

LES OSTÉOCHONDRODYSPLASIES LÉTALES : étude foetopathologique de 32 cas

Ahlem Lahmar-Boufaroua, Mohamed Tahar Yacoubi, Sihem Hmissa, Mohamed Selmi, Sadok Korbi

service d'anatomie et cytologie pathologique. Hôpital Farhat Hached Sousse

A. Lahmar-Boufaroua, M. T. Yacoubi, S. Hmissa, M. Selmi, S. Korbi

LES OSTÉOCHONDRODYSPLASIES LÉTALES :
étude foetopathologique de 32 cas

LA TUNISIE MEDICALE - 2009 ; Vol 87 (n°02) : 127 - 132

A. Lahmar-Boufaroua, M. T. Yacoubi, S. Hmissa, M. Selmi, S. Korbi

LETHAL OSTÉOCHONDRODYSPLASIA :
foetopathological study of 32 cases

LA TUNISIE MEDICALE - 2009 ; Vol 87 (n°02) : 127 - 132

RÉSUMÉ

Pré-requis : Les ostéochondrodysplasies létales sont rares, leur incidence est estimée à 1 pour 10 000 naissances. Elles sont le plus souvent à déterminisme génétique. .**But :** étayer les caractéristiques malformatives et dysmorphiques ainsi que la prise en charge foetopathologique des ostéochondrodysplasies létales**Méthodes :** Étude descriptive de 32 cas d'ostéochondrodysplasies fœtales létales, colligés sur une période de 14 ans, au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques de Sousse.**Résultats :** Notre série était composée de 23 fœtus issus d'une interruption médicale de grossesse, 6 nouveau-nés et 3 mort-nés. L'âge moyen des mères était de 28 ans, la consanguinité était de 61%. 3 cas de récurrence de la maladie ont été notés.

Les anomalies osseuses ont été décelées à l'échographie anténatale dans 25 cas et à la naissance dans 7 cas. Elle avait objectivé une micromélie dans tous les cas, un thorax étroit dans 5 cas et une spina bifida dans 3 cas. L'examen foetopathologique, incluant un examen macroscopique, radiologique et histologique d'un prélèvement osseux, nous a permis en se basant sur la classification internationale de 2001 de classer les 32 cas d'ostéochondrodysplasies en : 8 cas d'achondrogénèse de type I (forme de Parenti-Fraccaro), 3 cas d'achondrogénèse de type II (forme de Langer-Saldino), 9 cas d'ostéogénèse imparfaite létale, 5 cas de dysplasie thanatophore, 4 cas de dysplasie de Schneckenbecken, 2 cas de syndrome « cotes courtes-polydactylie » type Majewski et 1 cas de dysplasie thoracique asphyxiant.

SUMMARY

Background : The lethal osteochondrodysplasias are rare, their prevalence is estimated at 1 per 10 000 births. Mostly have genetic determinism.**Aims:** To describe the malformations and dysmorphic features in lethal osteochondrodysplasias**Methods:** Our study involved 32 cases of lethal fetal Osteochondrodysplasias, collected over a period of 14 years in the pathological department of Sousse.**Results:** Our series consisted of 23 foetuses from a medical termination of pregnancy, 6 newborns and 3 stillbirths. The mean age of mothers was 28 years old, consanguinity was observed in 61%. 3 cases of recurrence of the disease in three families were noted.

The bone abnormalities were detected in antenatal ultrasonography in 25 cases (87%) and at birth in 7 cases. Ultrasound showed micromelia in all cases, a narrow chest in 5 cases and spina bifida in 3 cases

The foetopathological exam, including a macroscopic examination, radiological and histological samples of bone, has allowed us, based on the International Classification of 2001 to classify the 32 cases of Osteochondrodysplasias in: 8 cases of Achondrogenesis type I (type Parenti-Fraccaro), 3 cases of Achondrogenesis type II (Langer Saldino), 9 cases of lethal osteogenesis imperfecta, 8 cases of thanatophoric dysplasia, 4 cases of Schneckenbecken dysplasia, 2 cases of Short rib polydactyly syndrome, Majewski type and 1 case of asphyxiating thoracic dysplasia .

