



HAL
open science

Etude de la prévalence des aneuploïdies dans les produits d'avortements spontanés : intérêt des techniques FISH et MLFA pour la détection des remaniements chromosomiques.

Khadidja Haoud

► **To cite this version:**

Khadidja Haoud. Etude de la prévalence des aneuploïdies dans les produits d'avortements spontanés : intérêt des techniques FISH et MLFA pour la détection des remaniements chromosomiques.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université Djillali Liabès (Sidi Bel-Abbès, Algérie), 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM29 . tel-02073624

HAL Id: tel-02073624

<https://theses.hal.science/tel-02073624>

Submitted on 20 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Djillali Liabès
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Université d'Auvergne
Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé
Faculté de Médecine



THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

En vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'université d'Auvergne
Et le grade de
Docteur en Sciences de l'université Djillali Liabès

Spécialité : Biologie Cellulaire

Option : Biologie de la cellule normale et pathologique

Intitulé :

**Étude de la prévalence des aneuploïdies dans les produits
d'avortements spontanés : Intérêt des techniques moléculaires FISH et
MLPA pour la détection des remaniements chromosomiques**

Présenté et soutenue par :

Mme Khadidja Haoud

Devant le jury composé de :

Pr Tou Abdenacer

Pr ARIBI Mourad

Dr Laetitia GOUAS

Pr Moulessehoul Soraya

Pr Philippe Vago

Président

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

Directeur de thèse

UDL Sidi Bel Abbès

Université Aboubakr Belkaid Tlemcen

Université d'Auvergne

UDL Sidi Bel Abbès

Université d'Auvergne

Remerciements

Je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de l'apprenti chercheur.

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse Madame Moulessehoul et Mr Vago, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour leurs multiples conseils et pour toutes les heures qu'ils ont consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais leur dire également à quel point j'ai apprécié leur grande disponibilité et leur respect des délais serrés de relecture des documents que je leurs ai adressés. Je tiens à faire savoir à Mme Moulessehoul que je lui dois tout, et que je lui serai éternellement reconnaissante pour m'avoir appris à être plus autonome et moins « bonne élève » tout au long de mes études, et à Mr Vago, que j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral, et qu'aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude, mon respect et ma reconnaissance pour son aide, son implication, sa gentillesse, son soutien, et son hospitalité. Merci pour tout.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à Laetitia, puisse-t-elle avoir la conviction que sans elle, rien de tout cela n'aurait été possible aujourd'hui. Je lui exprime ici tout mon respect, ma gratitude et mon affection, et tiens à ce qu'elle sache que j'ai été honorée d'avoir travaillé avec une personne d'une telle compétence.

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

Je saisis également l'occasion pour adresser mes remerciements au Pr Chafi Y. pour m'avoir orientée vers ce thème et pour m'avoir apportée toute l'aide nécessaire à la réalisation de la première partie de ce travail lors de ma 1^{ère} post-graduation.

Je remercie les membres du Laboratoire de Cytogénétique Médicale pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée tout au long de ces années de thèse, pour leur bonne humeur et leur précieuse aide pendant la réalisation de mes recherches.

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

Dédicace

Il m'a fallu du temps pour dessiner les contours de mon sujet, avoir un certain recul, mettre en forme une thèse.... prendre en fait le temps nécessaire à tout travail de recherche, pour enfin donner le jour à ce travail. C'est un combat personnel que j'ai menée envers et contre tout, parfois même contre ma propre personne, afin de ne pas céder, de ne pas baisser les bras, malgré des circonstances souvent difficiles, et parfois même douloureuses.

C'est la raison pour laquelle je dédie entièrement ce travail à mon papa et à ma maman, mes piliers, mes exemples, mes premiers supporteurs et ma plus grande force. Merci pour votre présence, votre soutien, votre aide financière, et surtout, merci de n'avoir jamais douté de moi. Tout ce que j'espère, c'est que vous soyez fiers de moi aujourd'hui.

A ma plus belle raison de vivre, ma plus grande fan, mon plus bel amour, mon soleil et ma joie de vivre, ma petite sœur, fille, chérie : Fatima Zohra. Merci pour tout. Merci d'exister tout simplement.

A mon petit ange, le plus beau cadeau que la vie m'ait offerte, ma plus belle réalisation et ma plus grande fierté : Mon fils Mohamed Nadir. Ta venue au monde a donné un sens à ma vie, une raison de me battre. Tu me combles de bonheur, et même si tu es trop petit pour comprendre ce qui se passe, j'espère qu'un jour tu seras fier de ta maman.

A mon cher frère Sid Ahmed et à mon petit « Batitou », sache que je suis très fière d'être ta « tata ».

A la mémoire de ma très chère grand-mère, sache ma mima que ta prière « daradja 3la daradja » a été entendue. Repose en paix.

Résumé

L'avortement spontané (AS) désigne la perte du produit de conception avant sa viabilité, c'est-à-dire avant la 22^{ème} semaine d'aménorrhée, ou un poids fœtal inférieur à 500 g. La cause génétique est à l'origine de plus des deux tiers des AS, les aneuploïdies autosomiques, représentant à elles seules jusqu'à 70% des pertes fœtales du 1^{er} trimestre. Le caryotype présente une très bonne sensibilité en ce qui concerne le dépistage des trisomies autosomiques (13, 18 et 21) et des aneuploïdies affectant les chromosomes sexuels, mais il montre d'importantes limites, d'une part en raison des échecs de culture cellulaire et d'autre part en raison de l'existence de remaniements non détectables au caryotype standard. Actuellement plusieurs techniques moléculaires de dépistage rapides des aneuploïdies liées aux échecs de grossesses ont été confirmés : la Fluorescence *In Situ* par Hybridation, et l'Amplification Multiplex de sondes nucléiques Dépendant des Ligatures (MLPA), qui présentent l'avantage d'être réalisables, sans culture préalable, sur noyaux en interphase ou sur ADN extrait et de permettre la détection d'anomalies cryptiques.

Notre étude repose sur l'étude cytogénétique des produits d'AS pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques les plus fréquentes à l'origine de ces pertes fœtales et d'en mieux appréhender les mécanismes de survenue. Elle a été réalisée sur 220 patientes âgées entre 19 et 45 ans, et était fondée sur l'analyse directe par FISH sur noyaux interphasiques (AneuVysionTM) de prélèvements de villosités choriales et sur l'analyse de l'ADN extrait de tissus fœtaux par MLPA afin de révéler d'éventuelles aneuploïdies et microremaniements. L'âge gestationnel au moment des différents prélèvements était compris entre 7 et 38 semaines d'aménorrhée. Sur un total de 151 échantillons analysés par AneuVysionTM, 10 anomalies chromosomiques ont été observées : 3 trisomies 21, 1 trisomie 18, 1 trisomie 13, 1 mosaïque 46,XX/47,XX+21, 3 triploïdies et 1 monosomie X (Turner). Par ailleurs sur les 69 autres échantillons analysés par MLPA, 6 étaient ininterprétables. Les anomalies trouvées par cette technique étaient : 2 monosomies X. Pour les échantillons restants, la MLPA a été négative.

Nous avons en parallèle réalisé une étude rétrospective fondée sur l'analyse comparative d'un échantillon recruté à Sidi Bel Abbés, de femmes ayant subi un AS et admises à la maternité de l'hôpital Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbés et d'un échantillon recruté à Clermont-Ferrand de femmes ayant subi un AS et pour lesquelles un prélèvement pour établir le caryotype du produit de fausse-couche avait été adressé dans le Service de Cytogénétique du CHU Estaing de Clermont-Ferrand. Cette étude a couvert une période de six années, allant de Janvier 2005 à Décembre 2010. Les techniques de FISH et de MLPA représentent des outils simples, rapides et sensibles pour la détection des remaniements chromosomiques. Elles représentent une alternative très intéressante à la culture cellulaire, et permettent le diagnostic de désordres génomiques indétectables par les techniques conventionnelles.

Mots Clés : Avortements, Spontanés, Aneuploïdies, FISH, MLPA

Abstract

Spontaneous abortion (SA) is the loss of the product design before its viability , that is , before 22 weeks of gestation or fetal weight less than 500 g . The genetic cause accounts for more than two thirds of AS, autosomal aneuploidies , alone accounting for up to 70% fetal loss . Chromosomal cytogenetic techniques show significant limitations on the one hand because of the failures of cell culture and secondly because of the existence of undetectable alterations to the standard karyotype. It was therefore planned to use molecular techniques: Fluorescence In Situ Hybridization by , and Multiplex Amplification of nucleic acid probes Depending on ligatures (MLPA) , which have the advantage of being achievable without prior culture of cores interphase or DNA extracted and to enable detection of cryptic abnormalities.

The project is based on cytogenetic study of AS products to highlight the most frequent cause of these fetal losses and to better understand the mechanisms occurring chromosomal abnormalities.

Our study was performed on 220 patients ranging in age from 19 to 45 years , and was based on the direct analysis by FISH on interphase nuclei (AneuVysion™) of chorionic villus sampling and analysis of DNA extracted fetal tissue by MLPA to reveal any aneuploidy and microremaniements . The gestational age at different samples ranged from the 7th to the 38th week of gestation. Of a total of 151 samples analyzed by AneuVysion™ , 10 chromosomal abnormalities were observed: three trisomies 21 , one trisomy 18 , one trisomy 13 , one mosaic 46, XX/47 , XX 21 , 3 and 1 triploidies monosomy X (Turner) . In addition to the other 69 samples analyzed by MLPA, 6 were uninterpretable. The abnormalities found by this technique were: 2 monosomies X. For the remaining samples, the MLPA was negative.

We conducted a retrospective parallel study based on the analysis of a sample recruited in Sidi Bel Abbes , women who have had an AS and admitted to the maternity hospital Abdelkader Hassani Sidi Bel Abbes and a sample recruited in Clermont -Ferrand women who underwent aS for which a levy to establish the karyotype product miscarriage had been addressed in the Department of Cytogenetics CHU Estaing, Clermont- Ferrand . This study covered a period of six years, from January 2005 to December 2010.

The techniques of FISH and MLPA are simple, rapid and sensitive for the detection of chromosomal rearrangements tools. They represent a very interesting alternative to the cell culture and allow the diagnosis of genomic disorders undetectable by conventional techniques.

Keywords : Spontaneous, Abortion, Aneuploidies, FISH, MLPA.

الإجهاض التلقائي - - هو فقدان تصميم المنتج التلقيح قبل قدرتها على البقاء وهذا 22 أسبوعا من الحمل أو وزن الجنين 500 . وراثي هو سبب أكثر من ثلثي الاجهاضات، وهو ما يمثل وحده 70 الجنين لديه حساسية جيدة جدا في الكشف عن جسمية (13 18 21) و التي تؤثر على عدم توازن الصبغيات ، لكنه يظهر قيود كبيرة من ناحية بسبب إخفاقات زراعة الخلية وثانيا بسبب وجود تعديلات لا يمكن الكشف عنها بواسطة النمط النووي. حاليا تم تأكيد العديد من الطرق الجزيئية للكشف السريع عن الإخفاقات المرتبطة بعدم توازن الصبغيات في الحمل: FISH ، و تحقيقات الحمض MLPA، والتي لديها ميزة كونها قابلة للتحقيق ، دون زرع مسبق لتمكين الكشف عن شذوذ خفي.

ويستند دراستنا على دراسة خلوية لمنتجات اجهاض تلقائي لتسليط الضوء على السبب الأكثر شيوعا من هذه الخسائر الجنين و إلى فهم أفضل للآليات التي تحدث شذوذ .

وقد أجريت الدراسة على 220 مريضة لدينا الذين تتراوح أعمارهم بين 19 45 عاما ، و كانت تقوم على التحليل المباشر من FISH وور البيئي نوى (AneuVysion™) زغابة المشيمي أخذ العينات وتحليل الحمض النووي المستخرج من النسيج بواسطة MLPA لكشف أي اختلال الصيغة الصبغية و كان عمر الحمل في ذلك الوقت من عينات مختلفة بين 7 38 . من مجموعه 151 عينة تم تحليلها بواسطة AneuVysion™، شوهد 10 :

3	تريبلويديا	18	13 ، واحد فسيفساء 46 XX/47 XX 21
6	غير قابلة للتفسير و	69	عينات أخرى تحليلها ب MLPA

وجدت من قبل هذه التقنية: 2 X تيرنر
X اما بالنسبة العينات المتبقية، كانت النتيجة سلبية.

أجرينا دراسة موازية بأثر رجعي استنادا إلى تحليل عينة نساء تعرضن لاجهاض تلقائي في سيدي بلعباس ، والنساء اللواتي تم تسجيلهم في مصلحة الولادة بمستشفى عبد القادر حساني بسيدي بلعباس وعينة من النساء في كليرمون فيران الذي خضعن لاجهاض عفوي والتي تم ارسال العينات لاختصاصها للفحص لإنشاء المنتج النمط النووي و التي عولجت في قسم الوراثة الخلوية CHUديستان ، كليرمون فيران . غطت هذه الدراسة فترة من ست سنوات ، من يناير 2005 إلى ديسمبر 2010.

التقنيات من FISH MLPA هي بسيطة وسريعة وحساسة للكشف عن إعادة ترتيب الكروموسومات . و هي تمثل بديلا مثيرة جدا للاهتمام ل زراعة الخلايا وتسمح لتشخيص الاضطرابات الجينية الغير قابلة للكشف بواسطة التقنيات التقليدية.

مفتاحية: الإجهاض العفوي ، أنيوبلويدي ، FISH MLPA

Liste des abréviations

AS : Avortement Spontané

ASR : Avortement Spontané à Répétition

MFIU : Mort Fœtale *In Utero*

CEP[®] : Chromosome Enumeration DNA FISH Probes

LSI[®] : Locus Specific Identifier DNA Probes

DAPI : 4,6-Diamino-2-Phénylindole

DRA : Dépistage Rapide des Aneuploïdies

FISH: Fluorescence *In Situ* par Hybridation

MLPA : Multiplex Ligation Probe-dependant Amplification

PCR : Polymerase Chain Reaction

QF-PCR : Amplification en Chaîne par Polymérase Fluorescente Quantitative

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ou encore CGHa)

BoBs : Bac on Beads

SA : Semaine d'Aménorrhée

HCG : Hormone Gonadotrophine Chorionique

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SNP: Single-Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme nucléotidique)

Kb: Kilo base

CNV : Variation du Nombre de Copies des gènes (en anglais : *Genes Copy Number Variation*)

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

IVG : Interruption Volontaire de Grossesse

IMG : Interruption Médicale de Grossesse

AG : Age Gestationnel

Rpm : Rotation Par Minute

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Revue bibliographique

Chapitre I : Cytogénétique des avortements spontanés

I. Les avortements spontanés.....	3
II. Etiologie des Avortements Spontanés.....	5
II.1. Les facteurs génétiques.....	5
II.1.1. Cytogénétique des avortements spontanés.....	6
II.1.1.1. La relation entre les anomalies chromosomiques et l'âge gestationnel.....	6
II.1.1.2. L'âge gestationnel.....	6
II.1.1.3. Types d'erreurs menant à des produits de conception chromosomiques anormaux.....	9
II.2. Les pertes de grossesses chromosomiquement normales.....	24

Chapitre II : Nouvelles techniques moléculaires de dépistage de l'aneuploïdie chromosomique

I. Spécimens utilisés pour les études cytogénétiques.....	29
II. Méthodes de dépistage rapide de l'aneuploïdie.....	30
II.1. Fluorescence <i>In Situ</i> par Hybridation (FISH).....	30
II.1.1. Les cibles.....	31
II.1.2. Les sondes.....	32
II.2. Amplification en chaîne par polymérase fluorescente quantitative (QF-PCR).....	33
II.2.1. Analyse des résultats de la QF-PCR, comparaison avec la FISH et perspectives future.....	34
II.3. Amplification multiplex de sondes nucléiques dépendant des ligatures (MLPA).....	35
II.3.1. Principe de la MLPA.....	35
II.3.2. Interprétation des résultats de la MLPA.....	36
II.3.3. Intérêt et utilisations de la MLPA.....	38
II.4. L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (ACPA).....	39
II.4.1. Hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN et fœtopathologie.....	41
II.5. La Bac on Beads (BoBs).....	42
II.5.1. Principe de la BoBs.....	43

Partie expérimentale

Partie 1 :

I. Matériel et méthodes.....	45
I.1. Protocole technique pour la FISH.....	45

Le sommaire

I.2. Protocole technique MLPA.....	46
II. Résultats et discussions.....	51
II.1. Résultats.....	51
II.2. Discussion.....	61
II.2.1. Analyse FISH en direct.....	61
II.2.2. Intérêts et inconvénients de la FISH.....	64
II.2.3. Analyse MLPA.....	64
II.2.4 Quelles perspectives ?.....	66
III. Quel intérêt pour l'évaluation des pertes de grossesses ?.....	67
Partie 2 :	
I. Population étudiée.....	69
II. Résultats et discussion.....	69
II.1. Caractéristiques des deux échantillons.....	69
II.2. Analyse des données.....	70
II.2.1. La fréquence des AS.....	70
II.2.2. La répartition des AS en fonction de l'âge maternel.....	71
II.2.3. Répartition des AS selon l'âge gestationnel.....	74
II.2.4. Répartition des AS en fonction de la parité.....	76
II.2.5. Répartition des AS en fonction de leur répétition.....	78
II.2.6. Résultats de l'analyse cytogénétique conventionnelle.....	79
Conclusion générale.....	83
Références bibliographiques.....	84

Introduction

Introduction

L'avortement spontané (AS) est la plus fréquente des complications gravidiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, il s'agit de l'expulsion ou l'extraction hors de la mère d'un embryon ou d'un fœtus de moins de 500 g, c'est à dire, avant la 22^{ème} semaine d'aménorrhée. On considère qu'environ deux tiers des grossesses s'arrêtent avant le 6^{ème} mois, mais la fréquence des AS « cliniques » est de 15 à 20 % [Kline et *al.*, 1985].

Outre les facteurs anatomiques, immunologiques, endocriniens, ou hématologiques incriminés dans l'étiologie des AS, les facteurs chromosomiques demeurent la principale cause de ces pertes de grossesses. En effet, la cause génétique explique à elle seule plus des deux tiers des avortements spontanés [Lin et *al.*, 1985 ; Dejmek et *al.*, 1992, Griffin et *al.*, 1997]. L'analyse cytogénétique des produits d'avortement spontané fournit de précieuses informations sur la fréquence des anomalies chromosomiques dans divers groupes ethniques, sur leur étiologie, sur les risques de récurrence et sur la suspicion d'une activité mutagène dans une population [Kajii et *al.*, 1980 ; Warburton et *al.*, 1980].

Le caryotype présente une très bonne sensibilité en ce qui concerne le dépistage des trisomies autosomiques (13, 18 et 21) et des aneuploïdies affectant les chromosomes sexuels, qui représentent la plupart des assortiments chromosomiques fœtaux anormaux [Rickman et *al.*, 2006]. Il permet également le dépistage d'autres aberrations chromosomiques, tant numériques que structurales, selon une résolution d'environ 10 millions de paires de bases (10 Mb) d'ADN. Cependant, le caryotype présente certaines limites [Shaffer et *al.*, 2004], en raison du temps requis pour la collecte et la mise en culture des cellules, ainsi que du processus d'analyse exigeant en main-d'œuvre avec l'exécution d'un caryotype complet qui peut aller jusqu'à 3 semaines. Des efforts considérables ont permis d'élaborer de solides techniques de biologie moléculaire qui ne nécessitent pas une mise en culture avant l'analyse et se prêtent à l'automatisation, permettant ainsi l'obtention de résultats plus rapidement et à moindre coût. A l'heure actuelle, plusieurs méthodes de Diagnostic Rapide des Aneuploïdies (DRA) ont été confirmées en vue d'une utilisation pour l'analyse des produits d'avortements spontanés, généralement à titre de méthodes d'appoint plutôt qu'en remplacement du caryotype : la FISH, la QF-PCR, la MLPA, l'ACPA et plus récemment les BoBs qui font toujours l'objet de recherches en ce qui a trait à leur utilisation dans le cadre de la recherche sur les AS.

Nous avons réalisé une étude rétrospective fondée sur l'analyse comparative d'un échantillon recruté à Sidi Bel Abbés (E1), de femmes ayant subi un AS et admises à la maternité de l'hôpital Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbés et d'un échantillon recruté à Clermont-Ferrand (E2) de femmes ayant subi un AS et pour lesquelles un prélèvement pour

Introduction

établir le caryotype du produit de fausse-couche avait été adressé dans le Service de Cytogénétique du CHU Estaing de Clermont-Ferrand. Cette étude a couvert une période de six années, allant de Janvier 2005 à Décembre 2010.

Nous avons, en parallèle, réalisé une étude pratique, menée conjointement dans le Laboratoire de Biotoxicologie de l'université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès et le Service de Cytogénétique Médicale du CHU Estaing de Clermont-Ferrand. Deux cents vingt produits d'avortements spontanés et de fœtus morts in utero ont été récoltés sur une période qui s'est étalée entre 2009 et 2012. L'âge gestationnel au moment des différents prélèvements allait de la 7^{ème} à la 38^{ème} semaine d'aménorrhée. Cette étude était fondée sur l'analyse directe par FISH sur noyaux interphasiques de prélèvements de villosités choriales extraites des différents produits d'avortements, et sur l'analyse de l'ADN extrait de tissus fœtaux par MLPA afin de révéler d'éventuelles aneuploïdies dans les différents prélèvements à l'origine de ces pertes fœtales.

Revue bibliographique

I. Les avortements spontanés :

L'avortement spontané (AS), complication la plus commune de la grossesse, est la perte spontanée du produit de conception avant sa viabilité ; ceci implique toutes les pertes de grossesses se produisant entre la conception et la 22^{ème} semaine d'aménorrhée. C'est ce qu'on appelle communément une « fausse couche ». Les grossesses « biochimiques » précoces, les grossesses molaires et ectopiques sont exclues de cette définition. [Vinatier et *al.*, 1998].

On estime qu'environ 15 % à 20% des grossesses reconnues cliniquement se terminent par une fausse couche spontanée, alors que le taux d'échecs de reproduction est quant à lui plus proche des 50% [Kline, 1989 ; Chard, 1991].

La nomenclature des obstétriciens regroupe les pertes avant 22 semaines sous le vocable d'« avortements » et les pertes fœtales plus tardives sous le terme de « mort fœtale ».

Auteurs	Nombre de grossesses cliniques	Nombre d'avortements spontanés	Risque d'avortements spontanés
Miller, 1980	102	14	13.7%
Edmonds, 1982	41	6	14.6%
Whittaker, 1983	85	11	12.9%
Wilcox, 1988	154	18	11.7%
Regan, 1989	226	23	10.3%
Goldstein, 1994	232	31	13.3%

Tableau 1 : Evaluation du risque de fausses couches spontanées à travers six études

[Vinatier et *al.*, 1998]

La prise en compte des accidents en fonction des périodes de développement correspond mieux à la réalité avec trois périodes :

- La période pré-embryonnaire de la fécondation jusqu'à la fin de la 5^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) (disque embryonnaire tridermique) ;
- La période embryonnaire de la 6^{ème} à la fin de la 10^{ème} SA ;
- La période fœtale, à partir de la 11^{ème} SA.

Les échecs de grossesse affectent l'une des trois périodes : pré-embryonnaire, embryonnaire et fœtale. Environ 87% des échecs ont lieu durant les 70 jours suivant les dernières menstruations, c'est-à-dire durant les périodes pré-embryonnaire et embryonnaire.

L'avortement spontané peut être complet si la totalité de l'œuf est évacué et incomplet s'il reste du tissu ovulaire dans la cavité utérine avant 22 semaines d'aménorrhée.

L'avortement incomplet est plus fréquent après 10 semaines d'aménorrhée, quand le placenta et le fœtus sont expulsés séparément. Une expulsion incomplète du placenta peut s'accompagner de métrorragies parfois profuses.

Environ 25% à 50% des femmes expérimentent un ou plusieurs AS durant leur vie reproductive, souvent du(s) à une anomalie chromosomique du conceptus, ce risque augmentant significativement avec l'âge [Stirrat, 1990 ; Greenwold et Jauniaux, 2002].

Dans la majorité des cas, une fausse couche unique ne compromet pas la possibilité de grossesses ultérieures. Près de 90% des femmes concernées ont de nouvelles grossesses et ne font pas de fausse couche. Cependant, pour un pourcentage réduit mais significatif d'entre elles, cela se reproduit. On parle dans ce cas de fausses couches à répétition.

L'avortement spontané à répétition (ASR) est défini par la survenue d'au moins 3 avortements spontanés consécutifs [Vinatier et *al.*, 1998]. Ces ASR affectent environ 1% des couples [Stirrat, 1990].

Le risque d'avorter pour une femme est directement lié à la survenue d'un précédent avortement ; c'est pour cette raison que plusieurs arguments sont en faveur de l'existence réelle de l'entité « avortement spontané à répétition » en tant que maladie et non simple répétition accidentelle d'un phénomène fréquent. En effet, et en retenant l'hypothèse la plus pessimiste d'un taux d'avortements spontanés de 15%, la probabilité pour un couple d'avoir deux AS successifs, si les événements sont indépendants, serait de 2,3% ; trois AS successifs seraient observés dans 0,34% des cas. Or, ces probabilités calculées ne coïncident pas avec la probabilité estimée dans la population d'avoir trois AS. En effet, l'incidence observée dans la survenue d'ASR est trop importante (1 à 3%) [Carrington et *al.*, 2005] pour être imputée au hasard seul [Regan, 1991].

Contrairement aux AS, les ASR tendent à se produire même si le conceptus a un caryotype normal [Stirrat, 1990], et touchent des femmes possédant des caractéristiques reproductives spécifiques [Jivraj et *al.*, 2001].

II. Etiologie des Avortements Spontanés :

Lorsque l'on examine la probabilité de succès d'un produit de conception donné, les résultats de la reproduction humaine sont assez mauvais. Environ 78% de toutes les conceptions ne parviennent pas à aller à terme [Roberts et Lowe, 1975]. Les données combinées provenant de trois études sur des femmes tentant d'être enceintes ont révélé un taux de perte post-implantatoire de 42% parmi les grossesses cliniquement prouvées (par la présence de HCG) [Wilcox et *al.*, 1988 ; Edmonds et *al.*, 1982]. La fécondité globale nette pour les patientes âgées entre 20 et 30 ans se situe entre 21 et 28% [Short, 1999], un niveau assez faible comparé à la plupart des autres espèces mammifères.

Bien que la plupart des pertes de grossesse se produit très tôt dans la gestation, les pertes continuent de se produire tout au long du deuxième et du troisième trimestre de grossesse, avec une légère augmentation de la mortalité à terme [Leridon, 1977]. Les causes sont aussi nombreuses et diverses que pour les fausses couches. Ce sont soit des causes fœtales soit des causes maternelles, mais elles ne sont pas toujours décelables dans le cas individuel. En règle générale, en matière d'avortement, plus c'est précoce et plus souvent la cause en sera ovulaire. Plus c'est tardif, plus on retrouvera de pathologie d'origine maternelle, utérine en particulier.

II.1. Les facteurs génétiques :

Les aneuploïdies sont la cause la plus importante des avortements avant la 10^{ème} semaine de gestation [Jacobs et Hassold, 1987]. Au moins 50 à 60% des avortements sont associés à des anomalies cytogénétiques, les plus fréquentes étant les trisomies, suivies par les polyploïdies et les monosomies X [Stephenson et *al.*, 2002 ; Kalousek et *al.*, 1993 ; Fritz et *al.*, 2001]. La plupart des aneuploïdies humaines résulte de la première division méiotique des ovocytes.

La majorité (90%) des grossesses caryotypiquement anormales avorte, tandis que la majorité des grossesses caryotypiquement normales continuent ; l'AS peut donc être considéré comme un processus de sélection naturelle.

II.1.1.Cytogénétique des avortements spontanés :**II.1.1.1.La relation entre les anomalies chromosomiques et l'âge gestationnel :**

De multiples études ont suggéré qu'entre 50% et 60% des pertes précoces de grossesses sont associées à des anomalies cytogénétiques. L'évaluation de 1205 produits d'avortements spontanés a révélé que 539 d'entre eux (45%) étaient porteurs d'anomalies chromosomiques [Yusuf et Naeem, 1997]. La probabilité de la présence d'une anomalie chromosomique varie en fonction de l'âge gestationnel et de la morphologie du produit avorté. L'évaluation morphologique du produit de conception (examen fœtopathologique) et l'âge du produit de ce dernier en semaine de développement au moment de l'arrêt de la gestation sont plus informatifs que l'âge gestationnel en semaines d'aménorrhée au moment de la fausse couche, car les produits de conception sont souvent retenus *in utero* plusieurs semaines après l'arrêt de la grossesse. Or, plus l'arrêt du développement embryonnaire est précoce, plus il est probable que l'embryon soit porteur d'une anomalie cytogénétique lors d'un avortement spontané. Boué et ses collègues [Boué et *al.*, 1985] ont révélé que près des deux tiers des pertes de moins de 8 SA et près d'un quart de ceux âgés entre 8 et 12 semaines présentaient effectivement un caryotype anormal (**Tableau1**). Plus tôt la grossesse subit un arrêt, plus il est probable qu'il y ait un développement anormal et, par conséquent, un caryotype anormal.

III.1.1.2. L'âge gestationnel :

L'examen des produits d'avortement spontané confirme la plus grande incidence des anomalies du caryotype [Yamamoto et Wantanabe, 1979].

L'identification d'une anomalie dans le développement embryonnaire pourrait avoir un impact considérable sur les grossesses futures ; c'est pour cette raison que les produits avortés doivent être considérés soigneusement dans le cas où la grossesse est interrompue spontanément.

Durant le deuxième trimestre de grossesse, les infections deviennent la première cause de la perte de grossesse. Les caryotypes anormaux sont moins fréquemment retrouvés à mesure que la grossesse avance, car la plupart des grossesses anormales non-viables a déjà fini par une fausse-couche.

Age gestationnel (en SA)	Nbre de cas	Cas anormaux	Taux de cas anormaux
2	23	18	78,0%
3	374	258	69,0%
4	203	125	61,6%
5	139	85	62,2%
6	302	211	69,9%
7	56	27	48,2%
Total semaines 2-7	1097	724	66,0%
8	36	8	22,2%
9	42	6	14,3%
10	14	7	50,0%
11	8	1	12,5%
12	8	3	37,5%
Total semaines 8-12	108	25	23%
Total	1205	749	62,2%

Tableau 2: Age gestationnel et fréquence des anomalies chromosomiques [Boué et *al.*, 1985]

Gaillard et *al.* [Gaillard et *al.*, 1993] ont étudié 462 pertes de grossesses survenues lors du deuxième trimestre ; 78,6% d'entre elles s'étaient récemment produites car leur macération n'était pas étendue. Les infections ascendantes pourraient expliquer 85% de ces arrêts de grossesse.

Des anomalies structurelles ont été observées dans 7,6% des produits avortés, les anomalies cytogénétiques ayant été suspectées ou confirmées dans la moitié de ceux-ci. La majorité des fœtus anormaux ont montré une macération relative à leur long séjour in utero après l'arrêt de grossesse. Encore une fois, ceci confirme que les anomalies cytogénétiques sont associées aux arrêts précoces de grossesses, ce qui n'empêche pas les produits de conception d'être fréquemment retenus un certain temps avant l'avortement spontané à

proprement dit. La macération du fœtus est donc un indicateur indirect significatif de la présence d'une anomalie chromosomique.

La mort fœtale au deuxième trimestre est donc plus souvent le résultat d'autres étiologies : troubles endocriniens, infections, anomalies anatomiques de l'utérus et facteurs immunologiques.

Bien que les anomalies chromosomiques soient plus fréquentes en début de grossesse, elles le sont beaucoup moins à terme. Environ 1 naissance vivante sur 200 présente un caryotype aneuploïde facilement identifié. Le taux de caryotypes déséquilibrés comportant une anomalie structurelle ou numérique est beaucoup plus élevé parmi les mort-nés, se situant entre 5% et 7% en général. Ici aussi, le risque est plus grand parmi les mort-nés macérés, surtout en présence d'anomalies congénitales. Les anomalies cytogénétiques associées aux anomalies congénitales sont également un facteur important dans la mortalité néonatale.

La probabilité de poursuite d'une grossesse avec un caryotype anormal est fonction de l'anomalie cytogénétique impliquée, ainsi que l'étendue de ses effets délétères sur la croissance et le développement du conceptus.

