

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1990

THESE N° 212

**INTERET DE LA REALISATION D'UN "PROFIL
AMNIOTIQUE" DANS L'ESTIMATION
DE LA MATURITE PULMONAIRE FOETALE
ETUDE REALISEE A PARTIR DE TRENTE CAS**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le : 21 Décembre 1990

Par

Thierry CHIANEA

né le 1 Janvier 1960 à SALAMBO (TUNISIE)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Mme. Le Professeur TIXIER
M. Le Professeur BRETON
M. Le Professeur NICOLAS
M. MOTTA
Mme. FOURNIER

Président
Juge
Juge
Juge
Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
- ASSESSEURS :
 - Monsieur le Professeur GHESTEM (1er assesseur)
 - Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2ème assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

. PROFESSEURS DES UNIVERSITES

| | |
|---------------------------|--|
| BENEYTOUT Jean-Louis | Biochimie |
| BERNARD Michel | Physique-Biophysique |
| BROSSARD Claude | Pharmacotechnie |
| BUXERAUD Jacques | Chimie Organique, Chimie Thérapeutique |
| CHULIA Albert | Pharmacognosie |
| CHULIA Dominique | Pharmacotechnie |
| DELAGE Christiane | Chimie Générale et Minérale |
| GALEN François-Xavier | Physiologie |
| GHESTEM Axel | Botanique et Cryptogamie |
| GUICHARD Claude | Toxicologie |
| HABRIOUX Gérard | Biochimie fondamentale |
| LEFORT des YLOUSES Daniel | Pharmacie Galénique |
| NICOLAS Jean Albert | Bactériologie et Virologie, Parasitologie |
| LOUDART Nicole | Pharmacodynamie |
| PENICAUT Bernard | Chimie Analytique et Bromatologie |
| RABY Claude | Pharmacie Chimique et Chimie Organique |
| TIXIER Marie | Biochimie |

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS

CELS René

A Muriel

A Hugo et Madely

A mes Parents

A mon Frère

A ma Famille

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Madame le Professeur TIXIER
Professeur des Universités de Biochimie
Praticien Hospitalier

Nous vous remercions du très grand honneur
que vous nous faites en acceptant de présider
notre jury.

Vous nous avez toujours accueilli
chaleureusement et nous avez prodigué
enseignements et conseils éclairés.

Veillez trouver ici le témoignage de notre
profond respect

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le Professeur BRETON
Professeur des Universités de Biochimie
Chef de Service

Vous nous avez accueilli dans votre
laboratoire et êtes à l'origine de ce
travail.

Nous avons été marqué par la richesse de vos
connaissances biochimiques.

Qu'il nous soit permis ici de vous remercier
et de vous exprimer notre respectueuse
considération.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur NICOLAS
Professeur des Universités de Bactériologie-
Virologie-Parasitologie

Nous sommes très sensible à votre présence
dans ce jury.

Nous avons pu découvrir grâce à l'étendue de
vos connaissances cette discipline
passionnante qu'est la biologie.

Veillez trouver ici l'assurance de notre
entière reconnaissance et de notre profond
respect.

Monsieur MOTTA

Maître de Conférences des Universités de Biochimie

Praticien Hospitalier

Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à notre travail, nous sommes très honorés que vous acceptiez de le juger.

Nous avons été très sensible à la grande gentillesse avec laquelle vous nous avez toujours accueilli dans votre laboratoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos remerciements chaleureux.

Madame FOURNIE

Pharmacien Biologiste

C'est avec beaucoup de spontanéité que vous avez accepté de faire partie de notre jury. Nous avons apprécié les qualités humaines et de rigueur scientifique avec lesquelles vous dirigez votre laboratoire. Veuillez trouver ici l'assurance de notre sincère reconnaissance.

A Jacques MONTEIL mon complice.

A Pierre CHEBROUX pour tout ce que je lui dois et
en gage de mon amitié.

Au Professeur TABASTE dont le dynamisme m'a été
d'une aide précieuse au cours de l'élaboration de
ce travail.

A mes amis de la spécialité.

A Alain, Viviane, Philippe et Monique du
laboratoire de Biochimie.

A Dominique du laboratoire d'Anatomie.

A Jacques COLLET et à mes amitiés athlétiques pour
dix années de passion, de rires et de rêves.

A mes amitiés mahoraises et réunionnaises

Je dédie ce travail

PLAN

INTRODUCTION

1ère PARTIE : GENERALITES

I - PHYSIOLOGIE DU SURFACTANT PULMONAIRE

A - Rappels anatomiques

- 1) - Anatomie fonctionnelle du poumon
- 2) - Le lobule pulmonaire
- 3) - L'alvéole pulmonaire
- 4) - Le système du surfactant
 - 4.1) - Les pneumocytes de type I
 - 4.2) - Les pneumocytes de type II
 - 4.3) - Le film de surface alvéolaire ou surfactant

B - Biosynthèse du surfactant pulmonaire

- 1) - Synthèse du surfactant pulmonaire
- 2) - Déterminisme de la synthèse du surfactant pulmonaire

C - Rôles du surfactant pulmonaire

- 1) - Rôle du surfactant pulmonaire dans les mécanismes de défense
- 2) - Rôle du surfactant pulmonaire dans le maintien de la structure alvéolaire

II - PHYSIOLOGIE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

A - Origine du liquide amniotique

- 1) - Origine foetale
- 2) - Origine amniotique

3) - Origine maternelle

B - La résorption du liquide amniotique

1) - Résorption par déglutition du liquide amniotique par le foetus

2) - Réabsorption par l'épithélium amniotique

C - Rôle physiologique du liquide amniotique

1) - Pendant la grossesse

2) - Pendant l'accouchement

D - Caractères physiques du liquide amniotique

E - Composition chimique du liquide amniotique

1) - Eléments minéraux

2) - Eléments organiques

III - STRUCTURE ET PROPRIETES DES PRINCIPAUX LIPIDES MIS EN EVIDENCE DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA MATURITE PULMONAIRE FOETALE

A - Classification des lipides

1) - Les lipides simples

2) - Les lipides phosphorés ou phospholipides

3) - Les lipides azotés non phosphorés

4) - Les lipides soufrés

B - Structure et propriétés des acides gras

C - Structure et propriétés des phospholipides

1) - Les glycérophospholipides

2) - les sphingophospholipides

IIème PARTIE : ANALYSE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

I - LES AMNIOCENTESES

A - Indications

- 1) - Amniocentèse précoce
- 2) - Amniocentèse tardive

B - Techniques

- 1) - Amniocentèse précoce
- 2) - Amniocentèse tardive

C - Risques obstétricaux

II - LES PRINCIPALES METHODES D'ANALYSE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

A - Méthodes biochimiques

- 1) - Généralités
- 2) - Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM)
- 3) - Méthodes d'estimation de la maturité pulmonaire foetale utilisant la CCM
 - 3.1) - Rapport lécithine sur sphingomyéline (L/S)
 - 3.1.1. Méthodes
 - 3.1.2. Intérêt du rapport L/S
 - 3.2) - Rapport lécithines précipitables/ sphingomyélines
 - 3.3) - Dosage des lécithines
 - 3.4) - Mise en évidence du PG - PI - PS - PE
- 4) - Principe de la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

- 5) - Détermination de la maturité pulmonaire foetale
par CPG

Rapport palmitate sur stéarate (P/S)

B - Méthodes physiques

- 1) - Mesure de la tension superficielle du liquide
amniotique
- 2) - Mise en évidence du pouvoir émulsionnant des
lécithines
- 3) - Densité optique à 650 nm
- 4) - Etude des "lamellar bodies"
- 5) - Microviscosité par polarisation de fluorescence
 - 5.1) - Principe de la polarisation de fluorescence
 - 5.2) - Détermination de la polarisation de
fluorescence du liquide amniotique

C) - Méthodes immunologiques

IIIème PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

I - METHODES RETENUES

A - Rapport L/S

1) - Raisons d'utilisation

2) - Méthode utilisée

2.1) - Extraction des phospholipides du liquide
amniotique

2.2) - Chromatographie des phospholipides

2.3) - Révélation

2.4) - Résultats

3) - Limites de la méthode

B - Rapport P/S

1) - Raisons d'utilisation

2) - Méthode utilisée

2.1) - Extraction des phospholipides

2.2) - Hydrolyse des phospholipides

2.3) - Méthylation des acides gras

2.4) - Séparation des acides gras par CPG

2.5) - Résultats

3) - Limites de la méthode

C - Microviscosité par polarisation de fluorescence

1) - Raisons d'utilisation

2) - Méthode utilisée

2.1) - Préparation des réactifs

2.2) - Traitement des échantillons

2.3) - Lecture du degré de polarisation P ou
de l'anisotropie (r) et calcul de
l'anisotropie corrigée

2.4) - Résultats

3) - Limites de la méthode

D - Détermination du phosphatidyl glycérol par agglutination immunologique

1) - Raisons d'utilisation

2) - Méthode utilisée

2.1) - Réactifs

2.2) - Traitement des échantillons

2.3) - Lecture des réactions d'agglutination

2.4) - Résultats

3) - Limites de la méthode

II - RESULTATS PERSONNELS

A - Population étudiée

1) - Répartition des pathologies observées

2) - Profils amniotiques obtenus

B - Interprétation des résultats

1) - Etude des profils obtenus

2) - Discussion

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Pendant toute la durée de la gestation, le placenta assure les fonctions de nutritives, d'échanges thermiques, d'épuration et de respiration. L'embryon puis le fœtus se développent et mûrissent progressivement jusqu'à la naissance, qui représente le passage de la vie aquatique à la vie aérienne.

Cet instant implique une adaptation immédiate des fonctions respiratoires et de la perfusion pulmonaire.

Pendant la vie fœtale les échanges gazeux sont assurés par diffusion à travers la membrane placentaire, l'adaptation respiratoire s'effectuant en quatre étapes (BONNET - 1984) :

- Etape embryonnaire (3^{ème} à 6^{ème} semaine)
- Etape pseudoglandulaire (6^{ème} à 17^{ème} semaine)
- Etape canaliculaire (17^{ème} à 24^{ème} semaine)
- Etape alvéolaire (24^{ème} semaine au terme).

Ce n'est qu'au delà de la 26/28^{ème} semaine que la surface d'échange est suffisante pour assurer après la naissance les transferts gazeux respiratoires (BONNET - 1984).

La vie fœtale s'accompagne d'une sécrétion permanente de liquide par les cellules épithéliales alvéolaires (2,4 ml/Kg/h), ce liquide est déversé par à coups dans la cavité amniotique. Après la 35^{ème} semaine de gestation il aura la composition définitive du surfactant pulmonaire (ALCINDOR - 1984) ainsi que ses propriétés tensio-actives. Un trouble ou un déficit de sa synthèse entraîne des pathologies respiratoires dramatiques. Les

affections respiratoires chez le nouveau-né sont les plus graves et les plus fréquentes (MAGNY - 1988) (3 à 4 % des naissances) de toutes celles rencontrées à cette période de la vie, elles viennent aussi au premier rang de la pathologie dans les services de réanimation néo natale (PERELMAN - 1982). Le prématuré étant bien évidemment plus touché que le nouveau-né à terme.

La maladie des membranes hyalines (MMH) qui appartient au groupe des détresses respiratoires d'origine pulmonaire concerne à elle seule :

- 1 % des naissances à terme
- 30 % des naissances prématurées (BONNET - 1984)

Elle a une incidence plus particulière chez le garçon que chez la fille (1/2), et c'est de plus la première cause de mortalité touchant le prématuré (GOLDE - 1980).

L'étiologie en est connue, il s'agit d'une déficience transitoire du surfactant pulmonaire en relation avec la prématurité, déficience déclenchée, entretenue ou aggravée par l'hypoxie ou l'asphyxie périnatale (figure 1). Un certain nombre d'autres facteurs peuvent entraîner cette insuffisance de synthèse du surfactant et notamment :

- le diabète maternel
- la transsudation des protéines plasmatiques dans l'espace alvéolaire
- l'oedème pulmonaire
- la toxémie gravidique
- les césariennes.

Néanmoins cette déficience en surfactant peut être prédite

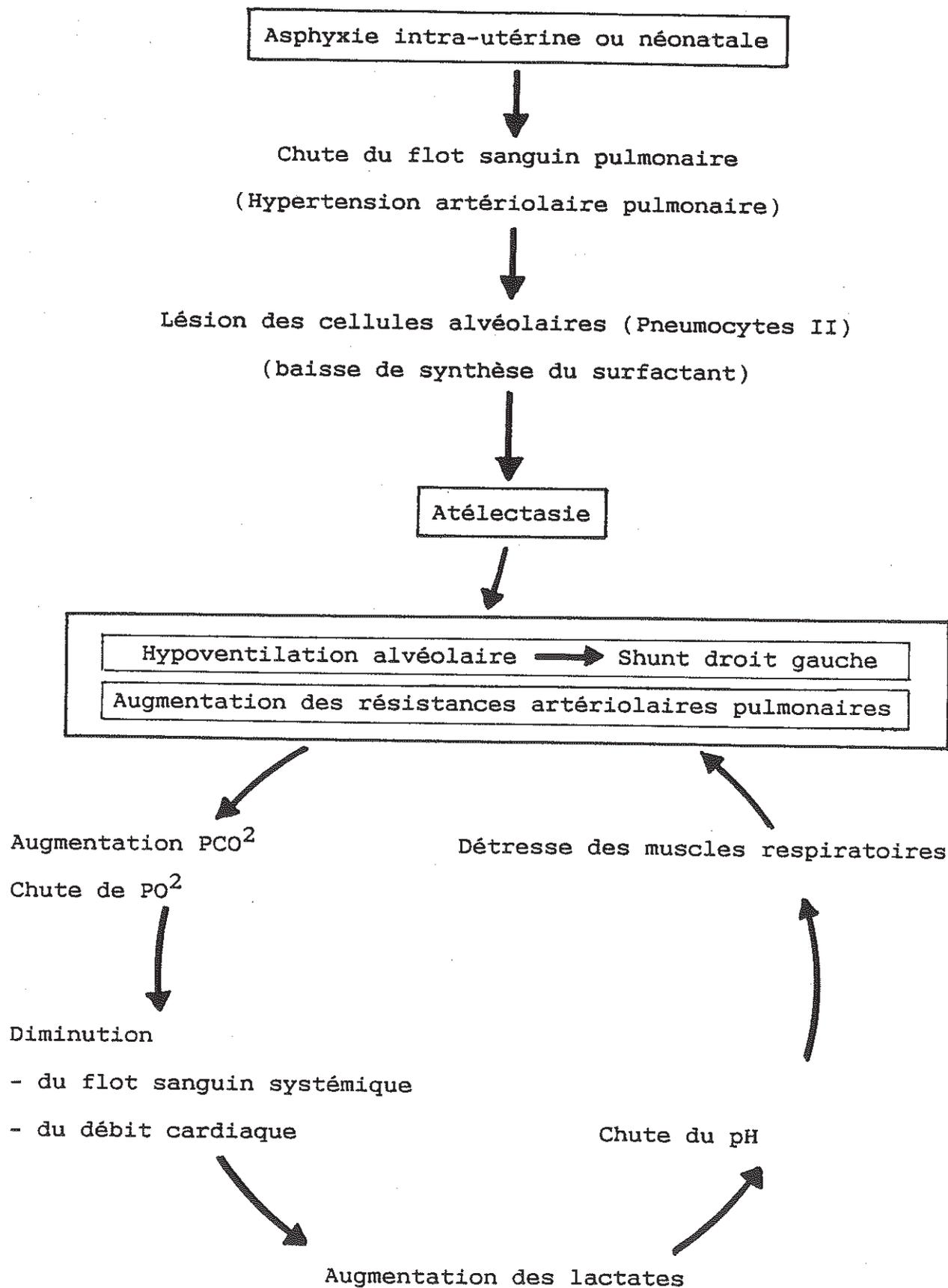


Figure 1 : Etiopathogénie des membranes hyalines

avant l'accouchement par la réalisation, à partir de ponction de liquide amniotique, d'un certain nombre de tests tels que :

- Détermination du rapport lécithines/sphingomyéline
- Détermination du rapport palmitate/stéarate
- Estimation du phosphatidyl-glycérol
- Etude de la microviscosité du liquide amniotique par polarisation de fluorescence.

D'une façon générale, une amniocentèse est pratiquée chez toute femme pour laquelle une interruption de grossesse est envisagée avant la 35ème semaine de gestation afin de prévoir une éventuelle détresse respiratoire du prématuré. Le risque étant déterminé, trois actions peuvent être envisagées :

- Diminution de la prématurité (ce n'est pas toujours possible)
- Augmentation de la qualité de l'accouchement pour diminuer l'asphyxie périnatale, monitoring lors de tout accouchement d'un prématuré avec surveillance du coeur et du pH foetal, césarienne en cas de souffrance foetale.
- Induction hormonale de la maturité pulmonaire par la corticothérapie ou thérapie substitutive à la naissance surfactant pulmonaire naturel (JIN - 1989, LANG - 1990) ou artificiel (BHAT - 1989).

Le présent travail, a pour objet, de comparer les différents tests qui permettent d'apprécier la maturité pulmonaire foetale.

Cette étude a été réalisée à partir de trente cas de patientes, présentant toutes une menace d'accouchement prématuré

(MAP), plus ou moins bien contrôlée. Toutes ont eu au moins une amniocentèse, entre la 34ème et la 38ème semaine d'aménorrhée théorique.

1ère PARTIE : GENERALITES

I - PHYSIOLOGIE DU SURFACTANT PULMONAIRE

On ne peut envisager et comprendre le rôle joué par le surfactant pulmonaire au cours du processus respiratoire si l'on n'aborde pas cet élément par l'étude préalable de son environnement naturel : le Poumon.

A - Rappels anatomiques

Le thorax peut être considéré comme l'enceinte creuse qui communique avec l'air ambiant par les voies aériennes. Cette enceinte étant déformable et élastique (DEJOURS - 1982).

Les deux poumons sont séparés de la paroi thoracique, du diaphragme et des viscères médiastinaux par une séreuse, dont le feuillet profond enveloppe les poumons et le feuillet superficiel recouvre la paroi et les viscères médiastinaux.

Les poumons sont divisés en lobes par des scissures.

- A droite : trois lobes : le lobe supérieur, le lobe moyen, le lobe inférieur
- A gauche : deux lobes : le lobe supérieur et le lobe inférieur.

Les lobes sont eux mêmes divisés en segments. Chaque segment représente le territoire parenchymateux de forme pyramidale qui correspond à la branche segmentaire tributaire. Il existe au niveau de chaque poumon dix segments numérotés de un à dix.

1) - Anatomie fonctionnelle du poumon

Le poumon peut schématiquement être ramené à un modèle divisé en trois zones (BROUET - 1976) (Figure 2).

