées, donc à l'espoir de fertilité limité, une éventuelle interruption médicale de grossesse. Cela devrait s'adresser aux patientes devant de toute façon passer par la fécondation *in vitro* et qui accepteraient, voire réclameraient, le principe d'un diagnostic prénatal et préféreraient le diagnostic génétique préimplantatoire.

M. Jean-Baptiste PAOLAGGI

Comment sont prises, en pratique, les décisions « collégiales » que vous avez évoquées ?

La consultation en trinôme réunit un généticien, une psychiatre-psychanalyste et un gynécologue-obstétricien. Une fois l'indication retenue celle-ci est soumise au centre pluridisciplinaire de médecine anténatale, comme cela est prévu par la loi. Il y a donc une réelle participation collective à la décision des indications du DPI.

M. Raymond BASTIN

Je souhaiterais revenir sur les réunions européennes auxquelles vous avez fait allusion. Y avez-vous déjà observé l'esquisse de dérives concernant les indications ?

Effectivement trois centres européens sur la cinquantaine qui fonctionnent ont donné des résultats concernant le choix du sexe sans aucune pathologie sous-jacente, uniquement pour « équilibre familial ». Les deux centres français agrées pour le DPI ont fait un éditorial qui a été publié au début de cette année dans la revue Européenne *Human Reproduction* affirmant notre opposition à ces pratiques de convenance qui tournent le dos à l'indication médicale du diagnostic génétique préimplantatoire, qui doit être la seule retenue.

M. Christian NEZELOF

Que sait-on des risques que fait courir la biopsie d'un ou deux blastomères sur les autres blastomères ?

Cinq cents enfants sont nés après DPI et leur poids de naissance, leur taille et le développement des premières années ne posent pas de problème médical. On peut donc penser que la biopsie d'un ou deux blastomères ne porte pas à conséquence, ce qui rejoint les situations que nous connaissons, par exemple après décongélation embryonnaire où il n'est pas rare que nous réimplantions des embryons qui ont perdu un ou deux de leurs blastomères et avec des résultats tout à fait satisfaisants.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, nº 5, 865-878, séance du 14 mai 2002

M. Jacques BATTIN

Dans l'expérience mondiale de DPI, y a t-il eu des diagnostics faussement négatifs ? En ce qui concerne le screening des aneuploïdies, la FISH ne pouvant accéder à toutes les paires chromosomiques, comme avec le DPN, les publications sur la DPI signalent aussi l'allélic drop out, à savoir le défaut d'amplification qui peut faire ignorer une mutation génique. Est-ce que l'empreinte génomique qui intervient lors de la gamétogenèse et de l'embryogenèse précoces peut perturber et augmenter le risque d'anomalies du développement par les procédures utilisées ?

Certes, dans la mesure où l'on va trouver ce que l'on cherche il est possible qu'indépendamment de telle ou telle translocation se développe une anomalie portée par un autre chromosome. Dans ce sens le DPI n'est pas une garantie contre toute anomalie génétique. Il existe des faux diagnostics. Trois ont été publiés au début de la pratique dans les années 1990, les techniques semblent s'être affinées, cependant, il est logique de proposer aux patientes un contrôle prénatal en leur mentionnant que la fiabilité des techniques de DPI ne peut être retenue à 100 %. Aucun risque d'anomalie de développement lié à la technique n'a été mis en évidence.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, nº 5, 879-893, séance du 28 mai 2002

Le traitement de l'azoospermie excrétoire. La chirurgie face à la biologie

Excretory azoospermia. Current appraisal of the treatment

Michel COGNAT *, Jean-François GUÉRIN **, Bertrand KEPPI*, Sylvia PILIKIAN**

RÉSUMÉ

L'azoospermie excrétoire relève d'une stratégie thérapeutique qui est aujourd'hui très efficace, comportant deux modalités d'action complémentaires, très différentes à la fois dans leur conception et leur réalisation pratique. La chirurgie de reperméabilisation du tractus séminal est la méthode ancienne, aux résultats bien connus, validés et reproductibles aux conditions d'une technique opératoire sophistiquée impliquant la microchirurgie. L'introduction récente de l'assistance biologique à la procréation, d'efficacité régulièrement croissante, offre d'ores et déjà des possibilités de traitement complémentaires, voire opposables à ceux de la chirurgie dans certaines situations, au-delà des seules contre-indications opératoires. L'évolution de la stratégie thérapeutique est analysée selon les données de notre expérience personnelle et de la littérature.

Mots-clés : Fécondation in vitro. Injection. Intracytoplasmique spermatozoïde. Oligospermie, chirurgie. Anastomose chirurgicale.

SUMMARY

The therapeutical strategy for excretory azoospermia is very efficient at the present time. It is represented by two complementary methods very different both in their concept and their practical aspects. The surgery for recanalisation of the seminal tract is the old method, associated with reproducible and validated results providing a sophisticated operative methodology which implies microsurgery. The recent introduction of the assisted reproduction technics with better or at least equal results than those of surgery and with a growing therapeutical power already nowadays offers satisfying opportunities of treatment in some

* Centre Fertily, Clinique de Monplaisir, 10 avenue des Frères Lumière – 69008 Lyon.
** Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital Édouard Herriot, place d'Arsonval – 69008 Lyon.

Tirés-à-part : Professeur Michel Cognat, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 29 janvier 2002, accepté le 11 mars 2002.

selected indications. The evolution of the therapeutical strategy is analyzed through our proper practice and the data of the literature.

KEY-WORDS (Index Medicus) : FERTILIZATION IN VITRO. SPERM INJECTIONS, INTRACYTOPLASMIC. OLIGOSPERMIA, surgery. ANASTOMOSIS, surgical.

INTRODUCTION

Les possibilités thérapeutiques puissantes offertes aujourd'hui à l'azoospermie excrétoire sont le résultat d'une évolution très particulière marquée par l'innovation thérapeutique chirurgicale et biologique. Nous l'envisagerons à travers notre expérience personnelle et les données de la littérature.

Les bases conceptuelles du traitement découlent d'une situation anatomopathologique simple : le testicule est normal, fonctionnel et producteur de spermatozoïdes, alors qu'à l'autre extrémité du tractus séminal le sperme qui s'écoule est vide de spermatozoïdes et de leurs précurseurs. Ce constat suggère un obstacle intermédiaire placé sur le transit normal des spermatozoïdes. Dès lors deux idées thérapeutiques sont possibles :

— supprimer chirurgicalement l'obstacle a été la première idée thérapeutique, en rétablissant le flux séminal par un geste « curatif », pour permettre une grossesse normale *in vivo* (ou plusieurs successives) ;

— ignorer cet obstacle et faire se réaliser biologiquement, « extra-corporéalement » et *in vitro*, la rencontre spermatozoïdes - ovocyte a été la deuxième idée thérapeutique, réalisable depuis peu par l'assistance médicale à la procréation (PMA). C'est une approche qui n'est que palliative, car il faut répéter la procédure si on envisage plusieurs tentatives de grossesse.

ÉTIOLOGIE DE L'AZOOSPERMIE EXCRÉTOIRE

Le choix de la méthode thérapeutique dépend beaucoup de l'étiologie qui se répartit entre deux grands groupes.

L'azoospermie excrétoire acquise

— *d'origine infectieuse par séquelles d'épididymite*, devenue plus rare avec les traitements corrects des infections aiguës associant antibiotiques et corticoïdes : la tuberculose est de plus en plus rare, le gonocoque et les germes banals sont également moins fréquents, alors que le chlamydia est de plus en plus fréquent, d'évolution souvent sournoise, laissant volontiers des séquelles plurifocales résistantes à l'antibiothérapie. L'obstacle est intra-luminal, unique ou plurifo-

cal, ponctuel ou étendu, accompagné de plus ou moins de sclérose ou d'inflammation persistante ;

— *d'origine iatrogène* avec oblitération simple ou perte de substance plus ou moins étendue par cure de hernie inguinale bilatérale (surtout celle pratiquée chez le très jeune garçon) ou par vasectomie ;

— *d'origine mécanique par obstacle du carrefour prostatique*, s'agissant essentiellement de troubles au niveau des canaux éjaculateurs avec obstruction par calcul à extraire, oblitération post-inflammatoire ou séquellaire de manœuvre endoscopique, compression profonde par un utricule prostatique sous tension (kyste sous-urétral).

L'azoospermie excrétoire congénitale

Tous les types d'anomalies congénitales du tractus séminal sont susceptibles d'occasionner une azoospermie excrétoire :

— *simple dystrophie de l'épididyme* favorisée par le diéthylstilboestrol administré à la mère durant la grossesse ;

— *défaut de jonction* entre testicule et tête épididymaire (épididyme flottant) ou entre les différentes portions constituantes de l'épididyme (tête, corps et queue), consécutif à un trouble de l'organogenèse

— *aplasie plus ou moins étendue d'un segment du tractus épididymo-déférentiel* et surtout *absence congénitale du déférent* (ACD), qui a des caractéristiques très spécifiques à bien connaître, moyennant quoi le diagnostic de cette affection, souvent tardif, peut être aisé et presque immédiat. Le banal examen clinique suffit à mettre en évidence cette possible disposition anatomique, en général bilatérale. L'existence d'une hypovolémie spermatique est très suggestive du diagnostic mais le petit éjaculat n'est pas constant car l'agénésie des vésicules séminales n'est pas toujours associée à celle des déférents. L'agénésie peut paraître partielle mais les malformations sont souvent étagées tout au long du tractus déférento-prostatique. L'agénésie déférentielle s'inscrit dans le cadre d'une anomalie du développement pendant la vie fœtale, en général associée à la mucoviscidose dont elle représente un morphotype maintenant bien connu, la majorité des patients qui en sont atteints étant porteurs d'une ou plusieurs mutations du gène CFTR, la plus fréquente d'entre elles étant la mutation delta F 508 [1]. Un conseil génétique est dans cette situation obligatoire [2]

L'évolution des causes durant ces dernières années fait maintenant apparaître les azoospermies congénitales (surtout l'ACD) plus fréquentes que les acquises, phénomène lié à la diminution relative des obstructions infections (pour lesquelles le chlamydia est aujourd'hui dominant).

BILAN PRÉ-THÉRAPEUTIQUE

Il comporte deux étapes qui consistent d'une part à affirmer l'azoospermie, d'autre part à mettre en évidence son origine obstructive et le site de l'obstacle, lequel conditionne l'approche thérapeutique, surtout si elle doit être chirurgicale.

Les méthodes contemporaines d'investigation bénéficiant des progrès, surtout au niveau des techniques de laboratoire, offrent une appréciable précision diagnostique :

- spermogramme avec spermocytogramme, à faire pratiquer en laboratoire spécialisé, à renouveler au moins une fois ;
- dosages des marqueurs séminaux : fructose pour les vésicules séminales, carnitine et alpha-glucosidase pour l'épididyme, phosphatases acides pour la prostate, leucospermie pour l'infection de l'ensemble du tractus séminal ;
- exploration échographique et radiologique, en particulier vésiculo-déférentographie (dans certains cas).

Les autres investigations permettent d'affirmer que la spermatogenèse est normale : bilan endocrinien, bilan génétique, et si besoin biopsie testiculaire, de pratique non systématique mais qui, si elle doit être pratiquée, doit prévoir une congélation de gamètes d'emblée en vue d'une option thérapeutique potentielle.

Le classique examen clinique garde toute sa valeur, permettant parfois à lui seul de faire d'emblée un diagnostic définitif, comme ce peut être le cas pour l'absence congénitale du déférent.

MÉTHODES THÉRAPEUTIQUES

La chirurgie

Le principe est un geste de reperméabilisation et c'est la réapparition postopératoire de spermatozoïdes dans le liquide séminal qui signe le succès de l'intervention curative, conduisant ainsi à une possible fécondation *in vivo* par conception naturelle [3].

L'essentiel de la chirurgie se concentre sur l'épididyme et le canal déférent et en pratique la chirurgie se résume à deux interventions : l'anastomose épididymo-déférentielle et l'anastomose déférento-déférentielle.

Cette chirurgie nécessite pour sa pratique une extrême minutie impliquant aujourd'hui la vraie méthode « microchirurgicale » (Bayle en 1938 préconisait déjà l'utilisation de la loupe).

Aspects techniques des anastomoses

— *Anastomose épididymo-déférentielle ou vaso-épididymostomie* [4, 5]

Il s'agit d'un contournement de l'obstacle par une anastomose de type « by-pass » entre épididyme et canal déférent que l'on peut confectionner selon trois modalités :

- *latéro-latérale*, classique, décrite par Bayle en 1938 [6],
- *termino-terminale*, décrite par Silber en 1977 [7],
- *latéro-terminale*, décrite par Fodgestam en 1986 [8], qui est aujourd'hui le mode opératoire le plus utilisé, à juste titre.

— *Anastomose déférento-déférentielle ou vaso-vasostomie* [4, 5]

Il s'agit d'une levée de l'obstacle séminal par résection suivie d'anastomose de recanalisation que l'on confectionne selon le mode termino-terminal avec deux variantes possibles en un seul plan ou en deux plans.