Davidson et Burn [Davidson et Burn, 1990] ont examiné la probabilité d'échecs de grossesses pour différentes anomalies chromosomiques confirmant une perte virtuelle de 100% pour les monosomies autosomiques et les tétraploïdies.

Environ 96,5% des grossesses présentant des trisomies autosomiques ont fini par un échec et plus de 99% des grossesses avec des monosomies X ont échoué, alors que seulement 11% des trisomies sexuelles ont été perdues spontanément.

Les mosaïques et les anomalies de structure montrent quant à elles des taux d'échecs de grossesses intermédiaires de 68,8% et 53,4% respectivement.

Bien que plusieurs rapports parlent de produits de conception tétraploïdes et de monosomies autosomiques quasi-complètes ayant survécu jusqu'au 3^{ème} trimestre, le fait reste extrêmement rare (**Tableau 3**).

Type d'anomalie	Avortements spontanés	Naissances vivantes
Nombre de caryotype réalisés	3353	32521
Trisomies autosomiques	1,10%	00,1%
13	5,58%	0,00%
16	0,84%	0,02%
18	2,00%	0,11%
21	11,81%	0,00%
Autres	21,33%	1,34%
Total trisomies	8,35%	0,01%
Monosomie X	0,33%	0,15%
Trisomies gonosomiques	5,79%	0,00%
Triploïdies	2,39%	0,00%
Tétraploïdies		
% total des anomalies	41,52%	0,60%

Tableau 3 : Pourcentage des anomalies chromosomiques parmi les AS et les naissances vivantes

[Kline et Stein, 1986]

III.1.1.3.Types d'erreur menant à des produits de conception chromosomiques anormaux :

La plupart des anomalies chromosomiques est associée à un mauvais pronostic en début de grossesse ; cependant, les mécanismes sous-jacents menant à un caryotype anormal et le risque de récurrence, varient considérablement selon chaque complément chromosomique anormal impliqué.

De manière générale, la plupart des anomalies chromosomiques rencontrées résulte soit d'une erreur méiotique, soit une erreur mitotique (menant à un mosaïcisme), soit d'une erreur lors de la fécondation, soit de réarrangements structuraux.

Une étude classique menée par Boué et ses collègues [Boué et *al.*, 1976 ; Boué et *al.*, 1975], réalisée sur 1498 produits d'avortements spontanés, a révélé 921 caryotypes anormaux, soit 61,5%. Les événements non-disjonctionnels représentaient 636 cas à eux seuls, avec : 141 monosomies (15,3%), 479 trisomies (52,0%) et 16 doubles trisomies (1,7%). Il y avait également 183 triploïdies (19,9%), 57 tétraploïdies (6,2%) et 10 cas de mosaïcisme (soit 1,1%). Les anomalies de structure quant à elles, ont été révélées dans 35 produits avortés (soit 3,8%). Avec l'utilisation de techniques moléculaires de cytogénétique plus élaborées, comme celles utilisées de nos jours, l'incidence de ces

anomalies aurait été encore plus élevée, des anomalies cryptiques ayant pu passer inaperçues : réarrangements cryptiques, disomies uniparentales, mosaïcismes «tissus spécifiques »... Cependant, l'étude montre clairement que les anomalies cytogénétiques sont présentes dans la majorité des AS précoces.

A. Les erreurs de la méiose :

Durant la méiose, le jeu diploïde parental habituel de 46 chromosomes est réduit au nombre haploïde de 23 chromosomes. Des évènements non-disjonctionnels durant la méiose I ou II, pouvant toucher aussi bien les ovocytes que les spermatozoïdes, peuvent entraîner des produits de conception monosomiques ou trisomiques suite à la formation d'un gamète avec un chromosome en plus ou en moins par rapport au nombre haploïde. A l'exception de la monosomie X complète, il apparaît que les monosomies autosomiques sont létales au début de la gestation et ne sont généralement pas identifiées dans les grossesses évolutives. Les effets du dosage génique ou des échecs de transcription pourraient être des facteurs contribuant à la mortalité élevée des embryons avec des monosomies autosomiques.

D'autre part, les trisomies sont relativement fréquentes et représentent le groupe d'anomalies le plus souvent rencontrée conduisant à une perte de grossesse spontanée. Environ le quart (soit 25%) des caryotypes de produits avortés spontanément sont trisomiques [Simpson, 1986].

Toutes les trisomies autosomiques ont été rapportées dans les différentes études menées à la seule exception du chromosome 1, pour lequel, la trisomie semble létale avant même l'implantation et aurait peu de chances de subsister assez longtemps pour être mise en évidence dans les séries habituelles des AS. La majorité des produits de conception trisomiques, même ceux avec des caryotypes viables chez le nouveau-né, se termine par une fausse-couche.

- **Les trisomies :**

La fréquence des trisomies autosomiques particulières varie selon l'âge gestationnel. A terme, la trisomie 21 (syndrome de Down) est la plus fréquente et est retrouvée dans 1/700 naissances vivantes. Les trisomies 18 (syndrome d'Edward) et 13 (syndrome de Patau) sont observées dans 1/6000-8000 et 1/12000 naissances vivantes respectivement. La trisomie 8 est moins fréquente et les cas observés sont en mosaïque. Cependant, certaines études rapportent des cas d'autres trisomies autosomiques insolites et des monosomies

autosomiques rares observées chez des nouveau-nés. Ces aneuploïdies sont toujours en mosaïque et semblent létales lorsqu'une lignée cellulaire normale est absente.

La répartition des trisomies dans les produits d'avortement spontané est très différente de celle observée au terme des grossesses. Parmi les trisomies observées dans les produits d'AS, la trisomie 16 est la plus commune ; elle représente 31,0% des produits de conception trisomiques et 7,27% de l'ensemble des AS. Elle est suivie par la trisomie 22, révélée dans 11,4% des trisomies et 2,26% des AS. La trisomie 21 arrive à la troisième place des trisomies les plus fréquentes, ce qui représente 10,5% des trisomies et 2,11% des AS [Leridon, 1977] [Simpson, 1986] (**Tableau 4**).

Les doubles trisomies peuvent survenir aussi et sont tout aussi fortement associées à l'âge maternel avancé [Boué et *al.*, 1985].

La majorité des trisomies autosomiques est d'origine maternelle, avec des erreurs lors de la première division de la méiose plus fréquentes que lors de la deuxième division de la méiose, mais ceci varie en fonction du chromosome impliqué. L'examen des ovocytes révèle la présence d'un taux significatif d'anomalies cytogénétiques [Kamiguchi et *al.*, 1993]. C'est l'aneuploïdie qui a été le plus souvent observée, suivie par des anomalies diploïdes et structurales. L'étude cytogénétique des spermatoocytes chez l'homme a également révélé des anomalies dans la gamétogenèse paternelle. Les études rapportées ont utilisé différentes méthodes pour l'obtention d'un caryotype. En particulier, plus récemment, la fluorescence *in situ* par hybridation (FISH) a été utilisée et a permis l'examen d'un plus grand nombre de spermatozoïdes. Cette technique a des limites inhérentes puisqu'elle n'utilise que des sondes spécifiques à des chromosomes particuliers. Seules donc des aneuploïdies ciblées peuvent être détectées. Malgré cela, les données recueillies suggèrent que le taux de non disjonction méiotique des gamètes paternels est relativement constant pour les différents chromosomes étudiés.

Dans l'ensemble, l'âge maternel est le meilleur prédicteur connu des risques de survenue d'évènements non-disjonctionnels, en particulier ceux résultant de la première division de la méiose.

L'association entre l'âge maternel et le syndrome de Down est établie depuis bien longtemps, et le risque d'avortons trisomiques augmente également avec l'avancement de l'âge maternel [Kline et Stein, 1986 ; Hassold, 1986 ; Creasy et *al.*, 1976] (**Tableau 5**).

Chromosome N°	% des trisomies	% d'avortements spontanés
1	1 cas reporté	0
2	4,0	1,11
3	0,9	0,25
4	2,4	0,64
5	0,3	0,04
6	0,9	0,14
7	4,0	0,89
8	4,6	0,79
9	2,3	0,72
10	2,0	0,36
11	0,3	0,04
12	1,2	0,18
13	4,1	1,07
14	4,8	0,82
15	7,4	1,68
16	31,0	7,27
17	0,3	0,18
18	4,6	1,15
19	0,2	0,01
20	2,2	0,61
21	10,5	2,11
22	11,4	2,26

Tableau 4 : Répartition de la fréquence des trisomies individuelles parmi les avortements spontanés trisomiques [Davidson et Burn, 1990 ; Simpson, 1986]

Age maternel (Années)	Nombre de caryotypes réalisés	% de caryotypes anormaux	% de caryotypes trisomiques	% de caryotypes non-trisomiques
20	104	18,3	4,8	13,5
20-24	256	28,5	12,1	16,4
25-29	339	26,3	10,6	15,6
30-34	161	32,3	19,3	13,0
35-39	99	34,3	25,3	9,0
40 +	32	65,6	50,0	15,6

Tableau 5 : Incidence de l'âge maternel sur les trisomies [Creasy et al., 1976]

Les autres trisomies ne semblent pas toutes avoir la même association avec l'âge maternel. Warburton et al. , ont constaté que l'âge associé à la non-disjonction semble avoir un effet plus important sur les chromosomes les plus petits [Warburton et al., 1991].

La prédisposition à la non-disjonction ne peut pas être la même pour tous les chromosomes et le risque de récurrence peut dépendre du chromosome impliqué dans la trisomie, du parent apportant le chromosome supplémentaire et du risque de base associé à l'âge maternel. Quel que soit le risque exact, les couples ayant expérimenté un avortement trisomique seront rassurés par un diagnostic prénatal lors de grossesses ultérieures.

- **L'aneuploïdie des chromosomes sexuels :**

Les aneuploïdies des chromosomes sexuels font partie des anomalies chromosomiques les plus couramment retrouvées, tant dans les produits d'AS que chez les nouveau-nés. L'aneuploïdie la plus fréquente des chromosomes sexuels lors de la conception est de loin la monosomie X (45,X), ce qui représente environ 1-2% des pertes de grossesses reconnues cliniquement. La majorité des produits de conception comportant une monosomie X se terminent par une fausse-couche et seulement moins de 1% de ces grossesses évoluent jusqu'au terme [Davidson et Burn, 1990 ; Hook et Warburton, 1983]. L'incidence du syndrome de Turner est d'environ 1/1000 naissances féminines vivantes. Aucun caryotype 45,Y n'a été reporté et ce n'est pas un constat exceptionnel compte-tenu de la contribution au développement des gènes situés sur le chromosome X.

Les trisomies des chromosomes sexuels : 47,XXY, 47,XYY et 47,XXX sont beaucoup moins fréquentes que les monosomies X dans les échecs spontanés de grossesse, mais leur fréquence à terme est similaire. Chacune de ces trisomies touche environ 1/1000 nouveau-nés du sexe approprié. Les nourrissons atteints de trisomie sexuelle ne sont généralement pas dysmorphiques phénotypiquement et ne sont souvent identifiés que fortuitement lors d'analyses cytogénétiques. En effet, ces états ne sont identifiés que tard au cours de leur vie, lorsque des troubles du développement ou du comportement, une hypofertilité du couple ou, dans le cas des 47,XXY, l'infertilité amènent à poser l'indication d'un bilan cytogénétique. Certaines personnes touchées par ces trisomies peuvent ne jamais être identifiées. Le phénotype « doux » à la naissance semble refléter l'absence de traces des effets délétères durant l'embryogenèse. Cela expliquerait la fréquence relativement faible des trisomies des chromosomes sexuels dans les produits d'AS [Simpson, 1986].

Les grossesses avec monosomie X ont un phénotype considérablement variable et peuvent présenter une dysmorphie marquée.

La plupart de ces grossesses subit un arrêt de croissance embryonnaire précoce et se présente sous forme d'un sac gestationnel vide, ou sous forme d'un petit nodule nécrotique du tissu embryonnaire pendant au bout du cordon ombilical (**Figure 1**).

Un nombre moins important de ces grossesses survit au deuxième trimestre et à ce moment-là, le phénotype est celui d'un fœtus avec une anasarque massif et un hygroma kystique (**Figure 2**). Les anomalies cardiaques et rénales sont souvent bien visibles.

Au cours du troisième trimestre, l'apparence du fœtus peut être similaire à celle observée au 2^{ème} trimestre, avec des hygromas kystiques et des œdèmes dorsaux sur les mains et les pieds, le phénotype classique du syndrome de Turner.

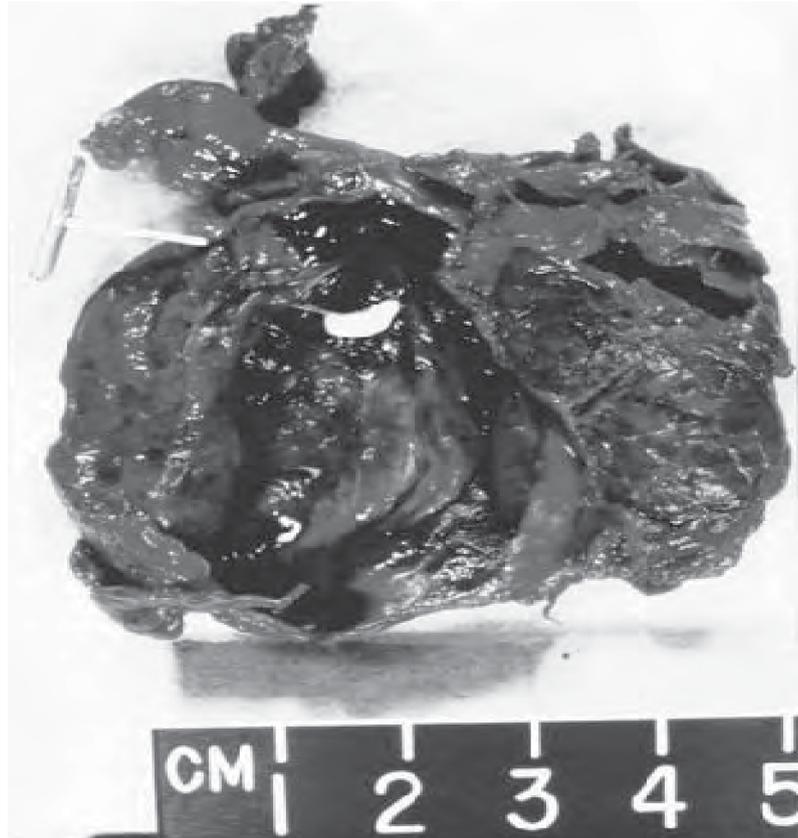


Figure 1 : Sac gestationnel avec un très petit embryon, résultant d'une monosomie X non viable
[Solveig et Pflueger, 2005]

Les nourrissons 45,X pourraient ne pas être reconnus à la naissance également, le phénotype caractéristique n'apparaissant que plus tard dans l'enfance ou l'adolescence avec l'hypogonadisme et la petite taille.

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer la grande variabilité phénotypique. Bien que la plupart des produits de conception 45,X ayant survécu à terme semble avoir un X d'origine maternelle, l'origine parentale de la monosomie ne semble pas influencer sur le phénotype ou la viabilité [Hassold et *al.*, 1988 ; Hassold et *al.*, 1992].

A l'inverse, la survie en début de grossesse dépend de la présence ou non dans certains tissus, d'un second chromosome sexuel, soit un autre X soit un Y. Les produits de conception 45,X non porteurs d'une mosaïque sont peu enclin à survivre, alors qu'une grossesse comportant une mosaïque a une meilleure probabilité de subir une morphogénèse ordonnée au début de la grossesse et une meilleure survie à terme [Held et *al.*, 1992]. Cette deuxième lignée cellulaire pourrait être absente de nombreux tissus et souvent difficile à détecter avec les techniques cytogénétiques de routine, mais peut parfois être identifiée à l'aide de multiples sites d'échantillonnage ou des techniques FISH. Bien que des efforts importants pour l'identification de la deuxième lignée cellulaire ne soient pas justifiés dans l'évaluation de routine d'un produit d'AS portant une monosomie X, ils le sont beaucoup plus dans l'évaluation des patientes atteintes du syndrome de Turner avec une faible suspicion d'un mosaïcisme du chromosome Y, car la présence de gènes provenant du chromosome Y peut exposer la patiente à un risque accru de gonadoblastome, le tissu gonadique, bien que dysgénésique, étant de nature testiculaire et en position ectopique.

Alors que la moyenne d'âge de la mère pour la plupart des produits de conception trisomiques est plus élevée par rapport à la population générale, ce n'est pas le cas pour les monosomies X. Au contraire l'âge moyen de la mère lors de la survenue d'une monosomie est égal ou inférieur à celui de la moyenne d'âge de la reproduction en général [Boué et *al.*, 1985]. De nombreux cas de monosomie X résultant d'une non-disjonction post-zygotique pourraient expliquer la différence dans l'âge maternel entre les grossesses aneuploïdes avec des monosomies X et celles avec des trisomies autosomiques. La non-disjonction mitotique pendant l'embryogenèse semble être un processus différent, ce qui peut ne pas incriminer les effets de l'âge maternel, d'où la conclusion que l'âge de la mère pour la monosomie X ne devrait pas être forcément plus élevé que celui de la moyenne d'âge de reproduction de la population. Les patientes avec antécédent de grossesse avec une monosomie X choisissent souvent de subir une évaluation cytogénétique prénatal pour les grossesses suivantes, mais le risque de récurrence pour les non-disjonctions mitotiques post-zygotiques n'a jamais été établi.

B. Les erreurs de la mitose :

Une mauvaise ségrégation lors de la première division mitotique peut donner lieu à une tétraploïdie. Les conceptus tétraploïdes sont généralement « éliminés » très tôt lors de la grossesse, bien qu'il existe de rares exceptions.

La non-disjonction mitotique se traduit souvent par un mosaïcisme - présence de deux ou plusieurs lignées cellulaires avec une constitution chromosomique différente -. Comme cela a été suggéré pour le syndrome de Turner ; l'aneuploïdie en mosaïque pourrait être mieux tolérée au cours du développement que l'aneuploïdie complète ; il est prouvé que la survie d'un fœtus trisomique à terme pourrait être plus probable s'il y a une lignée de cellules euploïdes est présente dans le placenta.



Figure 2 : Perte de grossesse 45,X au deuxième trimestre, avec hygroma kystique et un œdème généralisé [Solveig et Pflueger, 2005]

Lorsque la non-disjonction se produit très tôt, elle peut entraîner un modèle généralisé de mosaïcisme, tandis que sa survenue plus tard dans la grossesse peut conduire à un mosaïcisme limité à l'un des deux : soit le fœtus soit le placenta. Dans les villosités choriales du tissu placentaire, il peut y avoir des différences caryotypiques entre la préparation directe et la culture. Ceci est le reflet de l'origine embryologique différente du trophoblaste et du mésoblaste extra-embryonnaire.

Le mosaïcisme placentaire confiné est un problème potentiel, même chez le fœtus à caryotype normal. Sa présence a été associée à des niveaux de hCG anormaux [Morssink et

al., 1996] et est de mauvais pronostic quant à l'issue de la grossesse, pouvant entraîner soit un retard de croissance *in utero* (RCIU), soit une mort fœtale *in utero* (MFIU) [Kalousek et Barrett, 1994], soit à un avortement spontané.

Un caryotype fœtal normal n'exclut pas une anomalie cytogénétique dans le placenta pouvant être à l'origine d'une interruption spontanée de la grossesse, ce qui suggère la nécessité d'analyser à la fois le caryotype fœtal et celui des tissus placentaires dans les naissances mortes inexplicables [Kalousek et Barrett, 1994].

La contribution de la cytogénétique dans l'échec des grossesses humaines pourrait donc être encore plus élevée que les estimations fondées sur les premières séries d'études, dans la mesure où ces cas ont été souvent examinés en utilisant des tissus d'une source unique et que certains produits de conception morphologiquement anormaux classés comme euploïdies pourraient en fait avoir été le résultat d'un mosaïcisme ou d'un remaniement cryptique non diagnostiqués.

Des études moléculaires ont montré que les aneuploïdies autosomiques en mosaïque peuvent provenir soit d'erreurs mitotiques post-zygotiques soit d'erreurs méiotiques avec correction post-zygotique avec perte subséquente de l'un des chromosomes surnuméraires conduisant à la production d'une lignée cellulaire euploïde ou bien duplication du chromosome en monosomie à l'origine d'une lignée cellulaire euploïde responsable d'une disomie uniparentale.

La probabilité de survenue de l'un ou de l'autre des mécanismes peut varier en fonction du chromosome impliqué. Robinson et ses collègues suggèrent que les trisomies en mosaïque impliquant les chromosomes 13, 18, 21, et X sont le plus souvent dues à une perte somatique d'un chromosome surnuméraire issu d'une non-disjonction méiotique [Robinson et *al.*, 1995].

D'autre part, la trisomie 8 en mosaïque peut avoir plus de probabilité de survie lorsque la lignée aneuploïde survient tardivement comme le résultat d'une erreur mitotique post-zygotique, dans un produit de conception chromosomiquement normal à l'origine.

Le mosaïcisme placentaire pourrait être un facteur déterminant dans la survie des embryons trisomiques. Des cas de trisomie 13 et 18 qui survivent à terme semblent avoir une lignée de cellules diploïdes dans le cytotrophoblaste [Kalousek et *al.*, 1989; Harrison et *al.*, 1993]. Par contre, le mosaïcisme ne semble pas être à un facteur de survie dans le cas de la trisomie 21, sans doute à cause des effets moins délétères de cette trisomie sur la fonction placentaire [Kalousek et *al.*, 1989].

- **Le chimérisme :**

Une autre cause probable de la présence de plus d'une lignée cellulaire chez un fœtus est le chimérisme. La chimère dans la mythologie classique était une créature avec la tête d'un lion, le corps d'une chèvre et la queue d'un serpent. Bien que le composé chimérique mythique de plusieurs espèces sans lien particulier est purement fantaisiste, des individus avec des cellules provenant de deux ovules fécondées séparément sont connus dans l'espèce humaine et d'autres mammifères. La fusion post-zygotique de jumeaux dizygotes donne un seul individu chimérique. Le chimérisme peut expliquer la présence de deux lignées cellulaires chez un même individu, où l'une d'elles peut être dérivée de l'autre. C'est le mécanisme sous-jacent le plus probable pouvant expliquer l'hermaphrodisme 46,XX/46,XY et pourrait également expliquer le fœtus 45,X/69,XXY décrit par Betts et ses collègues [Betts et *al.*, 1989]. Un certain nombre de mosaïques diploïdes/triploïdes a également été rapporté [Blackburn et *al.*, 1982]. Certaines d'entre elles sont probablement des chimères, mais la dispermie est un autre mécanisme envisageable, dans lequel un pronucléus maternel haploïde unique est fécondé par un spermatozoïde haploïde de la manière habituelle d'où la lignée diploïde. Une seconde fécondation se produit alors dans l'une de cellules filles après la première division cellulaire, conduisant à la lignée cellulaire triploïde [Dewald et *al.*, 1975].

C. Les erreurs de fécondation :

Des erreurs survenant lors de la fécondation peuvent conduire à des grossesses avec un lot chromosomique supplémentaire complet (triploïdie) et des grossesses diploïdes anormales dans lesquelles les deux lots chromosomiques proviennent d'un seul et même parent (grossesse molaire ou môle hydatiforme). Etant donné que les triploïdies d'origine paternelle peuvent provoquer des changements dans les villosités chorales ressemblant aux môles hydatiforme, elles sont parfois appelées « môles partielles ». Les grossesses molaires complètes et partielles ont grandement contribué à faire progresser notre compréhension de l'empreinte génomique et le rôle qu'elle joue dans le développement embryonnaire et la cancérogenèse. Les empreintes génomiques peuvent avoir des fonctions non seulement dans l'expression des gènes précoces de l'embryogenèse, mais pourraient jouer également un rôle important dans le contrôle de la perte chromosomique plus tard dans la vie et contribuer ainsi à réduire le risque de cancer [Thomas, 1995].

Un jeu chromosomique haploïde supplémentaire d'origine maternel (digynie) ou paternel (diandrie) peut entraîner un embryon triploïde. Un caryotype à 69,XYY est

indicatif de l'origine paternelle du lot chromosomique supplémentaire, tandis qu'un caryotype 69,XXX ou 69,XXY, peuvent être le résultat soit d'une digynie soit d'une diandrie. Différents évènements peuvent conduire à la présence d'un jeu chromosomique supplémentaire. Les triploïdies d'origine paternelle résultent habituellement de la fécondation d'un ovule haploïde par deux spermatozoïdes (dispermie), ou de la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde diploïde.

La fécondation par un spermatozoïde haploïde avec une endo-duplication ultérieure du lot chromosomique paternel est un mécanisme également probable. Ce dernier peut entraîner une iso-disomie pour tous les chromosomes paternels comme le ferait une erreur lors de la méiose II [Neuber et *al.*, 1993]. D'autre part, les triploïdies ayant une origine maternelle ont le plus souvent pour origine une erreur lors de la méiose maternelle I ou II, donnant ainsi un œuf diploïde ; mais d'autres mécanismes, notamment la fécondation d'un ovocyte primaire (ovocyte II), ont également été suggérés [O'Neill et Kaufmann, 1987]. Dans l'ensemble, les deux triploïdies représentent 1 à 3% des grossesses reconnues cliniquement et 15 à 20% des AS chromosomiquement anormaux, plaçant ainsi la triploïdie parmi les aberrations chromosomiques les plus fréquentes dans la conception humaine [Jacobs et *al.*, 1978 ; Lindor et *al.*, 1992].

Bien que le résultat d'une diandrie ou d'une digynie soit le même avec 69 chromosomes, le phénotype des triploïdies d'origine paternelle est totalement différent de celles d'origine maternelle. L'observation microscopique de coupes faites dans des embryons triploïdes issus de diandries montre un mélange de villosités hydropiques et de villosités normales plus petites. La plupart de ces embryons se présente sous l'aspect d'un sac vide dans le premier trimestre. Ceux qui survivent dans le deuxième trimestre présentent un rapport poids fœtal/placenta anormal, avec un placenta très grand et des villosités choriales grossièrement hydropiques (**Figure 3**). Les taux d'alpha-fœtoprotéine (AFP) et d'hCG sont typiquement élevés.

Les fœtus porteurs d'une triploïdie d'origine maternelle présentent un retard de croissance avec un crâne disproportionné. Le placenta est petit et présente une apparence fibrotique, et la dégénérescence hydropique constatée dans la triploïdie paternelle est absente (**Figure 4**). Contrairement aux triploïdies paternelles, les taux d'AFP et d'hCG sont faibles.

Le risque de grossesse triploïde semble diminuer avec l'avancement de l'âge maternel. La baisse de survie des produits de conceptions anormaux chez les femmes âgées avant la découverte de la grossesse est une explication possible. Les patientes plus jeunes semblent

plus susceptibles de présenter des triploïdies paternelles, alors que la « mère triploïde » est plus fréquente chez les patientes âgées.

La môle complète est une grossesse caractérisée par une hypertrophie placentaire marquée par la présence de grandes villosités kystiques hydropiques. Le fœtus est absent et les villosités ne montrent pas de vascularisation fœtale.

Le trophoblaste sur les villosités montre divers degrés de prolifération. Les patientes présentent généralement des niveaux particulièrement élevés de hCG. En dépit de leur phénotype nettement anormal, les grossesses molaires présentent généralement un caryotype diploïde de 46,XX dans environ 90% des cas, et 46,XY dans 6 à 10% des cas [Berkovitz et *al.*, 1991] ; cependant, les deux jeux chromosomiques haploïdes sont d'origine paternelle. Les mécanismes sont probablement similaires à ceux de la triploïdie paternelle, mais avec la fécondation d'un ovule « vide » par deux spermatozoïdes. La duplication des chromosomes d'un spermatozoïde haploïde semble plus fréquente et pourrait expliquer la prépondérance des caryotypes 46,XX, alors que la fécondation par un spermatozoïde diploïde pourrait donner soit un 46,XX, soit un 46,XY. Le caryotype 46,YY semble être incompatible avec le développement embryonnaire ou fœtal [Lindor et *al.*, 1992].

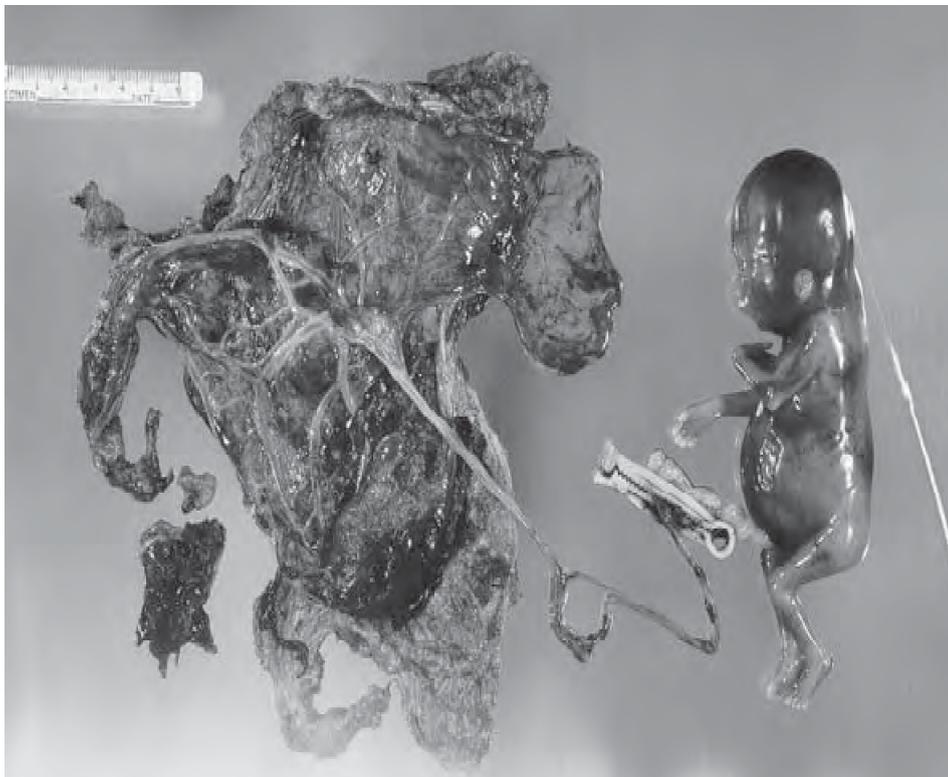


Figure 3 : Triploïdie paternelle avec un caryotype 69,XXY. Placenta très volumineux par rapport à la taille du fœtus [Solveig et Pflueger, 2005]

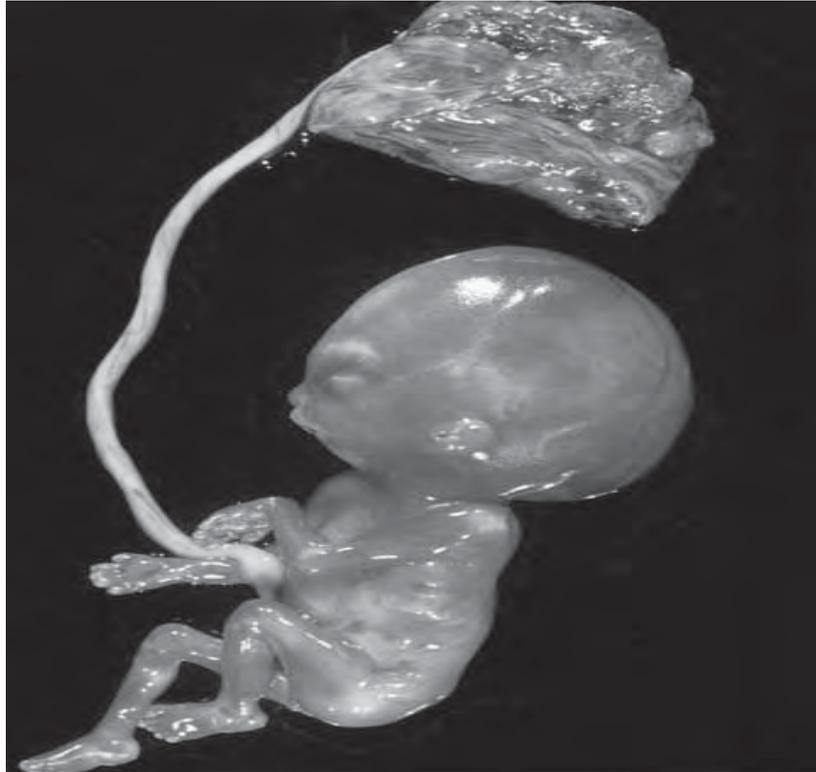


Figure4 : Triploïdie maternelle avec un placenta très petit et un crâne disproportionné en comparaison à la taille du fœtus [Solveig et Pflueger, 2005]

Les môles hydatiformes peuvent potentiellement subir une transformation maligne, donnant lieu à des choriocarcinomes. Pour cette raison, le diagnostic de ces dernières est essentiel. Les produits de conception triploïdes ne semblent pas avoir le même potentiel malin [Benirschke et Kaufmann, 1995 ; Szluman, 1984]. Le mécanisme de la transformation maligne de la môle complète semble être dû au phénomène d’empreinte génomique par l’expression de gènes qui devraient être réprimés normalement [Mutter et *al.*, 1993 ; Ariel et *al.*, 1994]. L’empreinte génomique a également été suggérée comme une explication plausible aux différences phénotypiques entre les triploïdies paternelles et maternelles [McFadden et *al.*, 1993].