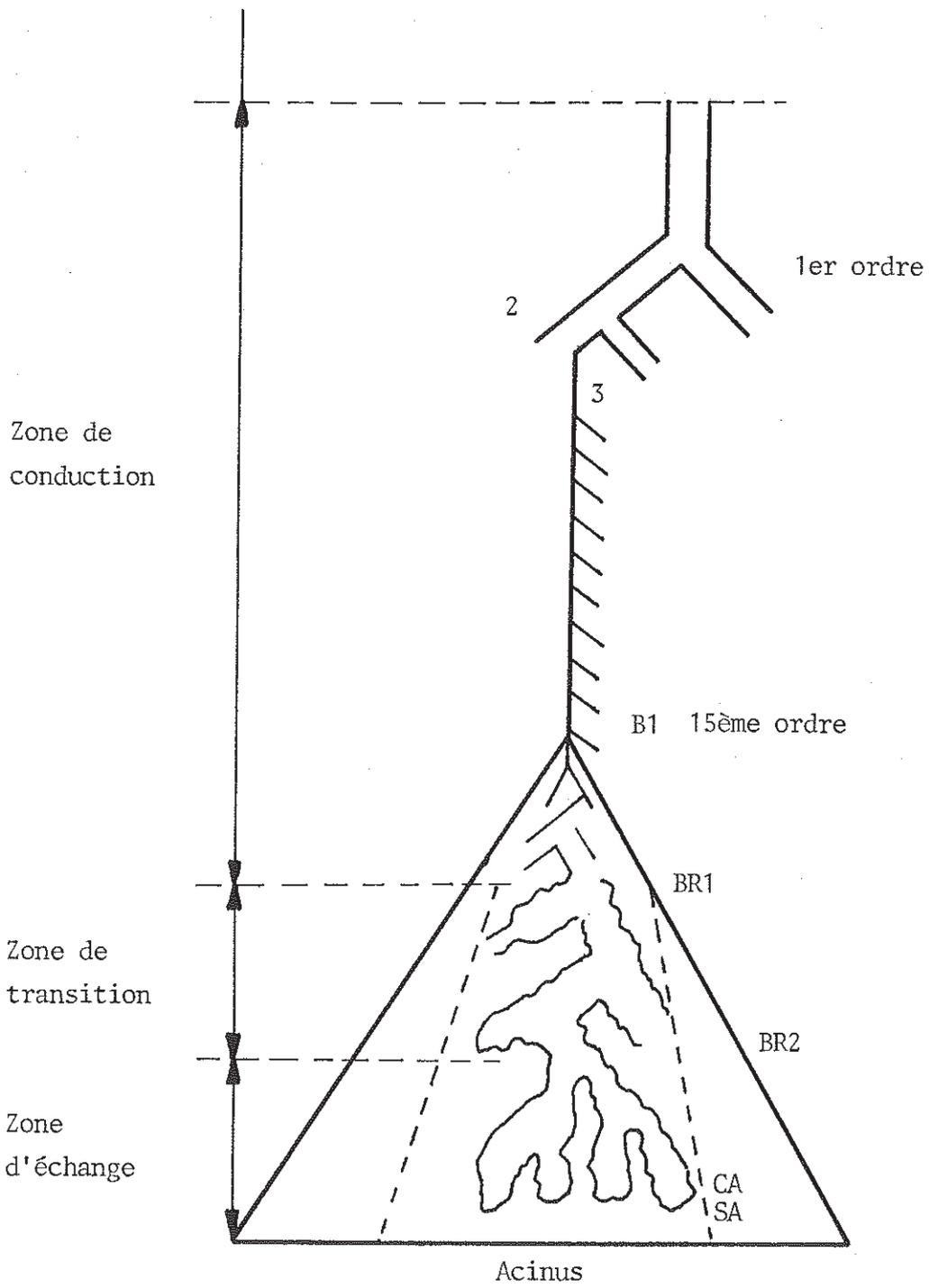


Figure 2 : Lobule secondaire de MILLER

- une zone de conduction ou de convection allant du nez et de la bouche jusqu'à la bronchiole terminale (BT). Le transfert des molécules gazeuses se faisant par transport de masse par l'intermédiaire des phénomènes mécaniques en rapport avec les mouvements de la cage thoracique.

- une zone de diffusion : à la partie distale alvéolisée du poumon où le transfert des molécules se fait par diffusion moléculaire passive suivant un gradient de concentration.

- une zone intermédiaire ou de transition où interviennent les deux mécanismes.

L'arbre bronchique présente un mode de division par dichotomie asymétrique, dans lequel il est habituel d'attribuer à la trachée le numéro 0, à la bronche principale le n° 1 ; aux bronches lobaires le n° 2, aux bronches segmentaires le n° 3 etc... L'arbre bronchique de conduction allant jusqu'à la bronchiole terminale de 15ème ordre (il en existe environ trente mille) (figure 3).

2) - Le lobe pulmonaire (figure 2)

Les bronches intralobulaires d'un diamètre de l'ordre du millimètre donnent naissance aux bronchioles proprement dites ou terminales qui se continuent par les bronchioles dites de transition ou bronchioles respiratoires de 1er, 2ème puis 3ème ordre (BR1, BR2, BR3). Celles-ci se terminent par les canaux alvéolaires (CA) et les culs de sac alvéolaires (SA).

Sur les bronchioles alvéolaires, sur les canaux et les sacs alvéolaires s'ouvrent les alvéoles pulmonaires au niveau d'une partie un peu retrécie dite collet de l'alvéole.

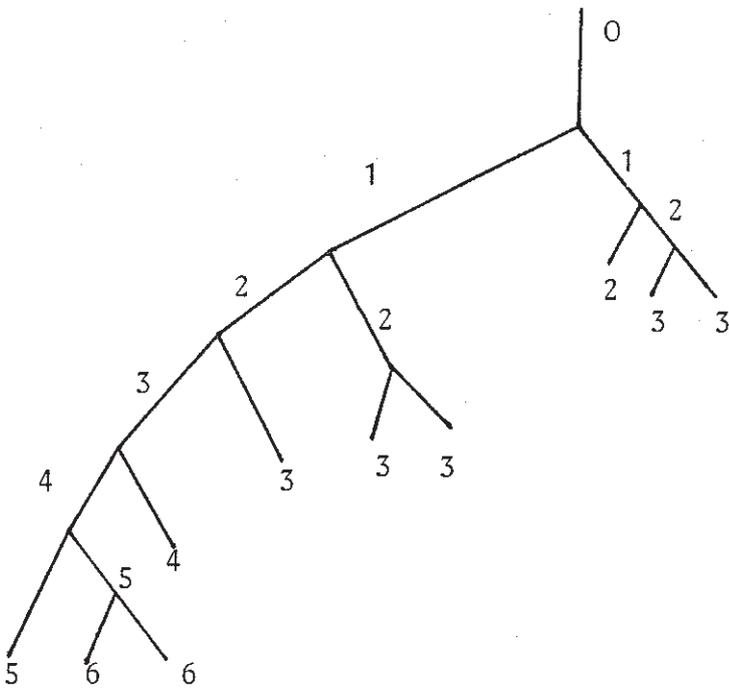


Figure 3 : Mode de division de l'arbre bronchique

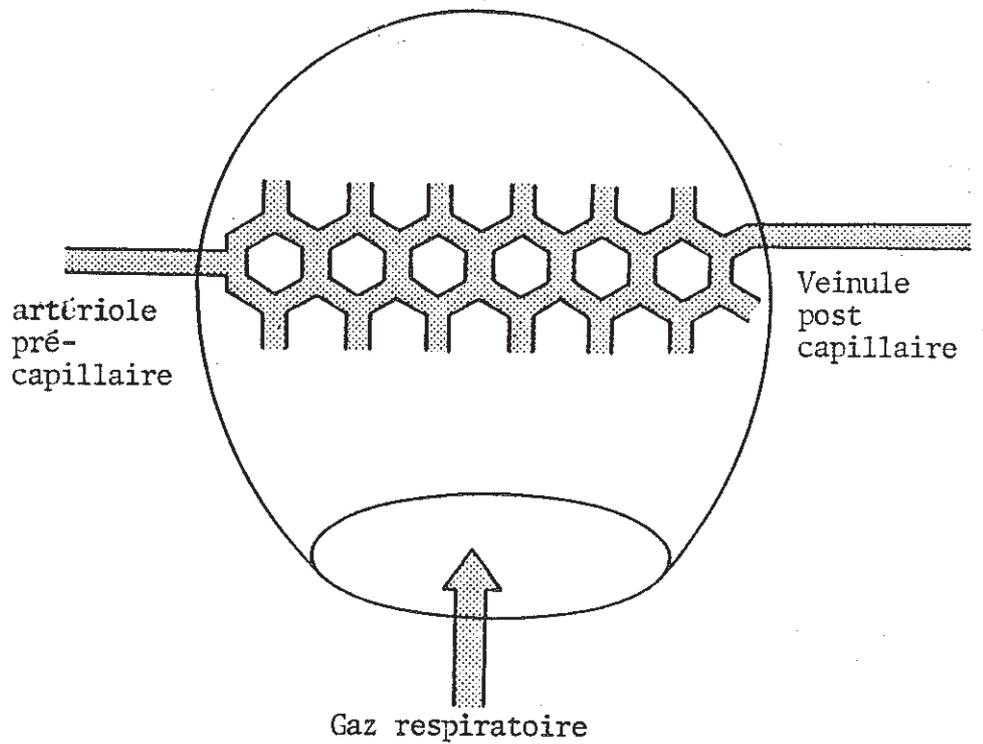


Figure 4 : L'alvéole pulmonaire

L'ensemble canal alvéolaire et alvéoles constitue l'acinus ou lobule primaire (diamètre un à huit mm), appendu à une bronchiole respiratoire, cinquante à cent cinquante lobules primaires constituent le lobule pulmonaire secondaire de Miller.

3) - L'alvéole pulmonaire

Les alvéoles ont un diamètre moyen de deux cent cinquante microns et sont au nombre approximatif de trois cents millions. A la naissance cependant ce nombre est beaucoup moins important.

Dans le poumon normal l'alvéole peut être assimilée à un 5/6 de sphère (figure 4) et la surface interne alvéolaire (SIA) c'est à dire la surface d'échange entre l'air et le sang capillaire peut être mesurée : elle est en moyenne de 70 m² chez l'adulte. La surface totale des capillaires situés dans les cloisons alvéolaires, est du même ordre de grandeur, et réalise un réseau très serré, de mailles hexagonales (figure 4).

La paroi qui sépare le sang capillaire du gaz alvéolaire est très fine, son épaisseur est variable, mais généralement inférieure à un micromètre. Sa face alvéolaire est recouverte d'un film liquide continu : le surfactant pulmonaire.

4) - Le système du surfactant

Le système du surfactant est constitué d'un film liquidien s'étalant à la surface des alvéoles et des différents type de pneumocytes.

4.1) - Les pneumocytes de type I

Ils recouvrent à peu près 95 % de la surface totale de l'alvéole. Ces cellules pauvres en organites, sont caractérisées par leurs voiles cytoplasmiques minces et étendus (de 0,1 à 0,2 μ m d'épaisseur) qui se chevauchent sur une surface plus ou moins importante, et glissent vraisemblablement les uns par rapport aux autres, lors des mouvements respiratoires. Ces cellules enchassent les pneumocytes de type II dans leurs voiles cytoplasmiques.

Les pneumocytes de type I reposent sur une lame basale continue, qui est largement fusionnée avec la lame basale de l'endothélium des capillaires alvéolaires.

Ainsi l'endothélium capillaire, la lame basale commune et le cytoplasme des pneumocytes constituent la membrane alvéolo-capillaire où se font les échanges gazeux.

Les pneumocytes de type I apparaissent incapables de se diviser. Le renouvellement de ces cellules se ferait à partir des pneumocytes de type II et, peut être, à partir d'une cellule souche commune indifférenciée.

4.2) - Les pneumocytes de type II

Ils ont une forme cubique et un diamètre cinq fois inférieur à celui des pneumocytes de type I (50 μ m). Ils sont disposés isolément, ou par deux ou trois cellules dans le revêtement alvéolaire. Leur surface est hérissée de microvillosités.

A côté d'un reticulum endoplasmique granulaire bien développé, ils renferment des ribosomes libres, des mitochondries, des lysosomes, des corps multivésiculaires et un appareil

de Golgi volumineux. Le pneumocyte de type II se caractérise par la présence de corps lamellaires de 0,2 à 2 μm de diamètre occupant le 1/4 de son cytoplasme.

Les corps lamellaires vus en microscopie électronique et la structure du surfactant alvéolaire montrent des similitudes avec la dispersion de corps phospholipidiques ou phospholipoprotéiques en phase aqueuse.

Le pneumocyte de type II libère directement le contenu des corps lamellaires dans la cavité alvéolaire (BATZENSCHLAGER - 1988).

4.3) - Le film de surface alvéolaire ou surfactant

Son existence a d'abord été soupçonnée à partir d'expérimentation physicochimiques et physiologiques qui ont aboutit à la notion d'un film liquidien monomoléculaire à haute activité tensio-active pour empêcher le collapsus alvéolaire.

Ce n'est que récemment, grâce à l'apport de la microscopie électronique, que l'on a pu le mettre en évidence. Il comporte en fait deux phases :

- un mince film de surface osmiophile de nature phospholipidique reposant sur :
- une hypophase non osmiophile riche en mucopolysaccharides de structure lâche et d'épaisseur variable, reposant directement sur la membrane des cellules épithéliales alvéolaires et comblant les irrégularités de la surface du revêtement.

B - Biosynthèse du surfactant pulmonaire

1) - Synthèse du surfactant pulmonaire

Les examens autoradiographiques laissent supposer que les précurseurs du surfactant sont amenés aux pneumocytes de type II par l'intermédiaire des capillaires sanguins.

L'acide palmitique et la choline marqués, administrés par voie intraveineuse, apparaissent après quelques minutes dans le reticulum endoplasmique et dans le complexe Golgien du pneumocyte de type II. Il existe probablement une synthèse continue dans les corps lamellaires. La réutilisation du surfactant éliminé serait un élément important dans le métabolisme de la fraction phospholipidique du surfactant.

La quantité totale de surfactant dans le poumon est très faible. Seuls 3 % de la barrière air-sang sont constitués de surfactant. Il y a environ 50 mm³ de surfactant par mètre carré de surface alvéolaire. Le surfactant n'est pas une substance chimiquement pure, mais un mélange de lipides, protéines et hydrates de carbone. La fraction lipidique représentant environ 90 % et les protéines 10 % de la quantité totale (FRANCOUAL - 1987).

La fraction lipidique est constituée de

| | |
|---|------|
| - Lécithines saturées (90 % de dipalmitoyl-lécithine) | 40 % |
| - Lécithines non saturées | 25 % |
| - Cholestérol | 8 % |
| - Phosphatidylglycérol et phosphatidylsérine | 8 % |
| - Phosphatidyléthanolamine | 3 % |
| - Glycérides | 3 % |
| - Lysolécithine | 1 % |
| - Sphingomyéline | 1 % |
| - Acides gras libres | 1 % |

La synthèse des phospholipides est cortico-dépendante.

La fraction protéique comprend :

3 protéines qui exercent vraisemblablement une influence sur l'état d'agrégation des phospholipides.

- L'albumine de PM 69.000
- une protéine de PM 35.000
- une protéine de PM 10.000

La dernière protéine étant vraisemblablement un produit de dégradation de la protéine de PM 35.000 (BATZENSCHLAGER - 1988)

2) - Déterminisme de la synthèse du surfactant pulmonaire

Les mécanismes qui déterminent la production du surfactant ne sont pas totalement élucidés. Les recherches montrent que l'acétylcholine, certains médiateurs et des prostaglandines participent à la régulation de la production du surfactant

(BATZENSCHLAGER - 1988).

Les voies d'élimination, étudiées par autoradiographie, sont les suivantes :

- Evacuation du surfactant par le système bronchique.
- Elimination par les macrophages alvéolaires qui sont en mesure de dégrader le matériel surfactant phagocyté par hydrolyse phospholipasique (ALCINDOR - 1984).
- Transport du surfactant jusqu'aux lymphatiques.
- Réincorporation dans les cellules alvéolaires et recyclage (COMROE - 1978).

C - Rôles du surfactant pulmonaire

1) - Rôle du surfactant dans les mécanismes de défense

Le surfactant évite le dessèchement de l'hypophase alvéolaire ; sans lui, et du fait de l'intensité des échanges respiratoires, l'alvéole serait rapidement desséchée et directement exposée aux toxines exogènes. Le surfactant joue donc ainsi un rôle dans les mécanismes de défense (BATZENSCHLAGER - 1988).

2) - Rôle du surfactant dans le maintien de la structure alvéolaire

Au cours des cycles respiratoires, le volume des alvéoles pulmonaires augmente à l'inspiration et diminue à l'expiration ce qui conduit à la formation d'une importante tension superficielle à l'interface air liquide alvéolaire (FRANCOUAL - 1987).

Le surfactant pulmonaire est un matériel doué de propriétés tensio-actives, qui empêchent le collapsus alvéolaire en diminuant la tension de surface quand la taille de l'alvéole diminue. Il permet de plus de maintenir l'intégrité et la stabilité membranaire.

C'est chez le nouveau-né, au moment de la première inspiration que le surfactant joue le rôle le plus important. En effet la tension superficielle est maximale dans les alvéoles non encore dépliées du fœtus, s'il existe un déficit en surfactant au moment de la naissance, les alvéoles ne se déplieront pas ce qui entraînera la formation de membranes hyalines.

Si la synthèse de surfactant débute tôt au cours du développement embryonnaire c'est à partir de la 35ème semaine que la concentration en lécithines et en phosphatidylglycérol augmente brusquement ce qui confère au surfactant ces propriétés tensio-actives (ALCINDOR - 1984). C'est pourquoi avant trente cinq semaines de gestation on ne peut guère espérer un déplissement des alvéoles chez un prématuré.

II - PHYSIOLOGIE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

A - L'origine du liquide amniotique

L'origine du liquide amniotique est assez complexe, elle est néanmoins essentiellement foetale (MERGER - 1989).

1) - Origine foetale

Au début de la grossesse le liquide amniotique n'est qu'une expansion du liquide extracellulaire du fœtus. Plus tard, il provient des sécrétions rénales. Toutefois sa composition est différente de celle de l'urine. A terme, 7 ml/kg/heure sont excrétés par le fœtus. Viennent s'y ajouter au cours du dernier trimestre des sécrétions pulmonaires.

2) - Origine amniotique

Le liquide amniotique serait aussi secrété par l'amnios, les études microscopiques et histochimiques de l'épithélium amniotique ont montré des images de sécrétion cellulaire sans que la preuve formelle de la sécrétion soit encore faite.

Un autre mécanisme est invoqué la transsudation de liquide à partir du sang foetal contenu dans les vaisseaux villositaires (ce mécanisme ne semble intervenir que dans certains cas pathologiques).

3) - Origine maternelle

La transsudation de liquide d'origine maternelle à travers les membranes ovulaires est certaine. Elle est prédominante dans les premiers jours de grossesse (POLONOVSKI - 1977). En définitive, l'origine du liquide est mixte : maternelle et surtout foetale.

B - La résorption du liquide amniotique

Deux mécanismes peuvent expliquer la résorption du liquide amniotique.

1) - Résorption par déglutition du liquide amniotique par le foetus

Le liquide dégluti est absorbé par l'intestin, parvenu dans le sang foetal il traverse la barrière placentaire, emprunte la circulation maternelle et est éliminé par les reins maternels. On estime que le foetus déglutit environ cinq cents millilitres de liquide amniotique par vingt quatre heures (MERGER - 1989).

2) - La réabsorption par l'épithélium amniotique

Certaines substances telles que l'eau et les glucides sont réabsorbées par un processus actif par l'épithélium amniotique. Ainsi s'établit entre production et résorption un équilibre maintenant une volamnie à peu près constante qui est d'environ cinq cents à sept cent cinquante millilitres à terme.

C - Rôle physiologique du liquide amniotique

Il est différent pendant la grossesse et pendant l'accouchement.

1) - Pendant la grossesse

Le liquide amniotique assure l'hydratation du fœtus, lui apporte des sels minéraux et le protège des traumatismes extérieurs et des infections. Il permet de plus le développement du fœtus, ses déplacements et réalise son isolement thermique (MERGER - 1989).

2) - Pendant l'accouchement

Il concourt à la formation de la poche des eaux.

Il lubrifie la filière génitale après la rupture des membranes et facilite les progrès de la présentation (MERGER - 1989).

D - Caractères physiques du liquide amniotique

Le liquide amniotique au terme de la grossesse est opalescent. Il renferme alors des débris divers :

- cellules épithéliales
- cellules kératinisées
- cellules annelées
- macrophages et polynucléaires
- poils de Lanugo
- fragments de matière sébacée

Ces éléments constituent le vernix caseosa.

- Il a - une densité comprise entre 1,006 et 1,008
- un pH compris entre 6,90 et 7,20
- un delta cryoscopique de ($\Delta c = - 0,50$), il est hypotonique au sérum sanguin ($\Delta c = - 0,56$)

E - Composition chimique du liquide amniotique

Après centrifugation le liquide amniotique a un aspect clair ; il est composé d'éléments minéraux et d'éléments organiques.

1) - Eléments minéraux

Ils constituent la majeure partie du liquide amniotique avec

- a) - de l'eau dans la proportion de 96,4 à 98,4 %
- b) - et des électrolytes de concentration à peu près identique à leur concentration sérique (POLONOVSKI - 1977).

- Na⁺ : 120 à 128 mmol/l
- K⁺ : 4 à 4,5 mmol/l
- Cl⁻ : 100 à 106 mmol/l
- Ca²⁺ : 3,8 mmol/l
- Mg²⁺ : 1,1 mmol/l
- PO₄²⁻ : 1,3 mmol/l
- CO₃H⁻ : 15,7 mmol/l
- Anions résiduels : 14 à 16 mmol/l
- Protéines : 2 à 4 g/l

2) - Eléments organiques

On décèle dans le liquide amniotique des composés azotés non protéiques, des protéines, des glucides et des lipides.

a) - Composés azotés non protéiques

- créatinine : elle passe de 90 $\mu\text{mol/l}$ à la fin du 2ème trimestre à 180 $\mu\text{mol/l}$ à terme
- urée : elle varie de 3,5 mmol/l en début de grossesse à 5,5 mmol/l à terme
- acide urique : environ 270 $\mu\text{mol/l}$
- acides aminés : environ 0,25 g/l.

b) - Protéines

Le liquide amniotique contient peu de protéines, environ 2 à 4 g/l en fin de grossesse. L'électrophorèse sur gel d'acétate révèle trois bandes principales :

- une fraction d'albumine : représentant la majeure partie des protéines
- une bande de mobilité intermédiaire entre les α_1 et α_2 globulines du sérum représentant l' α foetoprotéine
- une troisième bande au niveau des β globulines

Le taux des gamma globulines est très faible (POLONOVSKI - 1977).

