

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Thèse

Pour l'obtention du

Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)

Spécialité : Biologie

Option : Biologie de la Cellule Normale et Pathologique

Intitulé

L'application des techniques dites « rapides » de la biologie moléculaire à l'étude des produits d'avortements spontanés

Présentée et soutenue par :

Mme Mellali Sarah

Le: 02 / 06 / 2016

Devant le jury composé de :

Président :	Tou Abdenacer	Professeur	UDL Sidi Bel Abbès
Examineurs :	Sahraoui Tewfik	Professeur	Université d'Oran
	Klouche Lynda	MCA	UDL Sidi Bel Abbès
Directrice de thèse :	Moulessehoul Soraya	Professeur	UDL Sidi Bel Abbès
Membre invité :	Haoud Khadidja	MCA	UDL Sidi Bel Abbès

Année universitaire : 2015-2016

Remerciements

Par la grâce et la bénédiction d'Allah tout puissant et miséricordieux qu'on a accompli avec un grand intérêt cette thèse. À ce jour, c'est avec un sentiment indéfectible que j'aimerais remercier les personnes qui ont pu rendre ces travaux tangibles.

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Pr Moulessehoul et Dr Haoud Khadidja pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'avez accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de vos espérances. Quoi qu'il en soit, j'ai beaucoup appris à vos côtés et je suis très honorée de vous avoir eu pour encadrant.

Merci à vous Dr Haoud pour votre confiance, vos conseils fructueux et inestimables. Également pour votre soutien, votre disponibilité, votre optimisme et vos encouragements dans mes moments de doute. Sachez bien que sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible aujourd'hui.

Je vous remercie Pr Moulessehoul pour l'intérêt porté à mon travail et d'avoir créé les conditions nécessaires pour réaliser mes recherches.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Pr. Vago qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je lui en suis reconnaissante pour son hospitalité, professionnalisme, gentillesse, son soutien ainsi pour m'avoir apportée toute l'aide nécessaire à la réalisation de ma partie pratique. Ce stage été une grande aide pour mes recherches.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance, ma gratitude, mon respect à Dr Gouas qui a su catalyser mes nombreux objectifs et idées. Et je tiens à ce qu'elle sache que j'ai été honorée d'avoir travaillé avec une personne d'une telle compétence.

Mes remerciements vont également au Pr Tou pour avoir accepté de présider à ce jury de thèse, ainsi qu'au Pr Sahraoui et le Dr Kfouche pour m'avoir fait l'honneur de siéger à mon jury.

Je remercie les membres du Laboratoire de Cytogénétique médicale pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée tout au long de ces années de thèse, pour leur bonne humeur et leur précieuse aide pendant ma période de stage.

Je remercie le personnel de la maternité de Sidi bel Abbès notamment Djamilâ pour ces conseils, son encouragement et son aide au cours de la récolte des échantillons.

Enfin, que tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Dédicace

« Si la mer était une encre [pour écrire] les paroles de mon Seigneur, certes la mer s'épuiserait avant que ne soient épuisées les paroles de mon Seigneur, quand même Nous lui apporterions son équivalent comme renfort ». » (Sourate 18, verset 109).

Je reprendrai l'esprit de ces nobles paroles, pour exprimer l'immense reconnaissance et gratitude que je porte envers mes chers parents. Et tous les mots du dictionnaire ne sauraient correspondre aux sentiments exacts que j'ai pour vous mes chers parents. Je vous dédie ma thèse avec toute humilité. Sachez que sans votre appui, vos sacrifices, vos efforts et vos encouragements, je ne serai pas la future docteure que je suis. Je n'oublierai jamais votre amour que n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

Qu'Allah puisse vous protéger. Je vous aime.

Je vous remercie pour votre patience, soutien et compréhension qui m'ont aidé dans mes moments de doute.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Je tiens également remercier ma plus grande fierté mes deux petits frères : Oussama et Mohamed Abed Elfattah.

J'espère que vous serez toujours fiers de moi. Merci pour tout.

A mon âme sœur, Amine.

Merci pour ton soutien et ta compréhension. Tu es la source de mon inspiration et de mon courage. Je te souhaite tout le succès du monde. Chéri sache que je suis très fière de toi.

A mon ange gardien, ma cousine Samira

Merci infiniment pour le soutien moral ; ta présence malgré la distance; pour tes précieux conseils et ton aide à la réalisation de ce travail. Bonne chance dans ta thèse aussi.

À tous les membres de ma famille, ma belle famille, sans aucune exception ainsi qu'à toutes mes chères amies.

Merci pour votre soutien moral et vos encouragements

Et à tous celles et ceux à qui ma réussite leur tient à cœur

Résumé

L'Avortement Spontané (AS), encore appelé Fausse-Couche Spontanée (FCS), désigne la perte du *conceptus* avant sa viabilité, c'est-à-dire avant 20 semaines de gestation ou pesant moins de 500g. Le rôle du facteur génétique dans les FCS est indéniable. En effet, les anomalies chromosomiques, principalement numériques, sont responsables de plus de 50% des FCS.

Le caryotype standard était jusqu'à présent la méthode de référence pour l'étude cytogénétique des produits de FCS. Cependant, il est souvent impossible à établir en raison des échecs de culture, liés principalement à la macération des échantillons. Les techniques de Biologie Moléculaire offrent une alternative au caryotype, avec des performances qui ne cessent d'évoluer, et des approches révolutionnaires dans l'analyse cytogénétique des FCS afin de surmonter les limites du caryotype.

Notre travail consistait en la description et l'évaluation de la performance d'une nouvelle technique prometteuse dite « rapide » de Biologie Moléculaire : « Prenatal BoBs™ », en comparaison avec d'autres techniques existantes sur le plan pratique actuel : FISH interphasique, MLPA et le caryotype conventionnel, dans le but de déterminer sa fiabilité et sa robustesse dans des conditions cliniques en routine, ainsi que dans l'identification des anomalies chromosomiques qui peuvent être à l'origine des pertes fœtales.

Dans ce sens, nous avons réalisé une analyse cytogénétique de 240 produits de FCS prélevés sur des patientes âgées entre 19 et 43 ans, avec des âges de gestations allant de la 5^{ème} à la 41^{ème} semaine d'aménorrhée. Cette étude s'est déroulée entre janvier 2011 et décembre 2014. Sur les 71 échantillons analysés par Prenatal BoBs™, nous avons diagnostiqué une trisomie 21 et une délétion del 17p13.3 qui étaient passées inaperçues lors de l'analyse caryotypique. Les résultats étaient concluants dans 49 cas pour lesquels le caryotype n'a pu être réalisé en raison de l'échec des cultures cellulaires. Sur les 66 cas analysés par FISH, deux trisomies 21, une monosomie X, une trisomie 18 et deux triploïdies ont été identifiées. Les 53 cas analysés par la MLPA montraient une trisomie 21, une monosomie X et une microdélétion [XY, del 22 (q11.21)] . Prenatal BoBs™ a enregistré un taux de détection de ~ 90%, plus élevé que les autres techniques utilisées, ces dernières ayant montré un taux d'échec élevé qui se situait entre 28 et 45% ».

Toutes ces approches ont un positionnement différent en terme de richesse d'informations fournies et de délais de rendu des résultats. Cependant, Prenatal BoBs™ semble être rapide, fiable, facilement applicable en routine, et constitue une bonne alternative à d'autres techniques existantes, particulièrement le caryotype dans l'analyse cytogénétique des FCS, notamment lorsque le tissu est trop macéré pour réaliser une culture cellulaire. C'est une technique prometteuse qui peut être très utile dans les régions du monde où le personnel et les laboratoires de cytogénétique sont limités.

Mots Clés : Avortement, Spontané, Anomalie, Chromosomique, Prenatal BoBs™, FISH, MLPA, Caryotype, Cytogénétique.

Abstract

The Spontaneous Abortion (SA), also called a Spontaneous miscarriage (SM), is the loss of the conceptus before 20 weeks of gestation or weighing less than 500 g. The role of genetic factors in SM is undeniable. Indeed, chromosomal abnormalities (mainly *numerical abnormalities*) are responsible for more than 50% of SM.

The standard karyotype was until now the gold standard for the cytogenetic analysis of SM products. However, it is often impossible to establish because of culture failures, mainly caused by the sample maceration. Molecular Biology techniques offer an alternative to karyotype, with performances that are constantly evolving, and revolutionary approaches in cytogenetic analysis of SM, to overcome the limits of karyotype.

Our work was based on the description and evaluation of the performance of a new promising technique called "fast" of Molecular Biology: "Prenatal BoBs™", compared with other existing techniques in the current clinical practice, (interphase FISH, MLPA and karyotype), in order to determine the reliability and robustness of Prenatal BoBs™ in routine clinical practice as well in identifying chromosomal abnormalities that may be the cause of fetal loss.

We performed cytogenetic analysis of SM products of 240 patients aged between 19 and 43 years and with gestational ages between 5th and 41th SA. This study was conducted between January 2011 and December 2014. Of the 71 samples analyzed by Prenatal BoBs™, we detected trisomy 21 and del 17p13.3 that were unnoticed using karyotype analysis. The results were conclusive in 49 cases in which the karyotype could not be realized due to the cultures failures. Of the 66 cases analyzed by FISH, two trisomies 21; monosomy X; trisomy 18 and two triploidies were identified. Of the 53 cases analyzed by MLPA: trisomy 21; monosomy X and microdeletion [XY, del 22 (q11.21)] were detected. The detection rate of Prenatal BoBs™ was ~ 90%, which is the highest among all the techniques we used; the other techniques have shown a high failure rate "28-45%".

All of these approaches have a different positioning in terms of wealth of information and the time required to get the results. However, Prenatal BoBs™ appears to be fast, reliable, easily applied in routine and is a good alternative to other existing techniques, particularly the karyotype in cytogenetic analysis of SM, especially when the tissue is too macerated to launch a cell culture. Prenatal BoBs™ is a promising technique that can be very useful in regions where staff and cytogenetic laboratories are limited.

Keywords: Spontaneous abortion, Chromosomal abnormalities, Prenatal BoBs™, FISH, MLPA, Karyotype, Cytogenetic

ملخص

الإجهاض التلقائي (ات) هو خسارة الجنين قبل الأسبوع العشرين من الحمل أو وزن يقل عن 500 غ . دور العامل الوراثي في الإجهاض التلقائي لا يمكن إنكاره. في الواقع، شذوذ الكروموسومات (خاصة الشذوذ الرقمي) مسئولة عن أكثر من 50٪ من الإجهاضات.

فحص النمط النووي caryotype يمثل حتى الآن الطريقة المرجعية للفحص السيتوجيني لنواتج الإجهاض . لكن غالبا ما يكون من المستحيل القيام بالتحليل بسبب فشل الزراعات الخلوية المتكرر الناتج عادة عن تفسخ الأنسجة. تقنيات البيولوجيا الجزيئية تقدم بديلا للنمط النووي، بالتقنيات التي تتطور باستمرار، والأساليب الثورية في التحليل الوراثي الخلوي للإجهاض ، من أجل التغلب على مشاكل فحص النمط النووي.

يتمثل عملنا في وصف وتقييم أداء تقنية واحدة جديدة و سريعة في البيولوجيا الجزيئية Prenatal BoBsTM مقارنة مع التقنيات الأخرى المعمول بها حاليا (التهجين الموضعي FISH , MLPA , فحص النمط النووي) من أجل تحديد موثوقية ومثانة Prenatal BoBsTM في الفحوص الروتينية و في تحديد شذوذ الكروموسومات التي قد تكون سببا في فقدان الجنين.

أجرينا تحليل وراثي خلوي لنواتج إجهاض 240 مريضة تتراوح أعمارهم بين 19 و 43 عاما، و سن حمل يتراوح ما بين 5 و 41 أسبوع. وقد أجريت هذه الدراسة ما بين يناير 2011 وديسمبر 2014. من بين 71 عينة تم تحليلها باستعمال Prenatal BoBsTM ، قمنا بتشخيص حالة شذوذ تثلث الصبغي 21 و del 17p13.3 والتي لم يستطع كشفها تحليل النمط النووي. كانت النتائج حاسمة في 49 حالة التي لم نستطع القيام فيها بفحص النمط النووي بسبب فشل زراعة الخلايا. من 66 عينة التي تم تحليلها بواسطة FISH، تم الكشف عن 2 شذوذ تثلث الصبغي 21 ؛ شذوذ احادي الصبغي X ؛ شذوذ تثلث الصبغي 18 و 2 تريبلويديا. من 53 حالة التي تم تحليلها باستعمال MLPA وجدنا شذوذ تثلث الصبغي 21 و المحو [XY, del 22 (q11.21)]. Prenatal BoBsTM سجل نسبة كشف ~ 90٪، وهي أعلى نسبة بين جميع التقنيات المستخدمة، وقد أظهرت التقنيات الأخرى نسبة إخفاق مرتفعة "28-45٪".

كل هذه الأساليب لديها وضعية مختلفة من حيث وفرة المعلومات والوقت اللازم للحصول على النتائج. ومع ذلك، Prenatal BoBsTM تبدو تقنية سريعة وموثوق بها، سهلة التطبيق خلال الفحص روتيني وهي بديل جيد للتقنيات الأخرى الموجودة حاليا، لا سيما فحص النمط النووي في التحليل الوراثي الخلوي لنواتج الإجهاض، وخصوصا عندما يكون النسيج متفسخا و يستحيل زرع الخلايا . إنها تقنية واحدة و يمكن أن تكون مفيدة جدا في المناطق حيث قدرات الموظفين ومختبرات التحليل الوراثي خلوي محدودة.

كلمات المفتاحية: الإجهاض التلقائي ، شذوذ الكروموسومات ، Prenatal BoBsTM ، FISH ، MLPA ، فحص النمط النووي، تحليل وراثي.

La liste des abréviations

AS : Avortement Spontané

ASR : Avortement Spontané à Répétition

BoBs™ : BACs-on-Beads

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

Bande G : Bande Giemsa

Bande R : Banding Reverse

Bp: Paire de Base

CGH : Comparative Genomic Hybridisation

CV : Coefficient de Variation

CEP®: Chromosome Enumeration Probes

DAPI : 4,6-DiAmino-2-PhénylIndole

FCS : Fausse-Couche Spontanée

FCSR : Fausse-Couche Spontanée à Répétition

FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

LSI : Locus Spécifique Identifier

Mb : MégaBase

MCC: Maternal Cell Contamination

MDS : Miller–Dieker Syndrom

MFIU : Mort Fœtale *In Utero*

MLPA : Multiplex Ligation Probe-dependant Amplification

Ng : Nanogramme

OMS : Organisation Mondiale De La Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

POC : Product Of Conception

La liste des abréviations

Kb : Kilo base

SA : Semaine d'Aménorrhée

SD : Standard Deviation

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TRITC: Tetra-methylRhodamin IsothioCyanate

RCN : Relative Copy Number

Rpm : Rotation Par Minute.

RNase: RiboNucléases

µL : MicroLitre

Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Revue Bibliographique

Chapitre 1 : Les fausses- couches spontanées

I . Définitions et généralités.....	3
II . Causes et facteurs de risque	4
II.1. Les FCS du premier trimestre.....	4
II.2. Les FCS du deuxième trimestre.....	5
II.3. Le facteur génétique.....	5
II.4. Facteur de risque.....	6
II.5. L'âge parental.....	7
II.6. Relation entre âge parental, âge gestationnel, anomalies chromosomiques, parité et risque de FCS.....	8
III. Aspect génétique des fausses-couches spontanées.....	9
III.1. Les anomalies chromosomiques associées aux FCS et FCSR.....	10
III.1.1. FCS sporadiques	10
III.1.2. FCS à répétition.....	10
III.2. Les anomalies chromosomiques du caryotype parental.....	11
III.3. Biais de l'inactivation du chromosome X et FCS à répétition.....	12
III.4. Les anomalies chromosomiques des produits de FC.....	12
III.4.1. Les aberrations chromosomiques de nombre.....	14
III.4.1.1. Les trisomies.....	14
III.4.1.2. Les monosomies.....	14
III.4.1.3. Les polyploïdies.....	15
III.4.2. Le mosaïcisme.....	16
III.4.3. Les anomalies de structure.....	16
IV. La classification des produits de fausse-couche spontanée.....	17
V. Les observations anatomiques du produit de FCS.....	20

Table des matières

Chapitre II : Les techniques dites rapide de l'analyse cytogénétique moléculaire

I. L'évolution des techniques cytogénétiques : du caryotype à la cytogénétique moléculaire.....	22
II. Les méthodes d'exploration cytogénétique des produits de FCS.....	23
II.1. Caryotype conventionnel.....	23
II.2. les outils dits rapides de la Biologie moléculaire.....	24
II.2. 1. La Fluorescence <i>In Situ</i> par Hybridation (FISH).....	24
A. Le principe de la FISH.....	24
B. Les sondes.....	25
C. Les applications cliniques : FISH sur noyaux interphasiques.....	26
II.2.2. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA).....	27
A. Principe de la MLPA.....	27
B. MLPA et sondes « entièrement synthétiques ».....	30
C. Les applications cliniques.....	31
II.2.3. BAC on beads « BoBs™ ».....	32
A. Description de la technologie.....	32
B. Les kits disponibles.....	34
C. Principe du dosage.....	35
D. Les applications cliniques.....	37
III. Investigation cytogénétique des FCS : quel intérêt ?.....	38

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes.....	40
I.1. Les échantillons.....	40
I.2. La préparation tissulaire.....	41
I.3. BACs-on-Beads™ « Prenatal BoBs™ ».....	41
1.3.1. L'extraction d'ADN.....	41
1.3.2. Les kits utilisés.....	42
1.3.3 Protocole de Prenatal BoBs™.....	43
I.4. La MLPA.....	46
I.4.1. L'extraction d'ADN.....	46
I.4.2. Les kits utilisés (les sondes).....	47

Table des matières

I.4.3. Protocol de la MLPA.....	48
I.5. La FISH Interphasique.....	51
I.5.1. La préparation cytogénétique des échantillons.....	51
I.5.2. Les kits utilisés (les sondes).....	52
I.5.3. Protocole d'AneuCyte™	53
II. Résultats et Discussion.....	54
II.1.Résultats.....	54
II. 2. Discussion.....	66
Conclusion	74
Références bibliographiques.....	75
Annexes	
Glossaire	

Introduction

Introduction

L'Avortement Spontané (AS), encore appelé Fausse-Couche Spontanée (FCS), désigne l'expulsion du produit de conception avant qu'il ne soit viable, c'est-à-dire, pesant moins de 500 grammes, ou avant la 22^{ème} semaine d'aménorrhée (OMS). Il est estimé qu'entre 10 à 20% des grossesses cliniquement reconnues avortent de façon sporadique, par un processus naturel de sélection (Merveil et *al.*, 2005 ; Lejeune, 2006).

Les anomalies chromosomiques représentent le facteur le plus causatif de la pathologie fœtale. En effet, plus de 50% des fœtus avortés spontanément lors du premier trimestre sont porteurs d'une aneuploïdie. Celles-ci deviennent moins fréquentes avec la progression de la grossesse (présentes dans seulement 30% des avortons du deuxième trimestre), la plupart des fœtus anormaux ayant déjà été avortés spontanément. D'autres facteurs (facteurs maternels, infections,...etc) peuvent alors être impliqués dans la survenue des pertes de grossesses (Solveig et Pflueger, 2005; Doria et *al.*, 2009).

L'analyse cytogénétique des fœtus avortés spontanément est fortement recommandée pour un meilleur pronostic et diagnostic, mais également pour une meilleure estimation du risque de récurrence pour une future grossesse (Solveig et Pflueger, 2005).

Le caryotype est la technique de choix pour l'analyse cytogénétique des FCS, mais il est limité par les échecs de culture liés principalement à la macération des échantillons (Carvalho et *al.*, 2010 ; Vialard et *al.*, 2012 ; Paxton et *al.*, 2013). Pour parer à ces limitations, la biologie moléculaire ne cesse d'évoluer, et a vu la naissance d'approches révolutionnaires dans l'analyse cytogénétique des produits de FCS afin de surmonter les limites du caryotype, tels que FISH, MLPA, CGH...etc.

Notre travail a été mené conjointement au Laboratoire de Biotoxicologie de l'Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès et le Service de Cytogénétique Médicale du CHU Estaing de Clermont-Ferrand, et était basé sur l'analyse cytogénétique de 240 produits de FCS, récoltés sur une période de quatre années (de janvier 2011 à décembre 2014). L'âge des patientes au moment des différents prélèvements variait entre 19 et 43 ans, avec des âges de gestation qui se situaient entre la 5^{ème} et la 41^{ème} Semaine d'Aménorrhée (SA).

Notre objectif était de tester la performance d'une technique récente dite « rapide » de Biologie Moléculaire: BACs-on-Beads, et ce, par rapport à d'autres techniques cytogénétiques existantes sur le plan pratique actuel, notamment la Fluorescence In Situ par Hybridation « sur noyaux interphasique » ; la Multiplex Ligation-dependent Probe

Introduction

Amplification « MLPA » et le caryotype conventionnel, mais également à relever les avantages et les inconvénients des BoBs™ dans des conditions cliniques en routine, et plus particulièrement dans l'analyse cytogénétique des produits de FCS afin d'identifier les anomalies chromosomiques qui peuvent être à l'origine des pertes fœtales.

Revue bibliographique :
Chapitre I

I. Définitions et généralités :

L'interruption spontanée de grossesse est une complication obstétricale majeure. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Avortement Spontané (AS), encore appelé Fausse-Couche Spontanée (FCS), désigne l'expulsion non provoquée du produit de conception avant la viabilité du fœtus, c'est-à-dire, pesant moins de 500 g et/ou moins de 20 semaines de gestation (22 semaines d'aménorrhée) (Stirrat, 1990).

Il est estimé que 10 à 20 % des grossesses cliniquement reconnues avortent de façon sporadique, par un processus naturel de sélection, le plus souvent lors du premier trimestre et concernent une femme sur quatre durant sa période d'activité reproductive (Merveil et *al.*, 2005 ; Lejeune, 2006 ; Rai et Regan, 2006). Cependant, le taux de ces avortements pourrait être plus élevé (≈ 50 % du nombre des grossesses implantées) du fait que certaines grossesses ne sont pas cliniquement prouvées et avortent juste après la conception, avant que la femme ne se rende compte de sa grossesse.

Ces pertes précliniques sont dues à l'échec du développement embryonnaire, des erreurs précoces lors des premières divisions cellulaires ou des échecs lors de l'implantation (Merveil et *al.*, 2005 ; Rai et Regan, 2006).

Cinq pour cent des femmes ayant une grossesse médicalement reconnue *expérimentent* au moins 2 échecs de grossesse durant leur vie reproductive, et 1 à 2 % connaissent au minimum 3 avortements spontanés consécutives, il s'agit dans ce cas d'« Avortements Spontanés à Répétition » (ASR) (Lavigne et *al.*, 2005 ; Ford et Schust, 2009). Les auteurs ont proposé d'abandonner le terme d'Avortement Spontané (Abortion pour les anglophones) au profit de Fausse-Couche Spontanée (Miscarriage en anglais) afin d'éviter les confusions avec les interruptions médicales ou volontaires de grossesses (Beucher et *al.*, 2003).

Selon l'âge gestationnel, les FCS peuvent être précoces (se produisant avant la 12^{ème} SA), ou tardif (se produisant entre la 12^{ème} et la 22^{ème} SA), mais il est bien connu qu'approximativement 80% des FCS ont lieu durant les 12 premières semaines de gestation (Mattar et Mendes, 2002 ; Bottomley et Bourne, 2009 ; Lejeune, 2006), avec un pic d'occurrence maximum entre la 5^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation, où plus de 40% de tous les fausses-couches spontanés se produisent. (Czeizel et *al.*, 1984).

Plusieurs causes et facteurs de risque cliniques mènent à une FCS ou une Fausse-Couche Spontanée à Répétition (FCSR), tels que les anomalies morphologiques congénitales de l'utérus (cloison, utérus bicorne, exposition au distilbène) ou acquises (polype, fibrome, endométrite, synéchie), les anomalies chromosomiques (du caryotype fœtale ou parental), les pathologies endocriniennes (perturbations hormonales ou métaboliques), des dysfonctions thyroïdiennes, les causes infectieuses, les thrombophilies héréditaires ou acquises, les anomalies immunologiques, les causes masculines et les facteurs environnementaux. Cependant environ 50 % des cas restent inexpliqués après les investigations courantes gynécologiques, hormonales et de caryotype (Merviel et *al.*, 2005 ; Rai et regan, 2006).

II. Causes et facteurs de risque :

Dans les FCS et FCSR, plusieurs causes et facteurs de risque sont actuellement connus et souvent intriqués, bien que le bilan étiologique à proposer n'est pas consensuel, car la cause précise de l'arrêt de grossesse est impossible à déterminer en dehors d'anomalies chromosomiques mises en évidence par la réalisation du caryotype sur le produit de fausse-couche. Seules des hypothèses physiopathologiques sont possibles (50% des FCS n'ont aucune cause actuellement identifiable).

II.1. Les FCS du premier trimestre :

Plusieurs facteurs étiologiques sont associés à la perte du premier trimestre : le syndrome des Antiphospholipides (APL), des causes maternelles, les malformations anatomiques utérines,...etc (Bottomley et Bourne, 2009). Toutefois, les anomalies chromosomiques représentent le facteur le plus causatif de la pathologie fœtale. Elles sont retrouvées dans 50 à 70 % des FCS du premier trimestre, du fait que le risque d'anomalies chromosomiques augmente lors des fausses-couches précoces (70 % des FCS surviennent avant 6^{ème} SA). Les aneuploïdies sont incriminées dans 90 % des cas, notamment les trisomies, suivies par les polyploïdies et les monosomies X. Les trisomies les plus communes impliquent les chromosomes 16, 21 et 22 (**Tableau 1**) (Merviel et *al.*, 2005 ; Lejeune, 2006).

Références	Nombre caryotype	caryotype anormal %	Trisomie %	Polyploïdie %	Monosomie X %	Anomalie structure %
Eiben <i>et al.</i> , 1990	750	51	60	22	11	5
Ohno <i>et al.</i> , 1991	144	69	64	9	7	6
Dejme <i>et al.</i> , 1992	926	46	47	26	18	5
Gardo et Bajnoczky, 1992	224	51	52	23	16	5
Jauniaux et Hustin, 1992	319	38	37	25	25	—
Strom <i>et al.</i> , 1992	95	79	76	10	11	—
Ford <i>et al.</i> , 1996	1607	45	50	19	12	9
Brajenovic <i>et al.</i> , 1998	119	38	33	31	2	4
Doria <i>et al.</i> , 2009	173	38	60	10	21	7

Tableau 1 : Anomalies cytogénétiques retrouvées dans les produits d'avortement.

II.2. Les FCS du deuxième trimestre :

Le facteur pathologique causatif des FCS lors du 2^{ème} trimestre est différent de celui du 1^{er} trimestre (bien que quelques FCS au 2^{ème} trimestre soient des grossesses arrêtées lors du 1^{er} trimestre mais qui n'ont pas été expulsées de l'utérus). Les causes incluent les infections (chorioamnionitique ou infection systémique maternelle), la faiblesse cervicale, les anomalies utérines structurelles ou la thrombophilie. Les causes génétiques peuvent encore jouer un rôle dans la perte du 2^{ème} trimestre (20-30% des cas) (Stern *et al.*, 1996 ; Bottomley et Bourne, 2009), mais elles sont moins importantes que lors du premier trimestre. Les anomalies génétiques impliquées peuvent être soit une anomalie compatible avec la viabilité du fœtus (trisomies 13,18, 21, X monosomie et polysomies des chromosomes sexuel), soit une mutation génétique, soit une délétion ou une translocation héritées d'un des parents (Simpson, 2007 ; Bottomley et Bourne, 2009).

II.3. Le facteur génétique :

Les anomalies chromosomiques surviennent le plus souvent accidentellement (de novo) lors d'une fausse-couche et n'augmentent pas le risque d'une nouvelle FC avec la même anomalie (Stern *et al.*, 1996).

Dans 4 % des FCSR, un des deux parents est porteur d'une translocation déséquilibrée réciproque, ou une translocation *Robertsonienne*. En effet, 50 à 70% de leurs gamètes sont porteurs de translocations non équilibrées (Rai et Regan, 2006).

En cas d'une translocation équilibrée parentale, le risque de FCS sera très élevé surtout s'il s'agit d'une translocation d'origine maternelle, mais ça dépend aussi du type de translocation (Carp et *al.*, 2004 ; Lejeune, 2006 ; Rai et Regan, 2006).

L'inversion chromosomique est également liée aux FCSR, mais elle n'est pas retrouvée dans les FCS autant que les translocations.

Le risque d'avoir un enfant porteur d'une inversion héritée dépend de la taille de cette dernière, de son emplacement et du sexe du parent porteur. Les inversions de petite taille sont généralement létales. Paradoxalement, les inversions de grande taille sont parfois compatibles avec la survie du fœtus (Carpe et *al.*, 2004).

II.4. Les facteur de risque:

II.4.1. Les antécédents de FCS

Le risque de récurrence augmente avec le nombre d'antécédents : entre 17 et 35 % après 2 FCS, 25 à 46% après 3 FCS et supérieur à 50 % après 6 FCS (Lejeune, 2006). Il est estimé que la probabilité d'avoir un enfant vivant diminue de 23 % après chaque FCS (Merviel et *al.*, 2005).

Cette augmentation du risque ne peut pas être expliquée par le seul hasard, mais elle est liée à des nombreuses variables qui amplifient le risque d'une FC telle que :

II.4.2. La gravidité :

Le risque augmente avec la gravidité quelque soit l'issue des grossesses précédentes, même normales. Il existe des FCSR primaires (en l'absence d'accouchements antérieurs), et des FCSR secondaires (après la naissance d'un enfant vivant). Toute naissance entre les FC diminue le taux de récurrence d'environ 10 % (Regan et *al.*, 1989 ; Merviel et *al.*, 2005).

II.4.3. L'âge de gestation:

Les FCSR du premier trimestre sont les plus fréquentes : 31,9 % des cas surviennent avant la 7^{ème} SA, 52,3 % entre 8 et 11 SA, et 11,1 % entre 12 et 15 SA. Après le premier trimestre, leur fréquence retombe à 4,7 % (Merviel et *al.*, 2005).

II.4. 4. L'infertilité chez le couple :

Dans 25 à 50 % des cas aucune cause n'est retrouvée, cependant, il est probable que des perturbations de la tolérance immunologique pendant la grossesse soient à l'origine de ces cas (Merviel et *al.*, 2005).

II.5. L'âge parental:

Des études ont montré que l'âge maternel avancé à la conception est un facteur de risque majeur et indépendant pour les FCS, en raison de l'incidence élevée des conceptions porteuses d'anomalies chromosomiques. Le risque d'une perte fœtale augmente après l'âge de 35 ans, allant de 9% à 20-24 ans à 75% après 45 ans (**Tableau 2**). En effet, il a été reporté qu'environ 0,5 à 3% des femmes âgées plus de 45 ans ont déjà subi une FCSR.

Age (ans)	Nombre total des grossesses	Taux d'avortements %
20-24	350 395	9%
25-29	414 149	11%
30-34	23 5049	15%
35-39	93 940	25%
40-44	25 132	51%
≥ 45	1865	75%

Tableau 2 : Le taux de FCS en fonction de l'âge maternel à la conception (Knudsen et *al.*, 1991).

Selon l'étude menée par Nybo Andersen et *al.*, à l'âge de 42 ans, plus de la moitié de toutes les grossesses se terminent soit par une fausse-couche, soit par une grossesse ectopique ou un enfant mort né. L'association observée pourrait être le résultat des changements relatifs à l'âge tels qu'une augmentation des conceptions chromosomiquement anormales ou une diminution de la fonction utérine et hormonale. En outre, l'âge pourrait être un facteur de risque d'une exposition cumulative à des facteurs inconnus (Nybo Andersen et *al.*, 2000 ; Laurino et *al.*, 2005 ; Rai et Regan, 2006).

Une étude récente conclut qu'il existe une fréquence élevée d'aberrations chromosomiques dans le sperme d'hommes âgés. Cependant, le risque d'une FC augmente considérablement chez les couples dont l'âge maternel ≥ 35 ans et l'âge paternel ≥ 40 ans (Rachebrochard et Thonneau, 2002).

II.6. Relation entre âge parental, âge gestationnel, anomalies chromosomiques, parité et risque de FCS :

Les anomalies chromosomiques tendent à causer les FCS précoces. Boué et Boué (1969) ont rapporté qu'une anomalie chromosomique est retrouvée dans 70% des FCS qui surviennent lors des 6 premières semaines de la grossesse, dans 50% des FCS qui surviennent durant les 10 premières semaines et elle est retrouvée dans 10% seulement des FCS après 20 semaines de gestation (Boué and Boué, 1969).

Les anomalies chromosomiques des produits de FCS sont moins fréquentes quand les FCS se répètent, mais la répartition des différents types d'anomalies est la même que ce soit dans les FCS sporadiques ou les FCS répétées. Une anomalie du caryotype embryonnaire est retrouvée dans plus de 50 % des grossesses arrêtées quand les patientes ont déjà subi deux FCS, contre seulement 25 % quand elles en ont eu plus de six (Lejeune, 2006).