Résultats des anastomoses

Ils représentent les possibilités actuelles de la chirurgie, validées depuis la pratique de la microchirurgie qui a apporté dans les années 1975-1980 une certaine évolution positive, ayant amené les résultats à un niveau qu'il sera certainement impossible d'améliorer.

Ils s'expriment d'une part en terme de « perméabilité postopératoire rétablie » que l'on juge sur les spermogrammes (mais perméabilité positive ne signifie pas *ipso facto* grossesse et ne satisfait que le chirurgien) et, d'autre part, en terme de « grossesse », la grossesse étant le seul vrai résultat positif qui satisfasse le couple.

— *pour l'anastomose épididymo-déférentielle*

le taux moyen est supérieur à 25 % de grossesses postopératoires (seule la première grossesse est prise en compte). Cette estimation est évaluée d'après :

- la pratique personnelle de l'un d'entre nous (M. Cognat), basée sur 203 cas d'anastomoses épididymo-déférentielles avec des résultats différents selon les périodes (loupe au tout début de ma pratique puis microscope depuis 1972) [9],
- l'analyse compilative de 21 grandes séries internationales parmi les plus fournies de la littérature, entre autres de Wangenknecht [10], Silber [11], Lee [12], Schoysman [5], Matsuda [13], Fodgestam [8].

— *pour l'anastomose déférento-déférentielle*

le taux moyen est supérieur à 65 % de grossesses postopératoires, estimation faite d'après :

- ma pratique personnelle, basée sur 42 cas d'anastomoses déférento-déférentielles [4],
- l'analyse compilative de 7 statistiques internationales parmi les plus importantes, dont certaines dépassent 150 cas et deux 300 cas (venant des pays où la vasectomie est beaucoup plus pratiquée qu'en France) selon Belker [14], Lee [15], Owen [16], Schoysman [5], Wangenknecht [17], Sharlip [18], Thomas [19].

— *l'analyse synthétique de ces données postopératoires permet d'affirmer*

- que les résultats positifs de la chirurgie de recanalisation sont incontestablement validés par des statistiques déjà anciennes, et reproductibles sous condition d'une technologie adéquate ;
- que le facteur « opérateur-dépendance » est net dans ce type de chirurgie assez spécifique, surtout marqué pour l'anastomose épididymo-déférentielle qui est la plus difficile techniquement parlant ;
- que les résultats sont aussi sous dépendance multifactorielle : temps depuis l'intervention, site d'implantation de l'anastomose, autres critères chirurgicaux... [5]
- que l'issue favorable que représente la grossesse attendue de cette chirurgie faite sur l'homme est sous la dépendance non seulement de facteurs masculins, mais aussi féminins, incluant en particulier l'indice de fertilité de la partenaire que l'on ignore souvent.

Une technique chirurgicale (ou plutôt chirurgico-médicale) mérite d'être mentionnée, bien que n'étant plus d'actualité, ne serait-ce que parce qu'elle a préfiguré par sa conception ce que l'on fait maintenant lors de la FIV-ISCI avec prélèvement de spermatozoïdes. C'est le spermatocèle : conçu sur une idée de Hanley (1955), puis développé surtout par Schoysman (1968), Wangenknecht et Kélamy par la suite, ce réceptacle artificiel (en membrane placentaire, ou en paroi veineuse, ou encore alloplastique), connecté avec l'épididyme était supposé collecter des spermatozoïdes à ponctionner pour des inséminations artificielles. Le succès, qui n'a pratiquement jamais été au rendez-vous, aurait peut-être été meilleur si les techniques biologiques actuelles de préparation et de vitalisation du sperme et l'ICSI avaient été disponibles [20].

L'assistance médicale à la procréation

Le principe de la méthode

L'AMP, négligeant et laissant en place le barrage anatomique interposé sur le trajet des gamètes, permet la réalisation de la rencontre des spermatozoïdes et de l'ovocyte *in vitro*, aussi bien chez l'homme (et c'est le cas de figure dans l'azoospermie), que d'ailleurs chez la femme (c'est le cas de figure dans l'occlusion des trompes).

La pratique de la méthode

— Il a fallu attendre 1978 pour que ce concept de fécondation extracorporelle appliqué à l'espèce humaine et plus précisément la première fois à une stérilité féminine d'origine tubaire aboutisse à un premier succès avec grossesse à terme (entre les mains de P. Steptoe et R. Edwards).

— S'agissant de l'homme, encore quelques années plus tard, en 1987, Temple-Smith en Australie a publié la première grossesse par fécondation *in vitro* (FIV) [21] obtenue avec des spermatozoïdes captifs directement prélevés sur l'épididyme dans un cas d'azoospermie obstructive. Très peu d'équipes dans la période 1987-1989 ont connu la réussite avec le mode de FIV dit « classique », qui exige une assez forte concentration de spermatozoïdes, difficile à obtenir dans la disposition habituelle des rétentions de l'azoospermie canaliculaire et surtout difficile à réitérer en cas de programme itératif sur l'épididyme, organe particulièrement fragile, en raison des séquelles anatomiques résultant du fait de l'agressivité du prélèvement chirurgical, fut-il microchirurgical. Le deuxième succès mondial a été annoncé par Silber aux Etats-Unis en 1988 [22], suivi de celui publié par le Centre de Lyon associant deux d'entre nous (M. Cognat et J.F. Guérin) en 1989, qui a fait état de deux grossesses gémellaires avec enfants normaux [23].

— Par la suite, le pronostic de la méthode de FIV appliquée à l'azoospermie excrétoire s'est trouvé fondamentalement transformé par l'application de la technique de l'ICSI, introduite en 1990-1991 [24]. ICSI (abréviation de l'anglais Intra Cytoplasmic Sperm Insemination) désigne une méthode de laboratoire d'assistance « purement mécanique » apportée au spermatozoïde pour sa pénétration à travers la membrane pellucide de l'ovocyte [25] par une manœuvre microchirurgicale qui consiste à injecter en plein cœur du cytoplasme ovocytaire un seul gamète [26]. Cette technique nouvelle, exigeant très peu de « matériel », a rendu les prélèvements de spermatozoïdes initiaux ou itératifs faciles par la simple ponction-aspiration à l'aiguille sur l'épididyme ou dans le testicule. La mise au point concomitante de la congélation des spermatozoïdes prélevés a amplifié le succès de la méthode.

Les résultats actuels de la fécondation in vitro-ICSI sont le témoin de l'efficacité de la méthode. Le registre national FIVNAT [27], à la création duquel notre Centre a participé et ensuite collaboré chaque année depuis sa création, collecte les résultats des Centres français. Notre pratique personnelle est analysée à travers cette étude collaborative.

— Pour la période 1995–2000, l'analyse de 2 388 tentatives prises en compte, fait état de 570 grossesses, soit un pourcentage de 24 % de grossesses par tentative, de 25 % par cycle de ponction et de 28 % par transfert (toutes catégories confondues, c'est-à-dire avec sperme épididymaire ou testiculaire, avec sperme frais ou congelé), s'agissant entre autres des contre-indications de la chirurgie.

— Pour la seule année 2000, une analyse plus détaillée, faisant la discrimination au niveau des résultats entre les différents types de sperme utilisés, est en cours dont les premiers résultats, sur 1 038 cas, sont les suivants :

• nombre de programmes avec sperme prélevé : 1 038 avec la répartition suivante

épididymlaire frais	189
testiculaire	350
épididymaire congelé et testiculaire congelé	489

• résultats en terme de grossesse selon l'origine du sperme

	par cycle de ponction	par transfert
avec sperme épididymaire frais (189 cas)	25,5 %	28,3 %
avec sperme testiculaire frais (350 cas)	21,1 %	25,9 %
avec sperme épididymaire congelé et testiculaire congelé (489 cas)	25,9 %	28,5 %

Les résultats sont légèrement supérieurs avec le sperme épididymaire qu'avec le sperme testiculaire et identiques avec le sperme frais ou congelé.

Le taux cumulé des programmes après quatre tentatives avoisine 60 % de succès [27].

La congélation des spermatozoïdes, quand elle est possible lors d'une tentative, augmente d'au moins 50 % l'espoir de succès en permettant plusieurs fertilisations sans nouveau prélèvement [27].

Ainsi il apparaît à l'évidence que les résultats de la FIV–ICSI, encore en phase de croissance, sont d'ores et déjà validés.

ÉVOLUTION DE LA STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE

L'évolution des indications thérapeutiques a suivi celle des méthodes thérapeutiques, à savoir la chirurgie et l'assistance médicale à la procréation, ce qui fait distinguer deux grandes périodes.

— La première période, avant l'application de la fécondation *in vitro*, est celle de la chirurgie.

Si les premières tentatives, d'ailleurs infructueuses, datent de 1890 (Humbert) et si les premiers succès publiés en France par Bayle datent de 1938 [6], la chirurgie andrologique appliquée à l'azoospermie excrétoire n'est en fait devenue efficace qu'aux environs des années 1970-1975, avec l'apport de la méthode microchirurgicale.

Durant toute cette période, la stratégie thérapeutique était bien entendu très simple : on ne pouvait qu'opérer, donc on opérait tout, y compris les mauvais cas, sauf les contre-indications absolues.

— La deuxième période, depuis l'existence de la FIV, a commencé en 1985.

Le début a été marqué par la rareté des succès, tenant au fait de la technique qui était celle de la méthode dite « classique ». La situation restait simple au plan des indications thérapeutiques car l'AMP, accueillie comme la solution providentielle des contre-indications opératoires formelles, se cantonnait dans ce domaine.

Assez vite, en quelques années, l'assistance médicale à la procréation est devenue beaucoup plus efficace grâce à l'adaptation à la FIV de la technique ICSI et aussi à l'adaptation de la congélation à cette forme particulière de spermatozoïdes qu'est le gamète prélevé sur micro-biopsie ou sur mini-goutte de fluide séminal.

Ainsi, depuis l'application de ces étonnantes possibilités offertes par les techniques d'assistance médicale à la procréation, une nouvelle conception de l'approche thérapeutique est née, avec de nouvelles indications au profit de la FIV, donc aux dépends de la chirurgie. C'est la période actuelle [28].

Il est remarquable de noter que l'évolution de l'essentiel de ce panorama thérapeutique s'est déroulée sur un espace de temps de moins de trente ans. Un espoir de guérison voisin de 100 % est aujourd'hui proposable aux patients alors qu'il était encore presque nul dans les années 1970.

INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES

Indications de la chirurgie

Il existe d'une part les indications idéales qui sont celles où existe un obstacle défini, limité et bien atteignable, en un mot les cas où une chirurgie réglée peut être appliquée, à savoir :

— une anastomose épididymo-déférentielle dans les suites d'antécédents infectieux d'épididymite, lorsque les lésions post-inflammatoires sont concentrées sur la jonction épididymo-déférentielle, comme le montre souvent l'expérience ;

— une anastomose déférento-déférentielle pour une occlusion du canal déférent, essentiellement iatrogène après cure de hernie inguinale ou vasectomie.

Ces indications idéales peuvent se transformer en indications « limites » selon l'extension de la lésion occlusive.

Il existe d'autre part de véritables contre-indications opératoires absolues d'emblée, que sont :

— *les anomalies congénitales* de tous types du tractus séminal : simple dystrophie de l'épididyme, défaut de soudure et/ou aplasie des différents segments de l'axe testiculo-épididymo-déférentiel et surtout absence congénitale du déférent ;

— *les obstructions acquises* par lésions post-infectieuses quand elles sont plurifocales ou très fortement scléreuses ou encore accompagnées de destruction iatrogène étendue, comme on peut en rencontrer après herniorraphie inguinale intempestive faite sur le très jeune garçon.

Indications de l'assistance biologique à la procréation

Il existe les indications en quelque sorte absolues pour lesquelles la FIV est l'unique solution comblant le vide thérapeutique laissé par la chirurgie, à savoir l'ensemble des contre-indications opératoires, énumérées au paragraphe précédent.

Il existe aussi des situations pour lesquelles la FIV se présente comme une solution alternative de la chirurgie. Puisque la FIV est techniquement adaptable à toutes les formes étiologiques et anatomiques d'azoospermie excrétoire, comme indiqué précédemment, il est aujourd'hui logique et raisonnable d'élargir son application au-delà des seules contre-indications opératoires, dès lors qu'elle extériorise des résultats « opposables » à ceux de la chirurgie et qu'elle a parfois sur la chirurgie des avantages qui deviennent des critères de choix préférentiel.

