

**MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional  
le 13 mai 2011 par

**Caroline Devaux**

Conformément aux dispositions du décret  
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE SUR PUCES À ADN  
MISE EN PLACE DE LA CGH-ARRAY DANS LA STRATÉGIE  
DIAGNOSTIQUE DES MALFORMATIONS FŒTALES ET DES  
ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES PRÉNATALES**

**Président :**

M. le Pr Jean-Marie BARD, Biochimie Générale et Clinique- Pharmacie

**Membres du jury :**

M. le Pr Alain KITZIS, Biologie cellulaire- Médecine

M. le Dr Frédéric BILAN, Génétique moléculaire-CHU de Poitiers

Mme le Dr Martine DUGUE-MARECHAUD, Gynécologie-obstétrique-CHU de Poitiers

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>7</b>
<b>PRÉAMBULE</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>10</b>
1. LA CGH ARRAY .....	10
1.1 <i>Historique</i> .....	10
1.2 <i>Construction des puces</i> .....	12
1.2.1 Présentation des différentes formes de puces à ADN .....	12
1.2.2 Choix des puces au CHU de Poitiers .....	13
1.3 <i>Principe de la CGH-array</i> .....	14
1.3.1 Extraction des ADN.....	16
1.3.2 Marquage.....	17
1.3.3 Hybridation.....	18
1.3.4 Acquisition et analyse des données.....	20
1.3.4.1 Lecture des puces .....	20
1.3.4.2 Extraction des données.....	21
1.3.4.3 Analyse des résultats .....	21
1.3.4.3.1 Analyse des 22 autosomes.....	23
1.3.4.3.2 Analyse du chromosome X : 46XX/46XX.....	23
1.3.4.3.3 Analyse du chromosome X : 46XY/46XY.....	24
1.3.4.3.4 Analyse du chromosome Y .....	24
1.3.4.4 Contrôles de qualité.....	24
1.4 <i>Vérification des anomalies</i> .....	25
1.5 <i>Rendu des résultats</i> .....	25
1.6 <i>CNV et difficultés d'interprétation</i> .....	26
1.7 <i>Avantages et limites de la CGH-array</i> .....	28
1.8 <i>Applications en génétique</i> .....	29
2. LE DIAGNOSTIC PRENATAL .....	32
2.1 <i>Place de la génétique en diagnostic prénatal</i> .....	32
2.2 <i>CGH-array et DPN</i> .....	33
2.2.1 Préambules .....	33
2.2.2 CGH-array et liquides amniotiques .....	34
2.2.3 Choix des puces.....	35
2.2.4 Apport diagnostique de la CGH-array en prénatal.....	36
3. OBJETS DE L'ETUDE.....	39
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>40</b>
1. PATIENTS ET ECHANTILLONS.....	40
2. EXTRACTION DES ADN .....	41
2.1 <i>Sangs fœtaux</i> .....	41
2.2 <i>Liquides amniotiques</i> .....	42
2.3 <i>Cellules de liquide amniotique en culture</i> .....	42
2.4 <i>Villosités choriales</i> .....	43
3. MARQUAGE DES ADN.....	43
3.1 <i>Digestion enzymatique</i> .....	44
3.2 <i>Marquage des ADN par la technique d'amorçage aléatoire</i> .....	44
3.3 <i>Purification</i> .....	44
3.4 <i>Qualité des sondes marquées</i> .....	45
4. HYBRIDATION .....	45
4.1 <i>Mélange réactionnel</i> .....	45
4.2 <i>Chambre d'hybridation</i> .....	46
5. ANALYSE DES PUCES .....	47
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>48</b>
1. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS.....	49

2. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES .....	51
2.1 Sangs fœtaux.....	51
2.2 Liquides amniotiques.....	52
2.3 Cellules de liquide amniotique en culture .....	54
2.4 Villosités choriales .....	56
2.5 Qualité de l'hybridation en fonction du type de prélèvement.....	57
3. MISE AU POINT DE LA CGH-ARRAY : CONCORDANCE AVEC LES RESULTATS DE CYTOGENETIQUE .....	63
4. CARACTERISATION D'ANOMALIES ECHOGRAPHIQUES .....	64
4.1 Anomalies échographiques multiples .....	64
4.2 Anomalies échographiques isolées .....	68
5. CARACTERISATION D'ANOMALIES DU CARYOTYPE .....	69
5.1 Cas 17.....	69
5.2 Cas 18.....	73
5.3 Cas 19.....	77
5.4 Cas 20.....	80
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>88</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

A: absorbance  
ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists  
ADN: acide desoxyribonucléique  
ARN: acide ribonucléique  
BAC: Bacterial artificial chromosome  
BET: bromure d'éthidium  
B-HCG: Béta-Human Chorionic Gonadotrophin  
BHN: B Hors Nomenclature  
BP: Break Point  
BSA: Bovine Serum Albumine  
CGH: Comparative Genomic Hybridization  
CHU: Centre Hospitalier Universitaire  
CIV: communication interventriculaire  
cm<sup>2</sup>: centimètre carré  
CNP: copy number polymorphism  
CNV: copy number variation  
CO<sub>2</sub>: dioxyde de carbone  
CPDPN: Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal  
Cy 3: cyanine 3  
Cy 5: cyanine 5  
DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole  
Del: délétion  
DLRS: derivated log ratio spread  
dNTP: mélange des 4 désoxynucléotides triphosphates A T G C  
DPN: diagnostic prénatal  
Dup: duplication  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
FISH: Fluorescent in Situ Hybridization  
h: heure  
IMG: interruption médicale de grossesse  
Inv: inversion  
Ins: insertion  
IRM: imagerie par résonance magnétique  
Kb: kilobase  
KHPM: kininogène de haut poids moléculaire  
kpb: kilo paire de base  
LA: liquide amniotique  
Ln: logarithme népérien  
Log: logarithme  
Mar: marqueur chromosomique surnuméraire

Mat: maternelle  
Mb: mégabase  
mg: milligramme  
min: minute  
mL: millilitre  
MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification  
Mos: mosaïque  
N: nombre  
ng: nanogramme  
nm: nanomètre  
PAC: Phage artificial chromosome  
PAPP-A: Pregnancy Associated Plasma Protein A  
Pb: paire de bases  
PBS: phosphate buffered saline  
PCR: polymerase chain reaction  
pH: potentiel hydrogène  
pmol: picomole  
p/v : poids/volume  
QF PCR: PCR quantitative fluorescente  
RCIU: retard de croissance intra-utérin  
Rnase: ribonucléase  
SA: semaines d'aménorrhées  
SF: sang fœtal  
SNP: single nucleotide polymorphisms  
TAE: Tris Acétate EDTA  
TE: Tris EDTA  
T21: trisomie 21  
UV: ultraviolet  
WHS: Wolf-Hirshorn Syndrom  
 $\mu$ M: micromolaire  
 $\mu$ g: microgramme  
 $\mu$ L: microlitre  
°C : degré Celsius

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Hybridation génomique comparative sur chromosomes en métaphases.....	11
Figure 2 : Hybridation génomique comparative sur puce à ADN.....	12
Figure 3: Puce à ADN.....	13
Figure 4 : Principe de l'hybridation génomique comparative sur puce à ADN .....	16
Figure 5: Mesure de la concentration en ADN par spectrophotométrie.....	17
Figure 6: Vérification de la qualité de l'ADN sur gel d'agarose : ADN extraits de sangs périphériques (2,3) en comparaison avec Lambda/HindIII (1).....	17
Figure 7: Amorçage aléatoire par la technique de « Random Priming ».....	18
Figure 8 : Exemple d'expérimentation en Dye Swap.....	19
Figure 9: Principe de l'hybridation en trio .....	20
Figure 10 : Principe de l'hybridation en quatuor .....	20
Figure 11: Montage d'une puce .....	21
Figure 12: Signaux Cy3 et Cy5 émis par la puce. Un spot de couleur jaune indique la présence d'une quantité de matériel égale pour les deux ADN ; un spot de couleur vert indique un gain de matériel pour l'ADN patient marqué en Cy3; un spot de couleur rouge indique une perte de matériel pour l'ADN patient marqué en Cy3.....	22
Figure 13 : Représentation d'un chromosome X sur DNA analytic®.....	23
Figure 14: Exemple de représentation graphique sur DNA analytic®.....	23
Figure 15: Etapes d'assemblage de la chambre d'hybridation .....	47
Figure 16: Acquisition des spots d'une puce 2x105K par le scanner .....	48
Figure 17 : Répartition des cas analysés dans cette étude .....	50
Figure 18: Electrophorèses en gels d'agarose :.....	53
Figure 19: Electrophorèse en gel d'agarose : ADN extrait de liquide amniotique en comparaison à un ADN extrait de sang périphérique et Lambda/HindIII. 1. ADN extrait de LA après digestion par RNase 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte 3. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par Hind III) .	55
Figure 20: Migration en gel d'agarose : ADN extrait de cellules de liquide amniotique en culture en comparaison à un ADN extrait de sang périphérique et Lambda/HindIII. 1. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par HindIII) 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte 3. ADN extrait de cellules après digestion par la RNase A. ....	56
Figure 21: Migration en gel d'agarose : ADN extrait de villosités chorales en comparaison à un ADN extrait de sang périphérique et Lambda/HindIII. 1. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par HindIII) 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte 3. ADN extrait de villosité sans étape de digestion par la RNase A. ....	57
Figure 22: Représentation des chromosomes 18 sur DNA analytics® : 1.Hybridation sang/sang; 2.Hybridation cellules/cellules; 3. Hybridation villosités chorales/sang; 4.Hybridation sang fœtal / sang; 5.Hybridation LA / sang; 6.Hybridation cellules / sang; 7.Hybridation LA / sang; 8.Hybridation cellules / sang.....	59
Figure 23: Analyses de l'ADN du cas 1 (45XO) et de l'ADN du cas 2 (47XX,+21) .....	64
Figure 24: Analyse de l'ADN extrait des cellules en culture du cas 5 marqué en cyanine 3 et hybridé contre un patient témoin de sexe féminin marqué en cyanine 5. ....	65
Figure 25: Analyse de l'ADN du cas 8 (délétion de 8,98 Mb au niveau de la région 4p16.3).....	67
Figure 26: Analyse de l'ADN du cas 8 (duplication de 6.901 Mb au niveau de la région 8 p 23).....	67
Figure 27: Analyse de l'ADN du cas 17 : duplication de 1,3Mb en 13q21.2 .....	71
Figure 28: Analyse de l'ADN du cas 17 : délétion de 1,6Mb en 13q31.1.....	71
Figure 29: Visualisation de la région 13q31.1 dans « Database of Genomic variant ».....	72
Figure 30: Analyse de l'ADN du cas 18. ....	74
Figure 31: Hybridation in situ des cellules amniotiques du cas 18 avec une sonde BAC 15q24.....	75
Figure 32: Représentation schématique de la région 15q24 avec les trois points de cassures récurrents initialement décrits par Sharp et al. en 2007 [81]. La région critique est située entre les points de cassures BP1 et BP2. D'autres cas publiés par Klopocki et al. [79], Van Esch et al. [76], Masuret-Paulet et al. [80] sont également représentés ainsi que quatre autres patients décrits par Andrieux et al. en 2009 [77] et le patient décrit dans notre étude (cas 18). ....	76
Figure 33 : Visualisation de la région 15q24.3 incriminée dans « Database of Genomic variant ».....	77
Figure 34 : Caryotype du liquide amniotique du cas 19 : marqueur chromosomique surnuméraire (« mar »).....	78
Figure 35 : Hybridation in situ des cellules amniotiques du cas 19 avec une sonde 14-22.....	79

Figure 36: Analyse de l'ADN du cas 19 en Dye Swap .....	79
Figure 37: Hybridation in situ des cellules amniotiques du cas 19 avec une sonde 10q21.3 .....	80
Figure 38 : Visualisation de la région 10q21.3 dans « Database of Genomic variant » .....	80
Figure 39: Caryotype du liquide amniotique du cas 20.....	81
Figure 40: Analyse de l'ADN du cas 20 en Dye Swap (déletion de 2 Mb au niveau de la région 4q35.2).....	82
Figure 41: Visualisation de la région 4q35.2 dans « Database of Genomic variant » .....	82
Figure 42: Analyse de l'ADN du cas 20 en Dye Swap (duplication au niveau de la région 1q42.qter) .....	83

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques des enzymes de restriction AluI et RsaI.....	18
Tableau 2: Facteurs influençant l'évaluation des CNV (d'après Lee et al. [18]).....	28
Tableau 3: Etudes par CGH-array de patients atteints de retard mental.....	31
Tableau 4 : Apports de la CGH-array dans le diagnostic prénatal.....	39
Tableau 5: Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des fœtus inclus dans l'étude.....	51
Tableau 6: Caractéristiques de l'ADN obtenu après prélèvement de sang foetal.....	52
Tableau 7: Caractéristiques de l'ADN obtenu après prélèvement de LA.....	54
Tableau 8: Caractéristiques de l'ADN obtenu à partir des cellules de liquide amniotique en culture.....	56
Tableau 9: Caractéristiques de l'ADN obtenu après prélèvement de villosités chorales.....	57
Tableau 10: Caractéristiques biologiques des différents échantillons marqués et hybridés.....	63

# PRÉAMBULE

La CGH-array (Comparative Genomic Hybridization) a bouleversé le diagnostic des anomalies chromosomiques ces dernières années. Cette technique est utilisée depuis janvier 2009 au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers et est devenue une méthode de choix pour le dépistage des microremaniements chromosomiques. Elle est actuellement utilisée en routine pour explorer les syndromes polymalformatifs et retards mentaux chez des enfants ou adultes ne présentant pas d'anomalies visibles en cytogénétique classique : caryotype et FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).

Cette analyse pourrait être intégrée à la stratégie d'exploration diagnostique des syndromes malformatifs fœtaux inexplicés. Selon le rapport d'activité 2007 de l'agence de biomédecine [1], la pratique du diagnostic prénatal a conduit à réaliser en France 94375 caryotypes fœtaux. Parmi ceux-ci, 4100 anomalies chromosomiques déséquilibrées ont été identifiées (4,3%). 17128 caryotypes ont été demandés pour signes d'appels échographiques : dans cette cohorte, le taux d'anomalies déséquilibrées atteint 14,4%. Cependant, dans une grande proportion des cas, les anomalies échographiques restent inexplicées et des décisions quant au devenir de la grossesse sont prises sans connaître l'étiologie des malformations observées. C'est dans ce cadre que la CGH-array devrait être proposée en diagnostic prénatal. Plusieurs études ont déjà montré le gain diagnostique apporté par cette technique. L'identification d'une origine chromosomique causale pourrait éclairer le conseil génétique et donner une explication aux couples concernés.

L'application de la CGH-array en diagnostic prénatal reste néanmoins délicate. Outre l'aspect technique lié à la nature des prélèvements à analyser (villosités chorales, liquides amniotiques, cellules en culture de liquide amniotique et sangs fœtaux), l'interprétation des résultats est compliquée par l'existence de polymorphismes et peut ne pas donner de résultats explicites pour le diagnostic. Dans ce travail, nous avons mis au point la CGH-array pour le diagnostic des malformations fœtales inexplicées ayant justifié, pour la majorité des cas, une interruption médicale de grossesse. Nous avons également entrepris la caractérisation de déséquilibres chromosomiques mis en évidence par le caryotype.

Si l'utilisation de la CGH-array en routine pour le diagnostic prénatal (DPN) peut encore être considérée comme étant au stade du développement, son utilisation dans le diagnostic moléculaire des anomalies fœtales ayant abouti à une interruption médicale de grossesse (IMG) est indispensable.

# INTRODUCTION

## 1. La CGH array

### 1.1 Historique

Développée dans les années 1990, l'hybridation génomique comparative est initialement utilisée pour la détection des réarrangements chromosomiques présents dans les tumeurs solides [2]. Dans ces tissus, de nombreuses régions du génome se trouvent impliquées dans des altérations quantitatives de type délétion ou duplication d'ADN. La détection de ces anomalies est un élément important pour le diagnostic, le suivi et le traitement des patients. L'ADN tumoral et l'ADN témoin sont hybridés sur des chromosomes en métaphase afin de mettre en évidence les déséquilibres d'ADN dans le génome des cancers par rapport aux tissus normaux (figure 1). Le niveau de résolution ne dépasse pas 5 Mb.

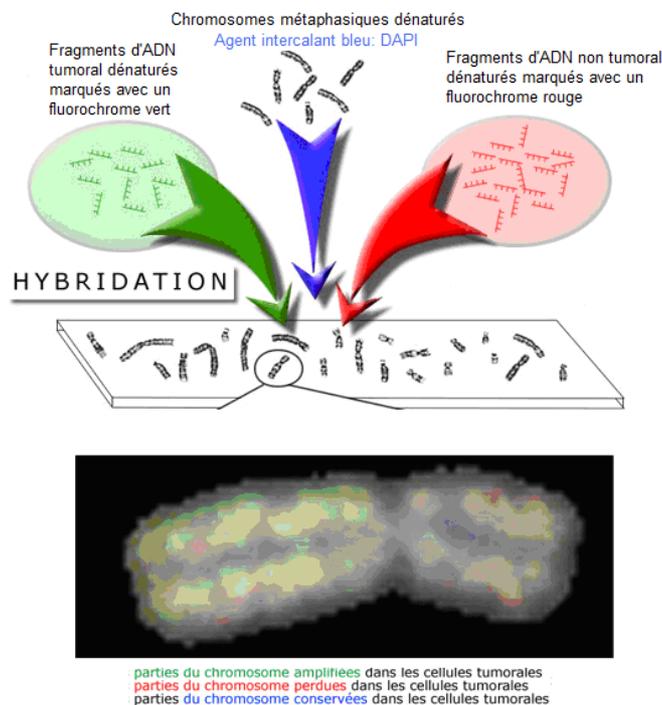


Figure 1 : Hybridation génomique comparative sur chromosomes en métaphases.

Quelques années plus tard, d'autres équipes montrent qu'il est possible de remplacer les chromosomes métaphasiques par des lames de verre sur lesquelles sont fixés des fragments d'ADN [3, 4]. L'hybridation est réalisée sur un support contenant des fragments d'ADN extraits de chromosomes artificiels de bactéries (BAC) ou de chromosomes artificiels de phages (PAC), fragments de séquences connues et vérifiées (figure 2). La résolution de la technique s'améliore considérablement, c'est la CGH-array ou «caryotype moléculaire» [5].

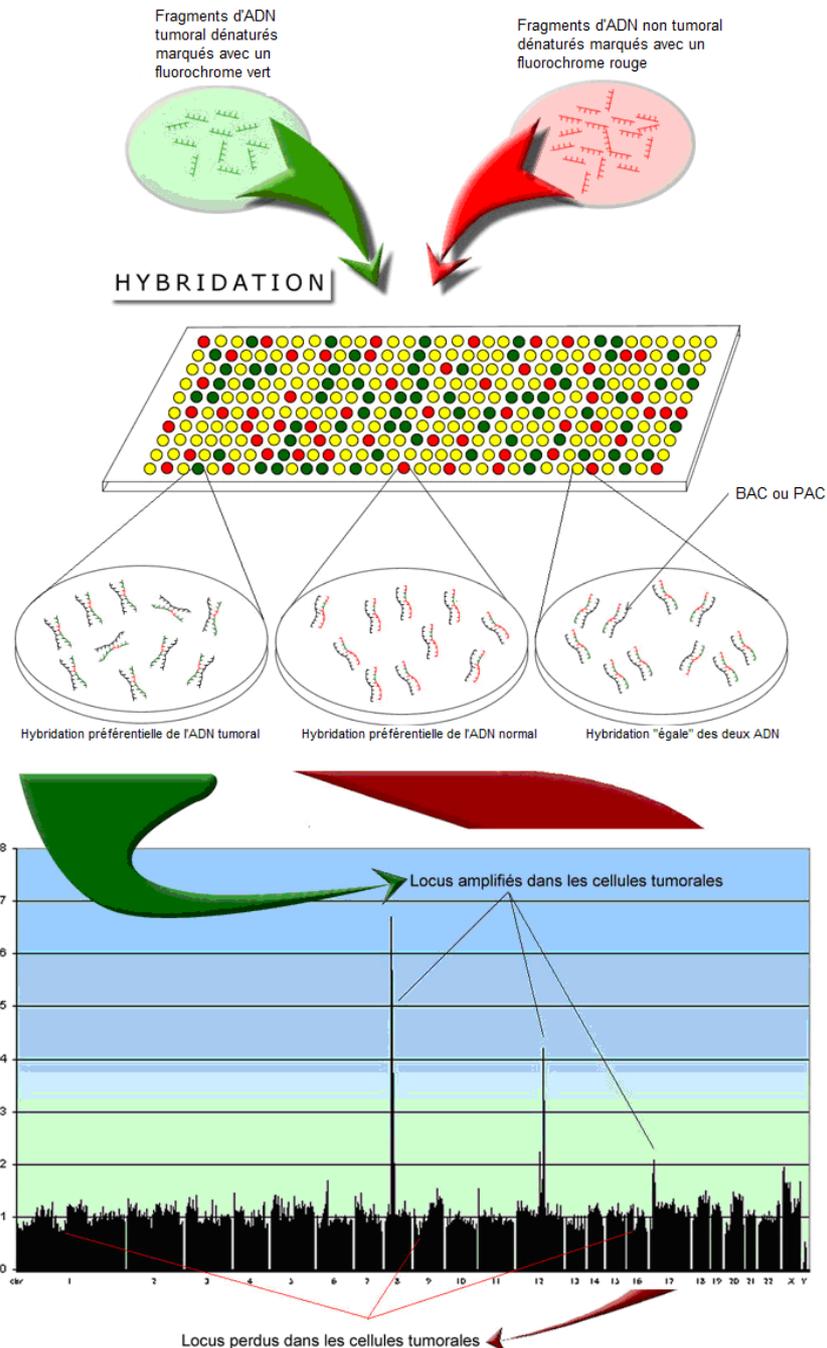


Figure 2 : Hybridation génomique comparative sur puce à ADN.

Avec les progrès du séquençage du génome humain et de la robotique apparaîtront ensuite des puces à ADN recouvrant le génome entier. En 2004, Ishkanian *et al.* [6] construisent une puce contenant 32433 BAC couvrant entièrement le génome (résolution de 80 kb).

## 1.2 Construction des puces

### 1.2.1 Présentation des différentes formes de puces à ADN

Les puces à ADN ou « microarray » se présentent sous la forme de lames de verre sur lesquelles sont déposés des fragments d'ADN de séquences génomiques connues. Dans un puits (ou spot) sont disposés plusieurs milliers de copies d'une molécule cible d'ADN correspondant à une séquence unique du génome. Les ADN de patients fragmentés et marqués par un fluorochrome donné s'hybrident de manière compétitive sur ces molécules cibles contre un ADN témoin dit « de référence » fragmenté et marqué avec un autre fluorochrome (figure 3). Les puces à ADN sont le reflet du génome avec une résolution plus au moins grande. Cette résolution dépend de la taille des séquences déposées, de l'espacement (distance génomique) des séquences entre elles et du nombre de spots contenus sur la puce. Plus une puce est résolutive, plus elle contient de puits et plus l'espacement entre deux sondes contigües sur le génome se trouve réduit.

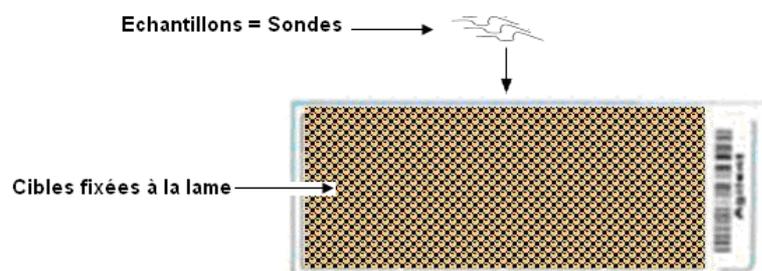


Figure 3: Puce à ADN.

Les fragments d'ADN génomique humain peuvent être de grande taille (100 à 200 kb) portés par des vecteurs de type BAC ou PAC donnant un niveau de résolution proche de 1 Mb. Ce sont par exemple les puces BAC Genosystem® ou Integragen®.

Ils seront de petite taille dans les puces constituées d'oligonucléotides de synthèse (25 à 60 bases) offrant une résolution de quelques kilobases [7]. Différentes formes sont commercialisées: 4X44K, 2X105K, 1X244K, 8X15K (Agilent®) lues par des scanners dont la résolution est de 5 µm. De nouveaux formats ont récemment été mis sur le marché 8X60K, 4X180K, 2X400K, 1X1M (lues par des scanners dont la résolution est de 2 µm).

Enfin, d'autres types de puces (Illumina®, Affymetrix®) conçues à l'origine pour détecter des polymorphismes génomiques n'impliquant qu'une seule paire de base sont également utilisées pour la détection de déséquilibres avec une résolution de quelques kilobases [8]. Par exemple les puces Affimatrix Gene Chip Human Mapping 262K utilisées par Gijbbers *et al.* [9] pour le diagnostic des retards mentaux contiennent 262262 oligonucléotides (25-mer) offrant une résolution de 12 kb. Ces puces utilisant des SNP «single nucleotide polymorphisms» ne nécessitent pas d'ADN de référence. Les oligonucléotides spécifiques sont synthétisés directement sur le support. L'ADN à tester s'hybride avec sa séquence complémentaire fixée. Elles permettent également la recherche de régions de perte d'hétérozygotie comme les unidisomies [10]. Cependant, l'interprétation des résultats (normalisation des données) demande de grandes séries de patients (40 en moyenne) et retarde le rendu des résultats.

### 1.2.2 Choix des puces au CHU de Poitiers

Au CHU de Poitiers sont utilisées des puces oligomériques 2X105K commercialisées par Agilent®. Elles offrent la possibilité de réaliser deux hybridations par lame soit l'analyse de deux patients sur une même lame. Dans chaque spot (environ 105 000 sur ces puces) est déposé une séquence d'oligonucléotides (60-mer) de synthèse dont l'emplacement sur la puce est connu. Les oligonucléotides sont synthétisés *in situ* par la technologie Inkjet SurePrint®. Leurs séquences nucléotidiques correspondent à des séquences codantes et non codantes pour couvrir au mieux le génome avec cependant un renforcement de la densité des oligonucléotides dans les régions géniques. Les séquences répétées ne sont pas représentées afin de réduire le bruit de fond et l'aspécificité des signaux.

Au total, les puces 105K Agilent® contiennent 105072 cibles disposées aléatoirement sur la puce (afin d'éviter les biais expérimentaux liés à la présence de corps étrangers tels que poussières, traces dues aux lavages, précipités de fluorochromes, etc...). En contrôle, 525 d'entre elles sont répliquées 3 fois à différentes localisations afin d'évaluer la reproductibilité expérimentale ; 4626 autres servent plus particulièrement aux mesures du contrôle de qualité interne. Les 99026 60-mers restants correspondent à des séquences uniques dans le génome. Les séquences d'oligonucléotides sont espacées en moyenne de 22 kb ce qui correspond à la résolution globale de la puce. Dans les régions géniques d'intérêts la résolution atteint 19 kb. 71% des cibles sont intragéniques couvrant ainsi 97,9% des gènes humains ([www.agilent.com/chem/goCGH](http://www.agilent.com/chem/goCGH)). D'autres puces plus résolutive sont actuellement commercialisées. Cependant, nous avons fait le choix de ne pas avoir recours à ces modèles en diagnostic prénatal afin de se limiter aux anomalies significatives.