L'âge maternel augmente considérablement le risque de FCS, particulièrement après 35 ans, en raison du risque augmenté des aneuploïdies fœtales. Sept pour cent des trisomies fœtales sont le résultat d'erreurs méiotiques parentales (Rai et Regan, 2006).

Plusieurs variables influencent le taux de FCS, y compris l'âge, le nombre des FCS précédents, et la parité. D'autre part, la proportion des grossesses finissant par une FCS s'étend approximativement de 9% chez des femmes nullipares ou pluripares âgées entre 25 et 29 ans et sans antécédents de FC, à >40% chez des femmes sans enfants et > 70% chez des femmes pluripares âgées entre 40 et 44 ans avec des antécédents de trois pertes ou plus (Nybo Andersen et *al.*, 2000).

Le taux de FCS au dessus de l'âge 35 augmente légèrement à cause de la présence de conceptions chromosomiquement anormales. La fréquence des FCS dépend également des antécédents obstétricaux. Les femmes avec des antécédents de FCS ont un risque plus élevé de subir une FC, par rapport aux femmes avec une naissance normal d'un enfant vivant (**Fig. 1**) (Stein et *al.*, 1988; Nybo Andersen et *al.*, 2000).

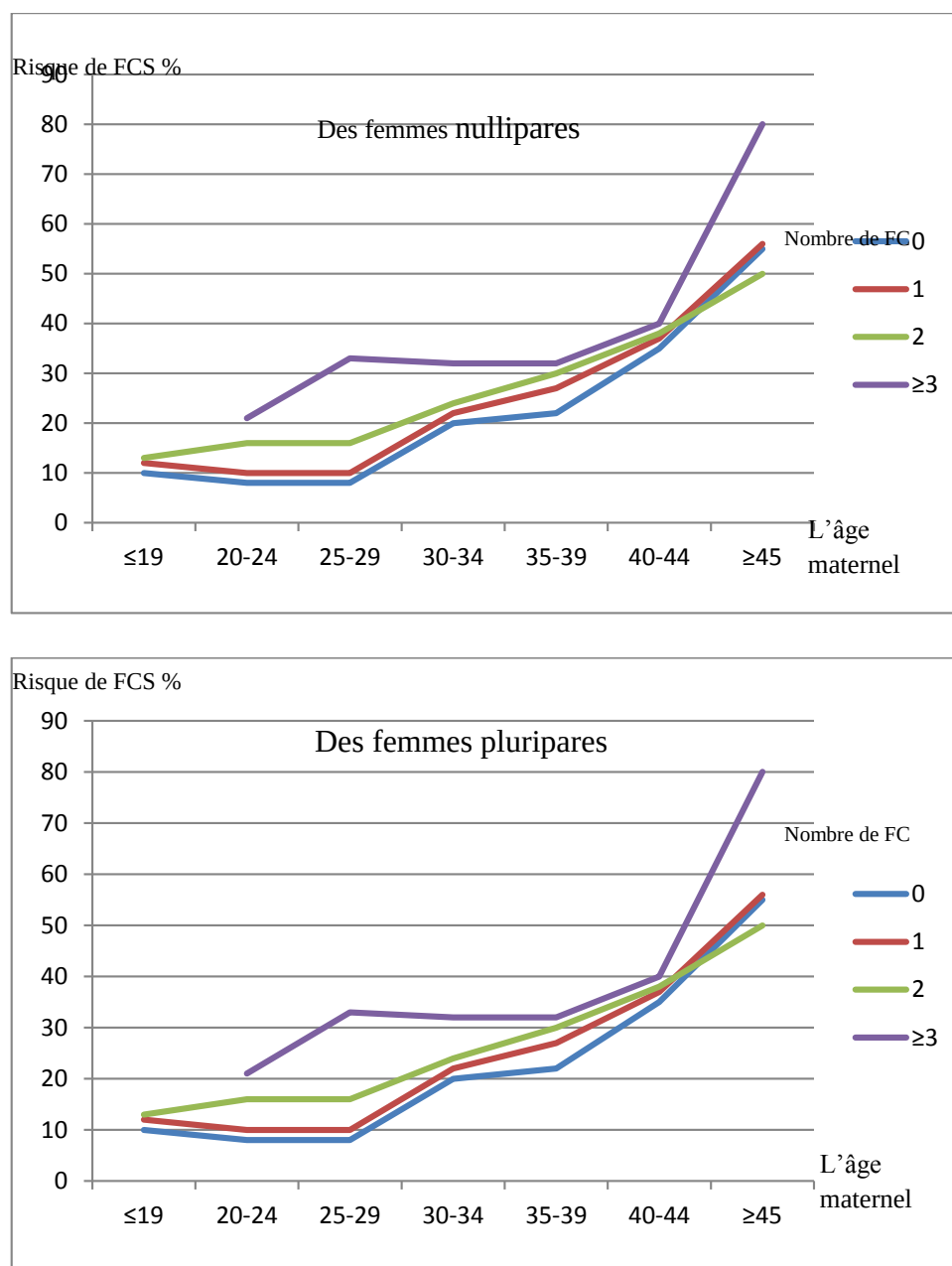


Figure 1: Risque de FCS chez des femmes avec nulliparités et pluriparités selon l'âge maternel à la conception et le nombre d'antécédents de FCS sur une période de 10 ans (Nybo Andersen et *al.*, 2000).

III. Aspect génétique des fausses-couches spontanées :

Le fait que les anomalies chromosomiques soient associées aux FCS est incontestable. En effet, elles sont le premier facteur causatif. Entre 50% et 80% des FCS présentent un caryotype anormal, ce taux dépend de l'âge maternel et de l'âge gestationnel au moment de l'arrêt de grossesse (Hassold et *al.*, 1980).

III.1. Les anomalies chromosomiques associées aux FCS et FCSR :

III.1.1. FCS sporadiques :

Après l'analyse du caryotype des FCS sporadiques, Boué et *al.* en 1976 ont mis en évidence environ 75 % d'anomalies chromosomiques. En concordance avec les résultats précédemment publiés, la majorité des anomalies chromosomiques trouvées étaient des aberrations numériques dans 94 % des cas (54 % de trisomies 16, 18, 21, 22 ; 20 % de triploïdies et polyploïdies et 20% de monosomies X), contre seulement 6% d'anomalies de structure dont la moitié étaient héritées d'un parent porteur d'une translocation équilibrée.

Dans la série de Doria et *al.*, en 2009 ; 38,2% des cas étaient anormaux, la plupart des anomalies chromosomiques trouvées étaient des aberrations numériques (93,9%), dues pour la majorité à des trisomies (60%), des monosomies X (10%), des polyploïdies 21% (notamment des triploïdies), des anomalies structurelles (7,6%) et des mosaïcismes (9%). Les trisomies les plus retrouvées dans cette série sont les trisomies des chromosomes 16,15, 22, 21, 13 et 18.

III.1.2. FCS à répétition :

Dans l'étude menée par Stephenson et *al.*, (2002), décrivant 422 caryotypes réalisés sur des cellules trophoblastiques issues de produits de FCS à répétition, une anomalie chromosomique était présente dans 54% des cas, dont 96 % était des anomalies de nombre (66,5 % des trisomies, 10 % des polyploïdies et triploïdies, 9 % des monosomies X), et 4% des anomalies de structure, notamment des translocations déséquilibrées.

Plusieurs études ont montré qu'une grande partie des FCSR peut être due aux anomalies numériques *de novo*, en particulier les trisomies autosomiques des chromosomes 13, 14, 15, 16, 21 et 22, et les monosomies X (Hassold et *al.*, 1988 ; Pandey et *al.*, 2005). Les FCSR peuvent également être causées par des anomalies chromosomiques récurrentes, en raison des aberrations équilibrées héritées d'un des parents. L'aberration chromosomique parentale pourrait être en mosaïque, des aberrations numériques, des anomalies structurelles représentées par des translocations réciproques ou Robertsoniennes. Les études récentes ont démontré l'implication des maladies génétiques liées à l'inactivation du chromosome X chez les femmes souffrant de FCSR (biais d'inactivation > 90%) (L'inactivation préférentielle de

l'un des deux chromosomes X dans les cellules femelles) (Pandey et *al.*, 2005 ; Beever et *al.*, 2003).

Le taux d'aberrations chromosomiques des fœtus avortés diminue avec le nombre de FCS, mais la répartition des différents types d'anomalies est la même dans les FCS sporadiques et les FCSR.

Dans la série d'Ogasawara et *al.*, (2000), il a été démontré qu'après 2 FCS successives les anomalies chromosomiques étaient impliquées dans 50% des cas. Ce taux retombe à seulement 25 % si la femme expérimente plus de 6 FCS.

Dans les recherches menées par Sullivan et *al.* en 2003, le taux d'anomalies chromosomiques était significativement plus faible dans les cas de FCSR: 25 % dans un groupe de 106 patientes ayant eu précédemment 2 FCS successives, contre 42 % dans un groupe de 102 témoins primigestes (Lejeune, 2006).

III.2. Les anomalies chromosomiques du caryotype parental :

Une anomalie chromosomique est observée chez 2 à 6 % des couples souffrant de FCSR. Ces anomalies chromosomiques sont probablement d'origine maternelle, les anomalies chromosomiques d'origine paternelle sont moins fréquentes (Stephenson, 1996 ; Merviel et *al.*, 2005).

Tableau 3 (Portnoi et *al.*, 1988 ; Fryns et Buggenhout, 1998) représente des études menées sur les caryotypes de couples souffrants de FCSR.

Séries	Caryotype normal (%)	Translocation réciproque (%)	Translocation réciproque (%)	Inversion (%)
Fryns et al. ≥ 2 FCS				
1986 N = 1 555	94	3,6	1,8	0,6
1998 N = 1 743	95,4	3,5	0,5	0,6
Portnoi et al. 1988				
2 FCS N = 771	96			
2 FCS et enfant normal	93,4			
Total N = 1 142	95,2	2,8	0,8	1,2

Tableau 3 : Caryotype de couples ayant subi au minimum deux FCS (Lejeune, 2006).

L'anomalie la plus fréquemment retrouvée est la translocation équilibrée : une translocation réciproque est observée dans 67 % des cas, et une translocation Robertsonienne

dans 33 % des cas, notamment la translocation t(13q ; 14q) qui est 4 à 6 fois plus fréquente dans la population générale. Plus rarement, il est mis en évidence une délétion, une duplication ou une inversion péri ou paracentrique.

Enfin, avec des taux insignifiants, les anomalies des chromosomes sexuels, des petits chromosomes surnuméraires et des microremaniements sont détectés.

La moitié des anomalies surviennent *de novo* pendant la gamétogenèse, dans le reste des cas, elles sont héritées d'un des deux parents (Merviel et *al.*, 2005 ; Lejeune , 2006).

III.3. Biais de l'inactivation du chromosome X et FCS à répétition :

Certains couples font préférentiellement des FCS sur les embryons mâles, faisant évoquer l'hypothèse de maladies géniques létales récessives liées à l'X. Les chercheurs se sont donc intéressés à la relation entre l'inactivation de l'X et les FCSR ; surtout si la femme ne donne naissance qu'à des filles. Les résultats sont contradictoires :

Certaines séries récentes (Lanasa et *al.*, 2001; Shanga et *al.*,1999) ont enregistré une augmentation de la fréquence des biais de l'inactivation de l'X chez les femmes souffrant des FCSR. En étudiant ces familles, il a été observé :

- Un nombre élevé de filles ;
- Une transmission maternelle du biais d'inactivation de l'X;
- Un taux de FCS d'environ 40 %.

Une série publiée par Sullivan et *al.* en 2003 ne confirme pas ces résultats et ne met en évidence aucune relation entre biais d'inactivation de l'X et FCSR.

Cependant, une étude de Beever et *al.* a mis en évidence une plus grande fréquence de FCS liées à des trisomies chez les femmes présentant un biais de l'inactivation de l'X, ce qui laisse supposer qu'une mutation létale liée à l'X n'est pas la seule explication des FCS de ces patientes (Beever et *al.*, 2003 ; Lejeune, 2006).

III.4. Les anomalies chromosomiques des produits de FC :

Une étude a été menée par l'analyse de 5318 FC par Simpson et Bombard en 1987, qui ont combiné les données de 4 autres études (Kajii et *al.*, 1973 ; Boué et *al.*, 1975 ; Hassold et *al.*, 1980 ; Warburton et *al.*, 1980). Le taux global des aberrations chromosomiques était de 51%, incluant les aberrations numériques (96%), les anomalies structurales (3%) et d'autres

anomalies chromosomiques (1%). Cependant, l'essor des nouvelles techniques de la cytogénétique moléculaire a amélioré le taux de détection des anomalies. Des études plus récentes ont enregistré de légères différences du taux des anomalies chromosomiques. **Le Tableau 4** résume la fréquence des anomalies chromosomiques, rapportée dans 11 séries avec un total de 4696 FCS analysées.

	Nombre caryotype	Caryotype normal	Caryotype anormal	Caryotype anormal %	Echecs	Trisomie (% d'anomalie)	Polyploidie	Monosomie X	Anomalie de structure	Autre (*)
Gerner 1987	189	44	145	77	13	89 (61)	16 (11)	13 (9)	12 (8)	15 (10)
Minguillon 1989	123	62	61	50	N R	30 (49)	13 (21)	9 (15)	3 (5)	6 (10)
Rehder 1989	200	83	117	59	0	55 (47)	30 (26)	12 (10)	2 (2)	18 (15)
Eiben 1990	750	370	380	51	233	229 (60)	82 (22)	40 (11)	18 (5)	11 (3)
Ohno 1991	144	44	100	69	12	64 (64)	9 (9)	7 (7)	6 (6)	14 (14)
Strom 1992	95	16	79	83	1	60 (76)	8 (10)	9 (11)	0	2 (3)
Gardo 1992	224	109	115	51	24	60 (52)	27 (23)	18 (16)	6 (5)	4 (3)
Dejmek 1992	926	500	426	46	582	202 (47)	110 (26)	78 (18)	19 (5)	17 (4)
Jauniaux 1992	319	197	122	38	N R	45 (37)	31 (25)	31 (25)	0	15 (12)
Ford 1996	1607	878	729	45	N R	367 (50)	141 (19)	90 (12)	64 (9)	67 (9)
Brajenovic 1998	119	74	45	38	N R	15 (33)	14 (31)	1 (2)	2 (4)	13 (29)
Totale	4696	2377	2319	49		1216 (52)	481 (21)	308 (13)	132 (6)	182 (8)

N R : non reporté

(*) : Incluant doubles et triples trisomies, mosaïcisme, mûles hydatiformes et monosomies autosomales

Tableau 4 : Les résultats cytogénétiques des études menées sur les FCS (Eiben et *al.* 1990 ; Guernen et *al.*, 1987 ;Minguillon et *al.*, 1989;Rehder et *al.*, 1989; Ohno et *al.*, 1991; Strom et *al.*, 1992; Gardó et *al.*, 1992; Dejmek et *al.*, 1992; Jaumaux et *al.*, 1992; Ford et *al.*, 1996; Brajenovic-Milic et *al.*, 1998).

L'incidence des anomalies chromosomiques était de 49%, incluant 86% d'anomalies numériques, 6% d'anomalies de structure et 8% d'autres anomalies. La conclusion la plus remarquable était l'incidence élevée des autres anomalies, telles que le mosaïcisme, les doubles et triples trisomies (Goddijn et Leschot, 2000).

III.4.1. Les aberrations chromosomiques de nombre :

Les anomalies numériques peuvent être subdivisées en aneuploïdies (trisomies et monosomies) et polyploïdies. Les trisomies sont les anomalies les plus fréquentes 52% dans les produits de FCS, suivis des polyploïdies (21%) et les monosomies (13%) (**Tableau 4**) (Goddijn et Leschot, 2000).

Les fœtus aneuploïdes résultent des erreurs de non ségrégation lors de la méiose I ou II de la gamétogénèse. La fréquence des aneuploïdies dans les gamètes humaines varie entre 12 à 37% dans les ovocytes et seulement 1 à 6% dans les spermatozoïdes (Eichenlaub, 1998; Martin, 2006; Frumkin et *al.*, 2008). Le taux des aneuploïdies qui surviennent pendant la méiose I est de 33,6%, la méiose II (33,7%), et les erreurs séquentielles de la méiose I et II (32,7%). Il a été reporté que les aneuploïdies des chromosomes 16 et 22 sont dues à des erreurs de la méiose II, tandis que ceux des chromosomes 18, 13 et 21 sont le résultat des erreurs de la méiose I (Kuliev et Verlinsky, 2004; Kuliev & *al.*, 2005; Frumkin et *al.*, 2008).

III.4.1.1. Les trisomies :

Toutes les trisomies ont été retrouvées dans les FCS sauf les chromosomes 1 et Y (Edwards et *al.* 1967). La plupart des trisomies sont causées par une non-disjonction en première division méiotique maternelle. La trisomie 16 est la plus fréquente dans les fœtus avortés, expliquant 31% de fœtus trisomiques et 7,27% de tous les FCS. Elle est suivie par la trisomie 22, retrouvée dans 11,4% des trisomies et 2,26% des FCS, puis la trisomie 21 expliquant 10,5% des trisomies et 2,11% des FCS, et enfin des trisomies 15, 13 et 18 (Davison et Burn, 1990 ; Goddijn et Leschot, 2000 ; merviel et *al.* , 2005).

III.4.1.2. Les monosomies :

La monosomie X est l'aneuploïdie du chromosome sexuel la plus fréquente. Elle est habituellement due à une perte du chromosome sexuel paternel, et il est estimé qu'environ 98% des fœtus monosomiques 45,X0 sont avortés spontanément et précocement durant la grossesse (**Fig.2 et 3**), bien qu'un nombre limité survive jusqu'au 2^{ème} trimestre. Les monosomies autosomiques sont rarement décrites lors des FCS (0,2 %), car elles sont responsables des FC très précoces (Edwards et *al.*, 1967 ; Goddijn et Leschot, 2000 ; merviel et *al.* , 2005).

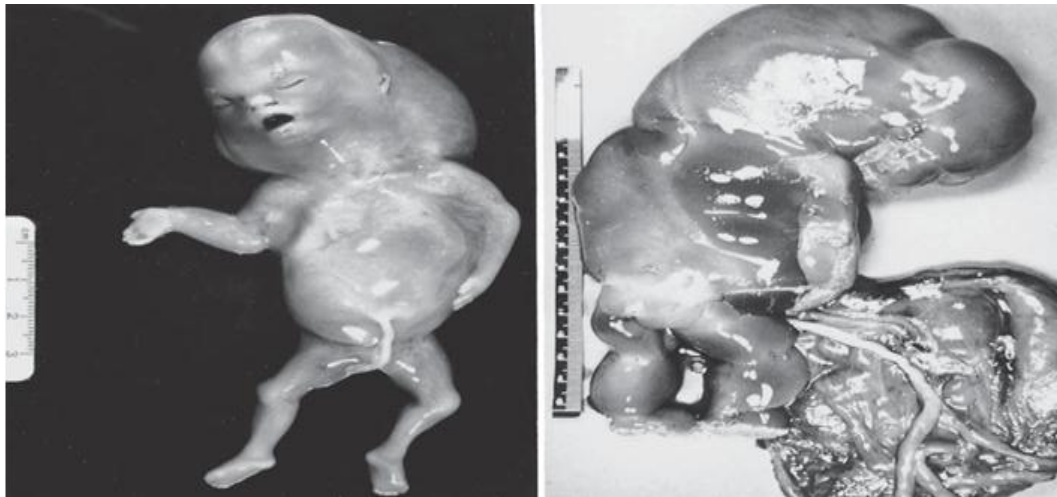


Figure 2 : Deux embryons avortés spontanément avec un caryotype 45,X0 (monosomie X) , à gauche, un embryon de 10 semaines avec hygroma et à droite, un embryon avec placenta hypoplasique (Benirschke, 2006) .



Figure 3 : Môle de Breus (hématome tubéreuse subchorionique) (Benirschke, 2006).

III.4.1.3. Les polyploïdies :

Les mécanismes mis en jeu pour les triploïdies ($3n = 69$) sont la fécondation d'un ovocyte par deux spermatozoïdes ou l'absence d'expulsion du deuxième globule polaire de l'ovocyte (un ovocyte diploïde). Il existe une association entre l'aspect du fœtus et la triploïdie. Le placenta apparaît plus important lorsque les deux lots chromosomiques sont paternels, et le retard de croissance plus marqué chez le fœtus lorsque ces deux lots sont maternels. Pour les tétraploïdies ($4n=92$), il s'agit d'une anomalie des divisions mitotiques après la fécondation (Goddijn et Leschot, 2000 ; merviel et *al.* , 2005).

Les grossesses diploïdes anormales dans lesquelles les deux lots chromosomiques proviennent du même parent (les grossesses molaires hydatiforme ou complètes) sont également avortées (**Fig. 4**) (Thomas, 1995).

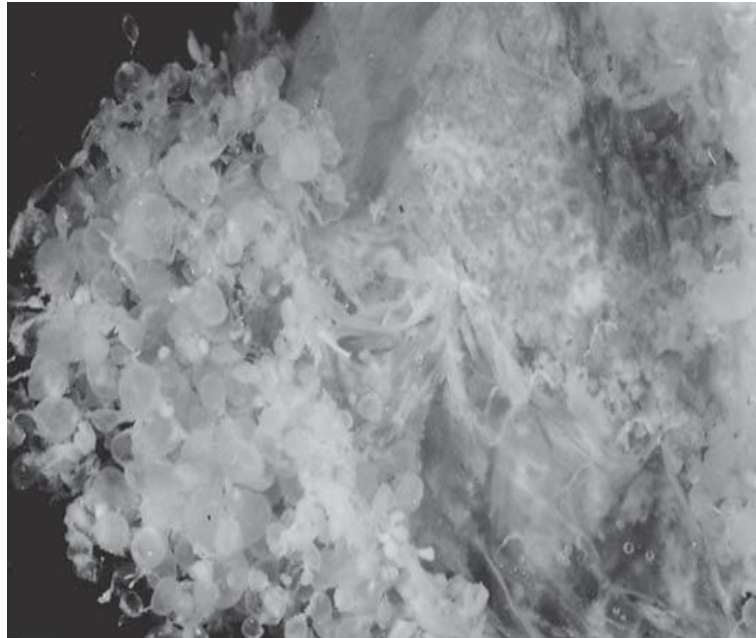


Figure 4 : Môle partielle hydatiforme ; cas de triploïdie (69, XXX) (Benirschke, 2006).

III.4.2. Le mosaïcisme :

Le mosaïcisme est lié à des accidents mitotiques qui se produisent après la fécondation. Il s'agit d'un fœtus avec un caryotype qui regroupe deux ou plusieurs lignées cellulaires. Le mosaïcisme peut toucher le placenta, l'embryon ou les deux. Le mosaïcisme du placenta (présence de cellule cytotrophoblastique mosaïque) représente l'anomalie la plus fréquente dans les FCS (Kalousek et *al.*, 1989 ; merviel et *al.*., 2005).

III.4.3. Les anomalies de structure :

Six pour cent des fœtus avortés avec un caryotype anormal sont porteurs d'une anomalie de structure (**Tableau I**). La moitié des anomalies surviennent *de novo* pendant la gamétogenèse, le reste est hérité d'un des deux parents portant une translocation équilibrée (réciproque dans les 67 % des cas et Robertsonienne dans 33 % des cas) ou une inversion. Un remaniement chromosomique parental est observé chez 6 % des couples qui ont subi une FCS. Ces couples peuvent souffrir de FCS à répétitions (Goddijn et Leschot, 2000 ; merviel et *al.*., 2005 ; Khong, 2007).

IV. La classification des produits de fausse-couche spontanée :

La plupart des tissus de FC que le pathologiste reçoit consistent seulement en une caduque, un tissu placentaire ou un tissu décidual avec site de réaction placentaire. Le tissu fœtal n'est pas toujours présent, et il est très rare de recevoir un fœtus ou un sac gestationnel intact. Une classification morphologique des avortements basée sur la morphologie des villosités a été développée par Rushton (1978, 1984) afin de chercher si les facteurs fœtaux ou maternels étaient en cause:

Groupe I : Œuf clair

- (a) la plupart des villosités montrent un changement hydropique
- (b) une morphologie constituée de mélange de villosités de (a) et de (c) avec des proportions approximativement égales
- (c) la plupart des villosités montrent la fibrose stromale et l'oblitération vasculaire

Groupe II : Embryons ou fœtus macérés ; quelques villosités sont hydropiques, mais la plupart montrent un changement post mortem, avec la fibrose stromale.

- (a) embryon ou fœtus présent
- (b) embryon ou fœtus absent

Groupe III : Embryons ou fœtus frais ; les villosités ne montrent pas un changement hydropique ou post mortem

- (a) embryon ou fœtus présent
- (b) embryon ou fœtus absent

Les placentas du groupe I sont plus susceptibles d'être des grossesses non embryonnaires (Fig. 5).

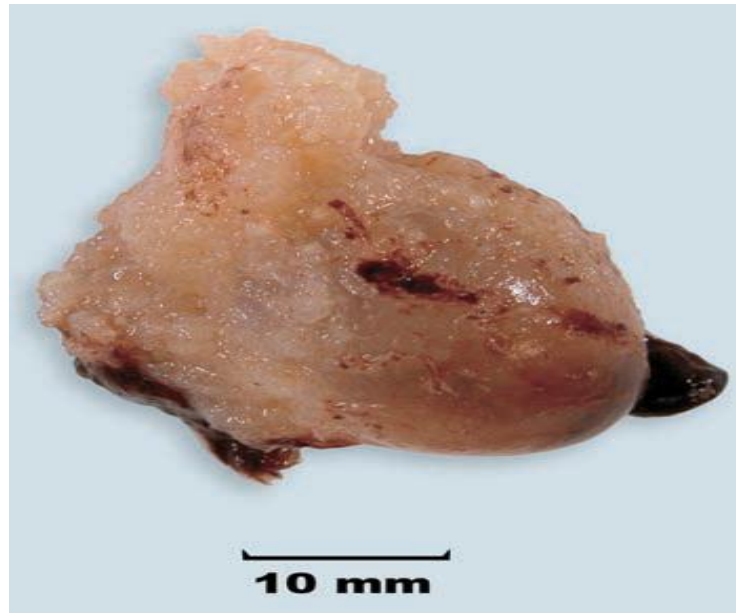


Figure 5 : Groupe I : un fœtus avorté pendant la 8^{ème} semaine de gestation sans pièces fœtaux identifiables (œuf clair) (Yee khong, 2007).

Les grossesses des groupes II et III représentent les FCS du deuxième trimestre. Avec les grossesses du groupe II, il est clair que la mort fœtal a précédé l'expulsion. La cause de l'échec des grossesses du groupe I sont probablement liée aux facteurs fœtaux (**Fig. 6**).

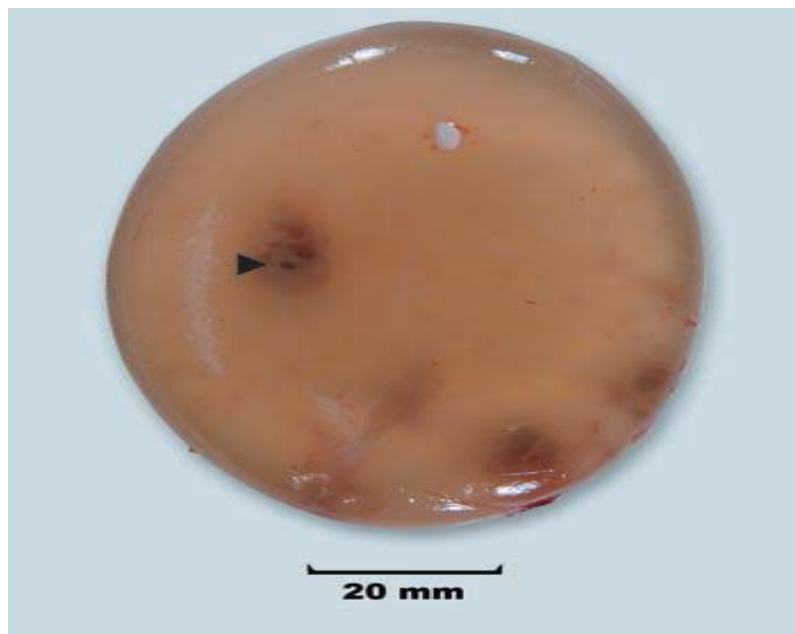


Figure 6 : Groupe II: un fœtus avorté durant la 10^{ème} semaine de gestation, nous observons le reste d'un sac jaune et un fœtus macéré avec des structures d'oeil (flèche) de taille d'environ 6 semaines dans le sac (Yee khong, 2007).

Dans les grossesses de groupe III, le fœtus était soit vivant au moment de FC, soit mort peu de temps avant l'interruption de grossesse. Contrairement aux deux autres groupes, les facteurs maternels sont plus susceptibles d'être en cause (Fig. 7).

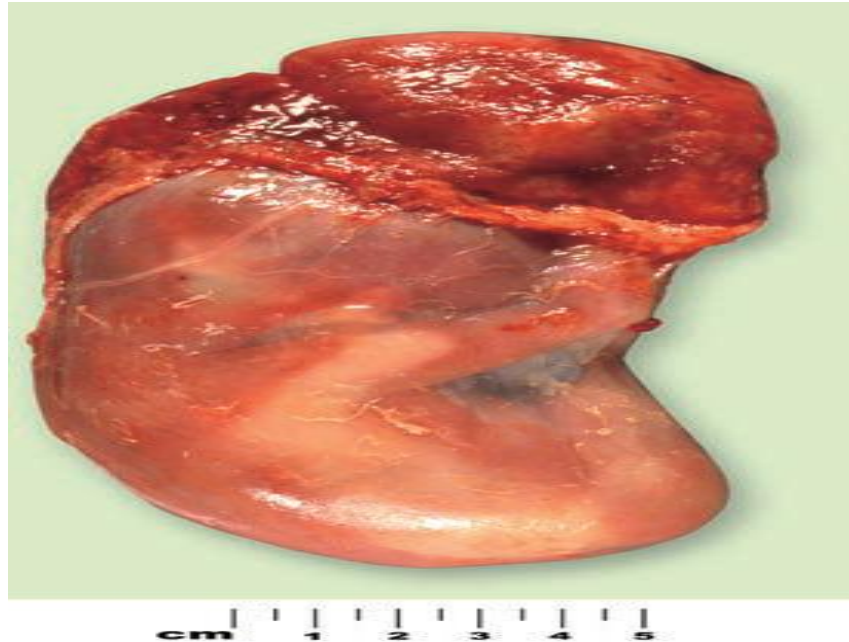


Figure 7 : Groupe III : Fœtus avorté pendant la 19^{ème} semaine de gestation. Le fœtus se trouve intact en dessous du sac gestationnel (Yee khong, 2007).

La classification de Rushton est fiable pour sa simplicité et les résultats placentaires étaient identiques dans les FCS et les FCSR ; mais ces résultats ne pourraient pas être liés aux résultats d'une future grossesse ; donc c'est une classification qui ne pouvait pas être utilisée pour l'estimation du risque de récurrence pour une grossesse ultérieure; ni informative pour un meilleur pronostic et diagnostic (Houwert-De Jong et *al.*, 1990).

Avec l'utilisation généralisée de l'échographie au début de la grossesse, les femmes avec des grossesses infructueuses sont plus susceptibles de subir une Interruption Médicale de Grossesse (IMG) (curetage), que de subir une FCS. Mais certains médicaments abortifs utilisés au niveau des hôpitaux peuvent entraîner des changements dans le placenta, le fœtus ou des pathologies (Lazda et Sams, 1995). Il est donc impossible d'établir une corrélation fiable entre la morphologie des villosités choriales et leur caryotype (Minguillon et *al.*, 1989; Rehder et *al.*, 1989).

V. Les observations anatomiques du produit de FCS :

L'évaluation des échantillons de conceptions avortés spontanément a beaucoup changé. Le soi-disant Windei (œuf clair) des premiers auteurs, l'«ovule pathologique" (avec ses nombreux sous-groupes), et bien d'autres désignations utilisées dans le passé sont devenus obsolètes. De même, des termes tels que nodulaire, cylindrique, un retard de croissance, et embryon désorganisé ont peu d'intérêt dans la description de la nature des anomalies embryonnaires (**Fig. 8**). Pour une meilleure compréhension de la pathogenèse des nombreuses anomalies dans les échantillons avortés, il est nécessaire de connaître leur constitution chromosomique. Une étude cytogénétique des échantillons des FCS est un outil indispensable non seulement pour la détection des désordres génétiques, mais aussi pour des raisons pronostiques et thérapeutique.