Dans cette logique on considère que sont plutôt en faveur de la FIV :

— **les échecs d'une première intervention de recanalisation** auxquels on ne propose plus la chirurgie itérative, sauf rares exceptions [29] **:** échecs complets avec azoospermie persistante auxquels s'ajoutent les échecs partiels lorsque la reperméabilisation pourtant rétablie n'est pas suivie de grossesse dans un délai de deux ans : la FIV avec ou sans ICSI peut apporter la solution, qu'il s'agisse de forte oligozoospermie sans ou plus souvent avec asthénozoospermie, ou encore de normospermie souvent en relation avec un facteur immunologique par anticorps anti-spermatozoïdes induit par l'obstruction initiale qui peut persister surtout si la recanalisation n'est pas totale ;

— **les azoospermies avec obstacle du carrefour prostatique** sont plutôt confiées à la FIV de première intention qu'aux endoscopistes même chevronnés exposés aux échecs et à la morbidité postopératoire

On reconnaît aussi comme « éligibles » pour la FIV de première intention, certaines situations à étudier et à accepter cas par cas, en fonction d'arguments objectifs médicaux ou plus subjectifs dépendant du couple.

— ce peuvent être des critères objectifs médicaux : pour n'en prendre qu'un seul exemple, on peut citer le paramètre « âge du couple » et surtout « âge de la femme » qui peut se révéler fondamental. On peut être amené à privilégier l'AMP à partir de 36-38 ans, s'il faut « aller vite » pour cette question d'âge,

conscient que la grossesse est souvent plus longue à obtenir avec la chirurgie, et que la fécondité de la femme diminue considérablement à l'approche de la quarantaine, surtout en FIV ;

— ce peuvent être des critères plus subjectifs avancés par le couple qui a le désir légitime de faire connaître son opinion, y compris le souhait de plus en plus fréquent d'éviter la chirurgie, critères liés à ce que le couple considère comme des avantages de la FIV, en particulier le mode moins invasif de la FIV et les procédures « apparemment » plus simples de celle-ci ;

— le colloque singulier qui doit présider à l'élaboration de ce choix fait « pour le couple et avec le couple » est l'occasion pour le praticien de rappeler :

- que la FIV ne présente pas que des avantages mais parfois aussi des risques et aléas avec sa probabilité de programmes à réitérer, son taux élevé de grossesses multiples, l'incertitude quant aux malformations potentiellement un peu plus fréquentes en FIV-ICSI avec le sperme ponctionné surtout testiculaire, etc [30]. La FIV peut aussi parfois être en opposition avec l'éthique personnelle ou religieuse du couple, ce qui est très exceptionnel ;
- que la chirurgie ne présente pas que des inconvénients. Elle a, entres autres, l'énorme supériorité sur la FIV de permettre plusieurs grossesses successives sans assistance médicale renouvelée, tout en sachant aussi que cet avantage devient un inconvénient pour le couple qui exprime le désir d'une seule grossesse, que l'on perçoit de plus en plus souvent, en particulier de la part des couples reformés.
- quant à l'implication financière, si elle est évoquée, il faut rappeler au couple que, *grosso modo* le coût de la FIV au-delà de deux programmes devient supérieur à celui de la chirurgie.

C'est ainsi que peuvent se concevoir les « nouvelles indications » de l'AMP, dans un contexte nouveau où deux attitudes sont à éviter aujourd'hui, à savoir :

— ne pas continuer à opérer trop de patients,

— ne pas confier trop de couples, voire tous les couples à la FIV, selon une tendance abusive parfois perceptible chez certains praticiens trop confiants en la méthode.

Pour l'heure, la chirurgie et l'AMP demeurent complémentaires. Le chirurgien s'est acquis une place de collaboration dans la pratique de l'AMP plus ou moins étendue, selon sa compétence et sa formation (qui devrait être celle d'une prise en charge globale de l'unité que représente un couple), et de plus il conserve un rayon d'action purement chirurgical en continuant à opérer les « bons cas » sélectionnés [31, 32].

CONCLUSION

Le choix de la thérapeutique de l'azoospermie excrétoire restera longtemps cantonné à une alternative, chirurgie et procréation assistée, car on n'entrevoit aucun espoir de nouvelle approche thérapeutique.

La gestion des indications thérapeutiques a beaucoup évolué et elle continuera à évoluer dans le sens d'une plus large application de l'assistance biologique à la procréation car la puissance thérapeutique de celle-ci va encore s'amplifier et ses procédures se simplifier, alors que dans le même temps la chirurgie ne fera aucun progrès.

L'azoospermie excrétoire, qui était synonyme de stérilité totale et d'infertilité définitive jusqu'à la publication des premiers résultats positifs de la chirurgie, est un thème médical d'actualité soutenu par l'innovation thérapeutique. Son approche thérapeutique devenue chirurgico-biologique offre aujourd'hui à près de 100 % des patients azoospermiques un espoir de devenir féconds.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Bertrand Cognat pour la préparation du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Cognat M., Durieu I. — Espoirs thérapeutiques dans les azoospermies excrétoires et risques génétiques dans l'aplasie congénitale des canaux déférentiels. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1994, *178*, 2, 249-262.

[2] Gauthier E., Sedbon E., Cognat M. — Faut-il condamner l'assistance médicale à la procréation dans les affections génétiques ? *Gynéco-Obst. Pratique*, 1996, *87*, 6-7.

[3] Cognat M. — Aspects chirurgicaux de la stérilité masculine. *Lyon Chirurgical*, 1975, *71*, 169.

[4] Cognat M., Cittadini E., Schoysman R., Audebert A. — Microsurgery in infertility (en français, anglais et italien), 1980, *livre* édition COFESE, Palerme.

[5] Schoysman R. — Microsurgery of male infertility. 1994, *livre* de 256 pages, Arte Grafiche Siciliane éditeur.

[6] Bayle H., Gouygou C. — La stérilité masculine. Rapport au 47ème congrès français d'urologie, octobre 1953. Paris : Masson éd.

[7] Silber S.J. — Perfect anatomical reconstruction of the vas deferens with a new microscopic surgical technique. *Fertil. Steri.*, 1977, *28*, 72.

[8] Fodgestam I., Fall M., Nilsson S. — Microsurgical epididymovasostomy in the treatment of occlusive azooospermia. *Fertil. Steril.*, 1986, *46*, 925-929.

[9] Guetat C. — Azoospermie excrétoire. Etude de 100 observations personnelles d'anastomoses épididymo-déférentielles. Thèse inspirée par Cognat M., Faculté de Lyon, 1986.

[10] Wangenknecht L.V. — Ten years experience with microsurgical epididymovasostomy : results and proposition of a new technique. *J. Androl.*, 1985, *6*, 26.

[11] Silder S.J. — Results of microsurgical vasoepididymostomy : role of epididymis in sperm maturation. *Hum. Reprod.*, 1989, *4(3)*, 298-303.

[12] Lee H.Y. — A 20 years-experience with epididymovasostomy for pathologic epididymal obstruction. *Fertil. Steril.*, 1987, *47*, 3.

[13] Matsuda T., Hori Y., Muguruma K., Komatz Y. — Microsurgical epididymo-vasostomy for obstructive azoospermia : factors affecting post-operative fertility. Proceedings of Kyoto Congress of IVF, 1993, Kyoto University.

[14] Belker A.M. — Transient fertility after vasovasostomy in 892 patients. *J. of Urol.*, 1985, *134*, 75-76.

[15] Lee H.Y. — Corrective surgery of azoospermia. *Arch. Androl.*, 1978, *1*, 115.

[16] Owen E.R. — Vasectomy reversal. Review of 475 microsurgical vasovasostomies. *Med. J. Aust.*, 1984, *140*, 398.

[17] Wangenknecht L.V. — Aktueller Erfahrungsbericht bei Samenwegrekonstruktionen. *Fertilität*, 1993, *9*, 210-218.

[18] Sharlip I.D. — Microsurgical vasovasostomy : preliminary report of a new technic. *Annual Meeting of American Fertility Society*, 1979.

[19] Thomas A.J., Pontes J.E. — Microsurgical vasovasostomy : immunologic consequences and subsequent fertility. *Fert. and Steril.*, 1981, *35*, 447-450.

[20] Schoysman R. — La création d'une spermatocèle artificielle dans les agénésies du canal déférent. *Bull. Soc. Belge Gynec. Obstet.* , 1993, *38*, 1339-1340.

[21] Temple-Smith P.D., Outhwick G.I., Yates A., Trouson A.O., de Krester D.M. — Human pregnancy by *in vitro* fertilization using sperm aspirated from the epididymis. *J. in vitro-embryo transfer*, 1985, *2*, 119.

[22] Silber S.J., Nagy Z.P., Liu J. — Conventional *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum. Reprod.*, 1994, *9*, 1705-1709.

[23] Cognat M., Czyba J.C., Guerin J.F. et coll. — Grossesse après FIV avec sperme épididymaire. *Presse Médicale*, 1990, *36*, 1983.

[24] Devroey P., Vandervorst M., Nagy P., Van Steirteghem A. — Do we treat the male or his gamete ? *Hum. Reprod.*, 1998, *13 suppl 1*, 178-185.

[25] David G. — Vers une assistance médicale au spermatozoïde. La PMA-vigilance. *BIOFUTUR*, 1996, 152.

[26] Craft I., Ysirigotis M., and *al.* — Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*, 1995, *63*, 1038-1042.

[27] Fivnat : bilan de l'année 2000. Organon Press.

[28] Hiounn N., Izard V., Epelboin J., Zorn J.R., Debre B., Jardin A., Jouannet P., Wolff J.P. — ICSI avec sperme testiculaire : quelle stratégie ? *Contracept. Fert. Sex.*,1997, *25*, 611-616.

[29] Nigam A.K., Hendry W.F. — Repeat epididymovasostomies : are they worthwile ? *B. J. U. Int.*, 1999, *83*, 816-819.

[30] Thibault Ch. — Certitudes et inquiétudes concernant l'ICSI. *Contracept. Fert. Sex.*, 1998, *26*, 211-217.

[31] Pomerol J.M. — Role of the urological surgeon in the age of ICSI. *Cu*, 5*rr. Opin. Urol.*, 1999, *9*35-539.

[32] Jardin A. — Traitement chirurgical de la stérilité masculine. *Revue du praticien*, 1983, *33*, 57.

DISCUSSION

M. Denys PELLERIN

Vous avez bien indiqué que les azoospermies congénitales ayant pour origine une aplasie du déférent seraient le plus souvent en rapport avec une mucoviscidose. Compte tenu du recul

encore limité de l'utilisation de l'ICSI dans ces indications, pouvez-vous déjà nous assurer que les garçons nés par cette méthode de FIV sont indemnes de toute mutation témoignant d'une mucoviscidose ? Peut-on assurer que les hommes nés par cette méthode ne risquent pas d'être aussi stériles ?

Suite à la première publication princeps de Gossens en 1993, l'absence congénitale des déférents (ACD) apparaît effectivement aujourd'hui dans la majorité des cas voire la totalité comme une forme atténuée de mucoviscidose, maladie autosomique récessive identifiée par le gène CFTR (dont on connaît plus de 1 000 mutations). L'étude de l'ADN à la recherche des principales mutations chez le patient et sa conjointe permet de chiffrer le risque potentiel de transmission : — si le propositus est double hétérozygote, ce risque dépend du génotype de la conjointe. Lorsque celle-ci est hétérozygote d'une mutation (4 %), ce risque est de 1 sur 2 (dont 1 sur 4 pour la forme sévère pulmonaire et de 1 sur 4 pour la forme atténuée génitale avec ACD) et lorsqu'aucune mutation n'est identifiée chez la femme, le risque est extrêmement faible mais non nul (possible mutation rare non détectée) ; — si le propositus est simple hétérozygote et si d'autres arguments cliniques existent (test à la sueur positif, sinusite chronique, ...), le diagnostic encore probable de mucoviscidose s'accompagne d'un risque beaucoup plus faible (inférieur à 1/1200), encore dépendant évidemment de la conjointe.

M. Roger HENRION

Avez-vous dans votre statistique des cas de patients qui, après une vasectomie recommandée comme méthode contraceptive il y a quelques années, ont sollicité une réparation des déférents ou une procréation médicalement assistée ? Avez-vous constaté une augmentation ou une diminution du nombre des vasectomies dans les dernières années ?

Dans ma série d'anastomoses déférento-déférentielles, il y a une trentaine d'indications pour réversibilité de vasectomies, toutes pratiquées pour motif de complaisance sauf un cas pour risque maternel grave d'une nouvelle grossesse. La demande de « refertilisation » a émané d'hommes souhaitant d'autres enfants, essentiellement dans le cadre d'un nouveau couple « reformé » et deux fois dans le cadre de couples unis, l'un après décès tragique des deux enfants, l'autre après simple regret de cette mutilation. Enfin une demande a été faite par un homme de 30 ans qui avait fait pratiquer une vasectomie de « contraception » aux États-Unis à 20 ans, avant toute paternité. Je termine ma réponse en précisant que la législation française, qui autorise maintenant la stérilisation déférentielle (et tubaire) « pour raisons médicales », ne semble pas avoir entraîné une augmentation de la pratique de la vasectomie.

M. René MORNEX

Quelle est la valeur fécondante des spermatozoïdes bloqués et stagnants dans l'épididyme par rapport à celle des spermatozoïdes issus de sperme frais ? Quelle est la stratégie que l'on peut proposer lorsque les deux modes thérapeutiques sont applicables et y a t'il une séquence d'association privilégiée ?