De nombreuses protéines enzymatiques sont décelées :

lactico-déshydrogénases, succino-déshydrogénase, phosphatases alcalines, anhydrase carbonique et estérases diverses.

c) - Glucides

Leur concentration amniotique est très faible, à peine 1,2 mmol/l. Les acides organiques dérivés du catabolisme glucidique tels que l'acide pyruvique et l'acide lactique sont présents, et constituent une partie importante des anions résiduels.

d) - Lipides

La concentration en lipides du liquide amniotique est dix à vingt fois moins élevée que dans le sérum.

A l'électrophorèse on n'observe pas de migration des fractions lipidiques qui restent au point de départ. On caractérise (POLONOVSKI - 1977) :

- des lipides neutres : ils représentent environ les 2/3 des lipides totaux à terme. Ils comprennent des stérides et des stérols, ainsi que divers constituants du vernix caseosa.
- des phospholipides :
 - Lécithines : en particulier la dipalmitoyl-lecithine, constituant principal du surfactant pulmonaire
 - Sphingomyélines : le rapport des lécithines sur les sphingomyélines dans le liquide amniotique à terme est souvent voisin de dix
 - Céphalines : phosphatidylethanolamines
 - phosphatidyl sérines - phosphatidylinositol
 - Phosphatidyl-glycérol.
- des acides gras libres : en très faible concentration
- des prostaglandines : leur présence explique l'effet ocytocique du liquide amniotique.

e) - des hormones

- protidiques : et en particulier les hormones gonadotropes
- stéroïdes : progestérone - cortisol - cortisone - oestrogènes et en particulier l'oestriol.

III - STRUCTURE ET PROPRIETES DES PRINCIPAUX LIPIDES MIS EN EVIDENCE DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA MATURITE PULMONAIRE FOETALE

A - Classification des lipides

Les lipides sont des esters d'acides gras et d'alcool (BOULANGER - 1989).

1) - Lipides simples (ne contenant que carbone - hydrogène et oxygène)

- Glycérides neutres : l'alcool est le glycérol
- Stérides : l'alcool est un stérol
- cérides : l'alcool aliphatique possède un poids moléculaire élevé
- glycoglycérides : des oses sont attachés à un diglycéride

2) - Lipides phosphorés ou phospholipides

- Glycérophospholipides
 - acides phosphatidiques
 - Phosphatidylglycérol et diphosphatidylglycérol
 - Phosphatidylcholines (Lécithines)
 - Phosphatidyléthanolamines
 - Phosphatidylsérine
 - Phosphatidylinositol

- Sphingophospholipides : Sphingomyélines

3) - Lipides azotés non phosphorés

- Acylsphingosines : céramides
- Sphingosidolipides
 - cérébrosides
 - oligosidocéramides
 - neutres
 - gangliosides

4) - Lipides soufrés

- Sulfatides - cérébroside sulfate
- dihexosidocéramide sulfate

B - Structure et propriétés des acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à longue chaîne carbonée. Leurs molécules comportent deux zones bien différentes :

- une chaîne carbonée qui ressemble à celle des carbures saturés
- une extrémité carboxylique - COOH

La chaîne carbonée hydrophobe est non mouillable.

Il existe

- des acides gras saturés

Ac palmitique (C16) : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$

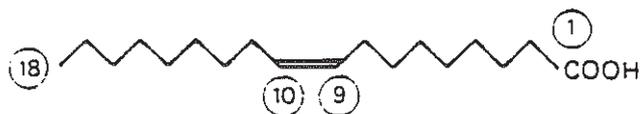


Ac stéarique (C18) : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{COOH}$



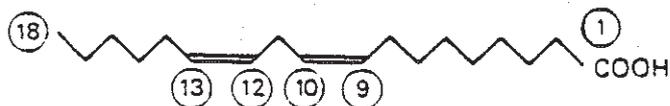
- des acides gras insaturés

Ac oléique (C18/1) $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}=\text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$



seul l'isomère CIS est physiologique

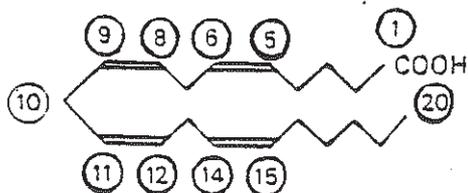
Ac linoléique (C18/2)



Ac arachidonique (C20/4)



on écrit plus généralement sa formule de façon repliée.



L'étude par chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras des lipides du liquide amniotique a permis d'observer des variations en fonction de l'âge de la grossesse des pourcentages des divers acides gras (POLONOVSKI - 1977) (tableau 1).

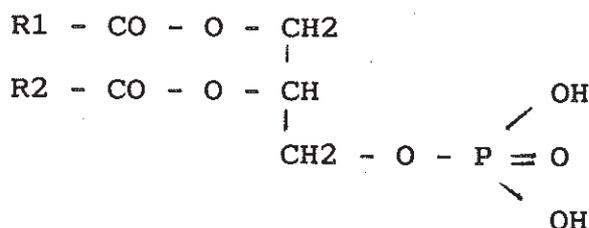
| | 28 se | 33/34 se | 35/36 se | 37/38 se | 39/42 se |
|---------------------|-------|----------|----------|----------|----------|
| Acide palmitique | 28 | 34,5 | 41,5 | 53 | 52 |
| Acide stéarique | 13,6 | 11,7 | 10,5 | 8,4 | 6,5 |
| Acide oléique | 29,6 | 28,7 | 25 | 19,6 | 19,3 |
| Acide linoléique | 15 | 13,2 | 12,5 | 7 | 6,3 |
| Acide arachidonique | 6 | 5,2 | 5 | 4,5 | 3,7 |
| Acide palmitoléique | 6,8 | 6,7 | 5,5 | 7,5 | 12,2 |

Tableau 1 : Composition comparée en acides gras des lipides du liquide amniotique au cours de la grossesse (valeurs exprimées en pourcentage des acides gras totaux)

C - Structure et propriétés des phospholipides

1) - Les glycérophospholipides

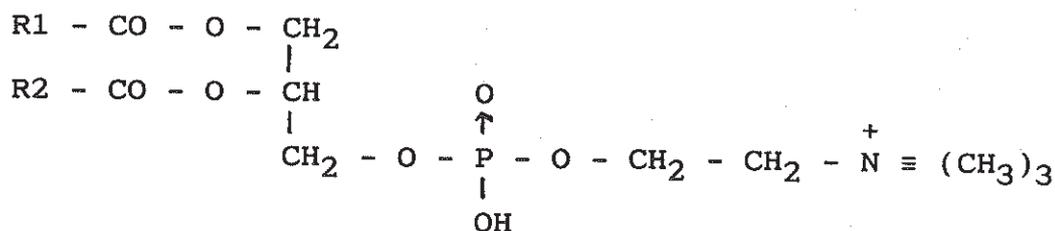
Ils contiennent du glycérol et du phosphate ainsi que des acides gras et certains alcools particuliers. En fait on peut les considérer comme des dérivés d'un composé appelé acide phosphatidique qui résulte de la fixation sur une molécule de glycérol d'une molécule d'orthophosphate en position α et de deux résidus d'acides gras en position α et β par liaison ester (BOREL - 1987).



Acide phosphatidique

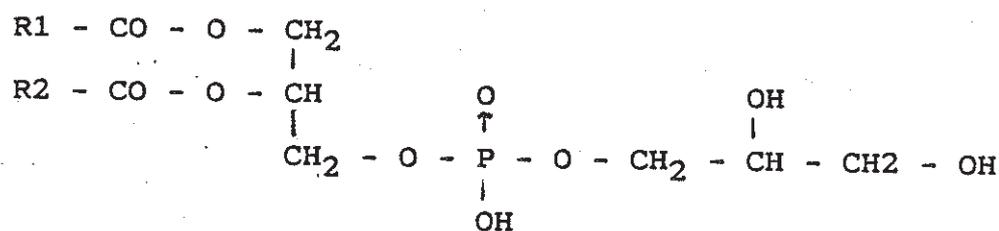
Les divers types de glycérophospholipides dépendent de la nature de l'alcool fixé au phosphate. Il peut s'agir de choline, de glycérol ou d'inositol, d'éthanolamine, de sérine.

- Phosphatidylcholine (ou lécithine)

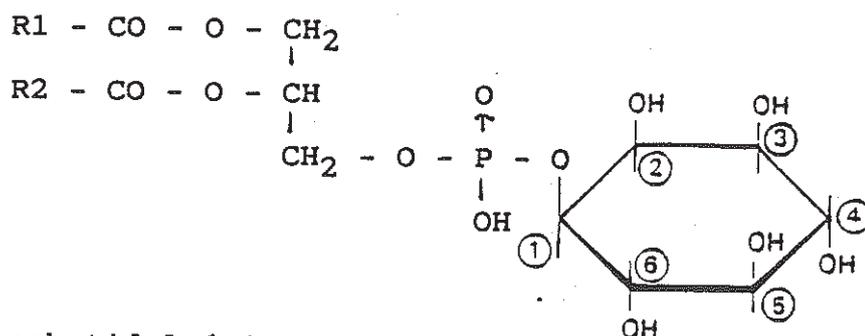


La lysolécithine est une phosphatidylcholine à laquelle manque l'acide gras estérifiant l'alcool β du glycérol.

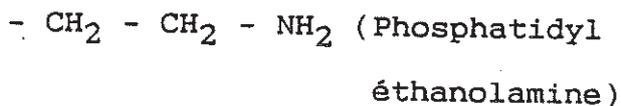
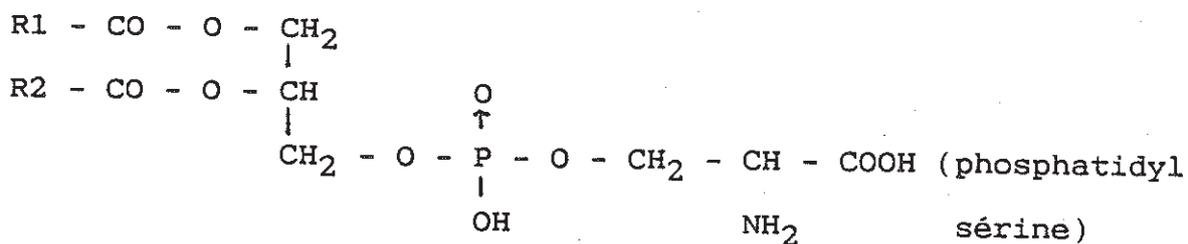
- Phosphatidylglycérol



- Phosphatidylinositol



- Phosphatidylsérine



Toutes ces molécules ont deux parties. Les deux radicaux d'acyl gras à longue chaîne carbonée sont non mouillables, au contraire le groupement phosphorique et l'alcool azoté, l'inositol ou la seconde molécule de glycérol sont polaires et donc s'associent à l'eau (BOREL - 1987).

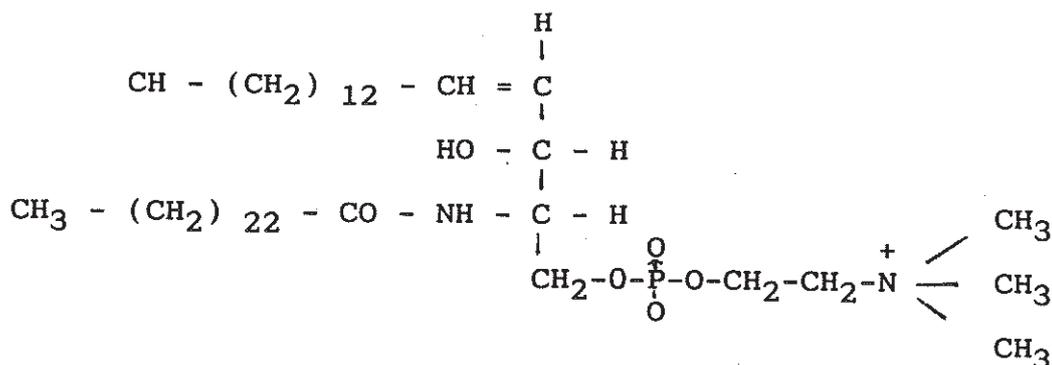
La phosphatidylcholine avec son ammonium quaternaire fortement ionisée est la plus polaire de toutes ces molécules.

Ces molécules ont donc tendance à présenter à l'eau leur zone polaire et au contraire à associer leur zone hydrophobe entre elles et à former des doubles couches très stables.

Les lécithines sont solubles dans les solvants des lipides sauf l'acétone, ce qui permet de les séparer des autres phospholipides.

2) - Les sphingophospholipides

Les sphingomyélines sont des phospholipides composées de sphingosine, d'acide gras et de phosphorylcholine, mais bien que la sphingosine comporte deux fonctions alcool, c'est toujours sur la fonction amine située entre ces deux alcools que se fixe l'acide gras, par conséquent les sphingolipides ne sont pas des esters, mais des amides. La fonction alcool primaire de la sphingosine est estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, qui est elle-même unie à une molécule de choline.



Sphingomyéline

Chez l'homme les sphingomyélines contiennent principalement l'acide lignocérique (C24) ou les acides palmitique ou stéarique (BOULANGER - 1989).

L'ensemble de la molécule forme un ion dipolaire, les sphingomyélines sont insolubles dans l'éther, très peu solubles dans l'acétone, solubles dans l'alcool chaud et cristallisent par refroidissement.

IIème PARTIE : L'ANALYSE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

I - LES AMNIOCENTESES

Les amniocentèses sont des prélèvements de liquide amniotique réalisés par ponction à travers la paroi abdominale et l'utérus. Selon la date à laquelle la ponction est faite, on distingue l'amniocentèse précoce de l'amniocentèse tardive, dont les modalités techniques et les indications sont différentes.

A - Indications

1) - Amniocentèse précoce

Ces indications en sont diverses (figure 5) mais dominées actuellement par le diagnostic prénatal à la recherche essentiellement d'une atteinte chromosomique foetale (GAMERRE - 1987). Elle est pratiquée à la 17ème semaine de grossesse, plus tôt elle est rendue difficile par la faible quantité de liquide amniotique (GIRAUD - 1982).

2) - Amniocentèse tardive

La décision d'amniocentèse dite tardive est orientée par des signes d'appel anormaux, obstétricaux, cliniques et échographiques. Les indications des amniocentèses tardives peuvent être différentes du diagnostic prénatal proprement dit (ou parfois complémentaires) (figure 6). Elles sont pratiquées au cours du dernier trimestre de grossesse.

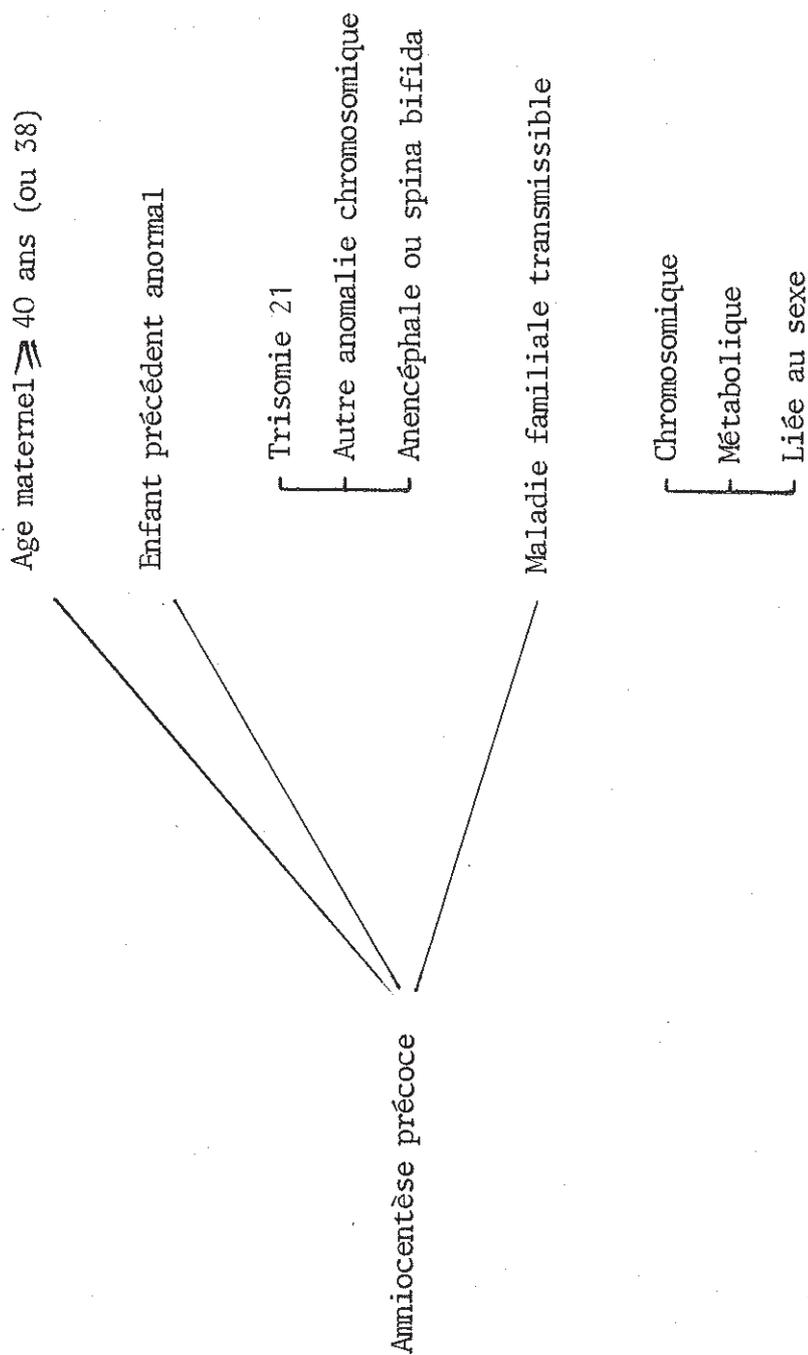


Figure 5 : Indications des amniocentèses précoces

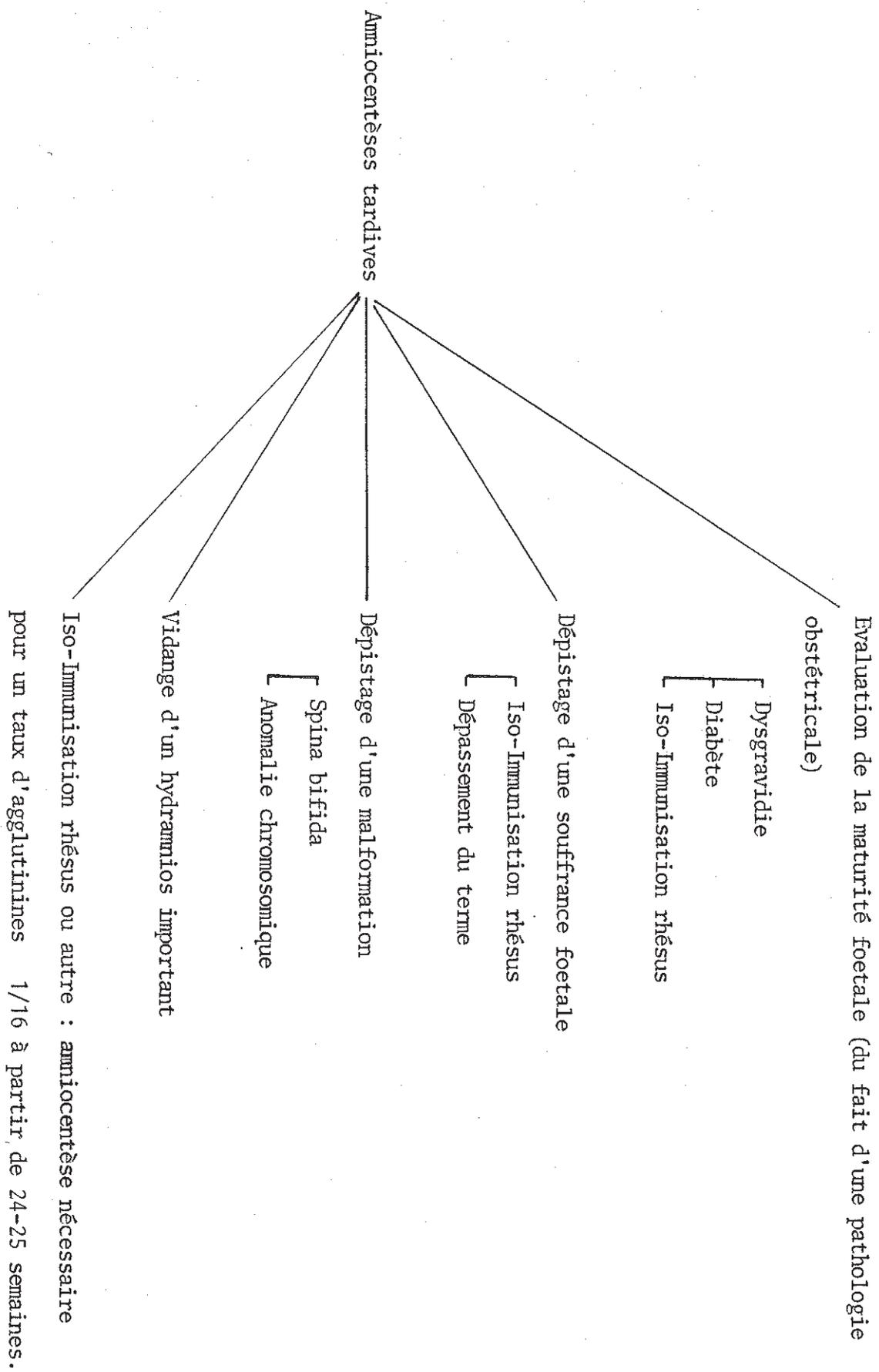


Figure 6 : Indications des amniocentèses tardives

B - Techniques

Les modalités techniques tout comme les indications sont très différentes selon la date à laquelle est faite l'amniocentèse.