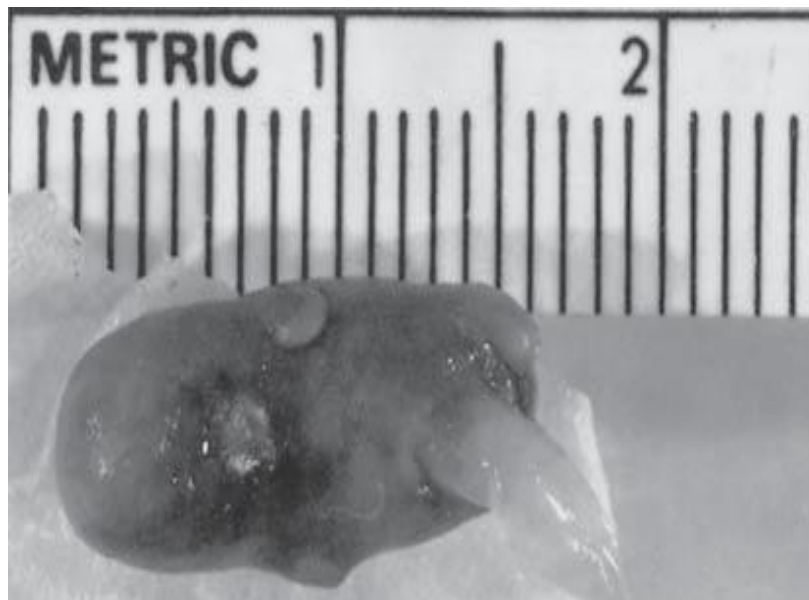


Figure 8 : Embryon cylindrique d'une FCS à la 9^{ème} semaine de gestation. L'embryon a une croissance restreinte (qui devrait être de 2,5 cm) et hémorragique. Il a été l'objet d'une étude microscopique; la FC est sans doute dû à une erreur chromosomique (Benirschke, 2006).

L'utilisation de l'autopsie du trophoblaste (les villosités choriales) issu du produit de FC a été préconisée par Johnson et *al.* (1990). Ils ont non seulement trouvé que c'était plus efficace que la biopsie de la peau et l'amniocentèse, mais ils ont également découvert un taux d'anomalies chromosomiques anormalement élevé.

La majorité des fœtus anormaux ont montré une macération compatible avec une mort fœtale intra-utérine durant une longue période. Là encore, il y a une confirmation que les

anomalies cytogénétiques sont associées à un arrêt précoce du développement, mais qu'il y a aussi une fréquente rétention des produits de conception longtemps avant leur expulsion. Le fœtus macéré signifie le plus souvent qu'il présente un risque important pour une anomalie chromosomique, alors que la mort du fœtus frais sans anomalies congénitales graves est plus souvent le résultat d'autres causes, notamment infectieuses, des troubles endocriniens, une anatomie anormale de l'utérus, ou les facteurs immunologiques (Solweig pflueger, 2005).

Chapitre II

I. L'évolution des techniques cytogénétiques: du caryotype à la cytogénétique moléculaire :

Les techniques cytogénétiques sont en perpétuelle évolution depuis l'établissement du premier caryotype en 1959 (la cytogénétique classique). Cette technique pangénomique permet de détecter des anomalies génomiques quantitatives de l'ordre de 10 à 15 Mb. A partir des années 1970, les progrès technologiques ont permis à la cytogénétique d'être plus performante avec l'avènement du caryotype à haute-résolution (3 à 5 Mb), les techniques de marquage chromosomique (en bande G et R) et de la cytogénétique moléculaire depuis le milieu des années 1980, avec des approches rapides plus résolutive.

L'hybridation chromosomique utilisant des sondes fluorescentes, Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), s'est particulièrement développée depuis les années 1990, ce qui a permis la localisation génique et le début de la cartographie du génome. L'hybridation génomique comparative (CGH) qui utilise de l'ADN hybridé sur chromosomes métaphasiques est apparue quelques années plus tard, mais n'a pas vraiment permis d'augmenter les performances de l'analyse pangénomique. En 1998, apparaît la puce d'ADN (CGH-array), mais c'est seulement en 2005 que son application a connu un essor important, en terme du nombre de centres utilisateurs et de publications scientifiques. Cette technique permet une résolution pangénomique de 1 Mb à quelques kilobases pour la détection des anomalies quantitatives (détection des anomalies infra-cytogénétiques ou 'cryptiques'), et deviennent ainsi le « chaînon manquant » entre la cytogénétique et la biologie moléculaire (Andrieux, 2008 ; Villard et Molina Gomes, 2010).

En 2002, Schouten et *al.* décrivent pour la première fois une nouvelle méthode simple et rapide de quantification génique en multiplex, la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, ou MLPA. C'est une technique de quantification génique basée sur la ligation et l'amplification des oligonucléotides. Grâce à la possibilité de concevoir des sondes MLPA d'une manière entièrement synthétiques afin de répondre à une utilisation ciblée de la MLPA, cette stratégie a permis d'ouvrir le champ de la MLPA à des applications variées allant du diagnostic des pathologies les plus rares aux vérifications des anomalies détectées en CGH-array (Coutton et *al.*, 2012).

En 2011, Gross et *al.* décrivent les BACs-on-Beads™, technologie en diagnostic prénatal détectant les gains et les pertes d'ADN. Les dosages BACs-on-Beads sont basés sur la

technologie xMAP, cette approche est décrite comme révolutionnaire dans l'analyse cytogénétique moléculaire (Gross et *al.*, 2011).

Le caryotype conventionnel demeure cependant « une technique de référence », mais il reste pénalisé par la phase de culture. Le secteur de la biologie moléculaire propose des outils toujours à la pointe de l'innovation ; ceux-ci trouvent leur place soit pour développer des nouvelles stratégies de diagnostic, soit pour remplacer ou compléter des techniques existantes en les rendant plus rapides et/ou plus fiables. Toutes ces approches ont un positionnement différent en termes de richesse, d'informations fournies et des délais de rendu de résultat dans l'analyse cytogénétique des produits de FCS, dont nous détaillerons le principe, les avantages et les inconvénients de chaque technique ainsi que son intérêt.

II. Les méthodes d'exploration cytogénétique des produits de FCS:

II.1. Caryotype conventionnel :

Traditionnellement, l'analyse cytogénétique de fausses-couches a été réalisée par le caryotype en Bande G sur des chromosomes métaphasiques après une culture cellulaire des villosités chorales de longue durée (Kajii, et *al.*, 1980). Cette méthode cytogénétique standard exige des cellules vivantes pour la culture, et la qualité de la métaphase est cruciale (Stephenson, et *al.*, 2002). En fait, les taux de réussite du caryotype après la culture cellulaire des produit de FC varient selon les laboratoires, allant de 60 à 90% (Kajii, et *al.*, 1980; Stephenson, et *al.*, 2002). Il a également été supposé que le caryotype conventionnel ne peut détecter que des caryotypes anormaux qui permettent la prolifération cellulaire *in vitro* et les échantillons des fausses-couches qui ne prolifèrent pas pourraient avoir des anomalies rares, qui vont causer les échecs de la culture cellulaire (Jobanputra, et *al.*, 2011).

Un autre obstacle assez fréquent de la cytogénétique classique c'est la contamination de l'échantillon par des cellules ou des micro-organismes d'origine maternelle (Nobuaki Ozawa ,2012; Jobanputra, et *al.*, 2011), du fait que l'élimination complète des cellules maternelles (cellule de caduque / sang) n'est pas toujours possible. En conséquence, le caryotype pourrait être faussement classé comme femme normale, et le sex-ratio en faveur des femelles est souvent reconnu dans l'analyse du caryotype des produits de FCS.

Les remaniements chromosomiques de taille inférieure à quelques mégabases (moins de 5Mb) tels que les microdélétions et les remaniements cryptiques sont indétectables par le

caryotype, en raison de la faible résolution. L'analyse microscopique des chromosomes et la culture cellulaire prend du temps et demande de l'expertise.

Au cours des dernières années, et avec l'évolution de la biologie moléculaire, plusieurs nouvelles méthodes cytogénétiques dites rapide ont été introduites dans l'analyse cytogénétique des FCS afin de surmonter les inconvénients du caryotype conventionnel (Nobuaki Ozawa ,2012).

II.2. Les outils dits rapides de la Biologie moléculaire :

II.2.1. La Fluorescence *In Situ* par Hybridation (FISH):

A. Le principe de la FISH :

L'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) repose sur la capacité de l'ADN à se dénaturer et se renaturer dans des conditions précises de température, de salinité et de PH, c'est une approche qui consiste en l'hybridation d'une sonde, séquence d'ADN spécifique d'une région du génome marquée par un fluorochrome, sur des préparations chromosomique ou dans la chromatine du noyau en interphase. Elle permet ainsi de détecter une anomalie très fine mais ciblée du génome. Il est donc impératif d'avoir une idée préalable de la région à étudier (Keren et Sanlaville, 2008).

En pratique, la première étape de FISH consiste en une dénaturation thermique de l'ADN cible et de la sonde. La deuxième étape consiste en l'hybridation de la sonde sur l'ADN cible. La troisième étape correspond à la révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte grâce à des protéines spécifiques (molécules « signal ») couplées à des fluorochromes et à la contre-coloration du support chromosomique.

Les lames hybridées sont observées avec un microscope à épifluorescence muni de filtres spécifiques aux différents fluorochromes utilisés et éventuellement d'un analyseur d'images (**Figure 16**). La sonde hybridée avec la cible est révélée sous forme d'un signal fluorescent et l'analyse des signaux permet de déterminer la présence, la localisation et le nombre des copies d'une séquence cible et par conséquent de détecter les remaniements chromosomiques de nombre ou de structure (Bouayed Abdelmoula, 2004).

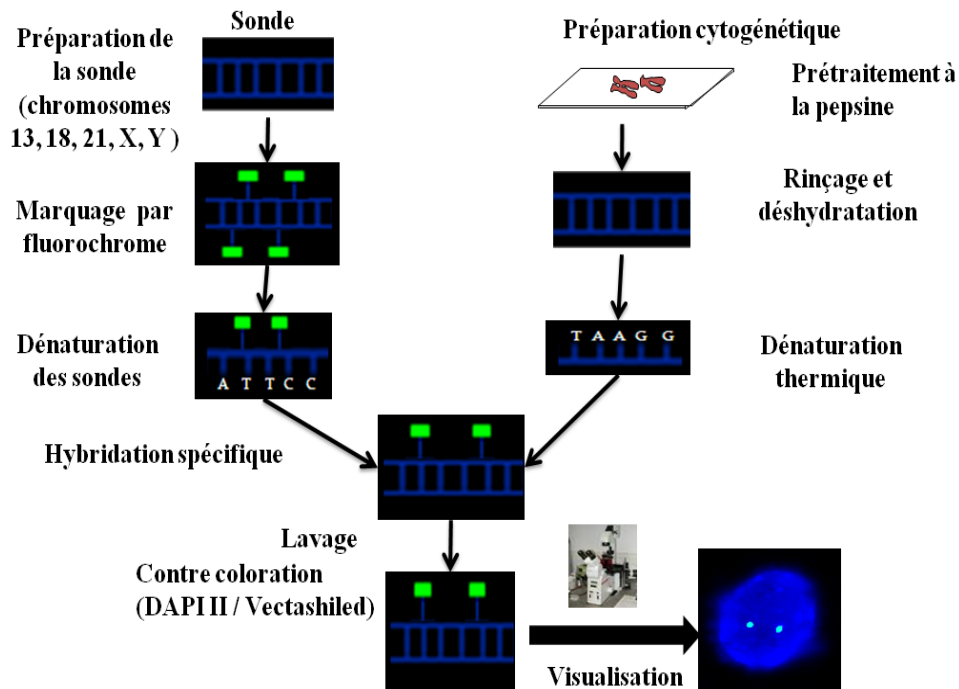


Figure 16 : Principe de la FISH : les différentes étapes sur préparation chromosomique.

B. Les sondes :

Avec les progrès des techniques moléculaires, il est possible de synthétiser aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome, de ce fait, il existe sur le marché une large gamme des sondes spécifiques, il suffit d'avoir une idée préalable sur les chromosomes impliqués pour détecter les remaniements chromosomiques.

On distingue :

- **Les sondes composées des séquences spécifiques d'ADN répété** (centromérique ou télomérique). Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilobase), mais s'hybrident sur des séquences spécifiques (centromères par exemple) répétées en tandem sur plusieurs centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité (**Fig. 17 a**).

- **Les sondes composées des séquences uniques** On distingue : les sondes spécifiques de loci (un gène, une séquence unique) et les sondes d'une peinture chromosomique spécifique d'un bras chromosomique ou d'un chromosome entier (**Fig. 17b et 17c**) (Bouayed Abdelmoula, 2004 ; Cooper et *al.*, 2011).

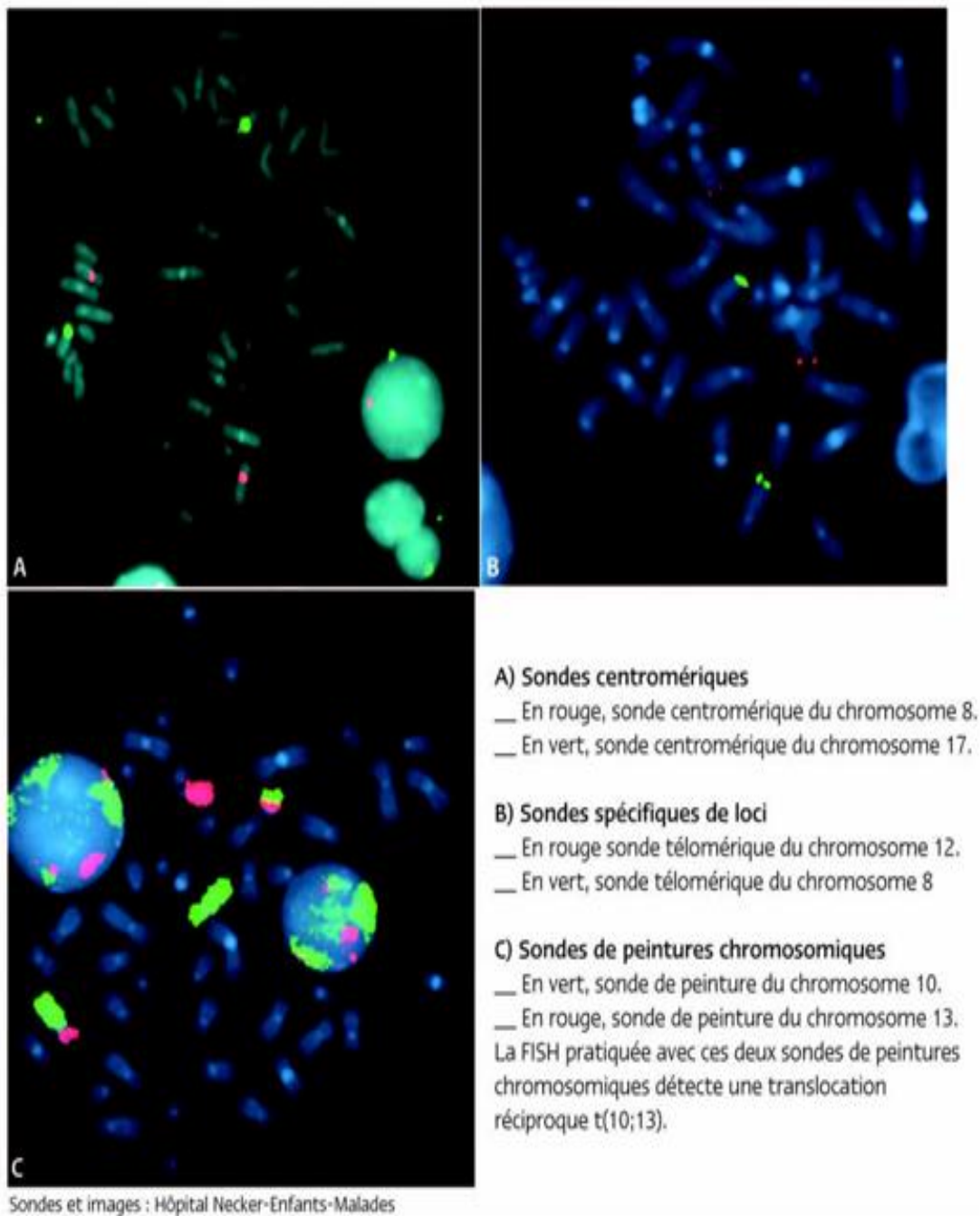


Figure 17 : les sondes utilisées par FISH (Romana et Malan, 2010).

C. Les applications cliniques : FISH sur noyaux interphasiques :

La FISH interphasique est une approche qui s'est rapidement imposée car elle permet de surmonter le problème de la culture cellulaire, avec des résultats concluants après 24 h, ainsi les signaux d'hybridation émis par les sondes (de taille >150 kb) sont visibles sur les noyaux en interphase. Un plus grand nombre de cellules peuvent être ainsi étudiées (les noyaux sont 10 à 50 fois plus nombreux que les métaphases sur une préparation de cellules cultivées)

(Bouayed Abdelmoula, 2004 ; Keren et Sanlaville, 2008). Ses applications concernent la détection des anomalies chromosomiques associées à des pathologies constitutionnelles ou acquises, tel que le diagnostic rapide des principales aneuploïdies associées aux FCS.

En effet, FISH sur noyaux interphasiques de cellules non cultivées a montré sa robustesse dans l'analyse des échantillons de FCS. Cette approche permet une identification rapide des aneuploïdies communes (des chromosome 13 ; 18, 21, X et Y), en utilisant des quantités relativement faibles de cellules, évitant les inconvénients majeurs de la cytogénétique conventionnelle telles que l'échec de la culture cellulaire et la prolifération des cellules maternelles (Doria, et *al.*, 2010; Jobanputra , et *al.*, 2011). Le diagnostic précis des polyploïdes ou la fréquence de la lignée cellulaire anormale dans le cas d'un mosaïcisme de bas grade est possible seulement par cette méthode.

La limitation de cette technique ciblée est le fait que les anomalies chromosomique non incluses dans les ensembles des sondes passent inaperçus et les anomalies structurelles sont indétectable à moins d'utiliser des sondes spécifiques. Enfin cette technique nécessite une forte intensité de travail et peut rencontrer des problèmes techniques tels que la défaillance d'hybridation ou d'hybridation croisée des sondes de chromosomes différents sans oublier le fait qu'elle soit très couteuse (Nobuaki Ozawa ,2012).

II.2.2. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) :

A. Principe de la MLPA :

La MLPA est une technique de quantification génétique qui permet d'explorer simultanément 45 locus du génome afin de chercher des pertes ou des gains de matériel génomique en une réaction. Comme la FISH, il s'agit d'une méthode de détection ciblée mais qui possède l'avantage d'étudier un grand nombre de locus simultanément et l'avantage d'être appliqué uniquement sur une faible quantité d'ADN génomique.

Le principe général repose sur l'hybridation à une séquence cible spécifique de deux oligonucléotides (hemi-sondes) adjacents formant une sonde unique après ligation (**Fig. 14**).

Après une étape de dénaturation, le mélange contenant les couples d'oligonucléotides est ajouté et la réaction d'**hybridation** est réalisée sur la nuit. Il s'en suit une étape de **ligation** des sondes hybridées à l'ADN cible (seule les hémi-sondes préalablement hybridées à leur séquence complémentaire seront liées) puis à une **amplification** par PCR multiplex à l'aide

d'amorces universelles fluorescentes des produits de ligation. Les produits de PCR obtenus présentent une taille différente grâce au segment oligonucléotidique de taille variable, ce qui permet leur identification après séparation électrophorétique sur un séquenceur à capillaires.

Afin de quantifier les éventuelles variations observées, il est procédé à la normalisation des intensités des signaux des sondes amplifiées. Cette normalisation se fera à la fois par rapport à des sondes de référence (ou contrôles) incorporées dans le mélange réactionnel et servant « d'étalon interne » et par rapport aux échantillons d'ADN de même nature servant de contrôles négatifs. Ainsi, si les deux copies attendues de la région d'intérêt sont présentes, le ratio normalisé du signal de fluorescence généré par l'amplification de la sonde sera théoriquement égal à 1. En cas de délétion, le ratio normalisé se situe autour de 0,5 et de 0. Pour une duplication (trois copies), le ratio normalisé se situe autour de 1,5. Il y a une exception à cela pour les gènes situés sur les chromosomes sexuels chez les garçons. En cas de délétion, le ratio normalisé sera égal à 0 et à 2 pour une duplication. En pratique, les valeurs observées oscillent plus ou moins autour de la valeur théorique. Ainsi, il est admis comme ratios « normaux » des valeurs comprises entre 0,7 et 1,3. Ces valeurs seuils sont discutables en fonction du coefficient de variation (CV) des sondes utilisées dans le mélange et des possibles cas de mosaïcisme (Keren et Sanlaville, 2008 ; Coutton et *al.*, 2012).

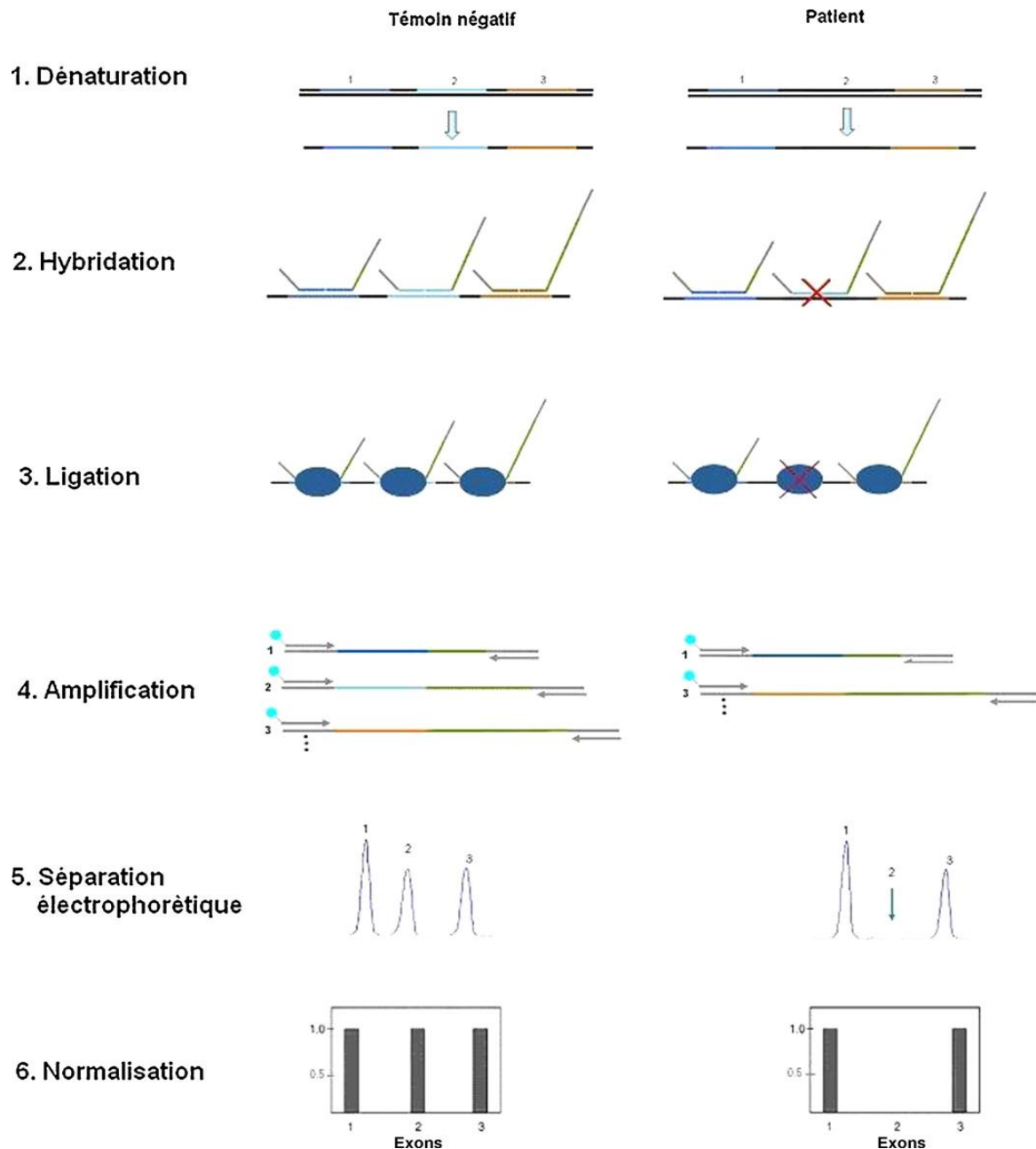


Figure 14 : Principe général de la réaction de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Après une étape de dénaturation de l'ADN (1), les couples d'oligonucléotides sont hybridés à leur séquence cible (2). En l'absence de cette séquence, les oligonucléotides ne peuvent s'hybrider. Seuls les oligonucléotides hybridés pourront être liés par la ligase (3). Ces produits de ligation seront ensuite amplifiés par PCR multiplex grâce aux amorces universelles (4). Les amplifiats seront ensuite séparés par migration électrophorétique (5) et enfin les signaux fluorescents des sondes seront normalisés afin de permettre la quantification de la séquence cible (6). La quantification est ici relative puisque la quantification génique de l'échantillon du patient est faite par rapport à celle d'un témoin négatif sain (Coutton et al., 2012).

B. MLPA et sondes « entièrement synthétiques » :

Chaque sonde MLPA est composée de deux oligonucléotides (Fig. 15) :

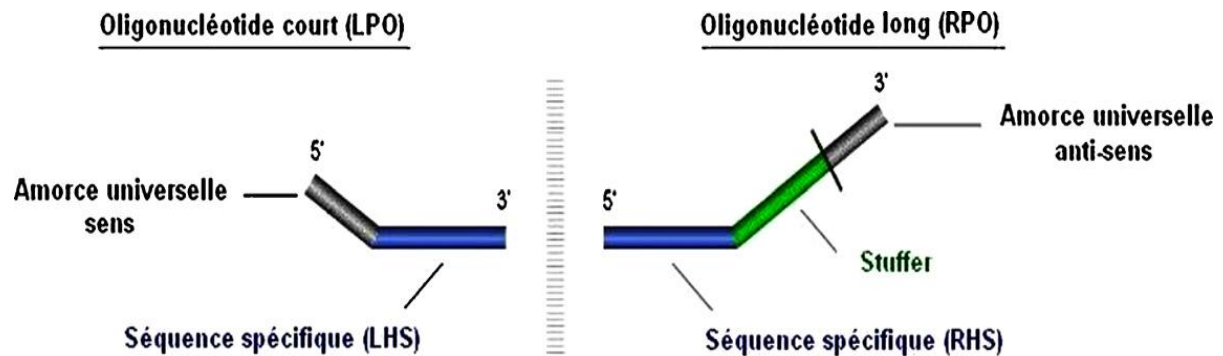


Figure 15 : Schéma et nomenclature conventionnelle d'une sonde Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). LPO : *left probe oligo* ; LHS : *left hybrising sequence* ; RPO : *right probe oligo* ; RHS : *right hybrising sequence* (Coutton et al., 2012).

- Un oligonucléotide synthétique court, ou *left probe oligo* (LPO) (50-60bp), composé d'une séquence spécifique de la cible (20-30 nucléotides) à son extrémité 3' ou *left hybrising sequence* (LHS) et une séquence commune correspondant à l'une des deux amorces universelles de PCR en position 5'.
- Un oligonucléotide long, ou *right probe oligo* (RPO) (60-450b), composé de trois séquences distinctes : une séquence spécifique de la cible à son extrémité 5' ou *right hybrising sequence* (RHS), une séquence commune complémentaire à l'une des amorces de PCR à son extrémité 3' et entre les deux précédentes une séquence non spécifique de taille variable appelée « stuffer », qui permet de différencier les amplifiats en fonction de leur taille (Ameziane et al., 2006 ; Coutton et al., 2012).

Les sondes MLPA utilisées dans les troussees commerciales sont obtenues par clonage dans différents vecteurs (ex: phage M13). Cette approche robuste s'avère cependant longue et difficile à mettre en place. Cela limite considérablement le développement des nouveaux kits et freine l'utilisation ciblée de la MLPA dans les laboratoires, restreintes aux seuls kits développés et commercialisés. Afin de palier à ce manque, il est possible désormais de concevoir des sondes MLPA de façon entièrement synthétiques. Cette stratégie des sondes synthétiques a permis d'étendre la MLPA à des applications choisies et propres à chaque laboratoire. Une des limites de cette stratégie est qu'elle reste complexe et difficile sans expérience. En effet, de très nombreux paramètres et caractéristiques physicochimiques

(température d'hybridation des oligonucléotides ou T_m , pourcentage de G et C de la séquence ciblée, enthalpie libre, présence de polymorphismes de type SNPs dans la séquence ciblée, taille de la PCR générée. . .) doivent être pris en compte pour la modélisation « à façon » des sondes MLPA (Coutton et *al.*, 2012).

C. Les applications cliniques :

Cette technique est dotée d'une excellente sensibilité avec sa grande capacité de multiplexage qui permet la quantification simultanée des plusieurs loci différents au sein d'une même expérience (jusqu'à 45) et cela même pour les mutations en mosaïque de faible pourcentage (20 %) et une spécificité élevée (utilisation de deux oligonucléotides adjacents comme sonde). La MLPA est moins sensible à la dégradation d'ADN car les séquences des sondes utilisées sont courtes (50- 60bp). Enfin, sa fine résolution (≈ 100 pb), sa rapidité (résultat dans 2 jours), son application facile en routine (ne nécessite aucune expertise particulière) et son coût relativement moindre par rapport à celui des autres techniques quantitatives ont permis à la MLPA de s'imposer comme une des techniques de choix pour la quantification des petits réarrangements génomiques sur tous types de tissus (Ameziane et *al.*, 2006, Coutton et *al.*, 2012).

Du fait que la quasi-totalité des anomalies cytogénétiques des fausse-couches impliquent des gains ou / et des pertes de nombre des copies subtélomériques, MLPA ciblée pour chaque région subtélomérique est jugée fiable pour l'analyse des FCS. (Carvalho. et *al.*, 2010; Nobuaki Ozawa ,2012). Avec la combinaison des 3 kits commerciaux (SALSA P036/P070 et P245) , il est possible d'explorer toutes les régions subtélomériques ainsi que 21 régions chromosomiques impliquées dans des retards mentaux syndromiques dans les produit de FCS, même en cas de macération des échantillons (problème assez fréquent dans les produits de FCS) la MLPA a prouvé sa fiabilité du fait que cette approche est moins sensible à la dégradation d'ADN.

Cependant, cette méthode montre des limitations dans l'identification des polyploïdies ou des anomalies structurales équilibrées dans l'analyse des FCS (Carvalho et *al.*, 2010 ; Nobuaki Ozawa ,2012). Les translocations déséquilibrées Robertsoniennes pourraient être diagnostiquées par erreur comme une unique aneuploïdie chromosomique. La détection de mosaïque serait également limitée en fonction de la proportion de la lignée cellulaire aneuploïde (Nobuaki Ozawa ,2012). La présence des faux positifs est un autre problème

associé à cette approche : comme la MLPA utilise deux sondes adjacentes, la présence d'une mutation au niveau de la séquence cible spécifique de la sonde peut interférer avec la fixation de la 2^{ème} sonde à sa cible ou interférer dans la phase de ligation. Ceci aboutit à la diminution des produits de ligation qui peut être interprétée par erreur comme une délétion. Par conséquent, le résultat peut être rendu positif par défaut (Ameziane et *al.*, 2006).

II.2.3. BAC on Beads « BoBs™ » :

Récemment la biologie moléculaire a connu l'essor d'une nouvelle technologie révolutionnaire dans l'analyse cytogénétique : BACs-on-Beads (BoBs™). C'est une technique comparable à l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) en suspension liquide et qui permet la détection des gains et pertes d'ADN dans des régions chromosomiques spécifiquement sélectionnées à partir d'une grande variété d'échantillons, incluant les aneuploïdies (Gross et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2012) .

A. Description de la technologie :

La technique Prenatal BoBs™ est basée sur la technologie xMAP. Son principe est basé sur l'utilisation des billes de polystyrène colorées selon un gradient de concentration de deux colorants luminescents.

Le gradient de concentration permet d'obtenir un code de couleur différenciant 100 types de billes différentes (Vialard et *al.*, 2011, Shaffer et *al.*, 2011) (**Fig. 9**).

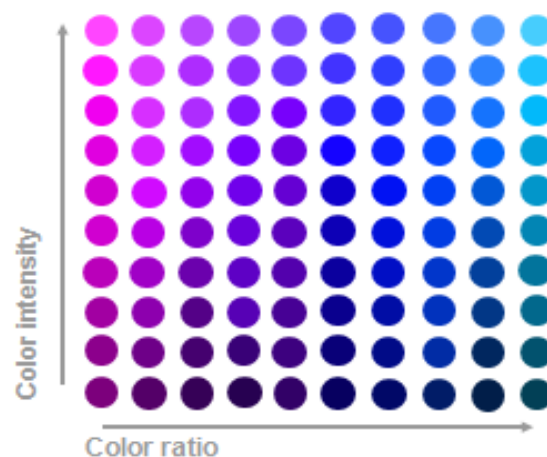


Figure 9: Gradient de concentration (PerkinElmer, 2012).