La technologie des puces à oligonucléotides est adaptée au diagnostic prénatal qui demande une rapidité dans le rendu de résultat. Elle permet d'intégrer des patients urgents aux séries. Le résultat est théoriquement accessible en une semaine. Cela ne serait pas le cas avec l'utilisation de puces SNP qui demandent de grandes séries de patients avant de pouvoir interpréter les résultats. Les puces oligonucléotidiques offrent également différents avantages par rapport aux puces BAC : densité des sondes supérieure, absence de séquences répétées.

### 1.3 Principe de la CGH-array

La CGH-array consiste à marquer à l'aide de 2 fluorochromes différents [cyanine 3 (Cy 3) et cyanine 5 (Cy 5)] deux ADN de nature distincte : un ADN test (ADN du patient) et un ADN de référence (témoin). Ces deux ADN sont hybridés en quantité égale sur une puce à ADN. Durant la phase d'hybridation, les molécules d'ADN marquées en Cy 3 et Cy 5 s'apparient de manière complémentaire avec les cibles présentes sur la puce. Après des lavages permettant d'éliminer l'ADN marqué non hybridé, les puces sont lues par un scanner. Celui-ci mesure les fluorescences émises par les fluorochromes Cy 3 et Cy 5 pour chaque spot composant la puce. L'intensité du signal est proportionnel au nombre de molécules fluorescentes hybridées et donc à la quantité d'ADN de départ. Les gains et pertes de matériel de l'ADN patient sont ainsi visualisés en réalisant le ratio des intensités émises par les cyanines 3 et 5 (figure 4).

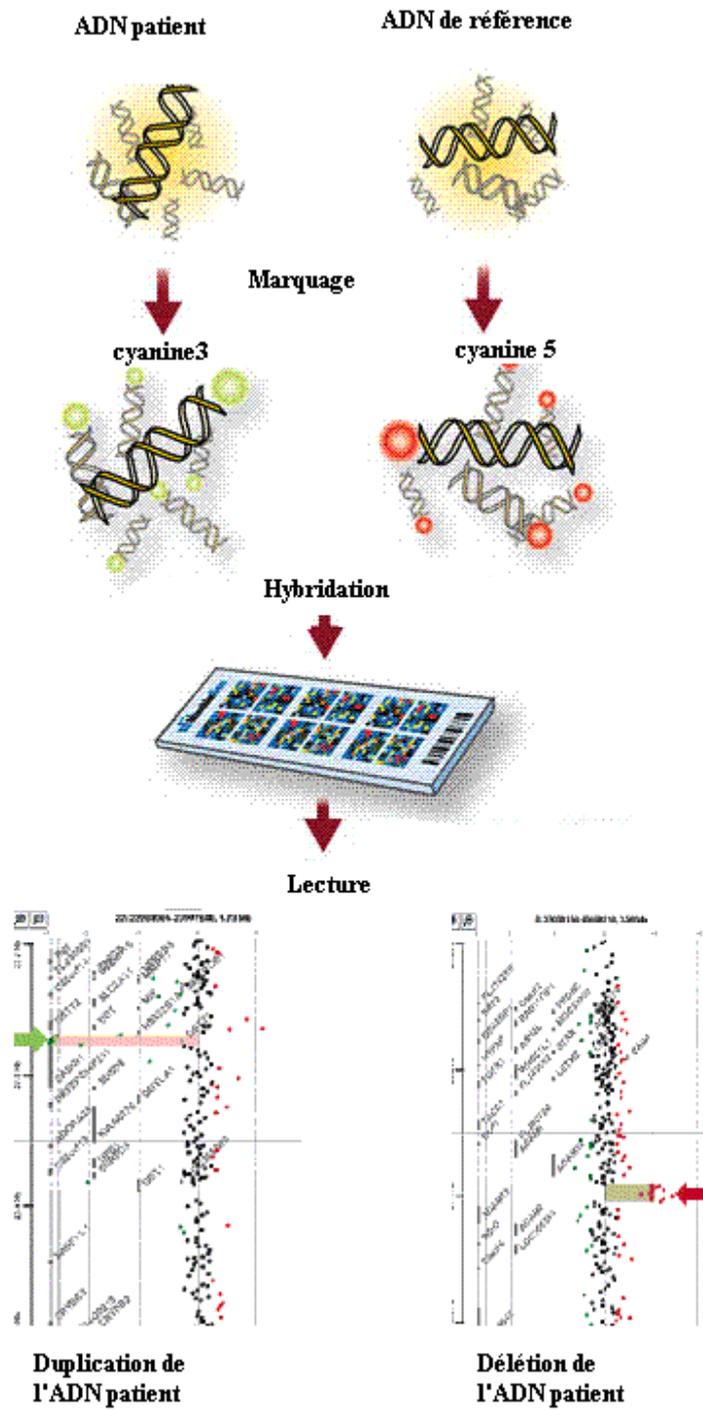


Figure 4 : Principe de l'hybridation génomique comparative sur puce à ADN.

### 1.3.1 Extraction des ADN

Les ADN sont extraits à partir d'échantillons biologiques prélevés chez le patient.

Leur concentration est mesurée par spectrophotométrie de type Nanodrop® (figure 5). Le ratio 260/280 donne une indication sur la pureté de l'ADN. Il est acceptable autour de 1,8 à 2. Un ratio inférieur montre la présence de protéines. Le ratio 260/230 est également utilisé comme indicateur de pureté. Les valeurs attendues se situent aux alentours de 2-2,20. Si ce ratio est inférieur, il indique la présence de contaminants : carbohydrates et solvants essentiellement.

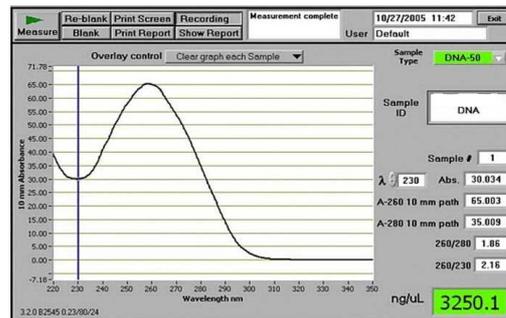


Figure 5: Mesure de la concentration en ADN par spectrophotométrie.

La qualité des ADN est visualisée après migration en gel d'agarose. L'ADN est révélé par du BET (Bromure d'Ethidium), agent intercalant et fluorescent aux UV. Une dégradation se traduit par la présence de fragments de faible taille. Les pré-requis pour une hybridation correcte en CGH-array sont l'absence de signe de dégradation de l'ADN sur gel d'agarose (figure 6).

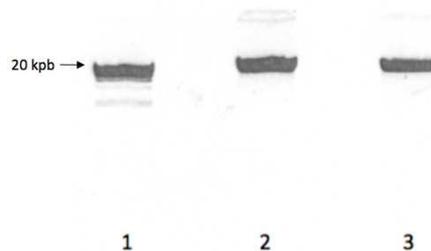


Figure 6: Vérification de la qualité de l'ADN sur gel d'agarose : ADN extraits de sangs périphériques (2,3) en comparaison avec Lambda/HindIII (1).

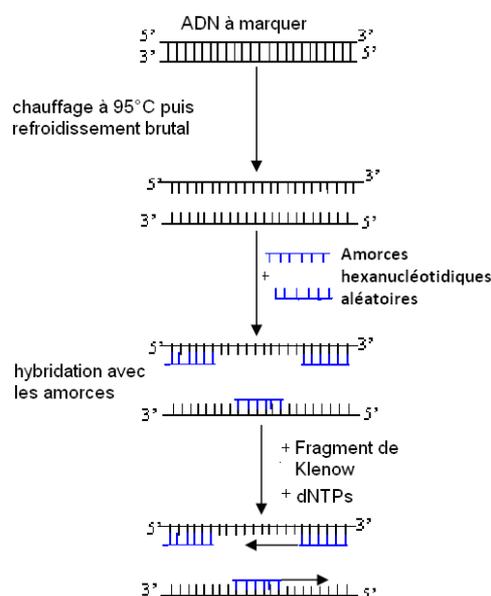
### 1.3.2 Marquage

Les ADN sont clivés par les enzymes de restriction *AluI* et *RsaI* afin d'obtenir des fragments de taille compatible avec les oligonucléotides de la puce (tableau 1). La taille des fragments de restriction est estimée entre 200 et 500 pb. Il est possible à cette étape de faire migrer les fragments en gel d'agarose afin de s'assurer de l'efficacité du processus de coupure (non réalisé en routine).

	Séquence reconnue	Coupure
<i>AluI</i> ( <i>Arthrobacterluteus</i> )	5'AGCT3' 3'TCGA5'	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'
<i>RsaI</i> ( <i>Rhodopseudomonassphaeroides</i> )	5'GTAC3' 3'CATG5'	5'---GT AC---3' 3'---CA TG---5'

**Tableau 1: Caractéristiques des enzymes de restriction *AluI* et *RsaI*.**

L'ADN patient et l'ADN témoin sont marqués avec les fluorochromes Cy3 et Cy5 par amorçage aléatoire ou « Random Priming » (figure 7). Les amorces de séquence « aléatoire » sont de courts fragments d'ADN simple brin de six bases (hexanucléotides) constitués de toutes les combinaisons de séquences possibles. Ces amorces « aléatoires » s'hybrident au hasard sur le génome (ADN patient et témoin dont les brins sont préalablement séparés à 95°C). Ils servent d'amorce pour le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase (dépourvue d'activité 5'-3' exonucléasique par digestion enzymatique) qui reconstitue le second brin.



**Figure 7: Amorçage aléatoire par la technique de « Random Priming ».**

Une purification sur colonnes de type « centricon » permet d'éliminer l'excédent de fluorochrome ainsi que les nucléotides en excès non incorporés lors du marquage.

Pour déterminer l'efficacité du marquage, l'absorbance des échantillons est mesurée par spectrophotométrie. Deux longueurs d'ondes différentes sont utilisées : mesure à 550 nm pour la cyanine 3 et 650 nm pour la cyanine 5.

### 1.3.3 Hybridation

La méthode habituelle consiste à hybrider l'ADN du patient marqué en cyanine 3 contre un ADN témoin marqué en cyanine 5 en quantité égale puis, en guise de contrôle, on procède à l'expérimentation inverse (inversion des fluorochromes appelée dye swap en anglais) (figure 8). Le dye swap permet d'éliminer les artefacts d'hybridation et de fluorescence pouvant être dus à un défaut d'hybridation de l'un des deux ADN ou à un bruit de fond. Les anomalies doivent être retrouvées en miroir pour être validées.

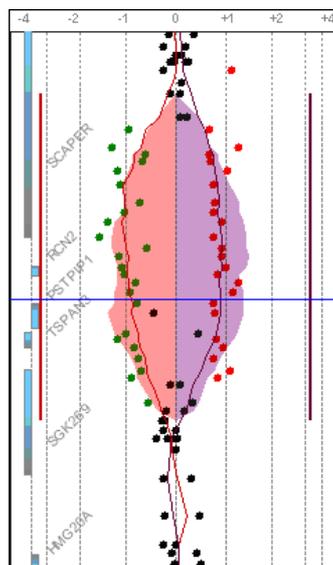


Figure 8 : Exemple d'expérimentation en Dye Swap.

Pour diminuer le nombre d'hybridations nous travaillons en trio (figure 9). Cette procédure a été choisie pour minimiser le coût et le risque d'hybrider ensemble deux patients qui auraient la même anomalie. La probabilité pour que trois patients aient la même anomalie est en effet quasi nulle. Ce schéma permet d'hybrider chaque patient en double pour un coût de revient final de 256 euros par patient (l'analyse est facturée BHN 4000 soit 1080 euros).

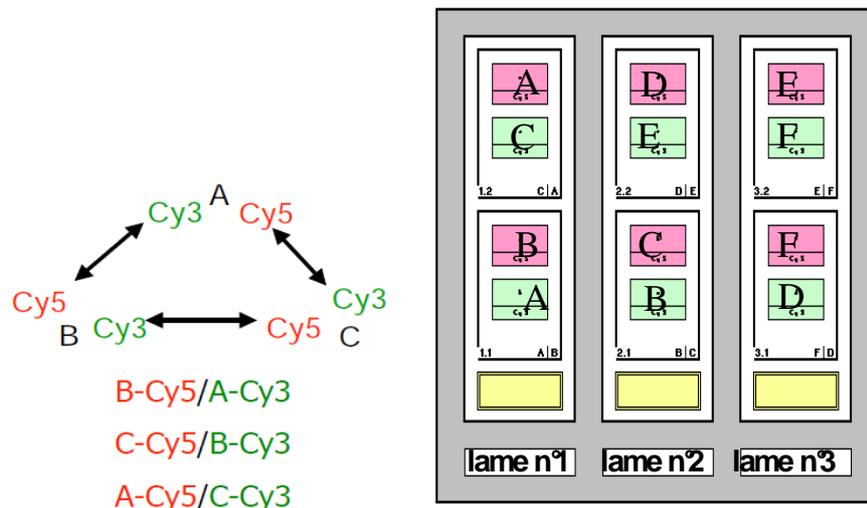


Figure 9: Principe de l'hybridation en trio.

Afin de faciliter l'interprétation des gains et pertes de matériel sur le chromosome X les hybridations ont lieu, autant que possible, entre patients de même sexe (« sex match »). Pour des raisons pratiques et d'urgence, il arrive que les hybridations aient lieu entre des patients de sexes différents (« sex mismatch »). Dans ce cas, on essaie de réaliser au moins une hybridation en « sex match » et l'hybridation se fait selon la méthode du quatuor (figure 10).

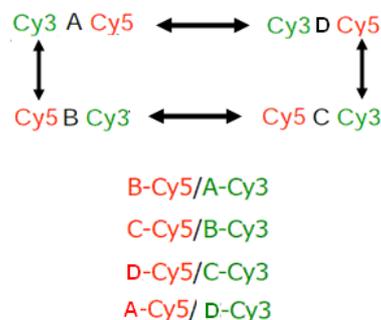
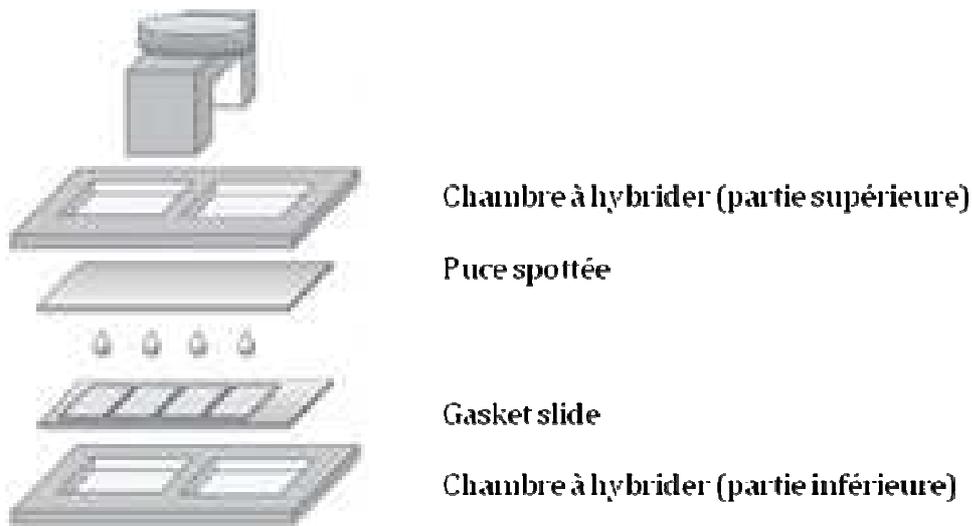


Figure 10 : Principe de l'hybridation en quatuor.

Les ADN marqués en cyanine 3 et cyanine 5 sont mélangés en quantité égale avec un tampon d'hybridation contenant des agents bloquants constitués d'ADN enrichi en séquences répétées. L'ADN hautement répété n'est pas codant ; il constitue l'hétérochromatine. Les agents bloquants empêchent ainsi les hybridations non spécifiques.

La solution d'hybridation est déposée sur une lame porte joint, puis est recouverte par la puce et placée dans une chambre à hybrider (figure 11). L'hybridation a lieu dans un four rotatif. La puce est enfin lavée puis séchée avant lecture.

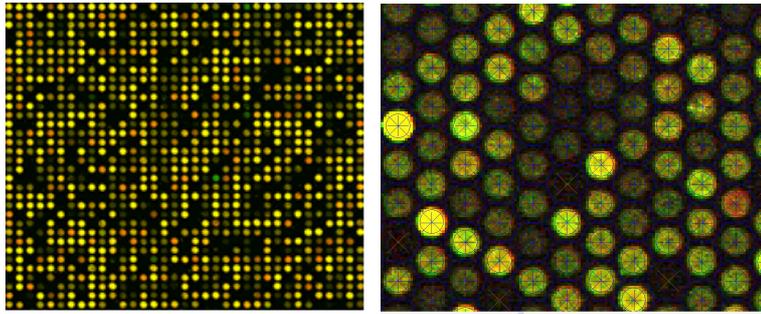


**Figure 11: Montage d'une puce.**

### 1.3.4 Acquisition et analyse des données

#### 1.3.4.1 Lecture des puces

Les images sont acquises par lecture des puces grâce à un scanner muni de lasers mesurant les signaux émis par les fluorochromes (ratios de fluorescence entre cyanine 3 et cyanine 5 pour chaque spot). Pour chaque sonde est quantifié le signal d'hybridation. Chaque spot est découpé en zones pour l'analyse informatique (figure 12).



**Figure 12: Signaux Cy3 et Cy5 émis par la puce. Un spot de couleur jaune indique la présence d'une quantité de matériel égale pour les deux ADN ; un spot de couleur vert indique un gain de matériel pour l'ADN patient marqué en Cy3; un spot de couleur rouge indique une perte de matériel pour l'ADN patient marqué en Cy3.**

#### 1.3.4.2 Extraction des données

Les données sont extraites par un logiciel qui calcule le ratio des intensités cyanine 3 / cyanine 5 et cyanine 5 / cyanine 3 et les normalise en évaluant le bruit de fond environnant chaque spot. Il relie les signaux de fluorescence des sondes à leurs positions dans le génome. D'autre part, ce logiciel compare les intensités de fluorescence des oligonucléotides déposés en doubles ou triples sur la lame (contrôle interne). Il repère également les zones de la puce non exploitables (poussières etc...) et s'affranchit de ces zones pour le rendu des résultats.

#### 1.3.4.3 Analyse des résultats

Sur le logiciel d'analyse, les sondes de la puce sont visualisées sous forme de points colorés en fonction du ratio des intensités de fluorescence : en rouge lorsque c'est la cyanine 5 qui domine et en vert lorsque c'est la cyanine 3 (figure 13). Les 22 autosomes et 2 chromosomes sexuels X et Y sont représentés (figure 14).

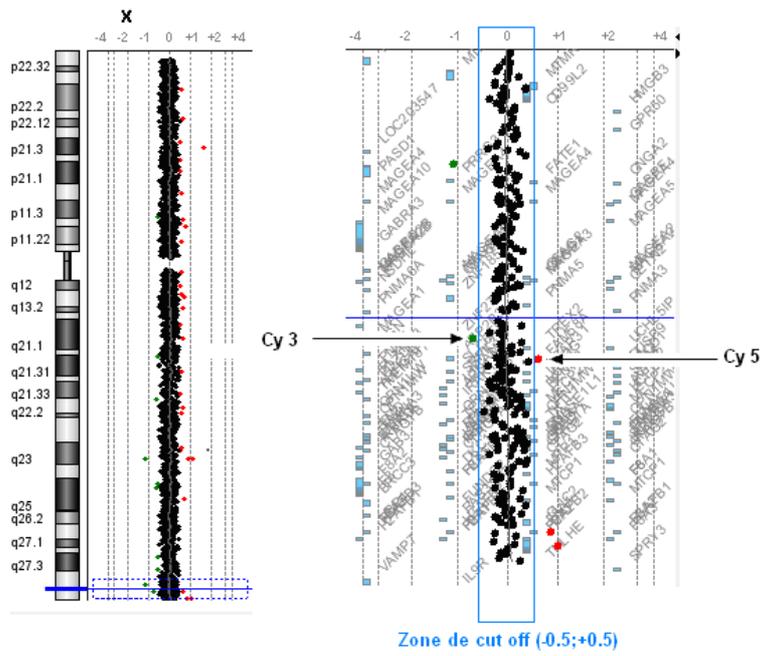


Figure 13 : Représentation d'un chromosome X sur DNA analytic®.



Figure 14: Exemple de représentation graphique sur DNA analytic®.

Pour la représentation graphique les ratios d'expression sont transformés dans une échelle logarithmique en base 2. Les chromosomes autosomiques contiennent en temps normal deux copies d'un même gène. Le nombre de copies hybridées est donc théoriquement de 2/2. La transformation en logarithme base 2 permet d'avoir des ratios cyanine 5 / cyanine 3 qui suivent une distribution autour de 0. Cet outil mathématique permet donc de recentrer l'axe des chromosomes autour de 0 (et non pas autour de 1).

$$\text{Log}_2 \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}} = (\text{Ln} \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}}) / \text{Ln} 2 = \text{Log}_2 \frac{2}{2} = 0$$

#### 1.3.4.3.1 Analyse des 22 autosomes

La distribution est centrée autour de 0.

Lorsque le patient présente une délétion sur l'un des 22 autosomes une succession d'au moins trois spots de couleur rouge est visualisée et la ligne de base dévie en 1 :

$$\text{Log}_2 \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}} = \text{Log}_2 \frac{2}{1} = 1$$

Lorsque le patient présente une duplication sur l'un des 22 autosomes trois spots minimums de couleur verte se succèdent et la ligne de base dévie en -0,58 :

$$\text{Log}_2 \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}} = \text{Log}_2 \frac{2}{3} = -0.58$$

En routine nous travaillons en trio (figure 9). Il n'y a donc plus d'ADN patient et ADN de référence mais trois patients P1 P2 et P3 marqués chacun en cyanine 3 et 5 et hybridés deux par deux (P1 contre P2, P2 contre P3 et P3 contre P1). Si P2 présente une délétion les sondes dévieront en 1 lorsqu'il sera marqué en Cy3 et hybridé contre P1, elles dévieront en -1 lorsqu'il sera marqué en cyanine 5 et hybridé contre P3. Si P2 présente une duplication les sondes dévieront en -0.58 lorsqu'il sera marqué en Cy3 et hybridé contre P1, elles dévieront en +0.58 lorsqu'il sera marqué en cyanine 5 et hybridé contre P3.

#### 1.3.4.3.2 Analyse du chromosome X : 46XX/46XX

Lorsque sont hybridés ensemble deux patients de sexe féminin (46XX) l'analyse du chromosome X est la même que sur les autosomes (déviations en 1 pour une délétion ou -0.58 pour une duplication)

#### 1.3.4.3.3 Analyse du chromosome X : 46XY/46XY

Lorsque sont hybridés ensemble deux fœtus de sexe masculin (46XY) les rapports seront différents au niveau du chromosome X. La ligne de base est toujours centrée sur 0 :

$$\text{Log}_2 \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}} = \text{Log}_2 \frac{1}{1} = 0$$

Lorsqu'une délétion est présente sur le chromosome X du patient les sondes dévient vers l'infini :

$$\text{Log}_2 \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}} = \text{Log}_2 \frac{1}{0} = \infty$$

Lorsqu'une duplication est présente sur le chromosome X du patient les sondes dévient en -1 :

$$\text{Log}_2 \frac{[\text{Cy5}]ADN_{référence}}{[\text{Cy3}]ADN_{patient}} = \text{Log}_2 \frac{1}{2} = -1$$

#### 1.3.4.3.4 Analyse du chromosome Y

Le chromosome Y ne contient pas de gènes impliqués dans des anomalies délétères mais il peut servir de contrôle pour les sexmatch et sexmismatch (vérification du décalage ou non des sondes selon le sexe des patients hybridés ensemble). Il pourrait également révéler des anomalies telles qu'un Klinefelter (47, XXY) dans le cas où il n'y aurait pas de caryotype réalisé.

Ces calculs expliquent la nécessité de connaître le sexe des patients pour interpréter correctement les données.

#### 1.3.4.4 Contrôles de qualité

Il est nécessaire de vérifier les critères de qualité de l'image obtenue par le scanner avant l'analyse des résultats. Le DLRS (Derivated Log Ratio Spread) représente de manière imagée « l'écart type » de fluorescence entre chaque spot ; il est acceptable lorsqu'il reste inférieur à 0,2. Au-delà il faudra prendre des précautions quant à l'interprétation des anomalies de petites tailles. Sont également évaluées les intensités de fluorescence des cyanines, le bruit de fond qu'elles génèrent (mesuré grâce aux spots non pucés) ainsi que la reproductibilité de la puce (cibles disposées en triples). Ces paramètres sont à prendre en

compte afin de vérifier la qualité de l'hybridation avant toute interprétation afin d'éliminer les faux positifs et faux négatifs.

## 1.4 Vérification des anomalies

Toute anomalie détectée doit être vérifiée par une autre technique : FISH ou PCR quantitative, chez le patient et si possible chez ses parents pour affirmer le caractère hérité ou *de novo* de l'anomalie génomique. La FISH est adaptée à la vérification des délétions de grande taille. Brièvement, la FISH consiste à hybrider de grands fragments d'ADN simples brins appelés sondes au niveau de l'ADN impliqué dans l'anomalie. Ces sondes sont des BAC qui couvrent la région d'intérêt. Elles sont fabriquées à partir d'un fragment d'ADN inséré dans un vecteur de clonage bactérien. Les BACs sont sélectionnés en fonction du réarrangement à étudier sur « Database of genomic variant ». Nous nous assurons qu'ils hybrident à l'endroit voulu avant de vérifier les anomalies détectées par CGH-array.

Nous devons également faire la preuve de l'implication du microremaniement dans le phénotype du patient. Pour distinguer les polymorphismes des anomalies délétères il faut rechercher si des cas semblables ont été décrits dans la littérature et consulter les bases de données comme :

- Decipher (<https://decipher.sanger.ac.uk/>),
- ECARUCA (<http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>),
- BACH (Base de données d'Anomalies Cytogénétiques Humaines) (<https://www.genopole-lille.fr/bach/menu.php>),
- Database of genomic variant (<http://projects.tcag.ca/variation/>)

## 1.5 Rendu des résultats

Les images d'anomalies visualisées sur DNA analytics® sont répertoriées sur des fiches avec l'interprétation de Database of genomic variant. Les anomalies sont ensuite retranscrites sur une fiche de compte rendu.

## 1.6 CNV et difficultés d'interprétation

Avec les avancées de l'hybridation comparative sur puces à ADN, il a été montré que le génome humain était beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait. De nombreuses régions génomiques présentent une variation dans le nombre de copies d'ADN. Ces polymorphismes sont détectés par la CGH-array et représentent l'un des principaux inconvénients de ce type d'analyse : ils génèrent un nombre élevé de vérifications et peuvent rendre l'interprétation du résultat plus difficile. Plus une puce est résolutive, plus on isole un nombre élevé de CNV et plus on est amené à confirmer leur existence ainsi que leur mode de transmission.

Plusieurs études sur des populations témoins ont considéré certaines de ces variations comme des polymorphismes relativement fréquents [11, 12]. Ces délétions insertions ou duplications sont appelées CNV (Copy Number Variation) ou CNP (Copy Number Polymorphism) et sont retrouvées chez tous les individus de la population générale. Un CNV est défini comme un fragment d'ADN de taille supérieure ou égale à 1 kb avec un nombre de copies différent comparé à un génome de référence [13].

Ils contribuent à la diversité mais pourraient également être des facteurs de susceptibilité à certaines maladies [13] ou au contraire être sélectionnés par l'évolution [14]. En effet ces régions peuvent contenir des gènes ou leurs régions de régulation [11].