1) - Amniocentèse précoce (figure 7)

Le guidage échographique est nécessaire, il permet la localisation du placenta et évite de le traverser. La femme est placée en décubitus dorsal, après évacuation de la vessie l'aiguille est introduite perpendiculairement sur la ligne médiane à travers la paroi abdominale et la paroi utérine. Après avoir retiré le mandrin, 5 à 15 ml de liquide amniotique sont aspirés.

2) - Amniocentèse tardive (figures 8 et 9)

Le guidage échographique permet de repérer la ou les citernes ponctionnables, la topographie placentaire et l'insertion puis le trajet du cordon ombilical. Il permet aussi d'éviter la ponction de lésions foetales expansives, volumineuses, à type d'omphalocèles, d'encéphalocèles, de myéloméningocèles (GAMERRE - 1987) etc...

La position du fœtus est précisée sur la femme, après évacuation de la vessie, en décubitus dorsal. Le point de ponction électif se situe au dessus du pubis dans la partie inférieure du cul de sac ovulaire, le pôle inférieur du fœtus est refoulé vers le haut pour libérer le cul de sac ovulaire. La

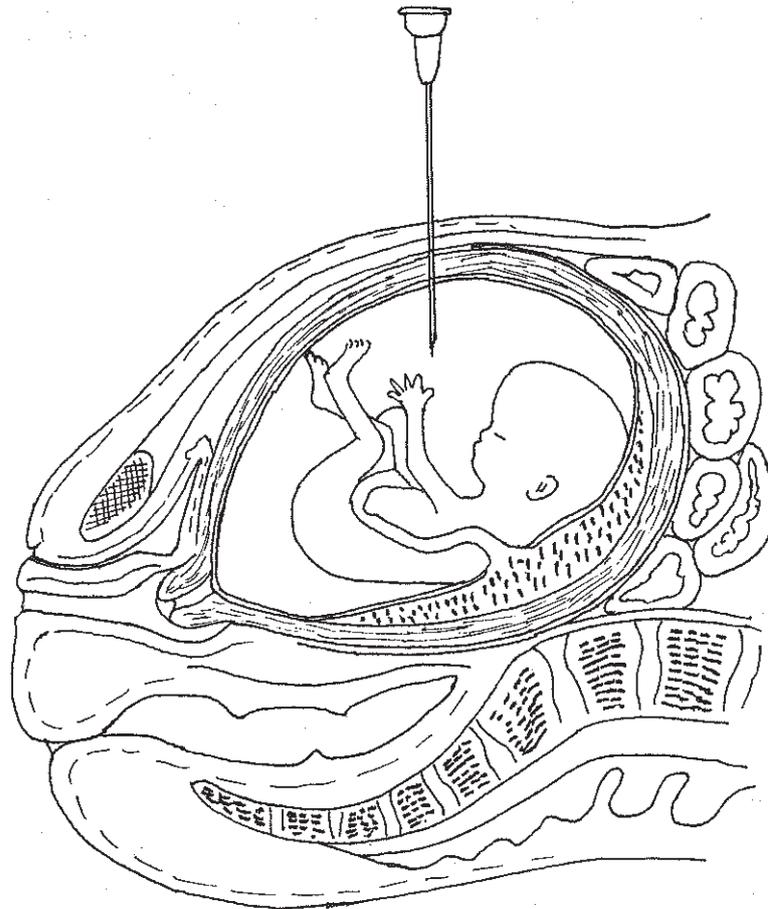


Figure 7 : Amniocentèse précoce

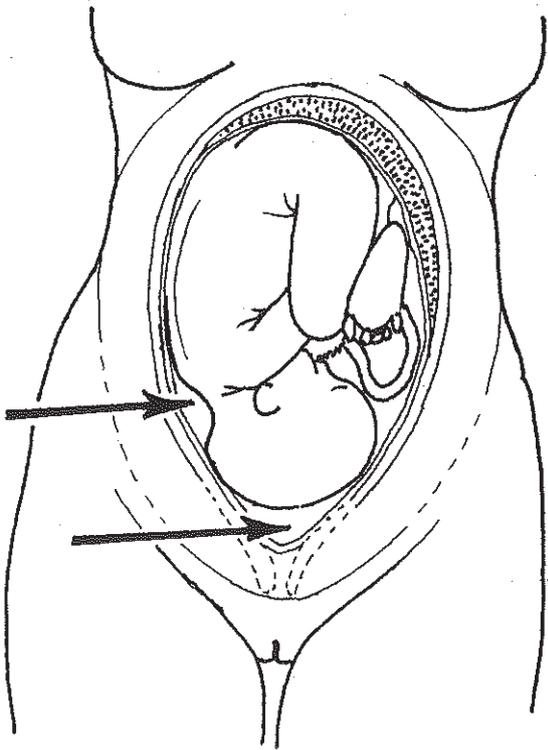


Figure 8 : Points de ponction dans l'amniocentèse tardive

- Partie inférieure du cul-de-sac ovulaire

- En regard du sillon du cou

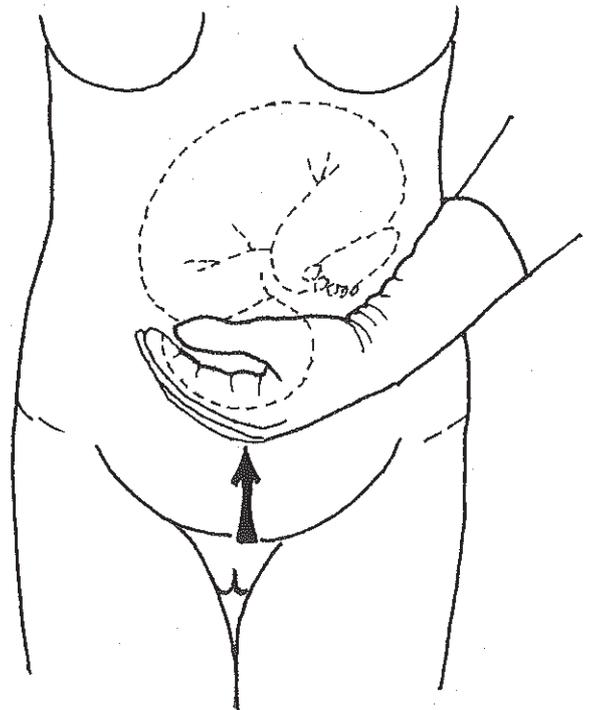


Figure 9

ponction peut aussi se faire latéralement en regard du sillon du cou en sachant qu'elle peut être dangereuse s'il existe des circulaires du cordon (GAMERRE - 1987).

Le prélèvement est d'au moins 20 ml de liquide amniotique.

C - Risques obstétricaux

Les risques encourus sont rarement traumatiques ou infectieux, ils sont surtout hémorragiques par lésion placentaire ou plus rarement cordonnale.

Le risque d'avortement évolue selon les équipes de 0,5 à 1,5 %, il ne paraît pas modifié après amniocentèse tardive.

L'amniocentèse peut déclencher une iso-immunisation rhésus, chez des gestantes rhesus négatif il faut donc chez ces femmes là faire systématiquement une prévention rhésus.

Enfin, l'amniocentèse tardive peut entraîner une rupture prématurée des membranes.

II - LES PRINCIPALES METHODES D'ANALYSE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

A - Méthodes biochimiques

1) - Généralités

Les méthodes biochimiques utilisées sont pour la plupart des méthodes chromatographiques. Aucune définition de la chromatographie ne saurait être parfaite car ce terme désigne un ensemble

de méthodes de séparation basées sur différents principes physiques. Toutefois ces méthodes ont un point commun, elles utilisent un support qui est :

- soit une poudre très fine qui grâce à ses nombreux grains possède une grande surface,
- soit un solide percé de fins canalicules dont la surface interne est très importante.

Les molécules à séparer sont dissoutes dans un solvant approprié et la solution obtenue circule entre les particules du support ou dans les microcanalicules. Des interactions physiques (forces de Van der Waals, liaisons polaires) s'établissent entre le support et les molécules à séparer. Il se produit ainsi des réactions de fixation rapides et réversibles, dont la force dépend de la nature des molécules à séparer. En faisant passer à travers le support une solution à vitesse constante, on entraîne certaines molécules plus vite que d'autres, on réalise ainsi leur séparation.

Il existe cinq mécanismes de chromatographie (utilisés seuls ou en association).

- La chromatographie d'adsorption : l'intensité de la fixation dépend de la nature chimique des molécules adsorbées. On définit le coefficient d'adsorption K tel que :

$$K = \frac{\text{quantité de soluté par unité de phase stationnaire}}{\text{quantité de soluté par unité de phase mobile}}$$

- La chromatographie d'échange ionique : basée sur la formation de liaisons ioniques.
- La chromatographie d'exclusion - diffusion : la séparation est basée sur la différence de taille des molécules. On définit le coefficient de diffusion K_d tel que :

$$K_d = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s : concentration de la substance dans la phase stationnaire

C_m : concentration de la substance dans la phase mobile

- La chromatographie d'affinité : elle utilise des interactions spécifiques comme les liaisons enzymes-substrat, ou antigène-anticorps.
- La chromatographie de partage : les substances à séparer vont se partager entre deux solvants non miscibles, la surface poreuse n'intervient que pour servir de support à l'un des deux solvants.

Il existe un cas particulier ; la chromatographie gaz-liquide dans laquelle il y a partage entre une phase liquide et une phase gazeuse.

On définit le coefficient de partage λ tel que :

$$\lambda = \frac{C_B}{C_A}$$

C_B : concentration de la substance de la phase B

C_A : concentration de la substance de la phase A

Le coefficient de partage dépend de la solubilité de la

substance (S) dissoute dans les phases A et B.

$$\lambda = \frac{SB}{SA}$$

On distingue suivant le support de chromatographie, les chromatographies sur papier, sur couche mince et en colonne.

2) - Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans la chromatographie en couche mince, le support est étalé sur une plaque rigide (verre - plastique - aluminium). Sa cohésion peut être renforcée par un liant et on peut y incorporer des substances aidant à la révélation. La chromatographie en couche mince fait appel à des forces de liaison mixte (partage et adsorption par exemple).

Le dépôt est ponctuel et porte sur une petite quantité d'échantillon déposé par fraction de 5 à 10 microlitres, des témoins sont déposés en parallèle.

Le développement est réalisé par migration de la phase mobile par capillarité ascendante ou descendante (ascendante en général) on peut réaliser des développements mono ou bidimensionnels avec deux phases solvantes successives développant le chromatogramme en deux directions perpendiculaires.

Le développement nécessite une enceinte close (cuve que l'on aura pris soin de saturer).

La révélation sera réalisée 1 h 30 à 2 heures plus tard en moyenne, quand le front du solvant sera parvenu à 1 ou 2 cm du bord supérieur du chromatogramme. Elle est visualisée par une

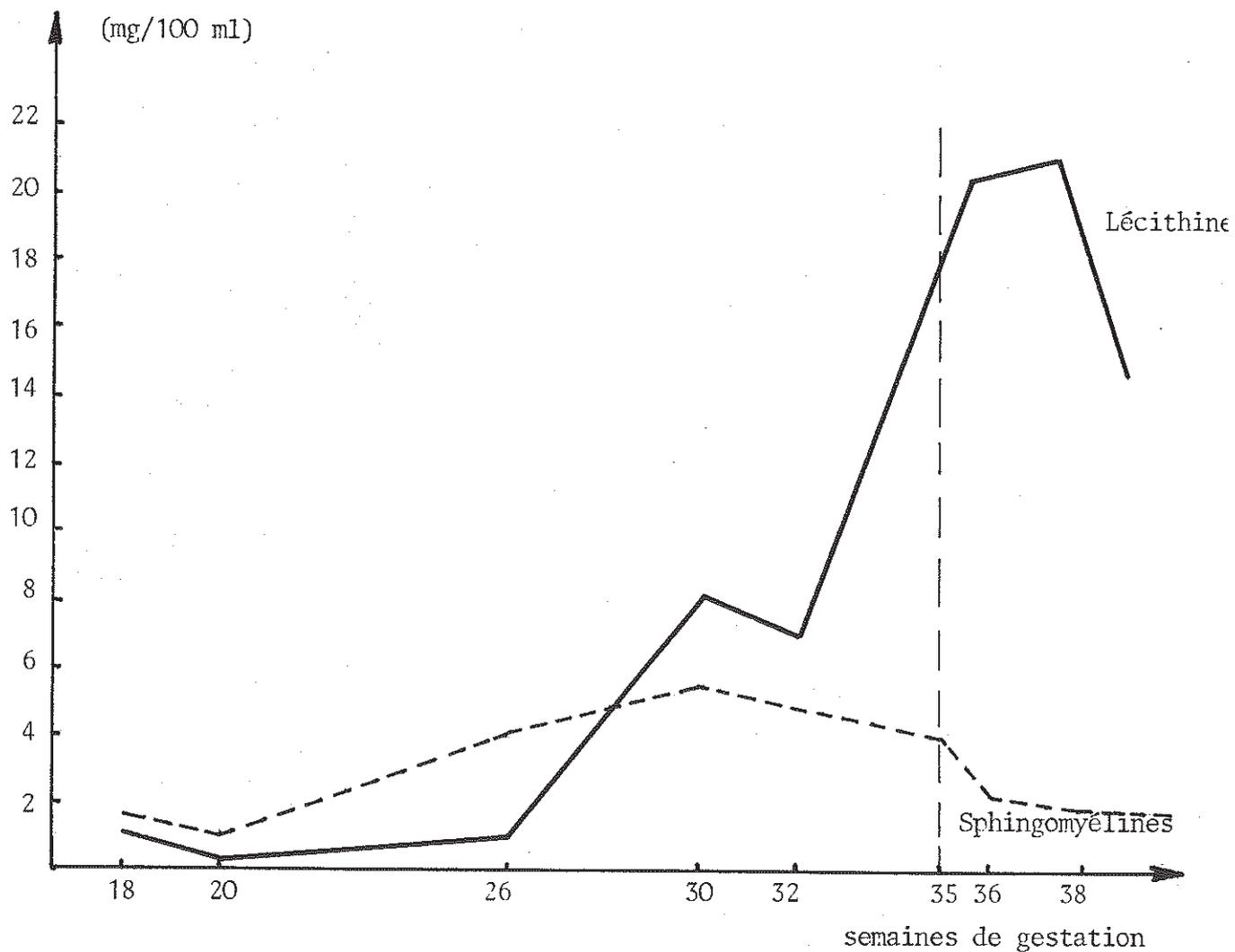


Figure 10 : Evolution de la concentration en lécithines et en sphingomyélines au cours de la gestation (grossesses normales) selon GLUCK et coll.

réaction colorée plus ou moins spécifique faisant apparaître des taches de soluté dont on enregistre la forme (planimétrie) ou l'intensité (densitométrie - fluorimétrie - radioactivité) sous forme de pics.

L'élution suit éventuellement la révélation après séparation des zones correspondant aux solutés voulus.

3) - Méthodes d'estimation de la maturité pulmonaire foetale utilisant la CCM

3.1) - Rapport lecithine/sphingomyélines (L/S)

3.1.1. Méthodes

L'étude du rapport L/S proposé par GLUCK en 1971 est encore actuellement la méthode la plus utilisée en biologie clinique pour étudier le surfactant pulmonaire. Cette technique s'est développée à partir de deux observations.

- De par sa composition en protéine et en phospholipides le liquide amniotique ressemble à une dilution du fluide trachéal.
- A partir de la 32ème semaine de gestation le taux des lecithines amniotiques augmente très fortement, alors que celui des sphingomyélines reste relativement constant (fig. 10).

Afin d'éliminer les problèmes de dilution la concentration des lecithines est ramenée à celle des sphingomyélines.

Un rapport L/S supérieur ou égal à 2, est considéré comme témoignant d'une maturité suffisante du surfactant pulmonaire.

Le test repose sur une extraction des phospholipides par des solvants organiques, une séparation par CCM suivie d'une quantification des différentes classes phospholipidiques, chacune de ces trois étapes ayant donné lieu à de nombreuses publications.

- L'extraction selon la technique de FOLCH (FOLCH - 1957) est la plus communément utilisée (chloroforme/méthanol 2 : 1). Certains auteurs (BLIGH - 1959) recommandent plutôt un mélange chloroforme/méthanol/eau. GLUCK (GLUCK - 1971) lui utilise une méthode de FOLCH modifiée. Quoi qu'il en soit quand les résultats sont exprimés sous forme de ratio L/S aucune différence significative entre ces méthodes n'est notée (DUCK - CHONG - 1984).

- La chromatographie en couche mince sur gel de silice est la plus employée. Une chromatographie bidimensionnelle sur plaque (MAUGERY - 1984), une chromatographie sur baguettes imprégnées de silice suivie d'une détection par ionisation de flamme (MURRAY - 1985), une chromatographie haute performance liquide (D'COSTA - 1987) ou encore une chromatographie radiale "Haute performance" sur plaque (MAC KENZIE - 1990) sont également utilisées, encore que ces techniques aient pour but de mettre en plus en évidence la phosphatidyl-sérine (PS), le phosphatidyl-Inositol (PI) et/ou le phosphatidyl-glycérol (PG).

- Les systèmes de solvants de migration les plus utilisés sont des mélanges chloroforme/méthanol/eau dans des proportions variables (BOUGHTON - 1970, KULKARNI - 1972, SCHREYER - 1974,

TSAI - 1979) l'ammoniaque remplaçant parfois l'eau (SARKOZI - 1972).

- La révélation des lécithines et des sphingomyélines est l'objet de nombreuses controverses du fait de la grande variété des systèmes révélateurs utilisés :

- minéralisation par l'acide sulfurique (GLUCK - 1966)
- minéralisation par le dichromate de potassium (OLSON-1974)
- minéralisation par le sulfate d'ammonium (OLSON - 1974)

Avec les deux premières méthodes de minéralisation, les spots obtenus ont la même intensité pour la sphingomyéline et les lécithines, et ce quelles que soient les concentrations des deux phospholipides. Par contre ce n'est pas le cas avec le sulfate d'ammonium qui de plus doit être incorporé au gel de silice avant la migration et qui a des effets néfastes sur la séparation entre lécithines et sphingomyélines (KRAHN - 1987)

- Pulvérisation de la plaque de chromatographie par le bleu de Bromothymol et action des vapeurs d'hydroxyde d'ammonium (BORER - 1971)
- Révélation par la vapeur d'iode (KULKARNI - 1972)
- Révélation par l'acide phosphomolybdique et l'acide perchlorique (KULKARNI - 1972)
- Révélation par la rhodamine B (SASS - 1976)
- Révélation par la 2'7' dichlorofluorescéine méthanolique (BLASS - 1979)

Les résultats obtenus avec le bleu de Bromothymol sont excellents au contraire de ceux obtenus avec la vapeur d'iode qui de plus entraîne des problèmes de toxicité et de délai de visualisation des spots. En ce qui concerne le phosphomolybdate les résultats sont très discordants selon les équipes (OLSON - 1974, SASS - 1976). Quant à la Rhodamine elle pose des problèmes de discernement entre lécithines et sphingomyélines car les spots ont tendance à trainer et le bruit de fond est souvent important.

En définitive la méthode la plus employée, quand on accepte comme seuil de maturité pulmonaire la valeur de 2, est la minéralisation par l'acide sulfurique. Il faut toutefois noter que cette technique n'est pas applicable à toutes les plaques de chromatographie.