MOTS - CLÉS

fœtus- os-ostéochondrodysplasie-histologie-radiographie

KEY - WORDS

foetus-bone- osteochondrodysplasia-histology- radiography

الثلث العظمي الغضروفي المميت دراسة تشريحية للجنين حول 32 حالة.

الباحثون : لحر بوفروة. أ - يعقوبي. م. ط - هميسا. س - سالمي. م - قربي. ص.

الثلث العظمي الغضروفي المميت نادر (بنسبة 1/10.000 ولادة .) الهدف من هذه الدراسة التي تتناول 32 حالة هو استعراض الخصائص التشوهية والإحاطة التشريحية المرضية بالأجنة المصابة بهذا التشوه.

أثبتت الدراسة أن نسبة التزاوج بين الأقارب كانت مرتفعة. (61 %) ووقع إكتشاف التشوه العظمي عن ريق التخطيط بالصدى قبل الولادة في 25 حالة و7 حالات اكتشف بعد الولادة. وتناولت الدراسة التشريحية المرضية للجنين فحص بالعين وفحص تصويري وفحص نسيجي للخزغ العظمي.

الكلمات الأساسية : جنين - دراسة نسيجية - ثلث عظمي غضروفي تصويري.

Les ostéochondrodysplasies, maladies osseuses constitutionnelles, constituent avec les dystososes, un groupe hétérogène d'affections responsables d'un désordre électif de la croissance, de la structure ou de la morphologie du squelette. Les ostéochondrodysplasies réunissent les anomalies de la croissance ou de la structure de l'os ou du cartilage. Les ostéochondrodysplasies létales ont une faible incidence, leur fréquence est estimée à 1 pour 10 000 naissances (1). Le diagnostic se fait fréquemment par l'examen foetopathologique réalisé au décours d'une interruption médicale de grossesse (IMG), suite à une détection prénatale. Le diagnostic de ces affections nécessite donc une bonne connaissance du développement normal du squelette fœtal, de la classification des ostéochondrodysplasies et des signes cliniques, radiologiques et histologiques affirmant le diagnostic. La gravité et l'évolution fatale de ces ostéochondrodysplasies explique l'intérêt du diagnostic anténatal pour un conseil génétique pertinent avant une grossesse ultérieure.

Figure 1 : Achondrogenèse type II: photographie: hygroma kystique, dysmorphie faciale, membres courts et trapus.

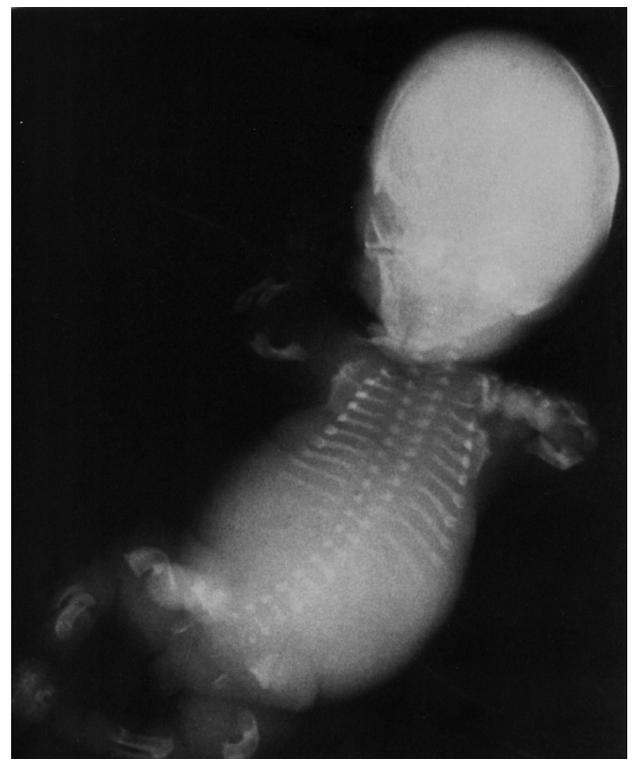


MATÉRIELS ET MÉTHODES

Notre étude est rétrospective descriptive, portant sur 32 cas d'ostéochondrodysplasies fœtales létales, colligés sur une période de 14 ans, allant de 1991 à 2004. Ces observations ont été répertoriées sur un ensemble de 3500 examens foetopathologiques effectués au service d'anatomie et de cytologie pathologiques de l'hôpital Farhat Hached de Sousse. Les 32 fœtus provenaient des gouvernorats de Sousse, Monastir, Mahdia, Kairouan et Nabeul. Les données concernant les antécédents maternels et les circonstances de découverte ont été relevés.