Sur un panel de 47 individus phénotypiquement « normaux » de 4 continents différents, Sharp *et al.* [15] découvrent 119 régions polymorphes grâce à une puce constituée de BAC sélectionnés dans des régions de forts réarrangements. En 2006, Redon *et al.* [16] établissent la première carte du génome qui décrit les microdélétions et microduplications visualisées chez 270 individus « normaux » de 4 populations différentes. Ils montrent que 12% du génome (360 Mb) est constitué de CNV (soit 1447 CNVs). Ce chiffre a depuis été réévalué : 11700 CNVs sont aujourd'hui décrits [17]. Un recensement est disponible sur le site Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

L'interprétation de la CGH-array est compliquée par la présence de ces polymorphismes. Lee *et al.* [18] ont récemment proposé des critères (appelés « critères de Lee ») permettant de classer les CNV en pathogènes, bénins ou de signification clinique indéterminée (tableau 2). Un CNV pathogène est caractérisé par le fait qu'il est hérité d'un parent présentant le même phénotype, qu'il est rapporté chez des individus présentant le même phénotype clinique, qu'il est localisé dans une région riche en gènes, notamment morbides (critères majeurs). À l'inverse, un CNV non pathogène est hérité d'un parent sain, rapporté chez des individus ne présentant pas le phénotype clinique et contient peu de gènes. Cependant, l'interprétation des CNV reste délicate : certains CNV décrits comme bénins se

rèvent être pathogènes dans de nouvelles études des années plus tard, notamment lorsque la pénétrance des gènes est variable ou encore soumis à empreinte parentale.

Critères majeurs	Caractéristique d'un CNV pathogène	Caractéristique d'un CNV bénin
Hérité d'un parent sain		X
Hérité d'un parent malade	X	
Similaire chez un apparenté sain		X
Similaire chez un apparenté malade	X	
Identifié chez des sujets sains		X
Identifié chez des sujets malades	X	
Présence de gènes morbides	X	
Région riche en gènes	X	
Région pauvre en gènes		X
Critères mineurs		
Délétion	X	
Délétion homozygote	X	
Duplication		X
Amplification	X	
Taille>3Mb	X	
Absence de séquences régulatrices		X

**Tableau 2: Facteurs influençant l'évaluation des CNV (d'après Lee *et al.* [18]).**

## 1.7 Avantages et limites de la CGH-array

Comme décrit précédemment, la CGH-array offre une étude globale de génome sans *a priori* sur la nature des chromosomes impliqués. L'intérêt majeur est de pouvoir localiser précisément les anomalies et de pouvoir réaliser des centaines d'analyses ciblées en un seul test. De plus, cette technique ne nécessite pas de mise en culture préalable. La CGH-array peut donc être un recours lorsque le caryotype fœtal conventionnel n'a pu être obtenu en raison d'un échec de la culture cellulaire. Par ailleurs, c'est une technique hautement résolutive, automatisable et reproductible qui a déjà fait ses preuves en génétique constitutionnelle (étude notamment des retards mentaux). La CGH-array permet également de borner précisément les points de cassures des anomalies repérées en cytogénétique conventionnelle.

Les mosaïques sont facilement visualisables en CGH-array lorsque le pourcentage dépasse 20% [5]. C'est d'ailleurs une technique adaptée à la détermination des pourcentages de mosaïque en postnatal [19]. Une différence des taux entre l'étude de cellules en culture et celle du sang non cultivé indique que le processus de culture introduit un biais de sélection qui modifie le pourcentage de cellules anormales. Seule la CGH permet de déterminer le vrai pourcentage de mosaïcisme (ADN extrait de sang périphérique ne nécessitant pas de culture).

Malgré cela, la CGH-array se heurte à certaines limites. Tout d'abord, elle ne détecte que les anomalies chromosomiques « déséquilibrées » entraînant une perte et/ou un gain de copies d'une région chromosomique. Les anomalies « équilibrées » telles que les translocations réciproques, robertsioniennes, inversions ou insertions équilibrées ne sont visualisées qu'au caryotype traditionnel. En ce qui concerne l'activité de diagnostic prénatal, un questionnaire envoyé aux laboratoires de cytogénétique aux Etats Unis et au Canada sur une période de 10 ans a permis d'évaluer le taux des réarrangements équilibrés *de novo* et leurs conséquences [20]. Sur 377357 amniocentèses rapportées, on retrouve 0,05% de translocations réciproques *de novo* ; 6,1% de ces translocations sont associées à de graves anomalies congénitales. Le taux des translocations robertsionnennes *de novo* est de 0,01% (3,7% de ces translocations sont associées à des anomalies congénitales). Celui des inversions équilibrées *de novo* est de 0,1% (9,4% de ces inversions sont associées à des anomalies congénitales).

Certaines anomalies « équilibrées » peuvent donc être responsables d'anomalies phénotypiques (points de cassure de remaniements de structure qui interrompent la séquence codante d'un gène) mais cela reste très rare. Une revue des études cytogénétiques a été menée chez 36325 patients atteints de retard mental aux Pays Bas entre 1995 et 2005 [21]. 155 translocations équilibrées et inversions *de novo* sont repertoriées. Cela représente donc 0,43% des patients atteints de retard mental. Parmi ces patients, 57 déséquilibres supplémentaires sont retrouvés en CGH-array. Le taux d'anomalies réellement équilibrées visible uniquement lors du caryotype et responsables d'anomalies phénotypiques est donc de 0,27%.

Dans cette même étude, ils estiment que la proportion des anomalies qui seraient restées invisibles par la seule exploration par CGH-array est de 0,78%. La CGH-array en analyse de première intention dans les explorations des retards mentaux et retards du développement détecterait ainsi plus de 99% des anomalies pathogènes. Néanmoins cette étude montre bien que CGH-array et caryotype sont deux techniques complémentaires.

D'autres limites ont été mises en évidence. Selon le type de puces utilisées certaines études ont révélé l'incapacité pour la CGH-array de détecter les polyploïdies. En s'équipant de puces constituées de BAC et PAC deux équipes ne parviennent pas à diagnostiquer les polyploïdies [22, 23]. Tyreman *et al.* [24]. montrent au contraire que la puce Affymetrix® GeneChip 6.0 peut les détecter. En prénatal les triploïdies sont souvent repérées à l'échographie. Lors de suspicion durant la vie fœtale d'autres moyens diagnostics comme la PCR quantitative peuvent être utilisées [22].

## 1.8 Applications en génétique

En génétique constitutionnelle la principale application de la CGH-array est la recherche de déséquilibres chromosomiques chez les patients atteints de retard mental avec caryotype normal. L'analyse combinée du caryotype et des régions subtélomériques par FISH (régions connues pour être responsables de retard mental car riches en gènes) permet de poser un diagnostic chez 8 à 10% des patients [25]. La prévalence des microremaniements télomériques est de 6,8% chez les patients atteints de retard mental modéré à sévère [26]. En 2002, Veltman *et al.* [27] montrent déjà que la CGH-array peut améliorer la détection des réarrangements télomériques.

La CGH-array détecte ainsi 7% à 17% d'anomalies supplémentaires chez des patients présentant retards psychomoteurs ou malformations congénitales. Ces taux varient en fonction

des critères cliniques retenus, de la taille des populations étudiées, des analyses conventionnelles réalisées et du type de puces utilisées [9, 28-36]. Il faut préciser que ces taux ne regroupent pas tous les CNV identifiés. Les anomalies dont la causalité n'est pas certaine ne sont pas répertoriées (tableau 3).

	Nombre de patients	Nombre d'anomalies causales additionnelles révélées par CGH-array	Résolution des puces utilisées
Shaw-Smith <i>et al.</i> 2004 [29]	50	7 (14%)	1 Mb
Rosenberg <i>et al.</i> 2006 [30]	81	13 (16%)	1 Mb
Schoumans <i>et al.</i> 2005 [28]	41	4 (9,8%)	1 Mb
Menten <i>et al.</i> 2006 [31]	140	19 (13,6%)	1 Mb
De Vries <i>et al.</i> 2005 [32]	100	10 (10%)	100 kb
Friedman <i>et al.</i> 2006 [33]	100	11 (11%)	100 kb
Miyake <i>et al.</i> 2006 [34]	30	5 (16,7%)	1,4 Mb
Vissers <i>et al.</i> 2003 [35]	20	3 (15%)	1 Mb
Gijsbers <i>et al.</i> 2009 [9]	318	22 (6,9%)	10 kb
Tyson <i>et al.</i> 2005 [36]	22	2 (9%)	1 et 3 Mb

**Tableau 3: Etudes par CGH-array de patients atteints de retard mental.**

Parmi ces anomalies, certaines s'avèrent être des microdélétions ou des microduplications récurrentes. En étudiant de grandes cohortes de patients atteints de retard mental par CGH-array, de nouveaux syndromes ont été individualisés. Redon *et al.* [37] font par exemple la description en 2006 de deux patients présentant des phénotypes communs (macrocéphalie, retard psychomoteurs, hyperactivité et dysmorphisme facial) avec une microdélétion interstitielle en 9q22.32-q22.33 causale. Ils suggèrent que cette délétion cryptique soit prise en compte dans les diagnostics des retards mentaux et des retards de croissance. En 2008, Slavotinek *et al.* [38] rapportent les principaux nouveaux syndromes décrits : délétion et duplication en 17q21.31, délétion 15q13.3, délétion 16p11.2, délétion 15q24, délétion 1q41q42, délétion 2p15p16.1 et délétion 9q22.3.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la CGH-array peut révéler des déséquilibres chez les patients porteurs d'un réarrangement chromosomique en apparence équilibré. Sur 155 anomalies équilibrées au caryotype, 57 déséquilibres (36%) sont retrouvés par CGH-array (cohorte de 36325 patients atteints de retard mental) [21]. Ce taux d'anomalies cryptiques additionnelles a été retrouvé dans plusieurs études [39] [40-42].

## 2. Le diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal relève des « pratiques médicales ayant pour but de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité » (article L2131-1 du code de la santé publique). Il repose sur le prélèvement de villosités chorales entre 10 et 13 semaines d'aménorrhées (SA), de liquide amniotique, le plus souvent à partir de 15 SA et de sang fœtal à partir de 18 SA [43]. Les anomalies génétiques sont explorées grâce au caryotype standard et à la recherche d'anomalies ciblées par biologie moléculaire ou par FISH (Fluorescent in Situ Hybridization). Mais ces techniques sont limitantes : le caryotype constitutionnel a une résolution insuffisante, la FISH est une technique ciblée qui ne s'intéresse qu'à un locus particulier.

### 2.1 Place de la génétique en diagnostic prénatal

La technique de référence du diagnostic des anomalies chromosomiques est le caryotype. Il est obtenu après la mise en culture de villosités chorales, de cellules fœtales issues du liquide amniotique (LA) ou de sang fœtal (SF). Le caryotype permet une analyse globale de l'ensemble des chromosomes et met en évidence des anomalies de nombre et/ou de structure. Cependant, cette technique qui requiert une étape de culture cellulaire prend du temps. En routine, deux à trois semaines sont nécessaires pour obtenir un résultat sur LA. Ceci augmente l'attente et l'anxiété des patients. Par ailleurs, lorsque l'anomalie chromosomique est submicroscopique, elle peut passer inaperçue. En effet, le niveau de résolution ne dépasse pas 7.5 Mb pour le caryotype conventionnel 400 bandes, 2 Mb pour le caryotype haute résolution 800 bandes. D'autre part, cette technique peut être compromise par l'échec de culture ou la contamination par des cellules maternelles.

La FISH permet une recherche d'anomalies ciblées de petites tailles (1 à 3 Mb) lorsqu'il existe une orientation clinique (anomalie échographiques etc..). Mais il ne s'agit pas d'une étude globale du génome. Sans orientation clinique préalable, la FISH est peu informative. En situation prénatale, le phénotype est parfois limité à quelques signes échographiques difficiles à relier à un déséquilibre génomique connu.

Des outils de biologie moléculaire comme la QF PCR (PCR quantitative fluorescente) et le MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) ont été développés et ajoutés aux méthodes conventionnelles pour détecter les principales aneuploïdies [44]. Ceci

permet un diagnostic rapide des trisomies 13, 18, 21, X et Y et une meilleure prise en charge des patientes (temps d'attente raccourci).

La biologie moléculaire prend ainsi de plus en plus de place dans les stratégies de diagnostic en prénatal.

## 2.2 CGH-array et DPN

L'utilisation de la CGH-array en DPN est encore limitée. Son utilisation systématique n'est pas encore d'actualité, notamment à cause des problèmes liés à la qualité des prélèvements mais surtout à cause des difficultés d'interprétations.

### 2.2.1 Préambules

Les premières études ont consisté à étudier les prélèvements issus de fausses couches spontanées. En 2004, Schaeffer *et al.* [45] analysent 41 villosités choriales en utilisant à la fois la cytogénétique classique (caryotype bande G) et la cytogénétique moléculaire (puce de 287 cibles BAC GenoSensorarray 300). La CGH-array détecte toutes les anomalies décelées par le caryotype : la robustesse de la technique est affirmée. Elle révèle également de nouvelles anomalies dans 9,8% des cas (4/41) : une mosaïque de trisomie 20, une duplication de la région télomérique du chromosome 10, une délétion interstitielle du chromosome 9p et une duplication interstitielle sur le 15q. Cette étude retrospective montre que la technologie de la CGH-array surmonte les limites de la cytogénétique conventionnelle (échec de culture, limites de résolution...).

Warren *et al.* [46] ont publié une autre série de tissus fœtaux et placentas issus de fausses couches entre 10 et 20 semaines d'aménorrhées. Le caryotype est normal (n=9) ou non réalisé (n=26). L'ADN est correctement extrait dans 30 cas sur 35 (échec d'extraction des tissus inclus en paraffine). 13% d'anomalies sont retrouvées en CGH-array. Ces anomalies concernent de larges régions d'ADN et pourraient apporter des explications aux pertes fœtales inexplicables.

La CGH-array a également été appliquée sur des prélèvements fœtaux (poumons congelés) après interruption médicale de grossesse (n=41) ou mort fœtale spontanée (n=8) en raison de syndromes polymalformatifs inexplicables [47]. Les fœtus examinés présentent au

moins trois malformations et ont un caryotype normal. Les puces 287 cibles BAC GenoSensorarray 300® révèlent 8 réarrangements chromosomiques (16,3%). 4 d'entre eux sont considérés comme étant clairement responsables de la pathologie associée (8%).

De manière attendue, en plus de montrer une concordance complète avec les résultats normaux et anormaux du caryotype, la CGH-array améliore le taux de détection des anomalies chromosomiques fœtales. Benzaken *et al.* [48], proposent que la CGH-array soit effectuée chez tous les fœtus ayant des signes d'appels échographiques très évocateurs d'anomalies chromosomiques et dont le caryotype conventionnel est normal ou équilibré.

### 2.2.2 CGH-array et liquides amniotiques

Les liquides amniotiques sont riches en ADN fœtal [49]. La première étude prospective évaluant l'utilité de la réalisation d'une CGH sur du liquide amniotique "frais" a été menée par Lapierre *et al.* en 2000 [50] : 71 LA prélevés entre 14 et 35 semaines d'aménorrhées ont été analysés conjointement en CGH (sur chromosomes en métaphases) et caryotype conventionnel. Les critères d'inclusions sont l'âge maternel avancé (21,1%), les anomalies échographiques (73.3%), les marqueurs biochimiques (5.6%). 66 échantillons sont informatifs (93%). La CGH est appliquée avec succès en utilisant 5 à 10 mL de liquide amniotique non cultivé. Un résultat complet est obtenu en 3 à 4 jours pour la CGH contre 10 à 15 jours pour le caryotype.

Le facteur le plus limitant est la qualité de l'ADN de départ. L'ADN isolé de LA est souvent dégradé à cause de l'importance des cellules mortes et des débris. Les premiers essais de Larrabee *et al.* [51] en CGH-array sur LA ne permettent d'hybrider que 17 des 28 LA à cause de la trop faible teneur en ADN des échantillons.

Plusieurs équipes ont réussi à surpasser cette limite. En 2006, Lapaire *et al.* [23] extraient l'ADN à partir de 10 mL de liquide amniotique. L'extraction est réalisée avec le kit QIAamp DNA Maxi Kit Quiagen® en combinaison avec 40 mL de tampon AVL Quiagen® (supplémenté en substances entraînant les acides nucléiques). L'hybridation est possible dans 10 cas sur 10 (puce BAC array 434 clones Spectral constitutional chip®)

Bi *et al.* [52] réussissent à isoler une quantité suffisante d'ADN dans 13 sur 15 échantillons de LA. Une étape d'amplification supplémentaire (kit WGA1 GenomePlex

WGA®) leur permet d'appliquer la CGH-array aux 2 échantillons restant avec des résultats comparables. Ils montrent ainsi la faisabilité de la CGH-array en diagnostic prénatal avec une puce à oligonucléotides (V6 OLIGO® : puce de 44000 oligonucléotides de 60 paires de base commercialisée par Agilent®) pour analyser directement sans culture les cellules du LA.

Faas *et al.* [53] testent également l'ADN extrait de liquide amniotique non cultivé sur les puces SNP 250K. 3 à 4 mL d'échantillons sont nécessaires. Sur 38 fœtus et nouveaux-nés inclus dans l'étude, 21 ADN obtenus de LA sont correctement hybridés. L'extraction est réalisée à l'aide du kit QIAmp DNA Mini de Qiagen® avec une élution finale dans 50 µL de tampon.

### 2.2.3 Choix des puces

L'importance du nombre de CNV dans la population et l'existence de régions aux significations incertaines ont conduit certaines équipes à construire des puces ciblées constituées d'un nombre limité de clones. Ces puces regroupent les régions génomiques dont le déséquilibre est reconnu comme étant pathogène. De cette manière, les capacités de diagnostic sont maximisées tout en limitant les faux positifs [54, 55]. En effet, et d'autant plus en situation prénatale, la découverte d'un déséquilibre génomique doit conduire à un conseil génétique clair pour le futur de la grossesse.

Rickman *et al.* [22] proposent l'utilisation de puces composées de 600 clones (résolution moyenne de 10 Mb) réunissant des régions aux syndromes génétiques connus. En utilisant cette puce adaptée au diagnostic prénatal, 29 anomalies préalablement détectées par FISH ou caryotype sont retrouvées sur un total de 30 échantillons, alors que, seulement 22 réarrangements sont correctement identifiés avec une puce BAC de 1Mb. 30 échantillons de contrôles négatifs sont testés en parallèle : il n'y a aucun faux positif. Cette puce permet par ailleurs de travailler avec une quantité de liquide amniotique faible (1 à 2 mL de liquide amniotique non cultivé) puisque 0,100 µg d'ADN sont requis pour l'hybridation.

Dernièrement une puce optimisée pour le diagnostic prénatal a été construite [56]. Elle cible les délétions et duplications cryptiques de 26 syndromes génétiques connus. Même si elle ne contient qu'un nombre très limité de clones ce système peut apporter une réponse claire et rapide pour le screening des anomalies inframicroscopiques.

Coppinger *et al* [57] montrent cependant qu'en prénatal l'utilisation de puces recouvrant le génome entier est préférable. Les puces pangénomiques de hautes résolutions augmentent le taux de détection des anomalies submicroscopiques de signification clinique (2,7% d'anomalies avec une puce haute résolution contre 0,9% avec une puce ciblée) sans augmenter le taux d'anomalies de signification indéterminée (0,5% que ce soit avec une puce haute résolution ou une puce ciblée).

#### 2.2.4 Apport diagnostique de la CGH-array en prénatal

En terme d'informations nouvelles pour le conseil génétique, un gain de 1,3 à 15,6 % par rapport au caryotype est observé en fonction du type de puce utilisée, de la cohorte étudiée, des indications retenues et de l'étude cytogénétique préalable (tableau 4).

Shaffer *et al.* [58] et Kleeman *et al.* [59] utilisent une puce ciblée de type BAC-array et retrouvent dans leurs cohortes 1,3% et 2% respectivement d'anomalies considérées comme causales du phénotype. Van den Veyver *et al.* [60] testent l'ADN de 300 fœtus avec une puce BAC ciblée constituée de 1476 clones et trouvent 2,30% d'anomalies causales. Tyreman *et al* [24] et Faas *et al.* [53] étudient une population de fœtus présentant une ou plusieurs anomalies échographiques avec une puce AffymetrixGeneChip 6.0 et obtiennent respectivement 9,4% et 15,6% d'anomalies pathologiques. Cette différence peut être due au nombre de patients inclus dans l'étude. En ciblant une population avec au moins trois malformations (n=42) ou une anomalie cérébrale sévère (n=8), Valduga *et al.* [61] trouvent 6 anomalies pathogènes chez 5 fœtus polymalformés (soit 10% de fœtus avec déséquilibres chromosomiques). Les analyses sont effectuées avec une puce de résolution moyenne (44K Agilent®) pour la presque totalité des fœtus (utilisation d'une puce 244K pour un fœtus porteur d'une duplication 22q11.2 de 2,4 Mb). Dernièrement, Evangelidou *et al.* [62] ont publié leurs résultats d'activité en diagnostic prénatal avec une puce BAC de 1Mb. Grâce à la CGH-array, ils retrouvent deux déséquilibres pathogènes (8%) chez deux fœtus présentant des anomalies échographiques.

Le taux de détection de résultats anormaux en CGH-array est beaucoup plus élevé en post-natal : sur 1375 patients âgés de 0 à 84 jours, 11,4% d'anomalies délétères sont détectées avec une puce ciblée de type BAC-array (contre 1.3% en prénatal avec la même puce) [58]. Parmi ces résultats anormaux, 40% des enfants sont adressés pour dysmorphisme. Ces résultats montrent l'importance de l'examen clinique et toutes les difficultés d'orientation devant de simples signes échographiques qui parfois ne sont pas confirmés à la naissance.

Outre le diagnostic moléculaire d'anomalies échographiques, la CGH-array est également d'une aide précieuse pour la caractérisation des marqueurs chromosomiques surnuméraires décelés au caryotype (fragments chromosomiques trop petits pour être caractérisés). On estime que ces marqueurs chromosomiques surnuméraires sont retrouvés dans 0,075% des caryotypes en diagnostic prénatal et 0,044% des caryotypes chez les nouveaux nés [63]. Callier *et al.* [64] présentent le premier cas de diagnostic prénatal de marqueur surnuméraire caractérisé par CGH-array : ils caractérisent une duplication 20p11.2-q11.23 délétère.

	Indications	Nombre de patients	Pourcentage d'anomalies causales non retrouvées par les méthodes de cytogénétiques conventionnelles
Kleeman <i>et al.</i> 2009 [59]	anomalies échographiques (isolées n=33, multiples n=17)	50	2%
Van de Veyver <i>et al.</i> 2009 [60]	âge maternel avancé (n=123), anomalies échographiques(n=84), histoire familiale (n=87), déséquilibre chromosomique du caryotype(n=28), marqueurs sériques maternels de dépistage de trisomie 21 anormaux (n=9), anxiété parentale (n=33), inconnues (n=3)	300	2,30%
Shaffer <i>et al.</i> 2008 [58]	anomalies échographiques (n=110), anxiété (n=20), histoire familiale (n=19), âge maternel avancé (n=2)	151	1,30%
Valduga <i>et al.</i> 2010 [61]	Polymalformations (n=42), anomalie cérébrale sévère (n=8)	50	10,00%
Tyreman <i>et al.</i> 2009 [24]	anomalies échographiques	106	9,40%
Faas <i>et al.</i> 2009 [53]	anomalies échographiques	32	15,60%
Evangelidou <i>et al.</i> 2010 [62]	anomalies échographiques (n=15), réarrangement équilibré (n=10)	25	8%

**Tableau 4 : Apports de la CGH-array dans le diagnostic prénatal.**

### 3. Objets de l'étude

L'introduction de la CGH-array dans la stratégie de diagnostic prénatal est à ce jour controversée. Les questions discutées sont diverses : bénéfices et risques apportés par la méthode, type de puce adapté, interprétation des résultats... Malgré cela il existe un réel besoin d'améliorer le taux de détection des aberrations génétiques causales d'anomalies phénotypiques en prénatal.

Le premier objectif de ce travail a été d'évaluer la faisabilité de la CGH-array sur des prélèvements prénataux. Le problème majeur est d'obtenir du matériel de qualité, en quantité suffisante, pour procéder à l'analyse du génome par CGH-array. Nous avons donc réalisé une étude prospective en sélectionnant les grossesses pour lesquelles était programmée une interruption pour raison médicale. Nous rapportons également les cas où le laboratoire de cytogénétique a eu recours à la CGH-array pour affiner son diagnostic. Ces dossiers nous ont amenés à mettre au point la technique de CGH-array en prénatal.

A la lumière de nos résultats nous avons effectué un comparatif entre les différents types de prélèvements quant à la qualité de rendu en CGH-array. Nous avons été confrontés aux difficultés d'interprétation. Nous nous sommes également penchés sur la faisabilité en pratique routinière, au temps nécessaire pour le rendu des résultats dans la perspective future de pouvoir appliquer cette technique en diagnostic prénatal. Le délai est très important en diagnostic prénatal surtout lorsque les anomalies échographiques apparaissent tardivement. Enfin nous discuterons de la place de la CGH-array en diagnostic prénatal : l'utilisation de cet outil doit-elle se limiter aux cas d'IMG ? A-t-elle sa place dans le diagnostic prénatal ?

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1. Patients et échantillons

La CGH-array a été mise au point en prénatal à partir d'échantillons provenant d'interruptions médicales de grossesse. Aucun geste invasif n'a été réalisé spécifiquement pour cette étude. A aucun moment il n'a été pris de risque supplémentaire pour la vie des fœtus. Toutes les ponctions sont réalisées lors de l'IMG ou parallèlement aux prescriptions de génétique « conventionnelle ».

L'ensemble des couples sont informés lors de la signature du consentement éclairé des investigations supplémentaires réalisées et du risque d'échec de la technique, qui, au moment de la mise en place de l'étude, est du domaine du développement scientifique.

Quatre types de prélèvement sont recueillis : villosités, liquides amniotiques, cellules en culture issues du liquide amniotique en culture et sangs fœtaux. Les prélèvements nous sont adressés par le centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal (CPDPN) du CHU de Poitiers. Les liquides amniotiques et sangs fœtaux sont ponctionnés lors de l'interruption médicale de grossesse, avant l'injection de foeticide, parallèlement aux échantillons conservés pour DNAtèque. Aucun acte invasif supplémentaire n'est donc réalisé. Ils sont recueillis sur tube Falcon et EDTA respectivement. Les villosités nous sont envoyées pour diagnostic rapide par biologie moléculaire des principales aneuploïdies. L'ADN est conservé à +4°C. Il est utilisé en CGH array lorsque liquides amniotiques et sangs fœtaux ne sont pas disponibles (échec de ponction, geste invasif supplémentaire...). Les cellules en culture issues des LA sont envoyés par courrier à température ambiante par un laboratoire de cytogénétique extérieur au CHU de Poitiers : laboratoire CYLAB situé à La Rochelle. Dans un premier temps, seules les grossesses pour lesquelles une interruption médicale est programmée et dont la cause est probablement génétique sont concernées.

Pour les 2 grossesses n'ayant pas abouti à une interruption médicale les échantillons sont recueillis lors de la ponction pour caryotype fœtal.

## 2. Extraction des ADN

Différents protocoles d'extraction ont été mis en place selon la nature des prélèvements. Le but est d'obtenir une quantité d'ADN suffisante (1 µg avec une concentration de 50 ng/µl) et de bonne qualité pour pouvoir poursuivre l'analyse par CGH-array. Cette étape est essentielle car elle conditionne le marquage de l'ADN.

### 2.1 Sangs fœtaux

Pour obtenir l'ADN dans les conditions expérimentales requises, les sangs fœtaux sont extraits avec le kit QIAamp® DNA Blood Midi.