Chaque type de bille est couplé à une ou trois sondes d'ADN générées à partir des chromosomes bactériens artificiels (BACs) d'environ 150kb, servant de support pour la technique. Les échantillons et les références sont alors marqués et hybridés séparément sur les sondes BAC complémentaires et donc, sur des billes spécifiques (**Fig. 10**).

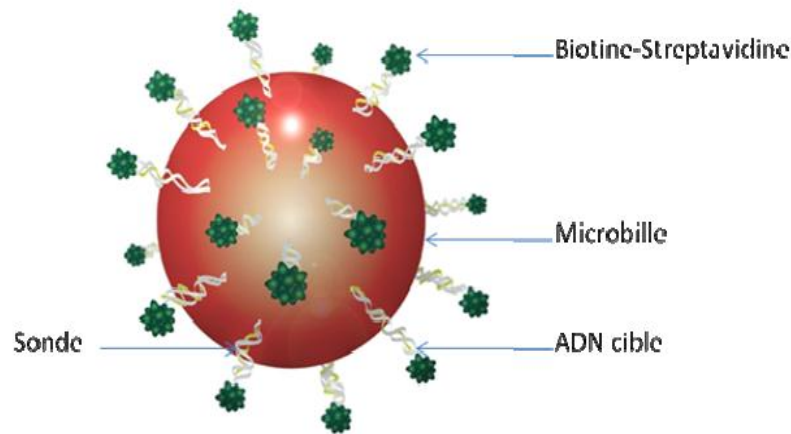


Figure 10 : Les Billes utilisés dans la technique BoBs (PerkinElmer, 2012).

Au final, chaque puits est lu sur un lecteur Luminex. Le lecteur peut-être assimilé à un cytomètre, dans le sens où une aiguille vient aspirer le contenu de chaque puit, et que les billes passent une par une devant les deux lasers du lecteur (**Fig. 11**). Un 1^{er} laser rouge permet d'exciter les deux colorants des billes (même longueur d'excitation, mais des longueurs des émissions différentes) afin de les identifier ; un 2nd laser vert permet de lire le signal émis par le marquage des ADN.

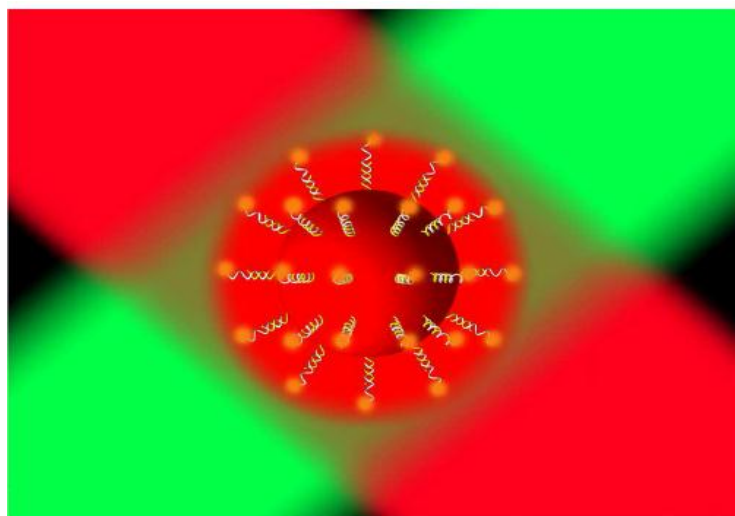


Figure 11 : La lecture de bille par les deux lasers ; le laser rouge identifie le signal de la bille et le laser vert identifie le signal de la phycoérythrine sur l'ADN (PerkinElmer, 2012).

B. Les kits disponibles :

Les kits BoBs™ sont des dosages qualitatifs utilisés pour la recherche de variations du nombre des copies au niveau des bras des chromosomes (KaryoLite BoBs) ou au niveau d'une unique sonde BAC (Prenatal BoBs).

➤ Karyolite BoBs :

Le KaryoLite BoBs™ est un caryotype moléculaire basé sur l'utilisation de billes et de sondes dérivées d'ADN des chromosomes bactériens artificiels (BACs) et couplées à des microsphères codées. Il contient 90 sondes d'ADN immobilisées sur des microsphères de polystyrène distinguable avec le système Luminex. Les sondes sont composées d'ADN dérivé de 3 différents BACs.

La trousse KaryoLite permet la recherche des changements chromosomiques ciblés sur l'ADN extrait. Elle fournit des informations à propos des variations du nombre des copies de l'ADN au niveau des bras chromosomiques. Les clones sont dirigés sur chaque bras chromosomique des chromosomes métacentriques et submétacentriques, et sur les bras q des chromosomes acrocentriques. Chaque bras inclut au moins deux sondes, une sur la partie subtélomérique du chromosome et l'autre sur la partie distale du chromosome. Chaque sonde, est composée d'ADN dérivé des trois BACs. Le produit n'est pas destiné à l'étude des réarrangements cryptique subtélomériques.

Les différentes applications de KaryoLite BoBs™ sont l'analyse de liquide amniotique, biopsie de villosité chorale, sang fœtal, les échantillons de Leucémie et finalement l'analyse des villosités chorales issues des produits des FCS afin d'identifier les aneuploïdies les 22 paires de chromosomes homologues (autosomique) et les chromosomes X et Y (Campos-Galindo et *al.*, 2012 ; Paxton et *al.*, 2013 ; Sheath et *al.*, 2013).

➤ Prenatal BoBs :

La technologie Prenatal BACs-on-Beads utilise le couplage de 83 sondes d'ADN générées à partir des BACs sélectionnés et amplifiés par PCR, sur les billes Luminex codées par fluorescence. Cinq sondes BACs-on-Beads indépendantes sont incluses pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y, et 4 à 8 sondes sont incluses pour chaque région microdélétionnelle.

La trousse Prenatal BoBs™ est un dosage multiplexe à billes conçu pour détecter les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, ainsi que les gains et pertes dans les

régions de 9 syndromes microdélétionnels les plus fréquente et qui sont associés avec des significations clinique bien reconnue (associés à des troubles génétiques du fœtus et la mort fœtal *in utero*) et qui ne sont pas détectables par caryotype classique.

Les syndromes microdélétionnels inclus dans le kit “Prenatal BoBs™” sont : le syndrome de DiGeorge I et II, le syndrome de Williams-Beuren, le syndrome de Prader-Willi, le syndrome d’Angelman, le syndrome de Smith-Magenis, le syndrome de Wolf-Hirschhorn, le syndrome du cri du chat, le syndrome de Langer-Giedion et le syndrome de Miller-Dieker.

La technique Prenatal BoBs™ est destinée à l’analyse du liquide amniotique, biopsie de villosité chorale, sang fœtal et les produits de fausse-couche. Prenatal BoBs™ est certifié, à usage diagnostic *in vitro*. Par contre KaryoLite BoBs™ est conçue pour un usage à des fins de recherche uniquement (Vialard et *al.*, 2011 ; Shaffer et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2012).

C. Principe du dosage :

L’analyse par BoBs™ se déroule en plusieurs étapes que la **Figure 12** illustre.

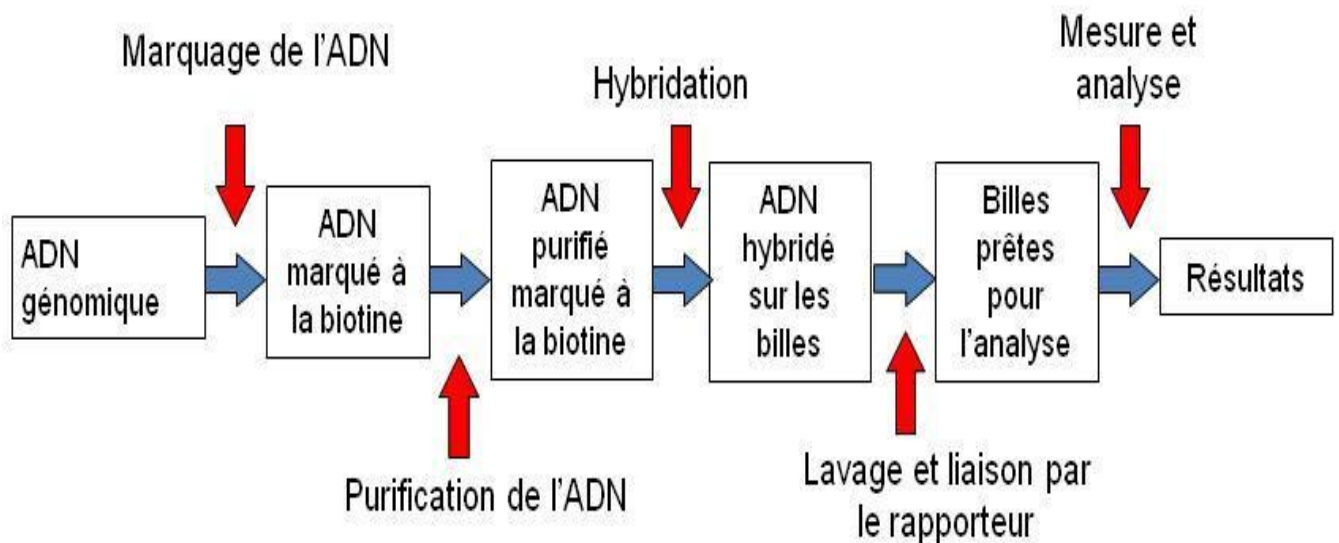


Figure 12 : Les principales étapes du dosage prénatal BoBs (PerkinElmer, 2012).

Etape 1 : Marquage des ADN à la Biotine.

Les ADN (références et échantillons) sont tous marqués simultanément par une incorporation enzymatique des nucléotides biotinylés en utilisant la solution Random Primer, Biotin-dNTP Mix et Polymerase.

Etape 2 : Purification des ADN marqués

L'ADN marqué est purifié en utilisant un kit de purification, puis la concentration de l'ADN purifié est mesurée.

Etape 3 : Hybridation des ADN marqués et purifiés avec les billes

L'ADN marqué et purifié est hybridé avec le BoBs™ Mix pendant un minimum de 16h.

Etape 4 : Lavage des ADN et révélation du signal

Les billes hybridées sont lavées puis transférées sur une plaque filtrante.

Etape 5 : Lecture des puits avec le lecteur Luminex et analyse des résultats avec le logiciel BoBSoft.

L'intensité moyenne de la fluorescence de l'ADN de l'échantillon hybridé sur une sonde BAC spécifique est comparée à l'intensité moyenne de la fluorescence de l'ADN de référence en liaison avec cette même sonde BAC spécifique. Les rapports échantillon / référence mâle et échantillon / référence femelle sont calculés pour chaque sonde BAC.

Un échantillon est défini comme normal « disomique » lorsque le rapport entre les intensités de fluorescence est d'environ 1,0 pour tous les loci analysés. Un échantillon est défini comme « dupliqué / délétion dans un locus du chromosome lorsque la fluorescence dans l'essai est supérieure ou inférieure à celle de la référence. Les gains et les pertes à copie unique génèrent des ratios de 1,3 à 1,4 et 0,6 à 0,8, respectivement, comme initialement rapporté (**Fig. 13**).

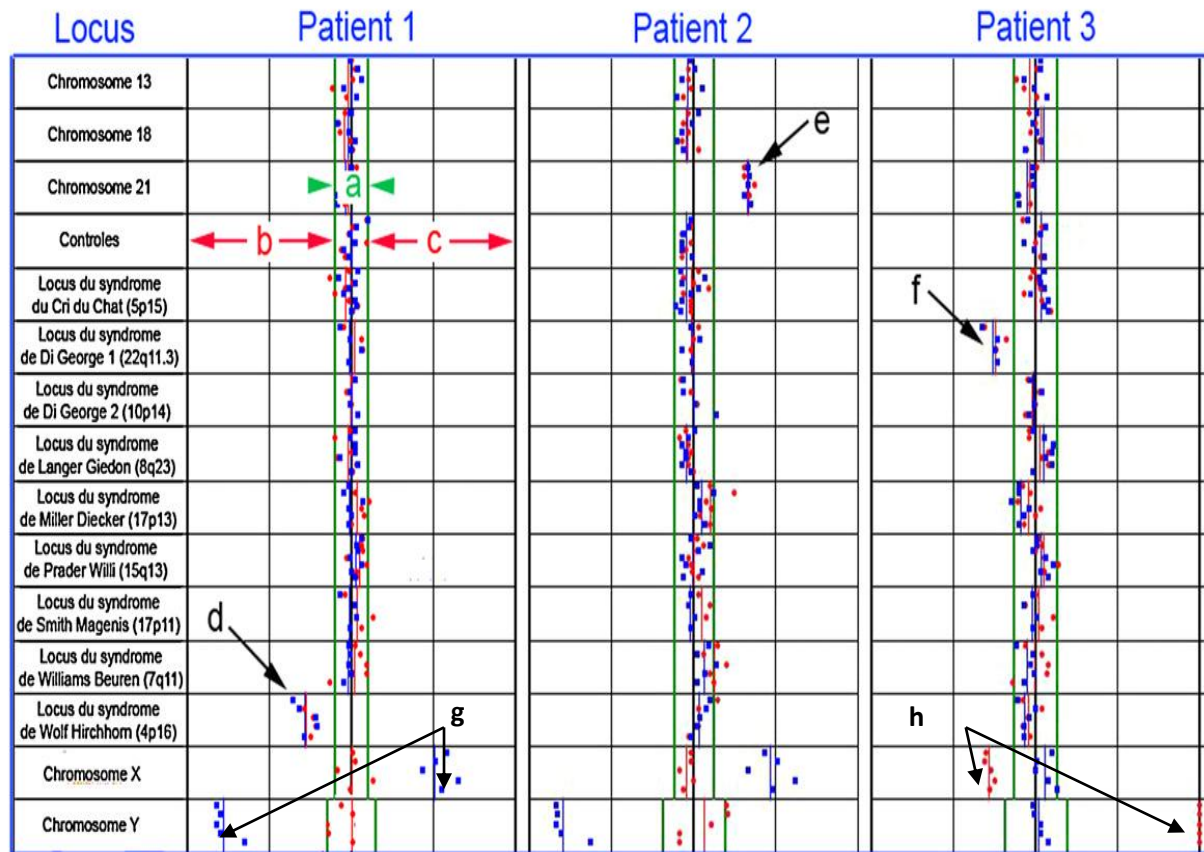


Figure 13 : Résultat avec la technologie BACs on Beads. **a** : zone de normalité .**b** : zone de délétion. **c** : zone de duplication. **d** : Patient 1 : délétion au locus du syndrome de Wolf Hirschhorn. **e** : Patient 2 : trisomie 21. **f** : Patient 3 : délétion au locus du syndrome de Di George I. **g** : duplication du chromosome X et délétion du chromosome Y par rapport au contrôle masculin (bleu). **h** : amplification du chromosome Y et délétion du chromosome X par rapport au contrôle féminin (rouge) (Vailard et Molina Gomes, 2010).

D. Les applications cliniques :

Cette technique permet de tester simultanément de multiples anomalies chromosomiques à partir de quantités infimes d'échantillon d'ADN (50- 240 ng), avec un rendu des résultats en 24 à 48 heures, et ceci pour un maximum de 44 échantillons à la fois. Elle s'est montrée notamment utile dans l'analyse cytogénétique des produits de fausse-couche (Vailard et *al.*, 2011 ; Campos-Galindo et *al.*, 2012 ; Paxton et *al.*, 2013). En effet, cette approche a diminué le taux d'échecs de 20% à environ 3% et a augmenté le nombre d'anomalies détectables (Vialard et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2012), même en utilisant le produit de la conception avec un ADN dégradé (Sheath et *al.*, 2013). BoB's peut identifier les mosaïques avec un taux de 20 à 40% (Vialard et *al.*, 2011). Aussi la contamination maternelle MCC devient apparente à un niveau de 20 à 30 % de cellules femelles normales (Shaffer et *al.*, 2011) .

Cependant comme toute technique ciblée, la technique des BoBs a une certaine limitation dans la détection des polyploïdies (triploïdies et tétraploïdies) et dans l'identification des translocations ou inversions équilibrés (Gross et *al.*, 2011).

Cette technologie prometteuse peut être particulièrement utile dans les régions du monde où le personnel et les laboratoires cytogénétiques sont limités. Elle représente une alternative rapide, sensible, robuste et économique pour le dépistage de routine des anomalies chromosomiques en surmontant les limites des techniques de la cytogénétique moléculaire actuelle et caryotype conventionnel (Gross et *al.*, 2011 ; Vailard et *al.*, 2011).

III. Investigation cytogénétique des FCS : quel intérêt ?

L'analyse de caryotype du fœtus avorté est une procédure importante afin de mieux comprendre les causes possibles des pertes fœtales, et d'assurer une meilleure prise en charge des patientes. Cependant, l'identification de la cause de fausse-couche est généralement très réconfortante pour les patientes souffrant de FCS ou FCSR, car les FCS sont associées à la culpabilisation, l'anxiété et la dépression chez la patiente (Nikcevic, et *al.*, 1999 ; Nobuaki Ozawa, 2012).

L'analyse cytogénétique des fœtus avortés est fortement recommandée pour un meilleur pronostic et diagnostic pour une meilleure estimation du risque de récurrence pour une future grossesse, car ils peuvent détecter des remaniements chromosomiques non équilibrés associés à l'âge maternel avancé ou la présence des réarrangements structuraux équilibrés et hérités (Solveig et Pflueger, 2005).

Cependant, à partir de la deuxième FCS, un caryotype parental doit être réalisé (6 % sont dus à des remaniements parentaux hérités), conduisant à un conseil génétique permettant d'expliquer au couple le risque de récurrence et de proposer des moyens de dépistage lors d'une prochaine grossesse: diagnostic pré-implantatoire, prénatal, mesure de la clarté nucale, marqueurs sériques, échographie morphologique...(Merveil, 2005).

Lorsqu'un caryotype anormal est la cause de fausse couche chez les patients avec FCSR, il est possible d'éviter les essais ou traitements inutiles pour FCSR, et les résultats de caryotype anormal auraient un meilleur pronostic pour les futures grossesses, bien qu'il puisse y avoir un risque accru de récurrence pour une autre grossesse de trisomie dans les cas de mosaïcisme gonadique ou tendance génétique à la non-disjonction. D'autre part, l'enquête et le

changement des traitements actuels deviendraient un outil nécessaire en cas de fausse couche avec caryotype normal chez les patients souffrant de FCSR. Lorsqu'une anomalie structurelle déséquilibrée est détectée lors d'une fausse couche, la réalisation du caryotype parental afin de vérifier si l'un d'eux est porteur, semble importante pour offrir des informations précises sur la possibilité d'avoir une autre fausse-couche ou une conception anormale. Ainsi, l'enquête cytogénétique des produits de fausse-couche est cruciale pour la prise en charge des patientes subissant des FCSR et fournit des informations précieuses pour les futures grossesses (Stephenson et *al.*, 2002 ; Eshre , 2008; Nobuaki Ozawa ,2012) .

Partie Expérimentale :
Matériel et méthodes

I. Matériels et méthodes :

I.1. Les échantillons :

Notre étude est basée sur l'analyse cytogénétique de produits de FCS collectés au niveau des maternités du CHU Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbès (Algérie) et du CHU Estaing de Clermont-Ferrand (France), sur la période allant de janvier 2011 à décembre 2014. Cette étude a inclu 240 patientes ayant subi une FCS, et dont les âges variaient de 19 à 43 ans. Les âges de gestation au moment des prélèvements variaient de la 5^{ème} à la 41^{ème} semaine d'aménorrhée (SA). Les patientes ont toutes été soumises à un questionnaire (**Annexe 1**). Notre travail a été mené au Laboratoire de Biotoxicologie de l'Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès et le Service de Cytogénétique Médicale du CHU Estaing de Clermont-Ferrand.

Notre travail est basé sur la description et l'évaluation de la performance d'une nouvelle technique dite « rapide » de biologie moléculaire : BACs-on-Beads « Prenatal BoBs™ », dans des conditions cliniques de routine, et ce par rapport à d'autres techniques existantes sur le plan pratique actuel, notamment la Fluorescence In Situ par Hybridation FISH « sur noyaux interphasique » ; la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification « MLPA » et le caryotype conventionnel. Le but de cette étude est de déterminer la fiabilité et la robustesse de Prenatal BoBs™ dans la pratique clinique actuelle, et plus particulièrement dans l'analyse cytogénétiques des produits de FCS afin d'identifier les anomalies chromosomiques qui peuvent être à l'origine des pertes fœtales.

Pour les BACs-on-Beads, nous avons utilisé le kit Prenatal BoBs™ pour exploiter l'ADN extrait des villosités choriales afin de détecter les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, ainsi que les gains et pertes dans les régions de 9 syndromes microdélétionnels fréquents habituellement associés à des troubles génétiques du fœtus et responsables de mort fœtale *in utero*. Nous avons ensuite entrepris une étude comparative avec des résultats du caryotype conventionnel (Caryotype en Bandes G) réalisés sur la même cohorte d'échantillons analysés par Prenatal BoBs™ afin d'évaluer la performance de cette nouvelle technique.

Pour la FISH Interphasique, nous avons utilisé le kit « AneuCyte™ ». Il s'agit d'une analyse directe sur des noyaux interphasiques obtenus à partir de prélèvements de villosités choriales, dans le but d'identifier les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y.

Pour la MLPA, nous avons utilisé les kits SALSA P036 et P070, incluant tous les deux des sondes subtélomériques pour les extrémités de chaque paire chromosomique. L'intérêt de l'utilisation combinée de ces deux kits est de prendre en compte le polymorphisme de ces régions subtélomériques et de confirmer les résultats en cas de perte ou de gain du matériel génétique. Un troisième kit - SALSA P245- a été utilisé pour détecter 21 syndromes à l'origine de mort fœtale *in utero* et de retards mentaux.

I.2. La préparation tissulaire :

Le prélèvement arrive dans son milieu de transport (10 ml RPMI 1640 ; 0,5 ml SVF ; 0,1 ml L-Glutamine ; 3 à 4 gouttes de streptomycine). Les opérations suivantes se déroulent dans ce milieu.

- Mettre la biopsie dans une boîte de pétri stérile et recouvrir de milieu
- Rincer avec le milieu lorsque le prélèvement est sanglant
- Vérifier la pureté de la biopsie par observation à la loupe binoculaire, et bien repérer les villosités chorales
- Toujours sous la loupe, éliminer à l'aiguille les parties non fœtales, petits caillots et autres
- Fragmenter les villosités à l'aide de deux aiguilles en fragments de quelques mm et séparer quelques villosités pour l'analyse cytogénétique par BoB's, FISH ou MLPA (**Annexe 2**).

I.3. BACs-on-Beads™ « Prenatal BoBs™ »:

1.3.1. L'extraction d'ADN :

La purification de l'ADN génomique est effectuée avec le kit QIAamp DNA Mini kit pour la purification de 50 kb d'ADN génomique (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden, Allemagne. (www.qiagen.com) et se déroule de la manière suivante (**Annexe 3**) :

- Dans un tube de 1,5 ml au nom de patiente et contenant les villosités chorales (25 mg).
- Ajouter 180 µl de Buffer ATL et 20 µl de Protéinase K, vortexer et incuber à 56°C pendant 1 heure dans un bain de marie sec.
- Retirer les tubes et ajouter 200 µl de Buffer AL, vortexer rapidement puis incuber à 70°C pendant 10 min dans un bain de marie sec.

- Ajouter dans chaque tube 200 µl d'éthanol pur (100%), vortexer/15 sec, centrifuger brièvement.
- Transférer le mélange à l'aide d'une micropipette dans les colonnes de purification et centrifuger 1 min à 8000 rpm et on jet l'éluât.
- Ajouter 500 µl de Buffer AW₁ et centrifuger 1 min à 8000 rpm et on jet l'éluât.
- Ajouter 500 µl d'AW₂ et centrifuger 3 min à 14000 rpm.
- Jeter l'éluât et placer la colonne dans un tube collecteur propre
- centrifuger 1min à 14000 rpm.
- placer la colonne dans un Eppendorf de 1,5 ml propre étiqueté et délicatement mettre 100 µl de tampon AE. Attendre 2 min et centrifuger 1 min à 8000 rpm.
- On récupère l'éluât présent dans l'eppendorf qui contient notre ADN purifié.
- Prendre la concentration et les DO au Nanodrop 2000C (*Thermo Scientific*) couplé à un ordinateur et à un logiciel d'analyse (**Annexe 4**).

Pour la technique Prenatal BoBs™, le dosage doit être validé avec 50-240 ng d'ADN comme quantité de départ. En raison de la réduction du bruit de fond, il est recommandé d'utiliser des quantités de départ plus élevées (>100 ng)

1.3.2. Les kits utilisés:

La trousse Prenatal BoBs™ (Perkin Elmer, Turku, Finland, CE-marked IVD product) est un dosage multiplexe à billes, conçue pour détecter les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, ainsi que les gains et pertes dans les régions de 9 syndromes microdélétionnels communs et qui sont habituellement associés à des troubles génétiques du fœtus et la mort *in utero*:

- **4p16.3** : région du syndrome de Wolf-Hirschhorn
- **5p15.3-p15.2** : région du syndrome du Cri du Chat
- **7q11.2** : région du syndrome de Williams-Beuren
- **8q23-q24** : région du syndrome de Langer-Giedion
- **15q11-q12** : région du syndrome de Prader-Willi / Angelman

- **17p13.3** : région du syndrome de Miller-Dieker
- **17p11.2** : région du syndrome de Smith-Magenis
- **22q11.2 et 10p14** : régions du syndrome de DiGeorge

L'analyse est basée sur la technologie BACs-on-Beads qui utilise l'immobilisation des sondes d'ADN générées à partir de chromosomes bactériens artificiels (BACs) sélectionnés et amplifiés par PCR, sur les billes Luminex® codées par fluorescence. Cinq sondes BACs-on-Beads indépendantes sont incluses pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y et 4 à 8 sondes sont incluses pour chaque région microdélétionnelle ; le contenu de la trousse est suffisant pour 96 réactions. *Annexe 5: contient une description plus détaillée des kits.*

Les neuf régions de syndromes microdélétionnels ont été sélectionnées selon les critères suivants: syndromes avec une prévalence relativement élevée parmi les anomalies chromosomiques; syndromes dont la délétion est le principal mécanisme qui provoque la pathologie; syndromes avec des microdélétions qui ne sont pas détectables, ou peuvent passer inaperçues en utilisant le caryotype conventionnel; syndromes avec des phénotypes bien décrits et une signification clinique connue. Les altérations ayant une signification clinique inconnue sont exclues.

1.3.3 Protocole de Prenatal BoBs™:

JOUR 1

➤ Marquage de l'ADN génomique :

- Identifier les barrettes tubes et marquer 2 échantillons références femelles, 2 mâles, et chaque échantillon à analyser. Utiliser 50 ng de chaque ADN de référence.
- Préparer pour chaque échantillon 240 ng (50 ng minimum) d'ADN. Pour chaque référence et échantillon, ajoutez du *Sample Diluent* afin d'atteindre un volume de 24 µL dans tous les tubes.
- Ajoutez 20 µL de la solution *Random Primer* dans chaque puits:
- Placer les barrettes tubes dans un thermocycleur PCR. Dénaturer à +98 °C pendant 5 minutes, puis refroidissez à +37 °C. Passez à l'étape suivante dès que la machine PCR a atteint +37 °C.

- Pendant la dénaturation, préparer le Mix de Marquage (5,5 μ L Biotin-dNTP Mix + 1,1 Polymerase):
- Ajouter 6 μ L du Mix de Marquage à chaque tube (volume total = 50 μ L).
- Sceller les tubes et incuber 60-90 min à 37°C dans le Thermocycler.

➤ **Purification de l'ADN marqué**

- La réalisation de la purification de l'ADN marqué avec la trousse de purification PureLink PCR Purification Kit :
- Transférer les 50 μ L dans la plaque de purification
- Régler le système de vide à une aspiration de 190 mm Hg et laisser jusqu'à aspiration de tout les puits (environ 10 minutes).
- Ajouter 50 μ L de TE 1X ou H₂O.
- Laisser sur le système de vide jusqu'à aspiration de tout les puits (environ 10 minutes).
- Sécher le dessous de la plaque et ajouter 25 μ L de TE 1X ou H₂O.
- Mettre 5 minutes à agiter dans le TriNEST à TA et 800 rpm.
- Mesurer la concentration d'ADN à l'aide de Nanodrop.

➤ **Hybridation de l'ADN**

- Régler le TriNest à 52°C pour le préchauffage
- Dans un tube 1,5ml, préparer le Mélange de Billes en utilisant 11 μ L d'Hybridization Buffer et 1 μ L de BACs-on-Beads Multiplex Bead Mix.
- Créer un schéma de plaque pour les hybridations afin de noter la correspondance de chaque échantillon avec le puits de plaque. Vous trouverez ci-dessous un exemple de plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(F)	(S5)										
B	(F)	(S6)										
C	(M)	(S7)										
D	(M)	(S8)										
E	(S1)											
F	(S2)											
G	(S3)											
H	(S4)											

F = Référence femelle, M = Référence mâle, S = Échantillon

- Transférer 5 μ L de chaque échantillon (dilué ou non) dans une plaque PCR, et ajouter 11 μ L du KaryoLite Hyb Mix.

- Sceller la plaque avec un papier d'aluminium collant pour microplaque.
- Mettre la plaque à agiter 5 min à 52°C à 800 rpm.
- Incuber la plaque 5 min à 85°C pour la dénaturation, puis faire descendre à 52°C avec le Thermocycler.
- Incuber la plaque dans le TriNest à 52°C et 800 rpm sur la nuit (16-20 heures).

JOUR 2

➤ Lavages post-hybridation :

- Mettre à chauffer le 2nd Trineest à 37°C, allumer le Luminex 200 pour faire chauffer les lasers (30 min).
- Retirer la plaque du Trineest et réduire la température à 50°C.
- Retirer le papier aluminium et ajouter 100 Kl de Wash 1 dans chaque puit.
- Incuber 20 min à 50°C et 1200 rpm dans le Trineest.
- Préparer la solution du mélange de rapporteur (0,45 µL de Reporter Concentrate + 112.5 µL Diluant Rapporteur) et couvrir le tube immédiatement avec du papier aluminium pour le protéger du photoblanchiment.
- Dans une microplaque filtrante 0,45µm, ajouter 30µl de Wash 2 pour humidifier la membrane dans les puits correspondants à l'emplacement des échantillons.
- Retirer la plaque du Trineest et transférer chaque puits dans la plaque filtrante (125µl).
- Utiliser le vacuum pour aspirer le liquide des puits.
- Ajouter 100µl de Wash 2 dans chaque puits et utiliser le vacuum pour aspirer le liquide des puits.
- Ajouter de nouveau 100µl de Wash 2 dans chaque puits, et utiliser le vacuum pour aspirer le liquide des puits puis sécher le dessous de la plaque avec du papier absorbant.
- Ajouter 100µl de solution du mélange de rapporteur dans chaque puits.
- Incuber la plaque dans le 2nd Trineest 30 min à 37°C à 1200 rpm.
- Retirer la plaque du Trineest et aspirer le liquide des puits sur le vacuum.
- Ajouter 100µl de Wash 2 dans chaque puits, et utiliser le vacuum pour aspirer le liquide des puits et sécher le dessous de la plaque avec du papier absorbant.
- Ajouter 100 µl de Wash 2 dans chaque puits.
- Charger la plaque dans le lecteur Lumine^{x®} 100/200TM et lancer la lecture en utilisant le protocole approprié du logiciel xPONENT3.1.

➤ Calcul des résultats

Les résultats sont visualisés et analysés avec le logiciel BoBSoft™ ; ce logiciel extrait le fichier de résultats de l'appareil Luminex® 100/200™, effectue les calculs et génère le CQ (contrôle qualité) du dosage et les données échantillons, numériquement et graphiquement.

➤ Valeurs attendues et interprétation des résultats :

Les résultats décrits ici ont été obtenus en utilisant des valeurs seuils basées sur un ratio afin de déterminer si un changement du nombre de copie d'ADN s'est produit. Si trois sondes ou plus dans une zone cible donnée ont dépassé la valeur seuil, on parle de gain ou de perte d'une zone. Le rapport de valeur seuil a été déterminé à $\pm 2x$ un écart type (SD) corrigé des sondes autosomiques. Le SD corrigé est défini comme le SD des sondes autosomiques présentant des ratios compris dans la fourchette $\pm 2x$ les SD des ratios autosomiques.

Les critères d'inclusion utilisés pour les échantillons de lignées cellulaires lors des tests de vérification étaient un ratio $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$. Les critères d'acceptation utilisés lors des évaluations de vérification des performances pour tous les tests sont décrits dans le tableau ci-dessous. Les tests ne répondant pas aux critères ont été considérés comme « échoués ».