Le phénomène de résorption de spermatozoïdes qui se met en place au voisinage de l'obstacle sur la voie séminale ne suffit pas en général à entretenir un fluide séminal physiologique apte à conserver la valeur fécondante des gamètes bloqués ; on peut néanmoins obtenir suffisamment de matériel à inséminer en pratiquant des prélèvements

étagés et en soumettant les spermatozoïdes recueillis à des traitements biologiques de vitalisation appropriés pendant quelques heures. Lorsque les deux modalités thérapeutiques disponibles (chirurgie et FIV) sont applicables, elles peuvent être utilisées dans un ordre quelconque, aucune ne coupant les ponts à l'autre : la confection première d'une anastomose laisse toute possibilité de pratiquer ensuite des ponctions pour FIV — la réalisation initiale de plusieurs programmes de FIV n'altère pas les sites opératoires pour une éventuelle chirurgie de seconde intention – une association rapprochée des 2 méthodes est également concevable pour potentialiser les chances de succès quand il faut « aller vite », par exemple chez un couple dans lequel l'âge de la femme dépasse 36-38 ans.

M. René KÜSS

Étant donné la bénignité des anastomoses favorisées par la microchirurgie, ne croyez-vous pas que, dans le cas d'une azoospermie purement excrétoire, cette chirurgie devrait être proposée en premier lieu, avant la fécondation in vitro *?*

Je ne peux qu'être complètement d'accord avec vous, d'abord parce que réellement dans l'exemple que vous citez la chirurgie réunit un maximum d'avantages par rapport à la FIV, ensuite parce que je suis avant tout chirurgien. Mais, si la proposition logique est la chirurgie, le praticien ne peut rien imposer. Dans le contexte actuel de la prise de décision médicale thérapeutique, le praticien se doit d'informer aussi complètement que possible le couple des options disponibles ainsi que de leurs avantages et inconvénients respectifs selon les connaissances actuelles, en l'occurrence dans le cas de la vasectomie, la chirurgie et la FIV. Au-delà de la suggestion la plus « raisonnable » faite par le praticien, le choix final appartient au couple.

M. Christian NEZELOF

J'ai lu dans le Lancet *que les enfants nés après fécondation* in vitro *ont un poids de naissance inférieur à celui des nouveau-nés habituels. Quelle est votre expérience ?*

Ce constat est bien connu et a été aussi mis en évidence en France par le Registre national FIVNAT, qui collige chaque année depuis 1985 l'activité des Centres d'assistance médicale à la procréation. Les néonatologistes considèrent que ce déficit pondéral est vite compensé après la naissance et n'est suivi d'aucun déficit ou retard mental et intellectuel.

M. Georges DAVID

Dans votre réponse à M. Küss vous avez très sagement discuté des intérêts respectifs, en cas d'obstruction des voies excrétrices génitales, de la chirurgie et de la biologie interventionnelle. On doit aussi souligner que les deux possibilités ne sont pas exclusives l'une de l'autre et peuvent se succéder, voire s'additionner dans le même geste opératoire. En cas d'agénésie bilatérale des déférents due à une mucoviscidose et si l'on détecte chez la femme une mutation du gène CFTR, ne croyez-vous pas qu'il y a indication d'un diagnostic génétique préimplantatoire ?

Lorsque le risque de transmission d'une forme sévère de la mucoviscidose (pulmonaire tout particulièrement) est élevé et que le couple, dans l'état actuel des connaissances, souhaite être informé le plus complètement possible, votre proposition est raisonnable.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 895-906, séance du 28 mai 2002

De la génomique à la post-génomique : un retour aux origines ?

From genomics to post-genomics : back to the origins ?

Philippe JEANTEUR *

RÉSUMÉ

L'objectif de cette revue est de souligner la multiplicité et l'importance, physiologique et pathologique, des niveaux de régulation de l'expression des gènes qui interviennent postérieurement à l'étape d'initiation de la transcription. Celle-ci n'est en effet que le premier pas, certes décisif, d'une longue cascade d'évènements de régulation qui vont aboutir à la production sélective des messagers fonctionnels appropriés à la nature des cellules et à leurs besoins instantanés. Au travers de ce long parcours, dont seules quelques étapes seront étudiées ici, elle s'attachera à souligner le rôle central de l'ARN, non seulement comme substrat mais comme acteur de sa propre régulation. L'accent sera mis sur les liens très nombreux existant avec la pathologie et jusqu'aux développements thérapeutiques dont l'ARN pourrait être la cible privilégiée. Enfin, elle aura cherché à montrer la pérennité des questions fondamentales posées depuis presque un demi-siècle et pour lesquelles la génomique aura fourni, à défaut de concepts nouveaux, la base de données et les outils indispensables pour entrer dans l'immense champ de la génomique fonctionnelle, seule capable d'apporter des réponses exploitables en thérapeutique.

MOTS-CLÉS : GÈNE RÉGULATEUR. ARN ANTISENS. ARN CATALYTIQUE.

SUMMARY

The purpose of this review is to emphasize the multiplicity and importance, physiological and pathological, of gene regulation levels which operate after the intiation step of transcription. Albeit crucial, this step is only the first one of a long cascade of events which eventually end up in the selection of functional messengers appropriate to the nature of the cells and to their immediate needs. Throughout this long pathway, of which only a few steps will be mentionned here, this review will attempt to address the central role played by RNA, not only as a substrate but as an actor of its own regulation. Emphasis will be put on the numerous connections with pathology up to the development of new therapeutics specifically

* *Lauréat de l'Académie nationale de médecine (Prix Gallet-Breton 1987).*
Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS, 1919 route de Mende — 34293 Montpellier cedex 5.

Tirés-à-part : Professeur Philippe JEANTEUR, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 7 février 2002, accepté le 4 mars 2002.

targeting RNA. It highlights the perennity of basic questions, nearly half a century old, for which genomics, short of new concepts, will provide the databases and tools required to access to the immense field of functional genomics, the only one likely to bring relevant answers for therapeutics.

Key-words (Index Medicus) : Genes, regulator. RNA, antisense. RNA, catalytic.

INTRODUCTION

La nature ne connaît que deux structures chimiques capables de porter ou de transporter une information génétique. Le statut de l'ADN est à cet égard définitivement établi depuis plus d'un demi-siècle sans avoir connu la moindre remise en question. Celui de l'ARN a au contraire connu une évolution considérable dont le propos de cet article est de retracer les grandes étapes jalonnées par plusieurs prix Nobel et, beaucoup plus modestement, par quelques contributions de mon laboratoire. J'insisterai particulièrement sur le rôle de l'ARN à différents niveaux de la régulation de l'expression des gènes dans la mesure où ils désignent autant de cibles potentielles pour une intervention thérapeutique.

ET l'ARN FUT...

Ce qu'on appelait dans les années 60 le dogme central de la biologie moléculaire tenait que le flux de l'information génétique ne pouvait aller que de l'ADN vers l'ARN et ensuite aux protéines. Le premier ébranlement de ce dogme fut la découverte de la transcriptase reverse associée aux virus oncogènes à ARN que l'on appelle depuis rétrovirus. H. Temin, qui en fut l'incontestable découvreur, eut bien du mal à la faire accepter avant d'être finalement reconnu par le prix Nobel de Physiologie et Médecine avec D. Baltimore en 1975. Encore n'était-ce qu'une contestation bien modeste du dogme, puisqu'elle ne faisait qu'admettre la possibilité d'une remontée de l'information de l'ARN vers l'ADN, sans pour autant remettre en cause la suprématie du second sur le premier. Par sa rigueur et son immuabilité, cette hiérarchie n'était pas sans évoquer celle de la classification des sciences par A. Comte, dont nous avons encore bien du mal à nous affranchir.

Jusque dans les années 80, on ne reconnaissait à l'ARN que des rôles essentiels mais de second plan : un rôle structural de l'ARN ribosomal au sein du ribosome, un rôle d'adaptateur de l'ARN de transfert permettant la traduction du code nucléique en code protéique. Quant au statut certes plus noble de molécule informationnelle de l'ARN messager, il n'était que par délégation au titre d'une copie transitoire que l'on jette après usage.

La véritable révolution fut la découverte par Th. Cech et S. Altman des propriétés catalytiques de l'ARN qui fut couronnée par le prix Nobel de Chimie en 89. De substrat, l'ARN devenait enzyme (ribozyme), la molécule passive devenait acteur de

son propre métabolisme. Les spécialistes de l'origine de la vie virent immédiatement dans cette ambivalence les attributs attendus de la molécule vitale originelle puisque l'ARN combinait la double capacité à être l'information génétique elle-même et à constituer la matière première des outils primitifs nécessaires à son expression et à sa réplication. D'où le concept maintenant largement accepté d'un monde ARN à l'origine de toute forme de vie [1].

L'ARN DANS TOUS SES ÉTATS

Le statut de matériel génétique n'est pas l'apanage de l'ADN. Le monde des virus à ARN est d'une extraordinaire diversité anatomique et responsable de maladies particulièrement dévastatrices : SIDA, diarrhées infantiles, etc.

La structure en double hélice de l'ADN, continue sur toute la longueur d'un chromosome, telle que l'ont décrite Watson et Crick en 1953 [2] est une contrainte qui ne lui permet pratiquement aucune fantaisie. Par sa nature en simple chaîne qui libère toute sa créativité structurale, par sa taille éminemment variable, l'ARN recèle une diversité morphologique potentielle qui l'apparente beaucoup plus aux protéines. Ses fonctions excèdent très largement le rôle informationnel des ARNs cellulaires de type messager.

Alors que l'ADN est exclusivement localisé dans le noyau, les mitochondries et éventuellement quelques autres petits organites, où il ne semble d'ailleurs jouer aucun rôle direct, l'ARN cellulaire est présent et actif dans tous les compartiments où il se passe quelque chose en rapport avec l'expression des gènes. Déjà au moment de la réplication des télomères, la télomérase, dont l'ARN est un constituant essentiel, veille à compenser le raccourcissement que chaque cycle de réplication leur impose. À l'autre bout de la chaîne, l'ARN de la SRP (Signal Recognition Particle) participe à l'excrétion des protéines extracellulaires.

Mais c'est entre ces deux extrémités de la cascade de régulation génique que l'ARN déploie toute l'étendue de ses capacités, dont seule une petite partie nous est connue.

L'ARN AU CŒUR DE LA (DYS) RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES

C'est dans ce domaine que se sont situés depuis 35 ans mes travaux personnels d'abord, ceux de mon laboratoire ensuite.

Mes premiers travaux sur la biosynthèse de l'ARN ribosomal [3] m'ont permis d'établir la structure de son précurseur et de décrire le premier exemple de maturation non conservative, c'est-à-dire impliquant une importante perte (gaspillage ?) de matériel. Seule en effet la moitié environ de la séquence du précurseur se retrouve dans les ARNs ribosomaux matures.

De très nombreux cas de maturation post-transcriptionnelle des ARNs cellulaires ont été décrits depuis. En fait, le phénomène est tellement général qu'il n'existe qu'une seule exception à cette règle, tous règnes confondus. Seul en effet de toutes les catégories d'ARNs cellulaires existant dans la nature, l'ARN messager bactérien est utilisé exactement dans l'état où il a été synthétisé sans aucune modification, fût-elle mineure. Cette situation de simplicité maximum s'accommode au mieux du contexte des bactéries dont elle tire la meilleure efficacité mais elle les prive d'un immense éventail de niveaux de régulation génique.

Toute différente est la situation des ARNs messagers chez les eucaryotes supérieurs. La transcription des gènes codant pour des protéines produit une population très hétérogène d'ARN nucléaire (hnRNA pour heterogenous nuclear RNA), dont seuls moins de 10 % se retrouvent dans le messager actif dans la synthèse des protéines [4]. Dans ce contexte, un travail tout à fait intéressant du groupe d'A. Kahn en 1989 [5] a montré que tous les gènes sont transcrits dans tous les tissus, à des taux très faibles mais cependant détectables par PCR. Ce phénomène de « transcription illégitime » est ce qui permet de faire des analyses de mutations dans les transcrits ARN à partir des tissus les plus accessibles (comme les lymphocytes) et même s'ils n'ont eux-mêmes aucun phénotype pathologique (par exemple dans la myopathie).

Entre la décision d'initier la transcription d'un gène et la production d'une protéine fonctionnelle, les étapes sont très nombreuses et fournissent autant de niveaux sur lesquels peut s'exercer une régulation. Je vais essayer de les recenser en citant chaque fois que cela est possible des exemples où une régulation et une incidence pathologique ont pu être démontrées.

L'élongation, sa régulation et ses dysfonctionnements

Longtemps considérée comme une étape sans événement particulier, l'élongation de la transcription s'avère maintenant requérir de nombreux facteurs pour aboutir à des vitesses de transcription compatibles avec la taille parfois gigantesque de certains gènes. Un exemple extrême est celui du gène de la dystrophine dont la transcription des plus de 2 millions de paires de bases prend environ 15 à 20 heures à la vitesse maximum observée *in vivo*. Or la RNA-polymérase II purifiée avec tous ses facteurs d'initiation ne transcrit *in vitro* qu'à une vitesse dix fois plus faible. C'est donc aux facteurs d'élongation qu'il revient de faire franchir à la machinerie transcriptionnelle cet indispensable ordre de grandeur.