Les deux môles complète et partielle semblent être le résultat d’erreurs aléatoires au moment de la fécondation. Dans ce cas, il n’existe pas d’impact significatif sur le risque d’autres anomalies chromosomiques dans les grossesses ultérieures [Berkowitz et *al.*, 1995]. La surveillance échographique est cependant proposée au début des grossesses suivantes afin d’exclure une môle récurrente et une évaluation post-natal des taux d’hCG est recommandée afin de prévenir une maladie trophoblastique persistantes [Berkowitz et *al.*, 1995]. Plusieurs études suggèrent une prédisposition familiale aux grossesses môleaires

[LaVecchia et *al.*, 1982 ; Kircheisen et *al.*, 1991], mais l'importance de ces antécédents familiaux n'a pas encore été établie avec certitude.

D. Les réarrangements structuraux :

Les anomalies de structure sont moins fréquentes que les aneuploïdies chromosomiques dans les pertes de grossesses. Environ 1 à 2% des grossesses montrent des réarrangements structuraux. Jacobs a étudié 5726 caryotypes d'AS, révélant 0,28% de réarrangements équilibrés et 1,54% de réarrangements déséquilibrés [Jacobs, 1981]. Les réarrangements équilibrés comprennent essentiellement les translocations robertsonniennes, les translocations réciproques et les inversions. Dewald et Michels ont révélé dans une revue de la littérature la présence d'une translocation chez 2,1% des couples ayant des ASR [Dewald et Michels, 1986]. Ces translocations ont été retrouvées chez 1,7% de patients de sexe masculin et 2,6% des patientes de sexe féminin. Ceci est comparable à une incidence de 1/500 (0,2%) chez les nouveau-nés [Jacobs, 1977]. La fréquence des réarrangements équilibrés dans les produits d'AS n'est pas sensiblement augmentée par rapport à celle observée dans les naissances vivantes ; cela n'est pas surprenant car les réarrangements équilibrés ne sont généralement pas associées à des altérations phénotypiques et sont compatibles avec le développement embryonnaire et fœtal.

Les réarrangements déséquilibrés les plus fréquents résultent d'une transmission déséquilibrée de translocations robertsonniennes. Celles-ci peuvent survenir « *de novo* » ou être d'origine familiale. L'incidence des translocations robertsonniennes déséquilibrées est beaucoup plus élevée dans les produits d'AS que dans les naissances vivantes, ce qui reflète la mort *in utero* de ces produits de conception. Les autres réarrangements structuraux déséquilibrés observés dans les produits d'AS sont des chromosomes dérivés avec du matériel supplémentaire ou manquant, les chromosomes en anneaux et les chromosomes marqueurs surnuméraires. Les réarrangements « *de novo* » sont le plus souvent d'origine paternelle [Olson et Magenis, 1988]. L'analyse du sperme humain a révélé une variabilité considérable entre les donneurs (de 0% à 17,8%), avec une moyenne de 9,3% de spermatozoïdes anormaux, présentant principalement des cassures, des fragments et des petites délétions dans la plupart des réarrangements.

Bien que de nombreux réarrangements structuraux soient « *de novo* », la majorité semble être familiale. De nombreuses études sur des patients qui ont subi des pertes de grossesses récurrentes ont montré que ces personnes ont un risque accru d'être porteurs d'un réarrangement chromosomique équilibré. L'analyse cytogénétique et le conseil

génétiq ue sont indiqués pour les couples avec deux ou plusieurs échecs de grossesses. Les porteurs de réarrangements équilibrés peuvent produire à la fois des gamètes équilibrés et déséquilibrés ; une combinaison de conceptions normales et anormales est fréquemment observée chez ces couples. Les réarrangements sont plus susceptibles donc d'être retrouvés chez des couples ayant vécu des avortements et des naissances vivantes que chez ceux ayant vécu uniquement des AS [Simpson et *al.*, 1989 ; Gadow et *al.*, 1991].

Campana et ses collègues notent que les chromosomes et points de cassure impliqués dans les réarrangements structuraux ne sont pas aléatoires [Campana et *al.*, 1986]. La survie d'une grossesse avec un complément chromosomique déséquilibré dépend du chromosome impliqué et du ou des segments, en particulier leur taille, en cause. Braekeleer et Dao ont trouvé des translocations ou des inversions chez 2,6% des femmes ayant des antécédents d'échecs de reproduction contre 1,4% chez les hommes et Gadow et *al.* ont constaté que 3,5% des femmes et 1,7% des hommes ayant subi des pertes récurrentes de grossesse avaient des translocations équilibrées [Braekeller et Dao, 1990 ; Gadow et *al.*, 1991]. Les deux rapports suggèrent que le risque d'hypofertilité chez les hommes porteurs est important. Les réarrangements chromosomiques semblent être associés à un risque accru d'hypofertilité, notamment en raison des échecs de grossesse à répétition. Le mauvais pronostic d'une grossesse lorsque l'un des parents est porteur d'un réarrangement structural varie considérablement en fonction du type et de la taille du réarrangement et du/des chromosome(s) impliqué(s). Le conseil génétique doit donc être individualisé pour chaque famille, avec une attention particulière à la viabilité potentielle de tous les produits méiotiques déséquilibrés. En règle générale, il a été suggéré qu'un porteur masculin présente un risque moindre pour une descendance anormale qu'une femme porteuse, mais cette généralisation n'est pas applicable dans tous les cas [Petrosky et Borgaonkar, 1984]. Par contre, l'obtention d'une grossesse est plus « facile » lorsque c'est la femme qui est porteuse du remaniement.

La cause de l'échec de la grossesse chez les patients présentant des translocations équilibrées est très probablement la production de gamètes déséquilibrés à la suite d'une ségrégation anormale pendant la méiose, sans minimiser l'entrave à la gamétogenèse et à la grossesse résultant du remaniement. Les inversions péricentriques peuvent aussi conduire à des gamètes déséquilibrés, avec duplication d'une extrémité et perte de l'autre extrémité en cas de crossing-over dans la boucle d'appariement non compensé avant la sortie de la boucle [Gardner et Sutherland, 1996].

II.2. Les pertes de grossesses chromosomiquement normales :

L'identification d'un avortement spontané cytogénétiquement normal pourrait être plus intéressante cliniquement que l'identification d'une gestation aberrante. Le risque d'ASR est plus élevé lorsque la perte de grossesse antérieure est chromosomiquement normale [Cowchock et *al.*, 1993]. Boué et ses collègues ont constaté un risque de répétition de la perte de 23% après une fausse couche cytogénétiquement normale, contre 16,5% à la suite d'un AS chromosomiquement anormal [Boué et *al.*, 1985]. Morton et ses collègues ont constaté que chez les femmes de moins de 30 ans, le risque de fausse-couche était de 22,7% suite à un AS avec un caryotype normal, 15,4% suite à une trisomie et 17% suite à une autre anomalie chromosomique. Chez les femmes de plus de 30 ans, ces risques étaient respectivement de 25,1%, 24,7%, et 20,3% [Morton et *al.*, 1987]. L'étude cytogénétique des ASR suggère que les patientes qui souffrent d'un AS chromosomiquement normal sont plus susceptibles de présenter des caryotypes normaux dans les pertes ultérieures [Hassold, 1980 ; Warburton et *al.*, 1987].

Hormis l'existence d'un remaniement chromosomique cryptique notamment équilibré, non visible au caryotype, chez l'un des deux parents, un AS chromosomiquement normal peut avoir différentes autres explications :

A. Les facteurs anatomiques :

Ils sont peu fréquents. La cavité utérine peut avoir des particularités qui font qu'elle ne favorise pas le développement de l'œuf. La prévalence des malformations utérines dans la population générale est estimée entre 0,1 et 10% [Maneschi et *al.*, 1995]. L'enquête étiologique dans les avortements spontanés à répétition trouve une malformation utérine dans 15 à 30% des cas [Gilchrist et *al.*, 1991]. Malgré de nombreuses controverses concernant la responsabilité des malformations, les travaux les plus récents semblent confirmer l'association causale. Le septum utérin est la malformation utérine la plus souvent associée aux avortements spontanés. Toutefois, d'autres pathologies, telles que le fibrome sous-muqueux et les synéchies intra-utérines, peuvent aussi les provoquer. La résonance magnétique ou l'échographie 3-D est nécessaire pour faire la différence entre le septum utérin et d'autres malformations utérines non associées aux AS. L'hystérocopie interventionnelle permet dans certains cas de corriger le problème.

B. Les facteurs immunologiques :

La cause des ASR restant inconnue pour 40 à 60% des couples, des facteurs immunologiques ont été retenus comme cause probable, sans pour autant qu'une preuve directe de leur implication n'ait été apportée. Il est probable que la cause immunologique puisse être autoimmune ou alloimmune.

- **Autoimmune** : Le syndrome antiphospholipide est associé aux ASR. Dix pour cent des patientes avec des anticorps antiphospholipides présenteront des pertes fœtales récurrentes. Il s'agit de pertes fœtales après 10 SA. Il n'y a pas de consensus en ce qui concerne l'association du syndrome anti phospholipide et les pertes fœtales avant 10 semaines. Les deux tests les plus souvent utilisés pour le diagnostic sont l'activité anticoagulante lupique et les anticorps anticardiolipines. Si le test se révèle anormal et qu'il y a eu présence d'évènements lors d'une grossesse antérieure, cela guidera vers un traitement anticoagulant.
- **Alloimmune** : Plusieurs hypothèses suggèrent une anomalie du blastocyste ou de la régularisation de la croissance placentaire. Les traitements immunologiques n'ont démontré aucune amélioration dans la prévention des ASR. Quelques études semblent proposer que le traitement avec de la progestérone aurait un effet de régulation immunitaire.

C. Les facteurs endocriniens :

De toutes les étiologies proposées pour expliquer les avortements à répétition, les causes endocriniennes sont les plus controversées, car l'indiscutable relation de cause à effet n'est pas établie. Les éventuelles anomalies hormonales retenues sont : les insuffisances lutéales, le diabète sucré, les maladies thyroïdiennes, les ovaires polykystiques et l'hypersécrétion de LH (Luteinizing Hormone).

D. Les facteurs infectieux :

Plusieurs agents infectieux peuvent induire des avortements sporadiques (Cytomégalo virus, virus, Herpes simplex, virus de la rubéole, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, Mycoplasma hominis, Ureaplasma hominis...) [Summers, 1994]. Plusieurs conditions doivent être remplies pour retenir la responsabilité d'un agent infectieux dans les avortements spontanés à répétition : longue persistance ; infestation peu

symptomatique pour échapper au diagnostic et au traitement ; accès au fœtus soit pour l'infecter, soit pour entretenir une réponse inflammatoire. Peu d'agents infectieux répondent à ces exigences. L'intérêt s'est récemment porté sur les infections vaginales qui pourraient intervenir dans les avortements tardifs et les accouchements prématurés. Etudiant les anticorps anti-Chlamydia trachomatis, deux études n'ont pas objectivé de différence chez des femmes témoins et des femmes présentant des avortements spontanés à répétition [Vinatier et *al.*, 1998]. Devant l'absence de preuves de responsabilité, l'efficacité des traitements anti-infectieux reste soumise à évaluation et ne seront prescrits que dans des études prospectives contrôlées.

E. Les facteurs masculins :

Les facteurs masculins sont rarement évoqués dans les avortements spontanés à répétition. Pourtant les études animales ont montré que le mâle pouvait intervenir dans leur survenue, alors que les paramètres du sperme semblent normaux. Les mâles avec une morphologie anormale significative et persistante du sperme (formes anormales) peuvent engendrer un nombre plus élevé d'embryons génétiquement anormaux. Cependant, plusieurs travaux ont montré l'absence de corrélation entre la numération des spermatozoïdes, le pourcentage de formes anormales et la probabilité d'un avortement. Le pourcentage de spermatozoïdes aneuploïdes augmente avec l'âge, atteignant 13% chez les hommes de plus de 44 ans [Rosenbuch et Slerzik, 1991]. Le pourcentage des spermatozoïdes aneuploïques ne semble pas être augmenté dans les avortements spontanés à répétition [Sbracia et *al.*, 1996]. La concentration spermatique en leucocytes et lymphocytes T ne permet pas d'identifier un groupe d'hommes à risque d'ASR [Hill et *al.*, 1994]. Un travail objective une anomalie du spermatozoïde, à savoir une résistance diminuée au milieu hypo-osmotique, qui serait plus fréquente chez les hommes en cas d'avortements spontanés à répétition. Cette anomalie pourrait traduire un défaut d'activation génique empêchant l'apparition de protéines d'origine paternelle identifiées dans l'embryon avant l'implantation [Buckett et *al.*, 1997]. Le spermogramme peut objectiver une oligoasthénotéatospermie, associée avec une fréquence d'avortements spontanés anormalement élevée. Ce sont la téatospermie et surtout la polyzoospermie qui paraissent en cause.

F. Les facteurs hématologiques :

Depuis longtemps les cliniciens, sans en apporter la preuve, pensent qu'un certain nombre d'avortements spontanés est dû à une perturbation du lit placentaire. L'hypothèse est que des micros thromboses des vaisseaux placentaires entraînent des infarctus placentaires multiples qui, retentissant sur le développement embryonnaire, pourraient induire un avortement. Certaines maladies congénitales de la coagulation seraient responsables de près de 10% des avortements chez des patientes ayant des antécédents thromboemboliques. Ces maladies thrombotiques héréditaires, baptisées « thrombophilie familiale », sont dues à une anomalie des gènes codant certaines protéines de la coagulation impliquées dans la cascade de l'antithrombine III et la protéine C. Les déficits en antithrombine III, protéine C et protéine S sont des maladies transmises sur un mode autosomique dominant. Les formes homozygotes sont souvent létales en période néonatale. Les sujets hétérozygotes présentent une tendance à faire des accidents thromboemboliques qui s'accroît avec l'âge. Une mutation du gène du facteur V entraînant une résistance à la protéine C activée a été mise en évidence [Vinatier et *al.*, 1998]. Cette mutation, transmise sur le mode autosomique dominant, a été baptisée « facteur V de Leyden ». Contrairement aux autres thrombophilies familiales, celle-ci est fréquente avec une incidence de 2-7%. Plusieurs travaux ont examiné l'éventuel lien entre cette mutation et la survenue des avortements spontanés à répétition. Toujours est-il que les thrombophilies familiales sont une cause émergente des avortements spontanés à répétition, dont l'importance reste à déterminer.

G. L'environnement :

Le tabagisme et l'alcoolisme maternels pourraient avoir un rôle dans les avortements spontanés à répétition. Les champs magnétiques (écran vidéo, couverture et matelas chauffants, wifi, téléphones portables...) ont été accusés sans preuve [Schnorr et *al.*, 1991]. Des expositions à certains polluants (gaz anesthésiques, formaldéhyde, plomb, oxyde d'éthylène...) ont été impliquées dans des avortements sporadiques. Le sélénium, élément essentiel à la fonction de l'enzyme glutathion peroxydase, protecteur de l'oxydation, pourrait faire défaut dans certains cas d'avortements spontanés à répétition.

H. Les facteurs psychologiques :

Les facteurs psychologiques étaient considérés comme fondamentaux dans l'étiologie des avortements spontanés à répétition. Plusieurs auteurs ont décrit une personnalité type de la patiente. Ces patientes ont été décrites comme étant tendues, ayant besoin d'attention ; elles n'auraient ni psychose ni névrose, mais auraient dans 19% des cas des troubles de la personnalité [Berle et Javert, 1959]. Ces femmes auraient en commun de répondre somatiquement à certaines situations psychiques (nausées, vomissements, céphalées, colite...). Pour ces femmes qui ne se sentent pas capables d'agir de façon mature, la grossesse est un trop grand stress auquel elles répondent corporellement par des contractions, des saignements et des avortements.

Toutes ces descriptions de profils psychologiques ont été réalisées après la série d'avortements. Ces traits de personnalité sont fortement imprégnés par l'expérience vécue.

Ces publications anciennes, anecdotiques et non contrôlées sont peu convaincantes pour retenir les causes psychologiques des avortements spontanés.

En conclusion, l'origine chromosomique des avortements spontanés, notamment à répétition, est de très loin la plus fréquente, bien que sous-estimée en raison du grand nombre de remaniements cryptiques non diagnostiqués par le caryotype.

Aussi, la cytogénétique est au premier rang des examens complémentaires à demander en cas d'avortement spontané, en particulier à répétition.

Chapitre III

Introduction :

Le caryotype présente une très bonne sensibilité en ce qui concerne le dépistage des trisomies autosomiques (13, 18 et 21) et des aneuploïdies affectant les chromosomes sexuels, lesquelles représentent la plupart des assortiments chromosomiques fœtaux anormaux [Rickman et *al.*, 2006]. De plus, le caryotype complet présente l'avantage de permettre le dépistage d'autres aberrations chromosomiques, tant numériques (triploïdie et chromosomes excédentaires anormaux sur le plan structural) que structurales (délétions, translocations, inversions et insertions), selon une résolution d'environ 10 millions de paires de bases (10 Mb) d'ADN.

Le caryotype présente néanmoins un certain nombre de limites [Schaeffer et *al.*, 2004], en raison du temps requis pour la collecte et la mise en culture des cellules, ainsi que du processus d'analyse exigeant en main-d'œuvre avec l'exécution d'un caryotype complet qui nécessite environ de 7 à 14 jours.

Des efforts considérables ont donc été déployés pour élaborer de solides techniques de biologie moléculaire qui ne nécessitent pas une mise en culture avant l'analyse et se prêtent à l'automatisation, permettant ainsi l'obtention de résultats plus rapidement et à moindre coût.

I. Spécimens utilisés pour les études cytogénétiques :

Bien que les études cytogénétiques puissent être très utiles dans le suivi des patients ayant des ASR, les caryotypes fœtaux sont rarement effectués. Cowchock et ses collègues ont rapporté un taux de succès de 84% dans une série de 100 échantillons, montrant que l'analyse des chromosomes est effectivement réalisable dans la plupart des spécimens [Cowchock et *al.*, 1993]. Les villosités choriales sont souvent le tissu de choix, tandis que les biopsies de peau prélevées sur le fœtus décédé sont associées à un taux d'échec élevé.

Tel que mentionné précédemment, lors des AS, il est fréquent que le tissu soit retenu dans l'utérus pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines après la mort de l'embryon ou du fœtus. Pour cette raison, le tissu fœtal est souvent autolysé et il est peu probable qu'il puisse être exploité dans le cadre de méthodes de culture standards. Les chondrocytes semblent survivre plus longtemps que la peau et la plupart des tissus mous après la mort du fœtus et pourraient augmenter les chances de succès de la culture cellulaire [Gelman-Kohan et *al.*, 1996]. D'autre part, les tissus placentaires restent souvent vivants plus

longtemps, car les substances nécessaires à leur survie leur sont fournies par le contact avec le sang maternel. Idéalement, les deux : fœtus et placenta doivent être utilisés. L'avantage du tissu fœtal est qu'il y a peu de risques d'une contamination par des cellules maternelles, cependant, si le fœtus est macéré, la réussite de la culture ne devrait pas être espérée. Le tissu placentaire pousse généralement bien, mais il existe un grand risque de contamination par les cellules maternelles. Ce risque est réduit si le technicien a une bonne connaissance en histologie et dans l'identification du placenta et des villosités choriales. Toutefois, si les cellules maternelles sont présentes dans l'échantillon, la trypsinisation des cellules visant à activer la pousse cellulaire lorsque celle-ci est lente, semble augmenter le risque de prolifération de cellules maternelles. Une sélection soigneuse des tissus et un lavage de ces derniers afin d'éliminer les cellules maternelles pourrait éventuellement réduire le risque de contamination par ces dernières [Lathi et Milki, 2002].

II. Méthodes de Dépistage Rapide de l'Aneuploïdie (DRA) :

A l'heure actuelle, deux méthodes de DRA ont été confirmées en vue d'une utilisation pour l'analyse des produits d'avortements spontanés, généralement à titre de méthodes d'appoint plutôt qu'en remplacement du caryotype : la FISH et QF-PCR. La MLPA est une technologie plus récente ; elle fait toujours l'objet de recherches en ce qui a trait à son utilisation dans le cadre de la recherche sur les AS.

II.1. Fluorescence In Situ par Hybridation (FISH) :

La technique de fluorescence *in situ* par hybridation comporte trois étapes. La première consiste en une dénaturation de l'ADN de la cible chromosomique et de l'ADN de la sonde si cette dernière est sous forme double brin. La sonde est ensuite hybridée sur l'ADN cible. La troisième étape correspond à la révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte et à la contre-coloration du support, c'est-à-dire les chromosomes ou les noyaux interphasiques. La sonde hybridée avec la cible est révélée par un signal fluorescent [Muleris et al., 1996; Wilkinson, 1994].

Les résultats sont étudiés avec un photomicroscope à épifluorescence équipé de filtres spécifiques des différents fluorochromes et éventuellement d'un analyseur d'images. Il est ainsi possible, en analysant les signaux fluorescents, de déterminer la présence, la localisation et le nombre de copies d'une séquence cible et de détecter les remaniements de nombre ou de structure (**Figure 4**).

II.1.1. Les cibles :

Il existe une seule cible, l'ADN génomique, qui prend deux aspects majeurs : celui de chromosomes métaphasiques et celui de domaines chromosomiques dans les noyaux interphasiques. Les métaphases sont obtenues selon les protocoles standards de cytogénétique conventionnelle nécessitant une étape préalable de culture cellulaire.

La fluorescence *in situ* par hybridation sur noyaux interphasiques permet l'analyse rapide d'un grand nombre de cellules en évitant l'étape de culture préalable, ce qui permet des diagnostics directs avec des délais de réponses très courts.

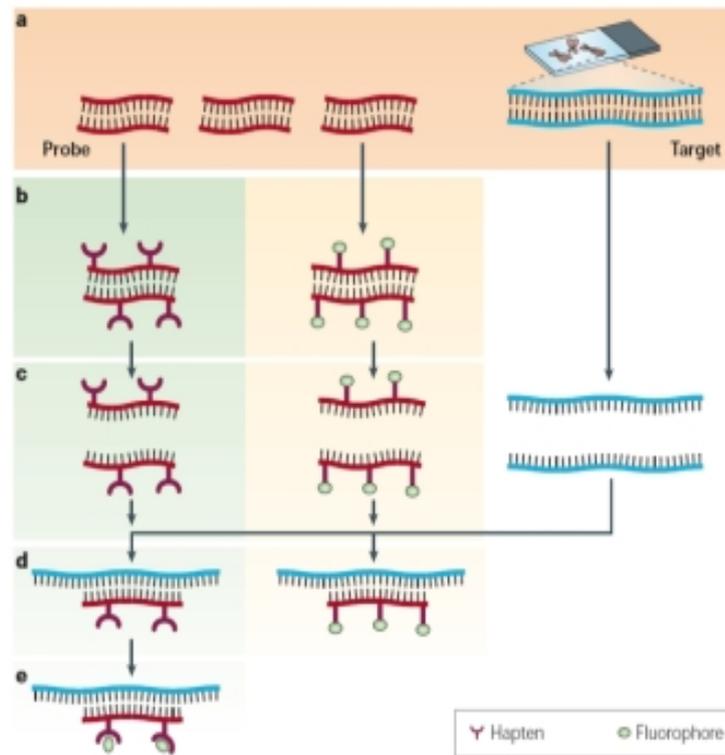


Figure 4 : Principe de la FISH sonde marquée par *Nick Translation*, hybridation *in situ* avec l'ADN dénaturé, traitement avec des anticorps fluorescents pour localiser le gène d'intérêt au microscope à épifluorescence [Muleris et al., 1996]

Il est possible de déterminer les anomalies de nombre en quantifiant le nombre des copies d'un chromosome donné, d'explorer les aneuploïdies en mosaïque aussi bien au niveau constitutionnel que somatique acquis au cours des processus tumoraux, mais également de mettre en évidence certains remaniements chromosomiques acquis dont les points de cassure clonés ont été utilisés pour produire des sondes.

Aux fins du DRA, les sondes utilisées sont propres aux chromosomes 13, 18, 21, X et Y. Les échantillons sont analysés au moyen d'un microscope; le nombre de signaux fluorescents par cellule indique le nombre de copies du chromosome ciblé. La pratique standard est d'examiner 100 noyaux pour écarter la possibilité de mosaïcisme à un niveau supérieur à 10 % à 15 % (soit à un niveau semblable à celui d'un caryotype complet).

La FISH est / peut également être utilisée aux fins du diagnostic ciblé de plusieurs microremaniements chromosomiques courants qui sont associées à des anomalies fœtales structurales (tel le syndrome de Di Georges, microdélétion 22q11 associé à des anomalies cardiaques) ou qui sont recherchés lorsque les parents ont déjà eu un enfant présentant un microremaniement particulier.

II.1.2. Les sondes :

Les sondes peuvent être utilisées sur de l'ADN ou de l'ARN (sondes nucléiques). Plusieurs types de sondes sont disponibles pour la détection des remaniements chromosomiques.

- Centromérique : permet de mettre en évidence les centromères des chromosomes. Sonde avec une séquence répétée satellite.
- Chromosomique (ou chromosome spécifique): permet de mettre en évidence les chromosomes individuellement par processus "peinture chromosomique".
- Locus spécifiques : permet de mettre en évidence un ou plusieurs gènes particuliers (**Figure 5**).

Pour permettre leur détection spécifique, les sondes sont marquées soit par des procédés enzymatiques par introduction d'haptène (biotine, digoxigénine), soit par procédés chimiques. Actuellement, les sondes utilisées sont préalablement couplées à des fluorochromes.

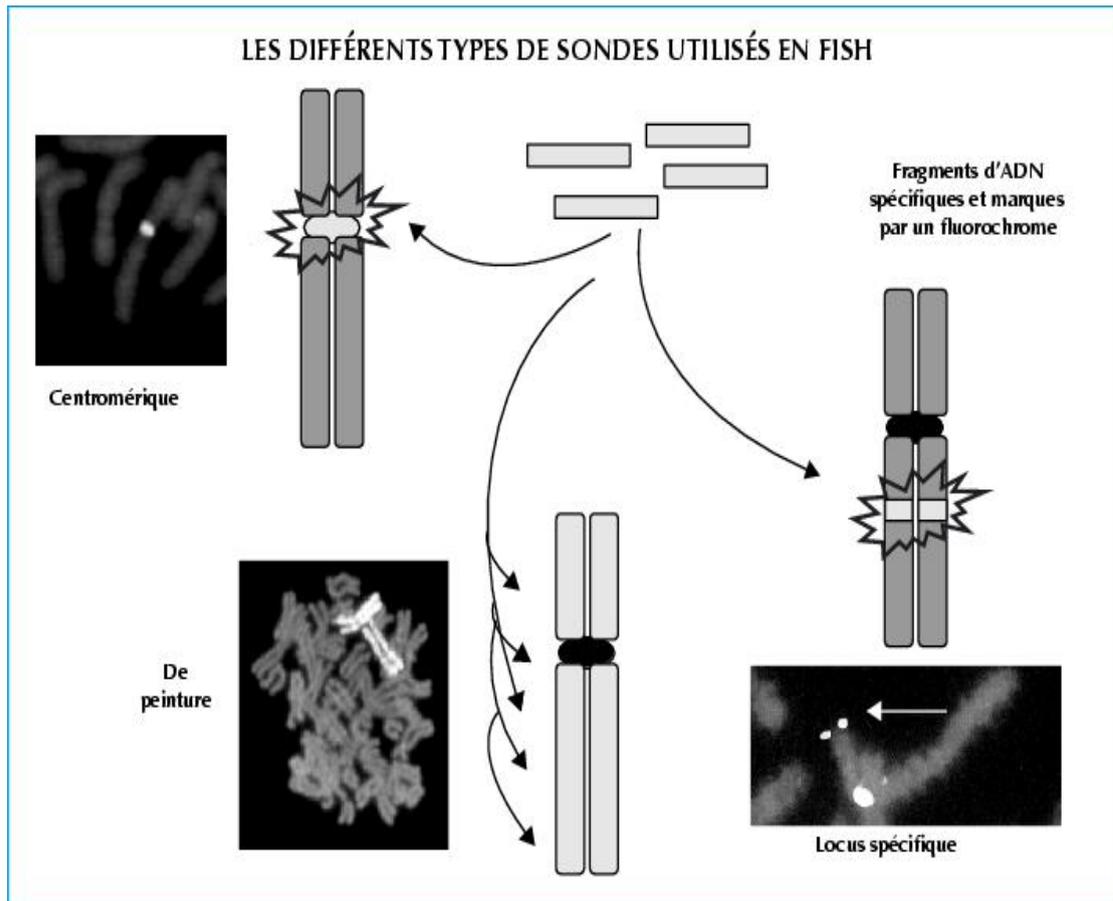


Figure 5 : Les différentes sondes utilisées en FISH [Lemieux et al., 1994]

III.2. Amplification en chaîne par polymérase fluorescente quantitative (QF-PCR) :

La QF-PCR est une méthode récente qui peut être utilisée pour déterminer le nombre de copies d'une séquence d'ADN [Mann et al., 2004 ; Schmidt et al., 2000]. La QF-PCR consiste en une PCR en multiplex couplée à une électrophorèse capillaire. À partir d'ADN extrait de villosités choriales ou d'amniocytes n'ayant pas été mis en culture, la QF-PCR amplifie les marqueurs d'ADN polymorphiques propres aux chromosomes visés (13, 18, 21 et, parfois, X et Y). Les amorces marquées par fluorescence se lient à chacune des séquences cibles et permet à l'ADN polymérase de répliquer le brin, synthétisant ainsi un ADN double brin. À la suite de l'amplification, les produits sont séparés en fonction de leur taille au moyen d'un système d'électrophorèse capillaire. La mesure assistée par ordinateur de l'intensité du signal fluorescent permet la détermination du nombre de copies de chacune des séquences cibles et donc, de chacun des chromosomes.

La QF-PCR a pour avantage de ne nécessiter qu'un petit prélèvement et de permettre l'automatisation de l'examen, ce qui offre un délai d'exécution rapide et à moindre coût,

par comparaison avec l'analyse cytogénétique conventionnelle. De surcroît, le dépistage au moyen de la QF-PCR élimine l'identification imprévue ou accessoire d'anomalies chromosomiques rares (dont l'importance sur le plan clinique demeure incertaine), tandis que le caryotype peut donner des résultats n'offrant qu'un faible coefficient de prévision en ce qui a trait au phénotype anormal, et ce, en raison de la détection du mosaïcisme et des remaniements *de novo* équilibrés [Speevak et *al.*, 2008].

II.2.1. Analyse des résultats de la QF-PCR, comparaison avec la FISH, et perspectives futures :

En analysant les résultats publiés à ce jour utilisant cette méthode, [Cirigliano et *al.*, 2004 ; Mann et *al.*, 2004] ainsi que la seule méta-analyse [Hulten et *al.*, 2003], le pourcentage de pathologies chromosomiques détectées se situe entre 4 et 6%. Les aneuploïdies autosomiques en constituent la plus grande partie, soit par ordre de fréquence croissante : les triploïdies, les trisomies 13, 18 et 21. Les aneuploïdies gonosomiques sont le plus souvent des (45,X) (correspondant au syndrome de Turner), ayant une occurrence proche de celle de la trisomie 13 ; elles prévalent sur les disomies X et Y (47,XXY, et 47,XYY).