Afin d'éliminer toute trace d'ARN, 1 mL de sang fœtal est incubé 30 min à 37°C en présence de 100 µL de Protéinase K (20 mg/mL) et 10 µL de RNaseA (10 mg/mL). Cette étape de digestion par la RNase permet d'obtenir une concentration finale d'ADN plus juste. En effet les concentrations de l'ADN et de l'ARN sont déterminées par étude de leur absorbance à une longueur d'onde de 260 nm avec un spectrophotomètre Nanodrop® qui ne distingue pas l'ADN de l'ARN dans notre échantillon. En présence d'ARN, les concentrations finales en ADN sont surestimées. Par conséquent, la quantité finale d'ADN marquée par le fluorochrome est réduite et se trouve en quantité insuffisante pour permettre l'hybridation sur les puces.

L'extraction de l'ADN se poursuit par l'ajout de 1,2 mL de tampon de lyse AL; puis le mélange est mis à incuber à 70°C pendant 10 min au bain marie. Après addition d'1 ml d'éthanol absolu, le mélange est alors dans les conditions de pH optimum (pH acide) pour la fixation de l'ADN sur une colonne de silice. Il est déposé sur un ensemble colonne/tube collecteur et centrifugé à 3000g pendant 3 min à 20°C. L'ADN fixé sur la colonne est lavé une première fois par 2 mL de tampon AW1 (centrifugation à 4000g, 1 min à 20°C), puis lavé une seconde fois avec 2mL de tampon AW2 (centrifugation 4500g, 30 min à 20°C). Pour évaporer les traces résiduelles d'éthanol, la colonne est centrifugée à vide (4500g, 1 min à 20°C) puis est placée 10 min dans une étuve à 70°C. Deux éluions successives ont lieu avec 200 µL de tampon AE : on dépose 200 µL d'éluant sur la membrane de silice et on incube 5 min à température ambiante. La colonne est centrifugée à 4500g (5 min à 20°C) puis l'éluat est remis au contact de la membrane pendant 5 minutes. L'ADN est élué par une nouvelle centrifugation (4500g, 5 min à 20°C). Ce protocole d'éluion permet d'améliorer la quantité finale de l'ADN extrait.

## 2.2 Liquides amniotiques

Les prélèvements sont centrifugés 10 minutes à 2500g et le culot cellulaire obtenu est lavé à deux reprises par 800 µl de PBS (Phosphate Buffered saline).

L'ADN est alors extrait du culot cellulaire en utilisant le kitQIAamp® DNA Mini (Qiagen). Le culot cellulaire est repris dans 400 µl de PBS et réparti dans deux tubes qui seront traités séparément dans un premier temps. Le mélange PBS/cellules (200 µl) est mis à incuber 30 minutes à 37°C en présence de 3 µl de RNase A (10 mg/mL) et 20 µL de protéinase K (20 mg/mL). Les cellules sont lysées par ajout de 200 µL de tampon AL (incubation 15 min à 56°C). L'incubation est prolongée si la persistance de débris cellulaires est constatée. Après ajout de 200 µl d'éthanol absolu et homogénéisation sur un vortex, le mélange est alors dans les conditions de pH optimum (pH acide) pour la fixation de l'ADN sur une colonne de silice. Les deux extraits cellulaires sont déposés sur une seule colonne (deux centrifugations successives à 8000g pendant une minute à 20°C). L'ADN fixé sur la colonne est lavé par 500 µL de tampon AW1 (centrifugation à 8000g, 1 min à 20°C), puis lavé par 500 µL de tampon AW2 (centrifugation à 21000g, 3 min à 20°C). La colonne est centrifugée à vide (21000g, 1 min à 20°C) pour éliminer les traces résiduelles de solvant. L'ADN est élué comme décrit précédemment (deux fois de manière successive) par 50 µl de tampon AE.

Lorsque la concentration finale en ADN est inférieure à 50ng/µL, l'éluat est évaporé 12h au bain marie à sec à 37°C puis repris dans un volume d'eau bidistillée garantie sans nucléases (GIBCO®) permettant d'obtenir la concentration requise.

## 2.3 Cellules de liquide amniotique en culture

Les cellules en culture nous sont envoyées par courrier par le laboratoire Cylab de La Rochelle. Dès réception, nous nous assurons que les cellules sont à confluence. Dans le cas contraire, elles sont remises à l'étuve à 37°C.

La préparation du culot cellulaire a lieu à partir de 2 flacons de 25 cm<sup>2</sup> de culture par patient. Chaque flacon est traité indépendamment avant d'être déposé sur une même colonne lors de l'extraction. Le milieu de culture est éliminé avec une pompe à vide. Le tapis cellulaire est lavé avec 5 mL de PBS. Les cellules sont remises en suspension dans 2,5 mL de PBS en grattant le tapis cellulaire. Elles sont transférées dans un tube de type

Falcon® de 15 mL. Après une centrifugation 5 minutes à 3000g, le surnageant est éliminé et chaque culot cellulaire est repris dans 200 µL de PBS.

L'extraction est ensuite réalisée avec le kit QIAamp® DNA Mini en suivant le protocole appliqué aux liquides amniotiques.

## 2.4 Villosités chorales

Les villosités chorales sont triées à la loupe binoculaire afin d'éliminer les tissus d'origine maternelle. Le protocole d'extraction de l'ADN est le même que celui utilisé pour les liquides amniotiques hormis quelques modifications : absence de digestion par la RNase, temps de lyse cellulaires augmenté (environ 20 minutes jusqu'à dissolution complète) et élution dans un volume plus grand (100 µl car les villosités chorales sont beaucoup plus riches en ADN que les liquides amniotiques).

Pour chaque échantillon, quelque soit la nature du prélèvement, la concentration en ADN est estimée par spectrophotométrie au NanoDrop®. Leur qualité est évaluée par migration en gel agarose 1% (p/v) en utilisant un tampon de migration TAE 0.5X (Tris 20 mM ; Acétate 20 mM ; EDTA 1mM) et une pointe de cône de Bromure d'éthidium, qui permet de visualiser l'ADN sous illumination UV. Le volume correspondant à 500 ng d'ADN est déposé avec 2 µL de bleu 10X et est soumis à une électrophorèse en comparaison avec le marqueur de taille d'ADN Lambda/*HindIII*.

## 3. Marquage des ADN

Les volumes réactionnels sont donnés pour marquer 1 µg d'ADN. Le volume maximal d'ADN de départ est de 20,2 µL. Tout échantillon dont la concentration est inférieure à 50 ng/µL sera rejeté. Les ADN trop concentrés sont dilués dans de l'eau bidistillée Gibco®.

Nous travaillons par série de 4 échantillons pour un fluorochrome donné, soit 8 échantillons au total (4 échantillons marqués par une cyanine 3, 4 échantillons marqués par une cyanine 5).

### 3.1 Digestion enzymatique

La réaction de digestion enzymatique contient, pour 1 µg d'ADN : 2µL d'eau bidistillée, 2,6 µL de tampon C 10X, 0,2 µL de BSA (Bovine Serum Albumine) à 10 µg/µL et 0,5 µL de chaque enzyme *AluI* (10 U/µL) et *RsaI* (10 U/µL). Les quantités sont préparées pour 9 tubes (8+1 tubes). 5,8 µL de ce mélange sont ajoutés à chaque échantillon d'ADN; on obtient un volume réactionnel final de 26 µl. Les échantillons sont incubés 2 heures à 37°C. Les enzymes sont ensuite inactivées par une incubation à 65°C pendant 20 minutes. La réaction est ensuite conservée dans de la glace.

### 3.2 Marquage des ADN par la technique d'amorçage aléatoire

5 µL d'un mélange de séquences aléatoires sont ajoutés dans chaque échantillon après digestion enzymatique.

L'ADN est dénaturé 3 minutes à 95°C puis est mis à incuber dans de la glace 5 minutes.

Deux mélanges réactionnels sont préparés pour marquer l'ADN : la moitié des échantillons est marquée par un fluorochrome de type cyanine 3, l'autre moitié par un fluorochrome de type cyanine 5. Ces mélanges sont préparés pour une quantité de 5 tubes qui contiennent chacun 10 µL de tampon 5X, 5 µL de dNTP 10X, 1 µL d'enzyme Exo-Klenow et 3 µL de fluorochrome cyanine 3 ou cyanine 5 (quantités pour un tube). 18 µL de ce mélange sont ajoutés à chaque échantillon contenant l'ADN et les amorces aléatoires. La réaction est mise à incuber 2h à 37°C puis l'enzyme est inactivée 20 minutes à 65°C. L'ADN est ensuite conservé dans de la glace. A partir de cette étape, il faut prendre soin de protéger les échantillons de la lumière.

### 3.3 Purification

Les ADN marqués sont purifiés et concentrés grâce aux filtres Amicon® Ultra-0.5. L'ADN est filtré une première fois par centrifugation à 8000g pendant 1 minute puis est lavé avec 430 µL de Tris EDTA (TE) (centrifugation 10 minutes à 14000g). Un deuxième lavage a lieu avec 480 µL de TE (centrifugation 10 minutes à 14000g). L'ADN est récupéré par

retournement des filtres et par centrifugation à 8000g pendant une minute. Le volume de chaque échantillon est ajusté à 41  $\mu\text{L}$  avec du TE.

### 3.4 Qualité des sondes marquées

L'efficacité du marquage est évaluée par dosage sur Nanodrop® à partir de 1,5  $\mu\text{L}$  d'échantillon marqué. Dans le programme « microarray » sont mesurées les concentrations d'ADN marqué par l'un ou l'autre fluorochrome à deux longueurs d'ondes : 550 nm pour la cyanine 3 et 650 nm pour la cyanine 5.

Le rendement du marquage correspond à la quantité d'ADN marqué en cyanine (3 ou 5) sur la quantité d'ADN de départ (1  $\mu\text{g}$ ). Un rendement supérieur à 5 indique un marquage correct. En dessous le marquage sera recommencé.

L'activité spécifique des sondes représente le rapport entre la concentration en cyanine 3 ou 5 (exprimée en  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ ) et la concentration en ADN total (en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Les valeurs attendues se situent autour 25 à 40  $\text{pmol}/\mu\text{g}$  pour les échantillons marqués en Cy3 et 20 à 35 pour les échantillons marqués en Cy 5.

## 4. Hybridation

Les échantillons sont intégrés à des séries de patients (sangs périphériques) et hybridés en suivant la méthode du trio ou du quatuor lorsque la quantité initiale d'ADN extraite le permet.

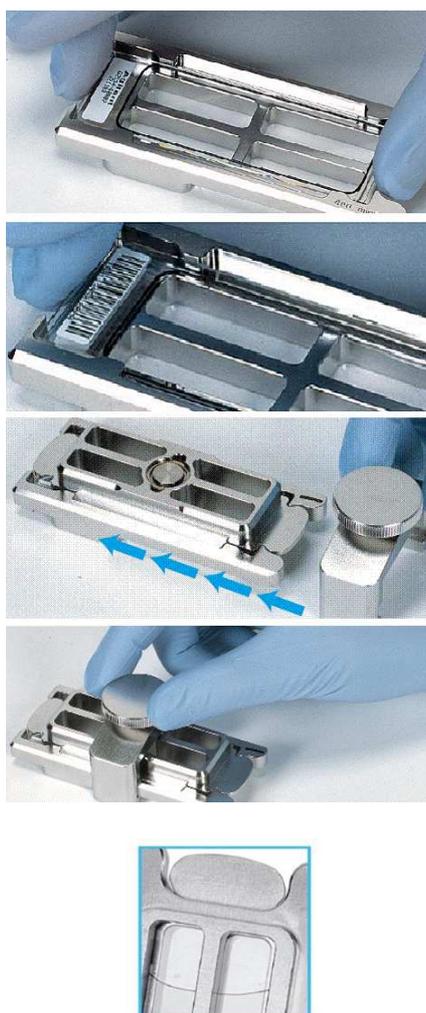
### 4.1 Mélange réactionnel

Le mélange d'hybridation comprend pour un tube : 25  $\mu\text{L}$  d'ADN Cot-1 Humain (Invitrogen®), 26  $\mu\text{L}$  d'agent bloquant 10X (Agilent Technologies®) et 130  $\mu\text{L}$  de tampon d'hybridation 2X (Agilent Technologies®). 39,5 $\mu\text{L}$  d'ADN marqués en Cy5 et Cy3 sont ajoutés aux 181  $\mu\text{L}$  du mélange d'hybridation, dénaturés 3 minutes à 95°C et incubés 30 minutes à 37°C.

## 4.2 Chambre d'hybridation

La partie inférieure de la chambre d'hybridation est placée sur la paillasse. La lame porte joint est posée, joint vers le haut sur ce support. 245  $\mu$ L du mélange réactionnel est déposé au contact des deux emplacements jointés de la lame. Cette lame est recouverte par la puce à ADN (spots de la puce vers l'intérieur). La chambre est fermée à plat (figure 15). L'incubation a lieu sous agitation (rotation de 20 tours par minute) dans le four Agilent technologies® pendant 40h à 65°C.

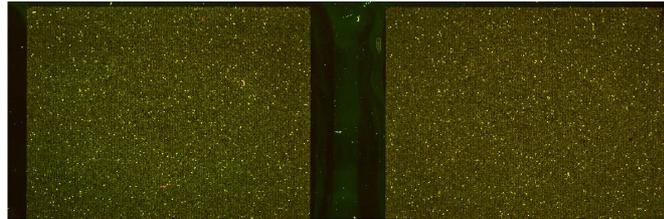
Les chambres d'hybridation sont ensuite démontées. La lame pucée et la lame joint sont désassemblées dans le premier récipient de lavage (Wash 1 Agilent technologies®). La puce est ensuite lavée 5 minutes sous agitation dans un tampon de lavage (Wash 1 Agilent technologies®) et 1 minute sous agitation dans la solution Wash 2 (Agilent technologies®), solution stabilisatrice et fixatrice maintenue à 37°C.



**Figure 15: Etapes d'assemblage de la chambre d'hybridation.**

## 5. Analyse des puces

L'acquisition des images se fait par lecture des puces sur le scanner Agilent technologies® grâce au logiciel Agilent Scan Control® (figure 16). Les données sont extraites par le logiciel Feature extraction® qui traite les données numériques, identifie chaque spot et lui redonne les coordonnées du génome lui correspondant.



**Figure 16: Acquisition des spots d'une puce 2x105K par le scanner.**

DNA analytics® permet enfin de visualiser les résultats comme décrit dans le paragraphe « Hybridation ». Une délétion ou duplication sera suspectée lorsque seront retrouvés trois oligonucléotides contigus déviants. Suivant les recommandations de l'American society for clinical pathology, 3 sondes consécutives déviantes de la même façon (positif ou négatif) avec un log ratio supérieur à 0,25 est requis pour définir un déséquilibre [65].

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

51 interruptions médicales de grossesse (IMG) ont été actées par le centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal entre le 20 mai 2010 et le 28 octobre 2010. Parmi celles-ci 34 ont eu lieu au CHU de Poitiers. Dans 20 cas sur 34 un diagnostic était posé au moment de l'interruption (pré éclampsie, Turner, Trisomie 18, 13 ou 21...); ils ont donc été évincés de l'étude à l'exception d'un syndrome de Turner (cas 1) et d'une trisomie 21 (cas 2) qui nous ont servis pour la mise au point des techniques. Nous avons étudié 9 dossiers pendant la période d'étude prospective (cas 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15) dont le diagnostic était inconnu au moment de l'interruption mais dont l'origine génétique était fortement suspectée.

Les cas 10, 16 et 17 également explorés pendant cette période ne sont pas des IMG.

Les cas 3, 4 et 7 sont des IMG antérieures à la période d'étude pour lesquelles des prélèvements ont été conservés suite à des prescriptions de génétique clinique.

Les cas 18, 19 et 20 sont des dossiers de fin 2009 et début 2010, antérieurs à la période d'étude des IMG; les échantillons ont été extraits selon des protocoles différents et n'ont donc pas été inclus dans le chapitre « caractéristiques biologiques » (figure 17).

Au total, nous avons étudié 14 cas d'anomalies échographiques non expliquées par le caryotype (cas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Parmi ces derniers, nous avons mis en évidence deux anomalies pathogènes chez un patient (cas 8). Un cas est resté ininterprétable (cas 5). Pour 12 patients aucune anomalie n'a été détectée au seuil de 250 kb. Nous avons également analysé 4 patients dont le caryotype présentait une anomalie demandant des précisions (cas 17, 18, 19 et 20). Les cas 18 et 19 présentent des anomalies échographiques et une anomalie cytogénétique. Aucune anomalie échographique n'est présente pour les cas 17 et 20. Dans les 4 cas nous avons affiné le diagnostic en mettant en évidence 5 déséquilibres additionnels, l'un d'entre eux étant rendu pathogène (cas 20).

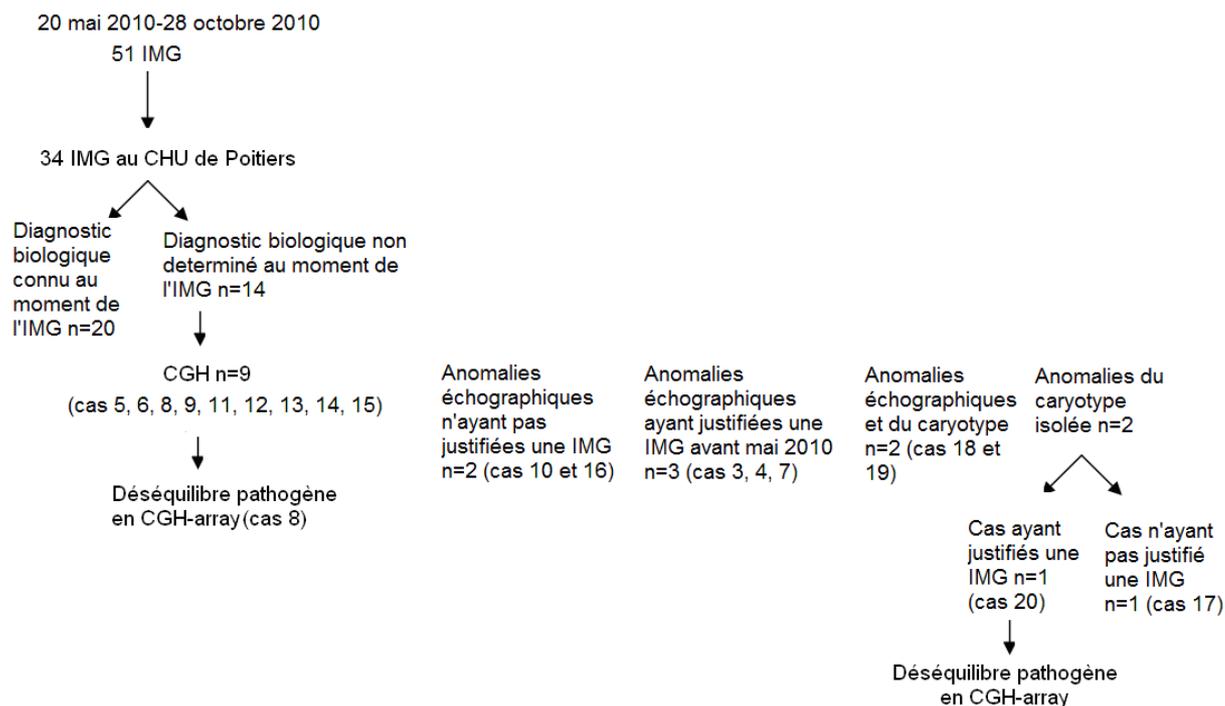


Figure 17 : Répartition des cas analysés dans cette étude.

## 1. Caractéristiques des patients

Les caractéristiques cliniques ayant entraîné la demande de CGH-array sont décrits dans le tableau 5. Nous mentionnons également le caryotype initial et le résultat rendu après l'analyse par CGH-array.

La plupart des femmes enceintes furent prélevées sur signes d'appels échographiques (cas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19). Les patientes 17 et 20 furent prélevées respectivement pour antécédents d'anomalies chromosomiques et risque intégré de trisomie 21 supérieur au seuil. Aucune anomalie échographique n'est présente ; la CGH-array est réalisée pour éclaircir le caryotype.

Les cas 1 et 2 ont été diagnostiqués respectivement syndrome de Turner et trisomie 21 par biologie moléculaire sur signes d'appels biologiques. Le diagnostic est déjà posé au moment où nous effectuons la CGH-array.

Dans le cas 8 seule la FISH demandée après examen clinique du fœtus a montré une délétion en 4p (caryotype de première intention rendu normal).

	Cas	Indications	Résultats du caryotype bande G et/ou de la biologie moléculaire	IMG	Résultats de la CGH-array
Mise au point	1	Risque de T21 à 1/142	45X0	oui	del(X)
	2	trisomie 21	47XX,+21	oui	dup(21)
Caractérisation d'anomalies échographiques	3	Dysmorphie faciale, imperforation anale, agénésie de la vésicule biliaire, anomalies vertébrales multiples	46,XY	oui	absence d'anomalies
	4	RCIU, hypoplasie cérébelleuse, ventriculomégalie, immobilisme fœtal, arthrogrypose, épanchement pleural, œdème généralisé	46XX	oui	absence d'anomalies
	5	Malformation cardiaque sévère, RCIU précoce	46XY	oui	Contamination d'origine maternelle
	6	Malposition des 4 extrémités, artère ombilicale unique, RCIU précoce	46 XX	oui	absence d'anomalies
	7	Cardiopathie, anomalies sévères jambes, pieds, avant-bras, mains	46XX	oui	absence d'anomalies
	8	<b>Cardiopathie, RCIU</b>	<b>46,XY</b>	<b>oui</b>	<b>del(4p16) + dup(8p23)</b>
	9	Hygroma coli	46XX	oui	absence d'anomalies
	10	Suspicion de Widemann Beckwith	46XX	non	absence d'anomalies
	11	Suspicion d'ostéogénèse imparfaite ou d'hypophosphatasie	46XX	oui	absence d'anomalies
	12	Cardiopathie	46 XX	oui	absence d'anomalies
	13	Anamnios, insuffisance rénale terminale	46XY	oui	absence d'anomalies
	14	Cardiopathie	46XY	oui	absence d'anomalies
	15	Cardiopathie	46XY	oui	absence d'anomalies
	16	RCIU	46XY	non	absence d'anomalies
Caractérisation d'anomalies cytogénétiques	17	Absence de signes échographiques Remaniement chromosomique maternel connu	mos 46,XX,inv(13)dup(13){3}/46,XX,insinv(13)(p13q21q32) mat	non	dup(13q21.2)+del(13q31.1)
	18	Ventriculomégalie, microretrognatisme	46,XX + marqueur excédentaire DAPI	oui	del (15)(q24.3)
	19	Spina bifida lombo-sacré	46XY + dup14 ou dup22	oui	dup(10)(q21.3)
	20	<b>Absence de signes échographiques, risque de trisomie 21 estimé à 1/226</b>	<b>46,XX,der4q+ish del(4)(q35)</b>	<b>oui</b>	<b>dup(1)(q42.13qter) + del(4)(q35.2qter)</b>

Tableau 5: Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des fœtus inclus dans l'étude.

## 2. Caractéristiques biologiques

Nous présentons ici les caractéristiques biologiques de 3 sangs fœtaux (cas 3, 4, 13), 6 liquides amniotiques (cas 1, 11, 12, 14, 15, 16), 2 villosités (cas 2, 9) et 7 cellules en culture issues de liquide amniotique (cas 4, 5, 6, 7, 8, 10, 17). Pour le cas 4 deux types de prélèvement ont été recueillis.

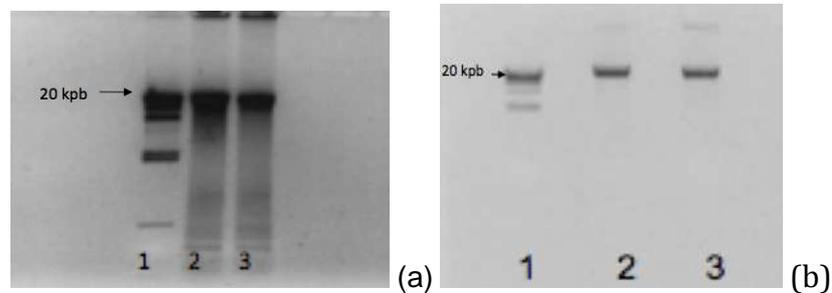
### 2.1 Sangs fœtaux

Les caractéristiques des échantillons sont regroupées dans le tableau 6 : Les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230 varient respectivement de 1,86 à 1,95 et de 2,1 à 2,23 ce qui indique que l'ADN est de bonne qualité. Dans chacun des cas nous obtenons une concentration d'ADN supérieure à 50 ng/μl (valeur minimale requise pour l'expérimentation) obtenue après extraction d'1 mL de sang fœtal (quelque soit l'âge gestationnel de la grossesse). L'ADN des sangs fœtaux est extrait dès réception ou après congélation ; ceci n'a aucune incidence sur la qualité de l'ADN.

Cas	Volume (mL)	Age gestationnel (SA)	Concentration (ng/μl)	A260/280	A260/A230	Congélation
4	1	26	84,2	1,87	2,23	oui
3	1	23+4	58,8	1,95	2,14	oui
13	1	35	73,47	1,86	2,1	oui

**Tableau 6: Caractéristiques de l'ADN obtenu après prélèvement de sang fœtal.**

L'étape de digestion par une enzyme, la RNase A, lors de l'extraction est indispensable afin de ne pas surestimer les concentrations en ADN et de ne pas parasiter la réaction de marquage. La disparition des bandes de faible poids moléculaire après traitement par la RNase A confirme qu'il s'agit d'ARN (figure 18). Nous avons ainsi constaté que, de façon surprenante, les échantillons de sangs fœtaux sont riches en ARN, ce qui n'est pas le cas du sang d'un nouveau-né ou d'un adulte.



**Figure 18: Electrophorèses en gels d'agarose :**

- (a) 1. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par *HindIII*) 2. et 3. ADN extrait de sang fœtal sans étape de digestion par RNase A.
- (b) 1. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par *HindIII*) 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte (dépourvu d'ARN) 3. ADN extrait de sang fœtal traité par RNase A.

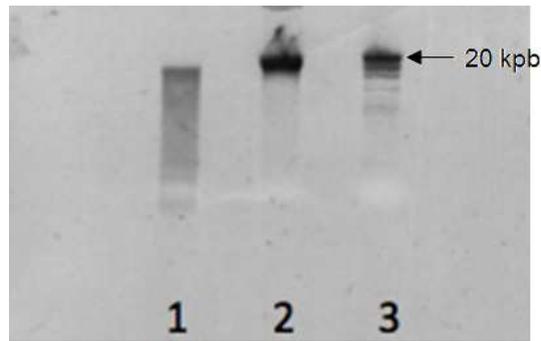
## 2.2 Liquides amniotiques

Les caractéristiques des échantillons sont regroupées dans le tableau 7. Les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230 varient respectivement de 1,78 à 1,95 et de 1.09 à 1.66. Les concentrations varient de 29,4 ng/μl à 132,9 ng/μl permettant la réalisation d'une expérimentation avec Dye Swap dans 50% des cas uniquement. Pour deux échantillons (cas 14 et 15) l'éluat a dû être évaporé et repris dans un minimum d'eau (20 μl) afin de les concentrer. Cette concentration d'ADN dépend de l'âge gestationnel et du volume de départ mais également probablement de la qualité du liquide amniotique (teneur en cellules mortes par exemple).