Sitôt l'événement primaire d'initiation réalisé et avant même que la polymérase ne prenne véritablement son essor pour une transcription au long cours, celle-ci peut se raviser et marquer une pause avant de prendre ses distances avec le promoteur. Une telle situation, initialement décrite notamment par notre laboratoire dans le cas des deux proto-oncogènes cellulaires c-myc et c-fos [6, 7] auxquels nous nous intéressons depuis une quinzaine d'années, semble bien maintenant être le cas général plutôt que l'exception [8].

Une fois la RNA-polymérase clairement engagée dans la synthèse du pré-messager, l'élongation de la transcription déroule son ruban d'ARN comme un long fleuve, certes, mais certainement pas tranquille. Il s'agit plutôt d'une succession de pauses, voire d'arrêts et même de reculs qui contribuent largement à la longueur du processus. C'est en supprimant les pauses, donc en accroissant la processivité, qu'agissent les facteurs qui augmentent la vitesse d'élongation.

Ces facteurs sont de plus en plus nombreux et le dysfonctionnement de la plupart d'entre eux est associé à des affections cancéreuses [9].

L'un de ces facteurs a été identifié à l'occasion d'une translocation chromosomique 11-19 dans certaines formes rares de leucémies myéloïdes aiguës (Mixed Lineage Leukemia, MLL) [10]. Le locus en question appelé ELL (Eleven-nineteen Lysin-rich Leukemia) ou encore MEN code pour une protéine qui supprime les pauses et stimule donc la vitesse d'élongation. Suite à la translocation, le gène ELL se trouve fusionné au gène MLL et la protéine de fusion MLL-ELL connaît alors une expression anarchique non régulée, qui explique son rôle oncogène.

Une situation opposée, mais qui aboutit finalement aux mêmes conséquences, est celle du produit du gène de la maladie de Von Hippel Lindau caractérisée par une prédisposition familiale à une variété de cancers comme le cancer du rein à cellules claires, les hémangioblastomes ou les phéochromocytomes. Ce gène a donc les attributs d'un gène suppresseur de tumeur dont le premier allèle est déjà absent dans la lignée germinale et le second est perdu ou muté au niveau somatique. A l'état normal, la protéine VHL [11] est un régulateur négatif du facteur d'élongation SIII (élongine). En son absence, il y a perte de la régulation normale au niveau de l'élongation, d'où possibilité d'une expression anarchique de certains gènes. Bien que ce ne soit pas établi, il est intéressant de spéculer sur la possibilité que les oncogènes cellulaires c-myc et c-fos, dont nous avons vu qu'une régulation importante intervenait aussitôt après l'initiation [12], soient des cibles décisives de ce processus.

C'est à cette étape de la transition de l'initiation à l'élongation qu'un autre facteur pTEFb (positive Transcription Elongation Factor) joue un rôle décisif en phosphorylant une sous-unité de la RNA-polymérase. Cet événement libère la RNA-polymérase des multiples interactions qui lui ont permis de reconnaître le promoteur. Ayant ainsi largué ses amarres, elle peut alors s'engager dans l'élongation. Il est intéressant de noter que l'activité kinase de pTEFb est modulée par un ARN cellulaire, le 7S K, dont on ignorait jusqu'alors complètement la fonction [13, 14]. Au-delà de ce rôle physiologique indispensable, pTEFb est impliqué dans une étape essentielle de la production de l'ARN de HIV. Le HIV recrute à son profit cette protéine cellulaire essentielle pour la forcer à produire préférentiellement l'ARN viral [9]. On trouve là un nouvel exemple de subversion de la machinerie cellulaire au profit d'un virus.

L'épissage

Un autre dogme fondamental de la biologie moléculaire, un gène-une protéine, a été définitivement détruit par la notion de gènes morcelés en exons/introns ; 1977 est la date de cette immense révolution qui valut à Sharp et Roberts le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1993.

L'épissage est ce processus qui permet d'exciser les séquences indésirables du pré-messager pour élaborer un messager fonctionnel. Mais cette réaction n'est pas univoque. On sait depuis longtemps qu'il peut exister plusieurs options permettant de produire plusieurs messagers, donc plusieurs protéines à partir d'un même pré-messager, donc d'une même séquence d'ADN : c'est l'épissage alternatif. Un des premiers exemples décrits est celui du gène de la calcitonine qui produit effectivement cette hormone dans la thyroïde mais aussi la CGR (Calcitonin Gene Related Peptide) dans le cerveau [15] (Figure 1). Les exemples d'épissage alternatif couvrent pratiquement tout le champ de la physiologie, de l'endocrinologie à la neurologie en passant bien sûr par l'immunologie où ce phénomène touche pratiquement tous les membres de la superfamille des immunoglobulines.

Au-delà de ces exemples nombreux, mais qui pouvaient néanmoins apparaître ponctuels, ce qu'on ne soupçonnait pas d'emblée, c'est l'ampleur quantitative du phénomène et ce fut une surprise, voire une déception, d'apprendre d'une première lecture superficielle du génome humain que le nombre de nos gènes, précédemment estimé au moins à 150 000, devait être revu à la baisse aux environs de 32 000 [16, 17]. Une exploitation plus générale de l'épissage alternatif permettrait de combler très facilement cette discordance.

Les tentatives d'évaluation globale du phénomène d'épissage alternatif sont très récentes et résultent essentiellement de la comparaison informatique des séquences exprimées à partir d'un même gène et en rapport avec la séquence du génome. Les estimations les plus récentes indiquent que 40 à 60 % des gènes humains sont l'objet d'épissage alternatif [18] suggérant que ce mécanisme est bien un élément essentiel de la diversité fonctionnelle du génome humain, d'autant que la plus grande partie (70 à 88 %) de ces variants d'épissage affecte la protéine elle-même [19]. Un exemple extrême est celui du gène DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule), une molécule d'adhérence cellulaire de la superfamille des immunoglobulines impliquée dans le guidage axonal, qui peut générer potentiellement près de 40 000 isoformes [20].

Reste cependant à dresser un répertoire exhaustif des isoformes d'épissage alternatif réellement exprimées. C'est ce qu'a entrepris de réaliser le groupe de J. Tazi à l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, en collaboration avec ExonHit. Ces résultats, non encore publiés, reposent sur une stratégie entièrement originale de criblage différentiel permettant de repérer, sur l'ensemble du génome et sur des critères biochimiques, les messagers issus de l'épissage alternatif.

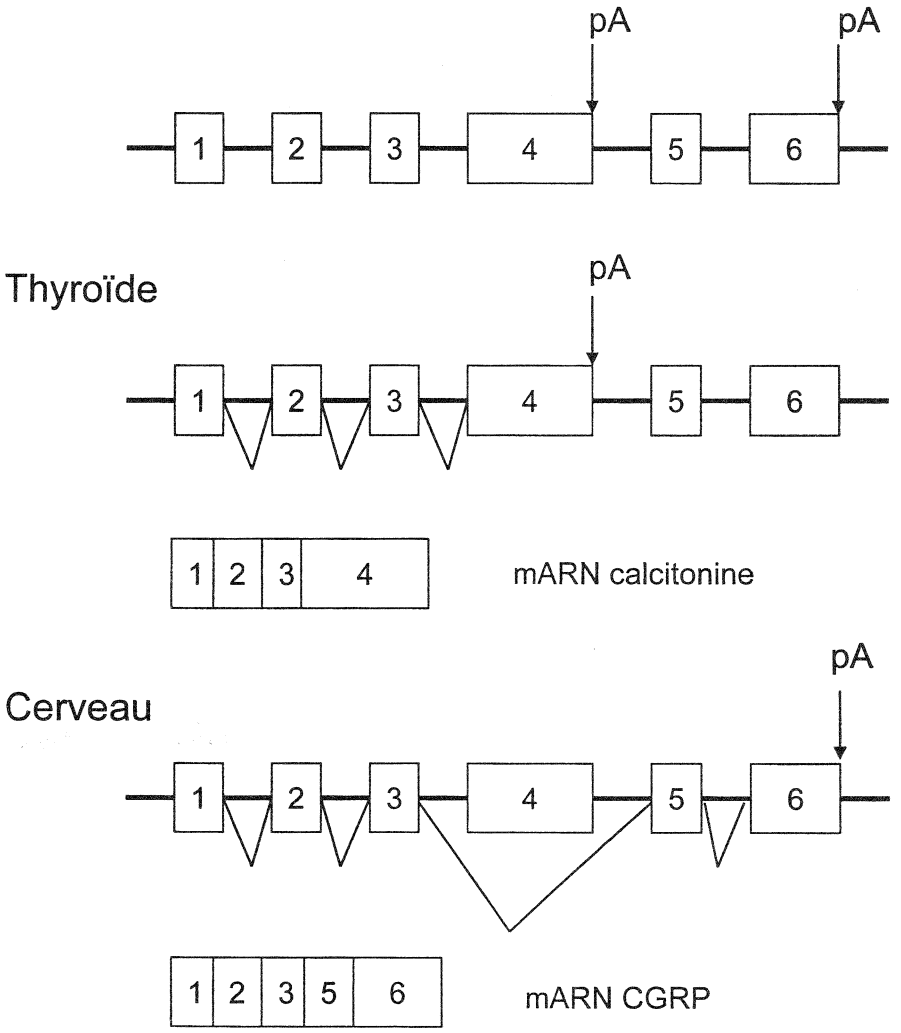

FIG. 1. — L'épissage alternatif du gène calcitonine/CGRP. Le choix du site de coupure/polyadénylation (pA) oriente l'épissage vers l'inclusion de l'exon 4 (qui mènera à la calcitonine) ou des exons 5 et 6 qui mènera au CGRP (Calcitonine Gene Related Peptide).

Les cas où des dysfonctionnements de la machinerie d'épissage sont à l'origine de maladies humaines sont déjà très nombreux et dépassent largement les possibilités de recensement d'une revue comme celle-ci. On évalue à environ 15 % la proportion des maladies génétiques qui résultent d'anomalies de l'épissage [21]. Pour s'en tenir au cadre du cancer, nombreux sont les exemples d'inactivation de gènes suppresseurs par modulation de l'épissage alternatif. On peut citer les quelques gènes

suivants : p16^{INK4A} [22], p130 (de la famille du gène du rétinoblastome Rb) [23], WT (tumeur de Wilms) dont la proportion des isoformes varie dans les cancers du sein par rapport au tissu normal [24], p53 dont la protéine est inactivée par mutation d'un site d'épissage dans certains cancers des VADS [25], l'exon 18 de BRCA 1 dont le mauvais épissage est causé par le polymorphisme d'un enhancer exonique [26] ou encore HDM2 dont 5 variants d'épissage sont détectés dans les carcinomes ovariens et pancréatiques et dont les expressions évoluent avec la progression tumorale [27] d'adaptabilité et d'évolution. On sait maintenant qu'il en est aussi l'artisan grâce aux snARNs qui sont les agents catalytiques de l'épissage [28].

La stabilité du messager

La plupart des messagers eucaryotes sont très stables. Mais qu'en est-il de ceux qui interviennent à un titre quelconque dans le cycle cellulaire et qui ne doivent être exprimés que dans une très étroite fenêtre de temps ? Non seulement la décision de les fabriquer doit suivre une chronologie extrêmement précise mais encore faut-il pouvoir les éliminer sitôt qu'ils sont devenus indésirables.

Ces considérations nous ramènent à un travail fondateur de mon laboratoire dans le milieu des années 80, qui a établi l'importance du contrôle de la stabilité des messagers de certains oncogènes comme c-myc et c-fos dans la cancérogenèse [29-31]. Nous avons en effet montré pour la première fois que le messager c-myc était extrêmement instable (10-15 minutes comparées aux quelques dizaines d'heures d'un messager cellulaire de stabilité normale) dans des cellules normales [29] mais qu'il était stabilisé dans des cellules transformées [30-31]. Ces travaux établissaient qu'un événement purement post-transcriptionnel, à savoir la production inopportune d'un messager (et d'une protéine) normale, pouvait constituer une étape décisive de la cancérogenèse.

L'ARN, CIBLE OU ACTEUR DE NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

L'idée de bloquer sélectivement la traduction d'un messager et donc la production d'une protéine donnée date d'une vingtaine d'années. Même si les succès thérapeutiques sont à ce jour très limités, ce concept a été très fécond car il a ouvert de nombreuses pistes, de façon parfois complètement inattendue, et qui paraissent néanmoins extrêmement prometteuses à moyen terme.

Oligonucléotides antisens et RNAi

Tout a commencé avec la fabrication d'oligonucléotides ADN complémentaires des messagers dans l'idée de bloquer leur traduction, un mécanisme qui n'a d'ailleurs jamais pu être prouvé. Une quinzaine d'essais cliniques de phases I ou II sont actuellement en cours dans des cancers ou des maladies virales. Une seule appli-

cation est à ce jour approuvée pour le traitement de la rétinite à cytomégalovirus [32].