Ce qui est remarquable est le fait que sur toutes ces séries publiées, il n'y a eu aucun résultat faux positif, ce qui situe le taux de faux positifs de cette méthode à $< 1/38\ 864$. La détermination des anomalies du nombre de gonosomes par QF-PCR était par le passé moins réalisée que celle des autosomes pour des raisons techniques, mais des améliorations récentes ont ajusté sa sensibilité, ce qui devrait corriger l'asymétrie constatée dans les publications [Donaghue et *al.*, 2003 ; Cirigliano et *al.*, 1999]

Un des avantages de la QF-PCR, par rapport au caryotype, est sa rapidité dans plus de 95% des cas les résultats peuvent être communiqués 24 heures après la réception de l'échantillon, ce qui, en plus de sa fiabilité, en fait un procédé technique simple. De plus, à partir du prélèvement de l'échantillon, chaque étape peut être robotisée, l'extraction de l'ADN génomique, la PCR couplée à l'électrophorèse, et enfin l'analyse des résultats. Cette méthode, par rapport à la FISH, permet de réduire les coûts de l'analyse rapide et pourrait être proposée à un plus grand nombre de patientes. Ces caractéristiques avantagent la QF-PCR, par rapport au FISH-interphasique. Cette dernière, tout en restant une alternative fiable et également rapide, n'est pas automatisable, et reste dépendant de l'interprétation d'opérateurs techniquement instruits.

La QF-PCR a par ailleurs l'avantage d'être compatible avec un développement futur [Ogilvie, 2003]. Comme évoqué précédemment, il est aussi envisageable d'augmenter la résolution de la QF-PCR par l'inclusion de marqueurs microsatellites supplémentaires. Cette mesure pourrait permettre la détection d'anomalies structurelles déséquilibrées, et élargir le spectre d'indications pour la QF-PCR.

II.3. Amplification multiplex de sonde nucléique dépendant des ligatures (MLPA) :

La MLPA est une technologie fondée sur la PCR qui établit une distinction entre les nombres de copies de séquences d'ADN particulières. La MLPA utilise des sondes en deux segments (deux hémi-sondes), l'une étant dotée d'une séquence « *stuffer* » dont la longueur varie d'une sonde à l'autre. Lorsque les hémi-sondes sont hybridées à des séquences cibles adjacentes sur l'ADN génomique, elles peuvent être liées par l'enzyme ADN ligase. Cela permet l'amplification de tous les sites ciblés au moyen d'une seule paire d'amorces « commune » qui s'avère complémentaire des deux extrémités libres que comptent toutes les hémi-sondes. Les produits sont soumis à un système d'électrophorèse capillaire et séparés en fonction de la taille de la séquence *stuffer*, de façon à ce que chaque pic soit le produit d'amplification d'une sonde distincte. Au moyen d'une série de calculs de normalisation, le nombre de copies peut être déterminé pour chacune des séquences cibles et, donc, pour chaque chromosome.

II.3.1. Principe de la MLPA :

La MLPA nécessite de l'ADN pur comme modèle, mais comme l'amplification ne repose que sur une petite portion d'ADN intact, les échantillons d'ADN partiellement dégradés permettent également de générer des résultats spécifiques. La MLPA a été conçue pour la quantification en une seule réaction et de façon simultanée d'un grand nombre de régions génomiques (pouvant aller jusqu'à 46) afin de détecter des délétions ou des duplications, en utilisant un ADN d'essai par rapport à un ADN témoin [Schouten et *al.*, 2002]. Pour chaque cible, une paire de hémi-sondes a été créée. Chaque hémi-sonde contient une séquence d'amorce PCR universelle, et une séquence complémentaire de la cible connue sous le nom de séquence d'hybridation. Les deux hémi-sondes s'hybrident sur l'ADN génomique, de façon adjacente et sans intervalle. Lorsque les hémi-sondes s'hybrident correctement à la séquence cible, elles sont liées par une enzyme ligase thermostable. Les amorces de PCR amplifient ultérieurement les hémi-sondes ligaturées de

manière exponentielle, ce qui les transforme en molécule unique contiguë. Une des amorces est marquée avec un colorant fluorescent de telle sorte que le produit d'amplification de la sonde puisse être détecté. Une électrophorèse de séquence type est réalisée afin de séparer les produits de la PCR résultants. Chaque longueur de sonde MLPA est conçue de manière à être facilement déterminée lorsque l'amplification du produit de PCR est gérée à travers un gel capillaire. La différence de taille est obtenue à l'aide d'une séquence de remplissage (séquence «*Stuffer*») de taille variable et présente dans une des hémi-sondes. Elle y est introduite soit par un vecteur (généralement le bactériophage M13), soit synthétisée par des oligonucléotides de tailles différentes, dans le cas où les oligonucléotides synthétiques sont disponibles. Les résultats sont obtenus sous forme de nombres de copies alléliques par rapport à des contrôles normaux : un rapport d'environ 1 est obtenu lorsque les deux allèles sont présents, un rapport d'environ 0,5 si un allèle est absent, et un rapport d'environ 1,5 si un allèle est dupliqué (**Figure 6**).

II.3.2. Interprétation des résultats de la MLPA :

A. Méthode manuelle

Le signal obtenu pour chaque sonde est normalisé en appliquant le protocole décrit par le fabricant : chaque aire de pic correspondant à une sonde est normalisé en divisant son aire par celles des pics voisins. Puis pour chaque échantillon, la moyenne des signaux normalisés des sondes pour chacun des chromosomes est calculée. Ces moyennes sont alors présentées sous forme d'histogrammes représentant de manière arbitraire la quantité relative de chaque chromosome dans l'échantillon. L'anomalie chromosomique est généralement visible sans calcul à partir de l'électrophorégramme et de l'histogramme, l'échantillon anormal étant alors comparé à la moyenne des échantillons normaux de la même série et de même nature (liquide amniotique ou villosités chorales), la déviation standard entre les échantillons devant être inférieure à 10 %. La quantité de sondes liées puis amplifiées étant proportionnelle au nombre de copie de leur séquence cible, la présence d'une trisomie se traduit par une augmentation de la taille de l'histogramme (moyenne des signaux normalisés) de l'ordre de 30 à 55% pour un chromosome donné par rapport à la moyenne obtenue pour des échantillons témoins et pour ce même chromosome. A l'inverse, une monosomie se traduit par une diminution de la taille de l'histogramme comprise entre 35 et 55 %.

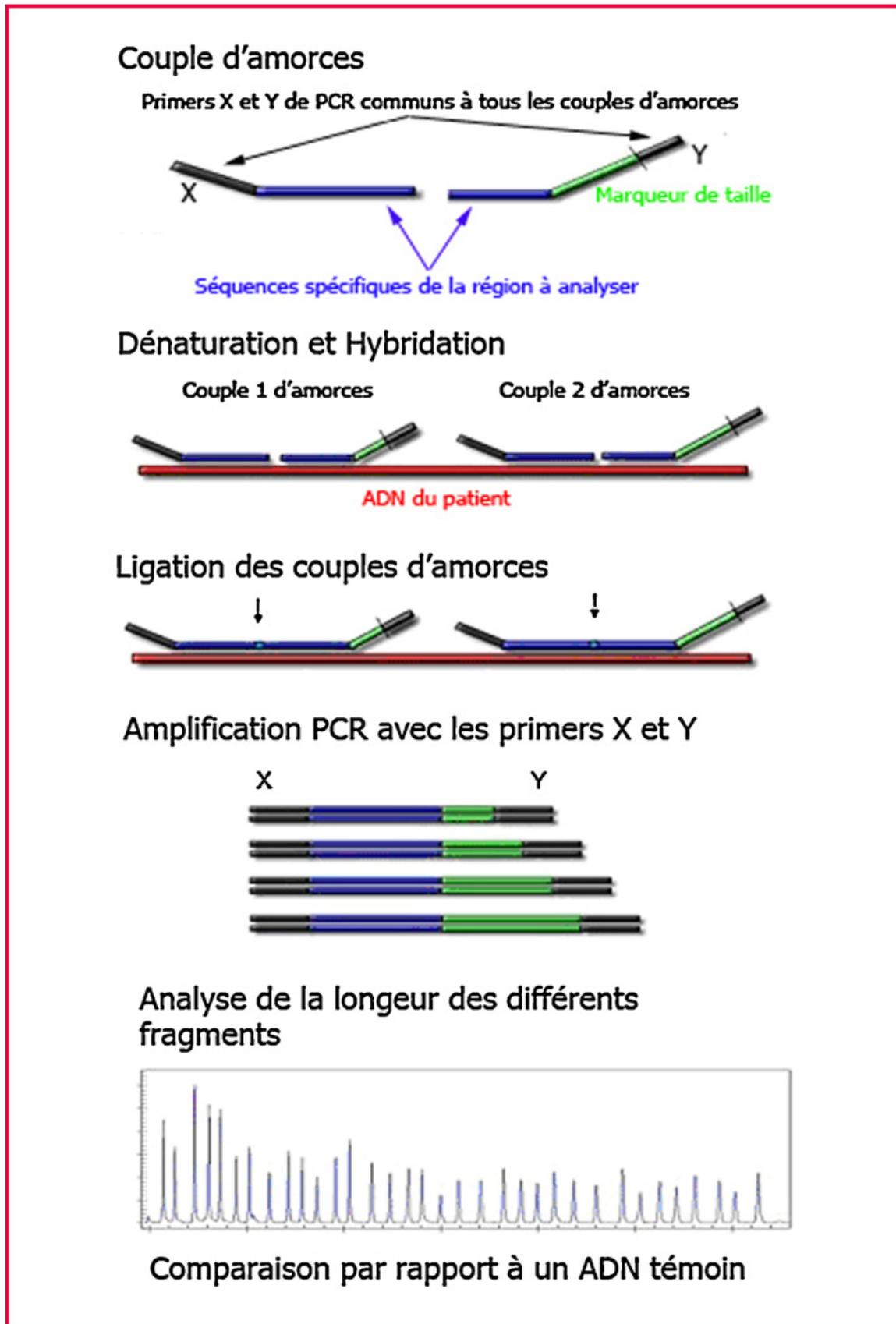


Figure 6 : Principe de la MLPA [Vialard et Molina, 2010]

B. Méthode automatique :

De façon générale, le programme reconnaît de manière automatique la taille des pics et exclut de l'analyse les amplifications non spécifiques. Le signal normalisé d'une sonde est calculé de la manière suivante : chaque aire de pic correspondant à une sonde est normalisée en divisant son aire par celles des pics voisins. Les ratios ainsi obtenus pour chaque pic sont divisés par la valeur médiane des ratios de l'ensemble des pics de l'échantillon étudié. De cette manière les sondes révélant une monosomie, une disomie et une trisomie ont, respectivement, un ratio théorique d'une valeur de 0,5, 1,0 et 1,5. Les calculs statistiques utilisés ont été développés par Gerdes et al. [Gerdes et al., 2005].

II.3.3. Intérêt et utilisations de la MLPA :

De nombreuses études ont montré que les aberrations subtélomériques sont une cause importante de retard mental modéré à sévère, et que les sondes FISH subtélomériques sont couramment utilisées dans la détection de ces anomalies [Knight et al., 2000]. Cependant, l'utilisation d'un ensemble complet de sondes subtélomériques est laborieux, fastidieux et coûteux. Plusieurs laboratoires ont donc élaboré une stratégie MLPA pour explorer les régions subtélomériques des patients avec des retards mentaux [Lam et al., 2006]. De récentes études ont également évalué l'utilisation de la MLPA avec des mélanges de sondes subtélomériques dans les avortements spontanés et ont confirmé l'intérêt de cette approche pour détecter les aneuploïdies et les réarrangements subtélomériques terminaux déséquilibrés dans les produits de fausse-couches [Bruno et al., 2006 ; Diego-Alvarez et al., 2007]. La détection prénatale des aneuploïdies 13, 18, 21 X et Y avec un mélange de sondes appropriées a également été reporté. Il a été conclu que le dépistage des aneuploïdies dans les amniocytes non cultivés par MLPA était réalisable dans un cadre de diagnostic clinique [Slater et al., 2003 ; Hochstenbach et al., 2005]. De nombreux autres kits commerciaux de MLPA sont disponibles. La MLPA est donc une technique fiable et reproductible, et peut être utilisée comme une approche alternative ou additionnelle dans l'identification de nombreuses aberrations chromosomiques [Moerland et al., 2006]. La MLPA s'est imposée rapidement dans les laboratoires de diagnostic génétique en raison de sa simplicité et de sa grande sensibilité par rapport à d'autres méthodes, mais également pour son coût relativement faible et sa robustesse. Par exemple, la MLPA permet de quantifier jusqu'à 46 cibles d'ADN différentes dans une seule réaction, avec des résultats généralement disponibles au bout de 2-3 jours, et consomme moins de temps technique que

la FISH subtélomérique. Cependant, la MLPA a certaines limites. L'une d'elles est son incapacité à détecter la contamination de l'ADN fœtal par de l'ADN maternel et les changements de ploïdie. Une autre limite est que les réactions de la MLPA sont plus sensibles aux contaminations et aux inhibiteurs de la PCR tels que des résidus de phénol, ce qui pourrait expliquer l'échec de certains essais. Par ailleurs, des mutations ponctuelles ou SNP qui se trouvent à proximité du site de ligature d'une sonde MLPA peuvent affecter l'efficacité de la ligature de la sonde, d'où une diminution apparente de la hauteur du pic et un risque de faux positif. La présence de CNV dans l'ensemble du génome a été largement démontrée [Redon et *al.*, 2006 ; Sharp et *al.*, 2005 ; de Vries et *al.*, 2005]. Lors de l'analyse des régions subtélomériques avec deux mélanges de sondes dérivés, les résultats positifs obtenus avec une seule des deux sondes est à considérer comme un CNV. Ainsi, l'existence d'un certain nombre de copies de polymorphismes subtélomériques nécessite l'examen de l'échantillon avec deux mélanges de sondes (P036D et P070). Néanmoins, en plus de comparer les résultats avec ceux des parents, d'autres techniques telles que la FISH ou QF-PCR devraient être utilisées afin de confirmer les résultats de la MLPA.

II.4. L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (ACPA):

Récemment, la technique d'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (CGHa), encore appelée ACPA (Analyse Chromosomique sur Puces à ADN) a modifié l'approche diagnostique des anomalies chromosomiques. Historiquement et techniquement, l'ACPA dérive de l'hybridation génomique comparative dite sur métaphases (CGHm) décrite par Kallioniemi et al. en 1992 [Kallioniemi et *al.*, 1992]. L'ADN génomique d'un individu à étudier (ADN test) et celui d'un individu témoin (ADN de référence) sont marqués par des fluorochromes différents émettant dans deux longueurs d'onde dissociables, respectivement (**Figure 7**). Ces deux ADN sont cohybridés en quantité équivalente sur des cibles. Initialement, selon la technique classique de CGH, les cibles étaient des chromosomes métaphasiques normaux. La résolution de la technique s'est considérablement améliorée avec l'ACPA dont les cibles sont constituées de fragments d'ADN génomique déposés sous forme de microréseaux sur un support (lame de verre ou support miniaturisé). Ces fragments d'ADN génomique humain peuvent être de grande taille (50 à 200 Kb) portés par des vecteurs (Bacterial Artificial Chromosome [BAC], Phage Artificial Chromosome [PAC], fosmides ou cosmides) ou des oligonucléotides de petite taille (60 bases). Après hybridation, la fluorescence est capturée

à l'aide d'une caméra (CGHm) ou d'un scanner laser pour l'ACPA et un logiciel calcule les rapports de fluorescence entre les deux ADN et représente les résultats sous forme graphique. Cette analyse est répétée pour l'ensemble des cibles présentes sur la lame. Pour chacune d'entre elles, un ratio égal à 1 correspond à un nombre de copie normal, c'est-à-dire deux, entre 1,3 et 1,4 à un gain d'une copie et entre 0,6 et 0,7 à la perte d'une copie. Pour des problèmes de représentation graphique, la plupart des auteurs utilisent le log 2 de ce ratio.

Les apports d'une telle technique d'analyse concernent sa résolution ou sa capacité à détecter de petites anomalies quantitatives de structure. Cette résolution est modulable au niveau de la couverture du génome et dépend de la taille des séquences déposées en microréseau, du nombre et de l'espacement régulier des séquences entre elles. Couplé aux données précises de la cartographie du génome humain et de l'annotation des gènes, il devient alors possible de préciser la taille du déséquilibre et son contenu en gènes. Outre l'approche diagnostique, ces informations participent aussi à mieux cerner au sein du déséquilibre chromosomique d'éventuels gènes candidats responsables du phénotype observé. Tout un nouveau champ de la pathologie chromosomique est ainsi apparu et plusieurs travaux utilisant la technologie des puces à ADN ont identifié des micro remaniements dans différentes cohortes de patients [Bruno et *al.*, 2009]. De nouvelles entités syndromiques ont été reconnues associées à certains de ces microremaniements chromosomiques [Slavotinek, 2008]. L'utilisation de l'ACPA permet de porter un diagnostic pour environ 15 % des individus étudiés, jusqu'alors sans diagnostic étiologique [Shinawi et Cheung, 2008]. La plupart des anomalies causales décrites sont de survenue de novo, sans anomalie génomique parentale. Dans certaines familles, l'ACPA a identifié un déséquilibre génomique chez l'enfant résultant d'un remaniement chromosomique équilibré chez l'un des parents, élément important dans l'évaluation du risque de récurrence d'un déséquilibre dans ces familles.

Cependant, cette technologie a fait aussi apparaître une nouvelle dimension de la nature complexe du génome humain [Redon et *al.*, 2006, Scherer et *al.*, 2007]. Des régions dispersées au sein du génome présentent une variation dans le nombre de copies (CNV) conduisant à des microduplications et des microdélétions. Plusieurs études sur des populations témoins ont considéré certaines de ces variations comme des polymorphismes relativement fréquents. Les corrélations entre le génotype et le phénotype pour certaines de ces variations sont encore très incertaines obérant toute interprétation diagnostique. Des observations récentes ont démontré aussi la variabilité d'expression clinique de certains

microremaniements hérités d'un parent dont le phénotype est atténué, voire une pénétrance incomplète avec chez le parent porteur du même déséquilibre génomique l'absence de signes cliniques associés [Hannes *et al.*, 2009, Mefford *et al.*, 2008]. Des études sur de grandes cohortes cliniquement bien décrites seront nécessaires pour discriminer un CNV pathogène d'un variant neutre. Cette incertitude actuelle d'interprétation doit donc être prise en compte dans l'utilisation à titre diagnostique de l'ACPA (**Figure7**).

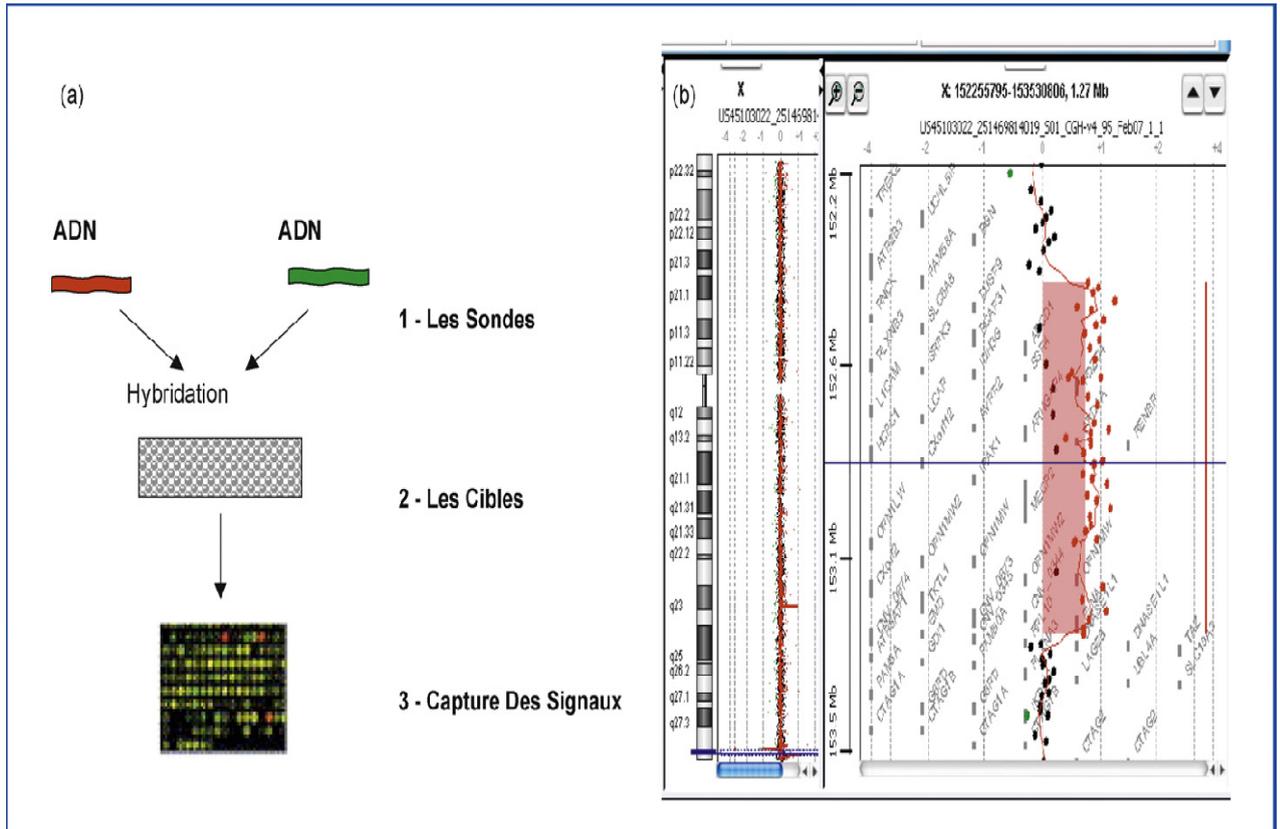


Figure 7 : Principe de l'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN : A. Les sondes sont représentées par l'ADN test et l'ADN du témoin marqués respectivement par un fluorochrome rouge et vert (1), puis sont cohybridés en quantité équivalente sur les cibles ADN déposées en microréseau sur un support solide (2), les images des signaux fluorescents sont capturées par un scanner et analysées (rapport de fluorescence)(3). B. Le rapport de fluorescence est représenté sous une forme graphique [Jonveaux, 2010]

II.4.1. Hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN et fœtopathologie :

Les premières études ont porté sur des prélèvements issus de fausses couches spontanées (FCS) du premier trimestre. Schaeffer *et al.* [Schaeffer *et al.*, 2004] ont utilisé une puce comprenant 287 cibles (réparties de façon inégale sur le génome) et l'ADN

extrait de villosités chorales de 41 produits de FCS ayant tous eu au préalable un caryotype. Toutes les anomalies repérées au caryotype ont été confirmées par l'ACPA. Parmi les 25 FCS à caryotype normal, une anomalie (duplication 10q) a été identifiée pour l'une d'entre elles (4 %). Shimokawa et *al.* [Shimokawa et al., 2006] ont de même étudié 20 FCS du premier trimestre à caryotype normal en utilisant une puce comprenant 2173 cibles avec une résolution ou espacement moyen entre deux sondes de 1,5 Mb. Deux anomalies ont été identifiées (10 %) avec respectivement une délétion de 1,4 Mb en 3p26 et une délétion de 13,7 Mb en 13q32. l'ACPA a aussi été appliquée sur des prélèvements fœtaux après interruption médicale de grossesse en raison d'un syndrome polymalformatif inexpliqué.

Le Caignec et *al.* [Le Caignec et al., 2005], à l'aide d'une puce de 287 cibles, ont ainsi analysé 49 prélèvements fœtaux pour cette indication (au moins trois anomalies échographiques fœtales et un caryotype normal) et révélé huit anomalies (16,3 %), toutes confirmées par une technique alternative de biologie moléculaire. Parmi ces anomalies, seules quatre (8 %) ont été considérées comme responsables du syndrome polymalformatif fœtal. Les quatre autres relevaient de polymorphismes a priori neutres déjà décrits dans les bases de données.

Ces études rétrospectives ont démontré la faisabilité et l'utilité de l'ACPA pour le diagnostic des anomalies chromosomiques fœtales. Des puces composées de sondes, avec une meilleure couverture du génome humain, contribueront à découvrir plus de microremaniements chromosomiques jusqu'alors non identifiés par la seule étude du caryotype. Des corrélations phénotype-génotype sont attendues dans le domaine de la fœtopathologie avec la caractérisation de nouveaux syndromes associés à des microremaniements chromosomiques à révélation anténatale. l'ACPA devrait trouver sa place dans la stratégie d'exploration diagnostique des syndromes polymalformatifs fœtaux inexpliqués et ayant conduit à une interruption médicale de grossesse. Une telle analyse participera à éclairer le conseil génétique à donner au couple.

II.5. Les BACs on Beads (BoBs):

Bien que le caryotype standard soit la technique standard pour l'analyse des tissus foeto-placentaires dans le but d'enquêter sur la présence éventuelle d'anomalies chromosomiques, les différentes techniques de biologie moléculaire précitées (FISH, MLPA, QF-PCR, CGH,...) ont pour objectif d'améliorer le diagnostic cytogénétique en

augmentant la résolution des anomalies chromosomiques manquées par le caryotype avec différentes combinaisons d'avantages et de limites. Cependant, aucune d'entre elles ne combine une large couverture de zones critiques associées aux plus fréquents microremaniements, avec des capacités de débit et de multiplexage bon marché, et une interprétation claire des résultats. Pour cette raison, une nouvelle technologie a été mise au point pour surmonter cette limitation du diagnostic cytogénétique : la technologie Prenatal BACs-on-Beads™ (ou BoBs). C'est une technique de biologie moléculaire comparable à l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) en suspension liquide. L'analyse utilise l'immobilisation des sondes d'ADN générées à partir de chromosomes bactériens artificiels BAC (Bacterial Artificial Chromosome), sélectionnés et amplifiés par PCR, sur des billes codées par fluorescence. Elle peut tester simultanément de multiples anomalies chromosomiques à partir de quantités infimes d'échantillon d'ADN, et fournir des résultats en moins de 24 heures [Gross et *al.*, 2011, Vialard et *al.*, 2011]. En outre, plus de 40 échantillons peuvent être analysés en une seule fois pour une capacité de diagnostic à haut débit. Ce caryotype moléculaire détecte de façon ciblée les gains et pertes d'ADN dans des régions génomiques pertinentes, soit les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, ainsi que les modifications du nombre de copies de l'ADN dans 9 régions de microremaniements: DiGeorge, Williams-Beuren, Prader-Willi, d'Angelman, Smith-Magenis, Wolf-Hirschhorn, Langer-Giedion, Miller-Dieker, et du cri du chat. En se concentrant sur des régions liées à des causes de maladies constitutionnelles graves, ce kit d'analyse génétique fournit plus d'informations décisionnelles que ce qui est obtenu avec d'autres méthodes couramment utilisées, en évitant toutefois les réponses de signification inconnue [Shaffer et *al.*, 2011].

II.5.1. Principe des BoBs :

Le dosage détecte les gains et les pertes dans les régions du génome humain sur lesquelles peuvent être hybridées les BACs dans le mélange BACs-on-Beads. L'intensité moyenne de la fluorescence de l'ADN de l'échantillon hybridé sur une sonde BAC spécifique est comparée à l'intensité moyenne de la fluorescence de l'ADN de référence en liaison avec cette même sonde BAC spécifique. Les rapports échantillon/référence mâle et échantillon/référence femelle sont calculés pour chaque sonde BAC. Les sondes BAC se trouvent dans la région critique de microremaniements ou loin du moindre petit locus de délétion/amplification, dans le cas des sondes d'aneuploïdie. Bien que plusieurs sondes

soient définies pour chaque région cible, le rapport de chaque sonde est calculé séparément. Lorsqu'un échantillon présentant une modification du nombre de copies est dosé, plusieurs sondes BAC situées sur la même région cible doivent répondre de la même manière et présenter un écart de rapport à la norme 1.0 [Gross et *al.*, 2011]. Les étapes de la BOBs sont ainsi les suivantes (**Figure 8**):

1- *Marquage de l'ADN génomique* : l'échantillon d'ADN et l'ADN référence sont marqués par incorporation enzymatique de nucléotides biotinylés.

2- *Purification de l'ADN marqué* : l'ADN marqué est purifié à l'aide de la trousse de purification PCR.

3- *Hybridation de l'ADN* : l'ADN marqué et purifié et la Mélange BACs-on-Beads sont hybridés une seule fois pendant la nuit.

4- *Lavage de l'ADN et liaison par le rapporteur* : Les billes hybridées sont lavées, transférées sur une plaque filtrante et lavées à nouveau. Après le lavage, les billes sont incubées avec un rapporteur qui effectue la liaison à l'ADN biotinylé. Ensuite, les billes sont lavées et remises en suspension à nouveau pour être mesurées.

5- *Mesure du dosage* : La quantité relative d'ADN liée aux billes est déterminée à l'aide d'un appareil Luminex, doté d'un logiciel spécifique.

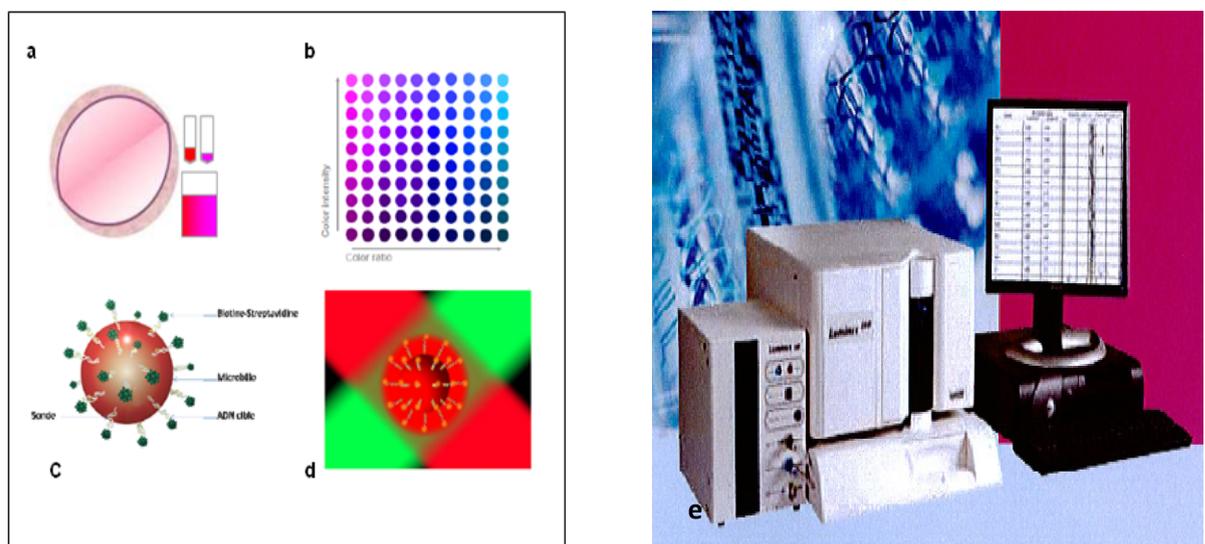


Figure 8 : Principe des BoB's. **a** : Billes marquées avec ratio spécifique de 2 fluo → 100 couleurs . **b** : Sondes spécifiques d'une région chromosomique donnée fixées sur billes. **c** : ADN marqué avec 3^{ème} fluorochrome. **d** : Hybridation ADN + BoBs. **e** : lecture avec cytomètre de plaque.

Partie Expérimentale

I. Matériel et méthodes :

Notre étude a été menée conjointement dans le Laboratoire de Biotoxicologie de l'université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès et le Service de Cytogénétique Médicale du CHU Estaing de Clermont-Ferrand. Elle a été réalisée sur une cohorte de 220 femmes dont les âges variaient de 19 à 45 ans. Deux cents vingt produits d'avortements spontanés et de fœtus morts in utero ont été récoltés sur une période qui s'est étalée de Janvier 2009 à Juin 2012. L'âge gestationnel au moment des différents prélèvements allait de la 7^{ème} à la 38^{ème} semaine d'aménorrhée. Les échantillons, prélevés dans le cadre de l'activité médicale habituelle et à des fins de diagnostic, provenaient des maternités du CHU Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbès et du CHU Estaing de Clermont-Ferrand. Les patientes ont généreusement répondu au questionnaire qui leur avait été soumis (*Annexe 1*).

Cette étude est fondée sur l'analyse directe par FISH sur noyaux interphasiques de prélèvements de villosités choriales extraites des différents produits d'avortements et sur l'analyse de l'ADN extrait de tissus fœtaux afin de révéler d'éventuelles aneuploïdies dans les différents prélèvements.