Cas	Volume (mL)	Age gestationnel (SA)	Concentration (ng/µl)	A260/280	A260/A230
1	12,5 mL	26+5	132,9	1,89	1,66
11	10 mL	25+6	52,3	1,92	1,53
12	8,5 mL	26+3	76,1	1,82	1,63
14	10 mL	25+3	45,9	1,87	1,39
15	7 mL	25+ 2	29,4	1,95	1,09
16	11 mL	21+5	88,9	1,78	1,15

**Tableau 7: Caractéristiques de l'ADN obtenu après prélèvement de LA.**

L'ADN des liquides amniotiques est extrait en présence de RNase A afin de ne pas surestimer la quantité d'ADN de l'échantillon. Les ADN extraits de liquides amniotiques sont dégradés. Cette dégradation se manifeste par des bavures ou « smear » par migration de 200 ng d'ADN génomique en gel d'agarose 1% (p/v) (figure 19). Malgré tout, pour le cas 1 ici présent, la qualité finale de la lame est acceptable puisque le DLRS est de 0,176376. Pour l'ensemble des liquides amniotiques suivants nous nous abstenons du dépôt sur gel afin de conserver le maximum d'ADN pour la technique de CGH-array. L'ADN est directement hybridé quelque soit la qualité initiale du matériel extrait.



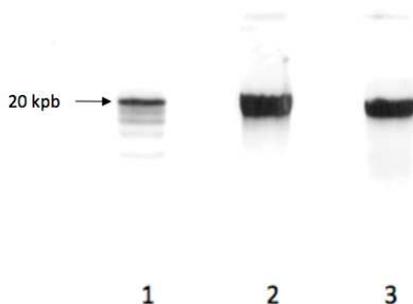
**Figure 19: Electrophorèse en gel d'agarose : ADN extrait de liquide amniotique en comparaison à un ADN extrait de sang périphérique et Lambda/*Hind*III. 1. ADN extrait de LA après digestion par RNase 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte 3. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par *Hind* III).**

### 2.3 Cellules de liquide amniotique en culture

Les caractéristiques des échantillons sont regroupées dans le tableau 8. Le cas 4 a été extrait selon un protocole différent comprenant plusieurs étapes de lyse du culot cellulaire puis purification sur un automate d'extraction d'acides nucléiques bionobis (Magratration – MagaZorb® DNA Common Kit-200). Cette méthode a été abandonnée à cause des trop faibles rendements d'extraction. Pour les autres cas, l'extraction a eu lieu selon le protocole décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ». Les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230 varient respectivement de 1.79 à 2.02 et de 1.11 à 2.13. Après le maintien en culture des cellules reçues du laboratoire de cytogénétique (24h à 72h dans une étuve à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), 2 flacons de 25 cm<sup>2</sup> dont les cellules ont atteint la confluence sont suffisants pour permettre une extraction avec une concentration finale variant de 62.24 à 474 ng/μl. L'ADN des cellules en culture de liquides amniotiques sont également extraits en présence de RNase A. L'ADN est de bonne qualité sans traces de dégradation visible (figure 20).

Cas	Age gestationnel (SA)	Concentration (ng/ $\mu$ l)	A260/280	A260/A230
8	27+5	101,7	1,99	2,13
4	26	99,57	1,79	1,86
17	17+6	62,24	1,97	1,11
5	19	474	1,93	2,1
6	25+ 5	160,6	1,93	1,95
7	15+1	80,43	2,02	1,71
10	33+5	319,7	1,94	2,07

**Tableau 8: Caractéristiques de l'ADN obtenu à partir des cellules de liquide amniotique en culture.**



**Figure 20: Migration en gel d'agarose : ADN extrait de cellules de liquide amniotique en culture en comparaison à un ADN extrait de sang périphérique et Lambda/*Hind*III. 1. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par *Hind*III) 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte 3. ADN extrait de cellules après digestion par la RNase A.**

## 2.4 Villosités chorales

Les caractéristiques des échantillons sont regroupées dans le tableau 9: Les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230 varient respectivement de 1.89 à 2.02 et de 1.67 à 1.72. Les villosités chorales sont des tissus riches en ADN, les concentrations obtenues ont toujours été supérieures à 100 ng/μl. Nous avons remarqué l'absence d'ARN dans ce type d'échantillon (figure 21).

Cas	Age gestationnel (SA)	Concentration (ng/μl)	A260/280	A260/A230
9	13+6	167	1,89	1,72
2	12+6	106,97	2,02	1,67

Tableau 9: Caractéristiques de l'ADN obtenu après prélèvement de villosités chorales.

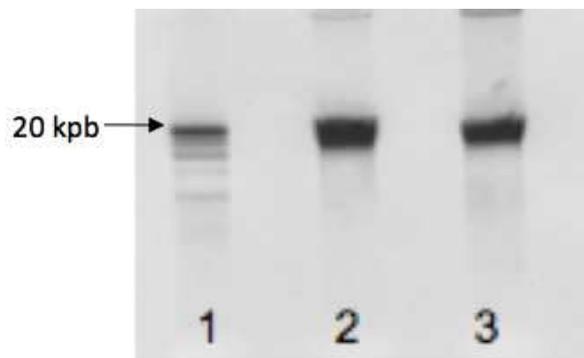
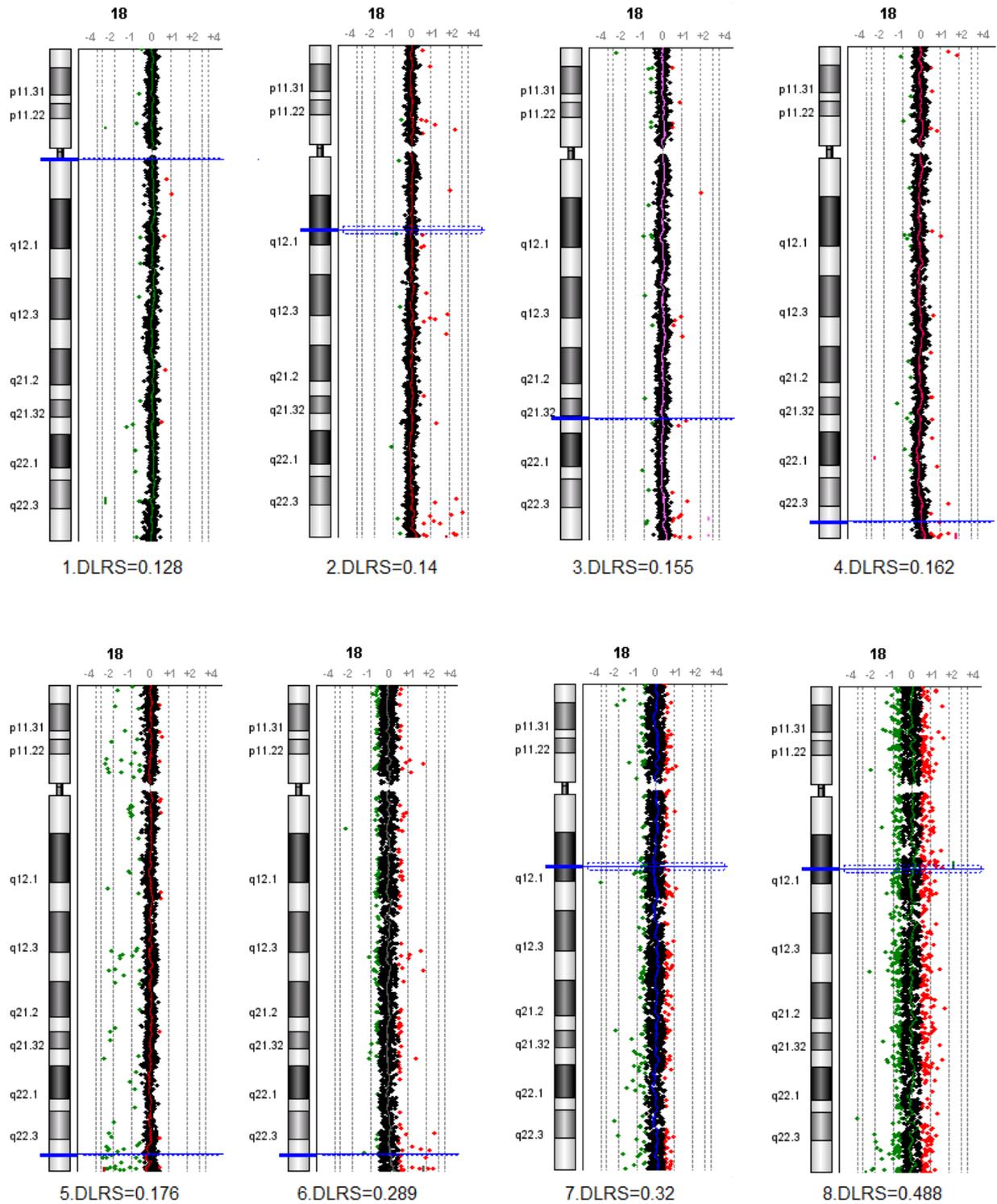


Figure 21: Migration en gel d'agarose : ADN extrait de villosités chorales en comparaison à un ADN extrait de sang périphérique et Lambda/*Hind*III. 1. Marqueur de taille (ADN de phage lambda digéré par *Hind*III) 2. ADN extrait de sang périphérique d'adulte 3. ADN extrait de villosité sans étape de digestion par la RNase A.

## 2.5 Qualité de l'hybridation en fonction du type de prélèvement

Nous obtenons, après la réaction de marquage des ADN par le fluorochrome, des rendements supérieurs à 5 pour l'ensemble des échantillons, ce qui est conforme aux normes préconisées par le fabricant. Les activités spécifiques sont comprises entre 25 et 40 pmol/ $\mu$ g pour ceux marqués en cyanine 3 et entre 20 et 35 pmol/ $\mu$ g pour ceux marqués en cyanine 5. Ces paramètres sont satisfaisants, preuve de la qualité de la réaction de marquage.

Le DLRS est un bon marqueur de la qualité finale de la lame. Les valeurs attendues se situent en dessous de 0,2. Plus cette valeur est faible, plus la qualité de la puce est haute rendant la lecture et l'interprétation aisées. Ceci a été observé de manière visuelle en regardant par exemple, la dispersion des sondes de part et d'autres de la ligne de base constituant l'intégralité du chromosome 18 (figure 22). Nous observons bien que la valeur des DLRS obtenus est inversement corrélée à la qualité de l'hybridation finale. Nous constatons également que seul un DLRS dont la valeur est supérieure à 0,20 a une nette incidence sur la qualité de la lame rendant son interprétation plus difficile.



**Figure 22: Représentation des chromosomes 18 sur DNA analytics® : 1.Hybridation sang/sang; 2.Hybridation cellules/cellules; 3. Hybridation villosités choriales/sang; 4.Hybridation sang foetal / sang; 5.Hybridation LA / sang; 6.Hybridation cellules / sang; 7.Hybridation LA / sang; 8.Hybridation cellules / sang.**

Les meilleurs DLRS sont obtenus pour les ADN extraits de villosités chorales (DLRS inférieur à 0,2 pour l'ensemble des échantillons) ce qui est en accord avec les résultats de la phase pré-analytique (pas de bandes parasites sur le gel, ratios d'absorbance corrects obtenus au Nanodrop®); lors de la lecture des lames le bruit de fond est limité, la ligne de base fine.

Il est également satisfaisant pour les ADN extraits de sangs fœtaux (un seul cas sur quatre présente un DLRS supérieur à 0,2 soit 75% de lames acceptables selon nos critères).

Inversement, la qualité des lames est médiocre en ce qui concerne les liquides amniotiques. Le DLRS varie de 0.171 à 0.323 avec un DLRS satisfaisant (inférieur à 0.2) dans 2 échantillons sur 7. La méthode d'extraction d'ADN ne semble pas en cause car les ratios d'absorbance sont corrects. C'est vraisemblablement la qualité d'ADN de départ qui est en cause. Les valeurs de DLRS obtenues sont en concordance avec les « smear » de dégradations visualisables sur les gels d'agarose.

Le DLRS varie entre 0.141 et 0.489 pour les cellules en culture avec un DLRS inférieur à 0.2 pour 7 échantillons sur 12 (58,3%). On obtient donc de meilleurs résultats avec les cellules en culture qu'avec les liquides amniotiques frais ce qui était attendu (on ne retrouve pas de « smear de dégradation » sur les gels d'agarose). Il est extrêmement probable que la différence de qualité entre les cellules en culture soit due à différents moments de vie des échantillons ; les cellules en phase d'apoptose sont ainsi plus susceptibles de contenir un ADN dégradé.

Nos résultats indiquent que les meilleurs prélèvements pour réaliser un diagnostic prénatal par CGH-array sont le sang fœtal ou les villosités chorales. En effet, pour les sangs fœtaux, nous avons obtenu un DLRS inférieur à 0,2 dans 3/4 des cas (contre 7/12 pour les cellules et 2/7 pour les liquides amniotiques). Ce résultat doit cependant être confirmé sur un plus grand nombre d'échantillons. L'étude de sang fœtal minimise le risque de contamination d'origine maternelle (contrairement aux liquides amniotiques et cellules en culture). Néanmoins, le prélèvement de sang fœtal comporte des risques pour le fœtus. Le taux de mortalité directement imputable à l'acte invasif est aux alentours de 1% [66]. Ce taux est légèrement supérieur à celui observé pour les prélèvements de LA (risque de fausse couche après amniocentèse estimé entre 0,5 et 1 % [43]).

Les villosités chorales d'un point de vue expérimental donnent également de très bons résultats (DLRS inférieurs à 0,2 dans 100% des cas), mais son utilisation en diagnostic prénatal pour la CGH-array devrait être exceptionnelle. En effet, les villosités chorales sont surtout prélevées en cas de signes d'appels bien définis lors de l'échographie du premier

trimestre (soit entre 11 et 13 SA), notamment en cas d'augmentation de la clarté nucale ou également en cas de signes d'appels biologiques (mesure de la B-HCG libre et PAPP-A). Ces différents signes sont souvent liés à des anomalies chromosomiques de grandes tailles (trisomie 13, 21...) détectables par biologie moléculaire ou cytogénétique classique (caryotype). Les indications de la CGH-array en prénatal se situent plutôt à partir de la deuxième échographie (soit entre 22 et 24 SA), période où sont dépistées environ 60% des malformations les plus graves [67]. A ce stade de la grossesse, le prélèvement de liquide amniotique est alors préférable. Par ailleurs il faut rester prudent avec les échantillons de villosités chorales : les lignées cellulaires étudiées avec une choriocentèse sont trophoblastiques et, certaines anomalies, comme la tétrasomie 12 p., peuvent ne pas être révélées (diagnostic pourtant accessible à partir des amniocytes) [43].

Le prélèvement de liquide amniotique est le plus courant des prélèvements fœtaux et le plus approprié à l'approche par CGH-array. Deux possibilités sont envisageables : les liquides amniotiques peuvent être traités directement ou après mise en culture. Dans le cas où ils sont analysés directement, l'avantage majeur est le gain de temps. On s'affranchit de l'étape de mise en culture, les premiers résultats sont ainsi théoriquement disponibles en 4 jours. Néanmoins, au niveau expérimental le liquide amniotique n'est pas le prélèvement « idéal ». En effet, la qualité des lames est médiocre. Si l'on s'arrête à l'interprétation des DLRS, seuls 2 échantillons sur 7 entrent dans les critères de qualité. L'analyse des lames est compliquée par la présence de bruit de fond. Afin de limiter le nombre de faux positifs, le seuil de résolution pour la détection d'anomalies a donc été modifié. Il est établi à 250 kb (initialement établi à 3 sondes consécutives soit 30 kb en moyenne). Les liquides amniotiques frais sont délicats à analyser ; l'ADN extrait est peu concentré ce qui ne permet pas toujours de pouvoir passer l'échantillon en double (cyanine 3 et cyanine 5). Ces difficultés pourraient être surmontées en augmentant le volume de liquide amniotique de départ (20 mL) ou en modifiant le protocole d'extraction [68].

Pour les cellules en culture de liquide amniotique, les résultats expérimentaux sont meilleurs (DLRS inférieur à 0,2 pour 7 échantillons sur 12). Néanmoins, plusieurs contraintes restent liées aux cellules en culture de liquides amniotiques comme le temps de la culture cellulaire (15 jours). De plus, on se heurte parfois à l'échec de remise en culture. En reprenant des cas pour lesquels nous n'avons plus de matériel « frais » nous avons eu des difficultés d'obtenir à nouveau des cellules à confluence. Néanmoins, les cellules en culture peuvent nous être d'une aide précieuse lorsque le liquide amniotique natif est trop pauvre en ADN, dans le cas où un caryotype est demandé en parallèle.

En ce qui concerne l'hybridation, la logique voudrait que l'on hybride ensemble des échantillons de même nature, extraits de façon identique. Cependant, afin de respecter des conditions d'analyse utilisable en routine, nous avons décidé d'inclure au fur et à mesure les échantillons prénataux aux séries de patients étudiés chaque semaine. Ainsi, tous les sangs fœtaux et liquides amniotiques ont été hybridés contre des sangs de patients. Certaines cellules en culture ont été hybridées contre d'autres cellules, villosités ou sang de patients. Nos données expérimentales montrent que l'hybridation de deux échantillons de nature différente ne semble pas impacter de manière majeure le DLRS, et que celui-ci n'est pas forcément plus faible lorsque l'on hybride des échantillons de même nature. Par exemple, pour le cas n°8 le DLRS ne change pas significativement lorsque l'hybridation a lieu contre du sang (DLRS=0,2889) plutôt que contre des cellules en culture (DLRS=0,30). Le DLRS ne semble donc pas impacté par la nature des prélèvements hybridés entre eux, mais plutôt par la qualité initiale de l'échantillon, et par le bon déroulement des différentes étapes de marquage. L'ensemble des résultats obtenus des caractéristiques propres au contrôle de la qualité sont regroupés dans le tableau 10. Au final, en tenant compte exclusivement de la qualité des données brutes obtenues après la lecture des puces à ADN nous avons considéré que l'ensemble des lames pouvaient être interprétées.

Cas	Nature du prélèvement	Cyanine marquée	Rapport A260/280 de l'ADN de départ	Rapport A260/A230 de l'ADN de départ	Rendement (µg)	Activité spécifique (pmol/µL)	DLRS	Nature du prélèvement contre lequel l'hybridation a lieu
4	Sang foetal	5	1,87	2,23	5,72	32,31	0,141842	sang
3	Sang foetal	3	1,95	2,14	5,36	29,17	0,24	sang
3	Sang foetal	5	1,95	2,14	5,1	34,39	0,161586	sang
13	Sang foetal	3	1,86	2,1	6,49	34,69	0,166261	sang
8	cellules	5	1,99	2,13	6,26	24,09	0,301784	cellules
8	cellules	3	1,99	2,13	6,18	28,42	0,2889	sang
4	cellules	3	1,79	1,86	5,74	30,55	0,301784	cellules
17	cellules	5	1,97	1,11	6,3	20,63	0,2747	sang
17	cellules	3	1,97	1,11	6,78	26,19	0,488755	sang
5	cellules	3	1,93	2,1	5,7	30,28	0,140945	cellules
6	cellules	3	1,93	1,95	7,32	34,12	0,180002	sang
6	cellules	5	1,93	1,95	5,61	32,37	0,172465	sang
7	cellules	3	2,02	1,71	6,01	28,4	0,199895	cellules
7	cellules	5	2,02	1,71	5,4	27,36	0,14095	cellules
10	cellules	5	1,94	2,07	6,13	29,94	0,199895	cellules
10	cellules	3	1,94	2,07	7,82	33,04	0,172363	villosités
1	LA	3	1,89	1,66	6,45	41,06	0,176376	sang
11	LA	3	1,92	1,53	5,81	38,63	0,171	sang
12	LA	3	1,82	1,63	5,8	31,12	0,282048	sang
12	LA	5	1,82	1,63	5,66	29,54	0,219997	sang
14	LA	5	1,87	1,39	6,52	31,5	0,255715	sang
15	LA	3	1,95	1,09	5,3	32,51	0,322977	sang
16	LA	5	1,78	1,15	5,63	32,6	0,273149	sang
9	villosités	5	1,89	1,72	6,31	31,46	0,172363	cellules
9	villosités	3	1,89	1,72	5,76	39,78	0,155515	sang
2	villosités	5	2,02	1,67	6,45	31,8	0,154143	sang

**Tableau 10: Caractéristiques biologiques des différents échantillons marqués et hybridés.**

### 3. Mise au point de la CGH-array : concordance avec les résultats de cytogénétique

La CGH-array montre une parfaite concordance avec les résultats de cytogénétique (caryotype conventionnel) en ce qui concerne les syndromes de Turner (cas 1) et les trisomies (trisomie 21 pour le cas 2) (figure 23). Pour l'échantillon 1, l'hybridation a lieu contre un patient de sexe masculin marqué en cyanine 5. L'échantillon n'a qu'une copie du chromosome X et aucune du chromosome Y : il s'agit donc d'une monosomie du X, résultat en concordance avec le caryotype sur liquide amniotique. Le fœtus est affecté par un syndrome de Turner (45X0). A noter que l'étude par CGH-array a été réalisée sur liquide amniotique et n'a pas été possible à partir du sang fœtal (extraction d'une trop faible quantité d'ADN). L'échantillon 2 présente une duplication sur l'ensemble du chromosome 21, résultat en concordance avec la technique de biologie moléculaire rapide sur villosités (trisomie 21).

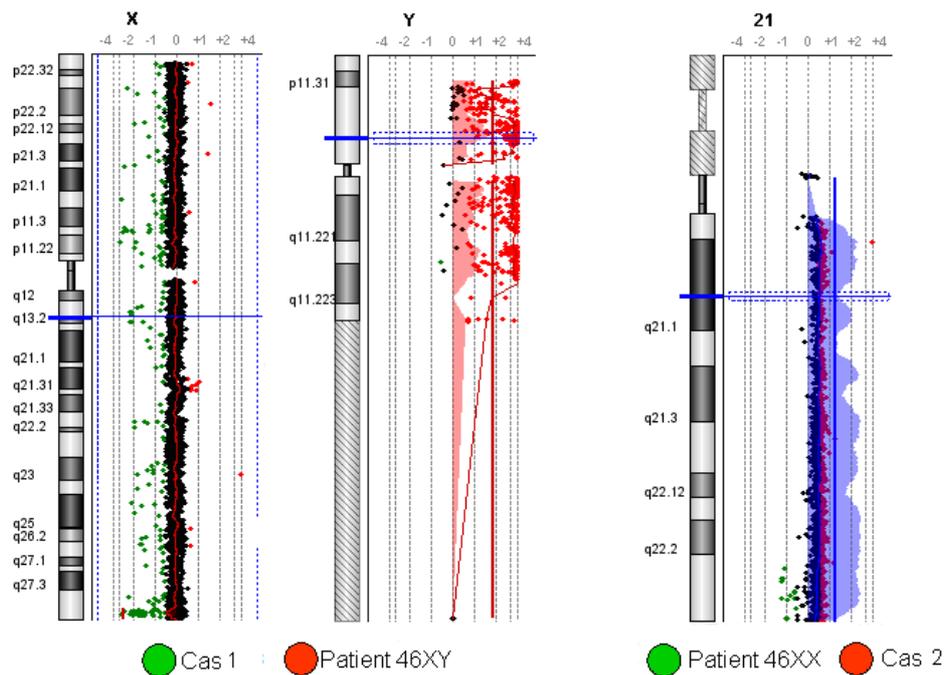


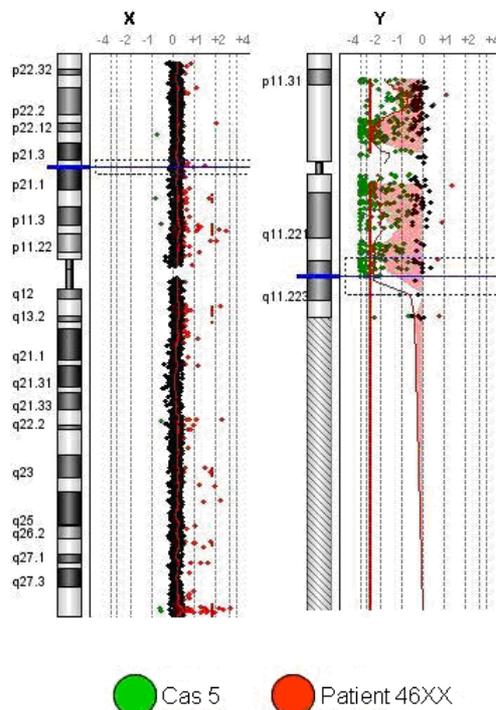
Figure 23: Analyses de l'ADN du cas 1 (45X0) et de l'ADN du cas 2 (47XX,+21).

## 4. Caractérisation d'anomalies échographiques

### 4.1 Anomalies échographiques multiples

Dans notre cohorte, sept patients présentent au moins deux anomalies échographiques (cas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10). Aucun remaniement chromosomique majeur n'a été retrouvé pour les cas 3, 4, 6, 7 et 10 au seuil de 250 kb.

Pour le cas 5, l'analyse du caryotype montre qu'il s'agit d'un fœtus de sexe masculin (46XY). L'hybridation est réalisée en sexmismatch : le fœtus 5 marqué en cyanine 3 est hybridé contre un patient féminin (46XX) marqué en cyanine 5. Lors de l'analyse de la puce, on trouve une ligne de base légèrement décalée pour le chromosome X mais ne se situant pas en +1 comme attendu, indiquant que le patient de sexe masculin a un gain de matériel sur tout le chromosome X. On visualise également un gain de matériel pour tous les clones du chromosome Y (figure 24). Ces résultats sont contradictoires avec ceux de la cytogénétique. L'analyse par MLPA montrera qu'il s'agit d'une contamination par des cellules d'origine maternelle. La CGH-array est ininterprétable devant un mélange de cellules fœtales et de cellules maternelles.



**Figure 24: Analyse de l'ADN extrait des cellules en culture du cas 5 marqué en cyanine 3 et hybridé contre un patient témoin de sexe féminin marqué en cyanine 5.**

Le cas 8 est un retard de croissance intra-utérin associé à une cardiopathie sévère mise en évidence à 25 SA. Le caryotype fœtal est normal : 46XY. Devant la gravité de la cardiopathie une interruption de grossesse est programmée à 27+5 SA.

L'autopsie fœtale laisse fortement suspecter un syndrome de Wolf-Hirshorn qui est confirmé par hybridation *in situ* en 4p16.3 (ish del(4)(p16.3p16.3)(WHS-). L'étude des parents par FISH montrera que le locus 4p16.3 est en place sur l'extrémité des bras courts des chromosomes 4 et que l'anomalie est donc survenue *de novo*.

Le syndrome de Wolf-Hirschhorn est caractérisé par des cardiopathies congénitales et des anomalies rénales et génitales. Le tableau clinique typique associe RCIU, microcéphalie, retard psychomoteur, faciès particulier, malformations diverses liées à des défauts de fusion de la ligne médiane, hypertélorisme, fentes labio-palatines, agénésie du corps calleux, défauts septaux cardiaques, hypoplasie rénale bilatérale, hypospadias [69]. L'examen foetopathologique confirme la cardiopathie (atrésie pulmonaire à septum inter-ventriculaire intact) et le retard de croissance ; on retrouve également un hypospadias, des remaniements congestifs diffus et des lésions dystrophiques pancréatiques atypiques.

Battaglia et *al.* en 2001 [70] s'intéressent à 87 patients présentant un syndrome de Wolf-Hirschhorn. Seulement 50,5% des cas sont diagnostiqués par l'analyse du caryotype bande G (une FISH est nécessaire afin de poser un diagnostic pour les 49,5% restants). L'analyse par CGH-array (résolution de 1Mb) décèle une translocation déséquilibrée dans 44% des cas associant la monosomie 4p et une trisomie partielle autre.

Les cellules en culture sont envoyées au laboratoire de génétique moléculaire afin de borner précisément l'anomalie. En CGH-array nous identifions une délétion de 8,98 Mb emportant les cytobandes 4p16.3 à 4p16.1 (figure 25) mais nous visualisons également une duplication de 6,901 Mb de la région 8p23.3 à 8p23.1 (figure 26).