Mais c'est à l'occasion de recherches sur les mécanismes d'action d'ARN anti-sens chez les plantes que s'est développée une autre voie entièrement nouvelle fondée sur l'utilisation de courtes séquences d'ARN en double brin (RNAi pour RNA interférence), dont le mécanisme d'action vient d'être élucidé récemment. Le RNA en double chaîne est l'objet d'un phénomène d'amplification enzymatique à l'intérieur de la cellule, un peu à la manière d'une PCR, qui inonde la cellule par une grande quantité de RNA antisens avec comme conséquence la dégradation du messager par une RNAse de type III. L'effet du RNAi est donc finalement un effet antisens dont l'efficacité résulte de la quantité et de la permanence de la production de RNA antisens dans la cellule [33].

Ce phénomène, utilisé d'abord avec un succès retentissant chez les plantes, le nématode et la drosophile, vient d'être appliqué à des cellules de mammifères en culture [34, 35]. On est cependant encore loin d'une application *in vivo* à l'homme mais l'originalité de cette approche et surtout sa généralité, justifient l'énorme intérêt qu'elle a suscité au cours de ces derniers mois.

Ribozymes

La première activité catalytique découverte pour l'ARN fut une nucléase (voir plus haut) d'où l'espoir immédiat de pouvoir créer des molécules d'ARN artificielles capables de détruire sélectivement un messager donné. Plusieurs essais cliniques (phases I, II ou préclinique) sont en cours, principalement dans certains cancers ou infections virales comme HIV [36]. Ces ribozymes ne sont pas délivrés tels quels, ce qui poserait d'énormes problèmes pratiques, mais par des vecteurs libérant le ribozyme dans les cellules infectées. Il s'agit donc au sens strict d'une approche classique de thérapie génique avec son cortège habituel de difficultés techniques et de problèmes pour la plupart non encore résolus.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux, collaborateurs puis chercheurs indépendants, qui ont contribué à accumuler les résultats produits dans ce contexte depuis 1984, d'abord à l'Université de Montpellier II et au Centre anticancéreux, puis depuis 1993 à l'Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier. Une mention particulière est due aux docteurs J.M. Blanchard, M. Piechaczyk et J. Tazi.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Gesteland R.F., Atkins J.F. — The RNA world. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1993.

[2] Watson J.D., Crick F.H.C. — Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, *171*, 737-738.

[3] Jeanteur Ph., Attardi G. — Relationship between Hela cell ribosomal RNA and its precursors studied by high resolution RNA-DNA hybridization. *J. Mol. Biol.*, 1969, *45*, 305-324.

[4] Sœiro R., Vaughan M.H., Warner J.R., Darnell J.E. — The turnover of nuclear DNA-like RNA in HeLa cells. *J. Cell Biol.*, 1968, *39*, 112-118.

[5] Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C., Kahn A. — Illegitimate transcription : transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, *86*, 2617-21.

[6] Lamb N.J.C., Fernandez A., Tourkine N., Jeanteur Ph., Blanchard J.M. — Demonstration in living cells of an intragenic negative regulatory element within the rodent c-fos gene. *Cell*, 1990, *61*, 485-496.

[7] Collart M.A., Tourkin N., Belin D., Vassalli P., Jeanteur Ph., Blanchard J.M. — c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent intron 1 block to elongation. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, *11*, 2826-2831.

[8] Krumm A., Hickey L.B., Groudine M. — Promoter-proximal pausing of RNA-polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev.*, 1995, *9*, 559-572.

[9] Conaway J.W., Coonaway R.C. — Transcription elongation and human disease. *Ann. Rev. Biochem.,* 1999, *68*, 301-319.

[10] Shilatifard A., Lane W.S., Jackson K.W., Conaway R.C., Conaway J.W. — An RNA-polymerase II elongation factor endoded by the human ELL gene. *Science*, 1996, *271*, 1873-1876.

[11] Duan D.R. et *al.* — Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*, 1995, *269*, 1402-1406.

[12] Bentley D.L. — Regulation of transcriptional elongation by RNA-polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1995, *5*, 210-216.

[13] Nguyen V.T, Kiss T., Michels A.A, Bensaude O. — 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature*, 2001, *414*, 322-325.

[14] Yang Z., Zhu Q., Luo K., Zhou Q. — The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*, 2001, *414*, 317-322.

[15] Leff S.E., Evans R.M., Rosenfeld M.G. — Splice commitment dictates neuron-specific alternative RNA processing in calcitonin/CGRP gene expression. *Cell*, 1987, *48*, 517-524.

[16] International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, *409*, 860-921.

[17] Venter J.C. et *al.* —The sequence of the human genome. *Science*, 2001, *291*, 1304-1351.

[18] Modrek B., Lee Ch. — A genomic view of alternative splicing. *Nature Genet.*, 2002, *30*, 13-19.

[19] Modrek B., Resch A. Grasso C., Lee Ch. — Genome-wide analysis of alternative splicing using human expressed sequence data. *Nucleic Acids Res.*, 2001, *29*, 2850-2859.

[20] Schmucker D. et *al.* — Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 200, *101*, 671-684.

[21] Krawczak M., Reiss J., Cooper D.N. — The mutational spectrum of single base pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes : causes and consequences. *Hum. Genet.*, 1992, *90*, 41-54.

[22] Shapiro G.I, Park J.E, Edwards C.D, Mao L., Merlo A., Sidransky D., Ewen M.E., Rollins B.J. — Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 1995, *55*, 6200-6209.

[23] Helin K., Holm K., Niebuhr A., Eiberg H., Tommerup N., Hougaard S., Poulsen H.S., Spang-Thomsen M., Norgaard P. — Loss of the retinoblastoma protein-related p130 protein in small cell lung carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, *94*, 6933-6938.

[24] Silberstein G.B., Van Horn K., Strickland P., Roberts C.T. Jr., Daniel C.W. — Altered expression of the WT1 Wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, *94*, 8132-8137.

[25] Cardinali M., Kratochvil F.J., Ensley J.F., Robbins K.C., Yeudall W.A. — Functional characterization *in vivo* of mutant p53 molecules derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol. Carcinog,.* 1997, *18*, 78-88.

[26] Liu H.X., Cartegni L., Zhang M.Q., Krainer A.R. — A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nature Genet*., 2001, *27*, 55-58.

[27] Sigalas I., Calvert A.H., Anderson J.J., Neal D.E., Lunec J. — Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences : transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nature Med*., 1996, *2*, 912-917.

[28] Valadkhan S., Manley J.L. — Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, 2001, *413*, 701-707.

[29] Dani Ch., Blanchard J.M., Piechaczyk M., El Sabrouty S., Marty L., Jeanteur Ph. — Extreme unstability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1984, *81,* 7046-7050.

[30] Blanchard J.M., Piechaczyk M., Dani C., Chambard J.C., Franchi A., Pouyssegur J., Jeanteur Ph. — c-myc gene is constitutively transcribed at high rate in G0-arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature*, 1985, *317*, 443-445.

[31] Piechaczyk M., Yang J.Q., Blanchard J.M., Jeanteur Ph., Marcu K. — Post-transcriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated c-myc mRNAs in murine plasma cell tumors. *Cell*, 1985, *42*, 589-597.

[32] Agrawal S., Kandimalla E.R. — Antisense therapeutics : is it as simple as complementary base recognition ? *Molec. Med. Today*, 2000, *6*, 72-81.

[33] Nishikura K. — A short primer on RNAi : RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell*, 2001, *107*, 415-418.

[34] Fjose A., Ellingsen S., Wargelius A., Seo H.C. — RNA interference : mechanisms and applications. *Biotechnol. Annu. Rev*., 2001, *7*, 31-57.

[35] Bernstein E., Denli A.M., Hannon G.J. — The rest is silence. *RNA*, 2001, *7*, 1509-21.

[36] Sun L.Q., Cairns M.J., Saravolac E.G., Baker A., Gerlach W.L. — Catalytic nucleic acids : from lab to applications. *Pharmacol. Rev*., 2000, *52*, 325-347.

DISCUSSION

M. Raymond ARDAILLOU

Y a-t-il une régulation physiologique de l'activité ou de l'expression de la SR protéine kinase ?

La question est effectivement importante. Les cellules en culture peuvent pousser sans SR-PK mais pas les embryons déficients en Topoisomérase I. Ceci indique que la Topo I/SR-PK est indispensable au développement mais pas à la prolifération. À l'inverse, la surexpression forcée de la Topo I obtenue par transfection est létale, ce qui semble indiquer que l'activité de cette enzyme doive être maintenue dans une fourchette étroite.

M. Claude DREUX

Vous avez dit que 10-15 % des maladies génétiques résultent d'un épissage alternatif. Pouvez-vous me donner quelques exemples de maladies de ce type ?

Ce sont en général des maladies très rares. On peut citer des maladies comme les amyotrophies spinales (SMA pour *Spinal Muscular Atrophy*), le syndrome d'Ehlers-Danlos, ou certains cas de mucoviscidose. On peut en trouver des listes plus exhaustives dans des revues récentes (*Trends in Genetics*, 2002, *18*, 123 et 186).

M. François-Bernard MICHEL

L'intitulé de la communication (« retour aux origines ») pouvait laisser entendre que la génomique aurait été indûment considérée aux dépens de la post-génomique. Celle-ci ne procède-t-elle pas de la première ?

C'est exact. Cette formulation était celle du titre de la communication écrite dont l'exposé oral ne reprend qu'une petite partie. C'était une allusion à l'évolution actuelle de l'intérêt scientifique qui se déplace de la génomique vers la post-génomique avec la conséquence que c'est l'ARN qui prend le devant de la scène aux dépens de l'ADN. C'était également un clin d'œil au fait que l'ARN est maintenant considérée comme la molécule primordiale de l'évolution car elle seule est potentiellement capable à la fois de contenir de l'information génétique et de la répliquer.

M. Henri ROCHEFORT

Est-ce que la proportion de 40-60 % de gènes qui font l'objet d'un épissage alternatif chez l'homme représente le sommet de l'évolution ou bien cette proportion est-elle moindre chez d'autres vertébrés ?

Bien que seule la séquence complète du génome humain soit connue, tout semble indiquer que la situation soit la même pour tous les mammifères. La proportion est cependant moindre si l'on descend plus bas dans l'échelle évolutive, comme par exemple chez la drosophile ou le nématode.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, nº 5, 907-909, séance du 7 mai 2002

INFORMATION

au nom de la Commission XVI (Relations internationales)

Fédération des Académies de Médecine et des Institutions Similaires de l'Union Européenne

Louis AUQUIER

Les relations internationales de l'Académie nationale de médecine ont porté sur les points suivants au cours de l'année écoulée et de l'année en cours.

Fédération des Académies de Médecine et des Institutions Similaires de l'Union Européenne

L'usage s'est établi que la Fédération se réunisse deux fois par an. Les réunions se tiennent à Bruxelles au siège de la Fédération et dans un des pays membres, actuellement au nombre de dix. Divers sujets sont abordés, des recommandations sont adressées, lorsque cela semble opportun, aux membres de la Commission Européenne.

En mai 2001, le sujet traité était la sécurité alimentaire. Il a donné lieu à des rapports de F. Montrasio (Italie), Pennington (Royaume Uni), Rey Calero (Espagne) et M. Tubiana, ce dernier insistant sur la nécessité d'un étiquetage des produits alimentaires, en particulier pour les plats préparés.

En décembre 2001 à Lisbonne, sous la présidence de Ribeiro da Silva (Portugal) qui a succédé à M. Durán Sacristán (Espagne), deux thèmes ont été abordés : la situation actuelle de la formation médicale continue en Europe et les problèmes posés par la télémédecine et ce qu'on entend sous ce terme. Une étude critique en a été présentée par J. Civatte et A. Pompidou. La discussion qui a suivi a montré qu'il n'était pas urgent d'intervenir sur ce sujet auprès des autorités européennes. À l'opposé, il convient de rappeler que la réunion de mai 2000 à Bruxelles sur la tuberculose résistante aux antibiotiques, après les rapports de Fr. Portaels, de C. Voisin et de Rey Calero, et la réunion de Madrid en décembre 2000 sur les accidents de la phytothérapie parallèle, ont donné lieu chacune à des recommandations auprès de la Commission Européenne.

Pour l'année en cours, la première réunion s'est tenue à Bruxelles le 4 mai ; elle a été consacrée aux vaccinations : leur calendrier et leur sécurité. Les rapporteurs en étaient P. Lachmann (Royaume Uni), Rey Calero (Espagne) et deux rapporteurs belges (Vandamme, d'Anvers, et Levy, de Bruxelles) qui ont fait une analyse pertinente de la situation créée par la décision française supprimant à titre provisoire la vaccination contre l'hépatite B en 1998. Il a été évoqué la création d'une vaccinovigilance au niveau européen.

La prochaine réunion de la Fédération se tiendra à Paris, samedi 16 novembre 2002.

Réseau inter-Académique Médical (Inter Academy Medical panel I.A.M.p.)