Pour la FISH, nous avons utilisé le kit AneuVysion™, capable de détecter les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y. Pour la MLPA, nous avons utilisé les kits SALSA P036 et P070, contenant tous les deux des sondes subtélomériques pour chacune des extrémités de chaque paire chromosomique. L'intérêt de l'utilisation combinée de ces deux kits est de prendre en compte le polymorphisme de ces régions subtélomériques et de confirmer par deux sondes les résultats en cas de délétion ou de duplication. Un troisième kit : SALSA P245 a été utilisé pour détecter 21 microremaniements pouvant être à l'origine de morts fœtales in utero et de retards mentaux dans l'espèce humaine (voir *Annexe 2 : Description technique des produits*).

I.1. Protocole technique pour la FISH :**1. Préparation des lames :**

Après repérage et tri des villosités sous la loupe binoculaire, celles-ci ont été lavées avec du milieu de transport puis laissées une heure dans du RPMI (10 ml de RPMI 1640 medium sans glutamine GIBCO, 0,5 ml de L-Glutamine, 0,5 ml de SVF et 0,1 ml de pénicilline/streptomycine) à 37°C. Ensuite 0,1 ml de colchicine a été ajouté au milieu (à 10µg/ml) et l'échantillon a été remis à 37°C pendant 1 heure. Un choc hypotonique au citrate de sodium à 1% a été ensuite réalisé durant 20 mn à 37°C.

Après avoir enlevé le surnageant, il a été procédé à 3 fixations successives de 15 minutes chacune (fixateur : 3 volumes d'éthanol et 2 volumes d'acide acétique glacial).

Une fois le fixateur enlevé, les fragments villositaires ont été déposés dans une cupule en verre dans 4 gouttes de milieu d'éjection (constitué d'un volume d'eau PPI pour un volume d'acide acétique).

Les villosités ont été alors dissociées sous une loupe binoculaire à l'aide d'aiguilles stériles pendant 5 à 10 minutes. Enfin, l'étalement a été fait sur lames sèches et froides, avec deux gouttes de suspension villositaire par lame (*Annexe3 : Réactifs et matériel pour la FISH*).

2. AneuVysion™ :

Les lames ont été séchées à l'étuve à 37° environ 2 heures, puis traitées 30 minutes dans une solution de Rnase à 37° et rincées à l'eau distillée. Elles ont été ensuite traitées par de la pepsine pendant 5 minutes puis rincées 5 minutes dans une solution de PBS à un pH de 7 avant d'être déshydratées dans de l'éthanol à 70%, 90% et 100%, 2 minutes par bain, et séchées à l'air libre.

3. L'hybridation :

Les sondes locus spécifiques pour les chromosomes 13 et 21 ont été déposées près du bord rodé de la lame et les sondes centromériques pour les chromosomes X, Y et 18 du côté opposé. Les lames ont été ensuite recouvertes de 2 lamelles 24x32 et lutées puis disposées dans un Hybrite® (automate d'hybridation) au programme préconisé par le fournisseur des sondes et hybridées en général toute une nuit. Dans l'Hybrite®, la dénaturation se fait à 72°C pendant 2 minutes puis à 37°C toute une nuit.

Le lendemain, les lames ont été rincées 3 minutes dans une solution de 0,04 SSC à 73°C, puis 30 secondes dans 2X SSC-NP40. Une fois la lame sèche, une goutte de DAPI II (contre coloration) et une goutte de Vectashield (antifade, pour optimiser le temps de fluorescence) ont été ajoutées. La lame a été alors recouverte d'une lamelle et scellée au vernis.

La lecture a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan 2) relié à un poste d'acquisition et de traitement d'images de cytogénétique MetaSystem Isis.

I.2. Protocole technique MLPA :

1. Extraction de l'ADN

Après analyse sous la loupe binoculaire et l'élimination des caillots sanguins et des parties non fœtales du prélèvement, il a été procédé à un découpage à l'aide d'un scalpel, avant la mise des échantillons dans un Eppendorf de 1,5 ml.

A ensuite été ajouté 180 μl de Buffer ATL et 20 μl de Protéinase K. Après vortexage, l'échantillon a été incubé à 56°C pendant 1 à 3 heures.

Après brève centrifugation, il a été ajouté 200 μl de Buffer AL, et après vortexage pendant 15 secondes, l'échantillon a été incubé à 70°C pendant 10 mn.

Après brève centrifugation, a été ajouté 200 μl d'éthanol. Après nouveau vortexage pendant 15 secondes et brève centrifugation, le contenu des tubes a été transféré à l'aide d'une micropipette dans les colonnes. Une fois fermées, les colonnes ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 1 mn puis placées dans un tube de 2 ml propre et le filtrat a été jeté. La colonne a été ensuite ouverte avec précaution et 500 μl de Buffer AW₁ a été ajouté, puis la colonne a été refermée et centrifugée à 8000 rpm pendant 1 mn.

La colonne a ensuite été mise dans un nouveau tube de 2 ml, et 500 μl d'AW₂ a été ajouté avant une nouvelle centrifugation à 14000 rpm pendant 3 mn. La colonne a ensuite été remise dans un tube de 2 ml puis centrifugée pendant 1 mn.

La colonne a enfin été mise dans un Eppendorf de 1,5 ml et 200 μl d'H₂O distillée y a été ajoutée. Après une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, l'Eppendorf a été centrifugé à 8000 rpm pendant 1 mn.

2. Dilution des ADN :

Les ADN ont été dilués à 20 ng. μL^{-1} dans un volume final de 50 μL .

NB : Toutes les dilutions doivent être étiquetées avec nom, prénom, concentration et ensuite rangées dans la boîte prévue à cet effet.

3. Préparation des mix :

Trois kits commerciaux ont été utilisés pour la réalisation de la MLPA, à savoir, Probemix P036, Probemix P070, et Probemix P245.

Les mix d'hybridation, de ligation et de PCR devaient être préparés la veille et préservés à moins 20° pour une utilisation le lendemain (voir *Annexe 4* : préparation des mix).

4. Dénaturation et hybridation de l'ADN :

Sur chaque barrette de tubes, le n° de colonne a été inscrit (1^{er} tube indiquant le haut de la série) et celui du n° de la manipulation ainsi que de l'hybridation. 5 μl d'ADN ont été distribués avant que les barrettes soient rebouchées. Après rapide centrifugation de l'ensemble des barrettes de tubes, elles ont été placées dans le thermocycler et le *programme HYB1* a été lancé pour dénaturer les ADN.

Programme HYB 1 :

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

En la maintenant dans le thermocycler, la barrette de tubes a été doucement débouchée 4µl/tube du mix d'hybridation a été ajouté en respectant le plan de plaque. Il a ensuite été procédé à un mélange aspiration-refoulement à la pipette puis les barrettes ont été rebouchées bien hermétiquement et replacée dans le thermocycler après une brève centrifugation. Le *programme d'hybridation HYB2* a lors été lancé.

Programme HYB 2

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

5. Etape de ligation :

Au thermocycleur, les tubes à traiter ont été débouchés et 32 µl de mix LIG ont été distribués dans chaque tube. Après avoir mélangé par aspiration/refoulement à la pipette, chaque colonne de tubes a été rebouchée bien hermétiquement. Après vortexage, les barrettes de tubes ont été centrifugées et remises dans le thermocycleur. Le *programme de ligation LIG* a été lancé.

Programme LIG :

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

6. Etape de PCR :

A la fin de la ligation, le programme a été stoppé et les barrettes de tubes ont été récupérées sur un portoir réfrigéré. De nouvelles barrettes de tubes ont été ensuite prises, sur lesquelles ont été inscrits le n° de colonne (1^{er} tube indiquant le haut de la série) et le n° de la manip + PCR. Les barrettes ont été ensuite placées sur un portoir microtubes réfrigéré et 20 µl de mix PCR a été distribué dans chaque tube. 5 µl de produit de Ligation a été ajouté dans colonne par colonne. Après un bref vortexage, les colonnes ont été centrifugées brièvement, puis mises dans le thermocycleur. Ensuite le *programme PCR* était lancé.

Programme PCR :

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

A la fin de la PCR, la plaque a été conservée à +4°C jusqu'au traitement des échantillons.

7. Séparation et quantification par électrophorèse capillaire :

Après avoir préparé les échantillons (voir annexe préparation de la migration électrophorétique), ils ont été mis dans le séquenceur (Beckmann Coulter GenomeLab™ GeXP) et le programme d'analyse de fragments a été lancé. L'histogramme obtenu était un ensemble de pics reflétant chacun le profil d'intensité de fluorescence du segment hybridé. Chaque pic correspondait à un amplicon. La hauteur du pic et l'aire sous la courbe étaient proportionnelles à la quantité de matériel génomique initialement présent

8. Analyse des résultats :

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GenomeLab (Beckmann-Coulter). Dans notre étude, les résultats ont été calculés manuellement, en exportant les résultats sur une feuille de calcul Excel. Le signal obtenu pour chaque sonde a été normalisé en appliquant le protocole décrit par le fabricant : chaque aire de pic correspondant à une

sonde a été normalisée en divisant son aire par celles des pics voisins. Puis pour chaque échantillon, la moyenne des signaux normalisés des sondes pour chacun des cinq chromosomes a été calculée. Ces moyennes ont été alors présentées sous forme d'histogrammes représentant de manière arbitraire la quantité relative de chaque chromosome dans l'échantillon. L'anomalie chromosomique était généralement visible sans calcul à partir de l'électrophorégramme et de l'histogramme.

Les échantillons ont été normalisés grâce à des échantillons contrôles (ADN de sujets sains) afin d'obtenir le nombre de copie relatif (RCN) de matériel génomique :

- le RCN était proche de 1 lorsque le locus étudié était présent en 2 copies
- la présence d'une délétion a été définie par un ratio $0,7$ sur 2 sondes consécutives
- un gain de matériel a été défini par un ratio $1,3$ sur 2 sondes consécutives

Résultats et Discussion

II. Résultats et Discussion:

II.1.Résultats :

Nous avons testé la capacité de deux méthodes moléculaires, à savoir la FISH dite rapide ou en direct et la MLPA, à détecter les anomalies chromosomiques les plus fréquemment rencontrées dans l'espèce humaine dans les produits d'avortement spontané.

Sur 220 échantillons recueillis au niveau du CHU de Sidi Bel Abbés (n=101) et du CHU Estaing de Clermont-Ferrand (n=119), seulement 151 ont pu être exploités pour une AneuVysion™, les autres étant des sacs embryonnaires vides, des prélèvements hémorragiques avec forte contamination maternelle, ou tout simplement recueillis à un stade de macération très avancé, rendant impossible la différenciation entre les parties maternelles et fœtales et l'identification de villosités chorales. Six de ces cas ont été également analysés par MLPA. En plus de ces 6 cas, 63 autres échantillons recueillis aux CHU de SBA et Estaing ont été soumis à une analyse MLPA, les autres ayant été écartés pour insuffisance du matériel génétique après l'extraction d'ADN (concentration d'ADN très inférieure à 100 µg/ml).

Sur un total de 151 échantillons analysés par AneuVysion™, 7 types d'anomalies chromosomiques ont été relevés (**Tableau 1**): 3 trisomies 21 (Planche 1, Fig. a), une trisomie 18 (Planche 1, Fig. b), une mosaïque XX/XX,+21(Planche 2, Fig. a), 3 triploïdies (Planche 2, Fig. b), une monosomie X (Planche 3, Fig. a) et une trisomie 13 (Planche 3, Fig. b). Par ailleurs 115 cas ne présentaient pas d'anomalies pour ces chromosomes avec 63 cas XX (Planche 4, Fig. a) et 52 cas XY (Planche 4, Fig. b). Les autres cas étaient ininterprétables, soit parce que le nombre de noyaux sur les lames analysées étaient très insuffisant pour permettre une conclusion probante des résultats, soit parce que les signaux fluorescents étaient trop flous ou absents.

Concernant les résultats de la MLPA, les 6 cas pré-analysés par AneuVysion™ n'ont pas montré d'anomalie des régions subtélomériques et des locus intrachromosomiques ciblés. Pour les autres échantillons, les résultats se sont révélés ininterprétables dans 6 cas. Nous avons par ailleurs observé, avec les 3 kits P036, P070 et P245, sur les électrophorégrammes une diminution significative de la taille des pics correspondants aux sondes ciblant des locus du chromosome X, ceci pour deux échantillons (Planches 5, 6). Nous en avons déduit qu'il pouvait s'agir une monosomie du X touchant les deux cas analysés (**Tableau 2**). Pour tous les échantillons restants, la MLPA s'est révélée négative et nous n'avons décelé aucune anomalie (Planches 7, 8).

Cas	Age maternel	Semaine d'Aménorrhée	Résultat AneuVysion
1	41	12	XX/XX,+21
2	27	18 + 3 jours	X0
3	45	13	XX,+21
4	44	11	XX,+21
5	29	12	XXX,+13,+18,+21
6	39	9	XY,+21
7	36	9	XY,+18
8	37	10	XXX,+13,+18,+21
9	23	12	XY,+13
10	Inconnu	21	XXX,+13,+18,+21

Tableau 1 : Les résultats anormaux de l'AneuVysion™ réalisée sur noyaux interphasiques

Cas	Age maternel	Semaine d'aménorrhée	Résultat MLPA
1	27	11	X0
2	24	9	X0

Tableau 2 : Les résultats anormaux de la MLPA sur l'ADN extrait des villosités chorales

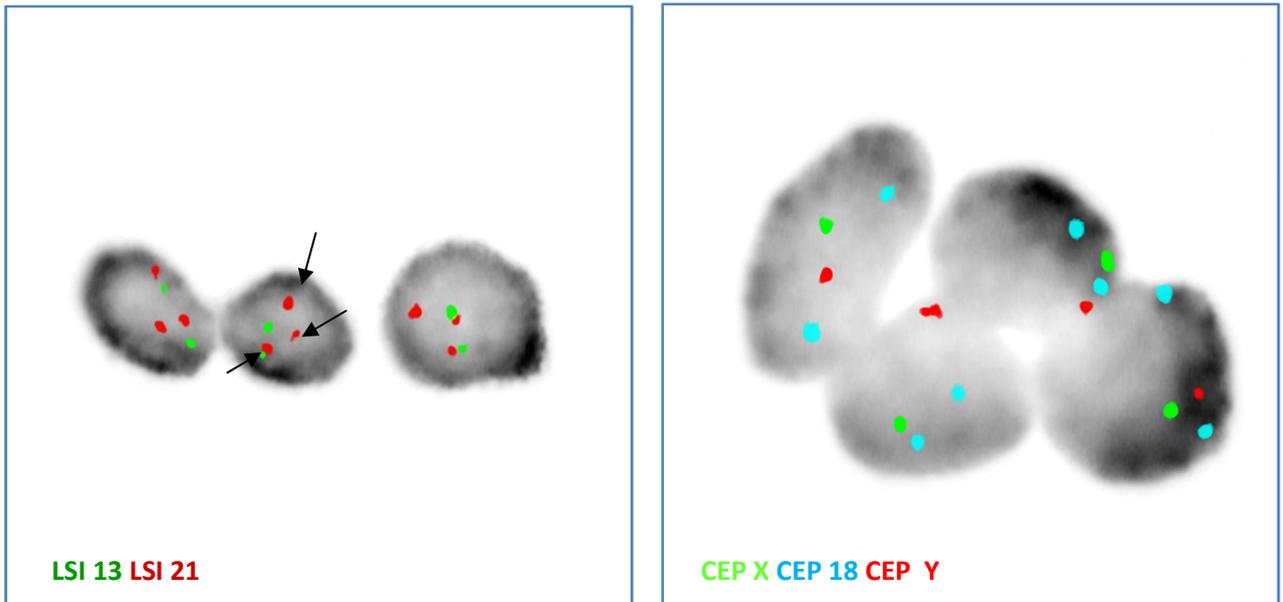


Figure a

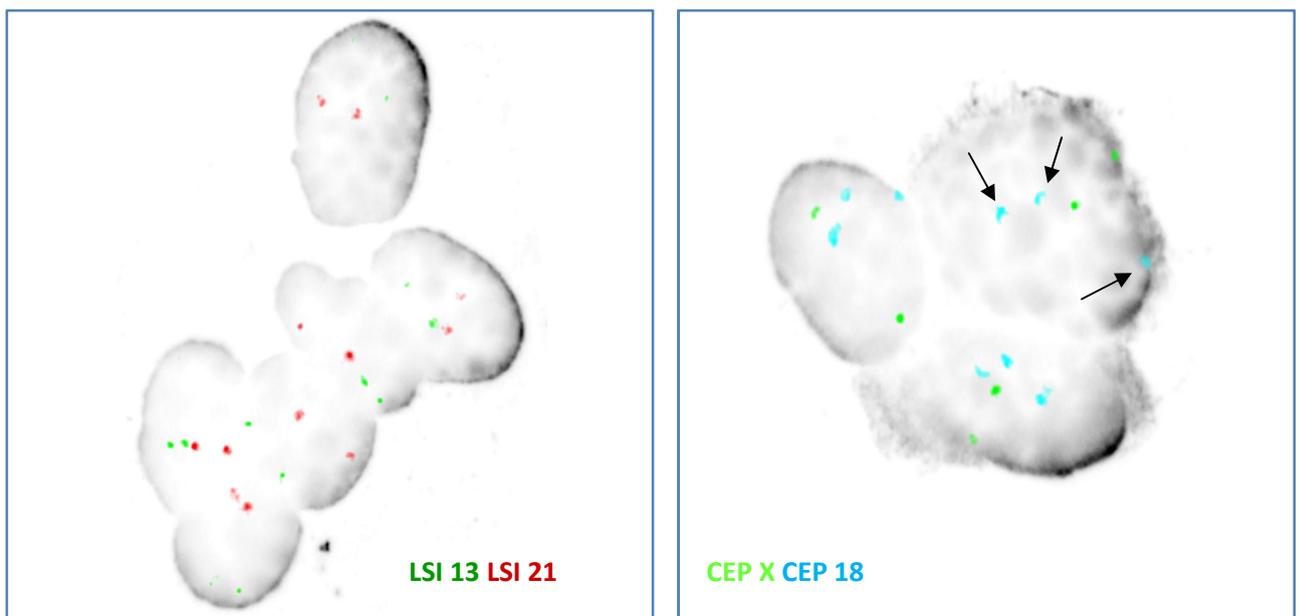


Figure b

Planche1 :

Fig. a : Révélation d'une trisomie 21 par la présence de 3 spots LSI 21 sur noyaux interphasiques obtenus à partir de villosités chorales, XY+21.

Fig. b : Trisomie 18 révélée par la présence de 3 spots CEP 18 sur une AneuVysion™ réalisée sur noyaux interphasiques de villosités chorales.

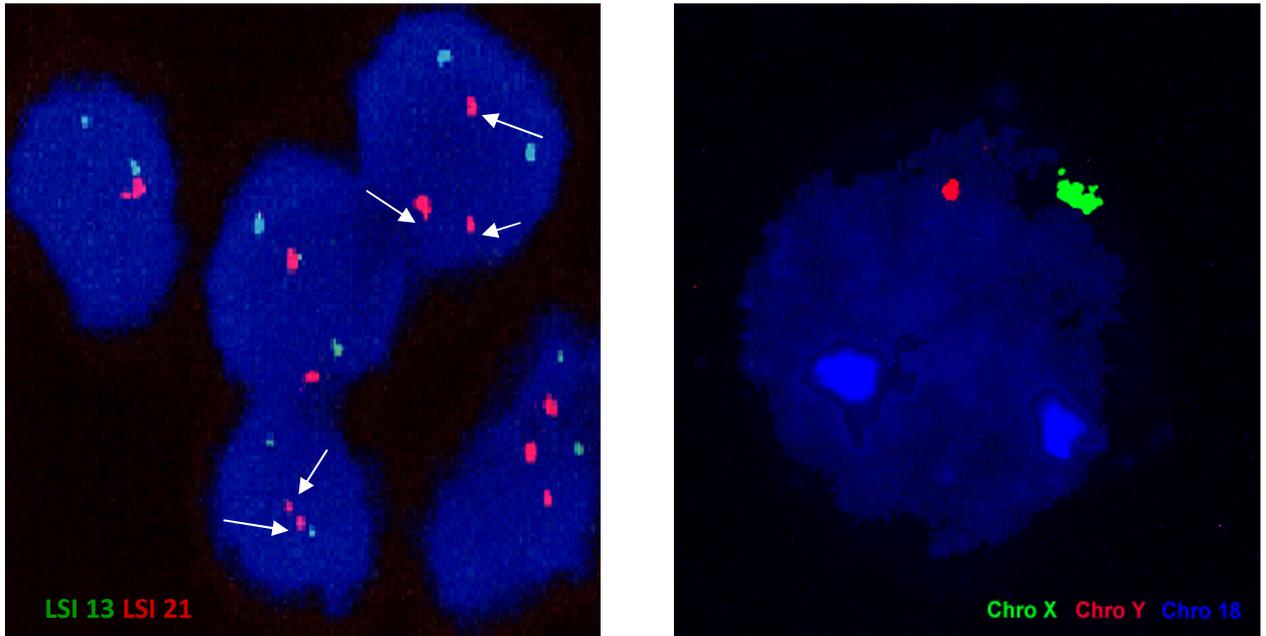


Figure a

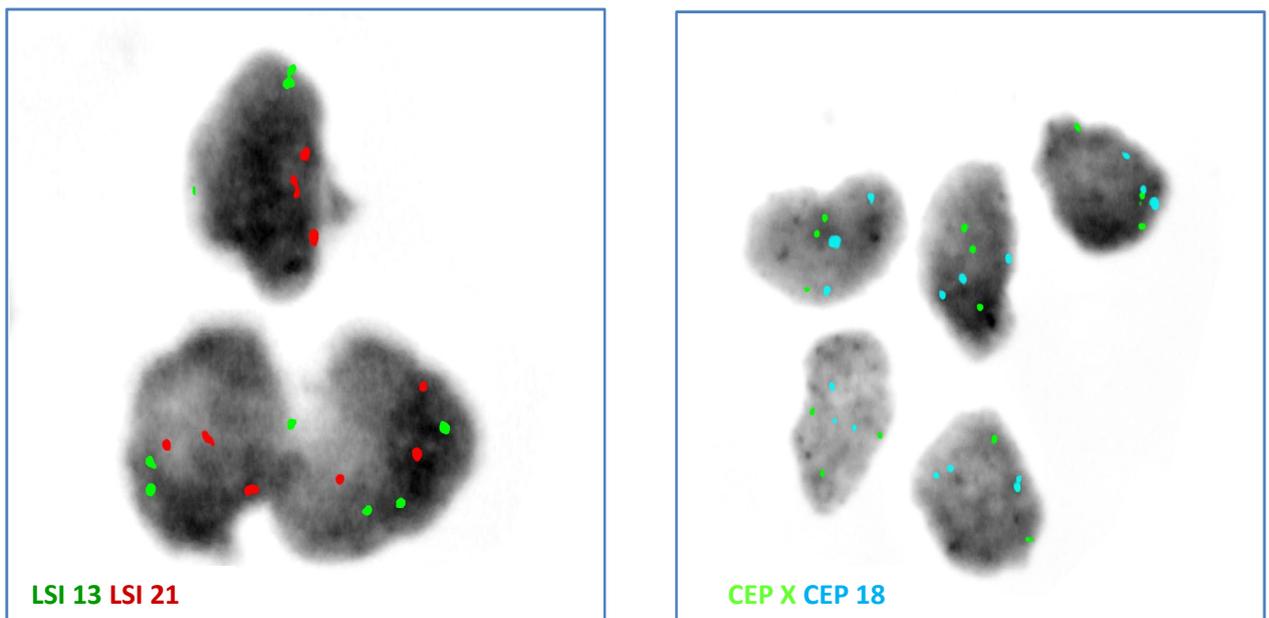


Figure b

Planche2 :

Fig. a : Mosaïcisme révélé par analyse FISH sur noyaux interphasiques par la présence de noyaux XY et des noyaux XY +21.

Fig. b : Triploïdie révélée par la présence de 3 spots de chaque sonde utilisée dans le cadre de l'AneuVysion™ sur noyaux interphasiques de villosités choriales.

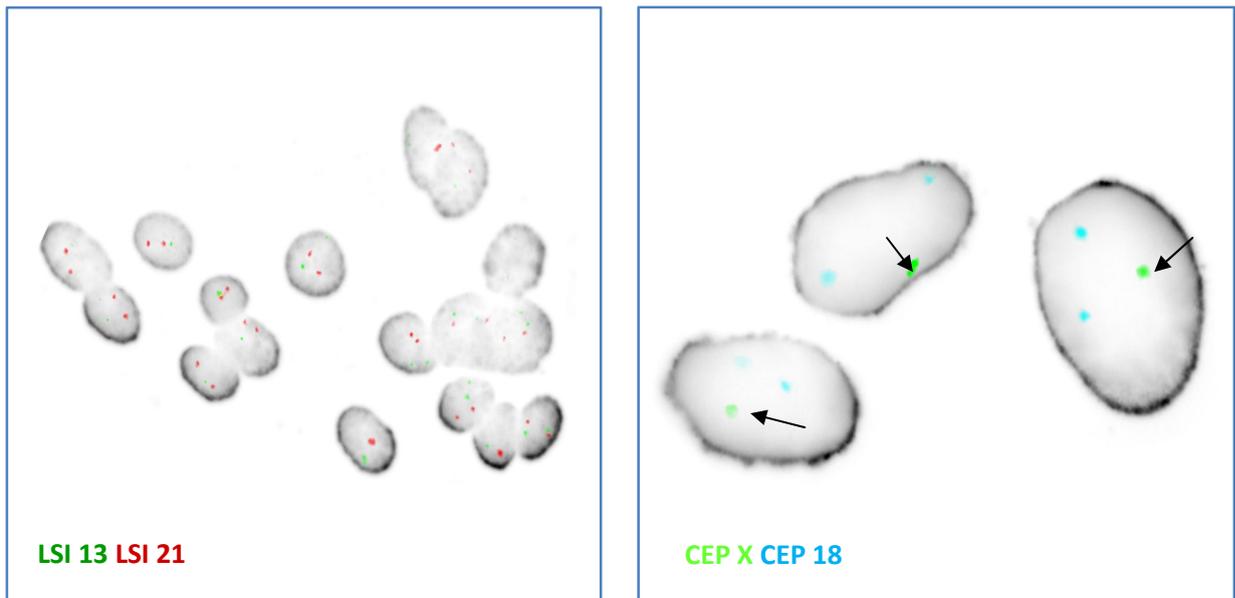


Figure a

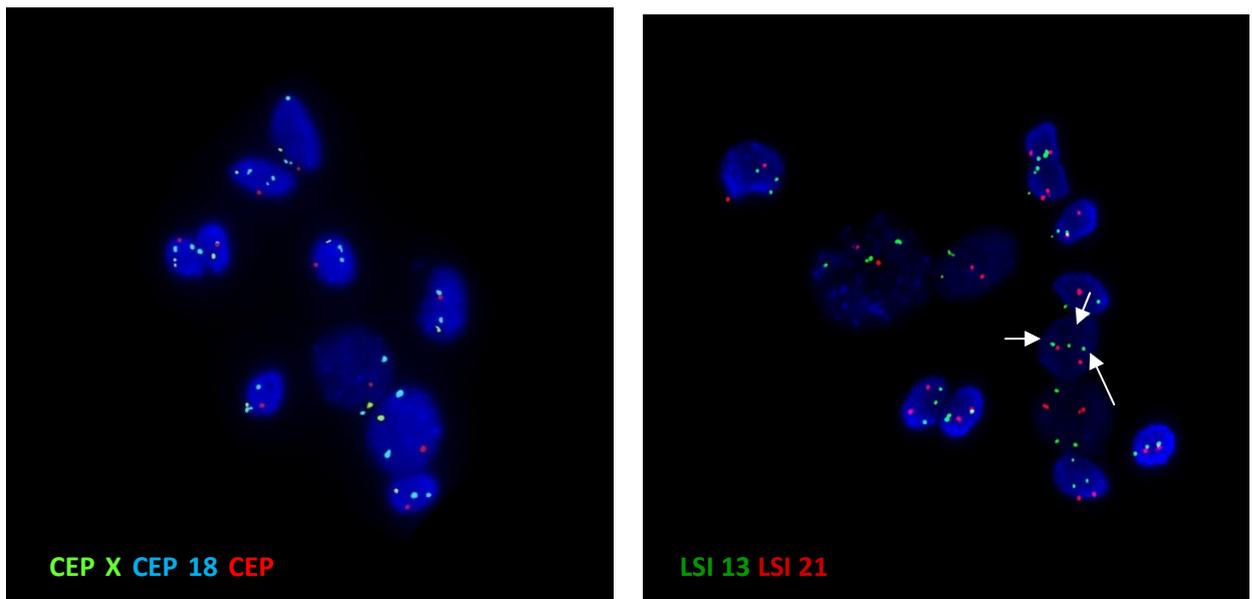


Figure b

Planche 3 :

Fig. a : Analyse par AneuVysion™ révélant un syndrome de Turner par la présence d'un seul spot CEP X dans les noyaux interphasiques de villosités choriales.

Fig. b : AneuVysion™ réalisée sur noyaux interphasiques de villosités choriales montrant un caryotype XY+13 (Présence de 3 spots LSI 13).

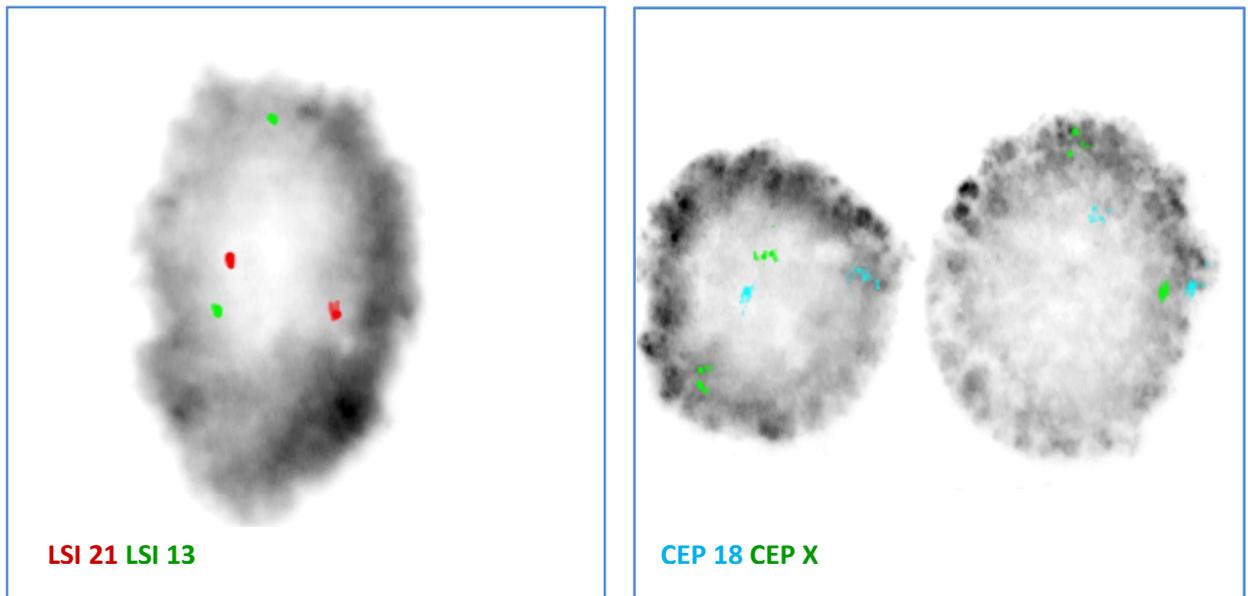


Figure a

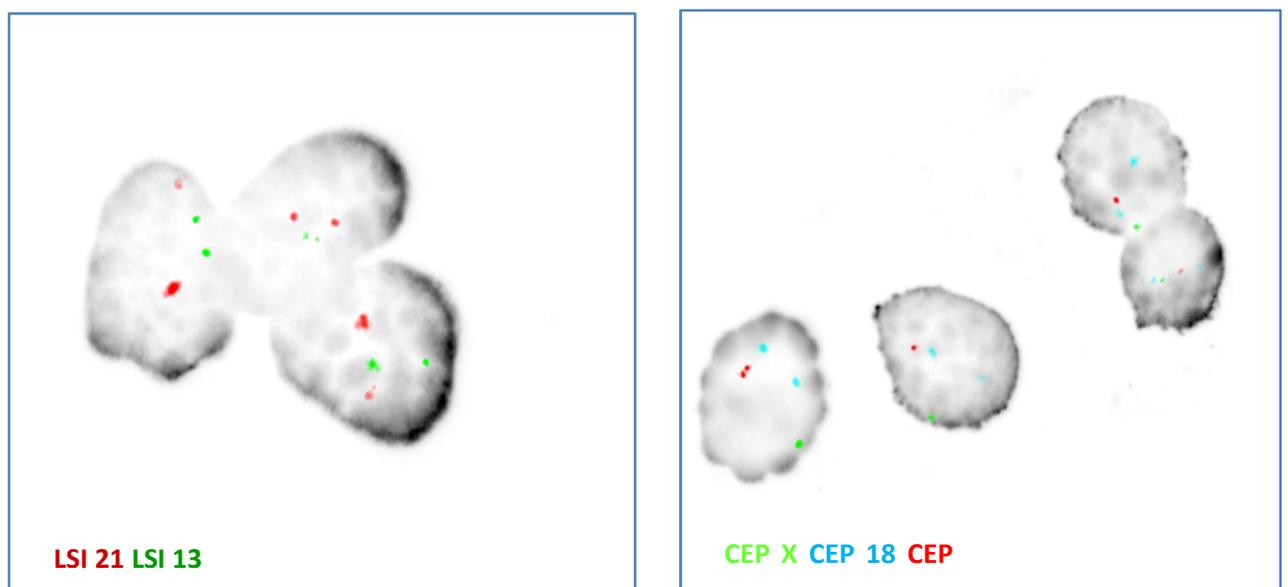


Figure b

Planche 4 :

Fig. a : Caryotype normal XX obtenu par AneuVysion™ sur noyaux interphasiques issus de villosités chorales.