Paramètre	Critères de qualité
Moyenne de référence de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI)	≥ 180
CV autosomique de référence	$\leq 6.0\%$
Séparation X totale de référence	≥ 0.6
CV autosomique de l'échantillon	$\leq 9\%$

Réactifs et matériel pour Prenatal BoBs : voir Annexe 6

➤ Etude comparative :

En parallèle, nous avons mené une étude comparative sur les résultats du caryotype conventionnel (**Annexe 7** : Protocol du Caryotype utilisé) réalisés sur la même cohorte des échantillons analysés par Prenatal BoB's afin d'évaluer la performance de cette nouvelle technique de la biologie moléculaire.

I.4. La MLPA :

I.4.1. L'extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN est réalisée avec le kit QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden, Allemagne) et se déroule de la même manière précédemment illustré.

I.4.2. Les kits utilisés (les sondes):

Grace à la technique MLPA nous avons pu explorer 45 locus du génome de l'ADN fœtal déjà extrait en une réaction, en utilisant 3 kits SALSA® MLPA® probemixes (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands, (www.mlpa.com):

➤ **SALSA® MLPA® probemix P036 Human telomere-3** et **SALSA® MLPA® probemix P070 Human telomere-5** utilisé pour un large dépistage des délétions / duplications de tous les télomères. Les deux kits contiennent une sonde pour chaque région subtélomérique et il est impératif de les utiliser simultanément pour une confirmation indépendante des résultats (présence de polymorphisme).

➤ Le troisième kit est le **SALSA® MLPA® probemix P245 Microdeletion syndromes-1**, qui contient des sondes pour 21 syndromes différents de microdélétions causant la mort fœtale *in utero* et des retards mentaux, y compris:

<i>Syndrome de délétion 1p36</i>	Syndrome de Miller-Dieker, 17p
La microdélétion 2p16	Syndromede microdélétionNF1
La microdélétion 3q29	Prader-Willi/Angelman
La microdélétion 9q22.3	MEPC2/Xq28duplication
Syndrome de délétion15q24	Syndrome de Rubinstein-Taybi
La microdélétion 17q21	Le syndrome de Smith-Magenis
22q13/Phelan-Mcdermid	Syndrome de Sotos5q35.3
Syndrome de cri du chat, 5p15	Syndrome de WAGR
Syndrome de Di George22q11	Syndrome de Williams
Région2de Di George, 10p15	Wolf-Hirschhorn 4p16.3
Syndromede Langer-Giedion, 8q	

Annexe 8: contient une description plus détaillé des kits

I.4.3. Protocole de la MLPA:

La procédure MLPA a été réalisée en suivant le protocole du fabricant (**Annexe 9**) :

JOUR 1**➤ Quantité et Dilution des ADN :**

La technique préconise d'utiliser entre 20 et 200 ng d'ADN fœtal. Les ADN doivent être dilués à 100 ng. μL^{-1} dans un volume final de 20 μL . Toutes les dilutions doivent être étiquetées avec nom, prénom, concentration

➤ Préparation des mix d'Hybridation, de Ligation et de PCR : (Annexe 10)**➤ Dénaturation et hybridation :**

- Sur chaque barette de tubes, inscrire le n° de colonne et distribuer 5 μL d'ADN.
- Placer les barettes de tubes dans le Thermocycler et n° de la manipulation.
- Boucher avec barette de bouchons
- Placer les barettes de tubes dans le Thermocycler et lancer le *programme HYB1* pour dénaturer les ADN.

Programme HYB 1 :

<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>
98	5 min	1
25	Pause	∞

- Ajouter 4 μL /tube du mix d'hybridation en respectant le plan de plaque
- Reboucher bien et Centrifuger
- Replacer les barettes de tubes dans le Thermocycler et lancer le *programme d'hybridation HYB2*.

Programme HYB 2 :

<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>	<i>Goto</i>	<i>Loops</i>
95	1 min	1		
60	60 min	16	2	15
54	Pause	∞		

JOUR 2

➤ **La Ligation :**

- Au thermocycleur, déboucher les tubes à traiter et distribuer 32 µl de mix LIG et mélanger par aspiration/refoulement à la pipette
- Vortexer les barettes de tubes et centrifuger
- Au thermocycleur, stopper le programme en cours et lancer le *programme de ligation LIG*.

Programme LIG =

<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>
54	15 min	1
98	5 min	1
4	Pause	∞

➤ **La PCR :**

- Sur des nouvelles barettes de tubes, inscrire le n° de colonne (1^{er} tube indiquant le haut de la série) et n° de la manip + PCR
- Placer les barettes sur un portoir microtubes réfrigéré.
- Distribuer colonne par colonne, 18 µl de produit de Ligation (2x9 µl aux multicanaux)
- Distribuer 5 µl de mix PCR et boucher les barettes de tubes PCR
- Au Thermocycleur, lancer le *programme PCR*.

Programme PCR :

<i>Température en °C</i>	<i>Temps</i>	<i>Cycles</i>	<i>Goto</i>	<i>Loops</i>
60	7 min	1		
94	30 sec	35		
60	30 sec			
72	30 sec		2	34
72	20 min	1		
15	Pause	∞		

➤ **Migration et quantification par électrophorèse capillaire :**

- Prendre les plaques 96 puits spéciales séquenceur (plaque tampon et plaque échantillon)
- Sortir le tampon de séparation, l'huile et le mélange SLS+600 nt du frigo (décongeler tube si nécessaire).

NB : Le mix SLS + 600nt est préparé à l'avance (6mL de SLS + 55µL de 600nt), aliquoté en 1mL dans tube de 1.5 mL.

- Vortexer le tube de SLS +600nt
- Distribuer 30µL de SLS+600nt dans la plaque ECHANTILLON pour séquenceur
- Avec la pipette multicanaux, répartir 1µl de produit PCR.
- Déposer une goutte d'huile dans chaque puits et centrifuger la plaque
- Dans la plaque TAMPON, répartir du tampon de séparation au $\frac{3}{4}$ de chaque puits.
- Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse grâce à un séquenceur automatique à capillaires (Beckmann Coulter GenomeLab™ GeXP), et le programme d'analyse de fragments était lancé. L'histogramme obtenu était un ensemble de pics reflétant chacun le profil d'intensité de fluorescence du segment hybridé. Chaque pic correspondait à un amplicon. La hauteur du pic et l'aire sous la courbe étaient proportionnelles à la quantité de matériel génomique initialement présent.

➤ **Analyse des résultats :**

La taille de chaque produit de PCR est déterminée par le logiciel GenomeLab (Beckmann-Coulter) qui permet de donner l'intensité de la fluorescence, ou hauteur des pics, de ces produits.

Les intensités de fluorescence sont par la suite exportées dans un tableur Excel qui va permettre de réaliser l'analyse des résultats. Les données sont normalisées en divisant l'intensité de fluorescence de chaque produit de PCR par la somme des intensités de fluorescence de l'ensemble des sondes. Puis, les rapports sont calculés en divisant les valeurs normalisées obtenus chez un patient par celles obtenues chez un individu contrôle. Ce kit contenant des sondes spécifique des régions non pseudo-autosomique, des chromosomes sexuels, nous devons tenir compte du sexe du patient dans l'analyse. Ainsi, pour le calcul des

rapports, les valeurs normalisées d'un patient sont rapportées uniquement sur les valeurs normalisées d'un individu contrôle de même sexe. Ce calcul est en réalité effectué en divisant les valeurs normalisées de chacun des produits de PCR d'un patient sur la moyenne des valeurs normalisées obtenue pour un certain nombre d'individus contrôle négatifs de même sexe.

Ces moyennes sont présentées sous forme d'histogrammes représentant de manière arbitraire la quantité relative de chaque chromosome dans l'échantillon. L'anomalie chromosomique était généralement visible sans calcul à partir de l'électrophorégramme et de l'histogramme.

➤ **Interprétation des résultats :**

Les échantillons sont normalisés grâce à des échantillons contrôles (ADN de sujets sains) afin d'obtenir le nombre de copie relatif (RCN) de matériel génomique, la détermination d'une perte ou d'un gain, repose sur l'obtention de 3 valeurs remarquables pour ces rapports :

- RCN = 1 indique un nombre de copie normal du locus étudié
- Un ratio $\leq 0,5$ sur 2 sondes consécutives indique une délétion hétérozygote
- Un ratio $\geq 1,5$ indique une duplication hétérozygote.
- Ce pendant en pratique, nous suspectons une microdélétion lorsque le rapport est inférieur à 0,7 et une microduplication s'il est supérieur à 1,3. Dans l'un de ces cas, une confirmation par FISH ou par une autre technique est nécessaire.

*Réactifs et consommable pour la MLPA : voir **Annexe 11***

I.5. La FISH Interphasique :

I.5.1. La préparation cytogénétique des échantillons :

➤ **Choc hypotonique :** (au Citrate de sodium 0.8%)

- Ajouter les villosités dans le tube contenant 5ml de choc préchauffé
- Incuber 20 min à 37°C

➤ **Fixation :**

- Préfixation : ajouter quelques gouttes de fixateur (3 volumes de méthanol pour 1 volume d'acide acétique), agité délicatement
- Fixation : Enlever le surnageant à la pipette

- Ajouter 5 ml de fixateur dans chaque tube : mélanger avec précaution
- Laisser agir 15 min à +4°C
- Renouveler l'opération deux autres fois

➤ **Ejection et étalement**

- Fixateur d'éjection : (1 volume d'eau stérile pour 1 volume d'acide acétique)
 - Enlever le fixateur et déposer les fragments villositaires dans une cupule en verre.
 - Déposer 6 gouttes du fixateur d'éjection et dissocier les villosités à l'aide d'aiguilles, sous la loupe binoculaire pendant 5 min
- Etalement : - Préparer 3 ou 4 lames blanches avec le nom de la patiente, la date
 - Déposer 2 gouttes de suspension des villosités chorales par lame et les faire sécher dans une étuve à 37°C

I.5.2. Les kits utilisés (les sondes):

Pour la technique FISH sur noyaux interphasique, nous avons utilisé le kit AneuCyte™ fabriqué par la société Cytocell (Aquarius® Prenatal Enumeration Kits, Cat. No. LPA 001) , qui permet la détection des aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, les plus fréquemment retrouvés lors des FCS. La technique ne nécessite pas une culture cellulaire parce qu'elle s'applique directement sur des noyaux interphasiques .

Les kits d'AneuCyte™ contiennent deux ensembles des sondes pour deux hybridations distincts :

- L'ensemble de sondes CEP (centromériques) pour chromosome X, Y et 18 : est un mélange des :
 - Sondes de la région Xp11.1 - q11.1 : DXZ1(X centromèrealpha-satellite) marqué avec un fluorophore vert (spectre FITC).
 - Sondes de la région Yp11.1 – q11.1 : (Y centromèrealpha-satellite) marqué avec un fluorophore orange (spectre TRITC/ Orange).
 - Sondes de la région 18p11.1 – q11.1 : (18 centromèrealpha-satellite) marqué avec un fluorophore bleu (spectre Aqua).
- L'ensemble de sondes LSI (locus spécifique) pour les chromosomes 13 et 21 : est un mélange des :
 - Sondes de la séquence unique 13q14.2 marqué avec un fluorophore vert (spectre FITC)

- Sondes de la séquence unique 21q22.13 marqué avec un fluorophore orange (spectre TRITC/ Orange)

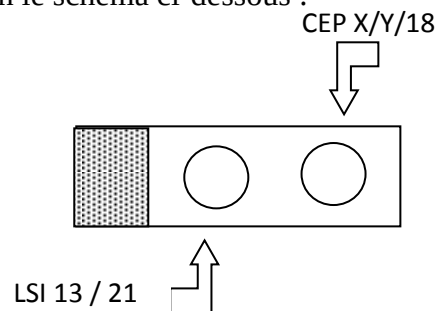
I.5.3. Protocole D'AneuCyte™ :

➤ Prétraitement à la pepsine :

- Traiter les lames préparées 30 min dans une solution RNase à 37°C puis rincer à l'eau distillée.
- Traiter 5 min dans la Pepsine puis rincer dans la PBS à pH 7,6 pendant 5 min.
- Déshydrater les lames dans l'éthanol à 70 %, 90%, 100 %, 2 min par bain et laisser sécher à l'air libre.

➤ Hybridation :

- Déposer les sondes selon le schéma ci-dessous :



- Rajouter une lamelle 22*22 sur chaque sonde
 - Recouvrir de 2 lamelles 24x24 – Luter avec du rubber cement
 - Mettre dans l'Hybrite®, (73°C pendant 2 minutes, puis 37°C 4 heures et plus).
 - Le lendemain, rincées les lames pendant 2 min dans 0,04 SSC à 73°C.
 - Rincer 30 secondes dans 2xSSC-NP 40 - Sécher.
 - Ajouter 1 goutte de DAPI II (contre coloration) et une goutte de Vectashield (antifade, pour optimiser le temps de fluorescence).
 - Recouvrir d'une lamelle puis écraser, et sceller au vernis.
- La lecture : La lecture a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan 2) relié à un poste d'acquisition et de traitement d'images de cytogénétique MetaSystem Isis.
- Réactifs et matériel pour la technique FISH : voir **Annexe 12**

Résultats et Discussion

II.1. Résultats :

Nous avons évalué la performance d'une nouvelle technique dite « rapide » de biologie moléculaire, Prenatal BoBs™, dans des conditions cliniques en routine par rapport à deux autres techniques rapides de biologie moléculaire (FISH et MLPA), et au caryotype conventionnel afin de déterminer sa fiabilité et sa robustesse dans la pratique actuelle et dans l'analyse cytogénétiques des produits de FCS, et d'identifier les anomalies chromosomiques qui peuvent être à l'origine des pertes fœtales.

Sur un total de 240 échantillons récoltés au niveau du CHU de Sidi Bel Abbès et du CHU Estaing de Clermont-Ferrand, seulement 190 prélèvements ont été analysés. Cinquante échantillons ont été exclus de l'analyse car ils étaient sous forme de sacs embryonnaires vides (œufs claires), étaient des échantillons hémorragiques avec forte contamination maternelle ou tout simplement parce qu'ils montraient un état de macération avancé, rendant impossible l'identification de villosités choriales. Cette macération est due soit à une longue période de rétention du produit d'avortement *in utero*, soit la conséquence de nombreux cycles de congélation/décongélation.

Sur les 190 cas analysés, 71 échantillons ont été testés par Prenatal BoBs™. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une étude comparative rétrospective avec les données issues de l'analyse par caryotype conventionnel réalisée sur la même cohorte d'échantillons. Par ailleurs, 66 prélèvements ont été explorés par la FISH sur noyaux interphasiques (AneuCyte™) et 53 cas ont été analysés par la MLPA.

Concernant la technique Prenatal BoBs™, et après l'extraction d'ADN, nous avons écarté un prélèvement en raison de l'insuffisance du matériel génétique (concentration d'ADN très infime $<5 \text{ ng}/\mu\text{l}$), causée par une forte dégradation de l'ADN. L'analyse cytogénétique a été réalisée avec succès dans 62 cas sur un total de 70 échantillons analysés (soit 89% des cas), avec un résultat concluant en 24 à 48H. Nous n'avons pas obtenu un résultat probant dans 8 cas en raison de problèmes techniques (échec de l'hybridation, du marquage et la mauvaise qualité de l'ADN $\text{CV} > 8$). Le taux d'échec de la technique était de 11%. Prenatal BoBs™ a permis de détecter deux anomalies chromosomiques (**Tableau 1.A et 1.B**), dont une trisomie 21 (**Planche 1**), et une délétion del 17p13.3 (syndrome de Miller–Dieker, MDS) (**Planche 2**). Les autres résultats ($n=60$) étaient normaux pour les locus étudiés (**Planche 3, Fig. a et Fig. b**).

Nous avons mené une étude comparative rétrospective avec les résultats du caryotype conventionnel réalisé sur la même cohorte d'échantillons analysés par Prenatal BoBs™ (**Tableau 1**). Sur un total de 71 prélèvements, 20 prélèvements ont été exclus parce qu'ils étaient trop macérés pour réaliser une culture cellulaire. Le caryotype a échoué dans 38 cas en raison de l'absence de prolifération cellulaire et de la contamination microbienne. Les autres caryotypes (n= 13) ont montré un résultat normal.

Pour la MLPA, et sur un total de 53 échantillons, la technique a été réalisée sur 41 cas seulement, 12 échantillons ont été exclus de notre étude car la concentration d'ADN était inférieure à 25 ng / μ L. Les kits utilisés P036, P070 et P245 ont permis d'identifier la présence de 3 anomalies chromosomiques (**Tableau 2**): une trisomie 21 (avec une augmentation de la taille des pics correspondants aux sondes ciblant les locus du chromosome 21 sur les électrophorégrammes) (**Planche 4**), une monosomie X avec un ratio < 0.7 sur les 3 kits (**Planche 5**), et une microdélétion [XY, del22 (q11.21)] « syndrome de Di George », avec un ratio < 0.7 observé dans le kit P245 (**Planche 6**). Les autres échantillons n = 35 ne présentaient aucun remaniement chromosomique détectable par ces kits (**Planche 7**). Enfin 3 échantillons analysés se sont révélés ininterprétables ; probablement à cause de la mauvaise qualité de l'ADN utilisé dans l'analyse.

Sur les 66 cas analysés par FISH interphasique, nous avons écarté 21 échantillons après exploitation des lames au microscope inversé, en raison de l'absence ou de l'insuffisance de noyaux. Ceci peut être expliqué par le fait que les prélèvements étaient trop anciens (plus de 2 mois pour certains), ou des mauvaises conditions de conservation.

La FISH a révélé la présence de 6 aberrations chromosomiques (**Tableau 3**) : 2 trisomies 21 « syndrome de Down » (**Planche 8**), une monosomie X « syndrome de Turner » (**Planche 9**), une trisomie 18 « syndrome d'Edwards » (**Planche 10**) et 2 triploïdies (**Planche 11**). Pour les autres cas (n= 30), les résultats étaient équilibrés (**Planche 12, Fig. a et Fig. b**), et aucune anomalie de nombre n'a été identifiée. Neuf cas étaient ininterprétables, soit parce que les signaux fluorescents étaient trop flous ou absents, soit en raison du nombre insuffisant de noyaux sur les lames analysées pour un résultat conclusif.

Résultat	Prenatal BoBs™	Caryotype conventionnel
Nombre des échantillons	70	51
Echecs N(%)	8 (11%)	38 (74,5%)
Sans anomalie N(%)	60 (96,7%)	13 (26,5%)
Avec anomalie N(%)	2 (3,3%)	/
Type d'anomalie	- 1 Trisomie 21 - 1 del 17p13.3	/

Tableau 1 .A : Résultats des explorations par Prenatal BoBs™ et Caryotype.

Patient	Age maternel	Semaine d'Aménorrhée	Antécédents obstétricaux	Prenatal BoBs™	Caryotype conventionnel
1	42	11	/	47,XX,+21	Echec
2	35	38	G1P0	46,XX,del 17p13.3	46,XX

Tableau 1 .B : Les résultats d'analyses des FCS à l'aide de Prenatal BoBs™ et caryotype montrant un caryotype anormal.

Patient	Age maternel	Semaine d'Aménorrhée	antécédents obstétricaux	MLPA
1	45	13	G4P3	47,XX, +21
2	35	18	G1P0	45,X0
3	22	20	G2P0 (1FCS)	46, XY, del 22 (q11.21)

Tableau 2 : Les résultats de la MLPA montrant un caryotype anormal

Patient	Age maternel	Semaine d'Aménorrhée	antécédents obstétricaux	AneuCyte™
1	35	14	G1P0	47,XX, +21
2	39	19	G4P2 (1 FCS)	47,XY, +21
3	21	13	G2P0 (1 FCS)	45,X0
4	39	19	G6P4 (1 FCS)	47,XX,+18
5	41	17	G3P2	69,XXX
6	21	13	G1P0 (GA)	69,XXX

G : Gestation ; P : Parité ; GA : Grossesse Arrêtée

Tableau 3 : Les résultats du caryotype anormal après l'analyse de FCS par la FISH

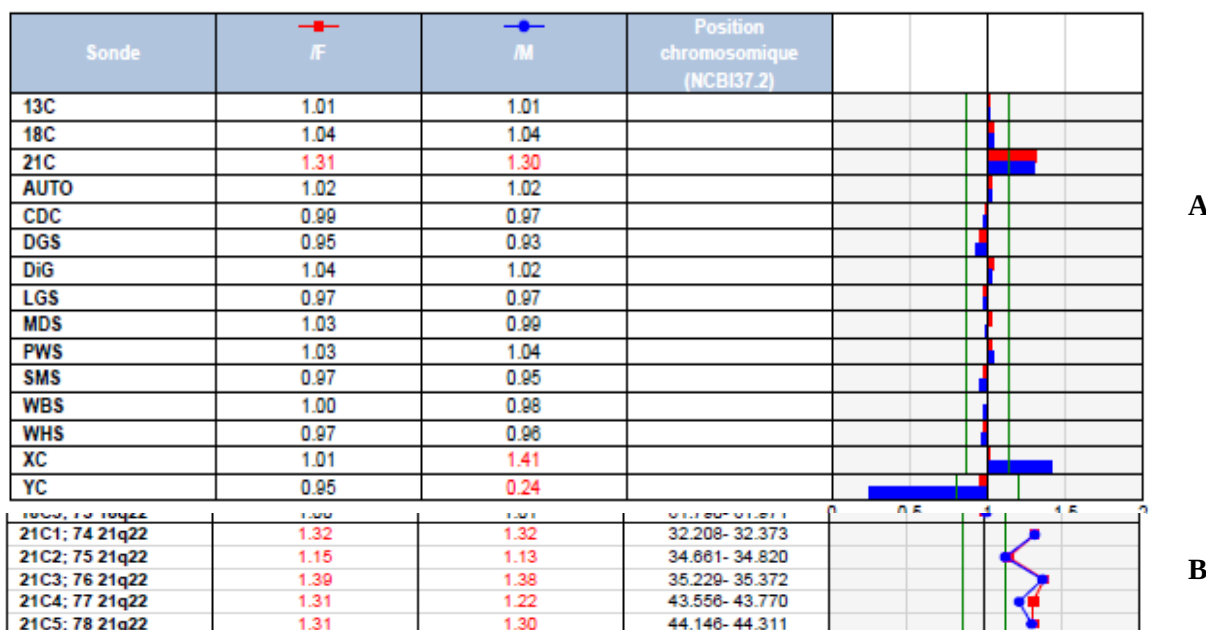


Planche 1: A. Résultat de Prenatal BoBs™ montrant le profil d'une trisomie 21 « 47,XX,+21 » réalisé sur un ADN extrait de villosités choriales issues de produit de curetage .B. Les cinq sondes pour les régions du chromosome 21 s'écartent de plus de 2 déviations standards (SDs) indiquant une duplication dans la région du chromosome 21.

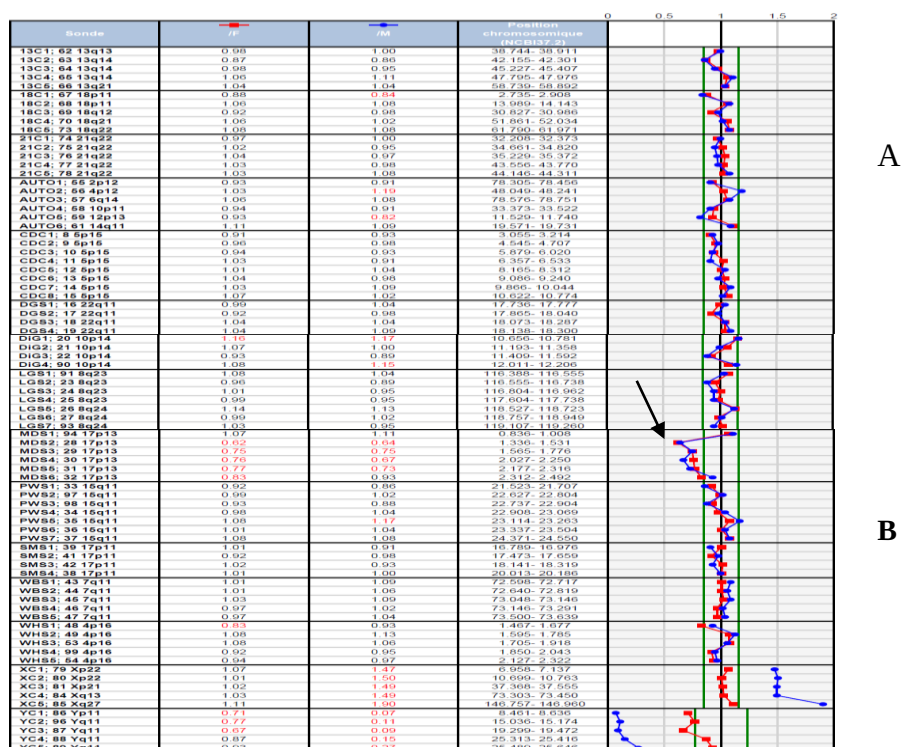


Planche 2 : Résultat de Prenatal BoBs™ montrant le profil d'une del 17p13.3 (Syndrome de Miller–Dieker), les cinq sondes pour les régions 17p13.3 s'écartent de plus de 2 déviations standards (SDs) et indiquent une délétion.

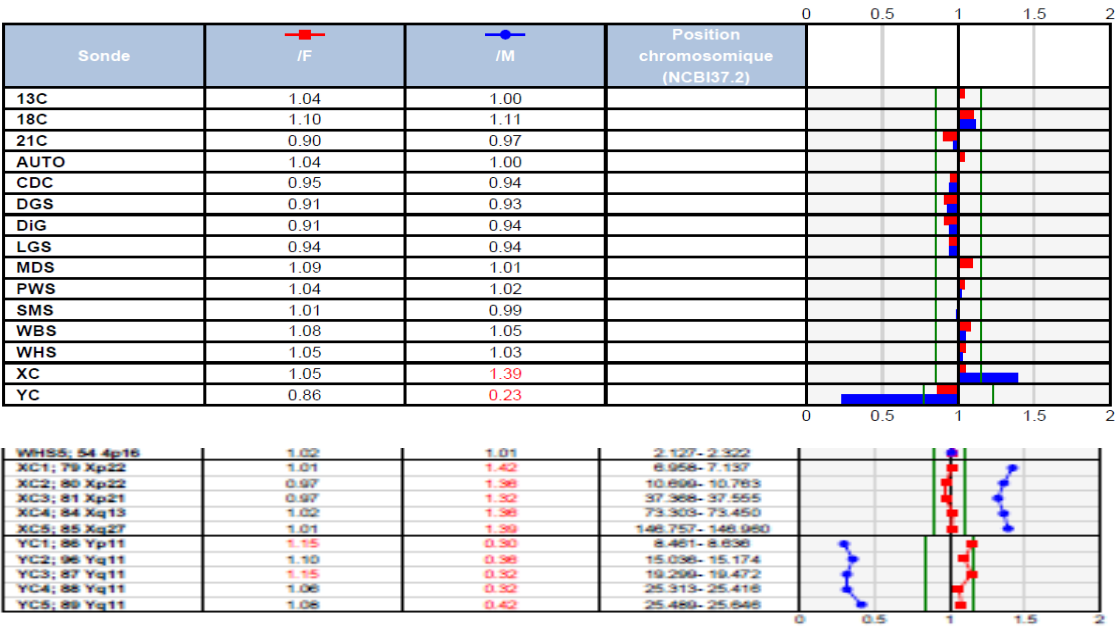


Planche 3, Figure a: Profil féminin normal « 46,XX » mis en évidence par Prenatal BoBs à partir d’ADN extrait de villosités chorales. Il y a autant de X qu’une fille et moins de Y qu’un garçon.

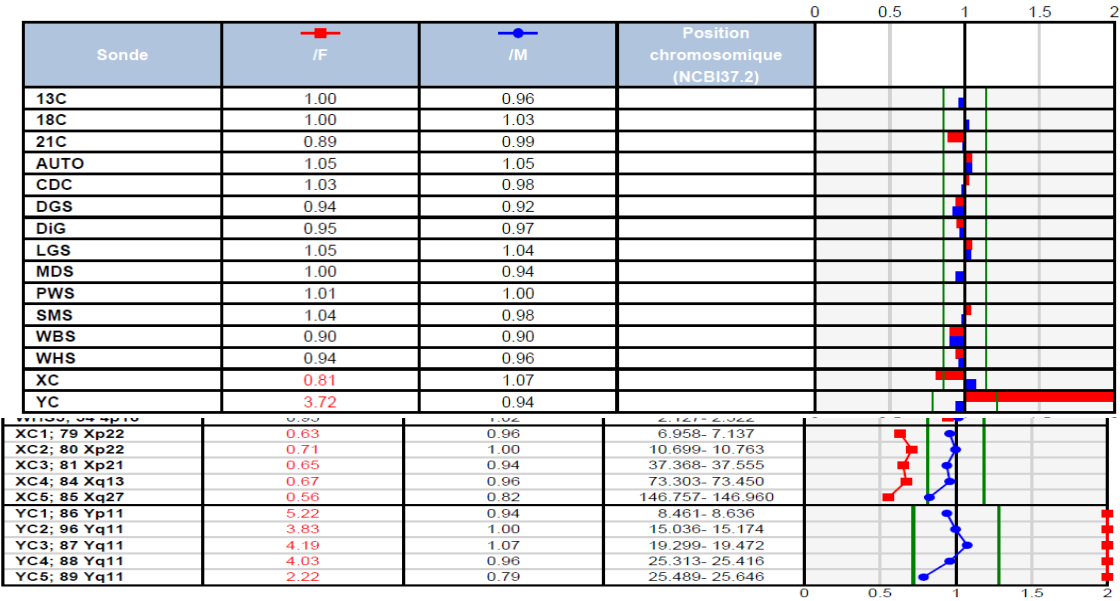


Planche 3, Figure b: Profil Prenatal BoBs montrant un male avec un caryotype normal « 46,XY ». Le profil indique le même nombre de copies ADN du chromosome X et du chromosome Y par rapport au control mâle (spots bleues) et la perte du chromosome X et un gain de nombre de copie d’ADN du chromosome Y par rapport au control femelle (points rouges).

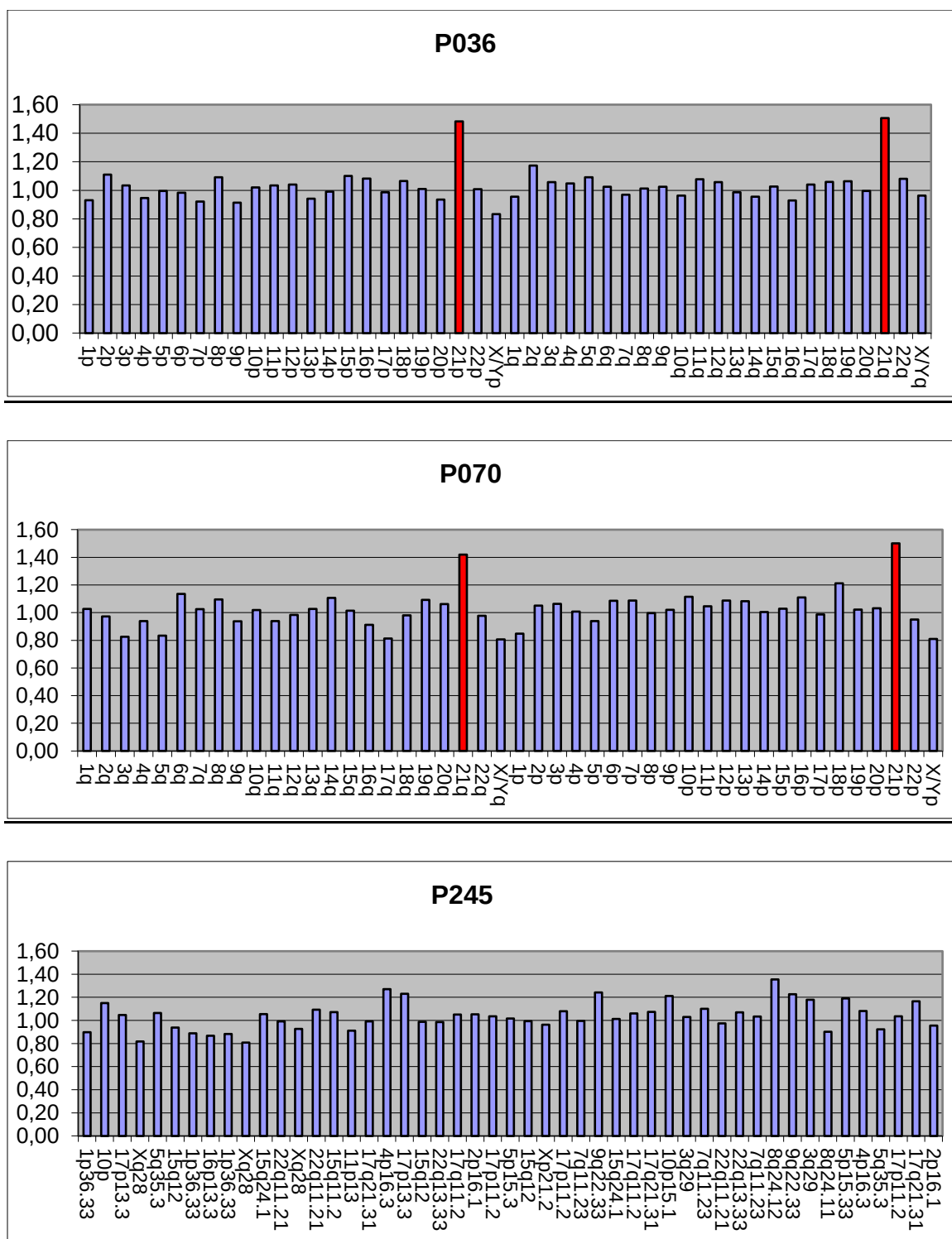


Planche 4 : Résultat MLPA montrant le ratio d'intensité de fluorescence pour chaque sonde. Pour le chromosome 21, le rapport de quantification est en dessus du seuil de détection 1,3 dans toutes les sondes pour les deux kits: P036 et P070 : Syndrome de Dawn «47,XX,21 ».