Une radiographie du squelette, un examen macroscopique et histologique surtout des os avait été pratiqué pour chaque fœtus. L'examen des annexes fœtales avait également été réalisé.

Figure 2 : Dysplasie thanatophore: Radiographie du squelette: vertèbres en forme de U, fémur en « receveur téléphonique ».



RÉSULTATS

Notre série était composée de 23 fœtus issus d'une IMG, 6 nouveau-nés et 3 mort-nés. L'âge des mères variait entre 20 et 39 ans avec une moyenne de 28 ans. Des antécédents d'IMG au 8ème et 6ème mois de grossesse pour malformations fœtales ont été notés chez une patiente, un antécédent de dysplasie squelettique chez une autre et 4 décès en bas âge chez une troisième. 8 cas étaient issus de mariages consanguins.

Les ostéochondrodysplasies létales ont été décelées à l'échographie anténatale dans 25 cas (87%) et à la naissance par l'examen clinique néonatal dans 7 cas. L'échographie avait objectivé une micromélie dans tous les cas, un thorax étroit

dans 5 cas et une spina bifida dans 3 cas ; elle a également permis de révéler d'autres malformations extra-squelettiques comme un œdème de la nuque, un hygroma kystique, une hydrocéphalie et des anomalies du liquide amniotique. Le caryotype était normal dans tous les cas.

Figure 3 : Dysplasie de Schneckenbecken : Radiographie du squelette: os iliaques en forme d'escargot, vertèbres en forme de U.



L'examen foetopathologique, incluant un examen macroscopique, radiologique et histologique d'un prélèvement osseux, nous a permis en se basant sur la classification internationale de 2001 de classer les 32 cas d'ostéochondrodysplasies en :

-8 cas d'achondrogénèse de type I (forme de Parenti-Fraccaro) compte tenu d'un aspect des os des membres réduit à des masses calcifiées, des membres courts et incurvés et l'examen radiographique qui montrait une brièveté des membres, des diaphyses incurvés, des métaphyses élargies et des côtes grêles avec extrémités cupuliformes. L'histologie osseuse avait objectivé une matrice cartilagineuse assez abondante et des chondrocytes de taille et forme variables.

- 3 cas d'achondrogénèse de type II (forme de Langer-Saldino) caractérisés par des membres courts et trapus avec des extrémités métaphysaires élargies en cupule. A l'histologie, le

cartilage était hypercellulaire et hypervascularisé.

- 9 cas étaient compatibles avec le diagnostic d'ostéogénèse imparfaite létale devant la transparence excessive du squelette et l'existence de multiples cals fracturaires osseux. Les membres étaient courts et déformés. A l'histologie osseuse, les os étaient fragmentés avec présence de nombreuses cals anormales.

- 5 cas de dysplasie thanatophore devant la macrocranie contrastant avec un tronc étroit et un abdomen proéminent. Les membres étaient courts et incurvés. La radiographie du squelette avait montré des vertèbres en forme de U et des fémurs courts ayant la forme d'un « receveur téléphonique ». L'examen histologique montrait une hypertrophie des lobes temporaux et une gyration radiaire temporale

- 4 cas de dysplasie de Schneckenbecken, devant la macrocranie, le thorax étroit, l'abdomen proéminent et les membres très courts et trapus. La radiographie du squelette montrait des os iliaques en forme d'escargot. A l'histologie osseuse, les colonnes d'ossification étaient courtes et irrégulières, le cartilage était hypercellulaire et hypervascularisé, les chondrocytes étaient irréguliers

- 2 cas de syndrome « côtes courtes- polydactylie » type Majewski ou type II devant la brièveté des côtes, une polydactylie et l'absence d'aspect effilé des extrémités osseuses. Les fémurs étaient courts avec pieds bots fêlés en massue. L'histologie osseuse avait montré une zone d'ossification irrégulière et des colonnes anarchiques. Les 2 cas étaient issus d'une même famille

- 1 cas de dysplasie thoracique asphyxiante de Jeune caractérisée par la brièveté des côtes, sans polydactylie.