Fig. b : Caryotype normal XY mis en évidence par une AneuVysion™ réalisée sur noyaux interphasiques de villosités chorales.

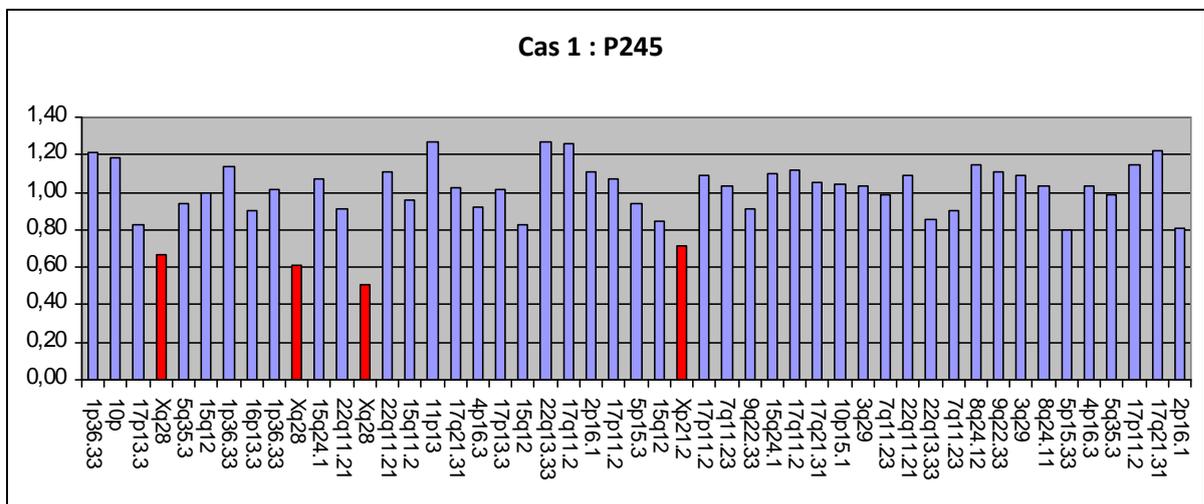
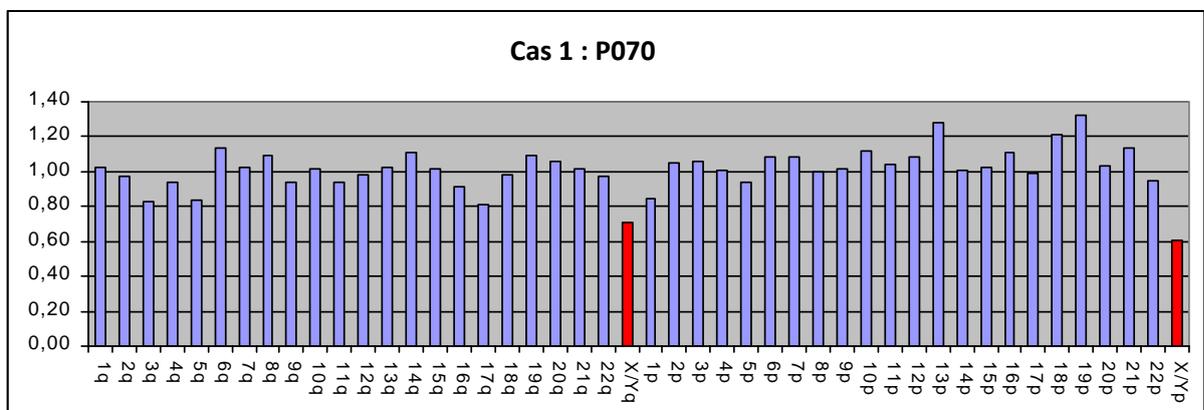
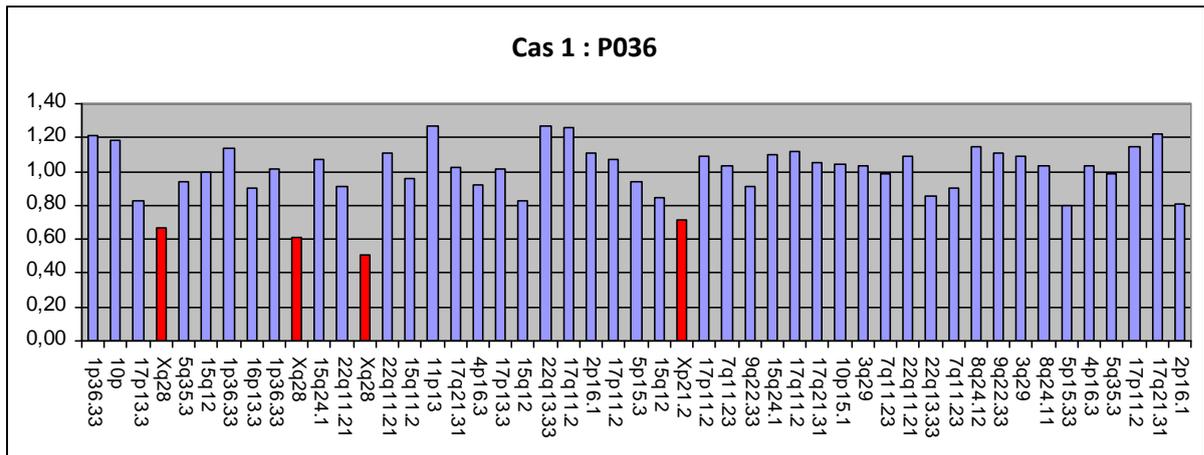


Planche 5 : Résultats MLPA sur ADN extrait de villosités chorales montrant un syndrome de Turner par faiblesse des signaux émis par le chromosome X.

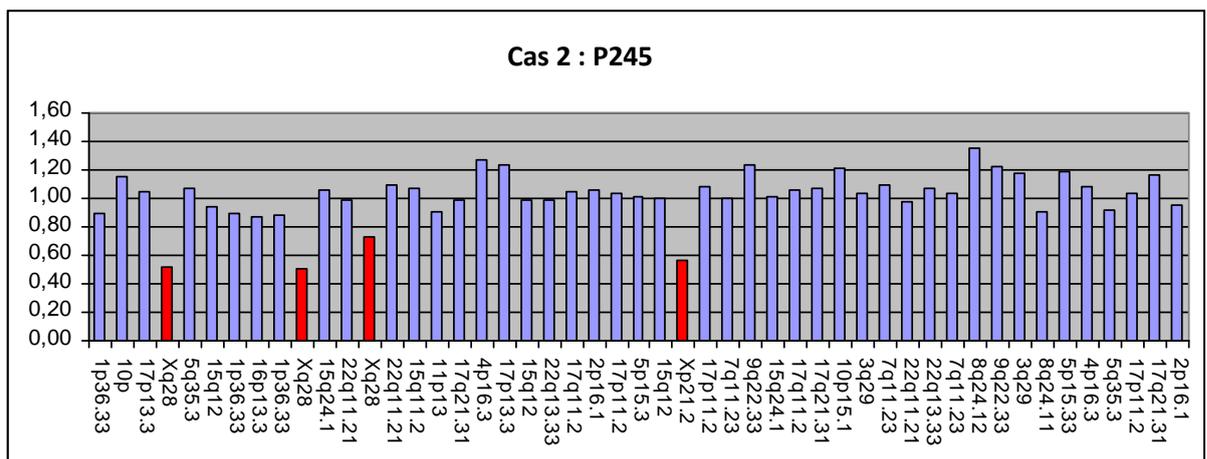
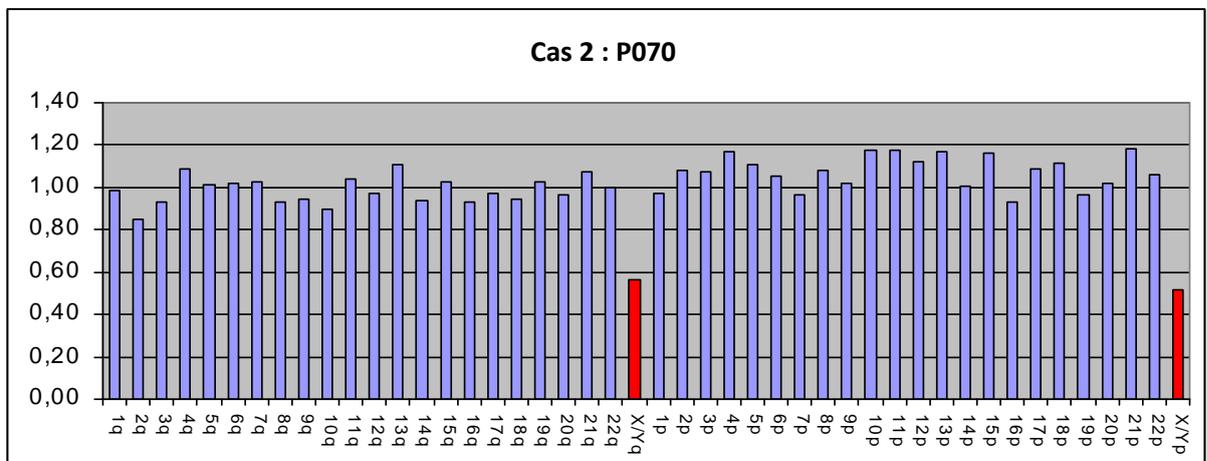
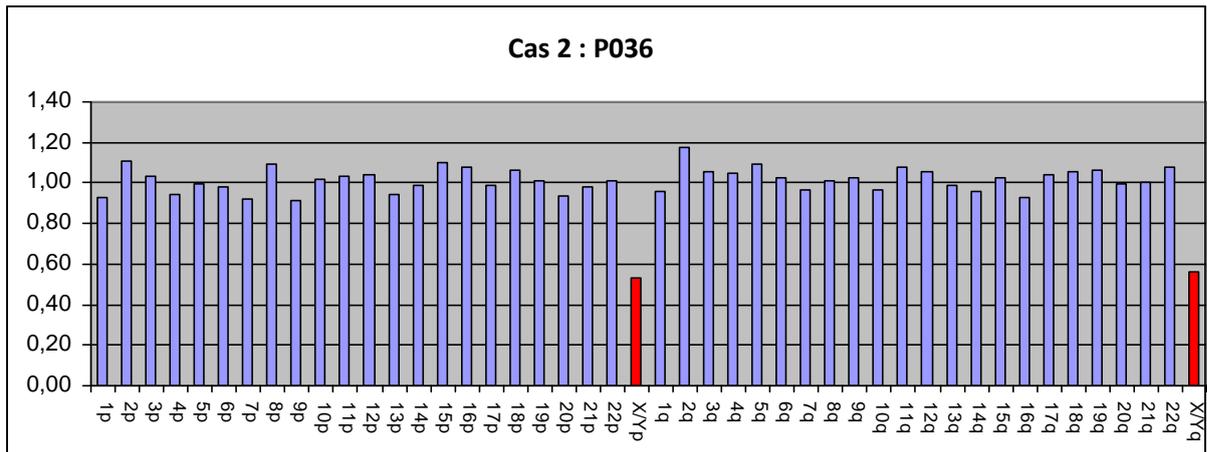


Planche 6 : Résultats MLPA sur ADN extrait de villosités chorales montrant un syndrome de Turner par faiblesse des signaux émis par le chromosome X.

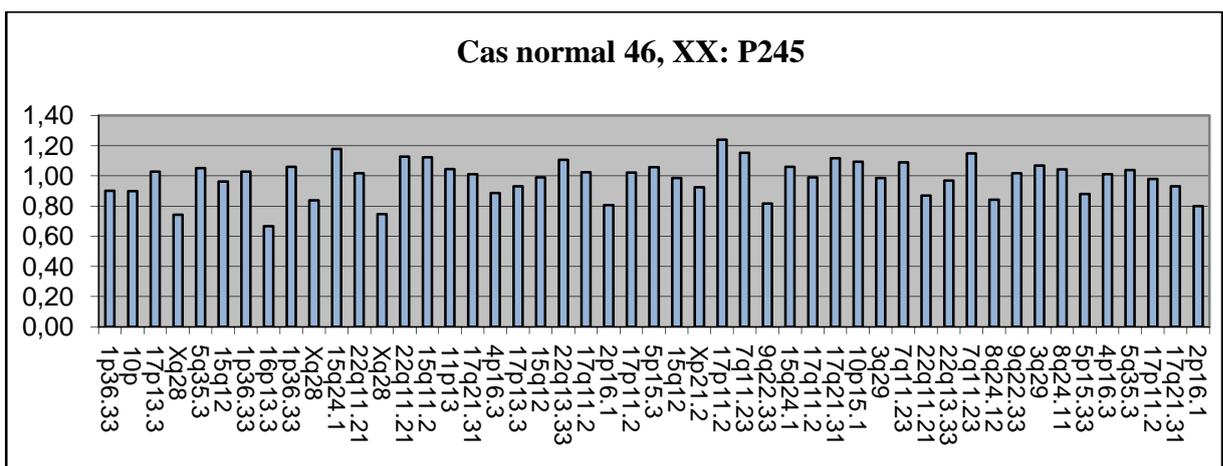
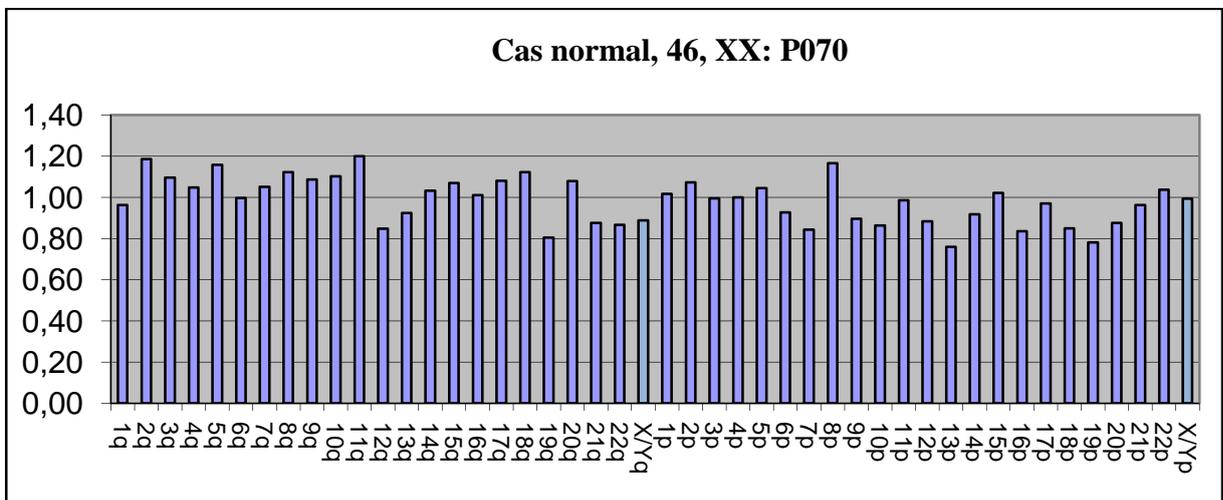
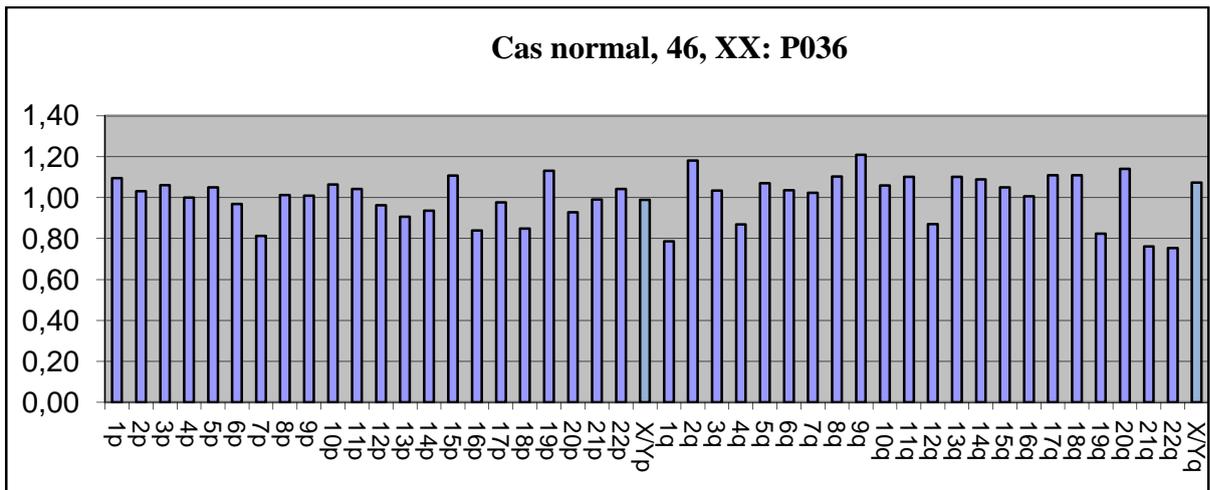


Planche 7 : Profil MLPA montrant un caryotype normal 46, XX à partir d'ADN extrait de villosités choriales.

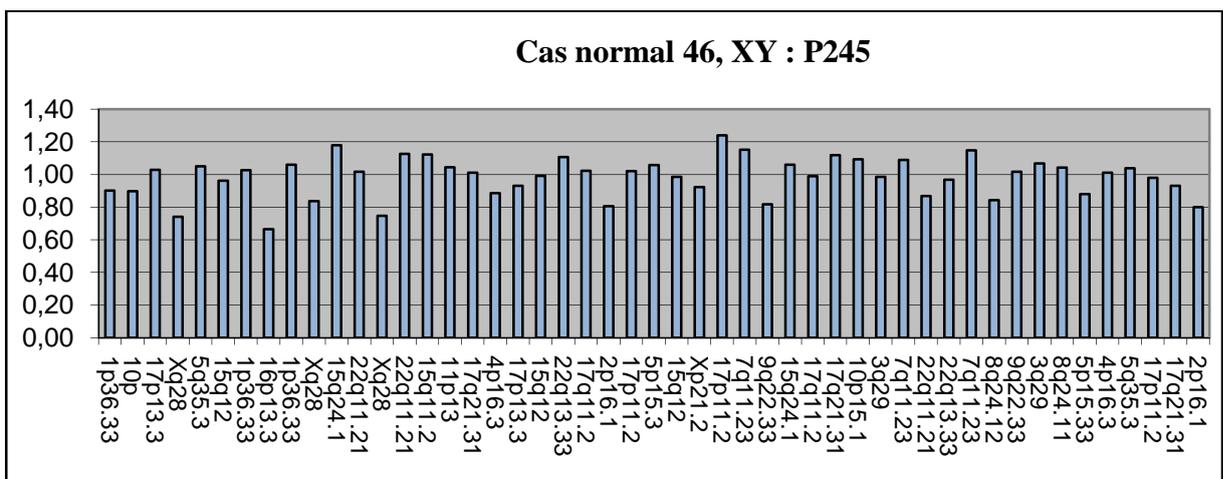
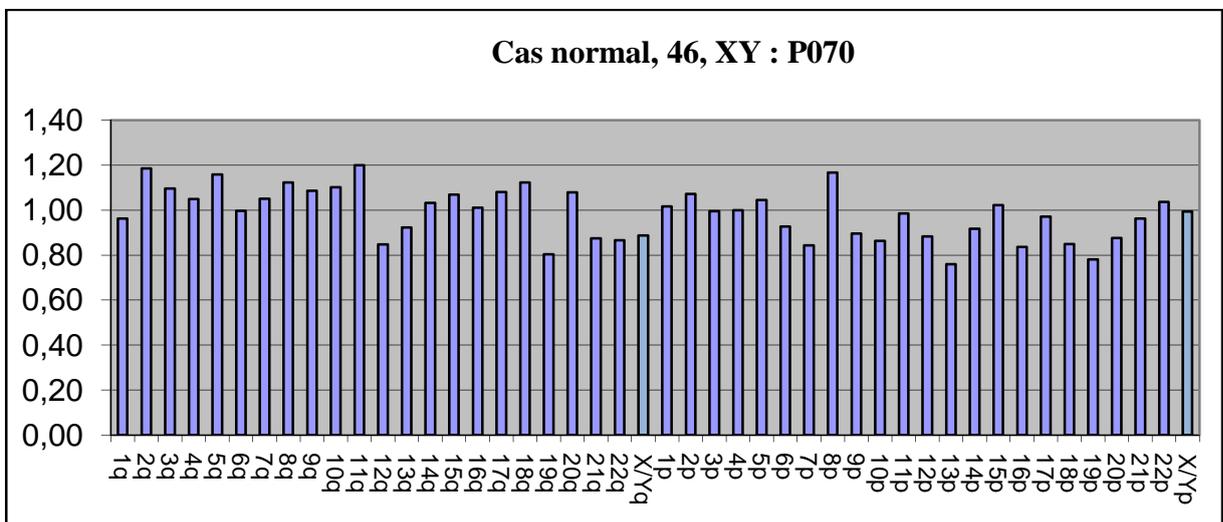
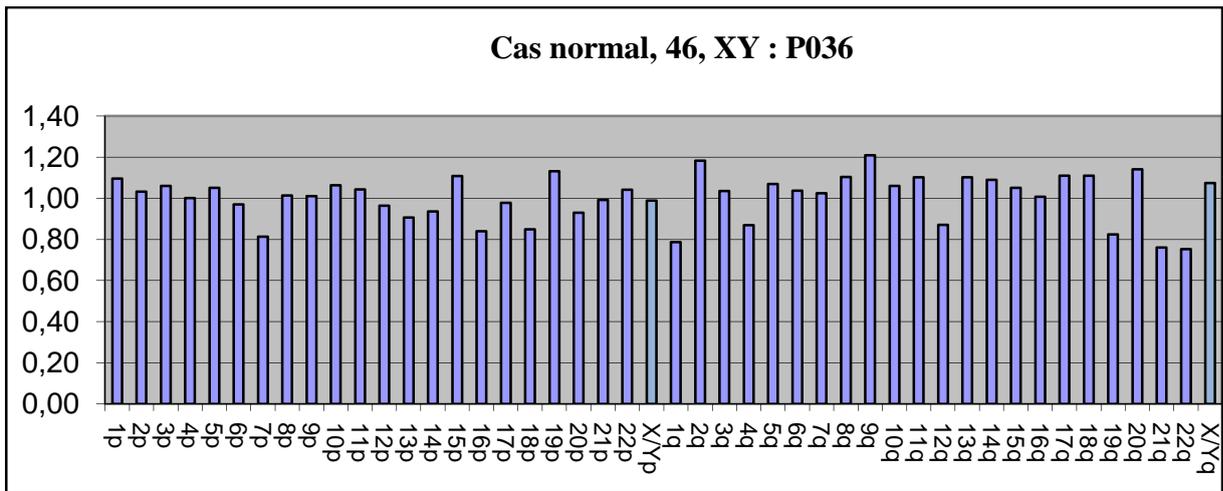


Planche 8 : Profil MLPA montrant un caryotype normal 46, XY à partir d'ADN extrait de villosités choriales.

II. 2. Discussion :

II.2.1. Analyse FISH en direct :

L'analyse cytogénétique des produits d'avortement spontané fournit de précieuses informations sur la fréquence des anomalies chromosomiques dans divers groupes ethniques, sur leur étiologie, sur les risques de récurrence et sur la suspicion d'une activité mutagène dans une population [Hassold et *al.*, 1980 ; Kajii et *al.*, 1980 ; Warburton et *al.*, 1980 ; Hassold et Jacobs, 1985 ; Boué et *al.*, 1985]. En outre, la connaissance des caryotypes peut s'avérer cliniquement pertinente et peut être une condition préalable à la recherche de causes non chromosomiques. Cependant, les études cytogénétiques ont été longtemps entravées par la nécessité de recourir à des cultures de cellules qui exposent à un risque de contamination maternelle ou d'absence de prolifération des cellules en culture, ce d'autant plus que l'état de macération du prélèvement est avancé. Ces techniques sont de plus laborieuses ; c'est la raison pour laquelle les analyses chromosomiques des avortements spontanés n'ont été effectuées que par un petit nombre de laboratoires, et de façon occasionnelle.

Récemment, les techniques moléculaires de cytogénétique ont pu démontrer que les chromosomes peuvent être efficacement étudiés à partir de villosités chorales prélevés sur des produits d'AS sans avoir recours à la culture.

Dans notre étude, nous avons essayé de surmonter les difficultés de la cytogénétique conventionnelle en testant l'intérêt de deux techniques moléculaires dans l'étude des AS : la FISH sur noyaux interphasiques et la MLPA.

Il est bien connu que les anomalies chromosomiques numériques sont fréquemment associées aux AS et aux morts fœtales *in utero* [Doria et *al.*, 2009 ; Carvalho et *al.*, 2010 ; Azmanov et *al.*, 2007]. C'est pour cette raison que nous avons eu recours au kit AneuVysion™ pour la FISH en direct, apte à détecter les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y, autrement dit, les aneuploïdies les plus fréquentes dans les AS.

L'AneuVysion™ a été réalisée avec succès sur 141 produits d'AS étudiés et les résultats de cet examen ont été obtenus dans un délai de 24 heures. Les 10 cas restants ont été exclus de l'étude pour insuffisance du nombre de noyaux présents sur la lame ou pour absence de signal fluorescent. Dix anomalies ont été observées, soit un taux d'anomalie d'environ 7,1%. Ce taux est inférieur au taux de 30-40% avancé par des études antérieures [Doria et *al.*, 2010 ; Carvalho et *al.*, 2010 ; Azmanov et *al.*, 2007]. Ceci peut être expliqué par le fait que nous n'ayons pas testé toutes les anomalies chromosomiques impliquées

dans les AS, notamment les aneuploïdies des chromosomes 16 ou 22, relativement fréquentes dans les produits d'AS [Azmanov et *al.*, 2007]. Par ailleurs, pour les échantillons du CHU de Clermont-Ferrand, majoritaires dans cette série, il s'agissait d'AS, sachant que la politique française de dépistage de ces anomalies par diagnostic prénatal chromosomique arrête la majorité de ces aneuploïdies par recours à une IMG avant la survenue de l'AS.

Parmi les 10 anomalies découvertes, 6 sont le résultat de pertes de grossesses précoces, ce qui soutient l'hypothèse selon laquelle la plupart des conceptions caryotypiquement anormales, et plus particulièrement les trisomies, avortent très tôt pendant la grossesse [Davidson et Burn, 1990].

En total accord avec la littérature, nos résultats ont montré une prépondérance des aneuploïdies autosomiques, à savoir les trisomies, avec 5 cas sur 10, suivie par les monosomies X. Ceci confirme le fait que ce sont les anomalies les plus souvent mises en évidence dans les avortons [Doria et *al.*, 2006 ; Carvalho et *al.*, 2010 ; Azmanov et *al.*, 2007 ; Doria et *al.*, 2010].

Dans 115 cas, aucune aneuploïdie des chromosomes 13, 18, 21, X et Y n'a été observée, avec 63 cas XY et 52 XX. Toutefois, nous ne pouvons en aucun cas exclure définitivement la cause cytogénétique comme étant à l'origine de ces pertes de grossesses dans la mesure où notre analyse était ciblée et que, par conséquent, il est possible que nous soyons passés à côté d'autres anomalies touchant d'autres chromosomes ou de réarrangements cryptiques non décelables par les sondes utilisées.

Dans notre étude, 6 cas parmi les aneuploïdies révélées par FISH provenaient de femmes dont l'âge était supérieur à 35 ans. Or, il est bien connu que l'âge maternel est un facteur prédisposant à la survenue des AS [Boué et *al.*, 1985]. Plus l'âge maternel augmente, plus le risque d'aneuploïdie, et plus particulièrement celui des trisomies, est élevé [Kline et Stein, 1986 ; Hassold, 1986 ; Creasy et *al.*, 1976].

Un cas a retenu notre attention, c'est celui d'une trisomie 21 détectée chez une femme présentant un antécédent de trisomie. En effet, certaines études suggèrent qu'il existerait une prédisposition aux conceptions trisomiques chez des patientes ayant des antécédents de grossesses trisomiques [Verp et Simpson, 1985 ; Robinson et Linden, 1993 ; Gardner et Sutherland, 1996]. Outre l'âge avancé de cette patiente (44 ans), il est envisageable que cette anomalie récurrente soit le résultat d'un mosaïcisme gonadique ou bien d'un remaniement équilibré cryptique chez un des deux parents, et nécessiterait un bilan cytogénétique plus approfondi. Par ailleurs les autres cas que nous rapportons ici

concordent avec l'hypothèse selon laquelle les AS associés à des anomalies de nombre des chromosomes sont le résultat d'erreurs non-disjonctionnelles sporadiques lors de la ségrégation méiotique des chromosomes, erreurs dont l'incidence augmente significativement avec l'âge maternel et sont favorisées par le vieillissement des ovocytes [Robinson et *al.*, 2001].

Alors que la moyenne de l'âge maternel pour la plupart des produits de conception trisomiques est plus élevée par rapport à la population générale, ce n'est pas le cas pour les monosomies X. En effet, le risque de survenue d'une monosomie X est inversement proportionnel à l'âge maternel [Boué et *al.*, 1985]. Dans notre série, nous avons relevé un cas de monosomie gonosomique X0 qui n'a pas dérogé à cette constatation puisque la mère était âgée de 27 ans, donc plus jeune que la plupart des autres mères présentant un AS avec anomalie cytogénétique. Cependant, cet échec est survenu tard dans la grossesse et fait sans doute partie des rares cas d'AS pour monosomie X qui surviennent dans le deuxième trimestre de la grossesse [Simpson, 1986].

Nous avons également identifié une mosaïque par la présence de deux lignées cellulaires : XX/XX+21. Il est très probable que le fœtus, de sexe féminin, était trisomique 21 et que l'échantillon ait été contaminé par des cellules maternelles XX non trisomiques.

Nous avons observé 3 triploïdies (FISH en direct = XXX,+13,+18,+21) dans notre série, ce qui n'est pas un fait rare puisque les pertes de grossesses attribuées à une triploïdie représentent 1 à 3% des pertes de grossesses cliniquement reconnues, ce qui place ces aberrations parmi les anomalies chromosomiques les plus fréquentes dans la conception humaine [Jacobs et *al.*, 1978 ; Lindor et *al.*, 1992]. Les triploïdies sont le résultat d'erreurs de fécondation, celles que nous avons diagnostiquées pouvant être indifféremment indicative d'une diandrie ou d'une digynie.

Enfin, et concernant les AS chromosomiquement normaux observés dans notre série, le nombre de fœtus XX est plus élevé que celui des fœtus XY avec un sexe ratio mâle-femelle de 0,82. Ceci est en concordance avec de nombreuses études antérieures [0,75 pour Hassold et *al.*, 1980, 0,90 selon Warburton et *al.*, 1980]. La prépondérance de résultats XX peut être attribuée à une contamination maternelle du prélèvement, ce d'autant plus que l'AS survient précocement et que, donc, la quantité de tissu fœtal soit très limitée dans celui-ci.