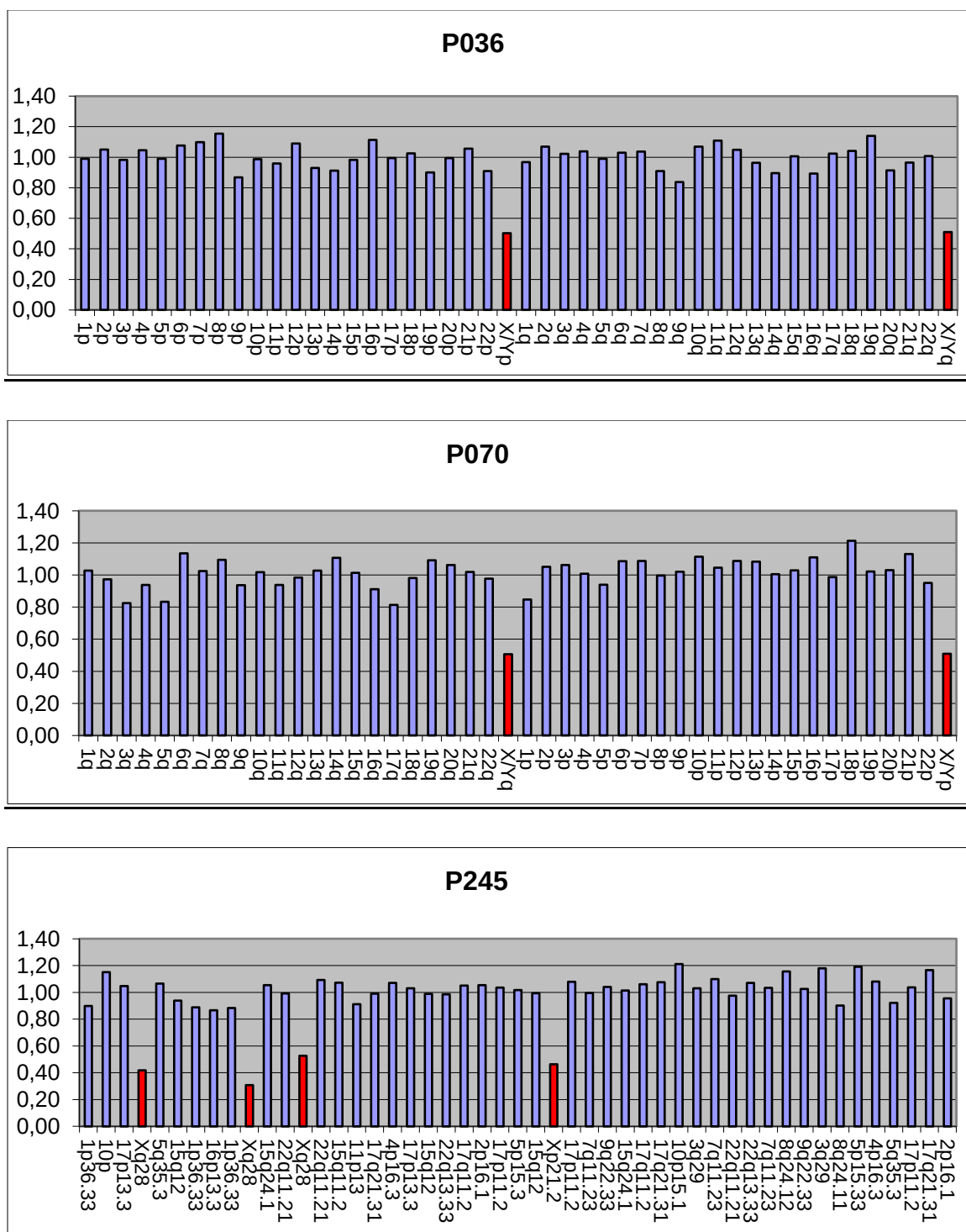


Planche 5 : Profil MLPA à partir d'ADN extrait des villosités chorales montrant un syndrome de Turner « 45,X0 », avec la présence des signaux faibles émis par le chromosome X dans les trois kits utilisés (ratio $\leq 0,7$)

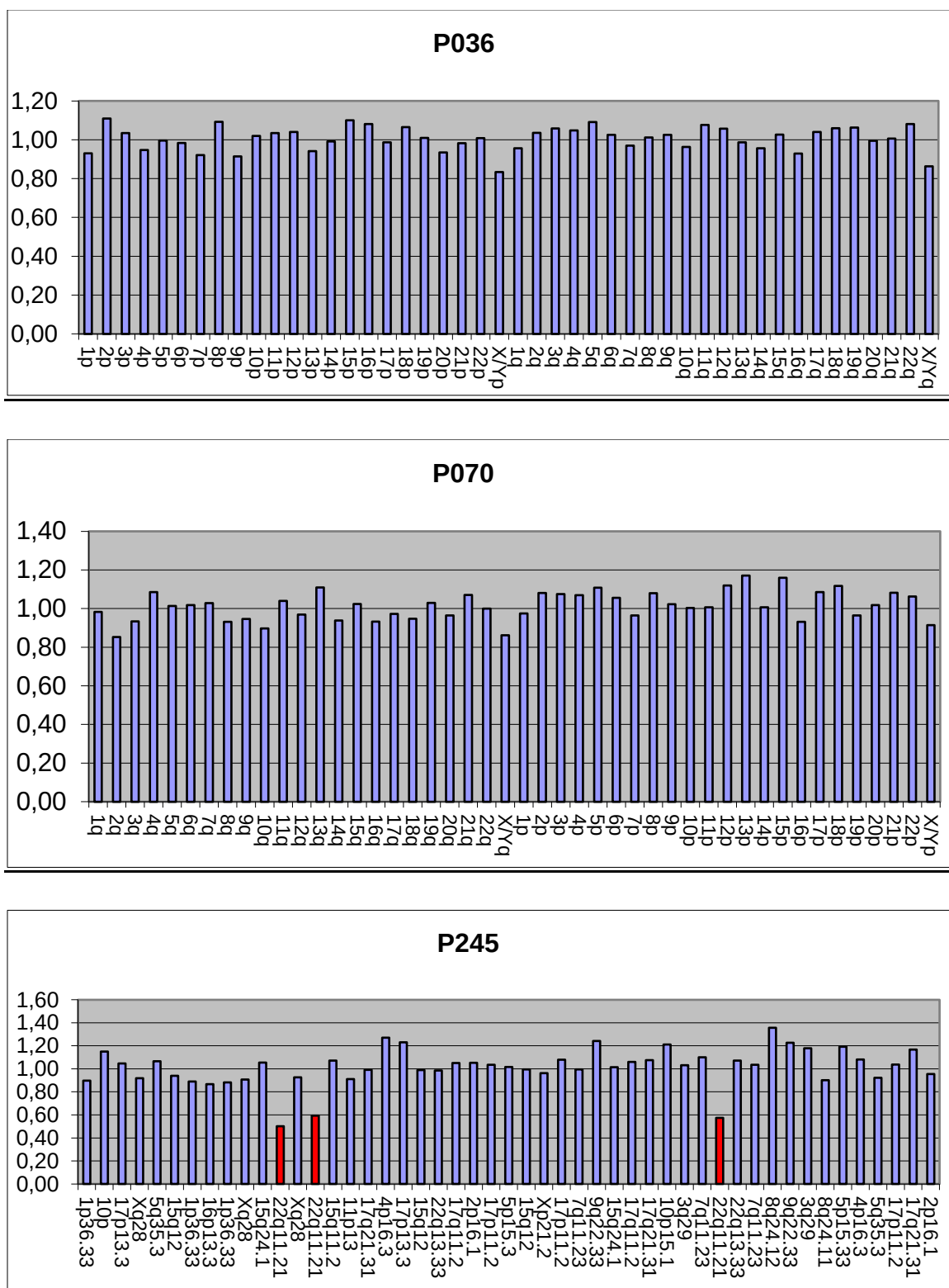


Planche 6 : Résultats de l'analyse MLPA sur l'ADN extrait de villosités chorales montrant un syndrome de Di George « 46, XY, del 22 (q11.21) » avec une délétion indiquée par un ratio inférieur à 0,7 pour la sonde 22q11.21.



Planche 7: Profil MLPA dévoilant un caryotype normal 46, XX sur les trois kits utilisés, réalisé à partir d'ADN extrait de villosités chorales issues d'un produit de curetage

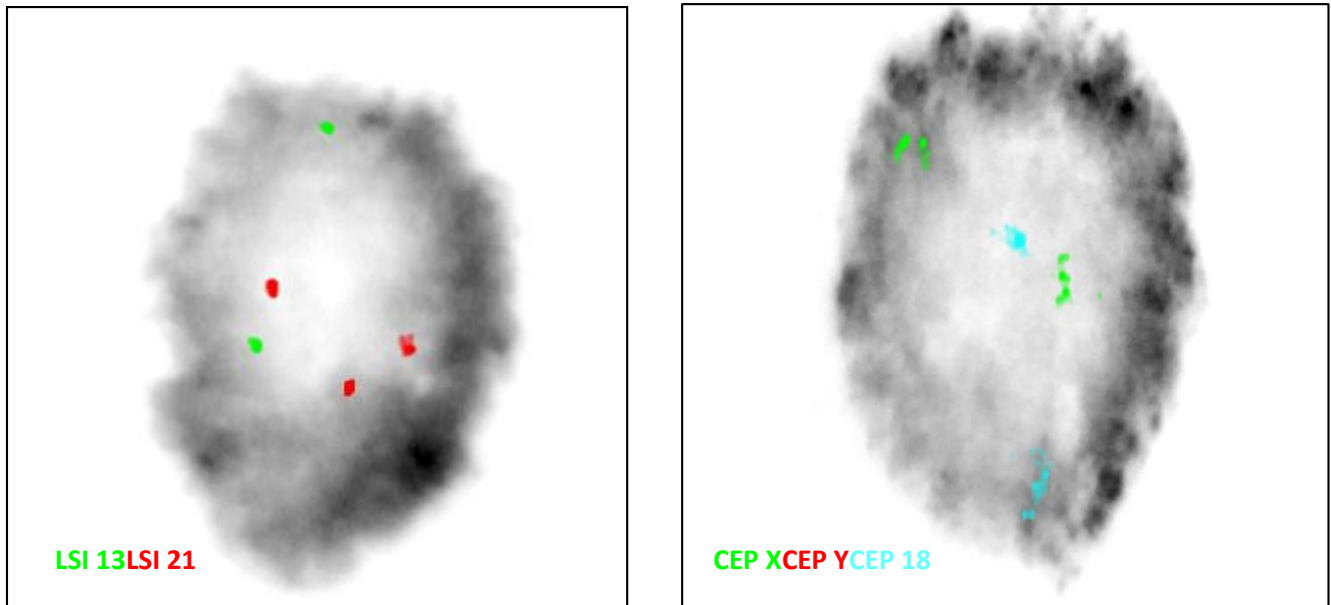


Planche 8 : Interphase FISH réalisée à partir des villosités choriales montrant une Trisomie 21 « 47,XX, +21 » (la présence de 3 spots rouge du chromosome 21).

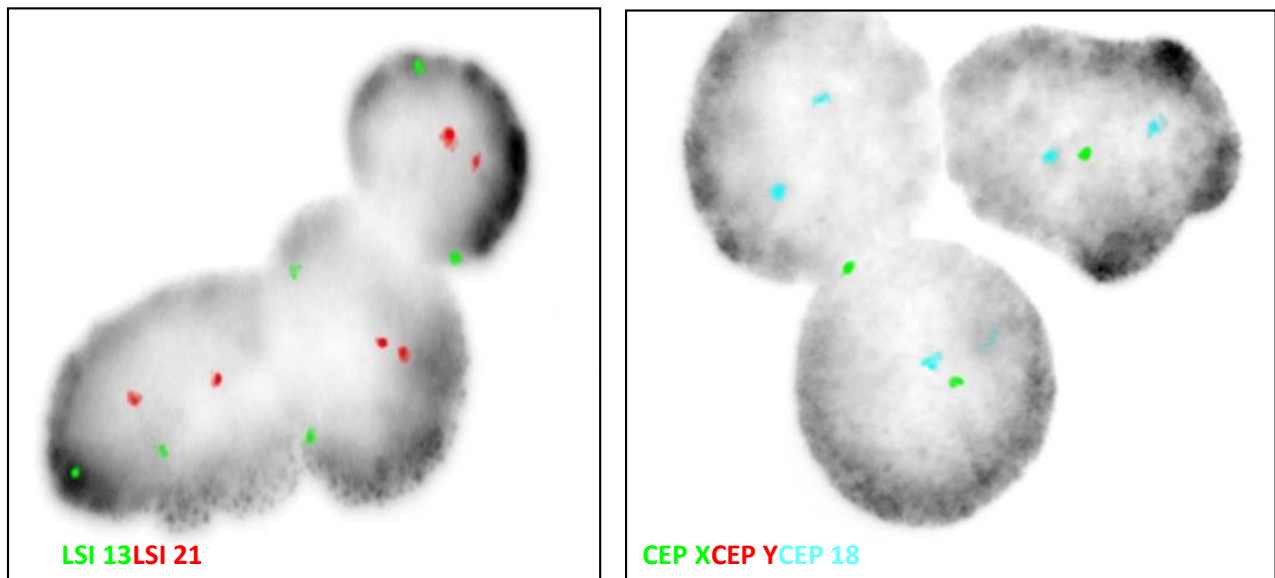


Planche 9: Analyse par FISH sur noyaux interphasiques révélant un syndrome de Turner « 45,X0 » par la présence d'un seul spot vert du chromosome X.

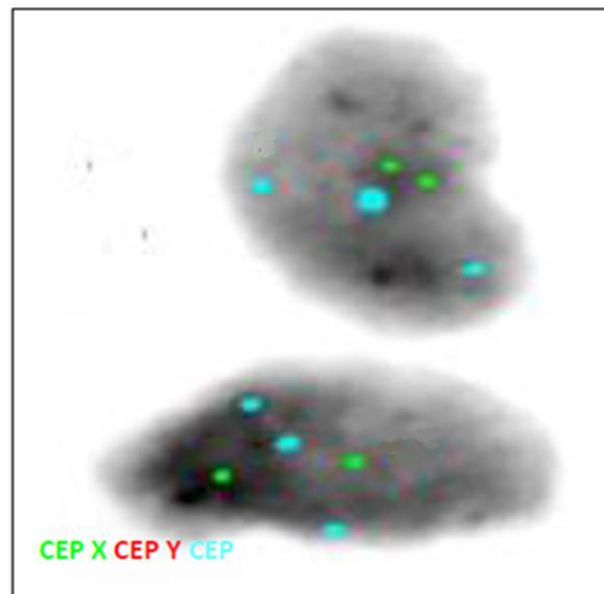
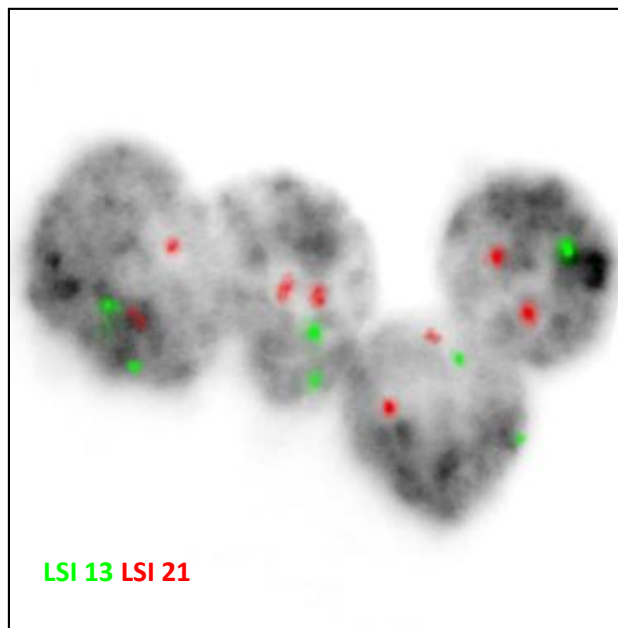


Planche 10 : AneuCyte™ réalisé sur produit de FCS présentant une Trisomie 18 « 47,XX,+18 » révélée par la présence de 3 spots CEP 18 .

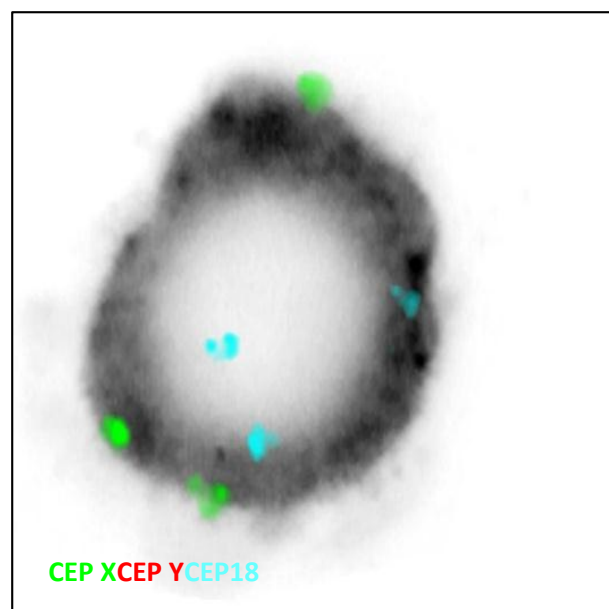
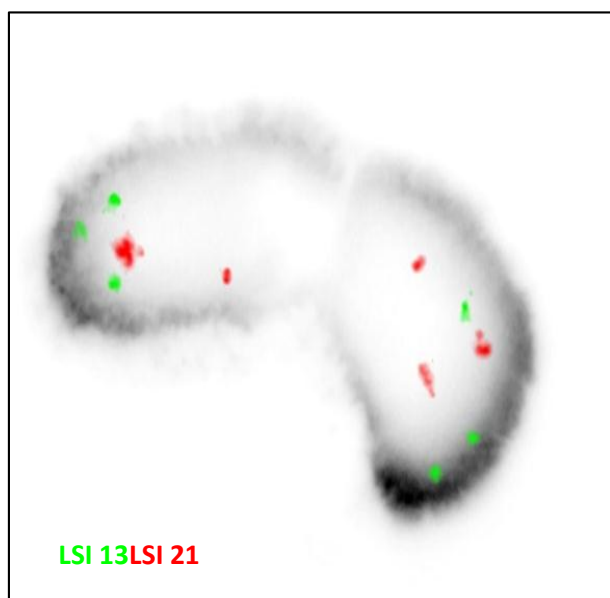


Planche 11 : La détection d'une Triploïdie « 69,XXX » révélée par la présence de 3 spots pour tout les sondes utilisées à l'aide de la FISH sur noyaux interphasiques des villosités chorales.

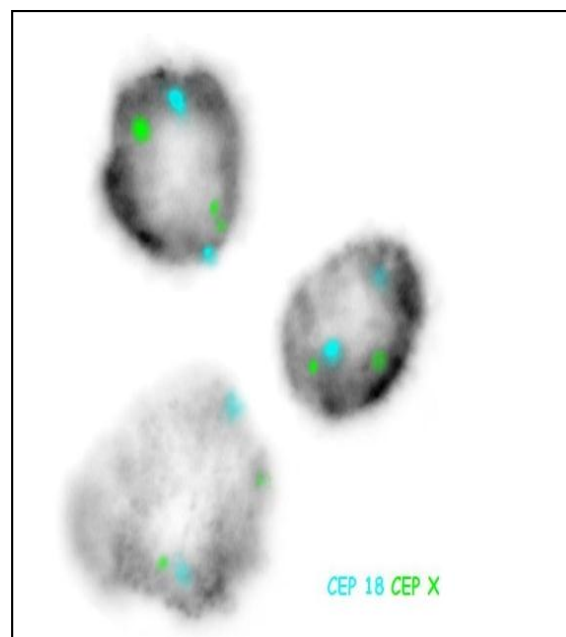
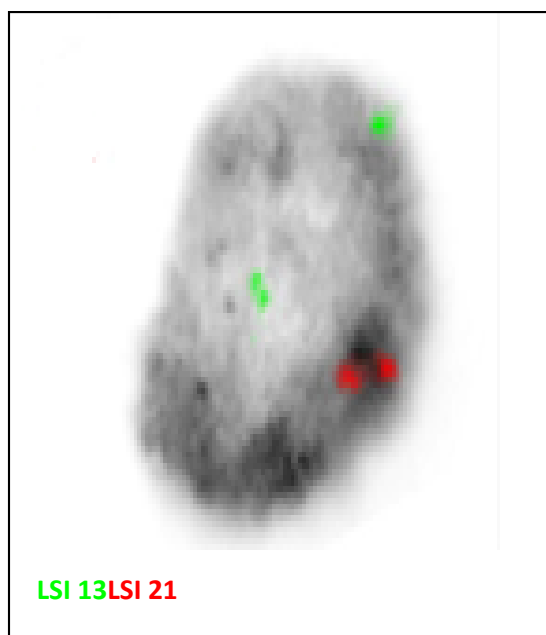


Planche 12, Figure a : Caryotype normal « 46,XX » détecté par AneuCyte™ sur noyaux interphasiques issus de produit de curetage.

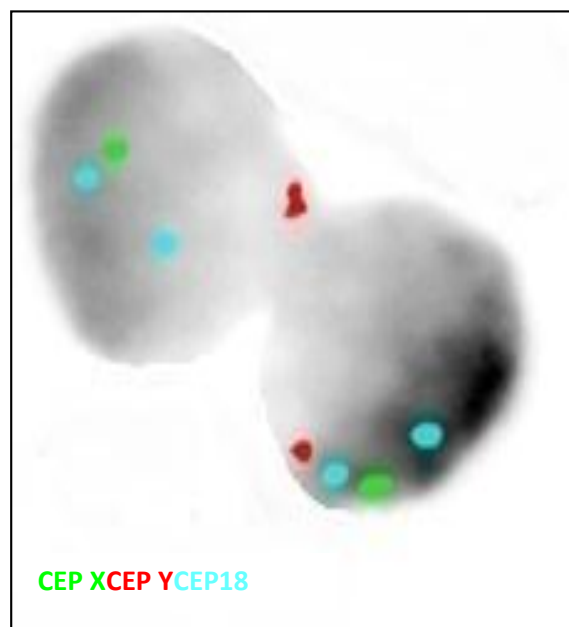
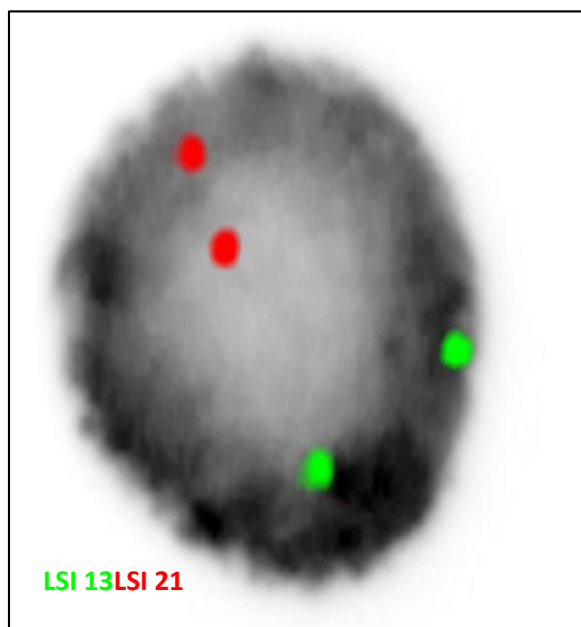


Planche 12, Figure b : Caryotype normal « 46,XY » mis en évidence par Interphase FISH réalisée sur des villosités chorales issues de produit de curetage .

II.2. Discussion :

Les anomalies chromosomiques sont le facteur le plus causatif de la pathologie fœtale. Plus de 50% des fœtus avortés spontanément au cours de premier trimestre présentent un caryotype anormal (principalement une aneuploïdie) (Solveig et Pflueger, 2005; Doria et *al.*, 2009). L'analyse cytogénétique des fœtus avortés est fortement recommandée pour un meilleur pronostic et diagnostic, mais également pour une meilleure estimation du risque de récurrence pour une future grossesse, car ils peuvent détecter les remaniements chromosomiques non équilibrés associés à l'âge maternel avancé ou la présence de réarrangements structuraux équilibrés et hérités (Solveig et Pflueger, 2005).

Le caryotype conventionnel reste la technique de référence pour l'analyse cytogénétique du produit de FCS, mais il est limité par les échecs de culture. Afin de surmonter les limites du caryotype, le secteur de la biologie moléculaire propose des outils toujours à la pointe de l'innovation pour développer de nouvelles stratégies de diagnostic, ou tout simplement pour remplacer ou compléter des techniques existantes, en les rendant plus rapides et/ou plus fiables. Toutes ces approches ont un positionnement différent en termes de richesse d'information fournies et de délais de rendu des résultats dans l'analyse cytogénétique des produits de FCS. Notre travail était basé sur la description et l'évaluation de la performance d'une nouvelle technologie prometteuse dite « rapide » de biologie moléculaire : Prenatal BoBs™, par rapport à deux autres techniques moléculaires déjà utilisées en routine dans le laboratoire de Cytogénétique Médicale dans le but de déterminer sa fiabilité et sa robustesse dans des conditions cliniques en routine, ainsi que dans l'identification des anomalies chromosomiques qui peuvent être à l'origine de pertes fœtales.

Prenatal BoBs™ est un outil très récent de la cytogénétique moléculaire pour l'analyse des aneuploïdies (chromosomes 13, 18, 21, X et Y) et de neuf syndromes microdélétionnels les plus fréquemment retrouvés dans les produits de conception. Cette analyse ciblée et rapide dépend de l'extraction de l'ADN, ne nécessite pas des cellules vivantes ou intactes, et a l'avantage de détecter 9 syndromes microdélétionnels avec une expression clinique bien connue et qui ne sont pas détectables, ou peuvent passer inaperçus, en utilisant le caryotype conventionnel. Elle représente donc une alternative très intéressante à la culture cellulaire (Gross et *al.*, 2011 ; Shaffer et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2012).

Dans notre étude, tous les échantillons analysés par Prenatal BoBs™ ont été confirmés par le caryotype conventionnel. Les résultats étaient concluants dans 49 cas pour lesquels le caryotype n'a pas pu être réalisé en raison d'une absence de prolifération cellulaire, ce qui rend cette technique un outil très utile pour l'analyse cytogénétique de produits de conception, en particulier dans les cas d'échecs de la culture cellulaire.

L'analyse a été réalisée sur 70 échantillons en utilisant l'ADN extrait à partir de villosités choriales issues de produits de FCS, de fibroblastes de la peau et de cellules amniotiques. Huit cas étaient ininterprétables, augmentant le taux d'échec à 11,4%, ce qui est plus élevé que le taux de ~3% rapporté par la littérature (Vialard et *al.*, 2012 ; Gross et *al.*, 2011). Il est également plus élevé que le taux de ~2% rapporté dans l'analyse des produits de conception en utilisant Karyolite BoBs™ (Paxton et *al.*, 2013 ; Grati et *al.*, 2013). Ces résultats peuvent être expliqués par la mauvaise qualité de l'ADN de certains échantillons très macérés.

Pour les autres cas, Prenatal BoBs™ a révélé la présence de deux aberrations chromosomiques. Une trisomie 21 a été détectée dans un fœtus de sexe féminin décédé *in utero* à 11 semaines de gestation. A l'autopsie, le fœtus a présenté un hygroma et un œdème sous-cutané généralisé. Cependant la culture cellulaire a échoué, nous n'avons donc pas pu déterminer si la trisomie était totale ou partielle, homogène ou par translocation faute de ne pas pouvoir réaliser un caryotype.

La trisomie 21 a été associée à un âge maternel avancé (42 ans), qui est un facteur bien connu dans la survenue des aneuploïdies, notamment les trisomies (Doria et *al.*, 2009 ; Carvalho et *al.*, 2010).

Une microdélétion 17p13.3 a été identifiée dans un fœtus de sexe féminin décédé *in utero* à 38 SA. Le dosage des marqueurs sériques du premier et du deuxième trimestre était normal et la deuxième échographie ultrasonore a révélé une artère ombilicale unique. A l'autopsie, le fœtus était hypotrophié, de petite taille (< 25ème percentile), et une circonférence de la tête diminué (< 3ème percentile). Il n'y avait pas une dysmorphie faciale, cardiaque, pulmonaire, ni anomalies rénales. L'examen de neuroanatomie n'a pas montré de lissencéphalie. L'analyse par FISH a montré que le gène LIS1 qui est responsable du syndrome de Miller-Dieker (MDS) n'est pas délété. Par contre, la délétion a été caractérisée en utilisant CGH array (4x180K, Agilent), qui a montré une délétion de 2,3 Mb englobant 40 gènes. Cette délétion, qui n'est pas typique de la MDS, est probablement responsable de la petite taille du fœtus,

mais nous ne pouvions pas non plus exclure que l'artère ombilicale unique pourrait être la cause de la mort fœtale.

La microdélétion 17p13.3 (2,3 Mb) n'aurait pas été détectée par le caryotype en raison de sa faible résolution ni par Karyolite BoBs™ en raison de sa limitation dans la détection des réarrangements structuraux, qui représentent environ 6% des anomalies retrouvées dans les produits de conception (Paxton et *al.*, 2013). En effet, dans les données publiées en 2012 par Vialard et *al.*, Prenatal BoBs™ a détecté un total de six microdélétions et microduplications qui n'auraient pas été détectées par les techniques de cytogénétique conventionnelle ou moléculaire (Vialard et *al.*, 2012).

Le syndrome de Miller Diecker (MDS) est un syndrome de malformation rare qui se manifeste par une *lissencéphalie* de type 1 et est associé à une microdélétion dans la région 17p13.3. Dans 50% des cas, cette microdélétion est détectée uniquement par les techniques de la cytogénétique à haute résolution (Dobyns et *al.*, 1991). D'autres réarrangements structuraux peuvent être identifiés dans les produits de conception. L'investigation cytogénétique de 1599 échantillons par Prenatal BoBs™ a révélé la présence de 11 cas de microdélétions et microduplications (0,75%) parmi lesquelles la del 22q11.2 (Di George syndrome) était l'anomalie la plus fréquemment détectée dans les produits de conception (Vialard et *al.*, 2012).

Pour autant, Prenatal BoBs™ est un test ciblé, les locus du génome qui peuvent être à l'origine d'un syndrome clinique dans un état de déséquilibre et qui ne sont pas inclus dans les sondes utilisées, seraient passés inaperçus au cours de l'analyse (Vialard et *al.*, 2011 ; Shaffer et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2012). Une meilleure approche d'analyse couvrant tout le génome peut conduire à une détection des microremaniements déséquilibrés avec des significations cliniques connues, mais peut conduire également à l'identification de gains ou de pertes dont la signification clinique est inconnue ou douteuse (Shaffer et *al.*, 2011 ; Sharp, 2009).

Prenatal BoBs™ est incapable de détecter les polyploïdies (triploïdies et tétraploïdies) (Vialard et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2012), anomalies assez fréquentes dans les FCS et qui représentent près de 16% des anomalies constatées par le caryotype conventionnel (Paxton et *al.*, 2013). Elle montre également des limitations dans l'identification des translocations et des inversions équilibrés (Gross et *al.*, 2011).

Une autre limite dans l'analyse cytogénétique des produits de FCS est le taux élevé de contamination par les cellules maternelles dans les échantillons. En effet, quelques études ont testé les capacités de Prenatal BoBs™ dans l'identification des formes mosaïques et de la contamination par des cellules maternelles (MCC). Prenatal BoBs™ est capable de détecter la forme mosaïque à hauteur de 20 à 40% (Vialard et *al.*, 2011 ; Cheng et *al.*, 2013), la contamination par les cellules maternelles peut être identifiée lorsque le taux de cellules femelles normal est compris entre 20 et 30% (Shaffer et *al.*, 2011 ; Vialard et *al.*, 2011).

Pour la MLPA, nous avons utilisé deux kits : SALSA P036 et P070. Ces kits permettent l'analyse simultanée de l'ensemble des régions subtélomériques de tous les chromosomes. Le troisième kit -P245- permet le dépistage simultané de 21 syndromes microdélétionnels différents à l'origine de mort fœtale *in utero* et de retards mentaux.