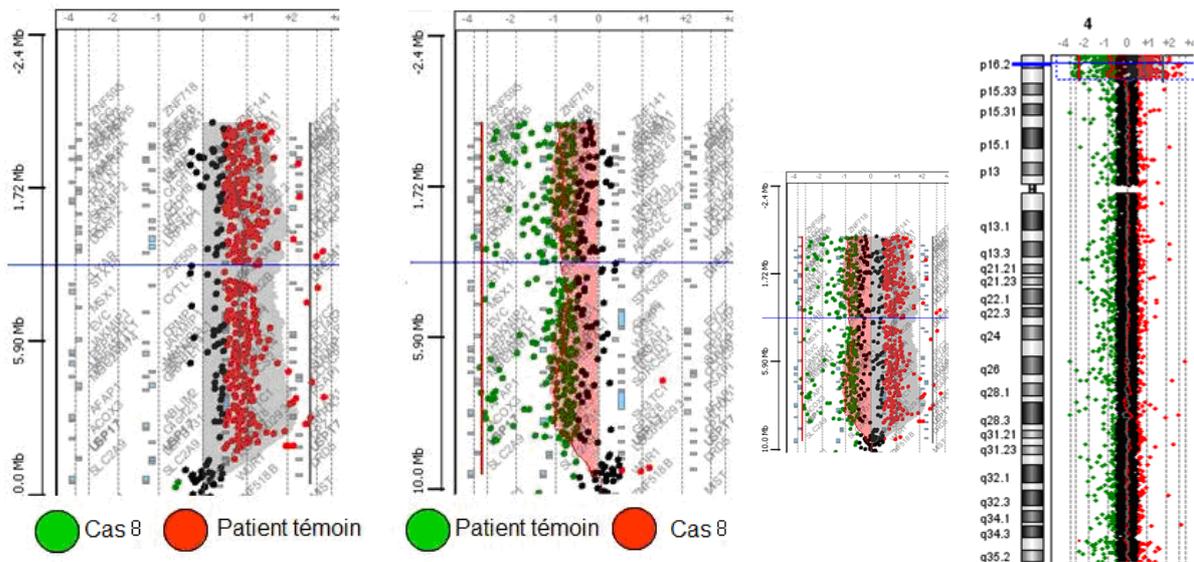


Figure 25: Analyse de l'ADN du cas 8 (délétion de 8,98 Mb au niveau de la région 4p16.3).

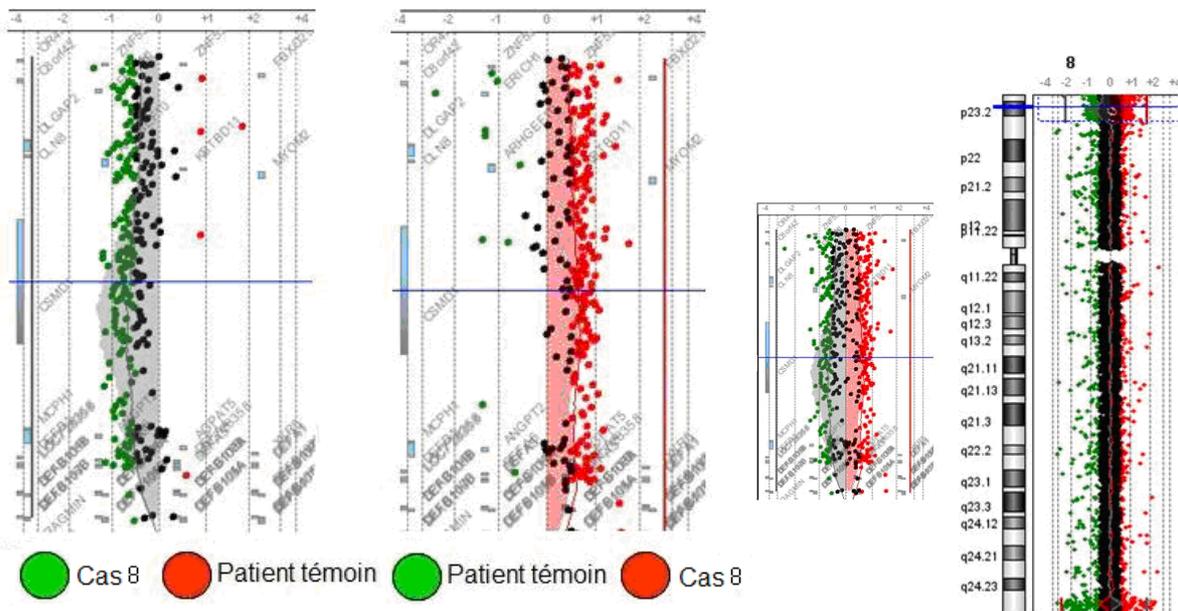


Figure 26: Analyse de l'ADN du cas 8 (duplication de 6.901 Mb au niveau de la région 8p23).

Plusieurs études montrent que la sévérité du phénotype dépend de la taille de la délétion associée. Une étude rétrospective sur 159 cas (96 patients vivants, 37 patients décédés et 13 patients diagnostiqués détectés en prénatal) montre que les délétions *de novo* de grande taille sont plus souvent associées à un taux de mortalité élevé [71]. Les malformations congénitales cardiaques ne sont présentes que dans le cas où la délétion est supérieure à 3,5 Mb [72]. Les délétions de taille inférieure donnent lieu à des phénotypes plus légers (absence de malformations). Dans notre cas la délétion mesure environ 8Mb ; on peut donc relier le phénotype du fœtus à la présence de la délétion.

La duplication 8p23 pourrait être un CNV bénin. L'exploration génétique d'un patient de 34 ans phénotypiquement normal (excepté l'oligoasthénospermie) rapporte une duplication 8p23.1 à p23.3 [73]. Sur le site BACH un patient est décrit comme porteur à la fois de la délétion 4p16.3p16.2 et de la duplication 8p23.3p23.1. Ce patient présente un Wolf-Hirschhorn découvert en postnatal à 1 an.

La CGH-array n'a ici aucune conséquence sur la prise en charge de la grossesse actuelle. Néanmoins il est important de savoir que la délétion 4p est accompagnée d'une duplication 8p. Cette association nous évoque un réarrangement complexe. Les parents doivent être explorés par biologie moléculaire ou FISH en 8p dans l'optique des grossesses futures.

Ce cas montre toute l'utilité de la CGH-array en prénatal. En effet, en l'absence d'anomalie cardiaque (par exemple si la délétion avait été de plus petite taille), on peut supposer que la grossesse aurait été menée à terme. L'investigation par FISH 4p- n'aurait probablement pas été demandée sur des signes d'appels tels que dysmorphies faciales ou RCIU. Devant une forme modérée du syndrome de Wolf-Hirschhorn, le diagnostic est particulièrement difficile à poser.

## 4.2 Anomalies échographiques isolées

Au seuil de 250 kb aucune anomalie majeure n'a été retrouvée dans la population de fœtus présentant une seule anomalie (cas 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Ceci peut remettre en question l'intérêt de la CGH-array dans le cas d'anomalies échographiques isolées. C'est également la tendance retrouvée dans l'étude menée par Kleeman *et al.* [59] : sur 33 anomalies échographiques isolées aucun déséquilibre n'est mis en évidence par CGH-array (alors que 5,9% de déséquilibres sont retrouvés dans le groupe « malformations multiples »). Dans la cohorte de Van de Veyver *et al.* [60], 2 déséquilibres sur 4 sont révélés chez des fœtus présentant une anomalie unique (n=300) ; dans celle de Tyreman *et al.* [24], 4 des 10 remaniements sont présents chez des fœtus avec une anomalie unique (n=106). Les anomalies échographiques isolées peuvent annoncer d'autres anomalies moins évidentes à déceler en prénatal. Certains syndromes seront ainsi révélés par une anomalie échographique unique. Pour ces raisons et également à cause du manque de recul à ce jour, la CGH-array doit également être réalisée chez cette population de fœtus dont le risque de porter un remaniement cryptique est moindre.

## 5. Caractérisation d'anomalies du caryotype

### 5.1 Cas 17

Un caryotype fœtal est réalisé à 17+6 SA en raison d'une anomalie chromosomique connue chez la patiente vraisemblablement responsable de plusieurs fausses couches précoces. Sa formule chromosomique est la suivante : 46,XX,insinv(13)(p13q21q32) ; il existe donc une translocation équilibrée au niveau du chromosome 13 avec inversion q21q32 et insertion en p13. Elle a elle-même un enfant en bonne santé porteur du même remaniement chromosomique. Le fœtus actuel présente le même remaniement chromosomique de type insertion inversion sur le chromosome 13 mais il a également sur trois supports de culture différents une autre anomalie de type inversion duplication sur le chromosome 13, ce qui évoque l'existence d'une mosaïque de structure de type déséquilibrée. Cette anomalie est retrouvée sur 3 clones sur 16 : la mosaïque est estimée à 18,75%.

L'analyse par CGH-array de l'ADN extrait des cellules cultivées à partir du liquide amniotique ne décèle pas de duplication en mosaïque sur le chromosome 13. Cela est très certainement dû au trop faible pourcentage des cellules porteuses de cette anomalie (et aussi à cause de la qualité du prélèvement : DLRS=0,2747 lorsqu'il est marqué en cyanine 5 et DLRS=0,488755 lorsqu'il est marqué en cyanine 3).

Cependant la CGH-array montre l'apparition d'anomalies déséquilibrées au niveau des points de cassure de l'inversion insertion avec une duplication en 13q21.2 de 1,347Mb (désert génique) et une délétion de 1,630Mb en 13q31.1 (figures 27 et 28).

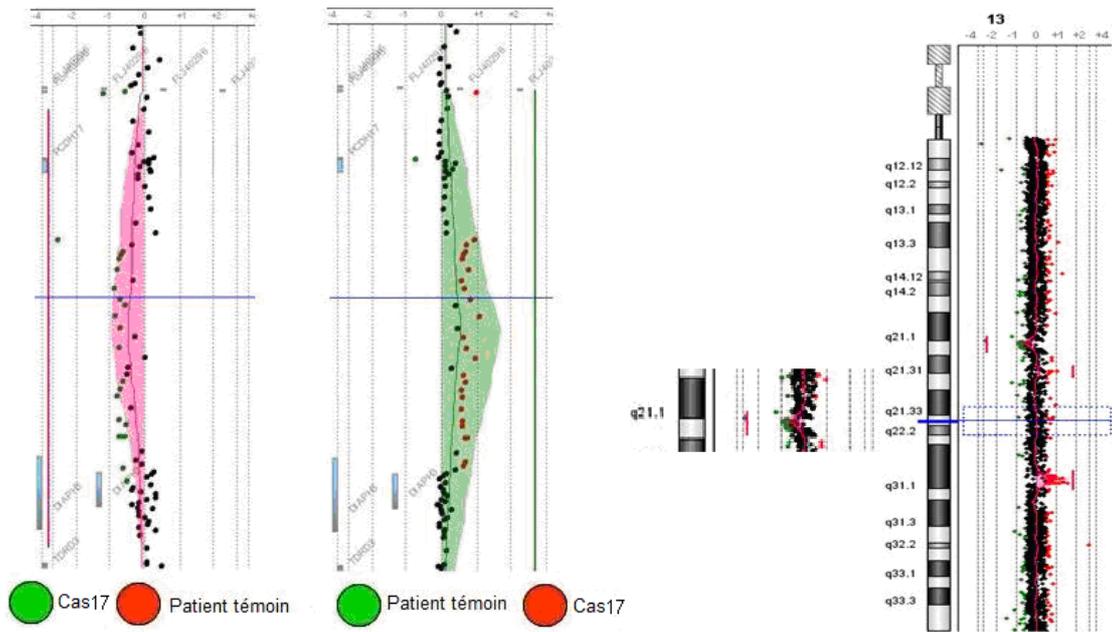


Figure 27: Analyse de l'ADN du cas 17 : duplication de 1,3Mb en 13q21.2.

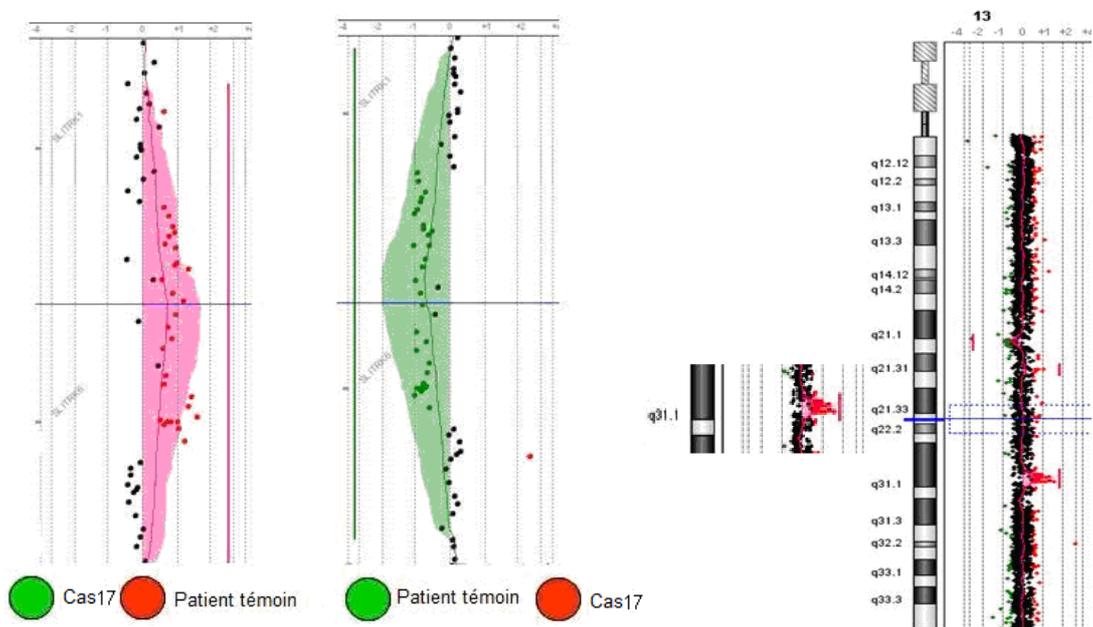


Figure 28: Analyse de l'ADN du cas 17 : délétion de 1,6Mb en 13q31.1.

Il s'agit donc d'une anomalie apparemment équilibrée au caryotype conventionnel qui se révèle être déséquilibrée en CGH-array. Ces anomalies ne sont pas décrites dans les banques de données. La duplication se situe dans une région dépourvue de gènes mais la délétion emporte deux gènes : MIR548F1 et SLITRK6 (figure 29). En plus de ces deux anomalies, on retrouve une délétion de 0,256 Mb en 13q21.31 décrite comme polymorphisme dans Database of genomic variant (CNV bénin).

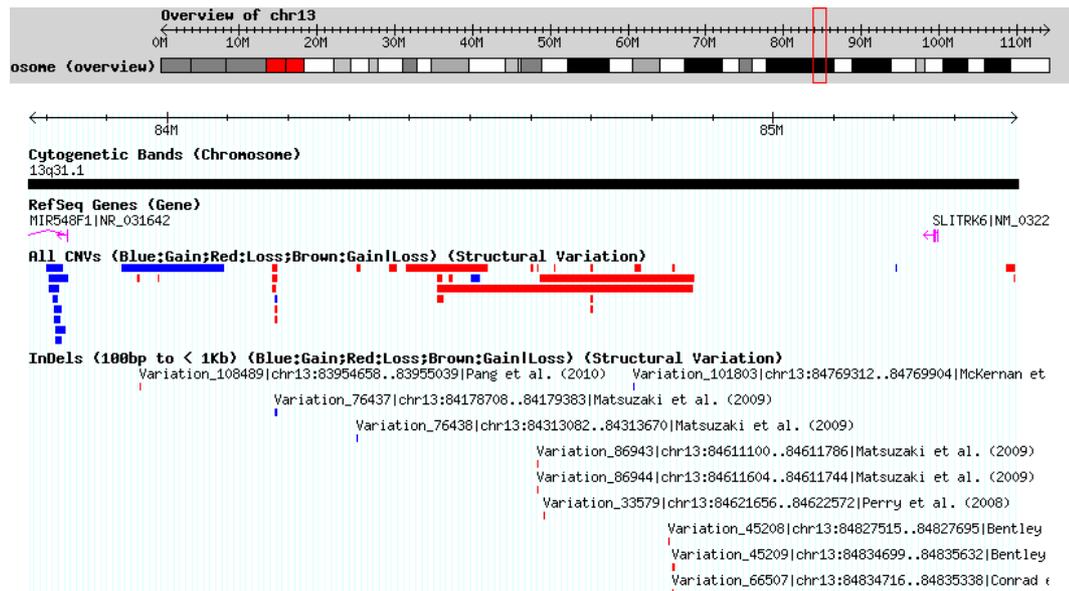


Figure 29: Visualisation de la région 13q31.1 dans « Database of Genomic variant ».

L'analyse du sang de la maman montre exactement les mêmes anomalies. Ce mécanisme est donc hérité. Le fait que l'anomalie soit héritée est un argument fort en faveur de l'absence de conséquences cliniques attendues. Cependant des réserves sont à émettre quant au phénotype de ce fœtus. Un CNV peut être hérité et pourtant causal. En effet certaines anomalies héritées se révèlent être délétères uniquement chez les descendants [39] [42]. La microdélétion 15q13.3 est un exemple typique de réarrangement à pénétrance incomplète [74].

Une cordocentèse et une nouvelle amniocentèse sont réalisées à 30+5 SA pour contrôler le caryotype fœtal. Sur ces deux échantillons, la mosaïque de structure du chromosome 13 n'est pas retrouvée et le caryotype fœtal montre le même remaniement chromosomique de type inversion insertion du chromosome 13 que chez la maman.

L'IRM cérébrale fœtale montre une morphologie cérébrale sans anomalie. Le dernier contrôle échographique à 31 SA 1/2 est normal. Cette patiente accouche au terme de 41+6 SA d'un enfant de sexe féminin en bonne santé.

Deux hypothèses sont émises concernant la trisomie partielle du chromosome 13 décelée lors du premier caryotype : il peut s'agir d'un accident de culture ou d'une mosaïque confinée à des tissus extra embryonnaires. La première hypothèse est rejetée car la mosaïque a été retrouvée sur trois supports de culture différents.

Les anomalies déséquilibrées isolées par CGH-array au niveau des points de cassure de l'inversion chromosomique sont sans conséquences phénotypiques majeures pour ce fœtus et peuvent être assimilées à des CNP. Ce cas démontre qu'il ne faut interpréter la CGH-array qu'en présence des échantillons parentaux.

## 5.2 Cas 18

Il s'agit d'une IMG au terme de 33+6 SA suite à la découverte échographique anténatale d'une ventriculomégalie sévère associée à une communication interventriculaire (CIV) et un microrétrognatisme. La présence d'ADN surnuméraire est suspectée au caryotype sous la forme d'un petit marqueur excédentaire révélé au DAPI. L'analyse par CGH-array de l'ADN extrait des cellules cultivées à partir de liquide amniotique ne décèle pas de matériel supplémentaire (il s'agit donc très certainement d'hétérochromatine) mais montre une délétion de 0,42 Mb en 15q24.3 (figure 30). Cette délétion est confirmée par FISH : présence de deux signaux verts témoins et d'un seul signal rouge en 15q24 indiquant une délétion en ce site (figure 31).

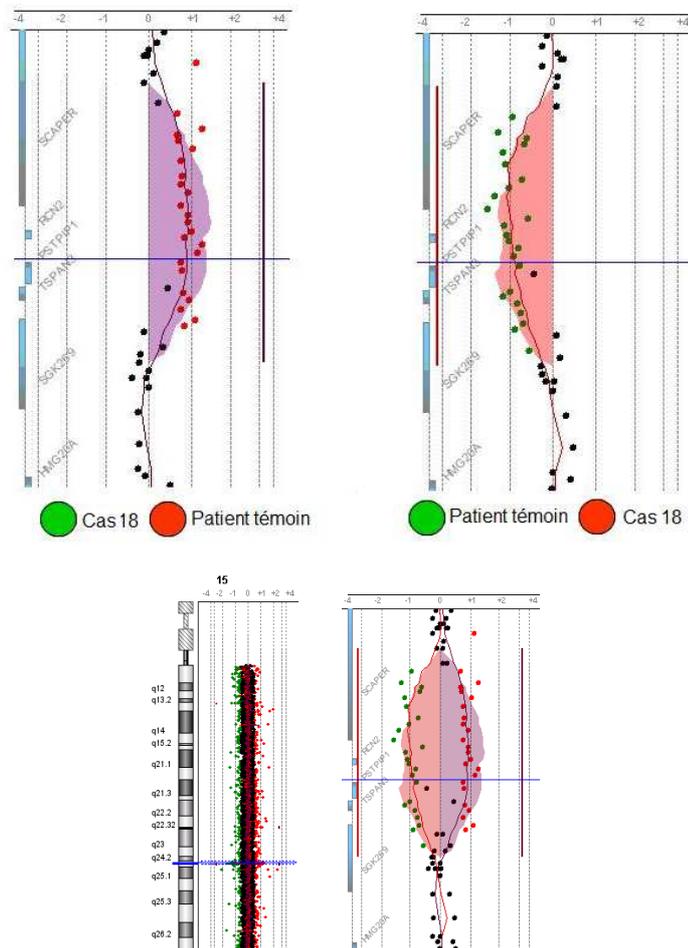
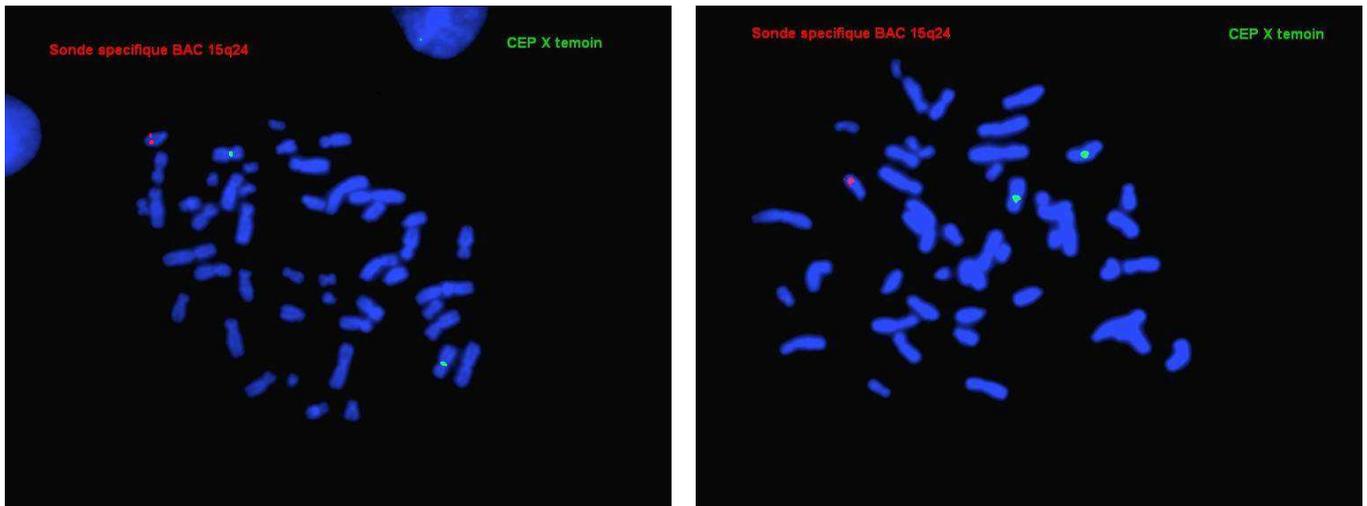


Figure 30: Analyse de l'ADN du cas 18.



**Figure 31: Hybridation in situ des cellules amniotiques du cas 18 avec une sonde BAC 15q24.**

Les deux parents sont analysés par FISH et sont négatifs pour cette délétion (ainsi que pour le marqueur excédentaire). Le caractère *de novo* peut être affirmé par le fait que le fœtus présentait un polymorphisme chromosomique retrouvé chez le père : une inversion péricentrique au niveau du chromosome 9.

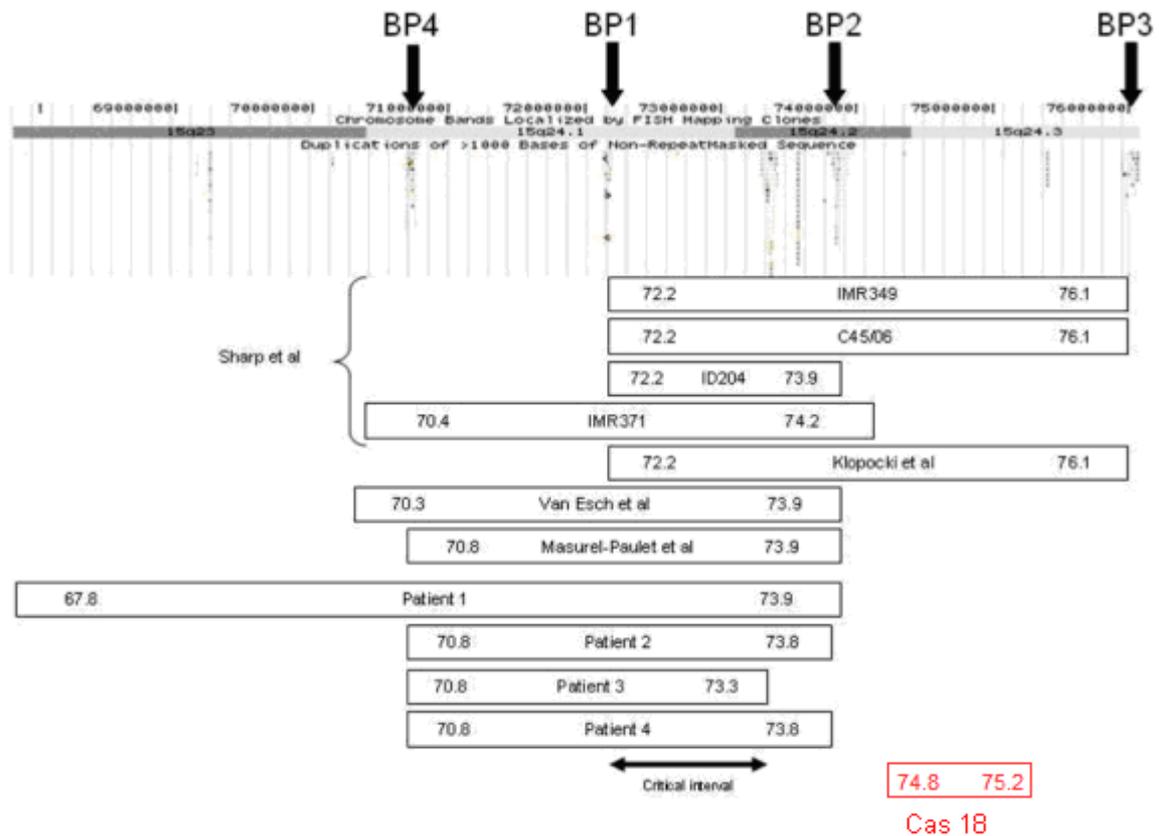
Devant l'hydrocéphalie majeure avec signes en faveur d'un processus hémorragique, une recherche d'anticorps anti-plaquettes est réalisée : cette recherche est négative. L'étude de l'incompatibilité plaquettaire ne prouve pas que ce mécanisme soit responsable de l'anomalie cérébrale. Le bilan immunologique est donc négatif. De même, le bilan thrombophilique se révèle être normal ainsi que les recherches virologiques.

L'examen foetopathologique montre qu'il n'y a pas de cardiopathie contrairement à la suspicion échographique mais confirme un microretrognathisme et une malformation cérébrale. L'examen neuro-pathologique met en évidence une hydrocéphalie tri-ventriculaire possiblement post-hémorragique et thrombophilique.