Après la révélation des plaques, la dernière étape consiste en une quantification des spots obtenus, qui bien que pouvant conduire à des valeurs très variables du rapport L/S est en général pratiquée par densitométrie (GLUCK - 1971, SARKOZI - 1972, GLUCK - 1974).

3.1.2. Intérêt du rapport L/S

Le rapport L/S est considéré comme étant la méthode de référence pour la détermination de la maturité pulmonaire foetale, la plupart des auteurs reconnaissent l'intérêt clinique de ce test dans les grossesses sans complication. Cependant le nombre important de modifications apportées par rapport à la méthode originelle de GLUCK (GLUCK - 1971), contribue au fait qu'aucune méthode standardisée ne semble exister et que la valeur seuil de 2 pour affirmer une maturité pulmonaire est sujette à

caution.

3.2) - Rapport lécithines précipitables/sphingomyélines

GLUCK en 1973 recommande de précipiter les lécithines par l'acétone froide. Précipitation qui aurait comme avantage de favoriser la séparation des lécithines les plus tensio-actives. Certaines équipes estiment cette étape indispensable (GLUCK - 1973, GLUCK - 1974, GEBBARDT - 1975), d'autres la jugent longue et inutile (SARKOZI - 1972, ROUX - 1974, BLASS - 1976, TSAI - 1979) et ne trouvent aucune différence dans la composition en acides gras des différentes fractions : précipitables ou non (ROUX - 1974).

3.3) - Dosage des lécithines

Partant du fait que seul des traces de sphingomyéline sont présentes dans le surfactant pulmonaire et qu'au contraire plusieurs sources sont susceptibles d'augmenter leur concentration dans le liquide amniotique (FREER - 1981), plusieurs auteurs proposent un dosage des lécithines seules. La méthode nécessite une extraction quantitative car il n'y a plus de standard interne (les sphingomyélines). Une fois encore les résultats diffèrent d'une équipe à l'autre, selon que l'on considère les lécithines totales, les acétones précipitables ou les lécithines désaturées (MASON - 1976, TSAI - 1987).

La méthode de séparation est en général une CCM (certaines méthodes enzymatiques permettent cependant de doser la choline directement (ANAKOAR - 1978, BRADLEY - 1987)). Le gros

inconvenient de ces techniques est dû aux variations de volamnie existant d'une patiente à l'autre ou même en cours de grossesse et limitant, de par ce fait, l'intérêt clinique de ces dosages.

Selon les méthodes utilisées, les concentrations moyennes en lécithines varient entre 53 et 125 mg/l (FREER - 1981, BRADLEY - 1987). Il est donc pratiquement impossible d'établir une valeur seuil de référence définissant une maturité pulmonaire satisfaisante.

3.4) - Mise en évidence du PG - PI - PS - PE

KULOVITCH en 1979 a montré l'importance de l'appréciation du phosphatidyl-glycérol (PG) dans le liquide amniotique. Ce phospholipide est en effet exclusivement synthétisé au niveau alvéolaire et paraît être un marqueur plus spécifique de maturité pulmonaire (WHITTLE - 1983, LEGRAS - 1985). Le PG apparaît aux alentours de la 35ème semaine de grossesse, au moment où la concentration en phosphatidyl Inositol (PI) diminue (figure 11). Sa concentration reste faible même en fin de grossesse (3 à 10 % des phospholipides totaux).

Les méthodes de détection comme toujours sont nombreuses et si certains estiment nécessaire une chromatographie bidimensionnelle (HALLMAN - 1976, HALLMAN - 1977), d'autres préfèrent une chromatographie monodimensionnelle (GOTELLI - 1978, TSAI - 1979) d'utilisation plus souple et permettant une excellente séparation PG - PI - lécithines et sphingomyélines. Seuls la phosphatidyl-sérine (PS) et la phosphatidyl éthanolamine (PE) migrent ensemble, mais sont nettement séparées des autres phospholipides.

TSAI et MARSHALL (TSAI - 1979) insistent sur le fait que de

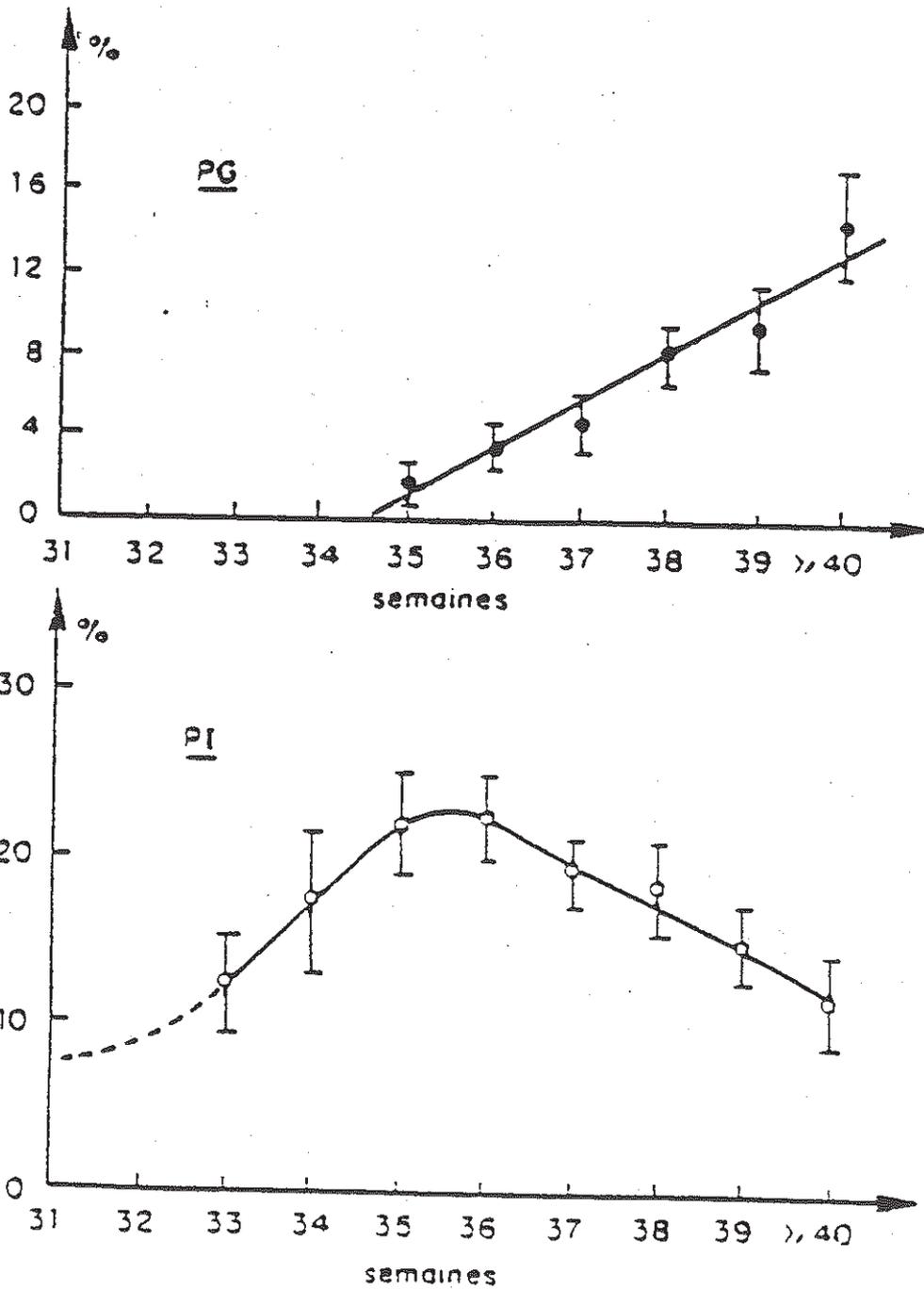


Figure:11. - Évolution du pourcentage de PG et de PI au cours de la grossesse (selon Kulovitch et coll.).

légères modifications des proportions relatives des différents constituants du solvant de migration, affectent la mobilité de certains phospholipides. Pour un solvant de référence constitué de 67 parts de chloroforme, 25 parts d'éthanol et 3 d'eau :

- si on augmente à 5 les parts en eau le PI migre avec les L ce qui entraîne un rapport L/S faussement élevé
- Si on diminue la concentration en chloroforme le PG migre avec le front de solvant

Il faut donc impérativement préparer extemporanément son solvant de migration.

Quelle que soit la méthode retenue, le PG est toujours ramené à un pourcentage des phospholipides totaux, et est comparé au traditionnel L/S. Là encore, le manque de standardisation des méthodes entraîne d'énormes difficultés d'interprétation (TSAI - 1979, BUSTOS - 1979) et de nombreuses discordances existent aussi bien au niveau de la sensibilité des méthodes, que de la corrélation entre le rapport L/S et le pourcentage de PG à partir duquel, le foetus est supposé avoir atteint la maturité pulmonaire (TSAI - 1979, BUSTOS - 1979, SPILLMAN - 1988).

4) - Principe de la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est un cas particulier de chromatographie de partage, utilisable pour l'analyse de petites molécules volatiles ou volatilissables après transformation chimique.

Les échantillons à chromatographier sont dissous dans un solvant vaporisable. Ils sont transformés en vapeur dans une

chambre d'injection préchauffée à température élevée, puis sont entraînés à travers une colonne de séparation (compacte ou capillaire intégrée à une enceinte thermostatée) par un courant de gaz inerte, appelé gaz vecteur. Un détecteur (fournissant un signal chaque fois qu'un type de molécule sort de la colonne) couplé à un enregistreur permet l'identification, et, éventuellement la quantification des molécules (grâce à la connaissance du temps de rétention, de la surface du pic et de la présence de témoin).

La CPG est une méthode très sensible, utilisant de très faible volume d'échantillon et permettant de mesurer des concentrations de l'ordre du nano ou du picogramme.

5) - Détermination de la maturité pulmonaire foetale
par CPG

Rapport palmitate sur stéarate (P/S)

L'étude de la composition en acides gras permet de distinguer deux types de lécithines :

- l'un dans lequel le glycérol est estérifié par de l'acide myristique et de l'acide palmitique
- l'autre dans lequel deux molécules d'acide palmitique estérifient le glycérol

Les dipalmitoyl-lécithines étant les plus abondantes dans le liquide amniotique, ALCINDOR et coll. proposent en 1974 un nouveau test d'appréciation de la maturité pulmonaire foetale : la détermination du rapport P/S.

Ce test consiste en une extraction des phospholipides par la technique de FOLCH, suivie d'une hydrolyse des phospholipides

totaux obtenus puis d'une méthylation des acides gras (par le trifluorure de bore) et enfin d'une séparation des esters méthyliques par CPG.

Le rapport P/S est établi en fonction de la concentration en acide stéarique qui est l'acide gras saturé le plus abondant, après l'acide palmitique (cf tableau 1) dans les phospholipides amniotiques.

La concentration en stéarate, étant de plus, à peu près constante tout au long de la gestation, on élimine ainsi les problèmes de volamnie.

Un rapport P/S supérieur ou égal à 5 est considéré comme témoignant d'une maturité pulmonaire satisfaisante (ALCINDOR - 1974, MOTTA - 1979, MOTTA - 1982).

D'autres auteurs proposent le dosage total des acides gras amniotiques (WARREN - 1973), le dosage des acides gras des sphingomyélines (KOKATNUR - 1985), le dosage de l'acide palmitique total (LINDBACK - 1976, IP - 1977) ou le dosage de l'acide palmitique des lécithines (RUSSEL - 1974). Ces dernières méthodes ont toutes en commun le désavantage de nécessiter une extraction quantitative car le stéarate ne joue plus son rôle de standard interne.

B) - Méthodes physiques

Bien avant que la composition du surfactant ne soit parfaitement déterminée, ses propriétés physiques ont été étudiées et un certain nombre de tests d'appréciation de la maturité pulmonaire en ont découlé.

1) - Mesure de la tension superficielle du liquide amniotique

Deux tests ont été proposés :

- l'un mesurant l'abaissement de la tension superficielle, obtenu après dépôts croissants d'extraits lipidiques, du liquide amniotique à la surface de l'eau (TIWARY - 1976)
- l'autre dénommé "capillary flow rate" et utilisant la corrélation existant entre le temps d'écoulement du liquide amniotique à travers une pipette Pasteur et sa tension superficielle.

2) - Mise en évidence du pouvoir émulsionnant des lécithines

CLEMENTS en 1972 propose d'effectuer des dilutions croissantes de liquide amniotique non centrifugé avec du sérum physiologique (1/1 - 1/1,3 - 1/2) et de les agiter en présence de 1 ml d'éthanol à 95°.

La présence d'un anneau de bulles persistant au delà de quinze minutes dans les trois tubes détermine un test positif. La présence de bulles dans au moins un tube correspond à un test intermédiaire, l'absence de bulles à un test négatif. Ce test relativement grossier, tout comme le "Tap Test" (SOCOL - 1984, SOCOL - 1990) permet une estimation rapide de la quantité de lécithines (MOTTA - 1979). Ces tests seraient parfaitement corrélés au rapport L/S.

3) - Densité optique à 650 nm

SBARRA et collaborateurs proposent en 1977 une méthode d'appréciation de la maturité pulmonaire, basée sur la mesure de la densité optique du liquide amniotique à 650 nm. Selon ces auteurs, si la densité optique à 650 nm est supérieure à 0,150 il existerait une bonne corrélation avec un rapport L/S > 2 (SBARRA - 1977, SBARRA - 1978). Le problème majeur posé par cette technique est dû au fait que les auteurs établissent des corrélations soit avec le rapport L/S, soit avec le phosphatidylglycérol (SBARRA - 1977, SBARRA - 1978, OULTON - 1990) et qu'ils n'apportent aucune justification quant à la nature du matériel absorbant à 650 nm. Là encore les taux de faux positifs et de faux négatifs obtenus varient énormément selon les études (SBARRA - 1977, PLANCHE - 1981, OULTON - 1990).

4) - Etude des "lamellar bodies"

Les "lamellar bodies" sont les précurseurs du surfactant, ils ont une structure en "corps lamellaires" de un à deux microns de diamètre et une densité différente des autres composants du liquide amniotique (DUCK-CHONG - 1980). On peut donc les isoler, soit par centrifugation en gradient de FICOLL (DUCK-CHONG - 1980), soit par "micropore filtration" (EGBERTS - 1983), puis on détermine ensuite leur contenu en phospholipides. Une autre méthode consiste à les dénombrer grâce à un compteur électronique, calibré pour des particules ayant un volume compris entre 1,7 et 7,3 femtolitres (DUBIN - 1989, ASHWOOD - 1990).

Une fois de plus la corrélation maturité pulmonaire en

fonction du nombre ou du contenu lipidique des corps lamellaires n'est pas établi avec précision.

Néanmoins cette technique, tout comme celle de l'étude des apoprotéines de PM 35.000 par immunonéphélométrie (KASHIWABARA - 1989, HALLMAN - 1989) est amenée à se développer. En effet, elle prend en compte des composés dont l'origine est spécifiquement pulmonaire.

5) - Microviscosité par polarisation de fluorescence

5.1) - Principe de la polarisation de fluorescence

SHINITZKY en 1976 décrit une méthode d'appréciation de la microviscosité des phospholipides amniotiques dérivant des méthodes d'étude des membranes biologiques. Son principe repose sur les propriétés particulières des "sondes" fluorescentes lorsque l'excitation se fait par une source de lumière polarisée.

Le résultat est fonction du temps de relaxation rotationnelle (c'est à dire d'après les équations de PERRIN, du temps que met une molécule pour effectuer une rotation de 68°). Si ce temps est court, c'est le cas pour les petites molécules qui sont relativement mobiles, la fluorescence émise ne sera pas polarisée, si au contraire ce temps est long, l'émission fluorescente conservera la polarisation du faisceau d'excitation. Quand une "sonde" fluorescente excitée par un flash de lumière polarisée ($\lambda = 365 \text{ nm}$) subit un mouvement de rotation dans un milieu isotrope, on enregistre une décroissance de l'anisotropie (r), et une ré-émission de lumière partiellement dépolarisée, de degré de polarisation P .

P et (r) sont reliés par l'équation
$$P = \frac{3(r)}{2 + (r)}$$

où
$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \text{et} \quad (r) = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}}$$

avec I_{\parallel} et I_{\perp} intensité de fluorescence pour des directions parallèles ou perpendiculaires au polariseur-analyseur par rapport au plan de polarisation de la lumière.

On peut aussi exprimer les résultats en unités de viscosité (fig. 12). Un certain nombre de paramètres physiques sont susceptibles de modifier la valeur de P et notamment

- le pH (SHINITZKY - 1976)
- la température (SHINITZKY - 1976, BARKAI - 1983)

Une standardisation de la méthode n'est possible qu'en fixant ces deux paramètres ainsi que la nature et la concentration de la sonde (SHINITZKY - 1976).

5.2) - Détermination de la polarisation de fluorescence du liquide amniotique

Une sonde fluorescente en général le 1-6 diphényl 1-3-5 hexatriene (DPH) est incorporée au liquide amniotique préalablement centrifugé (l'incorporation se fait par agitation douce, pendant un temps donné qui est fonction de la température à laquelle se fait l'incubation : 24° ou 37° C).

Quand le temps d'incubation nécessaire à la localisation homogène de la "sonde" dans les régions non polaires des agrégats phospholipidiques est atteint, on effectue une lecture en cuve thermostatée à 24° ou 37° C. La lecture est faite avec un fluorimètre classique équipé d'un accessoire de polarisation de fluorescence, ou avec un appareil spécifique : tel que le fluo-polarimètre SEFAM ou le TDX Abott (TAIT - 1982, RUSSEL - 1989).

D'autres "sondes" fluorescentes telles que le 1 palmytoyl-2 (6 - [(7 Nitro-2, 1-3 benzoxadiazol - 4 - yl) amino]) caproyl (ou NBD - PC) sont utilisées (TAIT - 1982, TAIT - 1986, RUSSEL - 1987).

Les valeurs de P, indiquant une maturité pulmonaire satisfaisante, sont très différentes selon que l'on travaille à 24° C ou à 37° C, et même à température identique, les valeurs seuils varient beaucoup d'une équipe à l'autre.

- à 24° C on relève comme seuil de maturité des valeurs fluctuant entre $P = 0,360$ (SHINITZKY - 1983) et $P = 0,316$ (THOMAS - 1978)
- à 37° C on relève comme seuil de maturité des valeurs fluctuant entre $P = 0,286$ (LEGGE - 1981) et $P = 0,256$ (TAIT - 1986).

Comme pour toutes les autres techniques d'estimation de la maturité pulmonaire foetale, de nombreux auteurs ont étudié la corrélation pouvant exister entre rapport L/S et polarisation de fluorescence (SHINITZKY - 1976, BLUMENFELD - 1978, GEBHARDT - 1979, SIMON - 1981). On estimait en effet que la différence de polarisation entre liquide mature et immature, était due aux

concentrations relatives de lécithine et de sphingomyéline. DONHAL en 1986 a montré qu'il n'en était rien et que c'est la concentration en phospholipides insaturées qui est la cause de la diminution du degré de polarisation, ce qui explique que la corrélation entre L/S et P soit effectivement excellente pour des liquides amniotiques matures (ELRAD - 1978).

| | Microviscosité en poises |
|--------------------------|--------------------------|
| Sphingomyéline | 10 - 12 |
| Phosphatidyléthanolamine | 4 |
| Phosphatidyl Inositol | 1,2 |
| Lécithine | 1 |
| Phosphatidyl Glycérol | 0,4 |

Figure 12 : Valeur moyenne de la microviscosité des phospholipides présentes dans le liquide amniotique (d'après C. MOTTA)

C) - Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques s'appliquent à la mise en évidence des protéines du surfactant (KATYAL - 1983) et à celle du phosphatidyl glycérol. Seule la détermination de ce dernier est universellement réalisée et à peu près standardisée.

En 1983 GARITE met au point une méthode de dosage semi-quantitatif à l'aide d'un test immunologique d'agglutination sur lame réalisable en moins de trente minutes, avec un appareillage minimum.

Ce test est utilisable directement sur le liquide amniotique centrifugé et paraît avoir une bonne fiabilité.

Un "taux" de phosphatidyl glycérol supérieur ou égal à "deux croix" (2 µg/ml) est considéré comme témoignant d'une bonne maturité du surfactant pulmonaire (GARITE - 1983).

Il semble que la présence de phosphatidyl glycérol dans le liquide amniotique permette avec certitude d'éliminer le diagnostic de MMH, mais son absence ne permet pas d'affirmer l'immaturité pulmonaire.