La MLPA a réussi à fournir des résultats interprétables dans 72 % des cas, avec un taux d'échecs de 28 % causé principalement par la dégradation et la faible concentration d'ADN, souci majeur dans l'analyse des FCS (Solveig et Pflueger, 2005).

La MLPA a permis d'identifier 3 anomalies chromosomiques : une trisomie 21, une monosomie X et une micro délétion de la région 22q11.21 (syndrome de Di Georges). Ces trois anomalies peuvent être parfaitement détectées en utilisant Prenatal BoBs™. L'étude menée par Vialard et *al.* en 2012 en utilisant Prenatal BoBs™, a révélé que la délétions 22q11.21 est le microremaniement le plus fréquemment rencontré dans les produits de FCS.

Cependant, la MLPA est également une technique ciblée qui a une certaine limitation dans la détection des polyploïdies, l'identification des réarrangements structuraux tels que les translocations ou inversions équilibrées, et des nombreuses suppressions interstitielles rares. Certains signaux de la sonde sont plus sensibles à la pureté de l'échantillon et à de petits changements dans les conditions expérimentales. Par conséquent, les délétions et les duplications détectées par MLPA doivent toujours être confirmées par d'autres méthodes. Les délétions et duplications détectées par MLPA ne sont pas forcément pathogènes (faux positifs), en particulier les gènes subtélomériques en raison de l'existence dans la population générale de polymorphismes qui touchent cette région, c'est pour cela qu'il est impératif de toujours avoir recours à la littérature scientifique la plus récente lors de l'interprétation du résultat (Ameziane et *al.*, 2006 ; Doria et *al.*, 2009 ; Carvalho et *al.*, 2010).

Concernant la FISH interphasique, nous avons utilisé les kits d'AneuCyte™ afin de détecter les aneuploïdies les plus fréquentes: 13, 18, 21, X et Y. La technique a pu fournir des résultats interprétables dans 55% des cas seulement, avec un taux d'échecs élevé (45% des cas). Ces échecs peuvent être expliqués par l'absence ou l'insuffisance de noyaux interphasiques, et des signaux fluorescents trop flous ou absents. Ce résultat montre que la FISH était la technique qui a enregistré le taux d'échec le plus élevé en comparaison avec les d'autres techniques que nous avons utilisé. En effet, la littérature a précédemment rapporté que c'est une technique qui nécessite une forte intensité de travail et qui est associée à des problèmes techniques tels que la défaillance de l'hybridation ou l'hybridation croisée des sondes des différents chromosomes, sans oublier le fait qu'elle soit couteuse (Nobuaki Ozawa ,2012).

La FISH a permis d'identifier 6 anomalies chromosomiques. Cette technique a permis de détecter deux cas de triploïdes, aberration chromosomique qu'il est impossible de diagnostiquer en utilisant MLPA ou Prenatal BoBs™. La FISH montre également son efficacité dans la détection de la fréquence de la lignée cellulaire anormale dans le cas d'un mosaïcisme de bas grade, ce qui est possible uniquement avec cette méthode (Jobanputra , et *al.* , 2002).

Cependant, la FISH reste une technique ciblée, les anomalies des chromosomes non incluses dans les sondes utilisées peuvent passer inaperçues, en incluant les microremaniements chromosomiques qui représentent à eux seuls 6% des anomalies chromosomiques retrouvées dans les produits de FCS (Doria et *al.*, 2009).

Dans notre étude comparative, nous avons relevé plusieurs constats (**Tableau 4 et 5**) qui confirment la robustesse de Prenatal BoBs™:

- Elle est plus informative que la FISH rapide qui peut identifier seulement les aneuploïdies fréquentes. Prenatal BoBs™ peut identifier 9 syndromes microdélétionnels qui ne sont pas détectables, ou peuvent être manqués par le caryotype conventionnel.
- Son protocole est simple, fiable et rapide (une technique à haut débit qui nécessite une faible quantité d'ADN, réalisable même en utilisant de l'ADN de mauvaise qualité, ne nécessite pas de culture cellulaire, et automatisable).

- Le temps de traitement manuel (hand-on-time) est d'environ la moitié de celui du dépistage d'aneuploïdies par FISH rapide, la MLPA et le caryotype en raison de la capacité du système à analyser jusqu'à 44 échantillons par session.
- Une spécificité élevée et une haute sensibilité par rapport aux autres approches (taux de détection ~90%, le plus élevé parmi toutes les techniques que nous avons utilisé, du fait que les autres approches ont montré un taux d'échec élevé « 28-45% »).
- Le coût de ce test est moins cher que les autres technologies qui ont la capacité de détecter plusieurs remaniements (CGH-array) et similaire à celui de FISH rapide.
- A l'inverse de la MLPA qui nécessite une confirmation des résultats par d'autres techniques alternatives, Prenatal BoBs™ est un kit certifié CE-IVD, donc les résultats positifs ne nécessitent pas une seconde analyse pour la confirmation de la présence des déséquilibres ; à l'exception des aneuploïdies dans un état mosaïque qui doivent être confirmées par FISH / caryotype.
- Plusieurs applications sont possibles : le kit peut être personnalisé en ajoutant ou en soustrayant des billes correspondant à divers syndrômes (système très flexible qui peut être ajusté en fonction des paramètres, notamment le diagnostic oncologique).

En conclusion, dans notre étude, Prenatal BoBs™ s'est avérée être une technique fiable, rapide et capable d'identifier les aneuploïdies les plus fréquentes, et 9 syndromes microdélétionnels indétectables par le caryotype dans les produits de FCS, notamment lorsque le tissu est endommagé ou macéré pour réaliser une culture cellulaire. Prenatal BoBs™ est un test simple, robuste, qui offre des avantages significatifs en termes de facilité dans l'utilisation en routine clinique, des volumes d'échantillon minimes (1 seule villosité chorale), il ne nécessite pas de culture cellulaire, le temps d'obtention des résultats est réduit, le taux de détection des aberrations est amélioré et le taux d'échecs réduit.

Il s'agit d'une technologie prometteuse qui peut être particulièrement utile dans les régions du monde où le personnel et les laboratoires de cytogénétique sont limités, et représente une alternative rapide, sensible et robuste pour une analyse de routine des produits de FCS et surmonte quelques limitations des techniques de la cytogénétique moléculaire actuelle et le caryotype conventionnel.

	Prenatal BoBs™	Caryotype Conventionnel	La FISH interphasique (AneuCyte™)	La MLPA (P030, P070 et P245)
Type d'analyse	Ciblée : Aneuploïdies du chromosomes 13, 18,21,X et Y + 9 syndromes microdélétionnels	Globale du génome	Ciblée : Aneuploïdies des chromosomes 13, 18,21,X et Y	Ciblée : toutes les régions subtélomériques + 21 syndromes microdélétionnels
Support / quantité	ADN : 50-240 ng (1 petite villosité)	Cellules métaphasiques (culture cellulaire)	Noyaux interphasiques	ADN : 20-200 ng (1 petite villosité)
Niveau de résolution	500-850 Kb	5-10 Mb	100-200 Kb	300bp
Temps de traitement	24-48 H	7 à 14 jours	24 H	24-48H
Précision (taux de succès)	62/70 (89%)	13/51 (25,5%)	36/66 (55%)	38/53 (72%)
Taux d'échecs	11%	74,5%	45%	28%
Coût	€€€*	€€	€€€	€€
Hand -on time	+	+++	++	++
La facilité d'utilisation en routine	Facile (44 patients par plaque)	Nécessite de l'expertise et très manuelle	Modérée	Modérée
Triploïdies	Non	Oui	Oui	Non
Mosaïcisme	Oui : un taux 20- 30%	Oui	Oui	Non
Contamination maternelle	Non	Oui	Oui	Non
Remaniements équilibrés	Non	Oui	Non	Non

* : Dépendent de nombre des échantillons traités simultanément

Tableau 4 : Evaluation de la performance des techniques utilisées dans notre étude en routine

	Avantages	Limites
Prenatal BoBs™	-Résultat rapide pas de culture cellulaire -Seulement 1 petite villosité -Jusqu'à 44 patients par plaque -Jusqu'à 100 sondes par puits dont 4 à 8 sondes par région étudiée -Une analyse plus large facilement applicable en routine -Réduit le taux échecs	-Non détection des translocations équilibrées ? -Difficulté d'interprétation des triploïdies -Technique coûteuse ? -Faux négatif et faux positif
Caryotype conventionnel	- Technique peu coûteuse, - Détection des anomalies équilibrées -Approche globale	-Résolution limitée à 5 Mb -Les échecs de la culture cellulaire -Un délais long pour obtenir des résultats 7 à 14 jours
La FISH interphasique (AneuCyte™)	-Technique très répandue, simple et robuste -Rapide	-Ciblée -Lecture et analyse longue lorsque un grand nombre de locus sont étudiés -Résolution limitée dans la détection des petites microduplications -Technique coûteuse -Taux échecs élevé
La MLPA (P030, P070 et P245)	-Possibilité d'analyse d'un grand nombre de locus rapidement : 45 locus -Exige 20 ng d'ADN -Rapide -Peu onéreuse	-Ciblée -Non détection des microremaniements équilibrés et les triploïdies. -Présence des faux positifs (polymorphismes) nécessitant la validation par une autre technique - Certaines microdélétion étudiées inutiles ?

Tableau 5 : Les avantages et les limites de Prenatal BoBs™, caryotype conventionnel, la FISH interphasique et la MLPA.

Conclusion

Conclusion

Notre travail reposait sur l'étude de la performance d'une nouvelle technique dite « rapide » de biologie moléculaire, « Prenatal BoBs™ », dans la mise en évidence des anomalies chromosomiques liées aux FCS, par rapport à deux autres techniques rapides de biologie moléculaire (FISH et MLPA) et au caryotype conventionnel.

Notre analyse cytogénétique de produits de FCS par Prenatal BoBs™ a révélé une trisomie 21 et une délétion del 17p13.3 qui étaient passées inaperçues avec le caryotype. Les résultats étaient concluants dans 49 cas pour lesquels le caryotype n'a pas pu être réalisé en raison d'une absence de prolifération cellulaire. Néanmoins, le taux d'échec de la technique était de 11%. La FISH a permis d'identifier 2 trisomies 21 ; une monosomie X ; une trisomie 18 et 2 triploïdies. Par ailleurs, MLPA a mis en évidence une trisomie 21 ; une monosomie X et une microdélétion [XY, del22 (q11.21)]. Les deux techniques ont enregistré un taux d'échec de 45% et 28% respectivement, ce qui est plus élevé que le taux observé en utilisant Prenatal BoBs™.

Les techniques utilisées dans notre étude ont un positionnement différent en termes de richesse d'information fournies et de délais de rendu des résultats dans l'analyse cytogénétique des produits de FCS. La Prenatal BoBs™ s'est avérée être également une technique fiable, rapide et facilement applicable en routine. Il s'agit d'une technologie prometteuse qui peut être particulièrement utile dans les régions du monde où le personnel et les laboratoires de cytogénétique sont limités. Elle constitue une bonne alternative à d'autres techniques, notamment le caryotype, dans la détection des aneuploïdies (chromosomes 13, 18, 21, X et Y) et 9 syndromes microdélétionnels (indétectables par le caryotype) dans les produits de FCS, en particulier lorsque le tissu est endommagé ou macéré pour réaliser une culture cellulaire.

Cependant, Prenatal BoBs™ ne détecte que les anomalies ciblées et montre des limitations dans l'identification des polyploïdies, des translocations et des inversions équilibrés. De ce fait, elle doit être utilisée en combinaison avec d'autres approches moléculaires plus précises, permettant une analyse plus globale du génome, ce qui devrait améliorer la détection d'anomalies chromosomiques dans les produits de FCS et pourrait être plus informative pour le conseil génétique de la reproduction et pour les parents.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahn, JW, Ogilvie CM, Welch A, et al. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet*. 2007;8:9.
- Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Techniques de séquençage de l'ADN. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Paris : Elsevier ; 2006 : 403-15.
- Andrieux J. Puces à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques. *Pathologie Biologie*. 2008; 56: 368–374.
- Azmanov DN, Milachich TV, Zaharieva BM, et al. Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* . 2007; 131:127–31.
- Badonnel Y, Berland M, Lacroix I, et al. . Grossesse et périnatalité : suivi biologique. *Annales de Biologie Clinique*. 1997 ; 55(4): 289-304.
- Beever CL, Stephenson MD, Penaherrera MS, et al. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet*. 2003; 72:399–407.
- Benirschke K. Abortion, Placentas of Trisomies, and Immunologic Considerations of Recurrent Reproductive Failure. *Pathology of the Human Placenta*. New York : Springer; 2006 : 762-796.
- Beucher G, Biellat T, Dreyfus M. Prise en charge des fausses couches spontanées du premier trimestre. *J Gynécol Obstet Biol Reprod*. 2003 ; 32 : 5-21.
- Bottomley C, Bourne T. Diagnosing miscarriage. *Best Practice & Research Clinical obstetrics and Gynaecology*. 2009; 23: 463–477.
- Bouayed Abdelmoula N. Apport de la cytogénétique moléculaire au diagnostic des anomalies chromosomiques. *Ann Biol Clin* 2004, 62 : 629-37
- Boué JG and Boué A. Fréquence des aberrations chromosomiques dans les avortements spontanés humains. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1969; 269:283–288.
- Boue J, Boue A, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology*. 1975;12:11-26.
- Boue JG, Boue A. Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion. Their consequences on early embryogenesis and in vitro growth of embryonic cells. *Curr Top Pathol*. 1976;62:193–208.
- Brajenovic-Milic B, Petrovic O, Krasevic M, et al. Chromosomal anomalies in abnormal human pregnancies. *Fetal Diagn Ther*. 1998;13: 187–91.
- Carvalho B, Doria S, Ramalho C, et al. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation dependent probe amplification: an alternative for speeding up results?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;153(2): 151-155..
- Carp H, Feldman B, Oelsner G, et al. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2004; 81(5):1296–1301.
- Cheng YKY, Wong C, Wong HK. The detection of mosaicism by prenatal BoBs™. *Prenatal Diagnosis*. 2013; 33:42–49.
- Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod*. 1997 ; 12 : 387-389.

Références bibliographiques

- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43:838-46.
- Coutton C, Vieville G, Satre V, et al. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) et sondes « à façon » entièrement synthétiques. Guide pratique, recommandations et expérience au CHU de Grenoble. *IRBM.* 2012; 33: 227–235.
- Davison, E.V. and Burn, J. (1990) Genetic causes of early pregnancy loss. In *Early Pregnancy Failure*. New York: Huisjes, H.J. and Lind, T., eds ; 1990 : 55–78.
- Delahaye A. Etude des régions sub-télomériques par MLPA chez 1041 patients présentant un retard mental non spécifique [Thèse de médecine]. Paris : *Université Paris 6* ; 2006.
- Dejme kJ, Vojtassa kJ, Malova J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 1992;46:129-36.
- Doria S, Carvalho F, Ramalho C, et al. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009; 147(2): 144-150.
- Doria S, Lima V, Carvalho B, et al. (2010). Application of touch FISH in the study of mosaic tetraploidy and maternal cell contamination in pregnancy losses. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27 (11): 657-662.
- Edwards JH, Yuncken C, Rushton DI et al. Three cases of triploidy in man. *Cytogenetics.* 1967; 6:81–104.
- Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet.* 1990;47:656–63.
- Eichenlaub-Ritter, U. Genetics of oocyte ageing. *Maturitas.* 1998; 30:143–169.
- Ford JH, Wilkin HZ, Thomas P, et al. A 13-year cytogenetic study of spontaneous abortion: clinical applications of testing. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1996;36: 314–8.
- Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009; 2(2):76-83.
- Frumkin T, Malcov M, Yaron Y et al. Elucidating the origin of chromosomal aberrations in IVF embryos by preimplantation genetic analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2008; 282 : 112–119.
- Fryns JP, Van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998;81:171–6.
- Jaumaux E, Hustin J. Histological examination of first trimester spontaneous abortions: the impact of materno-embryonic interface features. *Histopathology.* 1992;21:409-14.
- Jobanputra V, Esteves C, Sobrino A, et al. (2011). Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens. *Prenat Diagn.* 2011; 31(8): 755-9.
- Johnson MP, Drugan, A, Koppitch FC, et al. Postmortem chorionic villus sampling is a better method for cytogenetic evaluation of early fetal loss than culture of abortus material. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 1990; 163:1505–1510.
- Hassold TJ, Chen M, Funkhouser J et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Annals of Human Genetics.* 1980 ; 44 :151.

Références bibliographiques

Hassold T, Jacobs PA, Pettay D. Cytogenetic studies of couples with repeated spontaneous abortions of known karyotype. *Genet Epidemiol.* 1988; 5:65–74.

Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril.* 1996; 66:24–7.

Houwert-de Jong MH, Bruinse HW, et al. Early recurrent miscarriage: histology of conception products. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990; 97:533–535.

Gardo S, Bajnoczky K. Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1992;47:117–20.

Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14(5):855–65.

Gross SJ, Bajaj K, Garry D, et al. Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenat Diagn.* 2011;31:295–66.

Guernen S, Bettio D, Simom G. Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Human Reproduction.* 1987;2:735–9.

Kajii T, Ohama K, Niikawa N et al. Banding analysis of abnormal karyotypes in spontaneous abortion. *American Journal of Human Genetics.* 1973;25:539.

Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, et al. (1980). Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet.* 1980; 55 (1) : 87-98.

Kalousek DK, Barrett IJ, McGillivray BC. Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am J Hum Genet.* 1989 ; 44:338–343.

Keren B, Sanlaville D. Nouveaux outils diagnostiques du retard mental. *mt pédiatri.* 2008 ;11(4).

Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1991; 39: 31–36.

Kuliev A, Verlinsky Y. Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* 2004; 10: 401–407.

Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 111: 193–198.

Lanasa MC, Hogge WA, Kubik CJ et al. A novel X-chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185: 563-8.

Lejeune V. Fausses couches spontanées précoces répétées : quelle prise en charge proposer en 2006?. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 2006 ; 34 : 927–937.

Lissalde-Lavigne G, Cochery-Nouvellon E, Mares P, et al. Association entre thrombophilies héréditaires et pertes foetales : état des lieux 2005. *Hématologie.* 2006 ; 12 (3) : 171-9.

Lazda EJ, Sams VR. The effects of gemeprost on the second trimester fetus. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995 ; 102:731–734.

Mares P, JC Gris, Sina D, Ripart-Neveu S, Tayrac R. Prise en charge actuelle des fausses couches spontanées à répétition. *Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction.* 2004 ; 6 (5) : 309-11.

Martin, RH. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.* 2006 ; 22 : 142–147.

Références bibliographiques

- Menten B, Swerts K, DelleChiaie B, et al. Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors *in utero* samples. *BMC Medical Genetics*. 2009; 10:89.
- Mercy YL, Robin LB, Devki S, et al. Genetic Evaluation and Counseling of Couples with Recurrent Miscarriage: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling*. 2005; 14(3).
- Merviel P, Lanta S, Allier G, et al. Avortements spontanés à répétition. *EMC-Gynécologie Obstétrique*. 2005; 2: 278–296.
- Minguillon C, Eiben B, Bahr-Porsch S et al. The predictive value of chorionic villus histology for identifying chromosomally normal and abnormal spontaneous abortions. *Human Genetics*. 1989;82:373-6.
- Nobuaki Ozawa . Cytogenetic Analysis of Spontaneous Miscarriage. The Human Embryo. New York: Shigehito Yamada; 2012: chapitre 10.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, et al. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. 2000;320:1708–1712.
- Ohno M, Maeda T, Matsunobu A. A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Obstetrics & Gynecology*. 1991;77:394-8.
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S et al. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*. 2000;73:300–4.
- Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, et al. MLPA vs multiprobe FISH : comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet*. 2006 ; 69 : 228-33.
- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2005 Jul;272(2):95-108.
- Paxton CN, Arthur R, Brothman AR and Geiersbach KB. Rapid aneuploidy detection in products of conception using the KaryoLite™ BACs-on-Beads™ assay. *Prenatal Diagnosis*. 2013; 33: 25–31.
- Portnoi MF, Joye N, Van den Akker J, et al. Karyotypes of 1142 couples with recurrent abortion. *Obstet Gynecol*. 1988;72: 31–4.
- Rachebrochard E et Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage , results of a multicentre study. *Human reproduction*. 2002;17 (6):1694-1656.
- Rai, R. & Regan, L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006; 368: 601-11.
- Rehder H, Coerdts W, Eggers R et al. Is there a correlation between morphological and cytogenetic findings in placental tissue from early missed abortions. *Human Genetics*. 1989;82:377-85.
- Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *Br Med J*. 1989 ; 299 : 541-545.
- Romana S. et Malan V. Cytogénétique moléculaire. Paris : Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale ; 2010 : 15-23.
- Rushton DI. Simplified classification of spontaneous abortions. *J Med Genet*. 1978; 15:1–9.
- Rushton DI. The classification and mechanisms of spontaneous abortion. *Perspect Pediatr Pathol*. 1984; 8:269–287.
- Shaffer LG, Coppinger J, Morton SA. The development of a rapid assay for prenatal testing of common aneuploidies and

microdeletion syndromes. *Prenat Diagn.* 2011; 31: 778–787

Shanga KK, Stephenson MD, Brown CJ et al . Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 913-7.

Sharp AJ. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum Mutat.* 2009; 30: 135–144.

Sheath KL , Duffy L, Asquith P, et al. Bacterial artificial chromosomes (BACs)-on-Beads™ as a diagnostic platform for the rapid aneuploidy screening of products of conception . *Molecular medicine reports.* 2013; 8: 650-654.

Simpson J L, Bombard A. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion: frequency, pathology and genetic counselling. In: Bennett MJ & Edmonds DK(eds) *Spontaneous and recurrent abortion. Oxford: BlackwellBlackwell Scientific Publications; 1987: 20- 66.*

Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol*; 2007; 50(1): 10–30.

Solveig M et Pflueger V,. The Cytogenetics of Spontaneous Abortion. *The Principles of Clinical Cytogenetics.* 2005; 323-345.

Stein Z, Kline J, Susser E, et al. *Maternal age and spontaneous abortion.* In: Porter IH, Hook EB, eds. *Human embryonic and fetal death.* New York: Academic Press; 1980:107– 127.

Stirrat GM. Recurrent miscarriage and epidemiology. *The Lancet.* 1990; 90:673–675.

Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP (2002). Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *HumReprod.* 2002; 17 (2): 446-51.

Stern JJ, Dorfmann AD, Gutierrez- Najar AJ, et al. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 1996 ; 65 : 250-253.

Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod.* 2002;17:446–51.

Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M et al. Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotyp. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 1992;9:458-61.

Sullivan AE, Silver RM, Lacoursiere DY et al. Antiphospholipid syndrome: obstetric diagnosis, management and controversies. *Obstet Gynecol.* 2003;101:1333–44.

Sullivan AE, Lewis T, Stephenson M, et al. Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation. *Obstet Gynecol.* 2003; 101: 1236-42.

Thomas, J.H. Genomic imprinting proposed as a surveillance mechanism for chromosome loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92, 480–482.

The ESHRE Capri Workshop Group (2008). Genetic aspects of female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2008;14 (4): 293-307.

Villard F et MolinaGomes D. Les nouvelles technologies d'analyse du génome : quelles utilisations en diagnostic prénatal. *Gynecol Obst et Fertil.* 2010;39(1) :32-41.

Vialard F, Simoni G, Gomes DM et al. Prenatal BACs-on- Beads™: the prospective experience of five prenatal diagnosis laboratories. *Prenat Diagn.* 2012;32:329–35.

Vialard F, Simoni G, Aboura A, et al. Prenatal BACs-on-Beads: a new technology for rapid

Références bibliographiques

detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2011;31:500–8.

Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IY, et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53:375–380.

Warburton D, Stein Z, Kline J et al. Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: data from the Meww York City Study. In: Porter IH 5 Hook EB (eds) *Human Embryonic and Fetal Death. Hew York: AcademicAcademic Press; 1980:261.*

Yee Khong T. Spontaneous Abortion and the Pathology of Early Pregnancy. *Fetal and Neonatal Pathology.* 2007; 5: 102-122 .

Annexes

Annexes

Annexe 1

Questionnaire

Nom :

Prénom :

Age :

Adresse :

Profession:

Groupe:

Antécédents familiaux :

- Médicaux :
- Chirurgicaux :

Antécédents personnels :

- Médicaux :
- Chirurgicaux :
- Gynéco obstétriques :

Gestations:

Parité:

ABRT:

- Age de grossesse:
- Curetage : oui non

Antécédents de malformations:

- Oui Non
- Type de malformation:

Antécédents de malformations dans la fratrie :

- Oui Non
- Type de malformation:

Rapport de consanguinité :

Degré de consanguinité :

Grossesse actuelle:

DDR:

Age de grossesse:

Test de grossesse: Oui Non

Premier Trimestre: - Bilan sanguin

- Sérologie: - toxoplasmose

- rubéole

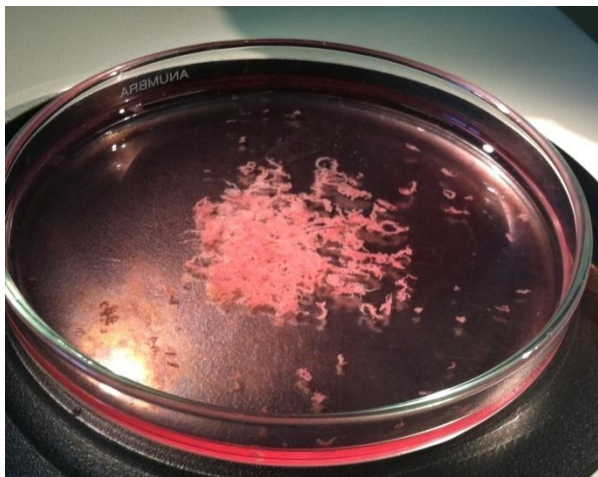
- Ecographie précoce

Deuxième trimestre : - Bilan sanguin et urinaire.....

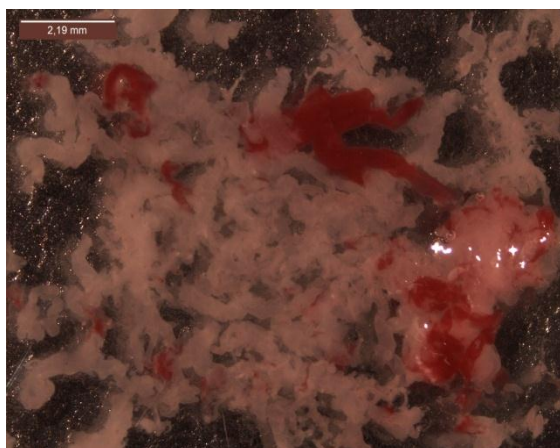
- Echographie malformative

Annexes

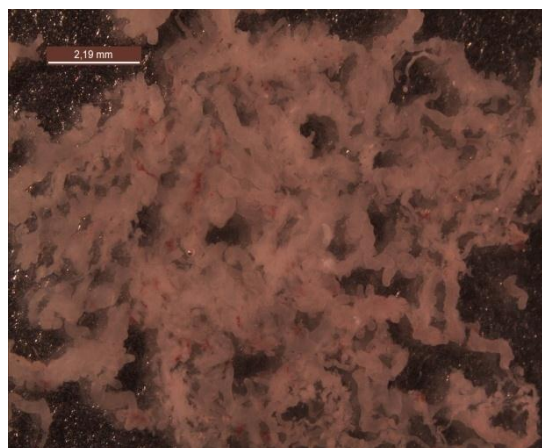
Annexe 2



L'aspect macroscopique des villosités choriales issues de produit de curetage



Avant



Après

Des villosités choriales avant et après le tri et l'élimination des parties non fœtales et les petits caillots

Annexes

Annexe 3

1- Préparation de l'échantillon	 200 µL de dilution + 200 µL de B3 Vortexer
2- Précipitation de l'ADN	200 µL d'éthanol Vortexer
3- Rétention de l'ADN sur la membrane	 Eluer la préparation  11,000 x g 1 min
4- Lavage de la membrane de silice	1er lavage 500 µL de BW  11,000 x g 1 min 2ème lavage 600 µL de B5  11,000 x g 1 min
5- Séchage de la membrane	 11,000 x g 3 min
6- Elution de l'ADN	 35 µL de BE (70 °C) 1 min à TA  11,000 x g 2 min puis 1 min en repositionnant l'éluant

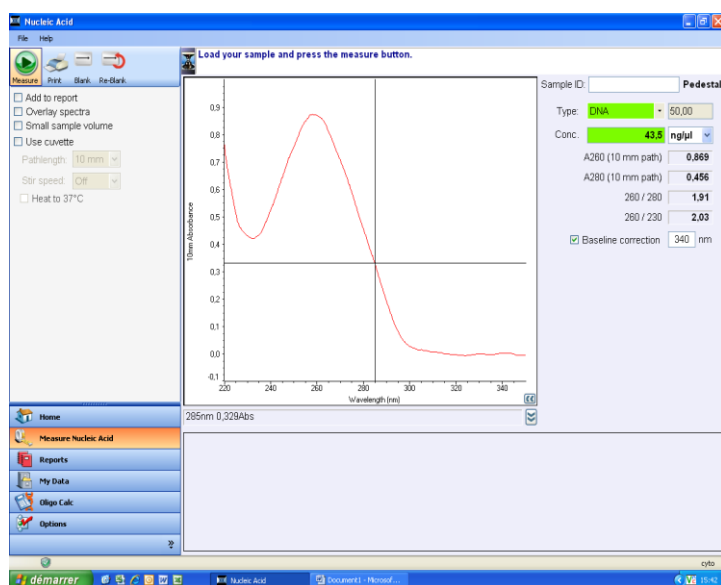
Annexes

Annexe 4

Le Nanodrop est un spectrophotomètre UV-Visible permettant d'effectuer des mesures de concentrations en acides nucléiques particulièrement précises sur des micro volumes d'échantillons (1 à 2µl) avec une reproductibilité optimale

MATERIELS

- Nanodrop 2000C (*Thermo Scientific*).
- Ordinateur.
- Logiciel du Nanodrop.
- Pipette 10µl.
- Cônes stériles 10µl.
- Essuyeur de Précision (papier absorbant)
- Eau stérile, Molecular Biology Reagent de SIGMA (Ref. : W4502).
- Tampon d'élution BE0 présent dans les kits d'extraction



La
mes
ure
de
la
con

centration d'ADN « DO » en utilisant Le Nanodrop

Annexes

Annexe 5

La description des kits de Prénatal BoBs

Cible	Région cible	Clone	Bande Cytogénétique	Début (ko)	Fin (ko)	Position centrale linéaire (Mo)
Région du syndrome de Wolf-Hirschhorn	4p16.3	1	4p16.3	1 467	1 677	1,57
		2	4p16.3	1 595	1 785	1,69
		3	4p16.3	1 705	1 918	1,81
		4	4p16.3	1 850	2 043	1,95
		5	4p16.3	2 127	2 322	2,22
Région du syndrome du Cri du Chat	5p15.3-p15.2	1	5p15.33	3 055	3 214	3,13
		2	5p15.32	4 545	4 707	4,63
		3	5p15.32	5 879	6 020	5,95
		4	5p15.31	6 357	6 533	6,45
		5	5p15.2	8 165	8 321	8,24
		6	5p15.2	9 086	9 240	9,16
		7	5p15.2	9 866	10 044	9,95
		8	5p15.2	10 622	10 774	10,7
Région du syndrome de Williams-Beuren	7q11.2	1	7q11.23	72 598	72 717	72,66
		2	7q11.23	72 640	72 819	72,73
		3	7q11.23	73 048	73 146	73,10
		4	7q11.23	73 146	73 291	73,22
		5	7q11.23	73 500	73 639	73,57
Région du syndrome de Langer-Giedion	8q23-q24	1	8q23.3	116 388	116 555	116,47
		2	8q23.3	116 555	116 738	116,65
		3	8q23.3	116 804	116 962	116,88
		4	8q23.3	117 604	117 738	117,67
		5	8q24.11	118 527	118 723	118,62
		6	8q24.11	118 757	118 949	118,85
		7	8q24.11	119 107	119 260	119,18
Régions du syndrome de Prader-Willi / Angelman	15q11-q12	1	15q11.2	21 523	21 707	21,62
		2	15q11.2	22 627	22 804	22,72
		3	15q11.2	22 737	22 904	22,82
		4	15q11.2	22 908	23 069	22,99
		5	15q11.2	23 144	23 263	23,20
		6	15q12	23 337	23 504	23,42
		7	15q12	24 371	24 550	24,46

Annexes

Cible	Région cible	Clone	Bande Cytogénétique	Début (ko)	Fin (ko)	Position centrale linéaire (Mo)
Région du syndrome de Miller-Dieker	17p13.3	1	17p13.3	836	1 008	0,92
		2	17p13.3	1 336	1 531	1,43
		3	17p13.3	1 565	1 776	1,67
		4	17p13.3	2 027	2 250	2,14
		5	17p13.3	2 177	2 316	2,25
		6	17p13.3	2 312	2 492	2,40
Région du syndrome de Smith-Magenis	17p11.2	1	17p11.2	16 789	16 976	16,88
		2	17p11.2	17 473	17 659	17,57
		3	17p11.2	18 141	18 319	18,23
		4	17p11.2	20 013	20 186	20,10
Régions du syndrome de DiGeorge	22q11.2	1	22q11.21	17 736	17 777	17,76
		2	22q11.21	17 865	18 040	17,95
		3	22q11.21	18 073	18 287	18,18
		4	22q11.21	18 138	18 300	18,22
	10p14	1	10p14	10 656	10 781	10,72
		2	10p14	11 193	11 358	11,28
		3	10p14	11 409	11 592	11,50
		4	10p14	12 011	12 206	12,11
Aneuploïdie du chromosome 13	Chr 13	1	13q13.3	38 744	38 911	38,83
		2	13q14.11	42 155	42 301	42,23
		3	13q14.12	45 227	45 407	45,32
		4	13q14.2	47 795	47 964	47,88
		5	13q21.2	58 739	58 892	58,82
Aneuploïdie du chromosome 18	Chr 18	1	18p11.32	2 735	2 908	2,82
		2	18p11.21	13 989	14 143	14,07
		3	18q12.1	30 827	30 986	30,91
		4	18q21.2	51 861	52 034	51,95
		5	18q22.1	61 790	61 971	61,88
Aneuploïdie du chromosome 21	Chr 21	1	21q22.11	32 208	32 373	32,29
		2	21q22.12	34 661	34 820	34,74
		3	21q22.12	35 229	35 372	35,30
		4	21q22.3	43 556	43 770	43,66
		5	21q22.3	44 146	44 311	44,23

Annexes

Cible	Région cible	Clone	Bande Cytogénétique	Début (ko)	Fin (ko)	Position centrale linéaire (Mo)
Aneuploïdie du chromosome X	Chr X	1	Xp22.31	6 958	7 137	7,05
		2	Xp22.2	10 699	10 763	10,73
		3	Xp21.1	37 368	37 555	37,46
		4	Xq13.2	73 303	73 450	73,38
		5	Xq27.3	146 757	146 960	146,86
Aneuploïdie du chromosome Y	Chr Y	1	Yp11.2	8 461	8 636	8,55
		2	Yq11.221	15 036	15 174	15,10
		3	Yq11.222	19 299	19 472	19,39
		4	Yq11.223	25 313	25 468	25,39
		5	Yq11.23	25 489	25 646	25,57

Annexe 6

La réactifs et matériel de Prénatal BoBs :

Le trousseau prénatal BoBs™ Dosage BACs-on-Beads™, Réactifs pour 96 hybridations,
POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*

Fabriqué par : Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku, Finlande

Sample Diluent (Diluant de l'échantillon), 2 flacons, 1000 µL, lot nr. 614869

BACs-on-Beads Mix (Mélange BACs-on-Beads), 1 flacon, 110 µL, lot nr 61889

Reporter Concentrate (Concentré Rapporteur), 1 bouteille, 45 µL, lot nr 618893

Reporter Diluent (Diluant Rapporteur), 1 bouteille, 11.2 mL, lot nr 618894

Wash Buffer 1 (Tampon de Lavage 1), 1 bouteille, 12.5 mL, lot nr 613953

Wash Buffer 2 (Tampon de Lavage 2), 1 bouteille, 46 mL, lot nr 618891

Trousseau de extraction ADN, QIAamp DNA Mini kit for Purification of up to 50 kb
genomic DNA (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden

Logiciel d'analyse BoBsoft (n° réf. 5012-0020)

Système d'appareil Luminex® 100/200™ (n° réf. 1014-0020)

Incubateur(s)/agitateur(s) capable(s) de maintenir des températures de +37 (±1) °C, +50 (±1) °C, +52 (±1) °C et d'agiter à 1 200 rpm avec une orbite de 2–3 mm de diamètre. Le dispositif doit s'adapter à une plaque PCR de 96 puits préservant l'étanchéité et à une plaque filtrante de 96 puits, par exemple deux TriNEST™⁴ Microplate Incubator Shakers (n° réf. 1296-0050) ou équivalent.