La totalité des formes d'ostéochondrodysplasie létales de notre série étaient accompagnées de malformations extra-squelettiques dont la plus fréquente est la dysmorphie faciale observées dans 75% des cas suivie de l'hypoplasie des poumons. L'examen du placenta et du cordon n'avait pas objectivé d'anomalies particulières. Les caryotypes fœtaux réalisés étaient normaux.

Figure 4 : Ostéogénèse imparfaite HEx100 Histologie osseuse: os fragmenté, cals anormaux

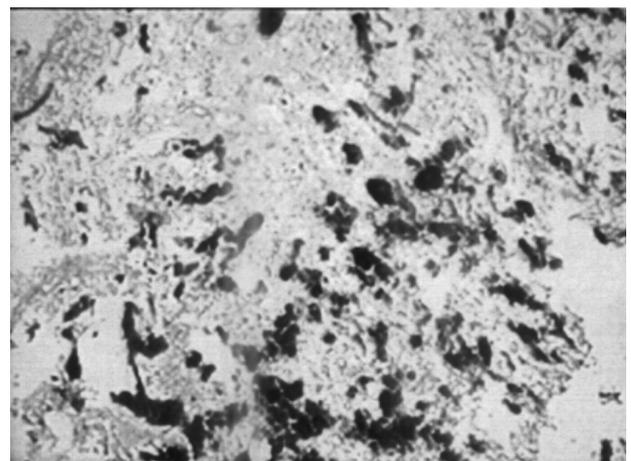
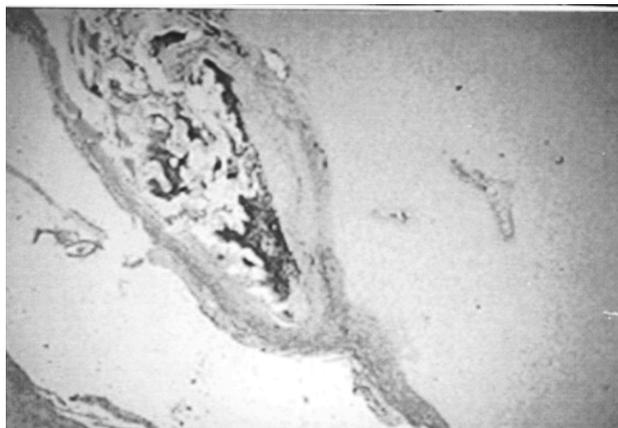


Figure 5 : Dysplasie thanatophore: Histologie osseuse HEx100 : plaque de croissance perturbée par des foyers d'ossification membraneuse, virole périchondrale élargie.



DISCUSSION

Les dysplasies squelettiques et les malformations des membres, constituent un large groupe hétérogène d'anomalies squelettiques, ayant une incidence évaluée à 1 pour 5000 naissances environ (1,2,3,4,5). Les formes létales des ostéochondrodysplasies forment un groupe d'affections rares, dont la fréquence est estimée approximativement à 1 pour 10.000 naissances (1,2,3,4,5)

Depuis 1936, date de la première description d'achondrogénèse par Parenti, de nombreux cas d'ostéochondrodysplasies létales ont été publiés, certaines sont plus fréquentes comme le nanisme thanatophore dont la fréquence est estimée entre 1/6400 et 1/100000 naissances, celle de l'achondrogénèse à 1/40000 et celle de l'ostéogénèse imparfaite à 1/55000 naissances (1,2,3,4,5).