L'anomalie de petite taille retrouvée en CGH-array ne correspond pas exactement à celle du syndrome microdélétionnel « 15q24 » décrit par Sharp *et al.* en 2007 [75] et repris par plusieurs auteurs [76-81]. Ce syndrome se caractérise par un retard de croissance, un retard mental, des anomalies des doigts, un hypospadias, une anomalie des tissus conjonctifs et une dysmorphie faciale (cheveux implantés haut sur le front, hypertélorisme, sourcils larges, fentes palpébrales anti-mongoloïdes, racine du nez large, philtrum long et plat, lèvre inférieure charnue) [81].

Dans le cas 18, l'anomalie chromosomique est située entre les points de cassure BP2 et BP3 mais ne contient pas la région critique décrite par les auteurs, localisée entre BP1 et BP2 (figure 32). Un seul patient décrit dans cette étude présente une atrophie cérébrale avec

ventricules élargis. Certains patients atteints par le syndrome microdélétionnel 15q24 présentent un micrognathisme [78].



**Figure 32: Représentation schématique de la région 15q24 avec les trois points de cassures récurrents initialement décrits par Sharp *et al.* en 2007 [81]. La région critique est située entre les points de cassures BP1 et BP2. D'autres cas publiés par Klopocki *et al.* [79], Van Esch *et al.* [76], Masuret-Paulet *et al.* [80] sont également représentés ainsi que quatre autres patients décrits par Andrieux *et al.* en 2009 [77] et le patient décrit dans notre étude (cas 18).**

La délétion 15q24.3 présente chez le fœtus étudié emporte cinq gènes (figure 33) : SCAPER (codant pour une protéine régulatrice du cycle cellulaire), RCN2 (codant pour une protéine impliquée dans le transport du calcium et vraisemblablement impliquée dans la coagulation), PSTPIP1 (codant pour une protéine régulatrice de l'actine du cytosquelette), TSPAN3 (codant pour une protéine régulatrice du cycle cellulaire), SGK269 (codant pour une serine/ threonine protéine kinase). Seuls les gènes SCAPER et RCN2 ne sont pas situés dans une région décrite comme polymorphisme. Parmi ces deux gènes, RCN2 semblerait être impliqué dans la coagulation. RCN2 code pour une protéine ERC-55 impliquée dans de nombreuses maladies mais dont le rôle exact est encore inconnu. Grâce à une approche

protéomique, l'équipe de Ludvigsen *et al.* [82] a révélé que cette protéine interagissait avec d'autres protéines dont l'annexine A5 et le kininogène, toutes deux impliquées dans la régulation de la coagulation. L'annexine A5 agit comme une protéine anticoagulante en inhibant la formation de thrombine. Le kininogène est le précurseur du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), kininogène de bas poids moléculaire et de la bradykinine. Le kininogène de haut poids moléculaire participe à la cascade de coagulation ; néanmoins les déficits constitutionnels sévères en KHPM ne s'accompagnent pas de manifestations hémorragiques.

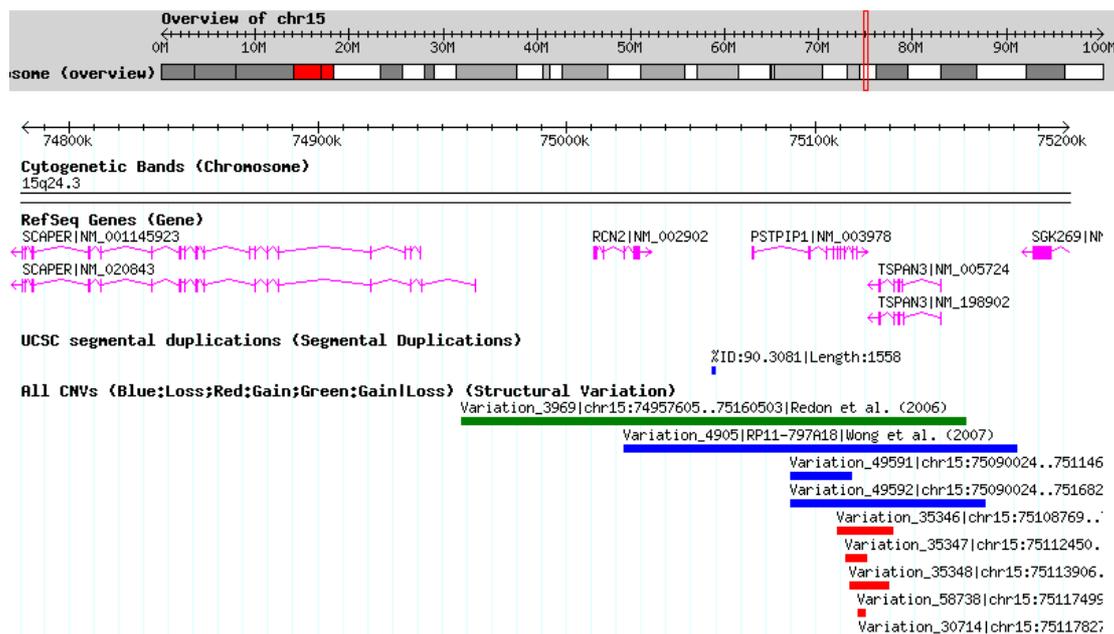


Figure 33 : Visualisation de la région 15q24.3 incriminée dans « Database of Genomic variant ».

Au total, il s'agit donc d'une anomalie de type délétion apparaissant *de novo*, non répertoriée dans les bases de données, dans une région riche en gènes dont certains impliqués dans la coagulation, critères en faveur d'un déséquilibre délétère. Cependant de grands déséquilibres génomiques peuvent être dépourvus de phénotypes [83]. En l'absence de données supplémentaires on ne peut pas assurer formellement que la ventriculomégalie et le microretrognatisme soient imputables à la délétion retrouvée chez ce fœtus mais il y a de grandes probabilités pour que les deux évènements soient liés. Le caractère *de novo* du remaniement est un argument fort en faveur de sa causalité.

### 5.3 Cas 19

Un caryotype fœtal est réalisé par amniocentèse en raison d'une malformation du tube neural (spina bifida lombo-sacré et signes cérébraux majeurs). Ce caryotype révèle la présence d'un marqueur chromosomique excédentaire (figure 34).

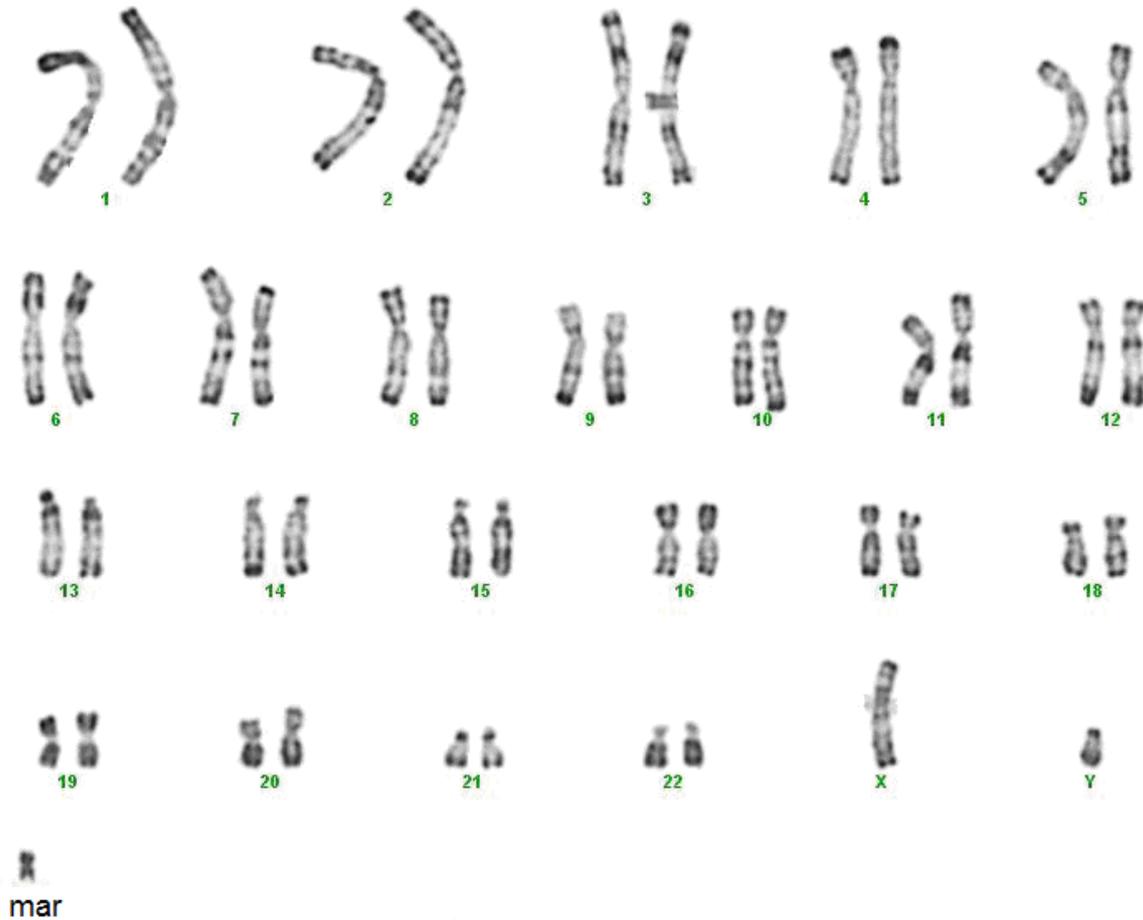


Figure 34 : Caryotype du liquide amniotique du cas 19 : marqueur chromosomique surnuméraire (« mar »).

Le laboratoire de cytogénétique suspecte une duplication du chromosome 14 ou du chromosome 22 d'après l'hybridation in situ réalisée (figure 35).

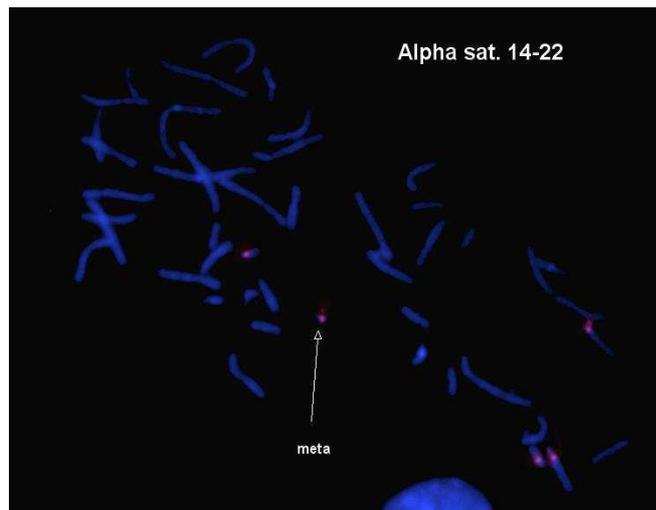


Figure 35 : Hybridation in situ des cellules amniotiques du cas 19 avec une sonde 14-22.

Pour déterminer de façon précise l'origine de ce marqueur, une étude par CGH-array est demandée. Aucune région du chromosome 14 ou 22 surnuméraire n'est retrouvée. Ce matériel excédentaire est donc constitué d'hétérochromatine. Il ne peut être tenu responsable de l'apparition de la malformation fœtale. Cependant, la CGH-array révèle une duplication en 10q21.3 de 1,48 Mb (figure 36); cette dernière est vérifiée par FISH (figure 37).

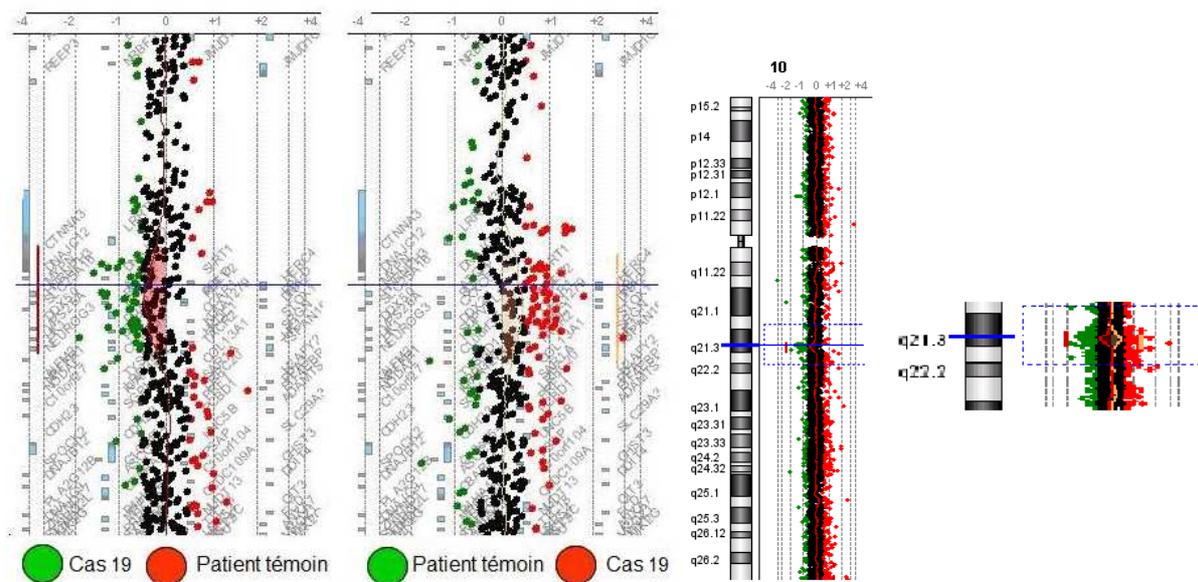


Figure 36: Analyse de l'ADN du cas 19 en Dye Swap.

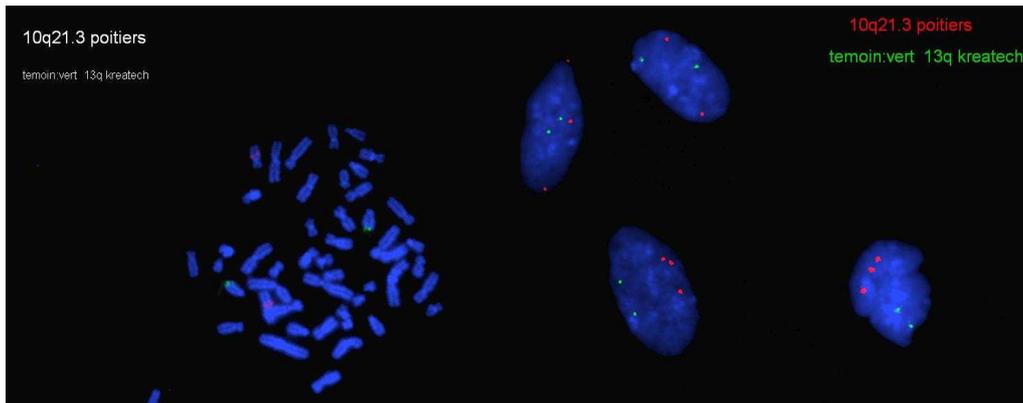


Figure 37: Hybridation in situ des cellules amniotiques du cas 19 avec une sonde 10q21.3.

Pour la sonde étudiée 10q21.3, 13/50 noyaux présentent trois spots (37 noyaux présentent 2 spots) chez le patient 19 alors que 1/50 noyaux en présentent trois chez le patient témoin. Pour valider la duplication il aurait fallu que 3 spots soient retrouvés sur au moins 50% des noyaux chez le patient. L'anomalie est donc probablement en mosaïque. La région surnuméraire peut également se trouver au niveau du marqueur. Cette dernière hypothèse n'a pas été vérifiée.

Aucun cas n'est publié dans la littérature. 16 gènes sont décrits dans la région impliquée dans le déséquilibre (figure 38); aucun CNV n'existe. Ces deux arguments sont en faveur d'une anomalie causale. Néanmoins, les anomalies entraînant un gain de matériel sont moins délétères que les délétions. De plus, on ne sait toujours pas si l'anomalie est *de novo* puisque les parents n'ont pas été explorés par biologie moléculaire ou FISH. Seul un caryotype réalisé chez la maman a permis de retrouver le marqueur surnuméraire. L'étude parentale est encore en cours.

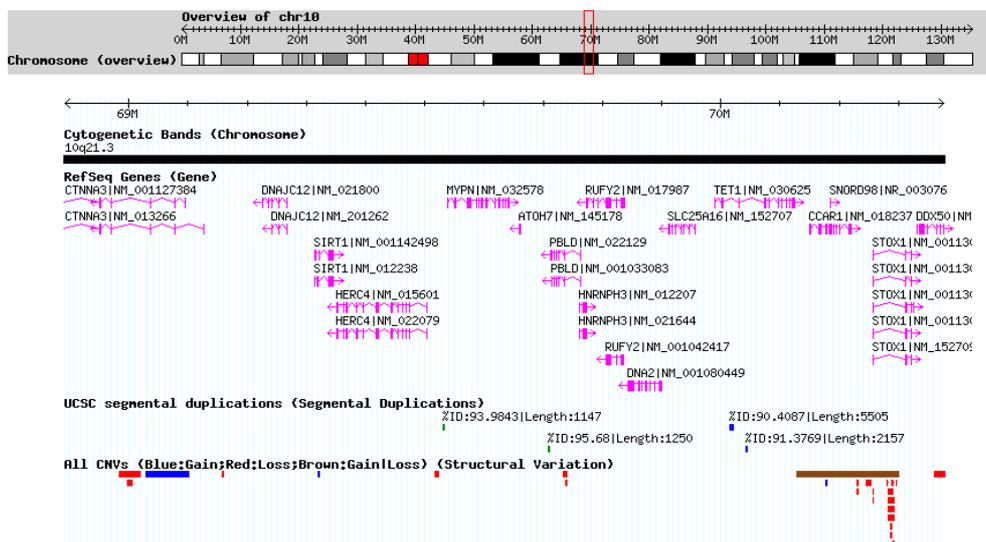


Figure 38 : Visualisation de la région 10q21.3 dans « Database of Genomic variant ».

## 5.4 Cas 20

Il s'agit d'une interruption médicale de grossesse à 23 SA pour anomalie chromosomique déséquilibrée *de novo* (caryotype des parents normaux) : monosomie distale 4q et trisomie partielle d'un fragment chromosomique non identifié (46,XX,der4q+ish del(4)(q35)) (figure 39). Il n'y a pas de point d'appel particulier à l'échographie, l'amniocentèse est réalisée pour risque de trisomie 21 estimé à 1/226.

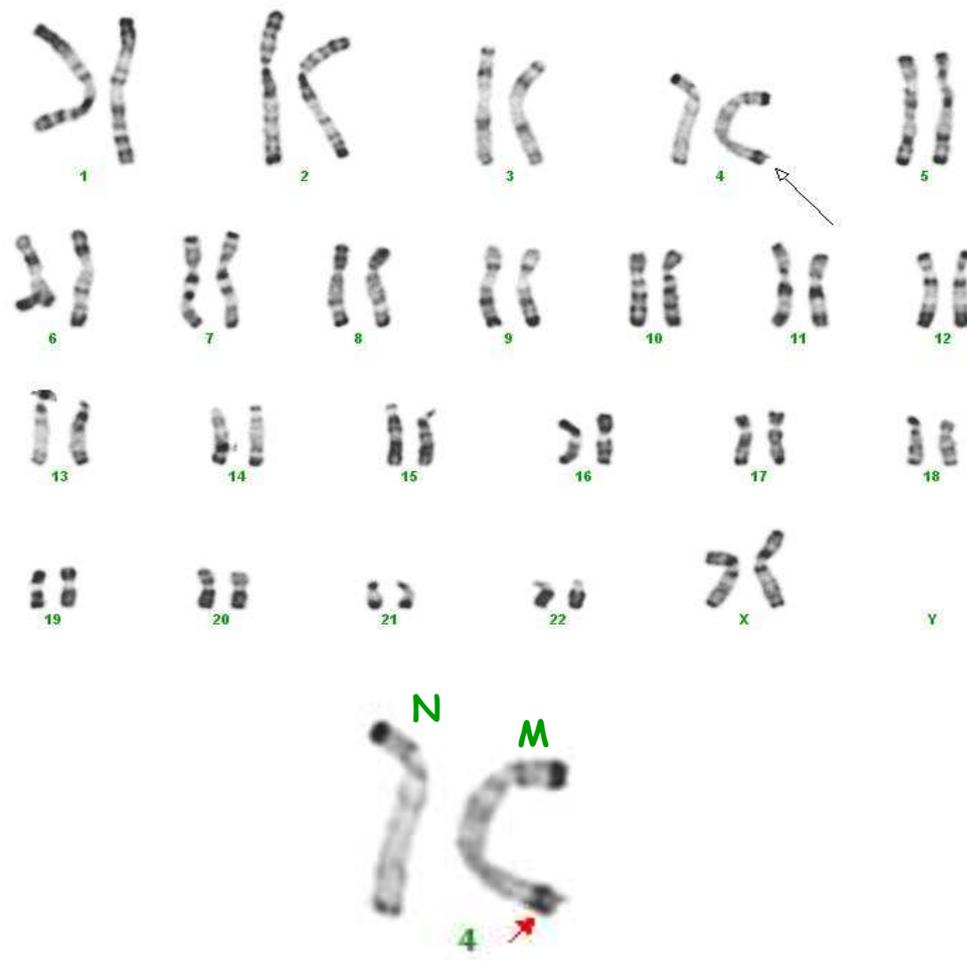


Figure 39: Caryotype du liquide amniotique du cas 20.

L'analyse par CGH-array de l'ADN des cellules en culture montre une délétion de 2,128 Mb de la région 4q35.2 à 4qter (figure 40). Ce résultat est en accord avec la FISH 4q35 réalisée en même temps que le caryotype. Plusieurs gènes sont impliqués dans cette région : ZFP42, TRIML2, TRIML1, FRG1, TUBB4Q. Plusieurs CNV sont également décrits (figure 41). D'après la littérature, la délétion 4q35.2 peut être responsable de retards mentaux légers [84, 85]. Cette délétion a déjà été retrouvée en France. Deux patients diagnostiqués en post natal à 6 et 7 ans sur retard psychomoteur pour l'un et trouble du comportement pour l'autre présentent le même déséquilibre en CGH-array (BACH).

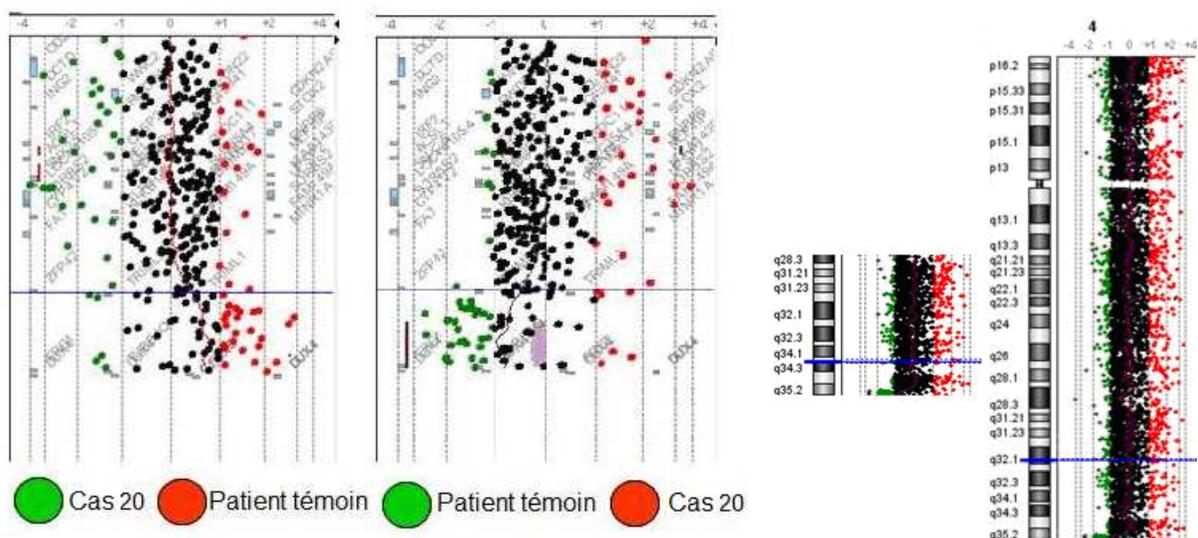


Figure 40: Analyse de l'ADN du cas 20 en Dye Swap (délétion de 2 Mb au niveau de la région 4q35.2).

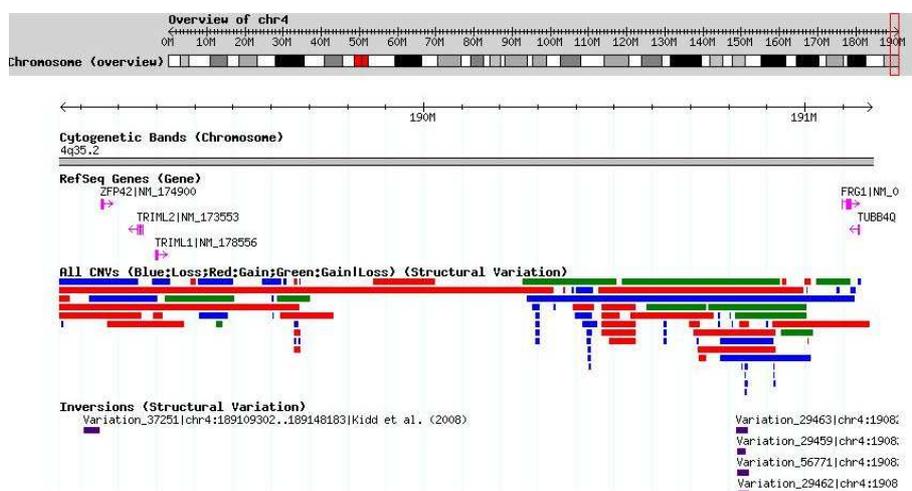
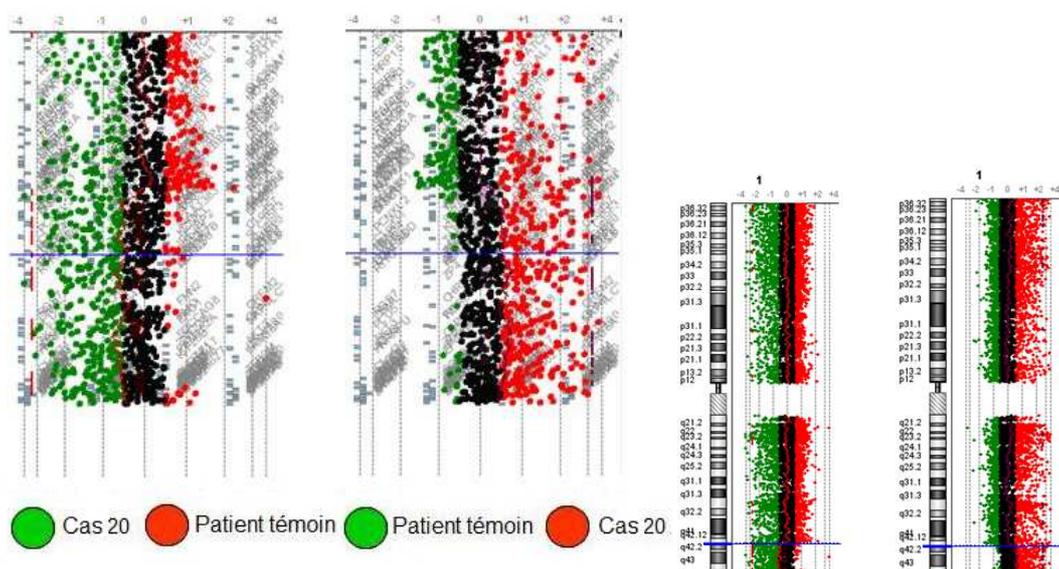


Figure 41: Visualisation de la région 4q35.2 dans « Database of Genomic variant ».