II.2.2. Intérêts et inconvénients de la FISH :

Nous avons rencontré de nombreux soucis pour l'acheminement des échantillons depuis Sidi Bel Abbés jusqu'au Service de Cytogénétique du CHU Estaing. Dans un premier temps, nous avons eu recours à l'envoi de lames pré-étalées ; nous avons ensuite fait appel à la congélation à sec des villosités chorales pour leur conservation jusqu'à leur envoi groupé. Malgré cela, les résultats n'ont pas été concluants avec un taux d'échec élevé de l'AneuVysion™ (26 cas sur 141). L'AneuVysion™ en direct est cependant une alternative intéressante à la culture, car permettant d'effectuer la recherche des aneuploïdies les plus fréquemment rencontrées dans les produits d'AS, avec de petites quantités de matériel et sans devoir avoir recours à une étape de culture ni à des manipulations stériles. En effet, et à de nombreux égards, l'analyse FISH en direct s'est avérée utile, offrant l'avantage d'être précise et fiable. Elle présente une spécificité et une sensibilité intégrales en ce qui a trait au dépistage des aneuploïdies ciblées [Grimshaw et *al.*, 2003]. Un de ses nombreux autres avantages est sa capacité à détecter les polyploïdies (triploïdies et tétraploïdies) comme cela a été le cas dans notre étude. Il ne faut pas oublier cependant que ce procédé ne permet de détecter que les aneuploïdies ciblées. Les anomalies chromosomiques autres que celles ciblées ne sont pas accessibles à ce type d'analyse, ce qui nous a conduit à présumer que le taux d'anomalie dans notre série pourrait être sous-estimé. Le principal inconvénient de la FISH reste cependant son coût élevé et le fait qu'elle ne se prête pas à l'automatisation [Grimshaw et *al.*, 2003 ; Mann et *al.*, 2004].

II.2.3. Analyse MLPA :

Une autre méthode qui a fait ses preuves pour le diagnostic des anomalies chromosomiques déséquilibrés dans les cas pour lesquels les cellules en métaphase ne sont pas disponibles est la MLPA. Cette méthode est dépendante de l'extraction d'ADN, ne nécessite pas de cellules vivantes ou intactes et peut donc être utilisée aussi bien pour des tissus fixés ou congelés que pour des tissus frais.

Pour notre étude, et afin d'augmenter la possibilité de détection des aneuploïdies ainsi que des réarrangements chromosomiques subterminaux déséquilibrés, nous avons utilisé une combinaison de deux kits de sondes MLPA : SALSA P036 et P070 permettant l'analyse simultanée de toutes les régions subtélomériques [Diego-Alvarez et *al.*, 2007 ; Bruno et *al.*, 2006]. L'utilisation d'au moins deux sondes différentes pour chaque région

est très recommandée en raison de l'existence de polymorphismes de ces régions dans la population générale.

Nous avons utilisé en parallèle le kit P245 permettant d'explorer simultanément 21 régions impliquées dans des microremaniements intra-chromosomiques à l'origine de syndromes cliniquement bien documentés.

Notre analyse a été réalisée sur 63 échantillons d'ADN extrait à partir de VC prélevées sur des produits d'AS. Six des cas étudiés ont été ininterprétables au final, donc exclus. Six autres cas avaient été pré-analysés par AneuVysion™ qui s'était révélée normale ; la MLPA s'est également révélée normale.

Pour les cas restants, nous avons révélé la présence de 2 aberrations chromosomiques : 2 monosomies X.

Dans notre série, le taux d'anomalie chromosomique est de 3.17% avec deux aneuploïdies et un réarrangement de structure. Ce taux est inférieur à celui de la littérature en raison du caractère ciblé de la MLPA et du petit nombre d'échantillons étudiés [Carp et al., 2001], mais montre que la MLPA peut être parfaitement utilisée, à l'instar des autres techniques moléculaires, dans le diagnostic d'anomalies chromosomiques [Diego-Alvarez et al., 2007].

Les deux cas d'AS avec monosomie X révélés par notre analyse se sont produits très tôt dans la grossesse, à la 9^{ème} et la 11^{ème} SA respectivement. Ces deux cas confirment le fait que les monosomies gonosomiques font partie des anomalies fréquemment impliquées dans les échecs de grossesses, sachant par ailleurs que 99% des conceptions avec monosomie X avortent tôt dans la grossesse [Davidson et Burn, 1990 ; Hook et Warburton, 1983]. Comme indiqué précédemment, l'âge maternel pour les monosomies X est inférieur à celui des autres aneuploïdies et plus particulièrement les trisomies [Boué et al., 1985]. Nos deux cas le confirment car les deux mères étaient âgées respectivement de 27 et 24 ans.

Tout comme l'analyse FISH, dans cette série la prépondérance des cas normaux XX a également été notée malgré l'échantillon réduit, avec un sexe ratio mâle-femelle de 0,85. Là aussi, certains auteurs suggèrent que ceci pourrait être lié à une contamination maternelle du prélèvement [Hogge et al., 2003 ; Sullivan et al., 2004 ; Moracles et al., 2008 ; Rodgers et al., 1996]. D'autres auteurs spéculent sur l'éventualité qu'il puisse y avoir une influence négative en début de grossesse de certains gènes qui échappent à l'inactivation du X, engendrant ainsi un déséquilibre dans le dosage génique entre les hommes et les femmes [Bell et al., 1999 ; Beever et al., 2003].

La MLPA est donc une autre alternative à la cytogénétique conventionnelle et à la culture cellulaire, du fait qu'elle n'utilise que l'ADN au lieu du matériel cultivé. Ceci a grandement facilité notre tâche, nous évitant des manipulations infructueuses des produits d'AS récoltés et nous obligeant seulement à congeler à sec des petits fragments de villosités chorales. Même les tissus très macérés, très nombreux dans notre étude, ont pu être exploités pour l'extraction de l'ADN.

II.2.4. Quelles perspectives ?

Nos résultats fournissent des preuves supplémentaires pour considérer la MLPA comme une technique rapide, automatisée, précise et fiable pour l'étude des aneuploïdies sur des tissus même très macérés ; elle ne nécessite pas de culture de cellules et les quantités d'ADN nécessaires à l'analyse ne sont pas très importantes. La MLPA fournit un excellent outil de détection rapide des aneuploïdies les plus fréquentes retrouvées dans les produits de conception aberrants, mais également des microremaniements subtélomériques et intra-chromosomiques. Elle permet l'analyse simultanée de tous les chromosomes en une seule réaction PCR et en utilisant une paire d'amorces communes à toutes les sondes utilisées simultanément. La MLPA est une approche ciblée mais offrant une analyse plus globale du génome que la FISH.

En plus d'être facile et fiable, la MLPA présente aussi l'avantage d'être peu coûteuse, et possède une excellente sensibilité.

Cependant, cette technique a des limites du fait qu'elle ne permet pas la détection des polyploïdies (triploïdies et tétraploïdies), anomalies assez fréquentes dans les pertes spontanées de grossesses, ni celle des réarrangements structuraux tels les translocations équilibrées ou les inversions.

Conclusion :

Des techniques moléculaires de cytogénétique émergentes sont susceptibles, dans un proche avenir, de supplanter la FISH en direct et la MLPA : il s'agit en particulier de la technique « prenatal BoBs » et de l'ACPA. La première permet un diagnostic rapide, en direct, des aneuploïdies 13, 18, 21, X et Y ainsi que de 9 régions impliqués dans des microremaniements à l'origine de grossesses pathologiques ; la deuxième permet une analyse pangénomique de très haute résolution.

III. Quel intérêt pour l'évaluation des pertes de grossesses ?

Bien qu'une évaluation complète d'une perte de grossesse nécessite de nombreux tests, y compris des études cytogénétiques, ces tests sont coûteux et laborieux, et des études cytogénétiques ne peuvent tout simplement pas être justifiées pour chaque échec de grossesse. Toutefois, un examen attentif par un pathologiste peut souvent être utile dans la mesure où il peut déterminer dans quelle condition la grossesse s'est arrêtée, et si elle semble s'être développée normalement ou non. L'âge de développement est particulièrement utile, car plus tôt se produit l'arrêt de croissance, plus il est probable que le produit de conception présente un caryotype anormal. Tout embryon ou fœtus doit être examiné de près pour détecter les preuves d'anomalies congénitales. Les embryons avec des malformations et des retards de croissance sont plus susceptibles de présenter des caryotypes anormaux.

Distinguer un AS chromosomiquement normal ou non est un avantage considérable pour la patiente, car ceci peut aider à déterminer d'éventuels besoins d'études complémentaires et à prédire le risque de récurrence. En effet, de nombreux auteurs préconisent une forte corrélation entre les constitutions chromosomiques du premier AS et des grossesses suivantes. Les patientes ayant vécu un AS chromosomiquement anormal sont plus susceptibles de faire l'expérience de caryotypes anormaux dans les grossesses ultérieures, alors que les pertes de grossesses chromosomiquement normales sont plus aptes à présenter des caryotypes normaux dans les grossesses suivantes [Hassold, 1980 ; Warburton et *al.*, 1987 ; French et Bierman, 1962].

Les études chromosomiques sont particulièrement utiles pour les mortinaissances soupçonnées d'avoir des anomalies cytogénétiques. Il pourrait également y avoir un risque accru d'aberrations chromosomiques en présence d'anasarque, de macérations, ou des antécédents de pertes antérieures [Mueller et *al.*, 1983]. Les études cytogénétiques devraient probablement être réalisées dans tous les cas où une explication physiopathologique à leur décès n'est pas identifiée.

D'autre part, et bien qu'un ASR est défini par la survenue de trois échecs consécutifs, aujourd'hui, de nombreux couples trouvent que trois fausses-couches sont plus que ce qu'ils sont prêts à accepter avant de chercher des réponses aux pertes de grossesse. Ça pourrait être une justification pour lancer une nouvelle évaluation après le deuxième échec de grossesse.

Bien que des progrès considérables aient été réalisés dans la compréhension des causes sous-jacentes d'échecs de grossesses, notre connaissance des mécanismes impliqués dans la méiose, la fécondation et la mitose est encore assez limitée, et les facteurs influant sur la survie de l'embryon ne sont pas encore compris. L'âge de la mère semble augmenter la fréquence des conceptions anormales, mais pourrait également diminuer l'efficacité de ce processus de contrôle. Il y a malheureusement peu à offrir à un couple qui a un risque augmenté pour des grossesses cytogénétiquement anormales. Quand un réarrangement est incompatible avec une issue normale de la grossesse (tel que l'isochromosome 21), l'utilisation d'ovules ou de sperme d'un donneur pourrait être une option, mais il n'existe pas d'alternative claire pour les couples ayant des aneuploïdies ou des polyploïdies récurrentes. Toutefois, et bien que nous ne puissions pas prévoir les risques, nous pouvons tenter d'offrir aux patients une explication des raisons pour lesquelles une grossesse donnée a échoué, et proposer un traitement qui pourrait améliorer les chances de réussite future. Un examen prénatal peut également être proposé dans le cas où il existe un risque accru d'anomalies cytogénétiques. Il est important de garder à l'esprit que même avec une histoire de grossesse chromosomiquement anormale, la plupart des couples ont une bonne probabilité de succès pour des grossesses ultérieures.

Enfin, la cytogénétique ne doit pas être considérée seulement comme un ensemble de techniques utiles en pratique médicale, mais comme une partie de la génétique humaine qui contribue à des recherches aussi diverses que l'inactivation de l'X, la signification des polymorphismes chromosomiques, la ségrégation des anomalies, la dynamique de leur évolution in vitro, le comportement des chromosomes à la mitose et à la méiose et les mécanismes en cause, les anomalies des télomères...

L'association des différentes techniques de cytogénétique, qui offrent maintenant un choix très étendu, ouvrent largement la voie à de très nombreux développements, dont l'étude du développement humain et des variations du génome.

Etude statistique

Partie 2 :**I. Population étudiée :**

Nous avons réalisé une étude rétrospective fondée sur l'analyse comparative d'un échantillon recruté à Sidi Bel Abbés (E1) et d'un échantillon recruté à Clermont-Ferrand (E2) (**Tableau 1**). Pour le premier échantillon, il s'agissait de femmes ayant subi un avortement spontané (AS) et admises à la maternité de l'hôpital Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbés. Pour le deuxième échantillon, il s'agissait de femmes ayant subi un AS et pour lesquelles un prélèvement pour établir le caryotype du produit de fausse-couche avait été adressé dans le Service de Cytogénétique du CHU Estaing de Clermont-Ferrand. Cette étude a couvert une période de six années, allant de Janvier 2005 à Décembre 2010. Des fiches techniques individuelles ont été établies à partir des dossiers des patientes recrutées. Chaque fiche comportait les données suivantes : l'âge maternel, l'âge gestationnel, la parité, la gestité, les antécédents d'avortements spontanés et pour les patientes de Clermont-Ferrand, le résultat du caryotype fœtal, ce type d'analyse n'étant pas réalisé en Algérie.

Les données recueillies ont été saisies et analysées à l'aide du logiciel EXCEL.

Les résultats obtenus sont donnés sous forme d'histogrammes.

II. Résultats et discussion :**II.1. Caractéristiques des deux échantillons :**

	Echantillon 1	Echantillon 2
Taille de l'échantillon	54720 NV/4349 AS	264 AS et MFIU
Age maternel moyen	31.47	30.79
• Patiente la plus jeune	17	15
• Patiente la plus âgée	60	46
Age gestationnel moyen (SA)	10.96	22.52
• AG le plus jeune	5	7
• AG le plus vieux	24	40

NV : Naissances vivantes, AS : Avortements Spontanés, MFIU : Mort Fœtale *In Utero*, AG : Age Gestationnel

Tableau 1: Caractéristiques des deux échantillons étudiés (E1 : Sidi Bel Abbès, E2 : Clermont Ferrand)

II.2. Analyse des données :

II.2.1. La fréquence des AS :

L'incidence des avortements spontanés est un indice de santé, utile dans les études épidémiologiques. Dans notre étude, l'incidence des avortements spontanés a été calculée pour l'échantillon de Sidi Bel Abbés par rapport au nombre total des grossesses enregistrées annuellement durant la période étudiée (naissances vivantes plus les avortements enregistrés).

La **figure 1** montre, pour l'échantillon de Sidi Bel Abbés, l'incidence annuelle des AS entre 2005 et 2010. Le taux d'avortements spontanés varie entre 7 et 9% et semble demeurer constant au cours des six années, avec une incidence moyenne de 8% (**Figure 2**).

Bien que l'incidence exacte des avortements spontanés dans une population soit difficile à évaluer, le taux que nous avons obtenu est légèrement en dessous de ce que rapporte la littérature. En effet, certains auteurs situent cette incidence entre 10 et 15% pour les grossesses cliniquement reconnues [Miller et *al.*, 1980 ; Kline, 1989 ; Chard, 1991, Rai et Regan, 2006]. D'autres l'estiment à 20% (touchant environ une grossesse sur cinq) [Merviel et *al.*, 2005 ; Savitz et *al.*, 2002]. D'autres enfin vont jusqu'à présumer que ce taux pourrait être 4 à 5 fois supérieur considérant qu'environ deux tiers des grossesses échouent, si on prend en considération les grossesses infracliniques, c'est-à-dire les grossesses s'arrêtant juste après la conception et les grossesses biochimiques [Merviel et *al.*, 2005 ; Jauniaux et Burton, 2005 ; Rai et Regan, 2006].

Ces différentes données ne sont pas contradictoires et expliquent la relative faible incidence des AS dans notre étude. En effet, en général les femmes ne consultent pas ou peu avant la fin du premier trimestre de la grossesse et un très grand nombre d'AS survient très tôt dans la grossesse, avant ou au moment de l'implantation ou avant la découverte clinique de la gestation. De plus, les femmes peuvent présenter une large variété de symptômes lors d'une fausse-couche et le nombre d'avortements spontanés à la maison, sans aucune intervention médicale, est inconnu.

Une autre hypothèse avancée par l'équipe médicale de la maternité Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbés, est que la prise en charge des femmes enceintes au niveau de la maternité s'est beaucoup améliorée à partir de 2005, année de mise en service de la dite maternité, avec de nouvelles structures d'accueil et de suivi des grossesses à hauts risques.

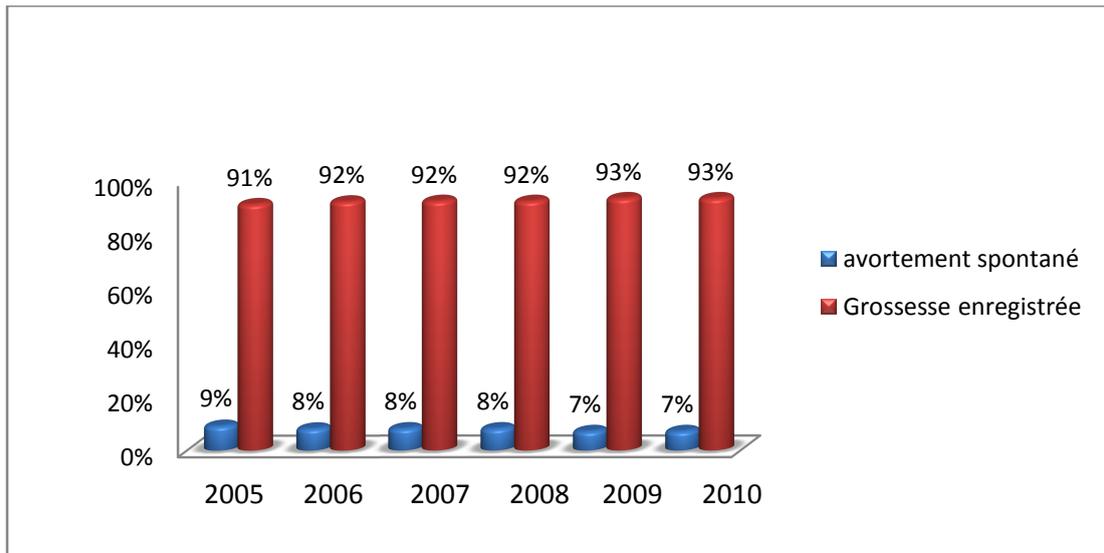


Figure 1 : Incidence annuelle des AS chez les patientes de Sidi Bel Abbés

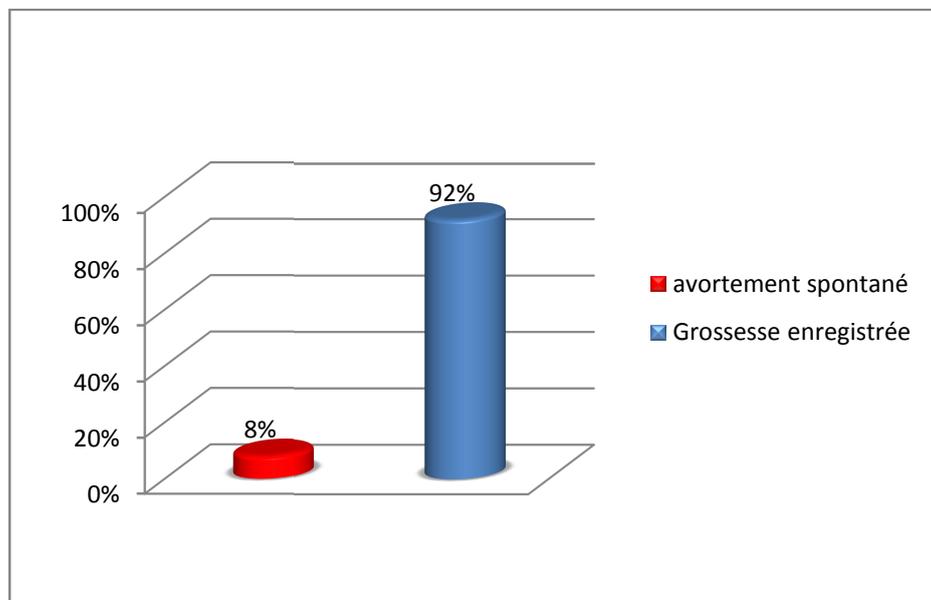


Figure 2 : Incidence moyenne des AS durant la période 2005-2010 à Sidi Bel Abbés

II.2.2. Répartition des AS en fonction de l'âge maternel :

La plupart des études portant sur les facteurs de risque des avortements spontanés a conclu que les effets négatifs prédominants sont ceux de l'âge maternel avancé (avec une nette augmentation du risque après 35 ans) [Leridon, 1977 ; Regan et *al.*, 1989 ; Coste et *al.*, 1991 ; Fretts et *al.*, 1995, NyboAndersen et *al.*, 2000, Osborn et *al.*, 2000 ; Glinianaia et *al.*, 2005]. Cependant, le comportement reproducteur dans notre société a changé et, pour diverses raisons sociales (études, travail, mariage tardif...), beaucoup de femmes choisissent de retarder la maternité. A titre d'exemple, et selon les données de recensement

du Royaume Uni, le nombre de bébés nés de mères âgées de 35 ans ou plus a doublé entre 1985 et 2001, passant de 8% à 16% du total des naissances [Stirrat, 1990 ; Sullivan et *al.*, 2004]. Aux Etats-Unis, cette proportion est passée de 19% en 1976 à 37,4% en 1998 [Ventura et *al.*, 1988, Guyer et *al.*, 1999]. Bien qu'il n'existe aucune donnée comparable pour les avortements spontanés, il est logique de penser que ce taux a également augmenté. En effet, une vaste étude prospective a montré que l'âge maternel à la conception est un solide facteur de risque des AS [Nybo Andersen et *al.*, 2000] en raison d'une augmentation des conceptions chromosomiquement anormales [Stirrat, 1990 ; Hassold et *al.*, 1985] ; ainsi, le risque de perte fœtale augmente considérablement après l'âge de 35 ans [Nybo Andersen et *al.*, 2000]. Dans notre étude sur l'échantillon de Sidi Bel Abbés, nous avons également observé une augmentation significative de l'incidence des AS avec l'augmentation de l'âge maternel, passant de 7,2% chez les patientes âgées de 24-29 ans à 11% chez les 35-39 ans et 16% chez les 40-45 ans (**Figure 3**). Ceci est en accord avec les résultats de la littérature [Dominguez et *al.*, 1991 ; Cano et *al.*, 1995 ; Nyboandersen et *al.*, 2000 ; Osborne et *al.*, 2000]. La probabilité d'une grossesse réussie chez les femmes âgées de 40 ans ou plus est donc faible, avec des risques de fausse couche, de grossesse extra-utérine, ou une mortinaissance beaucoup plus élevée que chez les femmes dans leur trentaine [Nybo Andersen et *al.*, 2000]. L'association observée entre âge maternel et augmentation des AS pourrait être le résultat de modifications liées à l'âge, telles que l'augmentation des conceptions chromosomiquement déséquilibrées, une moindre qualité de la muqueuse utérine pénalisant l'implantation de l'œuf ou une altération des fonctions hormonales. En outre, l'âge pourrait être un facteur de majoration de l'exposition à des facteurs de risques encore inconnus [Hassold et Chiu, 1985 ; Cano et *al.*, 1995].

Comme nous ne disposons pas des informations nécessaires (nombre total de grossesse et nombre total d'AS) pour mener une étude comparative sur l'âge maternel concernant l'échantillon de Clermont-Ferrand, nous avons calculé la répartition des AS par tranche d'âge sur les seules données dont nous disposons, à savoir celles des AS pour lesquels un prélèvement du produit de fausse-couche avait été adressé au Service de Cytogénétique du CHU Estaing. Nous avons obtenu le graphe suivant (**Figure 4**) :

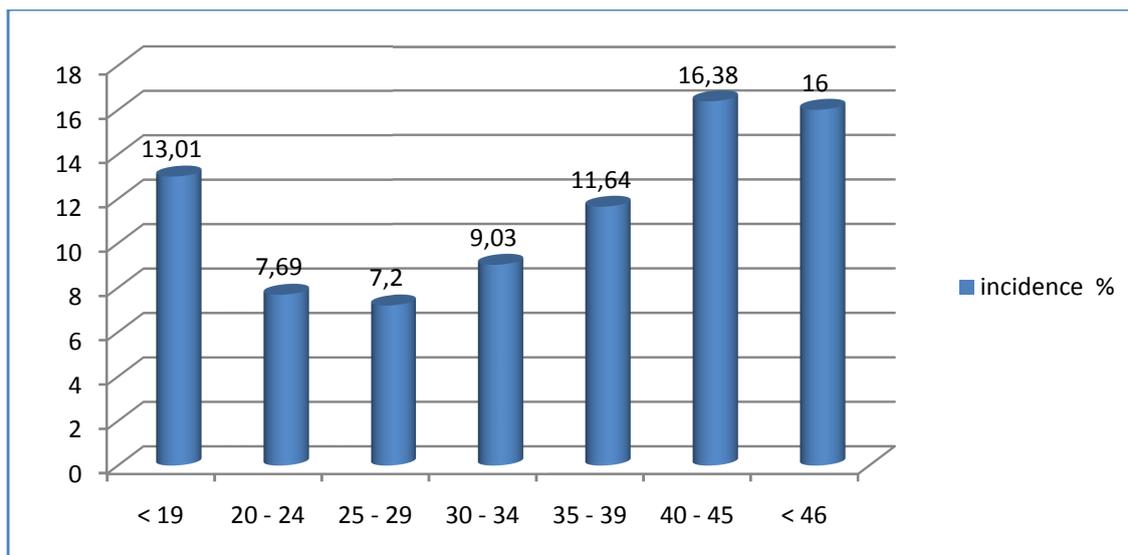


Figure 3 : Incidence des AS en fonction de l'âge maternel (Sidi Bel Abbès)

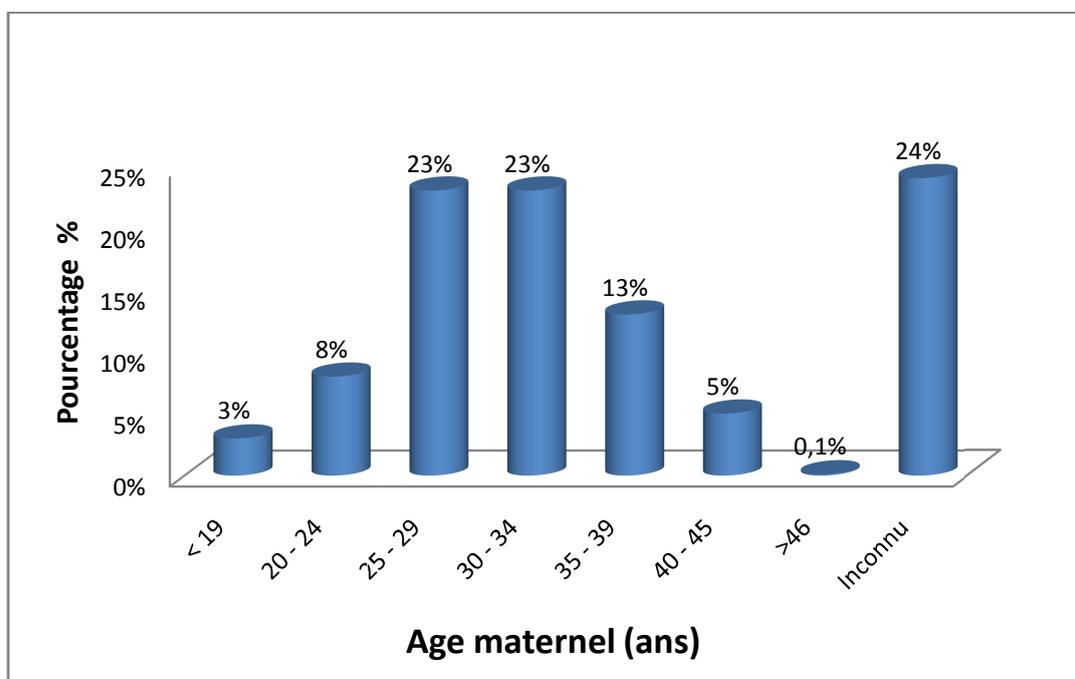


Figure 4 : Répartition des AS par groupes d'âge maternel (Clermont-Ferrand)

Un calcul similaire a été réalisé sur l'échantillon de Sidi Bel Abbès (**Figure 5**). Bien que la proportion de données manquantes pour l'âge maternel soit élevée pour l'échantillon de Clermont-Ferrand, ce qui pourrait induire un biais dans l'interprétation des données, nous avons noté que le pic des AS concernait les tranches d'âge 25-29 ans et 30-34 ans dans les deux échantillons. Cette apparente forte proportion des AS durant ces deux tranches d'âge n'est pas à interpréter comme une forte incidence des AS durant ces périodes, mais est liée au fait que le taux de reproduction est à son acmé durant ces périodes. Au-delà de 35 ans,

le taux de reproduction diminue et l'incidence des AS dans E1 augmente : la fertilité diminue donc.

Comme les deux graphes (**Figures 4 et 5**) sont similaires, il semble logique de conclure que les effets de l'âge maternel dans l'échantillon de Clermont-Ferrand sur l'augmentation de l'incidence des AS soient identiques à ceux observés pour l'échantillon Belabésien.

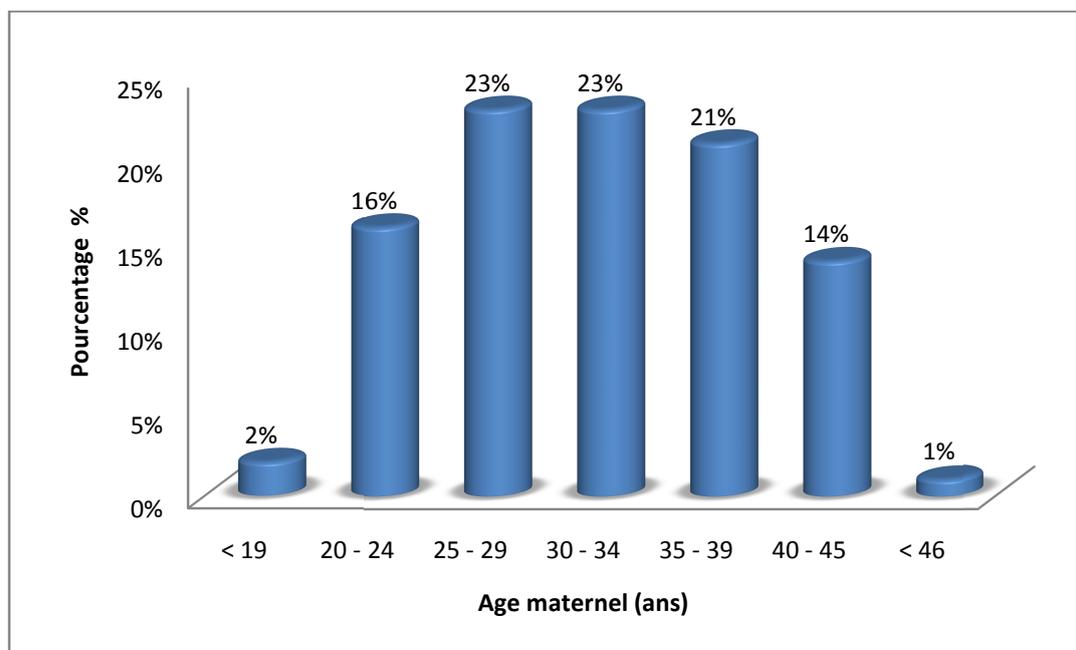


Figure 5 : Incidence des AS par tranches d'âge maternel (Sidi Bel Abbés)

II.2.3 Répartition des AS selon l'âge gestationnel :

Les figures 6, 7 et 8 montrent la répartition des AS en fonction de l'âge gestationnel. Les AS sont généralement classés en AS précoces (survenant avant la 12^{ème}SA) et en AS tardifs (survenant entre la 12^{ème} et la 24^{ème}SA [Bringham et al., 1999]).

La grande majorité des AS survient tôt, avant 12 SA [Bringham et al., 1999 ; Bricker et Farquharson, 2002 ; Ugwumadu et al., 2003]. Mattar et Mendes [Mattar et Mendes, 2002] estiment que 80% des AS surviennent avant la fin du premier trimestre de grossesse. Cet état de fait correspond aux résultats obtenus en Algérie, où 77% des AS sont survenus avant 12 semaines de gestation (**Figure 6**).