La découverte anténatale d'une ostéochondrodysplasie létale se fait essentiellement à l'échographie (6,7). La période la plus favorable pour l'étude statique et dynamique des membres tant globale que segmentaire, se situe entre la 19ème et la 22ème semaine d'aménorrhée (SA)(8,9). Le diagnostic exact est rarement posé et parfois des erreurs regrettables sont commises. Les signes échographiques orientant vers une ostéochondrodysplasie sont : une micromélie extrême, une disproportion entre le volume du crâne et le reste du corps, des signes de « mal-être » fœtal : immobilité, œdème, anasarque ou hydramnios(10,11). Des signes radiologiques spécifiques au contenu utérin peuvent être détectés selon l'affection en cause (tableau1), ce sont d'une façon générale un raccourcissement des os longs, un défaut d'ossification, un diamètre thoracique très petit, des fractures multiples et une incurvation.

A l'étude foetopathologique, la radiographie post-mortem constitue l'élément essentiel et souvent irremplaçable de la démarche diagnostique des ostéochondrodysplasies. L'aspect macroscopique varie selon le type (tableau 2), mais les signes communs sont des membres extrêmement courts et incurvés associés souvent à un thorax étroit et une dysmorphie faciale.

L'étude histologique se fait d'une façon générale sur des prélèvements au niveau des os longs, des côtes et du crâne. L'étude analytique d'un os long comprend : l'analyse du cartilage épiphysaire, l'analyse de la structure de la zone d'ossification et l'étude de la virole périchondrale. Les principales lésions histologiques retrouvées sont résumés dans le tableau 3.

La classification des ostéochondrodysplasies reste essentiellement clinique et radiologique, regroupant en «familles» les différentes anomalies selon des désordres morphologiques similaires.

Tableau 1 : Principales anomalies radiologiques des ostéochondrodysplasies létales (10,12,13,14,15,16).

| | Crâne | Rachis + | Thorax | Membres |
|---|-----------------|--------------------------------------|---|---|
| | bassin | | | |
| Achondrogénèse | Peu ossifié | - Vertèbres très Peu ossifiées ++ | - Côtes courtes - Thorax étroit | Déminéralisation |
| | | - bassin peu ossifié | | |
| Ostéogénèse | - Peu ossifié | - Platyspondylie | - Côtes parfois | - Courts |
| Imparfaite | - Os wormins | - déminéralisation | fracturées | - Déminéralisés - Déformés et incurvés - Fractures++ |
| Dysplasie | - Minéralisé | Vertèbres | - Côtes courtes | - Court incurvés |
| thanatophore | en "trèfle" | ossifiées, plates | | en "receveur téléphonique" |
| Dysplasie de | | - Platyspondylie | - Côtes courtes | - Courts |
| Schneckenbecken | | - Bassin en "escargot"++ | | |
| "Côtes courtes - polydactylie" | Normal | Normaux | - Côtes courtes++, horizontales - Thorax étroit | - Courts, ossifiés - Polydactylie |
| Dyslasie | Normal | - Rachis normal | - Côtes courtes | |
| Thoracique | | - Bassin : saillie | | |
| Asphyxiant | | médiane arrondie | | |

Tableau 2 : Principaux aspects macroscopiques des ostéochondrodysplasies létales (10,14,16, 17,18).

| | |
|--|--|
| Achondrogenèse de type I | - membres extrêmement courts - œdème généralisé |
| Achondrogenèse de type II | - extrême brièveté des membres - Nanisme sévère avec volume excessif du crâne - thorax court |
| Ostéogenèse imparfaite | - membres courts, incurvés - macrocrânie - dysmorphie faciale |
| Dysplasie thanatophore | - membres courts, souvent incurvés - macrocrânie avec tronc de longueur normale ; - dysmorphie faciale |
| Dysplasie de | - membres courts et trapus |
| Schneckenbecken | - macrocrânie - thorax étroit - dysmorphie faciale ; fente palatine : |
| « Côtés courtes – polydactylie » type | - thorax étroit - polydactylie |
| Majewski | - membres courts - malformations viscérales (cardio-vasculaires, uro-génitales...); fente palatine. |
| DysplasieThoracique | - thorax très étroit. |
| Asphyxiant | - membres courts. |