IIIème PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

I - METHODES RETENUES

La centrifugation du liquide amniotique, la contamination par du sang ou du méconium et la conservation des échantillons sont susceptibles d'entraîner des variations plus ou moins prononcées de l'estimation de la maturité pulmonaire foetale.

- Centrifugation : les forces de centrifugation utilisées par les différentes équipes sont extrêmement variables. Néanmoins une centrifugation supérieure à 750 g entraîne une perte de 70 % des lécithines du surnageant (FREER - 1981). Alors qu'une centrifugation inférieure à 1500 g, fausse les mesures de degré de polarisation : estimation par excès (MOTTA - 1982).
- Conservation des échantillons : la conservation des phospholipides à température ambiante est excellente sauf en ce qui concerne le phosphatidyl glycérol. Les tests seront donc réalisés dès réception des échantillons ou à défaut après congélation à - 20° C
- Contamination par du sang ou du méconium : en règle générale la contamination par du sang ou du méconium d'un liquide mature entraîne une appréciation par défaut. Tandis que la contamination d'un liquide immature se traduit par des caractéristiques de maturité prononcée (THOMAS - 1978, COX - 1983). Seul le phosphatidyl glycérol n'est pas perturbé par la présence de ces substances (TSAI - 1979, SULLIVAN - 1984).

A - Rapport L/S

1) - Raisons d'utilisation

L'étude du rapport L/S est actuellement la méthode la plus utilisée en clinique pour étudier le surfactant pulmonaire. Elle est encore considérée par beaucoup comme étant la technique de référence. Bien qu'elle tende actuellement à être remplacée par la polarisation de fluorescence.

2) - Méthode utilisée

2.1) - Extraction des phospholipides du liquide amniotique

- Centrifuger le liquide amniotique 10 mn à 750 g
- Prélever 5 ml de surnageant, ajouter dans un tube à vis de 50 ml : 5 ml de méthanol (Merck, ref 6009) et 10 ml de chloroforme (Merck, ref. 2445)
- Agiter 10 minutes (Vortex) et centrifuger 10 mn à 750 g
- Après centrifugation on obtient 2 phases, recueillir la phase inférieure (chloroformique) avec une pipette à bout effilé, essuyer l'extérieur de la pipette.
- Centrifuger à nouveau la totalité du contenu de cette pipette 5 mn à 750 g
- Prélever la phase inférieure avec une pipette propre.
- Evaporer à sec sous courant d'azote le dernier extrait chloroformique.
- Reprendre l'extrait évaporé à sec par 100 µl de chloroforme

2.2) - Chromatographie des phospholipides

- Préparation de la cuve (cuve en verre de 23 x 22 cm) :

Solvant de migration

- CHCl_3 70 ml (Merck, ref. 2445)
- CH_3OH 30 ml (Merck, ref. 6009)
- Ammoniaque à 25 % 5 ml (Merck, ref. 5432)

Laisser la cuve saturer au moins une heure

- Préparation de la plaque :

On utilise une plaque Carl Schleicher et Schüll gel de silice sur support plastique prête à l'emploi (ref F 1500).

Faire une marge de 1 cm de chaque côté. Puis 3 couloirs de 6 cm.

Prendre 2 solutions témoins à 2 mg/ml dans le chloroforme

- Lécithine (Schwartz - Mann, ref. 6070)
- Sphingomyéline (Schwartz - Mann, ref. 900796)

Disposer à 2,5 cm du bord inférieur de la plaque 20 μl de chaque solution témoin et 40 à 50 μl d'extrait phospholipidique de liquide amniotique.

Mettre la plaque à migrer jusqu'à ce que le front de solvant soit à 2 cm du bord supérieur de la plaque

2.3) - Révélation

La migration terminée, retirer la plaque, la sécher et l'immerger dans une solution acétique d'amido-Schwartz.

- 0,5 g d'amido-Schwartz 10 B (Merck n° 1167)
- 20 mg d'acide acétique cristallisable
- 80 mg d'eau distillée.

Temps de coloration : environ 1 minute.

Décolorer le fond de la plaque par immersion dans l'eau jusqu'à obtention d'un fond blanc.

Les différentes fractions phospholipides apparaissent en bleu foncé.

2.4) - Résultats

Gratter les spots correspondant aux lécithines et aux sphingomyélines du liquide amniotique. Les recueillir dans deux tubes différents (un pour les lécithines, l'autre pour les sphingomyélines).

Eluer par agitation avec 3 ml de N-N-diméthylformamide (Merck, ref. 822775).

Centrifuger 5 minutes.

Recueillir les surnageants en cuve de verre et mesurer la densité optique à 610 nm. Faire le rapport des densités optiques:

$$\frac{L}{S} = \frac{\text{d.op lécithines} \times 1,14}{\text{d.op sphingomyélines}}$$

On multiplie par 1,14 la d.op des lécithines car l'amido-Schwartz colore, à poids égal, 1,14 fois plus les sphingomyélines que les lécithines.

Si $L/S > 2$ alors le foetus est considéré comme mature pulmonairement.

3) - Limites de la méthode

Le manque de standardisation et le très grand nombre de modifications proposées par rapport à la méthode originelle de Gluck sont particulièrement révélateurs des imperfections de ce test. Les principaux reproches que l'on puisse lui faire sont :

- une absence totale de fiabilité en présence de sang et de méconium
- un rapport pouvant varier de $\pm 0,7$ selon que la ponction soit faite à proximité ou non de la bouche foetale (WORGTHINGTON - 1978).
- un délai de réponse long : environ trois heures
- un nombre très important de faux positifs (L/S < 2 et enfants ne présentant pas de MMH à la naissance) qui selon les études varie entre 5 et 15 % (MAGNY - 1988)
- Un nombre très important de faux négatifs (L/S > 2 et enfants présentant une MMH à la naissance) variant entre 5 et 18 % selon les auteurs (MAGNY - 1988)

Taux pouvant atteindre 30 % chez les patientes diabétiques (CEDARD - 1973, GOTELLI - 1978).

Remarque : les faux positifs sont en partie dus aux lécithinases et/ou au délai entre ponction et accouchement : le stress de l'accouchement pouvant accélérer la maturité pulmonaire.

B - Rapport P/S

1) - Raisons d'utilisation

L'augmentation en acides gras saturés, observée en fin de grossesse (tableau 1), dépend pour une grande part du palmitate contenu dans les dipalmytoyl lécithines (SCHIRAR - 1974). Or seules les lécithines saturées sont douées de propriétés tensio-actives et diminuent la tension superficielle au niveau des alvéoles pulmonaires (DOHNAL - 1986). D'où l'intérêt d'utiliser une méthode permettant une appréciation de la qualité des lécithines présentes dans le liquide amniotique. De plus, le rapport P/S est plus discriminatif que le rapport L/S quand ce dernier est compris entre 1,5 et 2,5, ainsi que dans les grossesses de femmes diabétiques (MAGNY - 1988). Enfin, il n'y a pas d'interactions dues aux lécithinases.

2) - Méthode utilisée

2.1) - **Extraction des phospholipides**

- Identique à celle utilisée pour réaliser le L/S

2.2) - **Hydrolyse des phospholipides**

- Reprendre l'extrait évaporé à sec par 1 ml d'Hexane
- Ajouter 200 µl de soude méthanolique 2 N
- Agiter 10 mn au vortex.

2.3) - Méthylation des acides gras

- Ajouter 200 µl d'acide sulfurique méthanolique 2 N
- Agiter 10 mn au vortex
- Centrifuger et récupérer le surnageant.

2.4) - Séparation des acides gras par CPG

- On injecte 1 µl de surnageant sur une colonne capillaire OV₁
- Température injecteur : 280° C
- Température détecteur : 285° C
- Programmation : 2° C/min de 160° C à 285° C

2.5) - Résultats

- Identifier les pics de palmitate et de stéarate
- Faire le rapport des surfaces palmitate/stéarate
- Si P/S > 5 la maturité pulmonaire est acquise.

3) - Limites de la méthode

Elles sont à peu près identiques à celles du rapport L/S. Contrairement à ce qu'affirmait RUSSEL (RUSSEL - 1974). Le sérum et le méconium affecte la détermination du palmitate (IP - 1979).

Le vernix est lui aussi susceptible d'interférer. Il peut être éliminé par une centrifugation adaptée.

Le délai de réponse, bien que raccourci par rapport à celui du L/S, reste tout de même assez long (environ 2 heures). De plus

le traitement consécutif de plusieurs échantillons augmente encore le temps de réponse.

Le taux des faux positifs serait comparable à celui observé avec le rapport L/S (spécificité identique) par contre le taux de faux négatif serait plutôt inférieur (MAGNY - 1988) (meilleure sensibilité).

C) - Microviscosité par polarisation de fluorescence

1) - Raisons d'utilisation

- L'action du surfactant est de diminuer la tension superficielle dans l'alvéole pulmonaire et par là de maintenir l'expansion alvéolaire. Aussi semble-t-il logique qu'une mesure physique donne une meilleure indication de la maturité pulmonaire, qu'une détermination chimique d'un milieu complexe, pour lequel les problèmes de séparation et de quantification des substances sont nombreux.
- L'interférence due au sang et au méconium peut être éliminée en utilisant un "blanc échantillon" (sans marqueur fluorescent)
- Le coefficient de variation de ce test est nettement meilleur à celui du rapport L/S (BLUMENFELD - 1979).
- La mesure de la fluorescence de polarisation est un excellent reflet de la composition du liquide amniotique en lécithines, sphingomyélines, phosphatidyl inositol, phosphatidyl éthanolamine, phosphatidyl sérine et phosphatidyl glycérol (BLUMENFELD - 1979). Cette mesure

est de plus particulièrement sensible à la présence de phosphatidyl glycérol (BLUMENFELD - 1979).

- Le délai de réponse est d' 1 h 30 au maximum, quel que soit le nombre d'échantillon à traiter et la réalisation du test est d'une extrême simplicité.

2) - Méthode utilisée

2.1) - Préparation des réactifs

- Solution mère de DPH

5 mg de DPH dans 10 ml de tétrahydrofurane (qualité UV)
(conservée à 4° C à l'abri de la lumière)

- Solution de travail

Dispersion extemporanée de 25 µl de solution mère dans
50 ml de tampon PBS pH 7,2 (agitation au vortex)

Cette solution est utilisable pendant 4 à 5 heures

- Liquide amniotique

Centrifugation à 1500 g pendant 10 mn.

On travaille sur le surnageant le plus clair possible.

2.2) - Traitement des échantillons

Prendre 3 tubes Sovirel de 10 ml (par liquide amniotique à traiter)

Tubes 1 et 2 : 1 ml de liquide amniotique + 3 ml de solution de travail.

Tube 3 : 1 ml de liquide amniotique + 3 ml de PBS. Ce tube est un "blanc" permettant d'éliminer le bruit de fond dû à la

fluorescence propre du liquide amniotique.

Incubation à l'obscurité pendant une heure à température ambiante et sous agitation douce.

2.3) - Lecture du degré de polarisation P ou de l'anisotropie (r) et calcul de l'anisotropie corrigée.

λ excitatrice : 360 nm

λ émission : 460 nm

Le tube contenant le PBS seul, doit être lu dans les mêmes conditions de réglage de l'appareil, que les tubes contenant le DPH.

L'anisotropie est une grandeur additive :

$$(r_T) = \sum F_i r_i \quad (T) = \sum F_i \times r_i$$

où F_i est la fraction de fluorescence du compartiment i
 r_i son anisotropie et (r_T) : l'anisotropie totale. On a donc

$$(r_T) = \frac{F_T - F_{blc}}{F_T} \times r_{la} + \frac{F_{blc}}{F_T} \times r_{blc}$$

avec F_T = fluorescence totale des tubes contenant le DPH : $I + 2 I$

F_{blc} = fluorescence naturelle de l'échantillon + Trouble éventuel + ... etc

(r_T) : anisotropie avec DPH

r_{blc} : anisotropie sans DPH

On en déduit (r_{LA}) qui est la valeur recherchée, épurée de tous les effets parasites pouvant dépolariiser la lumière.

2.4) - Résultats

La maturité pulmonaire est :

- acquise pour $rLA < 0,255$
- douteuse pour $0,255 < rLA < 0,270$
- incomplète pour $rLA > 0,270$

Ces valeurs étant obtenues à partir du Fluofluidimètre SEFAM.

3) - Limites de la méthode

Certains auteurs font état d'une spécificité et d'une sensibilité de ce test avoisinant les 100 % (COX - 1983). D'autres au contraire ne lui accorde pas un pouvoir de résolution supérieur à celui du L/S (SIMON - 1981, TAIT - 1982, COX - 1983) et notamment en ce qui concerne les grossesses compliquées par des pathologies associées (COX - 1983, SIMON - 1987).

D) - Détermination du phosphatidyl glycérol par agglutination immunologique

1) - Raisons d'utilisation

- La détermination du phosphatidyl-glycérol n'est perturbée ni par la présence de sang ni par celle de méconium (GARITE - 1983)
- Le temps de réalisation du test est court : environ 1/2 heure
- Les différentes études publiées font état d'une fiabilité

supérieure du phosphatidyl glycérol par rapport à tous les autres tests avec

- des taux de faux positifs de l'ordre de 7%
- des taux de faux négatifs variant entre 0 et 1,8

(MAGNY - 1988)

Encore convient-il de préciser que la majorité des faux négatifs publiés, concernent des grossesses de femmes diabétiques (MAGNY - 1988). Une controverse a d'ailleurs longtemps existé au sujet de la maturation pulmonaire des foetus de mères diabétiques. Cette maturation était pour certains accélérée et pour d'autres ralentie, en fonction de la classe à laquelle était rattachée le diabète maternel.

En fait la maturation pulmonaire étant cortico-dépendante, des épisodes d'hyperinsulinismes sont susceptibles d'entraîner un retard de maturation par effets antagonistes du cortisol (PARDI - 1989).

2) - Méthode utilisée

Le test utilisé est l'Amniostat-FLM, commercialisé par HANA Biologics.

2.1) - Réactifs

Le coffret se compose de 6 flacons, de 6 plaques en verre et d'un miroir

- 1 contrôle négatif
- 2 contrôles positifs - 1 contrôle haut : 2 µg de PG/ml
 - 1 contrôle bas : 0,5 µg de PG/ml

- réactif A : suspension de lécithines et de cholestérol dans l'éthanol

- tampon phosphate

- réactif B : anti sérum anti PG

2.2) - Traitement des échantillons

Centrifuger le liquide amniotique à 500 g

Ramener les réactifs à température ambiante ainsi que les plaques d'agglutination

- Porter le flacon de tampon phosphate à 35° C

- Prendre 4 tubes à hémolyse de 5 ml

Tube n° 1 : - 25 µl de liquide amniotique

- ajouter 25 µl de réactif A

- mélanger

- ajouter 250 µl de tampon. Mélanger

Tubes n° 2, 3, 4 : même procédure mais remplacer les 25 µl de liquide amniotique par :

- tube n° 2 : 25 µl de contrôle négatif

- tube n° 3 : 25 µl de contrôle positif "faible"

- tube n° 4 : 25 µl de contrôle positif "fort"

Prendre une plaque d'agglutination et déposer dans chaque puits 25 µl de réactif B et 10 µl de l'une des 4 suspensions précédentes.

Placer la plaque sur un agitateur rotatif réglé à 60 tours/mn pendant 5 minutes.

2.3) - Lecture des réactions d'agglutination

La lecture se fait sur miroir par comparaison du "puit patient" avec les 3 contrôles.

Un résultat négatif est caractérisé par un puit présentant un fond uniforme blanc-gris.

Un résultat positif fait apparaître une agglutination large sur un fond clair.

Un contrôle au microscope est souvent nécessaire.

2.4) - Résultats

La maturité pulmonaire est acquise si l'on observe, pour le liquide amniotique, une agglutination d'intensité au moins égale à celle du contrôle positif haut (2 µg/ml)

Elle est douteuse si l'intensité de l'agglutination est comprise entre celle du contrôle positif bas, et celle du contrôle positif haut. Elle est négative si on ne note pas d'agglutination dans le puits "patient".

3) - Limites de la méthode

Ce test semi-quantitatif, bien qu'étant actuellement le plus fiable de tous ceux proposés, présente plusieurs inconvénients qui sont :

- une extrême difficulté d'interprétation, rendant non seulement illusoire une distinction entre agglutination faible et agglutination forte, mais nécessitant de plus que sa réalisation soit effectuée toujours par la même

personne.

- Un coût unitaire très élevé. Problème pouvant être contourné de deux façons :
 - suppression du contrôle positif bas
 - adaptation de la technique originelle en une microméthode (SULLIVAN - 1984) permettant de n'utiliser que 2 µl d'anti-sérum. Cette adaptation nécessite l'acquisition d'un microscope et l'utilisation de micro plaque d'agglutination.
- D'autre part certains micro-organismes tels que Gardnerella vaginalis, Listeria Monocytogenes et Escherichia Coli synthétisent du PG, ce qui peut expliquer les taux de PG élevés observés dans des liquides amniotiques infectés, avec des enfants qui vont développer une MMH.

II - RESULTATS PERSONNELS

A - Population étudiée

Trente-deux amniocentèses ont été réalisées, chez trente patientes présentant toutes une menace d'accouchement prématuré (MAP) sur grossesse unique. Ces ponctions ont été effectuées dans le but de surveiller une souffrance foetale et/ou d'apprécier le degré de maturité pulmonaire.

1) - Répartition des pathologies observées

La répartition des patientes en fonction de leur pathologie est la suivante :

| | |
|--|------|
| - MAP isolée | : 15 |
| - Hypertension | : 10 |
| - Hypotrophie foetale | : 3 |
| - Oligoamnios | : 2 |
| - Hydramnios | : 1 |
| - Hydrocéphalie ou malformations diverses | : 1 |
| - Iso-immunisation rhésus | : 1 |
| - Bassin généralement retréci (BGR) | : 1 |
| - Antécédents divers | : 1 |

Deux femmes ont eu deux amniocentèses, à une semaine d'intervalle, seule la dernière sera prise en compte.

2) - Profils amniotiques obtenus

Les profils amniotiques réalisés dans cette étude sont présentés sous forme de tableaux (Cf tableaux récapitulatifs des profils amniotiques). Un certain nombre de remarques sont à faire avant d'aborder l'étude de la corrélation existant entre état clinique des nouveaux-nés et résultats des tests.

1 - Parmi les trente patientes retenues, quinze d'entre elles présentent une MAP associée à une pathologie évolutive.

2 - L'âge de la grossesse était connu avec précision (évaluation clinique et échographie précoce concordantes) dans dix-huit cas.

3 - Les ponctions ont été réalisées entre 34 et 38 semaines de grossesse théorique et pour vingt-trois d'entre elles entre 35 et 36 semaines.

4 - Sur les 32 amniocentèses réalisées, 104 tests ont été effectués, répartis comme suit :

- 11 PG
- 31 détermination de la microviscosité
- 31 L/S
- 31 P/S

5 - L'écart moyen entre ponction et naissance est de huit jours avec des extrêmes variant entre zéro et trente jours.

6 - L'âge neurologique des nouveaux-nés est compris entre 36 et 39 semaines. On note un écart supérieur ou égal à 15 jours, entre âge neurologique et âge théorique de la grossesse dans 4 cas avec

- une imprécision de terme dans deux cas
- une hypotrophie dans un cas.