Créé en 2001 à Tokyo par l'IAP (Inter Academy Panel), le réseau IAMP réunit 37 Académies de Médecine et Sections médicales d'Académies des Sciences.

La 1ère réunion de ce réseau mondial a eu lieu à Paris les 20-21-22 mars 2002 avec comme thème « le défi des maladies infectieuses : résistance aux antibiotiques et bioterrorisme ». Les textes remis sont en cours de publication.

Objectif de l'IAMP :

— être un interlocuteur privilégié auprès des organismes nationaux et internationaux sur les problèmes de santé, en particulier dans les pays en développement (P.E.D.)

— Collaborer avec les P.E.D. pour le recueil des données, la promotion des programmes de santé, et celle des projets de recherche médicale.

Le Comité de pilotage comprend des représentants des Académies de Médecine d'Afrique du Sud, du Brésil, de Chine, des États-Unis, de France, du Japon, des Philippines, du Royaume Uni et de la Turquie.

Coprésidence : Institut de Médecine de l'Académie des Sciences des États-Unis (Pr David Challoner) et Académie nationale de Médecine de France (Pr Guy de Thé).

La participation de la Fédération des Académies nationales de Médecine et des Institutions similaires de l'Union Européenne à l'activité de l'I.A.M.P. est à envisager.

Autres projets de rencontre

Après la visite, le 19 mars 2002, du Président et du Vice-président de l'Académie nationale de médecine du Brésil, la tenue à Paris d'une réunion commune franco-brésilienne sur un sujet chirurgical, en principe fin mars 2003, a été décidée.

Il existe une Fédération des Académies brésiliennes de médecine. Le président de l'Académie de l'Etat de Sergipe souhaite une coopération avec la France.

Des projets de coopération, avec des rencontres communes, sont envisagées avec le Québec, la Chine continentale et des pays de l'Est européen, sous réserve de recevoir les aides financières indispensables.

L'Union médicale balkanique invite chaque année un représentant de l'Académie : la réunion aura lieu en juin 2002 à Kishinev (République Moldave), sur le thème : les urgences médicochirurgicales.

MOTS-CLÉS : ACADÉMIE et INSTITUT. COMMUNAUTÉ ÉCONOMIQUE EUROPÉENNE.
KEY-WORDS (Index Medicus) : ACADEMIES AND INSTITUTES. EUROPEAN UNION.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, nº 5, 911-912, séance du 14 mai 2002

INFORMATION

L'évolution de l'imagerie médicale en 2001

Jean-Daniel PICARD *

À partir des enseignements du dernier congrès de la SFR [1] et du RSNA [2], il nous est apparu intéressant de vous proposer un survol des nouveautés et de l'évolution de l'imagerie alors que les années précédentes, nous avions tenté de vous faire bénéficier de nouvelles techniques, ARM, PET, endoscopie virtuelle, PACS et de leur évolution pratique en milieu hospitalier.

En 2001, il n'y a pas de nouvelles techniques. Nous n'assistons qu'à un perfectionnement permanent des résultats et une accélération du travail de tous ces équipements informatisés.

Quant aux bénéfices cliniques, ils sont prodigieux. Dans toutes les spécialités médicales, les résultats, grâce aux progrès, aboutissent à ce que nous considérons être la perfection, véritable prouesse de la technologie.

Un survol de l'imagerie et des techniques :

— en premier lieu, une image quasi parfaite de l'anatomie où dans tous les territoires de véritables atlas sont réalisés grâce à une imagerie (certes virtuelle), mais identique à celle des plus belles photographies réalisées *in vivo* et plus attractives que celles réalisées en « amphithéâtre » ;

— en deuxième lieu, nous assistons à une compétition permanente des scanners actuels avec l'IRM. Grâce à des temps de pose très courts, l'abord des structures mobiles autorise une imagerie cardio-vasculaire, digestive, ostéo-articulaire, etc, rapide, de définition morphologique parfaite, associée à une étude fonctionnelle ;

— bien entendu, l'étude tridimensionnelle est devenue un élément essentiel. Son obtention quasi immédiate autorise la confrontation permanente de l'image dans tous les plans de l'espace ;

— l'essor de l'endoscopie dite virtuelle, dans toutes les spécialités, est prodigieux. Chaque organe est explorable, en profondeur, s'il existe des

* *Membre de l'Académie nationale de médecine.*

[1] Société Française de Radiologie (Paris, octobre 2001).

[2] Chicago, novembre 2001.

cavités et en périphérie, ce que nous avons appelé la « périscopie ». L'endoscopie virtuelle n'est pas un examen supplémentaire, c'est le complément obtenu simultanément lors de toute exploration d'organe, grâce à un logiciel informatique adapté à l'IRM ou au scanner ;

— dans le domaine cardio-vasculaire qui nous préoccupe prioritairement, nous ne savons plus qui l'emporte de l'ARM ou des scanners rapides. Certes l'absence d'irradiation et de produit de contraste iodé contribue à privilégier la résonance magnétique. Néanmoins, la diffusion des scanners et la mise en évidence des calcifications justifient cette technique en première intention dans certaines indications ;

— le PACS devient progressivement un équipement irremplaçable pour la diffusion des informations. Grâce à toutes ces performances, l'imagerie moderne constitue une source essentielle d'informations pour l'enseignement médical ;

— la recherche d'une lecture automatique des images pathologiques est devenue indispensable, étant donné le grand nombre d'images réalisées pour chaque organe. Cette recherche a débuté par la lecture des mammographies. Elle s'intensifie en pathologie pulmonaire, colique, etc. Elle n'est certes pas spécifique, mais oriente la lecture, constitue un « débrouillage », un moyen de contrôle et d'apprentissage efficace pour la formation des spécialistes ;

— quelques images exceptionnelles, en dehors de cette synthèse, méritent d'être rapportées dans certaines spécialités :

- la surveillance de greffes pancréatico-rénales en IRM avec mise en évidence des parenchymes, des vaisseaux et des éventuelles complications,
- l'évolution des cancers du col utérin sous simple chimiothérapie : régression totale sous IRM contrôlée histologiquement,
- la découverte de ganglions lymphatiques intra-articulaires dans le genou, responsables de symptomatologie douloureuse,
- la présence de 3 voire 4 chenaux dans des dissections aortiques.

Ce survol est trop rapide et nous sommes persuadé que bien des spécialistes parmi nous auraient découvert des informations plus importantes que nous n'avons pas eu l'opportunité de saisir ou qui nous ont échappé.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 913-914, séance du 7 mai 2002

COMMUNIQUÉ

Sur les cellules souches embryonnaires humaines en médecine « régénératrice »

On the use of human embryonic stem cells in regenerative medical activity

Denys PELLERIN

Sous l'égide de l'Académie des sciences, de l'Académie nationale de médecine et de la Royal Academy of medical sciences du Royaume-Uni s'est tenu à l'Institut de France, du 25 au 27 mars 2002, un très intéressant colloque sur *Les cellules souches embryonnaires et la thérapie cellulaire.*

La dernière séance, qui se tenait, le 27 mars à l'Académie nationale de médecine sous la présidence du Pr Maurice Tubiana, se proposait, à la lumière de l'état d'avancement des recherches, de faire le point sur l'aspect médical actuel, dans notre pays, des applications déjà possibles ou escomptées des travaux expérimentaux, de confirmer ce qui est déjà une réalité de la médecine régénératrice, de relativiser ce qui n'est encore qu'un espoir et exigera encore une longue phase expérimentale avant toute application réellement médicale, c'est-à-dire thérapeutique.

Au terme de ce colloque, l'Académie nationale de médecine

— rappelle qu'elle a déjà défini, en 1996, 1998 et 2001, sa position sur la **médecine de l'embryon** et a souligné la nécessité de développer les recherches dans ce domaine pour élucider les échecs de la procréation naturelle et améliorer les résultats de l'assistance médicale à la procréation ;

— renouvelle l'expression de son opposition au clonage à visée de procréation ;

— définit aujourd'hui les quatre principes qui devraient conduire à une nouvelle **médecine régénératrice** à partir des cellules souches embryonnaires humaines :

- l'Académie a toujours encouragé l'utilisation thérapeutique des **cellules souches extraites d'organismes adultes et fœtaux ;**

- avant tout essai thérapeutique, des **études expérimentales sur des modèles animaux** sont nécessaires pour connaître les capacités de prolifération, de différenciation, d'éventuelles instabilités génétiques et transformations malignes des cellules souches embryonnaires ;
- au-delà de ces premiers travaux, les mêmes études pourraient être reprises sur les lignées cellulaires obtenues à partir **de blastocystes humains**, qui ne font plus l'objet de projet parental, sous réserve de l'accord des progéniteurs et de l'autorisation de l'autorité habilitée à les contrôler, ces blastocystes étant destinés, dans les conditions législatives actuelles, à la destruction ;
- pour les recherches utilisant les cellules souches obtenues par **transfert intra-ovocytaire d'un noyau somatique**, l'Académie n'exprime pas d'opposition de principe, à condition que les règles de surveillance soient les mêmes que pour les lignées cellulaires dérivées des blastocystes humains. Cette méthode paraît capable d'obtenir des cellules douées d'un grand potentiel de prolifération et de différenciation, cellules qui semblent, à ce jour, les seules à être génétiquement et immunologiquement identiques à celles de l'organisme receveur. Cependant, il s'agit là de données théoriques dont la réalité n'a pas encore été démontrée expérimentalement. Il est important de développer les recherches dans ce domaine. Il est également indispensable d'étudier les moyens d'éviter que ces techniques ne puissent être utilisées en vue d'un clonage à visée procréatrice. Il faudrait aussi prendre des dispositions pour éviter toute dérive liée au recueil d'ovocytes nécessaires à une telle recherche.

L'ensemble de ces problèmes continue à poser de difficiles interrogations éthiques à l'égard desquelles l'Académie nationale de médecine restera attentive.

Il en sera de même pour les aspects réglementaires qui peuvent être sensiblement différents au sein même des Etats membres de l'Union européenne.

*
* *

L'Académie, saisie dans sa séance du mardi 7 mai 2002, a adopté le texte de ce communiqué (6 abstentions).

Mots-clés : Cellule souche. Structures embryonnaires. Médecine reproduction.
Key-words (Index Medicus) : Stem cells. Embryonic structures. Reproductive medicine.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 915-924, séance du 7 mai 2002

ACTES DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

Séance du 7 mai 2002

Présidence de M. Maurice TUBIANA, *président*

ORDRE du JOUR

Communications

Jacques EUZÉBY (Académie nationale de médecine)
Sur l'épidémiologie de la cryptosporidiose humaine.

Gérard SCHAISON, Isabelle CAUBEL, Nadia BELMATOUG, Thierry BILLETTE de VILLEMEUR, Jean-Marie SAUDUBRAY (Hôpital Saint-Louis – Paris)
Résultats français de l'enzymothérapie substitutive dans la maladie de Gaucher.

Communiqué

Denys PELLERIN
Sur les cellules souches embryonnaires humaines en médecine « régénératrice »

Vote

Jacques-Louis BINET et Georges DAVID
Approbation des nouvelles procédures d'élection.

Information

Louis AUQUIER
Fédération des Académies de médecine et des Institutions similaires de l'Union européenne.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, nº 5, 915-924, séance du 7 mai 2002

Comité secret

Bernard LAUNOIS
Rapport sur les candidatures à une place de membre titulaire dans la 8ème section, en remplacement de M. Pierre MAGNIN, décédé.

Jean-Noël FIESSINGER
Rapport sur les candidatures à deux places de correspondant national dans la 1ère division, en remplacement de MM. Jean SUTTER et Jacques BOUDOURESQUES, nommés honoraires.

ACTES

CORRESPONDANCE OFFICIELLE

La ministre de l'Emploi et de la Solidarité, direction générale de la santé, sollicite, par lettre du 25 avril 2002, un avis sur le projet de décret fixant les conditions d'exercice de la biovigilance.

Commission I (Biologie – Immunologie – Génétique)

CORRESPONDANCE NON OFFICIELLE

Le professeur Vasile CANDEA, Secrétaire général de l'Union Médicale Balkanique, informe, par lettre du 20 avril 2002, de la tenue à Kishinev (République de Moldavie) les 19, 20 et 21 juin 2002, de la XXVIIème Semaine Médicale Balkanique sur le thème *Les urgences médicochirurgicales*. L'Académie est invitée à se faire représenter.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, nº 5, 915-924, séance du 14 mai 2002

Séance du 14 mai 2002

Présidence de M. Maurice TUBIANA, *président*

ORDRE du JOUR

Communication

René FRYDMAN (Hôpital Antoine Béclère – Clamart), Gérard TACHDJIAN, Nelly ACHOUR-FRYDMAN, Pierre RAY, Serge ROMANA, Samir HAMANAH, Sabine MARCADET-FREDET, Violaine KERBRAT, Renato FANCHIN, Jacques KADOCH, Tania ATTIE, M. LELORCH, Michel VEKEMANS, Arnold MUNNICH

Le diagnostic génétique préimplantatoire : premier bilan du groupe parisien.