En revanche, l'étiopathogénie de ces affections, qui est restée longtemps mal élucidée, commence à s'éclaircir pour beaucoup d'entre elles, grâce à des travaux de recherche fondés sur l'étude attentive du cartilage de croissance et de ces constituants et aussi à l'étude en biologie moléculaire qui a permis l'isolement des gènes responsables de certaines de ces affections(ostéogenèse imparfaite :COLIA1 et COLIA2, dysplasie thanatophore :FGFR3, achondrogénèse II:COL2A1, achondrogenese IB : DTDST)(20,21,22). Ces progrès ont aboutit pendant les dernières années à une nouvelle classification physiopathologique des maladies osseuses constitutionnelles regroupant les différentes variétés selon le défaut de gène ou de la protéine en cause (22,23).

La conduite à tenir devant ces affections est essentiellement préventive, puisque leur évolution est fatale, soit in utéro, soit après la naissance de quelques heures à quelques jours.

L'examen foetopathologique et le conseil génétique représentent actuellement les pivots de la médecine fœtale. Au terme d'un examen foetopathologique complet d'un enfant atteint (clinique et anatomo-pathologique), le compte rendu est rédigé à l'intention du médecin traitant (et des parents s'ils le désirent). Les parents sont ensuite reçus en consultation de conseil génétique pour décider des attitudes à tenir pour les

grossesses ultérieures. Un programme de diagnostic prénatal serait alors établi en fonction des risques. Cet examen prénatal repose essentiellement sur la surveillance échographique systématique de la grossesse, permettant surtout au deuxième trimestre, d'évaluer la croissance fœtale en fonction de l'âge gestationnel et le dépistage de ces malformations(24).

L'étude du collagène ou de l'ADN par biopsie du trophoblaste, en cherchant le gène muté dans les cellules fœtales au sein des villosités chorales, peut aussi être effectuée selon les cas.

En revanche, la découverte d'une ostéochondrodysplasie létale suppose aux parents le choix d'une interruption médicale de grossesse, qui est en général, sans problème éthique majeur dans ce cas, mais elle reste une décision grave et difficile à vivre et un soutien psychologique des parents est souvent nécessaire. Les perspectives thérapeutiques récentes, comme la thérapie génique, ne sont pas actuellement utilisés dans les ostéochondrodysplasies létales. Notre étude concerne un exemple d'anomalies fœtales dans lequel, la collaboration entre spécialistes (obstétriciens, radiologues, foetopathologistes et cytogénéticiens), permet d'améliorer la performance en matière de dépistage de ces malformations et éventuellement de mieux évaluer l'incidence et la conduite à tenir de ces affections dans notre pays.

Tableau 3 : Principales anomalies histologiques des ostéochondrodysplasies létales (10,14,18,19).

| | |
|--|---|
| Achondrogenèse de type I | - densité chondrocytaire augmentée ; inclusions Intra-cytoplasmiques (type IA); canaux vasculaires grands et nombreux ; matrice cartilagineuse pauvre. - ossification très anormale. |
| Achondrogenèse de type II | - densité cellulaire augmentée ; sclérose des Canaux vasculaires, très frappante. - ossification irrégulière. |
| Ostéogenèse imparfaite | - épiphyses et plaque de croissance normales. - paucité osseuse extrême. - fractures, cals, micro-fractures. |
| Dysplasie thanatophore | - cartilage désorganisé - virole péri-chondrale élargie. - ossification irrégulière. |
| Dysplasie de Schneckenbecken | - densité chondrocytaire variable; noyaux Hyperchromatiques proéminents; canaux Vasculaires larges; matrice inhomogène - ossification normale. |
| « Côtés courtes – polydactylie » type | - plaque de croissance courte - zone d'ossification normale |
| Majewski | |
| DysplasieThoracique | - colonnes cartilagineuses anarchiques. |
| Asphyxiant | - ossification irrégulière. |