TABLEAU RECAPITULATIF DES PROFILS ANNIOTIQUES

| n° | Terme Fiable | Pathologie associée | MAP contrôlée | Ponction (se) | L/S | P/S | PG | rLA | Acct | DRT | Age Neuro |
|----|-----------------|---|-------------------------|------------------|----------|-------------|---------|----------------|---------------|---|-----------|
| 1 | Oui | Hydranmios. Déclenchement pour macrosomie foetale | 36,5 se | 36 | 11,6 | 6,15 | ++ | 0,242 | 36,5 | - | 36 - 37 |
| 2 | Non | Déclenchement pour B.G.R. | | 38 | 5 | 5,04 | + | 0,261 | 38 + 5 jr. | - | 38 - 39 |
| 3 | Oui | | Non | 34 35 | 1,8 3 | 3,05 4,9 | + ++ | 0,276 0,257 | 35,5 | Réa néo natale Appar à 5 Extubé H 16 | 36 |
| 4 | Non | H.T.A. - Asthme | Oui 34 se | 35 | 3,5 | 3,3 | - | 0,277 | 36-37 | - | 38 |
| 5 | Oui | | Oui 34,5 | 34 + 5 j | 6,10 | 5,16 | + | 0,260 | 38 | - | 38 |
| 6 | Oui | Oedème. Prise poids supérieure à 20 Kg HTA | Oui 36 se | 36 | 11,5 | 6,1 | ++ | 0,240 | 37 | - | 38 - 39 |
| 7 | Non | Spina bifida dans la famille | Oui 34 se | 36 - 37 | 2,5 | 3,35 | - | 0,281 | 39 | - | 40 |
| 8 | Oui | | Oui 35 se + 4 jrs | 35 + 4 j | 10,02 | 6 | ++ | 0,250 | 37 | - | 38 1/2 |
| 9 | Oui | | Oui 34 se | 35 | 2 | 4,2 | | 0,268 | 39 | - | 40 - 41 |

| n° | Terme Fiable | Pathologie associée | MAP contrôlée | Ponction (se) | L/S | P/S | PG | rLA | Acct | DRT | Age neuro |
|----|-----------------|--|------------------|------------------|------------|------------|----|----------------|-------|-----|-----------|
| 10 | Non | | Non 32 se | 36 | 7,5 | 8,64 | + | 0,240 | 36,5 | - | 39 |
| 11 | Non | H.T.A. Prise excessive poids | Non 28 se | 35 - 36 | 2,02 | 5,48 | + | 0,261 | 35-36 | - | 38 |
| 12 | Oui | H.T.A. | Non | 35 | 3,4 | 5,2 | | 0,251 | 35 | - | 38 |
| 13 | Non | H.T.A. | Oui 34 se | 34,5 35,5 | 2,5 4,3 | 4,8 6,5 | | 0,255 0,234 | 37 | - | 38 |
| 14 | Oui | Obésité - H.T.A. - Hypotrophie Déclenchement à 37 se | | 34 | 4,9 | 5,6 | | 0,255 | 37 | - | 39 |
| 15 | Oui | | Oui 34 se | 36 | 4,3 | 5,7 | | 0,252 | 37 | - | 37 - 38 |
| 16 | Oui | | Oui 34 se | 35,5 | 3,3 | 3,6 | | 0,238 | 37 | - | 37 |
| 17 | Non | H.T.A. | Oui 33 se | 36 | 3 | 4,8 | | 0,263 | 37 | - | 37 |
| 18 | Oui | | Oui 34,5 se | 36,5 | 10 | 7,3 | | 0,253 | 39 | - | 40 |
| 19 | Non | Obésité. Iso-immunisation foeto maternelle. Déclenchement à 36 - 37 se | | 33 - 34 | 1,40 | 2,10 | | 0,277 | 36-37 | - | 37 |
| 20 | Non | | Oui 34 se | 36 | 5,40 | 6,2 | | 0,193 | 39 | - | 40 |

| n° | Terme Fiable | Pathologie associée | MAP contrôlée | Ponction (se) | L/S | P/S | PG | rLA | Acct | DRT | Age neuro |
|----|-----------------|---|---------------------------|------------------|---------------------------|-----|----|-------|------|--------------------|-----------|
| 21 | Oui | Obésité - H.T.A. | Oui | 36 | 1,7 | 3,7 | | 0,269 | 40 | - | |
| 22 | Oui | | Non 34 se | 36 | 6,3 | 7,6 | | 0,211 | 36 | - | 36 - 37 |
| 23 | Oui | Obésité - H.T.A. | Oui 33 se | 35 | 2,1 | 5,4 | | | 39 | - | 39 |
| 24 | Oui | | Oui 33 se + 3 jours | 35,5 | 2,5 | 4,8 | | 0,210 | 38 | - | |
| 25 | Oui | | Non | 35 + 3 | 4,2 | 7,1 | | 0,250 | 36 | - | 37 - 38 |
| 26 | Non | | Oui 34 se | 37 | 7,9 | 8,2 | | 0,254 | 40 | - | 40 |
| 27 | Oui | H.T.A. gravidique | Non | 35 | 4,9 | 6 | | 0,242 | 36,5 | - | 38 |
| 28 | Non | Hypotrophie-Souffrance foetale-oligoamnios | Non | 35,5 | Interférence méconiale | | | 0,344 | 35,5 | M.M.M. à minima | 36 |
| 29 | Non | Déclenchement à 36 semaines Hypotrophie - Oligoamnios Tabagisme | | 34,5 | 3,3 | 5,2 | | 0,243 | 36 | - | 36 |
| 30 | Oui | | Oui 34 se | 37 | 8,4 | 6,9 | | 0,236 | 39 | - | 39 |

TABLEAU RECAPITULATIF DES PROFILS AMNIOTIQUES IMMATURES

| N° | Terme Fiable | Pathologie associée | MAP contrôlée | Ponction | L/S | F/S | PG | <r> | Acct | DRT | Age Neuro |
|----|--------------|---|---------------|----------|---------------------------|------|----|-------|-------|-----------------|-----------|
| 4 | non | HTA - asthme | oui | 35 se | 3,5 | 3,30 | - | 0,277 | 36-37 | / | 38 se |
| 7 | non | | oui | 36-37 se | 2,5 | 3,35 | - | 0,281 | 39 se | / | 40 se |
| 9 | oui | | oui | 35 se | 2 | 4,20 | | 0,268 | 39 se | / | 40-41 se |
| 19 | non | obésité, iso-imm Rh déclenchement 36-37 se | | 33-34 se | 1,4 | 2,10 | | 0,277 | 36-37 | / | 37 se |
| 21 | oui | obésité - HTA | oui | 36 se | 1,7 | 3,70 | | 0,269 | 40 se | / | ? |
| 28 | non | hypotrophie, souff. foetale, oligoamnios | non | 35,5 se | Interférence méconiale | | | 0,344 | 35,5 | MMH à minima | 36 se |

B - Interprétation des résultats

1) - Etude des profils obtenus

L'interprétation des profils est discutée par rapport à l'ensemble des tests réalisés, chaque ponction définissant un cas particulier. En effet, un profil ne sera pas rendu comme étant "immature" s'il présente, par exemple un P/S à 4,8-4,9 ou un <r> égal à 0,260 et que l'ensemble des autres tests est en faveur d'une maturité pulmonaire prononcée.

Au total, parmi les trente profils réalisés on dénombre :

- vingt-quatre profils caractéristiques d'une maturité satisfaisante
- et six profils d'immaturité pulmonaire, dont cinq s'avèreront être des faux positifs (mais l'écart entre ponction et accouchement est supérieur à dix jours).

En résumé

- Cinq des six profils d'immaturité pulmonaire présentent une imprécision de terme et/ou une dissociation portant sur l'un des quatre tests réalisés, ainsi qu'une pathologie associée pour quatre d'entre eux.

- Un seul des nouveaux-nés de cette étude présente à la naissance une maladie des membranes hyalines. Son liquide amniotique était "extrêmement méconial", signant ainsi une souffrance foetale prononcée, mais empêchant toute réalisation et interprétation correcte d'un bilan de maturité pulmonaire.

- Les deux autres "hypotrophiques déclenchés"

présenterons, comme c'est souvent le cas, et comme le laissaient présager les tests réalisés, des caractères de maturité pulmonaire prononcée.

- Quant au nouveau-né victime d'une iso-immunisation foeto maternelle, il ne développera pas non plus de syndrome de détresse respiratoire. Mais l'écart de 21 jours enregistré entre ponction et accouchement, a permis au poumon foetal d'acquérir un état de maturité satisfaisante.

2) - Discussion

A la vue de ces résultats et compte tenu du petit nombre de détresses respiratoires enregistré, on peut être amené à se poser la question suivante :

Quand l'évaluation obstétricale (clinique, radiographique et échographique) conduit un clinicien à pratiquer une amniocentèse, un seul test biologique peut-il être suffisant pour déterminer avec précision un état de maturité pulmonaire foetale ?

La réponse semble assez évidente : si l'on analyse avec soin l'ensemble des résultats fournis par les tableaux, on relève alors pour certains profils quelques discordances entre les tests réalisés.

Par exemple, le profil 4 est mature si l'on ne considère que le L/S, alors qu'il est immature pour les trois autres tests (PG, P/S, <r>).

Au total si un seul test avait été réalisé :

- Avec le rapport L/S : on aurait 3 bilans d'immaturité (n° 3 : première ponction, 19, 21)
- Avec le rapport P/S : on obtiendrait 10 bilans d'immaturité (n° 3, 4, 7, 9, 13 : première ponction, 16, 17, 19, 21, 24)
- Avec la détermination de la "microviscosité" du liquide amniotique : on obtiendrait 5 profils d'immaturité (n° 3 : première ponction, 4, 7, 19, 28) et 6 douteux (n° 2, 3, 5, 9, 11, 17)
- Avec la détermination du PG : on obtiendrait 2 bilans d'immaturité (n° 4, 7) et 5 douteux (n° 2, 3 : première ponction, 5, 10, 11) (pour onze tests réalisés).

L'interprétation est donc moins aléatoire quand on dispose d'un profil complet permettant de mettre en évidence des phénomènes physiques, chimiques ou immunologiques.

Néanmoins, certains impératifs d'urgences et de coût peuvent justifier une réduction du nombre de tests pratiqués.

Si l'on ne considère que le caractère d'urgence lié à ce type d'examen, la méthode la plus intéressante paraît être la mise en évidence du PG par agglutination immunologique. Cette technique ne demande qu'une demi-heure de manipulation, entre l'arrivée du liquide amniotique au laboratoire, et le compte-rendu des résultats.

Malheureusement, la difficulté d'interprétation de ce test nécessite parfois une deuxième détermination, et interdit sa réalisation à tout personnel non entraîné.

Le gain de temps par rapport aux trois autres techniques n'est donc pas toujours réel, d'autant plus que l'on peut considérablement diminuer le temps nécessaire à la détermination de la "microviscosité" du liquide amniotique, par incorporation de la sonde fluorescente à 37° C.

Quant au choix des techniques en fonction de leur coût, aucune d'entre elles ne peut être qualifiée d'économique (à part le L/S).

- P/S et <r> nécessitent un appareillage spécifique
- PG ne nécessite pas d'acquisition particulière (en dehors éventuellement d'un microscope), mais les kits sont commercialisés à un prix très élevé.

Cependant, le rapport L/S sera volontairement délaissé en raison du nombre important des facteurs limitant sa réalisation et son interprétation.

De plus même si cette méthode a rendu de grands services avant l'apparition de la polarisation de fluorescence, elle semble aujourd'hui dépassée, les résultats obtenus n'étant pas toujours le reflet de la composition lipidique du poumon foetal. En effet, si l'on considère les concentrations relatives en lécithines (65 %) et en sphingomyélines (1 %) du surfactant pulmonaire, il est étonnant de ne jamais trouver, même au terme de la grossesse de rapport L/S de l'ordre de 50 ou 60.

En définitive la stratégie la mieux adaptée en fonction des impératifs clinico-biologiques semble être la suivante :

- Estimation de la maturité pulmonaire foetale par polarisation de fluorescence, en évitant toutefois de rendre les résultats en "poises". La corrélation entre microviscosité et degré de polarisation, ayant été établie à partir de solutions de référence assez éloignées de la composition réelle du liquide amniotique (suspension dans du glycérol ou des huiles minérales de L et de PG extraits de jaune d'oeufs, donc riches en acides gras insaturés). (CHESKIN - 1980, COX - 1983, TAIT - 1986).
- Détermination en parallèle du PG ou du rapport P/S, ce qui permet d'associer une mesure physique, et une mesure chimique, et par là même de s'affranchir d'un certain nombre de résultats douteux, et des défauts inhérents à chaque technique.

CONCLUSION

En période anténatale, les méthodes biochimiques ou physiques d'évaluation de la maturité pulmonaire foetale sont d'un intérêt essentiel lorsqu'on envisage une naissance prématurée.

L'éventail des tests proposés, comme nous l'avons vu tout au long de cette étude, est particulièrement large.

En général chaque méthode est susceptible de fournir un certain nombre d'informations aux cliniciens, encore faut-il bien connaître les avantages, les limites et les interférences pouvant influencer de façon importante sur le résultat final.

Il est donc souhaitable de combiner plusieurs de ces techniques (de préférence : une méthode physique, et une biochimique) afin de limiter le nombre de faux positifs ou de faux négatifs.

En conclusion, et à condition de s'entourer d'un certain nombre de précautions, on peut affirmer que les mesures sur le surfactant pulmonaire présent dans le liquide amniotique sont devenues un outil fiable et indispensable dans la surveillance des grossesses à risque.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALCINDOR L.G., BEREZIAT G., VIELH J.P., GAUTRAY J.P.
Le rapport de concentration acide palmitique sur acide stéarique, indicateur de la maturité pulmonaire foetale.
Clin. Chim. Acta (1974), 50, 31-34

- 2 - ALCINDOR L.G.
Le point rapide aujourd'hui sur le surfactant pulmonaire
Presse Médicale (1984), 4, 352-364

- 3 - ANAKOAR S., GARRY P.J., STANDEFER J.C.
Enzymatic assay for lecithin in amniotic fluid
Clin. Chem. (1978), 25, 103-107

- 4 - ASHWOOD E.R., OLDROYD R.G., PALMER S.E.
Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid
Obstet. Gynecol. (1990), 75, 289-292

- 5 - BATZENSCHLAGER A., MORGENROTH K.
Le système surfactant du poumon
(1988) W de G Berlin

- 6 - BHAT R., JOHN E., DIAZ-BLANCO J., ORTEGA R., FORNELL L., VIDYASAGAR D.
Surfactant therapy and spontaneous diuresis
J. Pediatr. (1989), 114, 443-447

- 7 - BARKAI G., MASHIACH S., MODAN M., SERR D.M., LAMIR D.,
LUSKY A., GOLDMAN B., SHINITZKY M.
Amniotic fluid fluorescence polarization value at
physiological temperature, a marked improvement in assessing
fetal lung maturity
Clin. Chem. (1983), 29, 264-267
- 8 - BLASS K.G., THIBERT R.J., DRAISEY T.F.
Simple rapid determination of lecithin and sphingomyelin in
amniotic fluid.
Clin. Chem. (1976), 19, 1394-1398
- 9 - BLASS N.G., BLASS K.G.
A rapid, sensitive method for accurate determination of the
lecithine/sphingomyelin ratio by thin-layer chromatography
and reflectance spectrofluorometry.
J. Chromatogr. (1979), 163, 37-46
- 10 - BLIGH E.G., DYER W.J.
A rapid method of total lipid extraction and purification
Can J. Biochem. Physiol. (1959), 37, 911-917
- 11 - BLUMENFELD T.A., CHESKIN H.S., SHINITZKY M.
Microviscosity of amniotic fluid phospholipids and its
importance in determining fetal lung maturity
Clin. Chem. (1979), 25, 64-67

- 12 - BONNET H.
Médecine périnatale
Pédiatrie 1 (1984) SIMEP Villeurbanne , 24-26 , 121-126
- 13 - BOREL J.P., RANDOUX A., MAQUART F.X., LE PEUCH C.,
VALEYRE J.
Biochimie Dynamique
(1987) Maloine Paris
- 14 - BURER R.C.
Prenatal prediction of the respiratory distress syndrome
(RDS)
Pediatr. Res. (1971), 5, 655 (abstract)
- 15 - BRIGHTON K., GAUDY G., GAIDNER D.
Hyaline membrane disease II. lung lecithine
Arch. Dis. Child. (1970), 45, 311-320
- 16 - BOULANGER P., POLONOVSKI J., BISERTE G., DAUTREVAUX M.
Biochimie médicale
1 - Les constituants des organismes vivants
2ème Edition, (1989), Masson, Paris
- 17 - BRADLEY C.A., SAILHANY K.E., ENTMAN S.S., ALESHIRE S.L.,
PASL F.F.
Automated enzymatic measurement of lecithin, sphingomyelin
and phosphatidyl glycerol in amniotic fluid.
Clin. Chem. (1987), 33, 81-86

- 18 - BROUET G., EVEN P., DUROUX P., BIGNON J., CAUBARRERE I.
Eléments de pneumologie
(1976) Editions médicales et universitaires, Paris , 7-25
- 19 - BUSTOS R., KULOVICH M.V., GLUCK L., GABBE S.G., EVERSTON C.,
VARGAS C., LOWENBERG E.
Significance of phosphatidyl glycerol in amniotic fluid in
complicated pregnancies.
Am. J. Obstet. Gynecol. (1979), 133, 899-903
- 20 - CEDARD P., CENTENE J., AMIEL-TISON C., HENRION R.
Assessment of fetal lung maturity by amniocentesis with the
L/S ratio
Am. J. Obstet. Gynecol. (1973), 115, 275-276
- 21 - CHESKIN H.S., BLUMENFELD T.A., BEERS P.C., BUDEGA V.
Effect of gestational variation of phosphatidyl glycerol and
phosphatidyl inositol on the microviscosity of amniotic
fluid phospholipids.
Clin. Chem. (1980), 26, 301-304
- 22 - CLEMENTS J.A., PLATZKER A.C.G., TIERNEY D.F., HOBEL C.J.,
CREASY R.K., MARGOLIS A.J. et al.
Assessment of the risk of the respiratory distress syndrom
by a rapid test for surfactant in amniotic fluid
N. Engl. J. Med. (1972), 286, 1077-1081

- 23 - COMROE J.H.
Physiologie de la respiration
2ème édition, (1978), Masson, Paris
- 24 - COX K.M., ALEXANDER ROSS J.B., PETERSON A.P., BENEDETTI T.J.
Fetal lung maturity assessed by fluorescence polarization :
evaluation of predictive value correction for endogenous
fluorescence and comparison with L/S ratio
Clin. Chem. (1983), 29, 346-349
- 25 - D'COSTA M., MASSINI R., BMAN H.
L/S ratios in tracheal aspirates from newborn infants.
Pediatr. Res. (1987), 22, 154-157
- 26 - DEJOURS P.
Physiologie de la respiration
(1982), Flammarion Medecine Sciences, Paris , 67-68
- 27 - DOHNAL J.C., BOWIE L.J., BURSTEIN H.J.
Degree of unsaturation of the fatty acids chains of
phospholipids influences the fluorescence polarization :
implications for evaluating fetal lung maturity
Clin. Chem. (1986), 32, 425-428
- 28 - DUBIN S.B.
Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by
resistive pulse counting : relationship to measures of fetal
lung maturity
Clin. Chem. (1989), 35, 612-616

- 29 - DUCK-CHONG C.O., GUPTA J.M., STOREY G.M.B., HOUGHTON C.R.S.
Lamellar body phospholipid content of amniotic fluid and
L/S ratio compared in assessing fetal lung maturity
Clin. Chem. (1980), 26, 766-769
- 30 - DUCK-CHONG C.G., BAKER G.S., MURDOCH S.R., PRICE R.M.
Methods for extracting phospholipids from human amniotic
fluid compared
Clin. Chem., (1984), 30, 271-274
- 31 - EGBERTS J., SOEDERHUIZEN W., GEBHARDT D.O.E.
Fluorometric procedure for determining "lamellar body" PL in
the particulate fraction of amniotic fluid after filtration
Clin. Chem., (1983), 29, 362-365
- 32 - ELRAD H., BEYDOUN S.N., HAGEN J.H., CABALUM M.T.,
AUBRY R.H.
Fetal pulmonary maturity as determined by fluorescent
polarization of amniotic fluid
Am. J. Obstet. Gynecol., (1978), 132, 681-685
- 33 - FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY A.
A simple method for the isolation and purification of total
lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem., (1957), 226, 497-509

- 34 - FRANCOUAL J., MAGNY J.F., DEHAN M., LELUC R.
Le phosphatidyl glycerol marqueur de la maturité pulmonaire
en période périnatale
Le Biologiste, (1987), 171, 453/33-457/37
- 35 - FREER D.E., STATLAND B.E.
Measurement of amniotic fluid surfactant
Clin. Chem., (1981), 27, 1629-1641
- 36 - GAMERRE M., AUGHER J.P., MATTEI J.F., RUF H.
Les amniocentèses tardives
(1987), Mise à jour en gynécologie et obstétrique, Vigot
Paris, 241-256
- 37 - GARITE T.J., YABUSAKI K.K., MOBERG L.J., SYMONS J.L.,
WHITE T., ITANO M. and FREEMAN R.K.
A new rapide slide agglutination test for amniotic
phosphatidyl glycerol : laboratory and clinical correlation
Am. J. Obstet. Gynecol., (1983), 147, 681-686
- 38 - GEBHARDT D.O.E., BEINTEMA A., DEROOIG R.E.
A study of the lecithin/sphingomyelin ratio of amniotic
fluid
Clin. chim. Acta (1975), 64, 133-138
- 39 - GEBHARDT D.O.E.
Relationship between the lecithin/sphingomyelin ratio and
the P value of amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. (1979), 133, 937