Tubes ou barettes à capuchon PCR à parois fines de 250 µL

Tubes de microcentrifugation de 1.5 mL, à faible rétention

Tubes de polypropylène de 15 mL

Plaque PCR de 96 puits avec jupe correspondant au thermocycleur PCR et à l'incubateur/agitateur utilisés

Plaque filtrante de 96 puits MultiScreen_{HTS} HV, 0.45 µm transparente correspondant à l'incubateur/agitateur utilisé

Scelleuse PCR de Microseal F Film – scelleuse de film en aluminium pour les microplaques, grade PCR

Annexes

Annexe 7

Protocol du Caryotype en Bandes G:

I. Culture :

I.1 – Préparation de la biopsie

Le prélèvement arrive dans son milieu de transport, le Chang-D. Les opérations suivantes se déroulent dans ce milieu.

- Mettre la biopsie dans une boîte de Petri stérile et recouvrir de milieu
- Rincer avec le milieu lorsque le prélèvement est sanglant
- Vérifier la pureté de la biopsie par observation à la loupe binoculaire, bien repérer les villosités chorales
- Toujours sous la loupe, éliminer à l'aiguille les parties non fœtales, petits caillots et autres
- Fragmenter les villosités à l'aide de 2 aiguilles en fragments de quelques mm³
- A ce stade, séparer quelques villosités pour la technique directe
- Mettre les fragments restants dans un tube à centrifuger stérile contenant du Chang pour la technique avec culture
- Garder le milieu de transport pour la culture de secours

I.2 – Milieux de culture :

Milieu de Chang :

- Chang medium D 100 ml
- Péni-streptomycine 1 ml

I.3 – Mise en culture :

- Allumer l'incubateur de paillasse et mettre la trypsine-EDTA et la collagénase à préchauffer à 37°C
- Retirer le milieu de culture du tube et ajouter 2 ml de Collagénase.
- Placer le tube sur l'agitateur rotatif et traiter pendant 20 à 30 min à 37° C en fonction de la taille du prélèvement.
- Centrifuger 5 min à 800 t/min puis éliminer le surnageant.
- Ajouter 2 ml de Trypsin-EDTA 1x, puis traiter 20 à 30 min à 37°C (agitateur rotatif dans incubateur de paillasse)
- Centrifuger 5 min à 800 t/min puis éliminer le surnageant.
- Rajouter 1ml de Chang-D .
- Centrifuger 5 min à 800 t/min puis éliminer le surnageant.

Annexes

En fonction de la quantité de culot, on peut faire un flacon de culture et des lames in situ. Si le culot est petit, ne faire que le flacon.

- Ajouter la quantité de Chang-D nécessaire : 1 ml pour le flacon et 1 ml par LIS
- bien mélanger culot et milieu à la pipette
- Répartir la suspension dans le flacon de culture filtrant traité au collagène et sur les lames in situ
- Faire la culture de secours : centrifuger le milieu de transport et mettre le culot en culture dans un flacon filtrant classique avec 1 ml de Chang D
- Disposer les flacons à plat sur un plateau stérile portant le jour et la date de mise en culture et placer dans l'incubateur à CO₂. (37°C et 5% de CO₂)

I.4 – Réactifs et Matériel :

- *Collagénase* : Collagénase type IV SIGMA Ref. C5138
- *Trypsin-EDTA* : Trypsin-EDTA solution Ref. T3924 Sigma
- *Chang-D* : Chang Medium D IRVINE SCIENTIFIC Réf. T105
- *Peni Streptomycine* : 10000 U BIOCHROM Réf : 60701 Polylabo .Reprendre dans 5 ml d'eau stérile et utiliser tel quel.
- *Flacons de culture au collagène* : BD 50 ml bouchons filtrants Ref. 354484
- *Plateau métallique stérile*

II – SUIVI DES CULTURES EN FLACON :

II.1 – Changements de milieu :

- Après 3 jours de culture, observer la pousse cellulaire au microscope inversé
- Si la pousse a démarré, effectuer un changement de milieu : dans le PSM, aspirer le milieu à l'aide d'une pipette pasteur couplée à la trompe à vide puis remettre du Chang-D frais : environ 7-10 ml
- Dans le cas contraire, rajouter 0.5 à 1 ml de Chang très doucement pour ne pas décoller les explants.
- Renouveler les changements de milieu tous les 3 jours, également avec du Chang D.

II.2 – Contrôle de la pousse cellulaire :

Après le premier changement de milieu, surveiller la pousse cellulaire dans tous les flacons chaque jour au microscope inversé.

Repérer le nombre et la densité des clones qui se sont fixés sur le fond du flacon.

Si le flacon contient au moins une dizaine de clones, on peut effectuer un repiquage

II.3 – Repiquages :

Annexes

Cela consiste à décoller les cellules et à les réensemencer dans un autre flacon qui sera repéré par A₁.

- Aspirer le milieu puis rincer avec environ 1 ml de solution de trypsine à 0,25 % **stérile**

- Aspirer de suite puis remettre 19 gouttes de trypsine, laisser en contact environ 20 min à l'étuve à 37°C en surveillant le décollement des cellules

- Remettre en suspension avec la pipette en aspirant et refoulant 4 ou 5 fois de suite pour bien dissocier les cellules.

- transférer dans le nouveau flacon (normal, non traité) une quantité de suspension qui dépend de la densité cellulaire obtenue, ajouter le milieu de culture Amniomax C100 puis bien mélanger par aspiration-refoulement.

- Surveiller la pousse cellulaire dès le lendemain. Les flacons sont prêts à techniquer quand la pousse recouvre environ 80% du fond du flacon.

II.4 – Réactifs et Matériel

- *Trypsine* : Trypsine Seromed à 0,25% sans Ca ni Mg Ref. 55282.01

- *Pipettes 10 ml usage unique* : stériles cotonnées Ref. 04017551

- *Béchers 125 ml stériles* (passage à l'autoclave)

- *Plateau métallique stérile*

- *Flacons de culture* : NUNC 50 ml bouchons filtrants Ref. 055422

III – SORTIE DE CULTURE EN FLACON

Il faut faire un changement de milieu 17 heures avant la technique.

III.1- Changement de milieu :

En pratique, changer de milieu à 14 H 30 la veille pour un blocage des métaphases à 8H30 le matin de la technique.

III.2 – Blocage des métaphases

Mettre dans chaque flacon 0,1 ml de Colcemid pour environ 8 ml de milieu

Laisser agir 2 heures à 37°C dans l'incubateur à CO₂

III.3 – Récupération des cellules :

- Préparer un tube à centrifuger 10 ml pour chaque flacon de culture et un cryotube 2 ml

- Trypsiner les cultures : récupérer le milieu, rincer avec 1 ml de trypsine à 0,25 %, récupérer le rinçage puis rajouter 1 ml de trypsine.

- Laisser agir 20 min à l'incubateur CO₂ en surveillant le décollement.

- Remettre en suspension avec la pipette en aspirant et refoulant 4 ou 5 fois de suite pour bien dissocier les cellules.

Annexes

- Centrifuger l'ensemble suspension-rinçage-milieu 10 min à 1200t/mn puis éliminer le surnageant avant de passer au choc hypotonique

III.7 – Réactifs :

- *Trypsine* : Trypsine Seromed à 0,25% sans Ca ni Mg Ref. 55282.01
- *Colcemid* : Colcemid dans HBSS Réf : 152.100 40

IV . BANDING G :

Reprendre les lames à la fin de la période de séchage. Lors des différentes étapes, les lames sont placées dans des paniers plastiques et les solutions dans des cuves en verre, sauf pour la trypsinisation : cuve porcelaine dans un bain marie à circulation.

- Colorer dans du Giemsa à 10 % pendant 10 min.
- Décolorer dans du méthanol 5 min. puis laisser sécher 5 min.
- Réhydrater dans du PBS 5 min.
- Bain de trypsine à 0,1% à 20° de 20 secondes à 2 min.
- Rincer dans 2 bains de PBS successifs.
- Colorer 10 min. dans la solution suivante :

. Giemsa pur	5 ml
. Acide Citrique 0,1 M	3 ml
. Méthanol	3 ml
. Disodium phosphate 0,2 N	8,5 ml
. Eau Volvic qsp	100 ml

- Vérifier la première lame au microscope et ajuster le temps de trypsinisation en fonction du résultat. Opérer de la même manière pour les autres lames.

Réactifs :

- *Méthanol* : fourni par la Pharmacie du C.H.U
- *PBS* : PBS en poudre. Reconstituer la solution et employer directement
- *Acide citrique* : Citric Acid anhydrous SIGMA Ref. C 0759

Préparer une solution à 0,1 M : 2,1 g/100 ml

- *Giemsa* : Giemsa rapide RAL CML Réf. 32 0314
- *Disodium phosphate* : 2H₂O 99,5% mini. MERCK Réf. 28029292. Préparer une solution à 0,2 N : 35.814 g/ 100 ml
- *Trypsine* : TRYPSIN 250 DIFCO Réf. 0152-13.

Annexes

Annexe 8

SALSA MLPA P036-E1 Human Telomere-3 probemix

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 §	1p	TNFRSF4	02269-L01761	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3p	CHL1	01721-L01329	03-000.34
151	4p	PIGG (FLJ20265)	02005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6p	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC8A (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 +	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24 (Acrocentric chromosome)
227 +	14q-cen	CCNB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.86 (Acrocentric chromosome)
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36 (Acrocentric chromosome)
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
283 +	21q-cen	RBM11	01739-L01311	21-014.51 (Acrocentric chromosome)
289 +	22q-cen	BID	01740-L01310	22-016.61 (Acrocentric chromosome)
298	Xp/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52 (PAR1 region)
307	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	02392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH1	02013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330 §	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	01746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
355	7q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
361	8q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
379	10q	PAOX (PAO)	09142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
411	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
441	18q	C18orf22 (FLJ21172)	01758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458	20q	OPRL1	02688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telom.)

Many notes on individual probes are present on page 7 and 8.

§ New in version E1 (from lot 0808 onwards)

+ The 13, 14, 15, 21 & 22 q-cen probes target the q arm close to the centromer (acrocentric chromosomes).

Annexes

SALSA MLPA P070-B2 Human Telomere-5 probemix

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation (autosomal)			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene ; X-111.95)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene ; Y-013.98)			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (DDX3Y gene ; Y-013.54)			
132	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	04084-L03605	01-247.08
139	2q	ATG4B (=APG4B)	02781-L03168	02-242.25
145	3q	KIAA0226	02690-L02842	03-198.88
152	4q	FRG1	02691-L02843	04-191.10
160	5q	GNB2L1	02790-L02232	05-180.60
166	6q	TBP	02694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	02793-L03167	07-158.63
179 ±	8q	RECQL4	02695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	02792-L02846	09-139.78
193 ±	10q	ECHS1	02696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B (=KIAA1030)	02697-L02848	11-133.29
211	12q	ZNF10	02686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	02698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	02699-L02850	14-104.99
233	15q	TM2D3 (=FLJ22604)	02701-L02851	15-100.01
241	16q	GAS8 (=GAS11)	02702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	02703-L03169	17-077.87
258	18q	CTDP1	02704-L03607	18-075.58
265 ±	19q	CHMP2A (=BC-2)	02705-L02853	19-063.76
274	20q	UCKL1 (=FLJ20517)	02706-L00642	20-062.05
281	21q	S100B	02587-L02854	21-046.85
290	22q	ARSA	02707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7 (=SYBL1)	02708-L02855	X-154.82 + Y-057.68 (PAR region)
306 ±	1p	TNFRSF18	02270-L01762	01-001.13
315	2p	ACP1	02709-L02856	02-000.27
323	3p	CHL1	02896-L02363	03-000.34
329	4p	PIGG	14440-L16146	04-000.51
337	5p	CCDC127 (=LOC133957)	02791-L02233	05-000.26
346	6p	IRF4	04077-L03462	06-000.34
355*	7p	SUN1 (UNC84A)	02780-L02857	07-000.84
362	8p	FBXO25	02715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8 (=FLJ00026)	02716-L00688	09-000.38
379	10p	ZMYND11 (=BS69)	05180-L16343	10-000.22
387	11p	BET1L	02784-L02226	11-000.20
393 *	12p	KDM5A (JARID1A (=RBBP2))	02787-L02229	12-000.29
402 + ±	"13p"	PSPC1	02717-L03608	13-019.25 (Acrocentric)
409 +	"14p"	PARP2 (=ADPRTL2)	02718-L00732	14-019.90 (Acrocentric)
418 + ±	"15p"	NDN	04026-L01542	15-021.48 (Acrocentric)
427 ±	16p	DECR2	02720-L00648	16-000.40
436	17p	RPH3AL	04081-L03465	17-000.18
444	18p	THOC1	02789-L02231	18-000.20
450	19p	PPAP2C	03501-L02880	19-000.23
459	20p	ZCCHC3 (=FLJ22115)	02723-L00641	20-000.23
466 +	"21p"	HSPA13 (=STCH)	02724-L00334	21-014.68 (Acrocentric)
479 +	"22p"	IL17RA	02725-L16344	22-015.96 (Acrocentric)
484	X/Yp (PAR1)	SHOX	03714-L16345	X/Y-000.52 (PAR region)

+ The 13, 14, 15, 21 & 22 "p" probes in fact target the q arm, as these chromosomes are acrocentric. The lengths of some probes in this description have been adjusted as compared to previous versions.

Annexes

SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion probemix

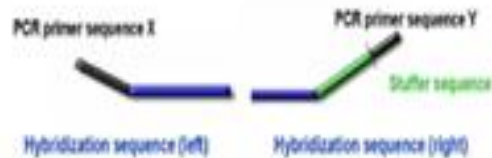
Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	TNFRSF4 Probe 2269–L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 Probe 7632–L07317	10p	DiGeorge region 2 (10p)
142	PAFAH1B1 Probe 4120–L03532	17p13.3	Miller-Dieker region
148	MECP2 Probe 9310–L09999	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
154	NSD1 Probe 2595–L08077	5q35.3	Sotos syndrome
160	UBE3A Probe 4620–L00863	15q12	Prader-Willi / Angelman
166	GABRD Probe 4690–L07966	1p36.33	1p36 deletion syndrome
172	CREBBP Probe 3087–L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi syndrome
178	GNB1 Probe 2890–L07968	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184	MECP2 Probe 9311–L10002	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
190	SEMA7A Probe 8380–L10003	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
196	CLDN5 Probe 1218–L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202	MECP2 Probe 3409–L02797	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
208	GP1BB Probe 5464–L10114	22q11.21	DiGeorge syndrome
214	NDN Probe 6282–L01542	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
220	PAX6 Probe 3253–L02690	11p13	Wagr syndrome
226	MAPT Probe 7856–L08385	17q21.31	"17q21 microdeletion"
232	LETM1 Probe 4190–L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
238	PAFAH1B1 Probe 1443–L08394	17p13.3	Miller-Dieker region
247	SNRPN Probe 2026–L10004	15q12	Prader-Willi / Angelman
253 †	SHANK3 Probe 10181–L11409	22q13.33	22q13 / Phelan-Mcdermid
260	NF1 Probe 3778–L11180	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
267	FANCL Probe 8386–L11411	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"
274	LRRC48 Probe 1452–L00936	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283	CRR9 Probe 1126–L00684	5p15.3	Cri du Chat syndrome
292	SNRPN Probe 1318–L07970	15q12	Prader-Willi / Angelman
297	DMD Probe 1412–L01059	Xp21.2	Chromosome X control probe
303	LLGL1 Probe 1453–L08499	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
310	ELN Probe 1333–L00876	7q11.23	Williams syndrome
319	TGFBR1 Probe 4652–L04036	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
325	CYP1A1 Probe 6811–L06406	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
335	NF1 Probe 2508–L02620	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
342	MAPT Probe 7857–L08501	17q21.31	"17q21 microdeletion"
349	Hs.538604 Probe 1232–L07388	10p15.1	DiGeorge region 2 (10p)
359	DLG1 Probe 8395–L08249	3q29	"3q29 deletion syndrome"
364	ELN Probe 1336–L00878	7q11.23	Williams syndrome
373	SNAP29 Probe 1235–L00773	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 †	SHANK3 Probe 10182–L11174	22q13.33	22q13 / Phelan-Mcdermid
391	LIMK1 Probe 1337–L02333	7q11.23	Williams syndrome
401	TRPS1 Probe 3081–L07411	8q24.12	Langer-Giedion syndrome
409	TGFBR1 Probe 4653–L10006	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
418	DLG1 Probe 8401–L08255	3q29	"3q29 deletion syndrome"
427	EIF3S3 Probe 1108–L00679	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
436	TERT Probe 3761–L02477	5p15.33	Cri du Chat syndrome
445	WHSC1 Probe 6058–L05513	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
454	NSD1 Probe 2600–L02071	5q35.3	Sotos syndrome
465 †	RAI1 Probe 9440–L11412	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
472	CRHR1 Probe 7859–L07620	17q21.31	"17q21 microdeletion"
486	REL Probe 9860–L10628	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"

Annexes

Annexe 9

Principe de la MLPA

I- Sonde de MLPA SALSA



II- Hybridation

- Le mélange des sondes est ajouté à l'ADN génomique dénaturé
- les 2 hémisondes s'hybrident sur leur séquence-cible adjacentes



III- ligation

- Les hémisondes sont liguées par une ligase Thermostable



IV- Amplification

- Des amorces universelles sont utilisées pour amplifier les sondes liguées (amorce sens fluorescente)
- Chaque produit d'amplification a une taille unique connue



V- Séparation et quantification par électrophorèse capillaire

- Chaque pic correspond à un amplicon
- Le hauteur du pic et l'aire sous la courbe sont proportionnelles à la quantité de matériel génomique initialement présent

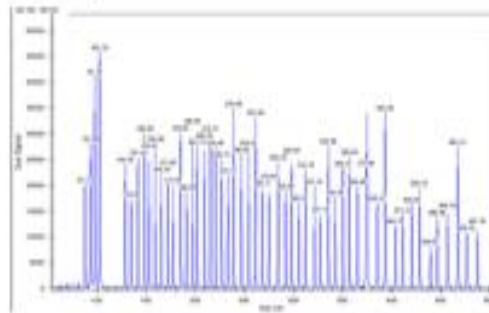


Fig.A: Pic de profil d'intensité de fluorescence

VI- Interprétation des résultats

- les données ont été analysées à l'aide du logiciel GenomeLab (Beckman-Coulter)
- les échantillons sont normalisés grâce à des échantillons contrôles (ADN de sujets sains) afin d'obtenir le nombre de copie relatif (RCN) de matériel génomique
- le RCN est proche de 1 lorsque le locus étudié est présent en 2 copies
- la présence d'une délétion est définie par un ratio $\leq 0,7$ sur 2 sondes consécutives
- Un gain de matériel est défini par un ratio $\geq 1,3$ sur 2 sondes consécutives



Annexe 10

Préparation des mix d'Hybridation, de Ligation et de PCR :

- Vortexer le tampon SALSA MLPA buffer, Ligase-65 Buffer A , Buffer B, primer mix.
- Vortexer plus doucement les sondes SALSA MLPA Probemix (P036 , P070 et P245)
- Dans des tubes de 0,5 ml appelés P036, P070 et P245:

→ 1,3μl*N+1,5 de Probemix P036 Telomere 3 *ou*
Probemix P070 Telomere 5 *ou*
Probemix P245 Microdeletion 1

→ 1,5μl*N+1,5 de SALSA MLPA buffer

→ 1,2μL*N+1,5 d'H₂O stérile

- Dans un tube de 1,5 ml (ou 2mL) appelé LIG :

→ 3μL*N+2 de Ligase-65 Buffer A,

→ 3μL*N+2 de Ligase-65 Buffer B,

→ 25μL*N+2 d'H₂O,

- Vortexer

Dans le tube 1,5 mL (ou 2 mL) appelé PCR :

→ 1μL*N+2 de SALSA PCR Primer mix,

→ 3.75μL*N+2 H₂O

- Congéler les mix LIG et PCR à -20°C pour le jour2.

Fin de la préparation des mixes LIG et PCR :

- Vortexer doucement le tube de SALSA Ligase-65
- Ajouter 1μL*N+2 de SALSA Ligase 65 dans le tube LIG
- Ajouter 0.25*N+2 de SALSA Polymérase (bouchon orange) dans le tube PCR et vortexer
- Stocker le mix PCR dans un portoir réfrigéré à 4°C

Annexe 11

Réactifs et consommable pour la MLPA

SALSA MLPA buffer / SALSA MLPA Probemix P036-E1 Telomere 3 - P070-B1 Télomère
5 - P245-A2 Microdeletion 1 /Ligase-65 Buffer A / Ligase-65 Buffer B / SALSA PCR Buffer/
SALSA Enzyme Dilution Buffer / SALSA PCR Primer mix / SALSA Polymérase (MRC-
Holland- Mélange SLS + 600nt (Beckman-Coulter)

Barettes Microtubes Eppendorf safe lock 0,2 ml.

Eau stérile Aliquotée en tube 1.5 ml, T° ambiante ou congelée

Standard de taille 600nt (Beckman-Coulter)

Cartouche de gel (Beckman-Coulter)

Tampon de migration (Beckman-Coulter) - Huile minérale (Sigma)

Plaques ECHANTILLON et TAMPON

Plaques ECHANTILLON et TAMPON neuves (Beckman-Coulter)

Annexes

Annexe 12

Réactifs et matériel pour la FISH :

Le kit AneuCyte™ fabriqué par la société Cytocell (Aquarius® Prenatal Enumeration Kits),
Cat. No. LPA 001

Trypsine / EDTA : Trypsin EDTA solution 100 ml SIGMA Ref. T3924

- *KCl* : ampoule plastique fournie par la Pharmacie du CHU

Solution diluée au 1/20, à préchauffer à l'étuve 37°C.

- *Acide acétique*: acide acétique 99,7 % minimum Réf : 1000631000 ELVETEC

- *Méthanol technique* : fourni par la Pharmacie du CHU

- *RNase* : Ribonucléase A 250 mg lyophilisé SIGMA Ref. R6513

Reprendre dans 10 ml de 2xSSC pH 7 et alicoter à 400 µl dans microtubes

- *PBS* : Tampon PBS 4x1 litre BIOMERIEUX Ref. 75 511

Reprendre la poudre dans 1 litre d'eau stérile

- *0.04 SSC- 2 SSC* : Tampon 20xSSC 1 litre SIGMA Ref.S6639

A diluer avant emploi dans eau stérile et à stocker au réfrigérateur

- *Pepsine* : Pepsine 5 g SIGMA Réf. P6887

Reprendre dans 50 ml d'eau stérile et alicoter à 500 µl

- *HCl* : HCL 1N ampoules Titrisol pour 1 litre Réf. 109970 ELVETEC

- *NP40* : NP40 2x1 ml VYSIS Réf. 32 804818

Diluer 100 µl de NP40 dans 100 ml de 2xSSC

- *Dapi II*: Dapi II 2x500 µl VYSIS Réf. 32 804831

- *Vectashield*: Vectashield 10 ml Réf. VH1000 Valbiotech SA

- Thermocycleur Hybrite 10139, ou PCR Express 10379 ou PX2 35202

- Bain-marie Polystat5 9594

- Centrifugeuse 10152 ou 10975

- Microscope inversé

- Etuve à 37°C 10955

Glossaire

Aneuploïdie : Nombre de chromosomes qui ne constitue pas un multiple exact de 23, soit une situation habituellement attribuable à une erreur de non-disjonction méiotique dans la production de gamètes.

Anomalie numérique : Tout nombre de chromosomes autre que 46.

Anomalie de structure : Nombre de chromosomes de 46 au sein desquels un ou des segments sont manquants (délétion), supplémentaires (insertion) ou remaniés (translocation ou inversion).

Autosome : Tout chromosome autre que les chromosomes sexuels X et Y. Il y a 22 paires d'autosomes dans les cellules humaines, soit 44 chromosomes non sexuels.

Bande G : Bandes claires et sombres sur les chromosomes apparaissant après traitement par la trypsine et coloration au Giemsa.

Bandes R : Bandes claires et sombres sur les chromosomes apparaissant après dénaturation par la chaleur et coloration au Giemsa.

Caduque ou décidue : La muqueuse utérine maternelle est modifiée au siège de l'implantation par la réaction déciduale (transformation de type épithélial des fibroblastes du stroma endométrial par accumulation de lipides et de glycogène) et prend le nom de **caduque** ou décidue.

Caryotype : Constitution chromosomique d'une personne (ou photomicrographie des chromosomes d'une personne) systématiquement disposée en 23 paires.

Conseil génétique : Le conseil génétique va permettre d'évaluer le risque de survenue d'une maladie héréditaire chez un individu. Il est recommandé aux personnes ayant des antécédents familiaux ou étant elles-mêmes atteintes de certaines maladies génétiques, conseil de reproduction

Délétion : C'est la perte d'un fragment de chromosome, pouvant aller d'une seule paire de bases à une fraction importante du chromosome. Une délétion est dite interstitielle si elle a lieu à l'intérieur d'un chromosome, et terminale si elle a lieu en bout de chromosome.

Duplication : Correspond à la multiplication de matériel génétique sur un chromosome. Il existe plusieurs mécanismes qui résultent à la duplication soit d'une large portion chromosomique, soit d'un gène ou bien de quelques séquences nucléotidiques.

Gestité : Nombre de grossesse vécues par une femme (incluant la grossesse courante si elle est en ceinte). Il s'agit du total de toutes les grossesses, qu'elles aient mené à un accouchement ou non (fausse couche, IVG, IMG, ...).

Hybridation de l'ADN : Adhésion d'une sonde d'ADN marquée à une séquence cible complémentaire.

Inversion : Résulte de la cassure d'un fragment de chromosome, suivie d'une rotation de 180°C de ce même fragment, puis de sa réintégration dans le même chromosome. Le phénotype associé à ce type de réarrangement est souvent invisible, étant donné qu'aucune information n'a été perdue. Lorsque la région touchée inclut le centromère, on parle d'inversion péricentrique, par opposition à l'inversion paracentrique.

Lissencéphalie : Une lissencéphalie, appelée également agyrie, est une malformation du cortex cérébral (surface du cerveau), se caractérisant par une absence congénitale de circonvolutions cérébrales (replis sinueux de la surface du cerveau, séparés par des sillons).

Macération : Décomposition de tissus fœtaux, à la suite de leur imbibition par le liquide amniotique, cela également peuvent causer un dommage significatif de l'ADN.

Monosomie : Absence d'un seul chromosome.

Mosaïcisme : Présence de deux lignées cellulaires génétiquement différentes ou plus chez une personne ou dans un tissu.

Nanodrop : Est un spectrophotomètre UV-Visible permettant d'effectuer des mesures de concentrations en acides nucléiques particulièrement précises sur des micro volumes d'échantillons (1 à 2µl) avec une reproductibilité optimale

Parité : Indication du nombre d'accouchements précédents : une mère vivant sa première grossesse sera 0-pare. Une mère vivant une grossesse après son premier accouchement sera 1-pare.

Produit de conception : Le produit de conception est successivement dénommé embryon, puis fœtus.

Syndrome de Miller-Dieker (MDS) : Est une délétion chromosomique située en 17p13.3 caractérisée par une lissencéphalie classique (encéphalite type 1) et des traits du visage caractéristiques.

Glossaire

Syndrome de Di Georges : Le syndrome de Di George (appelé aussi microdélétion 22q11) regroupe un ensemble d'anomalies du cerveau, du palais, des oreilles, du pharynx associé à des difficultés d'apprentissage.

SNP (polymorphisme nucléotidique) : Est en génétique, la variation (polymorphisme) d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes (environ une paire de bases sur mille dans le génome humain).

Tétraploïdie : Nombre de chromosomes 92 (4 copies de chaque chromosome).

Trisomie : Présence d'un chromosome supplémentaire dans au moins une paire chromosomique.

Triploïdie : Nombre de chromosomes de 69 (trois copies de chaque chromosome).

Translocation Robertsonienne : Il s'agit d'une anomalie de structure caractérisée par la fusion de deux chromosomes acrocentriques (type de

chromosomes dont le centromère se situe à l'extrémité du bras q (ou bras long), le bras court est très petit et se présente sous la forme d'une masse condensée appelée *satellite*; celle-ci est rattachée au chromosome par une zone de restriction secondaire) par translocation non-réciproque entre deux chromosomes homologues ou non homologues (incluant les chromosomes 13, 14, 15, 21, ou 22).

Translocation réciproque : Une translocation réciproque est un échange de fragments chromosomiques entre 2 chromosomes non homologues. Les translocations réciproques sont souvent équilibrées, car la totalité de l'information génétique est présente. Les problèmes surgissent lors de la formation des gamètes.

Villosité chorale : Elles font partie du trophoblaste, puis du placenta et permettent l'alimentation du fœtus, et les échanges entre ce dernier et la mère. Il s'agit donc d'une couche de cellules qui entourent la superficie de l'embryon à partir du cinquième jour de la fécondation, constituant le futur placenta.