RÉFÉRENCES

1. Rasmussen SA, Bieber FR, Benacerraf BR, Lachman RS, Rimoin DL, Holmes LB. Epidemiology of osteochondrodysplasias : changing trends due to advances in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 1996; 61:49-58.
2. Cadle RG, Dowson T, Hall BD. The prevalence of genetic disorders, birth defects and syndromes in central and eastern Kentucky. *J Ky Med Assoc.* 1996;94:237-41.
3. Connor JM, Connor RA, Sweet EM, Gibson AA, Redford DH. Lethal neonatal chondrodysplasias in the west of Scotland with a description of a thanatophoric, dysplasia like, autosomal recessive disorder, Glasgow variant. *Am J Med Genet* 1985;22:243-53.
4. Stoll C, Dott B, Roth MP, Alembic Y. Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin Genet* 1989;35:88-92.
5. Anderson PE. Prevalence of lethal osteochondrodysplasia in danemark. *Am J Med Genet* 1989 ;32 :484-9.
6. Kalifa G, Barbet JP, Labre F, Houette A, Sellier N. Value of systematic post mortem radiographic examinations of fetuses. 400 cases. *Pediatr Radiol* 1989;19:111-3.
7. Sharony R, Browne C, Lachman RS, Rimoin DL. Prenatal diagnosis of the skeletal dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:668-75.
8. Trotter AE, Saunders RC, Meyers CM, Dungan JS, Grumbach K, Sun CC, Campbell AB, Wulfsberg EA. Antenatal diagnosis of lethal dysplasias. *Am J Med Genet* 1998;75:518-22.
9. Elejalde BR, De Elejalde MM. Thanatophoric dysplasia : fetal manifestations and prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 1985 ;22: 669-83.
10. Hall CM, Elcioglu NH. Metatropic dysplasia lethal variants. *Pediatr Radiol* 2004 ;34,66-74.
11. Markowitz RI, Zackai E. A pragmatic approach to the radiologic diagnosis of pediatric syndromes and skeletal dysplasias. *Radiol Clin North Am* 2001; 791-802.
12. Cole WG, Dalgleish R. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 1995 ;32 :284-9.
13. Kozlowski K, John E, Masel J, Muralinath S. Case Report: Neonatal Platyspondylic Dwarfism- a new form. *Br J Radiol* 1995;68:1254-6.
14. Nickels PG, Strigter RH, Knoll IE, Van Harten HJ. Schneckenbecken dysplasia, radiology and histology. *Pediatr Radiol* 2001;31:27-30.
15. Smith WL, Breitweise TD, Dinno N. In utero diagnosis of achondrogenesis type I. *Clin Genet* 1981 ;19 :51-4.
16. Lavanya R, Pratap K. Short rib polydactyly syndrome- a rare skeletal dysplasia. *Int J Gynecol Obstet* 1995 ;50 :291-2.
17. Cubert R ; Cheng EY, Mack S, Pepin MG, Byers PH. Osteogenesis imperfecta : mode of delivery and neonatal outcome. *Obstet Gynecol* 2001;97:66-9.
18. SarathchandraP, Pope FM, Kayser MV, Ali SY. A light and electron microscopic study of osteogenesis imperfecta bone samples, with reference to collagen chemistry and clinical phenotype. *J Pathol* 2000; 192:385-95
19. Qureshi F, Jacques SM, Johnson SF, Johnson MP, Hume RF, Evans MI, YangSS. Histopathology of fetal diastrophic dysplasia. *Am J Med Genet* 1995;56:300-3.
20. Camera G, Baldi M, Baffico M, Pozzolo S. An unusual radiological finding in thanatophoric dysplasia type 1 with common mutation of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene . *Am J Med Genet* 1997;71:122-3.
21. Cohen-Solal L, Bonaventure J, Maroteaux P. Dominant mutations in familial lethal and severe osteogenesis imperfecta. *Hum Genet* 1991;87:297-301.
22. Superti-Furga A, Bonafe L, Rimoin DL. Molecular pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am J Med Genet* 2001;106:282-93.
23. International working group on constitutional diseases of bone.international nomenclature and classification of the osteochondrodysplasias. *Am J Med Genet* 2002;133:65-77.
24. Lund AM, Schwartz M, Skovby F. Genetic Counseling and prenatal diagnosis of osteogenesis imperfect caused by paternal mosaicism. *Prenat Diag* 1996;16:1032-8.