Élections

— **d'un membre titulaire,** dans la 8ème section, en remplacement de M. Pierre MAGNIN, décédé ;

— **de deux correspondants nationaux,** dans la 1ère division, en remplacement de MM. Jean SUTTER et Jacques BOUDOURESQUES, nommés honoraires.

Information

Jean-Daniel PICARD
L'évolution de l'imagerie médicale en 2001.

Comité secret

Jean CIVATTE
Rapport financier 2001.

Jacques FROTTIER
Rapport sur les candidatures

— à une place de membre titulaire dans la 3e section, en remplacement de M. Jacques CHRÉTIEN, nommé membre émérite ;

— à deux places de correspondant national dans la 3e division, en remplacement de MM. Charles MÉRIEUX et Robert BONNIOT de RUISSELET, nommés correspondants honoraires ;
— à une place de correspondant de l'Ile-de-France dans la 3e division, en remplacement de Mme Monique ASTIER-DUMAS, nommée honoraire.

Étienne-Émile BAULIEU
Rapport sur les candidatures

— à une place de membre titulaire dans la 4e section, en remplacement de M. Jean DAUSSET, nommé émérite.

Christian CABROL
Rapport sur les candidatures

— à une place de membre titulaire dans la 7e section, en remplacement de M. Jean-Charles SOURNIA, décédé ;

— à une place de correspondant national dans la 7e division, en remplacement de M. Albert RAYNAUD, nommé honoraire.

ACTES

DÉCLARATION DE VACANCE

Le président déclare vacante une place de membre titulaire dans la 2e section (Chirurgie et Spécialités chirurgicales) à la suite du décès du professeur Maurice MERCADIER.

ÉLECTIONS

L'ordre du jour appelle l'élection :

— **d'un membre titulaire dans la 8ème section (Membres non résidants, option Chirurgie et Spécialités chirurgicales)** en remplacement de M. Pierre MAGNIN, décédé.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. Michel COGNAT (Lyon),

— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Bernard BLANC (Marseille), Maurice-Antoine BRUHAT (Clermont-Ferrand), Philippe VICHARD (Besançon).

Il est procédé à un tour de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	103
	suffrages exprimés :	103
	majorité :	52
ont obtenu : MM.	COGNAT	40
	BLANC	4
	BRUHAT	4
	VICHARD	54
	Bulletin blanc marqué d'une croix	1
		103

M. Philippe VICHARD, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 8e section (membres non résidants, option Chirurgie et Spécialités chirurgicales).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

— **de deux correspondants nationaux dans la 1ère division (Médecine et spécialités médicales)** en remplacement de M. Jean SUTTER et Jacques BOUDOURESQUES, nommés honoraires.

MM. Bernard SALLE (Lyon) et Jean-Marie WARTER (Strasbourg) sont élus.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 915-924, séance du 28 mai 2002

Séance du 28 mai 2002

Présidence de M. Maurice TUBIANA, *président*

ORDRE du JOUR

Communications

Michel COGNAT (Centre Fertily, Clinique de Monplaisir – Lyon), Jean-François GUÉRIN, Bertrand KEPPI, Sylvia PILIKIAN

Le traitement de l'azoospermie excrétoire. La chirurgie face à la biologie.

Phlippe JEANTEUR (*Lauréat de l'Académie nationale de médecine* – CNRS, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier).

De la génomique à la post-génomique : un retour aux origines ?

Élections

— **d'un membre titulaire, dans la 3ème section,** en remplacement de M. Jacques CHRÉTIEN, nommé émérite.

— **de deux correspondants nationaux, dans la 3ème division**, en remplacement de MM. Charles MÉRIEUX et Robert BONNIOT DE RUISSELET, nommés honoraires.

— **d'un correspondant de l'Ile-de-France, dans la 3ème division**, en remplacement de Mme Monique ASTIER-DUMAS, nommée honoraire.

— **d'un membre titulaire, dans la 4ème section**, en remplacement de M. Jean DAUSSET, nommé émérite.

— **d'un membre titulaire, dans la 7ème section**, en remplacement de M. Jean-Charles SOURNIA, décédé.

— **d'un correspondant national, dans la 7e division**, en remplacement de M. Albert RAYNAUD, nommé honoraire.

Bull. Acad. Natle Méd., 2002, *186*, n° 5, 915-924, séance du 28 mai 2002

ACTES

CORRESPONDANCE NON OFFICIELLE

M. Philippe VICHARD remercie pour son élection à une place de membre titulaire dans la 8ème section (Membres non résidants, option Chirurgie et Spécialités chirurgicales).

M. Jean-Marie WARTER remercie pour son élection à une place de correspondant national dans la 1re division (Médecine et spécialités médicales).

Le Général DEBARNOT, commandant la brigade de sapeurs-pompiers de Paris, invite, par lettre du 17 mai 2002, dix à douze membres de l'Académie à visiter son État-major, place Jules-Renard à Paris. Cette visite, prévue le mardi 2 juillet à partir de 9 H 30, comportera une présentation en salle, une visite du centre 18, la présentation de matériels opérationnels. Elle sera suivie d'un déjeuner.

ÉLECTIONS

L'ordre du jour appelle l'élection :

— **d'un membre titulaire dans la 3ème section (Hygiène et épidémiologie),** en remplacement de M. Jacques CHRÉTIEN, nommé émérite.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. Pierre BÉGUÉ,

— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Claude-Pierre GIUDICELLI et François GRÉMY.

Il est procédé à un *Premier tour* de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	109
	suffrages exprimés :	108
	majorité :	55
ont obtenu : MM.	BÉGUÉ	42
	GIUDICELLI	43
	GRÉMY	23
	Bulletin nul	1
		109

Deuxième tour

	nombre de votants :	108
	suffrages exprimés :	106
	majorité :	54
ont obtenu : MM.	Bégué	50
	Giudicelli	48
	Grémy	8
	Bulletins nuls	2
		108

Troisième tour

	nombre de votants :	88
	suffrages exprimés :	87
	majorité :	44
ont obtenu : MM.	Bégué	47
	Giudicelli	39
	Grémy	1
	Bulletin nul	1
		88

M. Pierre Bégué, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 3ème section (Hygiène et épidémiologie).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

— **de deux correspondants nationaux, dans la 3ème division,** en remplacement de MM. Charles Mérieux et Robert Bonniot de Ruisselet, nommés honoraires.

MM. Michel Dumas (Limoges) et Dominique Richard-Lenoble (Tours), sont élus.

— **d'un correspondant de l'Ile-de-France, dans la 3ème division,** en remplacement de Mme Monique Astier-Dumas, nommée honoraire.

M. Yves Buisson est élu.

— **d'un membre titulaire, dans la 4ème section (Sciences biologiques)**, en remplacement de M. Jean Dausset, nommé émérite.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. André Bonnin,

— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Bernard Pessac, Alain Pompidou et Bernard Swynghedauw.

Il est procédé à un *Premier tour* de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	109
	suffrages exprimés :	108
	majorité :	55
ont obtenu : MM.	Bonnin	48
	Pessac	23
	Pompidou	25
	Swynghedauw	9
	Bulletins blancs marqués d'une croix	3
	Bulletin nul	1
		109

Deuxième tour

	nombre de votants :	108
	suffrages exprimés :	105
	majorité :	53
ont obtenu : MM.	Bonnin	59
	Pessac	16
	Pompidou	24
	Swynghedauw	3
	Bulletins blancs marqués d'une croix	3
	Bulletins nuls	3
		108

M. André Bonnin, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 4ème section (Sciences Biologiques).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

— **d'un membre titulaire, dans la 7ème section (Médecine sociale et membres libres),** en remplacement de M. Jean-Charles Sournia, décédé.

La section présente aux suffrages de l'Académie les candidats dans l'ordre suivant :

— en première ligne : M. Gérard Milhaud,

— en deuxième ligne et par ordre alphabétique : MM. Maurice Marois et Guy Nicolas.

Il est procédé à *un tour* de scrutin qui donne les résultats suivants :

	nombre de votants :	109
	suffrages exprimés :	108
	majorité :	55
ont obtenu : MM.	MILHAUD	75
	MAROIS	6
	NICOLAS	25
	Bulletins blancs marqués d'une croix	2
	Bulletin nul	1
		109

M. Gérard MILHAUD, ayant obtenu la majorité absolue des suffrages exprimés, est proclamé élu membre titulaire dans la 7ème section (Médecine sociale et membres libres).

Son élection sera soumise à l'approbation de Monsieur le Président de la République.

— **d'un correspondant national**, **dans la 7e division,** en remplacement de M. Alain RAYNAUD, nommé honoraire.

M. Georges CHARPAK (Genève), est élu.

BULLETIN DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le Secrétaire perpétuel et le Secrétaire-adjoint, assistés d'un Comité de Lecture, sont responsables de la publication du *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*. Pour chacun des textes qui ont été acceptés et présentés, l'Académie prend en charge huit pages du Bulletin soit 26 500 caractères. Tout dépassement sera facturé à l'auteur à raison de 400 francs la page.

Le texte fourni en trois exemplaires sera structuré en paragraphes homogènes, en évitant le style télégraphique, l'abus des alinéas, les successions de mots ou de phrases précédées d'un tiret, une numérotation superflue des propositions. Les titres et sous-titres seront détachés. Les signes et abréviations seront explicités lors de leur première apparition dans le texte. Les molécules (médicaments ou non) apparaîtront sous leur dénomination commune internationale.

Les communications seront rédigées suivant la norme scientifique en chapitres distincts : introduction, malades et méthodes, résultats, discussion. Pour les lectures, l'agencement des paragraphes doit faire apparaître la structure de l'exposé et les étapes du raisonnement.

Le titre en français de l'article figurera sur une première page, avec le prénom et le nom des auteurs ainsi que leur adresse et le lieu où pourront être demandés les tirés-à-part. Le résumé français sera accompagné des mots-clés répertoriés à l'*Index Medicus*. Le titre en anglais et un résumé anglais plus détaillé que le résumé français seront joints.

L'iconographie sera limitée à 4 tableaux ou documents photographiques. Chacun portera au dos un numéro et une indication de positionnement. Les légendes seront rédigées sur une feuille indépendante, numérotées suivant leur ordre dans le texte. Les diapositives seront tirées sur papier.

La bibliographie sera classée suivant l'ordre d'apparition dans le texte.

La version définitive devra être transmise par e-mail ou par voie postale, accompagnée d'une disquette. La correction des épreuves sera exclusivement d'ordre typographique. Toute modification du texte initial sera facturée à l'auteur.

Trente tirés-à-part seront fournis gratuitement. Des tirés-à-part supplémentaires peuvent être exécutés aux frais des auteurs.

Avant d'entreprendre la rédaction de leur texte, les auteurs sont invités à se procurer les « Consignes détaillées », à l'adresse ci-dessous

Secrétariat de l'Académie nationale de médecine
16, rue Bonaparte
75272 Paris Cedex 06
Tél : 01.42.34.57.73 — Fax : 01.40.46.87.55
Email : yvette.lahouati@academie-medecine.fr

Bulletin de l'Académie nationale de médecine

TARIFS D'ABONNEMENT 2002 (9 numéros par an)	
France :	850 F (129,58 Euros)
Autres pays :	900 F (137,20 Euros)
Membres ANM :	700 F (106,71 Euros)
Institutionnels France	1250 F (190,56 Euros)
Autres pays :	1325 F (201,99 Euros)

Les abonnements partent du premier numéro de l'année

The subscription begin with the first issue of calendar year

Mme, Mlle, M. (rayer les mentions inutiles)

Nom _____ **Prénom** _____

Adresse _____

_____

code Postal _____ **Ville** _____

Pays _____

A retourner ou à faxer à
ÉDITIONS SCIENTIFIQUES ET MÉDICALES ELSEVIER
23, rue Linois, 75724 Paris Cedex 15 - France
Service abonnements/Subscription department
à l'attention de Mme DUNOYER
Tél : (33) 1 71 72 45 64 - Fax : (33) 1 71 72 46 64
E-mail : abt2@elsevier.fr

Veuillez trouver ci-joint mon chèque d'un montant de..... à l'ordre des Editions Elsevier

Veuillez débiter ma carte de crédit (CB, MasterCard, EuroCard ou Visa) pour un montant de.....

N° _____ Expire fin _____

Signature : ☐ Je souhaite recevoir une facture acquittée

Numéros séparés de l'année et volumes antérieurs : 120 F ou 18,29 Euros
Back issue and volume

Conformément à l'article 27 de la loi informatique et Libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification des données vous concernant.
Sauf opposition de votre part, ces informations pourront être utilisées par des tiers.

Printed in France *Le Directeur de la publication* M. Louis AUQUIER.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays.

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective », et d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinée 1er de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

© 2002, Académie de Médecine, Paris

Imprimé par l'Imprimerie F. Paillart
86, chaussée Marcadé 80100 Abbeville
Académie de Médecine, éditeur, Paris — Dépôt légal 3e trimestre 2002 — N° 0190.
commission paritaire n° 787 AD