- 40 - GIRAUD J.R., TOURNAIRE M.
Surveillance et thérapeutiques obstétricales
(1982), Masson Paris
- 41 - GLUCK L., KULOVICH M.V., BRODY S.J.
Rapid quantitative measurement of lung tissue phospholipids
J. Lipid. Res., (1966), 7, 570-576
- 42 - GLUCK L., KULOVICH M.V., BORER R.C., BRENNER P.H.,
ANDERSON G.G., SPELLACY N.N.
Diagnosis of the respiratory distress syndrome by
amniocentesis
Am. J. Obstet. Gynecol., (1971), 109, 440-445
- 43 - GLUCK L., KULOVICH M.V.
Lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal
and abnormal pregnancy
Am. J. Obstet. Gynecol. (1973), 115, 539-546
- 44 - GLUCK L., KULOVICH M.V., BORER R.C.
The interpretation and significance of the
lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. (1974), 120, 142-155
- 45 - GOLDE S.H., GLADYS M.D., MOSLEY M.S.
A blind comparison study of the lung phospholipid profile,
fluorescence viscosity and the lecithin/sphingomyelin ratio.
Am. J. Obstet. Gynecol., (1970), 136, 222-227

- 46 - GOTTELI G.R., STANFILL R.E., KABRA P.M., FARINA F.A.,
MARTON L.J.
Simultaneous determination of phosphatidyl glycerol and the
lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid.
Clin. Chem. (1978) , 24, 1144-1146
- 47 - HALLMAN M., KULOVICH M.V., KIRPATRICK E.
Phosphatidyl inositol and phosphatidyl glycerol in amniotic
fluid : indices of lung maturity
Am. J. Obstet. (1976), 125, 613-617
- 48 - HALLMAN M., FELDMAN B.H., KIRPATRICK E., GLUCK L.
Absence of phosphatidyl glycerol in respiratory distress
syndrom in the new born. Study of the minor surfactant
phospholipids in new borns.
Pediatr. Res (1977), 11, 714-718
- 49 - HALLMAN M., ARJOMAA P., HOPPU K., TERANO K., AKINO T.
Surfactant protein in the diagnosis of fetal lung maturity
II. The 35 k.d protein and phospholipids in complicated
pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol (1989), 161, 965-969
- 50 - HAMLIA C.R., SULLIVAN P.A.
A cost effective modification of an immunologic
agglutination test for amniotic fluid phosphatidyl glycerol
Clin. Chem. (1984), 30, 1277-1278

- 51 - HARDING P., POSSMAYER F., MILNE K., JACO N.T., WALTERS J.M.
Amniotic fluid phospholipids and fetal maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. (1973), 115, 298-306
- 52 - IP M.P.C., DRAISEY T.F., THIBERT R.J., GAGNEJA G.L.,
JASEY G.M.
Fetal lung maturity as assessed by gas liquid
chromatographic determination of phospholipid palmitic acid
in amniotic fluid
Clin. Chem. (1977), 23, 35-40
- 53 - JIN H.Z., CHEN C., JIN Q.L., SHAO X.M.
Treatment of hyaline membrane disease by human amniotic
fluid surfactant.
Chin. Med. J. (1989), 102, 944-946
- 54 - KASHIWABARA J., ONOYAMA Y., SHINOKAWA H., HISANAGA S.,
NAKANO H.
A new method for measurement of surfactant specific
apoprotein in amniotic fluid.
Int. J. Gynaecol. Obstet. (1989), 29, 147-152
- 55 - KATYAL S.L., SINGH G.
An enzyme-linked immuno assay of surfactant apoprotein its
application to the study of fetal lung development in the
rat.
Pediatr. Res. (1983), 17, 439-443

- 56 - KOKATNUR M., BROOKS V., PLANCHE W.C.
Fatty acids of sphingomyelin from amniotic fluid of normal
and diabetic pregnancies.
Lipids (1985), 20, 449-453
- 57 - KRAHN J.
Variables affecting resolution of lung phospholipids in one
dimensional thin layer chromatography
Clin. Chem. (1987), 33, 135-137
- 58 - KULOVICH M.V., HALLMAN N.B., GLUCK L.
The lung profile I. Normal pregnancy
Am. J. Obstet. Gynecol. (1979), 135, 57-63
- 59 - KULOVICH M.V., HALLMAN N.B., GLUCK L.
The lung profile II. Complicated pregnancy
Am. J. Obstet. Gynecol. (1979), 135, 64-70
- 60 - KULKAMI B.D., BIENIARZ J., BURD L., SCOMMEGNA A.
Determination of lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic
fluid.
Obstet. Gynecol. (1972), 40, 173-179
- 61 - LANG M.J., ROBERT T., REDDY N.S., KURTH C.G., MERITT T.A.
A controlled trial of human surfactant replacement therapy
for severe respiratory distress syndrome in very low birth
weight infants.
J. pediatr. (1990), 116, 295-300

- 62 - LEGGE M., POTTER H.C.
Amniotic fluid fluorescence polarisation values for
assessing fetal lung maturation
J. Clin. Pathol. (1981), 34, 1094-1096
- 63 - LEGRAS B., AUDIAU C., CLERC L., RUELLAND A., GOBRON S.,
CLOAREC L.
Intérêt de la mise en évidence du phosphatidyl glycérol
amniotique au cours de la grossesse chez la femme
diabétique.
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (1985), 14, 587-589
- 64 - LINDBACK T.
Amniotic fluid palmitic acid concentration and prediction of
fetal lung maturity
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1976), 36, 689-693
- 65 - MACKENZIE J.R., TRUESDALE M.
Radial "high performance" thin layer chromatography used to
assess fetal lung maturity
Clin. Chem. (1990), 36, 728-731
- 66 - MAGNY J.F., FRANCOUAL J., DWORZAK P., DEHAN M., GABILAN J.C.
Diagnostic biochimique des détresses respiratoires néo-
natales : maladie des membranes hyalines et inhalation
méconiale.
Arch. Fr. pediater. (1985), 45, 505-510

- 67 - MASON R.J., NELLENBOGEN J., CLEMENTS J.A.
Isolation of disaturated phosphatidyl choline with osmium tetroxide
J. Lipid. Res. (1976), 17, 281-283
- 68 - MAUGERY D., PEGER J., JARDILLIER J.C., AGNERAY J.
Etude des phospholipides du liquide amniotique
Pharm. Biol. (1974), 8, 595-597
- 69 - MERGER R., LEVY J., MELCHIOR J.
Précis d'obstétrique
5ème édition, (1989), Masson, Paris
- 70 - MOTTA C., JOUANEL P., SUZANNE F., BAUDON J., DASTUGUE B.
Estimation de la maturité pulmonaire foetale par la mesure du rapport de concentration acide palmitique/acide stéarique et par le test de Clements dans le liquide amniotique.
Ann. Biol. Clin. (1979), 37, 157-161
- 71 - MOTTA C.
Etude critique de quelques tests amniotiques d'appréciation de la maturité pulmonaire foetale
Ann. Biol. Clin. (1982), 40, 249-254
- 72 - MURRAY D.K.
Improved reproductibility and quantitative analysis of phospholipids by flamme ionization detection.
J. Chromatogr. (1985), 331, 303-312

73 - OLSON E.B., GRAVEN S.N.

Comparison of visualisation methods used to measure the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid.

Clin. Chem. (1974), 20, 1408-1415

74 - OULTON M., FRASER M., ROBINSON S.

Correlation of absorbance at 650 nm with the presence of phosphatidyl glycerol in amniotic fluid.

J. reprod. Med. (1980), 35, 402-406

75 - PARDI G., BUSCAGLIA M., KUSTERMANN A., BOZZETTI P.,

FERRARI M.M., MARCONI A.M.

Foetal pulmonary maturation in pregnancies complicated by diabetes and rhésus immunisation

Eur. respir. J. (1989), 2, 50-52

76 - PERELMAN H.P., FARREL P.M.

Analysis of causes of neonatal death in the United States with specific emphasis on fatal hyaline disease.

Pediatrics, (1982), 70, 570-575

77 - PLANCHE W.C., FARO S., WYCHEK J.

Amniotic fluid optical density : relationship to L/S ratio phospholipid content and desquamation of fetal cells

Obstet. Gynecol. (1981), 58, 309-313

78 - POLONOVSKI M.

Biochimie Médicale

Fascicule IV , (1977), Masson Paris

- 79 - ROUX J.F., NAKAMURA J., FROSOLONO M.
Fatty acid composition and concentration of lecithin in the acetone fraction of amniotic fluid phospholipids
Am. J. Obstet. Gynecol. (1974), 119, 835-843
- 80 - RUSSEL P.T., MILLER W.J., MACLAIN C.R.
Palmitic acid content of amniotic fluid lecithin as an index to fetal lung maturity.
Clin. Chem. (1974), 20, 1431-1434
- 81 - RUSSEL J.G.
A calibrated fluorescence polarization assay for assessment of fetal lung maturity
Clin. Chem. (1987), 33, 1177-1184
- 82 - RUSSEL J.C., COOPER C.M., KETCHURN C.H., TORDAY J.S.
and al.
Multicenter evaluation of TDX test for assessing fetal lung maturity
Clin. Chem. (1989), 35, 1005-1010
- 83 - SARKOZI L., KOVACS H.N., FOX H.A., KERENYI T.
Modified method for estimating the phosphatidyl choline : sphingomyelin ratio in amniotic fluid and its use in the assessment of fetal lung maturity
Clin. Chem. (1972), 18, 956-960

- 84 - SASS N.L., ALVARADO R., MARTIN J.P.
A more specific indicator for use in the determination of
amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio
Bioch. Med. (1976), 15, 217-219
- 85 - SBARRA A.J., MICHLEWITZ H., SELVARAJ R.J., MITCHELL G.M.
and al.
Relation between optical density at 650 nm and L/S ratio
Obstet. Gynecol. (1977), 50, 723-727
- 86 - SBARRA A.J., SELVARAJ R.J., CETRULO C.L., KENNEDY J.L.
and al.
Positive correlation of optical density at 650 nm with
lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. (1978), 130, 788-790
- 87 - SCHIRAR A., VIELH J.P., ALCINDOR L.G., GAUTRAY J.P.
Amniotic fluid phospholipids and fatty acids in normal
pregnancies
Am. J. Obstet. Gynecol. (1974), 121
- 88 - SCHREYER P., TAMIR I., BUKOVSKY I.
Amniotic fluid total phospholipids versus lecithin/
sphingomyelin ratio in the evaluation of fetal lung
maturity.
Am. J. Obstet. Gynecol. (1974), 120, 909-917

- 89 - SHINITZKY M., GOLDFISHER A., BRUCK A., GOLDMAN B., STERN E.,
BARKAI G., MASHIACH S., SERR D.M.
A new method for assessment of fetal lung maturity
Br. J. Obstet. Gynaecol. (1976), 83, 838-844
- 90 - SIMON N.V., WILLIAMS G.H., FAIRBROTHER P.F., ELSEY R.C.,
PERKINS R.P.
Prediction of fetal lung maturity by amniotic fluid
fluorescence polarization, L/S ratio and phosphatidyl
glycerol.
Obstet. and Gynecol. (1981), 57, 295-300
- 91 - SIMON N.V., LEVITSKY J.S., LENKO P.M.
The prediction of fetal lung maturity by amniotic fluid
fluorescence polarization in diabetic pregnancy.
Am. J. Perinatol (1987), 4, 171-175
- 92 - SOCOL M.L., SING E., DEPP O.R.
A rapid indicator of fetal pulmonary maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. (1984), 148, 445-450
- 93 - SOCOL M.L.
The tap test : confirmation of a simple rapid, inexpensive
and reliable indicator of fetal pulmonary maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. (1990), 162, 218-222

- 94 - SPILMAN T., COTTON D.B., GOLUNSKI E.
Detection frequency by thin-layer chromatography of
phosphatidyl glycerol in amniotic fluid with clinically
functional pulmonary surfactant.
Clin. Chem (1988), 34, 1976-1982
- 95 - TAIT J.F., FOERDER C.A., ASHWOOD E.R., BENEDETTO T.J.
Prospective clinical evaluation of an improved fluorescent
polarization assay for predicting fetal lung maturity.
Clin. Chem. (1987), 33, 554-558
- 96 - TAIT J.F., FRANKLIN R.W., SIMPSON J.B., ASHWOOD E.R.
Improved fluorescence polarization assay for use an
evaluating fetal lung maturity (I) Development of the assay
procedure.
Clin. Chem. (1986), 32, 248-254
- 97 - THOMAS A., BLUMENFELD M.D., RAYMOND I., STARCK M.D.,
STANLEY J., JOHN D., GEORGE B.S., FURTH I.D., VINCENT J.,
FREDA M.D., SHINITZKY M.
Determination of fetal lung maturity by fluorescence
polarization of amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. (1978), 130, 782-787
- 98 - TIWARY C.M., GOLDKRAND J.N.
Assessment of fetal pulmonic maturity by measurement of the
surface tension of amniotic fluid lipid extract.
Obstet. Gynecol. (1976), 48, 191-194

99 - TSAI M.Y., MARSHALL J.G.

Phosphatidyl glycerol in 261 samples of amniotic fluid from normal and diabetic pregnancies, as measured by one-dimensional thin layer chromatography

Clin. Chem. (1979), 25, 682-685

100 - TSAI M.Y., SHULTZ E.K., WILLIAMS P.P., BENDEL R., BUTLER J., FARB H., WAGER G., KNOX E.G., JULIAN T., THOMPSON T.R.

Assay of disaturated phosphatidyl choline in amniotic fluid as a test of fetal lung maturity.

Clin. Chem. (1987), 33, 1648-1651

101 - WARREN C., ALLEN J.T., HOLTON J.B.

Assessment of fetal lung maturity by amniotic fluid fatty acid analysis

Clin. chim. Acta (1973), 44, 457-461

102 - WHITTLE M.J., WILSON A.I., WHITFIELD C.R., PATON R.D., LOGAN R.W.

Amniotic fluid PG : an early indicator of fetal lung maturity.

Br. J. Obstet. gynaecol (1983), 90, 134-138

103 - WORTHINGTON D., SMITH B.T.

The site of amniocentesis and the L/S ratio

Obstet. Gynecol. (1978), 52, 552-554

| | |
|---|-------|
| 2) - Origine amniotique | p. 35 |
| 3) - Origine maternelle | p. 35 |
| B - La résorption du liquide amniotique | p. 36 |
| 1) - Résorption par déglutition du liquide amniotique par le foetus | p. 36 |
| 2) - Réabsorption par l'épithélium amniotique | p. 36 |
| C - Rôle physiologique du liquide amniotique | p. 36 |
| 1) - Pendant la grossesse | p. 37 |
| 2) - Pendant l'accouchement | p. 37 |
| D - Caractères physiques du liquide amniotique | p. 37 |
| E - Composition chimique du liquide amniotique | p. 38 |
| 1) - Eléments minéraux | p. 38 |
| 2) - Eléments organiques | p. 39 |
| III - STRUCTURE ET PROPRIETES DES PRINCIPAUX LIPIDES MIS EN EVIDENCE DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA MATURETE PULMONAIRE FOETALE | |
| | p. 42 |
| A - Classification des lipides | p. 42 |
| 1) - Les lipides simples | p. 42 |
| 2) - Les lipides phosphorés ou phospholipides | p. 43 |
| 3) - Les lipides azotés non phosphorés | p. 43 |
| 4) - Les lipides soufrés | p. 43 |
| B - Structure et propriétés des acides gras | p. 44 |
| C - Structure et propriétés des phospholipides | p. 47 |
| 1) - Les glycérophospholipides | p. 47 |
| 2) - les sphingophospholipides | p. 49 |

| | |
|--|-------|
| IIème PARTIE : ANALYSE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE | p. 51 |
| I - LES AMNIOCENTESES | p. 52 |
| A - Indications | p. 52 |
| 1) - Amniocentèse précoce | p. 52 |
| 2) - Amniocentèse tardive | p. 52 |
| B - Techniques | p. 55 |
| 1) - Amniocentèse précoce | p. 55 |
| 2) - Amniocentèse tardive | p. 55 |
| C - Risques obstétricaux | p. 58 |
| II - LES PRINCIPALES METHODES D'ANALYSE DU LIQUIDE AMNIOTIQUE | p. 58 |
| A - Méthodes biochimiques | p. 58 |
| 1) - Généralités | p. 58 |
| 2) - Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM) | p. 61 |
| 3) - Méthodes d'estimation de la maturité pulmonaire foetale utilisant la CCM | p. 63 |
| 3.1) - Rapport lécithine sur sphingomyéline (L/S) | p. 63 |
| 3.1.1. Méthodes | p. 63 |
| 3.1.2. Intérêt du rapport L/S | p. 66 |
| 3.2) - Rapport lécithines précipitables/ sphingomyélines | p. 67 |
| 3.3) - Dosage des lécithines | p. 67 |
| 3.4) - Mise en évidence du PG - PI - PS - PE | p. 68 |

| | |
|---|-------|
| 4) - Principe de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) | p. 70 |
| 5) - Détermination de la maturité pulmonaire foetale par CPG | |
| Rapport palmitate sur stéarate (P/S) | p. 71 |
| B - Méthodes physiques | p. 72 |
| 1) - Mesure de la tension superficielle du liquide amniotique | p. 73 |
| 2) - Mise en évidence du pouvoir émulsionnant des lécithines | p. 73 |
| 3) - Densité optique à 650 nm | p. 74 |
| 4) - Etude des "lamellar bodies" | p. 74 |
| 5) - Microviscosité par polarisation de fluorescence | p. 75 |
| 5.1) - Principe de la polarisation de fluorescence | p. 75 |
| 5.2) - Détermination de la polarisation de fluorescence du liquide amniotique | p. 76 |
| C) - Méthodes immunologiques | p. 80 |

| | |
|---|-------|
| IIIème PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS | p. 81 |
| I - METHODES RETENUES | p. 82 |
| A - Rapport L/S | p. 83 |
| 1) - Raisons d'utilisation | p. 83 |
| 2) - Méthode utilisée | p. 83 |
| 2.1) - Extraction des phospholipides du liquide amniotique | p. 83 |
| 2.2) - Chromatographie des phospholipides | p. 84 |
| 2.3) - Révélation | p. 84 |
| 2.4) - Résultats | p. 85 |
| 3) - Limites de la méthode | p. 86 |
| B - Rapport P/S | p. 87 |
| 1) - Raisons d'utilisation | p. 87 |
| 2) - Méthode utilisée | p. 87 |
| 2.1) - Extraction des phospholipides | p. 87 |
| 2.2) - Hydrolyse des phospholipides | p. 87 |
| 2.3) - Méthylation des acides gras | p. 88 |
| 2.4) - Séparation des acides gras par CPG | p. 88 |
| 2.5) - Résultats | p. 88 |
| 3) - Limites de la méthode | p. 88 |
| C - Microviscosité par polarisation de fluorescence | p. 89 |
| 1) - Raisons d'utilisation | p. 89 |
| 2) - Méthode utilisée | p. 90 |
| 2.1) - Préparation des réactifs | p. 90 |
| 2.2) - Traitement des échantillons | p. 90 |
| 2.3) - Lecture du degré de polarisation P ou de l'anisotropie (r) et calcul de l'anisotropie corrigée | p. 91 |

| | |
|--|--------|
| 2.4) - Résultats | p. 92 |
| 3) - Limites de la méthode | p. 92 |
| D - Détermination du phosphatidyl glycérol par agglutination immunologique | p. 92 |
| 1) - Raisons d'utilisation | p. 92 |
| 2) - Méthode utilisée | p. 93 |
| 2.1) - Réactifs | p. 93 |
| 2.2) - Traitement des échantillons | p. 94 |
| 2.3) - Lecture des réactions d'agglutination | p. 95 |
| 2.4) - Résultats | p. 95 |
| 3) - Limites de la méthode | p. 95 |
| II - RESULTATS PERSONNELS | p. 96 |
| A - Population étudiée | p. 96 |
| 1) - Répartition des pathologies observées | p. 97 |
| 2) - Profils amniotiques obtenus | p. 97 |
| B - Interprétation des résultats | p. 103 |
| 1) - Etude des profils obtenus | p. 103 |
| 2) - Discussion | p. 104 |
| CONCLUSION | p. 108 |
| BIBLIOGRAPHIE | p. 109 |

RESUME

Après l'étude de la composition chimique du surfactant pulmonaire et du liquide amniotique, l'auteur rappelle les grands courants d'idée existant en matière d'estimation de la maturité pulmonaire foetale.

Actuellement quatre techniques sont essentiellement utilisées en vue de déterminer les risques de détresse respiratoire ou de maladie des membranes hyalines pouvant accompagner une naissance anticipée.

Ces quatre techniques sont : rapport L/S, rapport P/S, "microviscosité" par polarisation de fluorescence et détermination du phosphatidyl glycérol.

Cette étude réalisée à partir de 32 amniocentèses montre qu'il est préférable d'associer plusieurs de ces techniques afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité des résultats.

MOTS-CLES

Foetus

Membranes hyalines : maladie

Amniocentèse

Microviscosité