Par ailleurs, on observe une duplication de l'ordre de 20 Mb de la région 1q42.13 à 1qter (figure 42). Cette région surnuméraire, d'après le caryotype est transloquée au niveau du chromosome 4. Cette trisomie partielle du chromosome 1 sera vérifiée par FISH. Les bornes précises de ces anomalies restent incertaines car l'ADN étudié présente un aspect dégradé. D'après la littérature, les duplications terminales 1q42 à 1qter sont responsables de dysmorphismes légers : macrocéphalie, front proéminent, microrétrognathisme, fontanelle large, retard de croissance [86]. D'après Chia et *al.* [87] des anomalies cardiaques peuvent également être présentes; il peut exister un léger retard mental [88]. La CGH-array est informative : l'identification précise de l'anomalie découverte au caryotype permet de préciser le diagnostic.



**Figure 42: Analyse de l'ADN du cas 20 en Dye Swap (duplication au niveau de la région 1q42.qter).**

Ce cas montre l'utilité de la CGH-array lors de translocations déséquilibrées (matériel chromosomique absent ou supplémentaire). Pour répondre au plus vite aux doutes de la cytogénétique « conventionnelle », on pourrait proposer qu'un tube de LA soit systématiquement envoyé parallèlement en génétique moléculaire pour toute amniocentèse. En effet le LA peut être congelé ou extrait puis conservé à +4°C dans l'optique future d'être utilisé pour une CGH-array.

# CONCLUSION

L'objectif premier de ce travail a été d'appliquer la CGH-array aux échantillons prénataux. Ceci a été réalisé avec succès. L'ensemble des fœtus inclus dans l'étude a pu bénéficier d'une analyse par CGH-array quelque soit l'avancée de la grossesse. Dans le cas d'anomalies échographiques précoces les villosités choriales prélevées aboutissent à des résultats de bonne qualité. Pour des grossesses plus avancées, une amniocentèse est réalisée. Le liquide amniotique peut être analysé directement ou après mise en culture. L'analyse des liquides amniotiques natifs permet un gain de temps non négligeable surtout si cette technique est un jour employée en routine (on s'affranchit du temps et des aléas liés à la mise en culture). Néanmoins, la culture ne doit pas être abandonnée. On peut en effet avoir recours aux cellules en culture de liquide amniotique lorsque ce dernier est pauvre en ADN. Il a été précédemment montré que la congélation n'a pas de rôle majeur sur la dégradation de l'ADN [23, 51], nous l'avons également constaté. Les liquides amniotiques peuvent donc être congelés en attendant la décision ou non d'analyse par CGH-array (possibilité de prélever lors de l'amniocentèse prévue pour le caryotype et de retarder la technique de CGH-array en attendant les résultats des premières investigations de cytogénétique conventionnelle). Lorsque nous ne disposons pas de liquide amniotique ou pour éviter de ponctionner à nouveau une patiente ayant déjà eu une choriocentèse, il est également possible de récupérer l'ADN extrait des villosités (conservé à +4°C, pendant un an). Quant aux sangs fœtaux, leur analyse en CGH-array est aisée (obtention pour la plupart des cas de grandes quantités d'ADN de qualité) et très informative (contaminations par les cellules d'origine maternelle rares). Ceci dit, ce type d'échantillon semble plus adapté à l'étude des IMG qu'au diagnostic prénatal.

Au total, au moment de l'IMG nous recommandons de prélever LA et SF. On peut également proposer de prélever du matériel biologique pour CGH-array au moment du premier acte invasif dès lors que le fœtus est atteint de polymalformations de mauvais pronostic.

Il faut noter l'importance de recueillir ces prélèvements au moment de l'IMG. En postnatal, les tissus sont souvent de mauvaise qualité pour pouvoir identifier correctement les anomalies. L'analyse des tissus est à ce jour très aléatoire et donne généralement des résultats difficilement interprétables.

Bi *et al.* [52] réalisent lors de l'extraction une élution supplémentaire pour tester la contamination par les cellules maternelles. Cette démarche devrait être adoptée avant toute analyse de liquide amniotique ou de cellules en culture. Il est nécessaire de s'assurer avant de rendre un résultat que le matériel étudié est bien celui du fœtus (d'autant plus quand le fœtus est de sexe féminin : l'analyse des chromosomes X et Y en CGH-array ne peut pas nous alerter sur une éventuelle contamination maternelle). L'étude des microsatellites de l'ADN du liquide amniotique et du sang maternel permettrait de s'affranchir de toute erreur.

Par ailleurs, une étude par FISH du fœtus et des parents est nécessaire pour confirmer le caractère pathogène d'une anomalie. Cette étape est assez longue de par le processus en lui-même (commande des sondes, vérification des hybridations ...). Il serait donc préférable de récupérer les échantillons de sang des parents lors de l'acte invasif prénatal plutôt que de lors d'une deuxième convocation.

Signes d'appels échographiques et signes d'appels cytogénétiques sont deux indications qui justifient une analyse par CGH-array. Dans notre projet, nous avons appliqué la CGH-array à un nombre limité de cas : 14 fœtus avec signes d'appels échographiques. 7 présentent des polymalformations (au moins deux anomalies échographiques) (cas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10) ; les 7 autres sont atteints d'anomalies échographiques isolées (cas 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Par CGH-array, nous retrouvons 2 déséquilibres additionnels pathogènes chez 1 fœtus. Le nombre de cas étudié est cependant trop faible pour tirer des conclusions quant au taux attendu d'anomalies additionnelles par CGH-array dans le cadre des signes d'appels échographiques.

Nous avons également appliqué la CGH-array en complément de quatre caryotypes fœtaux présentant une anomalie de nature indéterminée. Dans la totalité des cas nous avons caractérisé l'anomalie de façon précise. Nous avons trouvé deux anomalies interprétées comme bénigne (cas 17), une anomalie en cours d'exploration (cas 19), une anomalie causale (cas 20) et une dernière dont la signification reste indéterminée mais très probablement causale (cas 18).

Au total, sur l'ensemble des 18 dossiers, nous avons donc révélé 3 anomalies délétères (16.7 %) chez 2 fœtus (11.1 %) (cas 8 et 20), 2 anomalies bénignes (11.1%) chez un fœtus (cas 17), 1 anomalie de signification indéterminée (5.6%) (cas 18) et 1 anomalie en cours d'exploration. Dans les études précédemment menées, le taux d'anomalies de signification

indéterminée se situe entre 0.6 et 3.7% [62]. En utilisant une puce de résolution supérieure nous ne retrouvons pas de différence significative avec ces chiffres.

En ce qui concerne la fiabilité des résultats, le seul cas non testé qui pourrait ne pas être détecté par CGH-array reste la triploïdie. Nous n'avons pas eu l'occasion de tester ce type d'anomalie chromosomique pendant la période d'étude. A l'avenir, il serait intéressant d'analyser par CGH-array un cas de triploïdie pour voir s'il est masqué par le logiciel (biais introduit par la normalisation des signaux émis par chaque sonde).

Si l'utilisation de la CGH-array dans le cadre des IMG semble incontournable, l'utilisation en diagnostic prénatal est encore discutée. Outre le temps nécessaire aux vérifications qui peut être incompatible avec le temps donné aux cliniciens pour poser le diagnostic, l'interprétation des résultats, délicate en raison de la présence de polymorphismes de signification indéterminée, reste un obstacle majeur. Pour y remédier, une des solutions serait d'avoir recours à des puces ciblées (syndromes microdélétionnels, télomères) uniquement en diagnostic prénatal (dans le cadre des IMG on aurait une perte de résolution qui diminuerait les chances de trouver une anomalie). Dans notre étude, l'analyse des puces à été réalisée à un seuil de détection de 250 kb. Cette résolution permet de s'affranchir des anomalies de petites tailles dont il faut se méfier en prénatal.

En intégrant les échantillons prénataux aux séries de patients adultes, le temps nécessaire au premier rendu de résultats (sans vérifications par FISH) varie de 4 à 8 jours. Une des barrières importante de l'utilisation de la CGH-array en prénatal est le temps dédié à la vérification des anomalies. Les délétions de grandes tailles sont généralement recherchées par FISH. Ce type de vérification peut prendre plusieurs mois (hors syndrome microdélétionnels classiques qui peuvent être disponibles rapidement). Peu de laboratoires ont à leur disposition une banque de BAC et par conséquent chaque sonde doit être commandée. Nous devons nous assurer à leur réception que les sondes hybrident au bon endroit avant de procéder à la vérification de l'anomalie découverte par CGH-array. Cette étape est consommatrice de temps. La disponibilité des sondes retarde le rendu ce qui restreint l'application en prénatal. Par ailleurs, lorsqu'il s'agit d'une duplication, celle-ci est dans la plupart des cas difficile à caractériser, comme nous avons pu le constater pour le cas 19. Il est difficile pour le biologiste de se prononcer, surtout en prénatal, sur l'existence d'une anomalie en comptant juste le nombre de spots sur un nombre élevé de mitoses, particulièrement si le prélèvement d'un des parents n'a pas été possible.

Toutefois, la biologie moléculaire peut surmonter ces barrières techniques imposées par la FISH. Dans un premier temps, la CGH-array sert de vérification initiale par l'utilisation du Dye Swap: une anomalie retrouvée sur deux puces distinctes est très probablement réelle. Il existe également des kits MLPA (MRC Holland) permettant en un seul test de confirmer de nombreux syndromes microdélétionnels (ou leurs microduplications correspondantes) ainsi que les anomalies télomériques. Enfin, l'utilisation de PCR quantitative peut être envisagée afin d'étudier une anomalie privée, non couverte par les kits existants, et ceci, aussi bien pour les délétions que pour les duplications.

En ce qui concerne les anomalies, les cas les plus simples à gérer sont en théorie ceux qui présentent à la fois des signes d'appels échographiques et cytogénétiques. Ici la CGH-array sert de contrôle au caryotype, elle permet de préciser l'anomalie et donc également de mettre un nom sur le syndrome avant l'IMG, ce qui améliore considérablement le conseil génétique et la décision concernant l'IMG. Cependant, notre expérience montre que tout n'est pas aussi simple : pour le cas 18, plusieurs anomalies décelées en échographie n'ont pas été retrouvées lors de l'autopsie. De plus le marqueur surnuméraire visualisé n'était que de l'hétérochromatine (élément rassurant), mais la CGH a mis en évidence une autre anomalie de petite taille située dans une région « non critique » d'un syndrome microdélétionnel connu. En l'absence de signes échographiques délétères pour le fœtus, l'identification de cette anomalie *de novo* aurait sans doute compliqué le conseil génétique.

En l'absence d'anomalies morphologiques (prélèvement sur signes d'appels biologiques) les cas les plus simples sont également ceux où le caryotype présente une anomalie. La CGH permet d'identifier la nature des marqueurs chromosomiques ou des déséquilibres génomiques observés. En revanche, lorsque le caryotype est rendu au préalable normal, le rendu de la CGH-array devient difficile pour le biologiste. S'il s'agit d'une anomalie de taille « cytogénétique » (5-10 Mb) non décelée au caryotype conventionnel, le résultat peut être raisonnablement rendu délétère, surtout lorsqu'il y a des cas déjà décrits. L'interprétation devient très difficile lorsque l'anomalie est inférieure à 5 Mb. Il faut tenir compte de la littérature, des banques de données et appliquer les « critères de Lee » [18]. Ce résultat doit pouvoir aider le clinicien lors du conseil génétique apporté aux parents.

Pour nous aider dans l'interprétation, il est important que les bases de données soient régulièrement mises à jour. Il serait également utile d'avoir accès à une banque de données répertoriant les variants qui n'ont aucune conséquence clinique (CNP), dans la population française (projet en cours d'étude au niveau national). Le suivi des patients est également très

important afin de savoir si certains CNV interprétés comme bénins se révèlent pathogènes dans le futur.

La Fédération Française de Génétique Humaine [89] considère que l'utilisation de tests pangénomiques dans des situations à haut risque (anomalies échographiques) est justifiée (mise à disposition d'un test diagnostique plus performant justifié par une situation clinique adaptée). En revanche, cette application doit être cadrée. L'utilisation de cette technique dans des situations à bas risque doit être mûrement réfléchi. Il ne s'agit pas de mettre en évidence des prédispositions pour certaines maladies (gènes de prédisposition aux cancers, autisme etc...).

D'après les recommandations faites en 2009 par l'ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists) [90], la CGH-array ciblée peut être utilisée en prénatal dans les cas d'anomalies échographiques inexplicables ou devant l'impossibilité d'obtenir des cellules en métaphases lors d'anomalies congénitales. En effet, les couples doivent recevoir un conseil génétique adapté avant et après l'examen pour les sensibiliser aux difficultés d'interprétation et limites de cette technique. Comme le soulignent Darilek *et al.* [91], il est important d'anticiper le conseil génétique afin de maximiser les bénéfices et de réduire les risques potentiels liés à cette nouvelle technologie pour les cliniciens comme pour les patients.

A l'avenir, la CGH-array pourrait être intégrée au diagnostic prénatal. Il faudrait alors accepter que certaines anomalies ne soient pas clairement définies comme pathogènes ou bénignes et dans ce cas précis, se rattacher sans doute aux images échographiques. Devant une anomalie de signification indéterminée avec absence de signe échographique on pourrait raisonnablement considérer que la CGH-array n'a pas été informative. La prise de décision concernant l'avenir d'une grossesse ne pourrait se faire que sur des anomalies dont le caractère pathogène est certain.

A ce jour, nous ne pouvons garantir que nos résultats en prénatal ne seront pas ambigus et que nous ne nous retrouverons pas devant des impasses diagnostiques (anomalies de signification indéterminées). C'est pourquoi, il faut continuer l'analyse des IMG. L'accumulation de résultats au décours des IMG devrait pouvoir nous aider à mieux appréhender le diagnostic prénatal. Avec un peu plus de recul, la CGH-array pourrait devenir une analyse de première intention devant certains types d'anomalies échographiques.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Agence de la biomédecine. Bilan des activités de procréation et génétique humaines en France. 2008.  
[http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2008/diag/1\\_diag\\_prenat/1\\_synthese.htm](http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2008/diag/1_diag_prenat/1_synthese.htm)
2. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992, 258(5083):818-821.
3. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998, 20(2):207-211.
4. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J *et al.* Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 20(4):399-407.
5. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S *et al.* Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005, 53(3):413-422.
6. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ *et al.* A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004, 36(3):299-303.
7. Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N *et al.* Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 2004, 101:17765-17770.
8. Lockwood WW, Chari R, Chi B and Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet* 2006, 14(2):139-148.
9. Gijsbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH *et al.* A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet* 2009, 17(11):1394-1402.
10. Komura D, Shen, F., Ishikawa S., Fitch KR *et al.* Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res* 2006, 16(1575-1584).
11. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML *et al.* Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004, 36(9):949-951.
12. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004, 305(5683):525-528.
13. Feuk L, Carson AR and Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006, 7(2):85-97.
14. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS *et al.* Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet* 2007, 39(10):1256-1260.
15. Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z *et al.* Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005, 77(1):78-88.
16. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006, 444(7118):444-454.
17. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464(7289):704-712.

18. Lee C, Iafrate AJ and Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007, 39(7 Suppl):S48-54.
19. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M *et al.* Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* 2006, 140(24):2757-2767.
20. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 1991, 49(5):995-1013.
21. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A *et al.* Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* 2009, 52(4):161-169.
22. Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R *et al.* Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet* 2006, 43(4):353-361.
23. Lapaire O, Lu XY, Johnson KL, Jarrah Z *et al.* Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenat Diagn* 2007, 27(7):616-621.
24. Tyreman M, Abbott KM, Willatt LR, Nash R *et al.* High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings. *J Med Genet* 2009, 46(8):531-541.
25. Stankiewicz P and Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation *Current Opinion in Genetics and Development* 2007, 17(3):182-192.
26. Flint J and Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003, 13(3):310-316.
27. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I *et al.* High-Throughput Analysis of Subtelomeric Chromosome Rearrangements by Use of Array-Based Comparative Genomic Hybridization. *Am J Hum Genet* 2002, 70(5):1269-1276.
28. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M *et al.* Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005, 42(9):699-705.
29. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M *et al.* Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004, 41(4):241-248.
30. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM *et al.* Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006, 43(2):180-186.
31. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K *et al.* Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 2006, 43(8):625-633.
32. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA *et al.* Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005, 77(4):606-616.
33. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A *et al.* Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006, 79(3):500-513.

34. Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N *et al.* BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006, 140(3):205-211.
35. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM *et al.* Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003, 73(6):1261-1270.
36. Tyson C, Harvard C, Locker R, Friedman JM *et al.* Submicroscopic deletions and duplications in individuals with intellectual disability detected by array-CGH. *Am J Med Genet A* 2005, 139(3):173-185.
37. Redon R, Baujat G, Sanlaville D, Le Merrer M *et al.* Interstitial 9q22.3 microdeletion: clinical and molecular characterisation of a newly recognised overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006, 14(6):759-767.
38. Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* 2008, 124(1):1-17.
39. Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C *et al.* Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet* 2008, 1:15.
40. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O *et al.* Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases. *European Journal of Medical Genetics* 2009, 52(5):291-296.
41. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T *et al.* Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 2007, 44(12):750-762.
42. Gijbbers AC, Bosch CA, Dauwerse JG, Giromus O *et al.* Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. *Eur J Med Genet*, 53(5):227-233.
43. Levy R, Arfi JS and Daffos F. Techniques de prélèvements fœtaux. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 2003, 31: 550-555.
44. Fauret A-L, Bilan F, Patri S, Couet D *et al.* Intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic rapide de la trisomie 21 et des aneuploïdies les plus fréquentes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2009, 37(7-8):611-619.
45. Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A *et al.* Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* 2004, 74(6):1168-1174.
46. Warren JE, Turok DK, Maxwell TM, Brothman AR and Silver RM. Array comparative genomic hybridization for genetic evaluation of fetal loss between 10 and 20 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 2009, 114(5):1093-1102.
47. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S *et al.* Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005, 42(2):121-128.
48. Benzacken B, Tabet A-C, Abourab A, Dupont C *et al.* Apport de la CGH-array au diagnostic prénatal d'anomalies génomiques chez des fœtus présentant des signes malformatifs, avec un caryotype apparemment équilibré *IRBM* 2007, 28(5-6):239-244.
49. Bianchi DW, LeShane ES and Cowan JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. 2001.
50. Lapierre JM, Cacheux V, Luton D, Collot N *et al.* Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. *Prenat Diagn* 2000, 20(2):123-131.

51. Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E, Lucas M *et al.* Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. *Am J Hum Genet* 2004, 75(3):485-491.
52. Bi W, Breman AM, Venable SF, Eng PA *et al.* Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. *Prenat Diagn* 2008, 28(10):943-949.
53. Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, Pfundt R *et al.* Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet*, 47(9):586-594.
54. Veltman JA and de Vries BB. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *J Mol Diagn* 2006, 8(5):534-537; discussion 537-539.
55. Bejjani BA and Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *J Mol Diagn* 2006, 8(5):528-533.
56. Park JH, Woo JH, Shim SH, Yang SJ *et al.* Application of a target array comparative genomic hybridization to prenatal diagnosis. *BMC Med Genet*, 11:102.
57. Coppinger J, Alliman S, Lamb AN, Torchia BS *et al.* Whole-genome microarray analysis in prenatal specimens identifies clinically significant chromosome alterations without increase in results of unclear significance compared to targeted microarray. *Prenat Diagn* 2009, 29(12):1156-1166.
58. Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, Torchia BA *et al.* Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn* 2008, 28(9):789-795.
59. Kleeman L, Bianchi DW, Shaffer LG, Rorem E *et al.* Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn* 2009, 29(13):1213-1217.
60. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN *et al.* Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenatal Diagnosis* 2009, 29(1):29-39.
61. Valduga M, Philippe C, Bach Segura P, Thiebaugeorges O *et al.* A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn*, 30(4):333-341.
62. Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C *et al.* Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet*, 3:24.
63. Liehr T and Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med* 2007, 19(5):719-731.
64. Callier P, Faivre L, Pigeonnat S, Quilichini B *et al.* Contribution of array CGH in prognosis and genetic counselling of prenatally diagnosed supernumerary ring chromosome 20. *Prenat Diagn* 2009, 29(10):1002-1005.
65. Yu S, Bittel DC, Kibiryeva N, Zwick DL and Cooley LD. Validation of the Agilent 244K oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization platform for clinical cytogenetic diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2009, 132(3):349-360.
66. Duchatel F, Oury JF, Mennesson B and Muray JM. Complications of diagnostic ultrasound-guided percutaneous umbilical blood sampling: analysis of a series of 341 cases and review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993, 52(2):95-104.

67. Comité national technique d'échographie de dépistage prénatal. Rapport de 2005, 6-15. [http://www.cngof.asso.fr/D\\_TELE/050430\\_rapport\\_echo.pdf](http://www.cngof.asso.fr/D_TELE/050430_rapport_echo.pdf)
68. Lapaire O, Johnson KL and Bianchi DW. Method for extraction of high-quantity and -quality cell-free DNA from amniotic fluid. *Methods Mol Biol* 2008, 444:303-309.
69. Boog G, Collet M, Bongain A, Le Vaillant C *et al.* Les signes échographiques évoquant un syndrome de wolf-hirschhorn (4 P -) dans le cadre des retards de croissance précoces. *Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction* 2004, 33(1):71-72
70. Battaglia A, Filippi T and Carey JC. Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2008, 148C(4):246-251.
71. Shannon NL, Maltby EL, Rigby AS and Quarrell OW. An epidemiological study of Wolf-Hirschhorn syndrome: life expectancy and cause of mortality. *J Med Genet* 2001, 38(10):674-679.
72. Zollino M, Di Stefano C, Zampino G, Mastroiacovo P *et al.* Genotype-phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 2000, 94(3):254-261.
73. Engelen JJ, Moog U, Evers JL, Dassen H *et al.* Duplication of chromosome region 8p23.1-->p23.3: a benign variant? *Am J Med Genet* 2000, 91(1):18-21.
74. Dibbens LM, Mullen S, Helbig I, Mefford HC *et al.* Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance. *Hum Mol Genet* 2009, 18(19):3626-3631.
75. Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S *et al.* Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet* 2007, 16(5):567-572.
76. Van Esch H, Backx L, Pijkels E and Fryns JP. Congenital diaphragmatic hernia is part of the new 15q24 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet* 2009, 52(2-3):153-156.
77. Andrieux J, Dubourg C, Rio M, Attie-Bitach T *et al.* Genotype-phenotype correlation in four 15q24 deleted patients identified by array-CGH. *Am J Med Genet A* 2009, 149A(12):2813-2819.
78. Cushman LJ, Torres-Martinez W, Cherry AM, Manning MA *et al.* A report of three patients with an interstitial deletion of chromosome 15q24. *Am J Med Genet A* 2005, 137(1):65-71.
79. Klopocki E, Graul-Neumann LM, Grieben U, Tonnies H *et al.* A further case of the recurrent 15q24 microdeletion syndrome, detected by array CGH. *Eur J Pediatr* 2008, 167(8):903-908.
80. Masurel-Paulet A, Callier P, Thauvin-Robinet C, Chouchane M *et al.* Multiple cysts of the corpus callosum and psychomotor delay in a patient with a 3.1 Mb 15q24.1q24.2 interstitial deletion identified by array-CGH. *Am J Med Genet A* 2009, 149A(7):1504-1510.
81. Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S *et al.* Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. In: *Hum Mol Genet*. vol. 16; 2007: 567-572.
82. Ludvigsen M, Jacobsen C, Maunsbach AB and Honore B. Identification and characterization of novel ERC-55 interacting proteins: evidence for the existence of several ERC-55 splicing variants; including the cytosolic ERC-55-C. *Proteomics* 2009, 9(23):5267-5287.
83. Kowalczyk M, Srebniak M and Tomaszewska A. Chromosome abnormalities without phenotypic consequences. *J Appl Genet* 2007, 48(2):157-166.

84. Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C *et al.* Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat* 2007, 28(10):958-967.
85. Rossi MR, DiMaio MS, Xiang B, Lu K *et al.* Clinical and genomic characterization of distal duplications and deletions of chromosome 4q: study of two cases and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2009, 149A(12):2788-2794.
86. Verschuuren-Bemelmans CC, Leegte B, Hoenius TM and Cobben JM. Trisomy 1q42 --> qter in a sister and brother: further delineation of the "trisomy 1q42-qter syndrome". *Am J Med Genet* 1995, 58(1):83-86.
87. Chia NL, Bousfield LR, Poon CC and Trudinger BJ. Trisomy (1q)(q42-qter): confirmation of a syndrome. *Clin Genet* 1988, 34(4):224-229.
88. Bartsch C, Aslan M, Kohler J, Miny P *et al.* Duplication (1)(q32q44) detected by comparative genomic hybridization (CGH): further delineation of trisomies 1q. *Fetal Diagn Ther* 2001, 16(5):265-273.
89. Fédération française de génétique humaine. Réflexions et propositions de la Fédération Française de génétique humaine en vue de la révision de la Loi relative à la bioéthique. 2009, 14-19.  
[http://www.etatsgenerauxdelabioethique.fr/base\\_documentaire/exp/FFGH.pdf](http://www.etatsgenerauxdelabioethique.fr/base_documentaire/exp/FFGH.pdf)
90. ACOG. Committee Opinion No. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2009, 114(5):1161-1163.
91. Darilek S, Ward P, Pursley A, Plunkett K *et al.* Pre- and postnatal genetic testing by array-comparative genomic hybridization: genetic counseling perspectives. *Genet Med* 2008, 10(1):13-18.

DEVAUX Caroline, Huguette, Georgette

**Titre du mémoire- thèse :** Hybridation génomique comparative sur puces à ADN

Mise en place de la CGH-array dans la stratégie diagnostique des malformations fœtales et des anomalies cytogénétiques prénatales

---

**Résumé du mémoire-thèse :** L'hybridation génomique comparative sur puces à ADN (CGH-array) est devenue une méthode de choix pour le dépistage des microremaniements chromosomiques. La CGH-array offre, en effet, une étude globale du génome avec une bien meilleure résolution que les méthodes de cytogénétiques « conventionnelles ». Cette analyse pourrait s'intégrer à la stratégie d'exploration diagnostique des syndromes malformatifs fœtaux inexplicables. Nous avons donc mis au point cette technique sur quatre types d'échantillons : villosités chorales, liquides amniotiques, cellules en culture de liquides amniotiques et sangs fœtaux. Nous avons étudié 18 cas prénataux. Parmi ceux-ci, nous avons identifié 7 déséquilibres additionnels au caryotype chez 5 fœtus. 3 anomalies sur 7 ont été considérées pathogènes. Le diagnostic moléculaire des anomalies fœtales ayant abouti à une IMG est indispensable. L'utilisation de la CGH-array pour les cas ne justifiant pas une IMG est délicate à cause de la présence de polymorphismes de signification indéterminée. Néanmoins, cette technique devrait, à l'avenir, pouvoir être mise en place en routine pour le diagnostic prénatal dans des cas ciblés, avec une grande prudence face aux anomalies non décrites.

---

**MOTS CLÉS :** CGH-ARRAY, PRÉNATAL, MALFORMATIONS FŒTALES, ANOMALIES  
CYTOGÉNÉTIQUES

---

**JURY :**

**Président :**

M. Jean-Marie BARD, PU de Biochimie Générale et Clinique, Faculté de Pharmacie de Nantes

**Assesseurs :**

M. Alain KITZIS, PUPH, Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de Poitiers

M. Frédéric BILAN, Docteur, Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de Poitiers

Mme Martine DUGUE-MARECHAUD, PH, Service de Gynécologie-obstétrique, CHU de Poitiers