Dans notre étude, le pic d'incidence s'est situé au cours du second mois de grossesse, entre la 6^{ème} et la 10^{ème}SA, totalisant une incidence de 40% uniquement pour cette période (**Figure 7**). Cette donnée est à rapprocher de celles de Bjorn et ses collègues [Bjorn et al., 2011] situant le pic d'incidence des AS entre la 7^{ème} et la 11^{ème}SA. La proportion de 1%

enregistrée au premier mois est de toute évidence due au sous-diagnostic, les femmes ne consultant généralement pas avant la 4^{ème} semaine de grossesse et les pertes embryonnaires n'étant pas enregistrées.

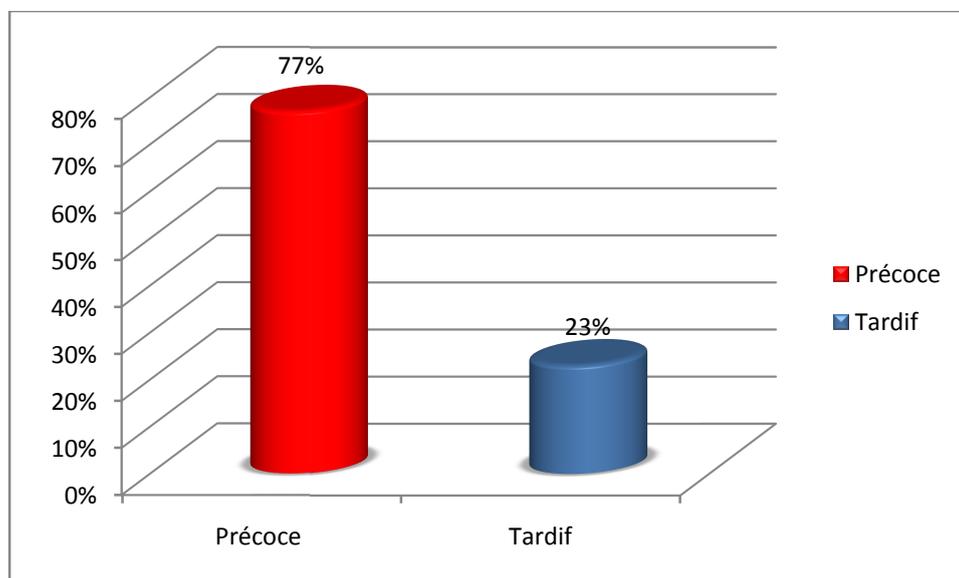


Figure 6 : Répartition des AS en fonction de l'âge gestationnel (Sidi Bel Abbés)

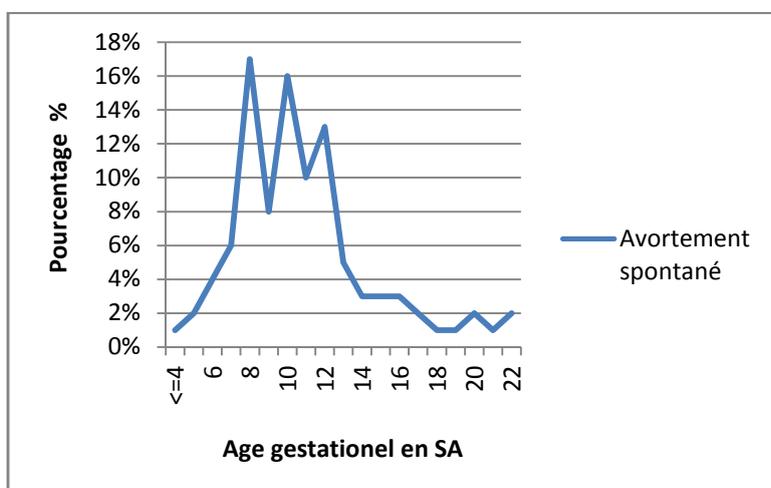


Figure 7 : Incidence des AS en fonction de l'âge gestationnel à Sidi Bel Abbés

Après la 12^{ème} SA, la figure 6 montre le passage du taux d'AS sous la barre des 5%. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Bringham et ses collègues [Bringham et al.,1999], qui avaient trouvé que moins de 5% des AS survenaient après l'identification de l'activité cardiaque embryonnaire, c'est-à-dire après la 1^{ère} échographie à la 12^{ème} SA.

Le graphique 8 montre les résultats obtenus pour l'E2 (CHU Estaing). La proportion d'âges gestationnels inconnus est de 6% ce qui pourrait biaiser l'interprétation des

résultats. Néanmoins, le graphe montre une très nette prépondérance des avortements spontanés tardifs, ce qui ne correspond pas aux attentes si on s'en réfère aux données de l'E1 et à celles de la littérature. Cependant, ces résultats doivent être analysés avec une attention particulière, en prenant en compte que des prélèvements de produits de fausse couche à visée cytogénétique ne sont que rarement réalisés avant 12 SA ; aussi, pour l'E2, les AS avant 12 SA ne sont pas répertoriés.

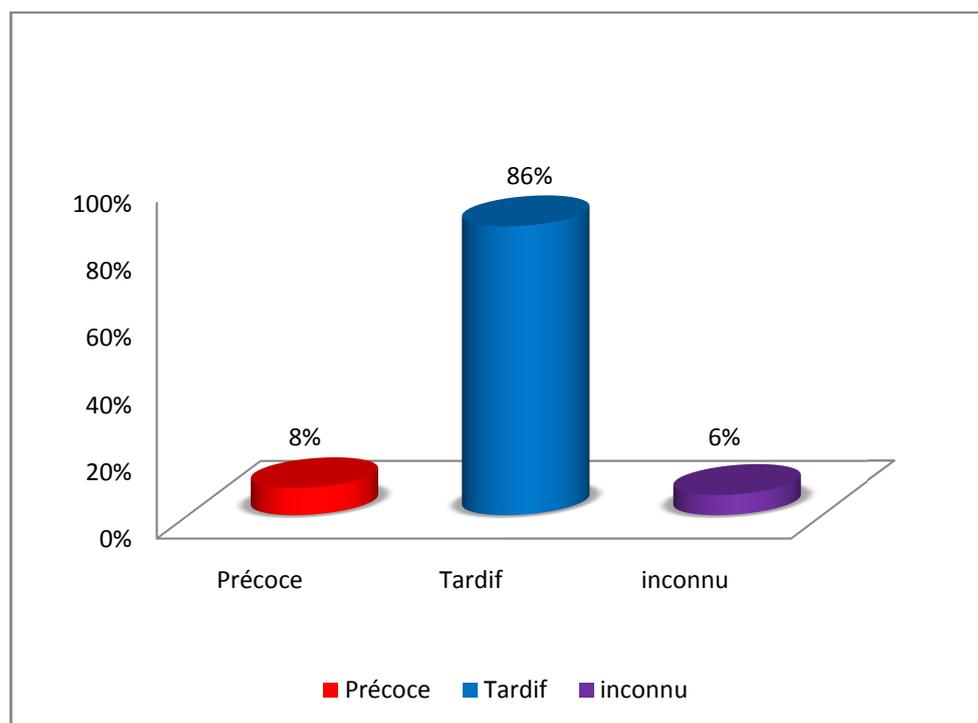


Figure 8 : Répartition des AS en fonction de l'âge gestationnel à Clermont-Ferrand

II.2.4. Répartition des AS en fonction de la parité :

Les antécédents de reproduction sont un facteur prédictif indépendant de l'issue future de la grossesse. Bien que la plupart des études désigne la pluriparité comme un facteur de risque connu pour les AS [Christiansen, 1997 ; Naylor et Warburton, 1979 ; Czeizel et *al.*, 1984], les graphes obtenus à Sidi Bel Abbés (**Figure 9**) et à Clermont-Ferrand (**Figure 10**) contredisent en première analyse cette théorie.

Notre étude montre en effet, que pour nos deux échantillons (Sidi Bel Abbés et Clermont-Ferrand), le taux d'AS est le plus élevé chez les primigestes, avec respectivement 31% et 37% d'AS. Ce résultat n'est pas en contradiction avec les données de la littérature ; en effet, dans notre étude, nous avons étudié la répartition et non

l'incidence des AS en fonction de la parité, sachant que le nombre d'AS est de moins en moins important au fur et à mesure que la parité augmente.

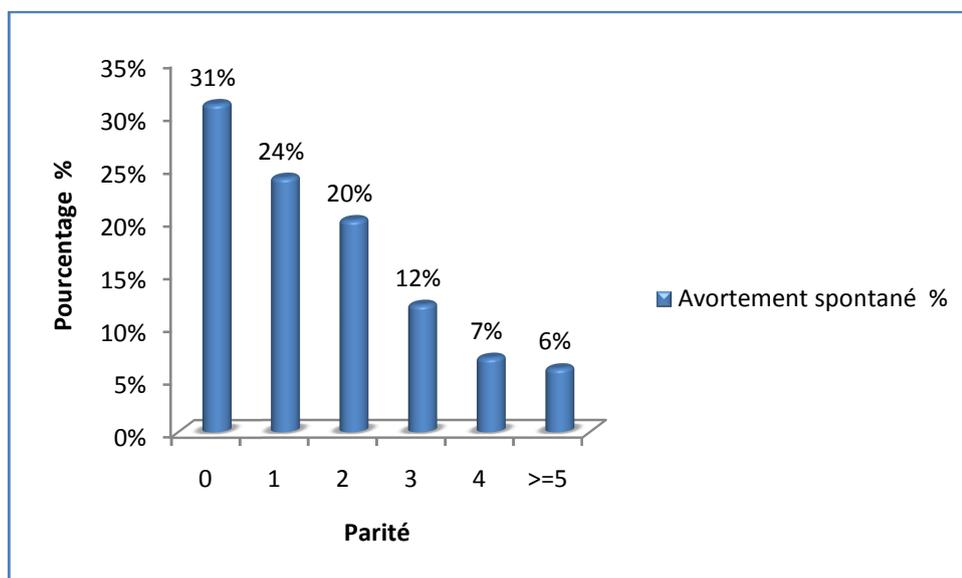


Figure 9 : Répartition des AS en fonction de la parité des patientes de Sidi Bel Abbès

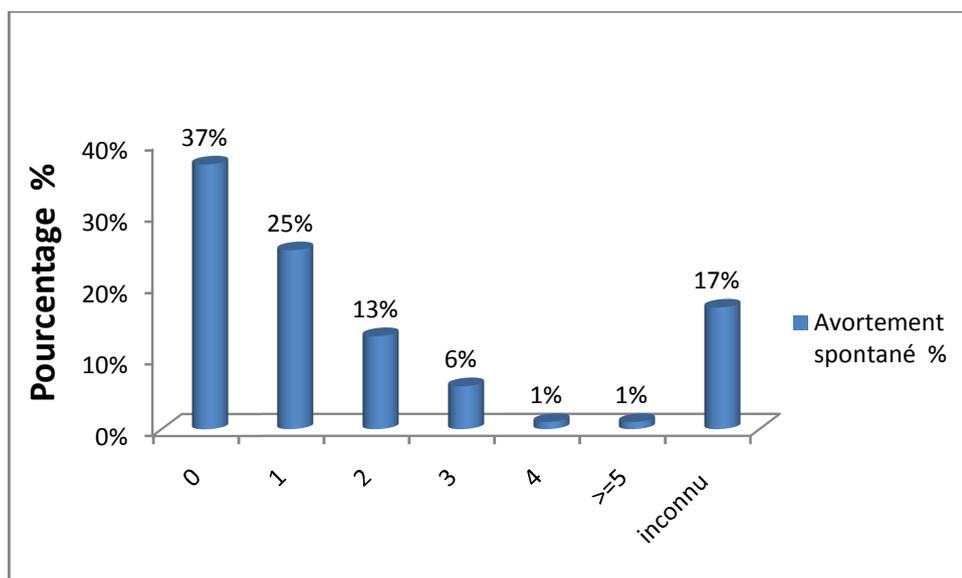


Figure 10: Répartition des AS en fonction de la parité des patientes de Clermont-Ferrand

Ces résultats sont tout de même soutenus par une étude Suédoise menée par Raymond et ses collègues [Raymond et *al.*, 1996] qui stipule que le risque d'AS est plus élevé chez les nullipares, même lorsque l'analyse exclut les femmes hypertendues, diabétiques, présentant des complications placentaires ou un retard de croissance intra-utérin.

II.2.5. Répartition des AS en fonction de leur répétition :

Selon le *Royal College of Obstetricians and Gynecologists* [1998] et *The American College of Obstetricians and Gynecologists* [2001], les avortements spontanés à répétition (ASR) sont souvent définis comme la survenue d'au moins trois pertes de grossesses consécutives avant la 24^{ème} semaine d'aménorrhée. Dans près de 50% des cas, l'étiologie des ASR reste inconnue [Stephenson, 1996], cependant, les facteurs de risque connus des ASR sont les troubles génétiques, notamment les anomalies chromosomiques parentales qui représentent une étiologie importante, avec une prévalence de ces anomalies variant de 2 à 8% chez les couples souffrant d'ASR [Elghezal et al., 2007], les pathologies utérines, les dysfonctionnements endocriniens, les maladies auto-immunes, la thrombophilie ainsi que les facteurs environnementaux [Rai et Regan, 2006].

La plupart des études menées sur le sujet estime l'incidence des ASR chez les femmes en âge de procréer entre 1 et 5% [Carrington et al, 2005 ; Hogge et al, 2003 ; Stirrat, 1990 ; Coulam, 1991 ; Scott, 1994]. Cette fréquence augmente avec le nombre d'accidents ultérieurs : 17 à 35 % après deux FCS, 25 à 46 % après trois FCS et supérieur à 50 % après six AS [Ogasawara et al., 2000]. L'incidence des ASR dans notre étude se situe dans la fourchette avancée par ces différentes études, avec des taux d'ASR respectifs de 3% (**Figure 11**) et de 5% (**Figure 12**) en France et en Algérie.

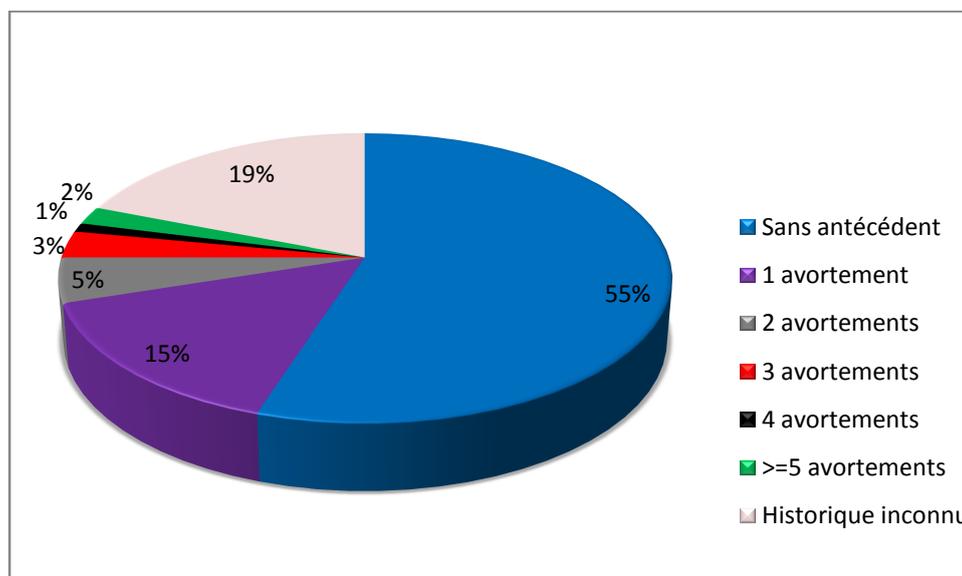


Figure 11 : Répartition des AS en fonction des antécédents (Clermont-Ferrand)

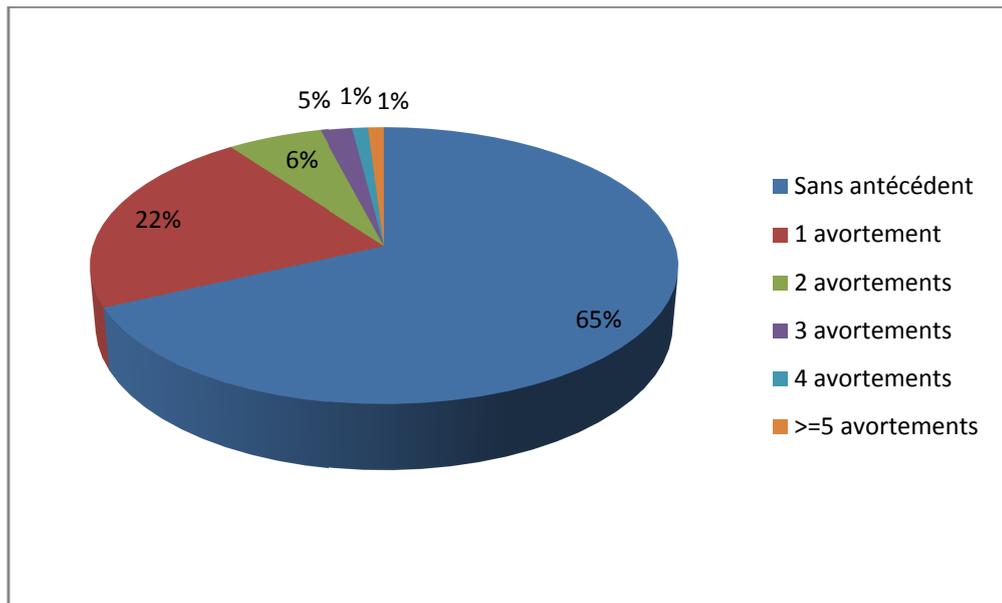


Figure 12 : Répartition des AS en fonction des antécédents à Sidi Bel Abbés

L'augmentation du risque d'AS avec le nombre d'accidents antérieurs est un argument en faveur de la réalité d'un syndrome d'ASR. On estime que la probabilité d'avoir un enfant vivant diminue de 23 % à chaque avortement supplémentaire au-delà de trois avortements [Stirrat, 1990]. Normalement il faut attendre la survenue de trois AS (définition des ASR) pour entreprendre un bilan étiologique. Cependant, même en résistant à la pression légitime des couples « pour trouver une cause, et donc proposer un traitement », ce bilan d'ASR est souvent pratiqué après deux AS car les taux de récurrence après 2 ou 3 AS sont proches. Le premier rôle du praticien est d'abord de rassurer le couple en l'informant que la probabilité de mener à bien une grossesse après trois AS est de 60 % [Clifford et *al.*, 1994].

II.2.6. Résultats de l'analyse cytogénétique conventionnelle :

A Clermont-Ferrand, 264 produits de fausse couche spontanée ont été analysés durant la période étudiée. Les résultats obtenus sont représentés dans le graphe suivant (**Figure 13**). Celui-ci montre un taux de contamination de 3% et des échecs de culture ont été observés dans 44% dans cas. Huit pour cent des produits d'AS analysés présentaient une anomalie chromosomique (**Tableau 1**).

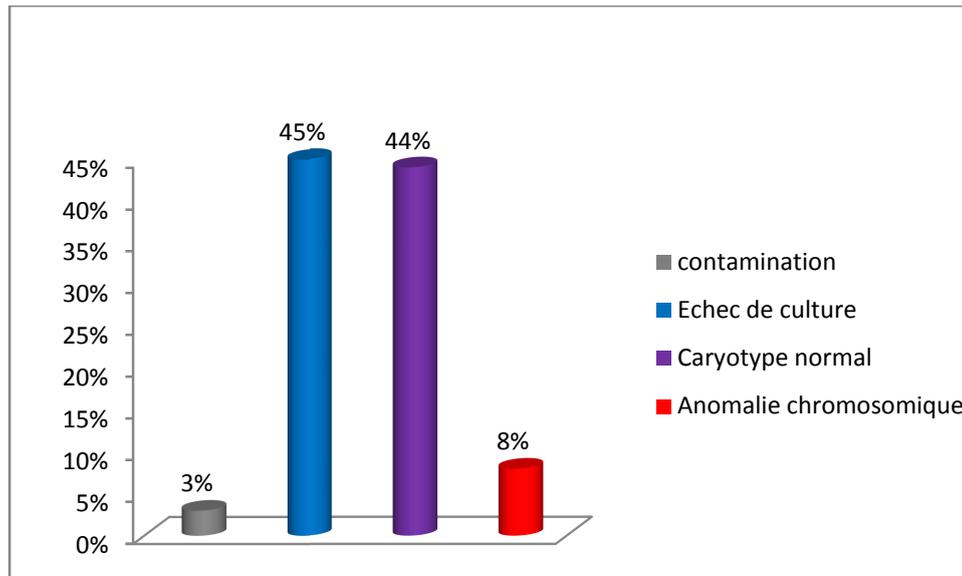


Figure 13 : Résultats de l'analyse cytogénétique conventionnelle à Clermont-Ferrand

Ces résultats ne sont pas surprenants étant donné que les études cytogénétiques ont toujours été limitées, après évacuation du produit de conception retenu *in utero*, par ces deux aspects, la contamination des prélèvements par des cellules maternelles et l'absence de prolifération des cellules *in vitro* liée à une macération *in utero* du conceptus. Historiquement, le taux de réussite des caryotypes était compris entre 48 et 59% [Hassold, 1986 ; Boué et *al.*, 1975 ; Kajii et *al.*, 1980], ce qui correspond parfaitement au taux de réussite que nous avons relevé dans notre étude estimé à 52% [Caryotypes normaux (44%) + caryotypes avec anomalies chromosomiques (8%)]. Une autre alternative possible pour le cytogénéticien : recourir aux techniques moléculaires de cytogénétique, celles-ci ayant le mérite de ne pas nécessiter une culture préalable, d'être rapides et de ne nécessiter que peu de matériel, même non vivant.

Cas	Age maternel	Age gestationnel (SA)	Histoire reproductive	Caryotype
1	27	14	G1P0	47,XX,+21
2	46	Inconnu	G4P3	47,XX,+18
3	27	13	G1P0	92,XXYY
4	42	20	G1P0	47,XX,+21
5	27	12	G4P1 (1	69,XXX
6	29	12	IMG)	69,XXX
7	29	26	G1P0	46,XX,del(13)(q21;q33.3)
8	28	28	G2P1	63,XXX
9	35	29	G3P1 (1 IVG)	46,XX[25]/47,XX,+16[5]
10	34	13	G4P3	69,XXY
11	27	13	Inconnu	69,XXX
12	32	12	G1P0	69,XXX
13	37	10	G5P2 (1 IVG)	47,XXX
14	39	Inconnu	G1P0	46,XX/47,XX,+mar/50,XXX,+7,+12,+13
15	34	9	G1P0	47,XY,+21
16	27	Inconnu	G1P0	69,XXY
17	26	32	Inconnu	XY(46,XY[12]/45,X[5]
18	45	13	G1P0	47,XX,+21
19	21	Inconnu	G6P1 51(1IVG+ 1IMG T21) G1P0	69,XXX

*G : Gestité, P : Parité

Tableau 1 : Caryotypes aberrants obtenus par l'analyse des produits d'AS adressés au CHU Estaing.

Conclusion :

L'étude des avortements spontanés est importante sous différents aspects médicaux, car ils peuvent être considérés comme le plus fréquent des issues fâcheuses de la grossesse. La mortalité fœtale semble donc être un mécanisme très efficace de sélection naturelle, ne permettant qu'aux grossesses non-pathologiques d'arriver à terme.

Il ressort de notre étude que la situation des AS dans les régions de Sidi Bel Abbès et de Clermont-Ferrand ne déroge pas aux conclusions d'études précédentes menées un peu partout dans le monde. En effet, et bien que l'incidence des AS soit relativement inférieure aux statistiques, il n'en demeure pas moins que les facteurs de risque restent les mêmes, à savoir, l'augmentation de l'âge maternel (induisant une augmentation de conceptions chromosomiquement déséquilibrées) et la primigestité.

Il nous a également été possible de conclure que la majorité des AS survenaient précocement durant la grossesse et que le taux des ASR se situait dans la fourchette des 2-8% avancée par la plupart des études sur le sujet.

Enfin, les échantillons analysés par les techniques de cytogénétique ont montré un taux d'échecs très élevé estimé à 45%, et seulement 8% d'anomalies chromosomiques, argument en faveur de l'utilité du recours aux techniques de biologie moléculaire pour une analyse plus efficace des produits d'AS.

Conclusion

Conclusion Générale

Notre objectif, reposant sur l'étude cytogénétique par des techniques moléculaires de produits d'AS, était de mettre en évidence les anomalies chromosomiques les plus fréquentes à l'origine des pertes fœtales dans deux échantillons de populations algérienne et française.

Les techniques de FISH et de MLPA ont montré que les chromosomes peuvent être efficacement étudiés à partir de villosités choriales prélevés sur des produits d'AS sans avoir recours à la culture cellulaire. Elles représentent des outils simples, rapides et sensibles pour la détection des anomalies chromosomiques et sont une alternative très intéressante à la culture, permettant le diagnostic de désordres génomiques indécélables par les techniques conventionnelles. Il nous a ainsi été possible de détecter à l'aide de la FISH 3 trisomies 21, 1 trisomie 18, 1 trisomie 13, 1 mosaïque 46,XX/47,XX+21, 3 triploïdies et 1 monosomie X (Turner). Par ailleurs, 2 monosomies X ont été mises en évidence grâce à la MLPA. Les techniques moléculaires de la cytogénétique (FISH, MLPA...) sont des approches alternatives au caryotype et très pertinentes pour établir et identifier l'étiologie chromosomique des AS, notamment quand la qualité du matériel biologique à disposition interdit le recours aux cultures cellulaires. Cependant les deux techniques présentent des inconvénients : la FISH en direct est ciblée et ne détecte que les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y ; elle est de plus coûteuse. La MLPA, bien qu'offrant une vue plus globale du génome permettant de détecter toutes les aneuploïdies en plus de 21 syndromes microdélétionnels, demeure incapable de détecter la contamination de l'ADN fœtal par de l'ADN maternel et les changements de ploïdie.

En 2013, la prise en charge des AS a fait un bond en avant avec l'avènement des « BACs on Beads » ou BoBs et le recours à l'ACPA (Analyse Chromosomique sur Puces à ADN). Les BoBs, pratiqués en première intention, permettent de détecter de façon ciblée des gains et pertes d'ADN dans 9 régions génomiques pertinentes en prénatal et les aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y ; cette approche est « robuste » et peut même être pratiquée sur du matériel macéré et, bien sûr, en absence de prolifération des cellules en culture. Lorsque le résultat des BoBs est négatif, une ACPA est alors réalisée, sachant que le sexe ayant été déterminé par les BoBs, l'échantillon pourra être correctement cross-matcher avec un témoin de même sexe. Si un déséquilibre est mis en évidence par l'ACPA, il sera alors confirmé par une autre technique moléculaire (FISH ou QF-PCR) et son caractère hérité ou *de novo* sera déterminé. De plus, le caryotype des parents pourra alors être établi afin d'appréhender les mécanismes de survenue de l'anomalie.

Références bibliographiques

-
- Alberman E, 1988. The epidemiology of repeated abortion In: Beard RW, Sharp F Ed. *Early pregnancy loss: mechanisms and treatment*. London: RCOG: 9-17.
- American College of Obstetricians and Gynecologists, 2001. *Management of recurrent early pregnancy loss*. ACOG practice bulletin n₂₄. Washington, DC: American College of Obstetricians and Gynecologists.
- Ariel I, Lustin O, Oyer CE et al., 1994. *Relaxation of imprinting in trophoblastic disease*. *Gynecol. Oncol.* **53**, 212–219.
- Azmanov DN, Milachich TV, Zaharieva BM, et al., 2007. *Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization*. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*; **131**:127–31.
- Baldinger S, Millard C, Schmeling D, and Bendel RP, 1987. *Prenatal diagnosis of trisomy 20 mosaicism indicating an extra embryonic origin*. *Prenat. Diag* ; **7**, 273–276.
- Beever CL, Stephenson MD, Penaherrera MS, et al., 2003. *Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies*. *Am J Hum Genet*; **72**:399–403
- Bell K, Van Deerlin P, Haddad B, Feinberg R, 1999. *Cytogenetic diagnosis of “normal 46, XX” karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading*. *Fertil Steril*; **71**:334–41.
- Benirschke K and Kaufmann P, 1995. *Pathology of the Human Placenta*. 3rd ed. Springer-Verlag, New York.
- Berkowitz RS, Bernstein MR, Harlow BL et al., 1995. *Case-control study of risk factors for partial molar pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*; **173**: 788-794.
- Berkowitz RS, Goldstein DP and Bernstein MR, 1991. *Evolving concepts of molar pregnancy*. *J. Reprod. Med.* **36**, 40–44.
- Berle BB and Javert CT, 1959. *Stress and habitual abortion: their relationship and the effect of therapy*. *Am J Obstet Gynecol*; **77**: 706-718.
- Betts DR, Fear CN, Barry T, and Seller MJ, 1989. *A 45,X/69,XXY fetus*. *Clin. Genet*; **35**, 285–288.
- Bjørn AM, Nørgaard M, Hundborg HH, Nohr EA, Ehrenstein V, 2011. *Use of prescribed drugs among primiparous women: an 11-year population-based study in Denmark*. *Clin Epidemiol*; **3**:149-56.
- Blackburn WR, Miller WP, Superneau DW, Cooley NR, Zellweger H, and Wertelecki W, 1982. *Comparative studies of infants with mosaic and complete triploidy: An analysis of 55 cases*. *Birth Defects: Original Article Series*; **18**, 251–274.
- Boué A, Boué J and Gropp A, 1985. *Cytogenetics of pregnancy wastage*. *Adv. Hum. Genet*; **14**, 1–57.
- Boué J, Boué A, and Lazar P, 1975. *Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions*. *Teratology* **12**, 11–26.
- Boué J, Philippe E, Giroud A and Boué A, 1976. *Phenotypic expression of lethal chromosomal anomalies in human abortuses*. *Teratology*; **14**, 3–20.
- Braekeleer MD and Dao TN, 1990. *Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses*. *Hum. Reprod.* **5**, 519–528.
- Bricker L and Farquharson RG, 2002. *Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice*. *Hum Reprod* **17**:1345–1350.
- Brigham S, Conlon C, Farquharson RG, 1999. *A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurring miscarriage*. *Hum Reprod* **14**:2868–2871.
- Brown HL, 1991. *Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss*. *Clin. Obstet. Gynecol* ; **34**, 17–26.
- Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI et al., 2006. *Highthrough analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy*. *Am J Med Genet A*; **140**(24):2786–93.
- Bruno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, et al., 2009. *Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice*. *J Med Genet*; **46**:123–31.
-

-
- Buckett WM, Farquharson RG, Lukas MJ, Kingsland CR, 1997. *The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage*. Fertil Steril; 68: 506-509.
- Campana M, Serra A, and Neri G, 1986. *Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: A study of 269 balanced translocations*. Am. J. Med. Genet. 24, 341-356.
- Cano F, Simon C, Remohi J, Pellicer A, 1995. *Effect of ageing on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity*. Fertil Steril.; 64:584-589.
- Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G, 2001. *Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage*. Fertil Steril; 75:678-82.
- Carrington B, Rai R, Regan L, 2005. *Polycystic ovaries, insulin resistance, hypofibrinolysis and recurrent miscarriage*. J Soc Gynecol Investig; 12: 20.
- Carrington B, Sacks G, Regan L, 2005. *Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome*. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 17, 591-597.
- Carvalho B, Doria S, Ramalho C et al., 2010. *Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation dependent probe amplification: an alternative for speeding up results?*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.
- Chard T, 1991. *Frequency of implantation and early pregnancy loss in natural cycles*. Baillieres Clin Obstet Gynaecol; 5: 179-89.
- Christiansen OB, 1997. *Epidemiological, immunogenetic and immunotherapeutic aspects of unexplained recurrent miscarriage*. Dan Med Bull; 44:396-424.
- Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M, 1999. *Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR*. Prenat Diagn; 19:1099-1103.
- Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, Rueda L, Lloveras E, Fuster C, Adinolfi M, 2009. *Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18 000 consecutive clinical samples*. Mol Hum Reprod; 10: 839-46.
- Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L, 1994. *An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases*. Hum Reprod; 9:1328-32.
- Coste J, Job-Spira N and Fernandez H, 1991. *Risk of factors for spontaneous abortions: a case control study in France*. Hum. Reprod.; 6: 1332-1337.
- Coulam CB, 1991. *Epidemiology of recurrent spontaneous abortion*. Am J Reprod Immunol; 26:23-7.
- Cowchock FS, Gibas Z, and Jackson LG, 1993. *Chromosomal errors as a cause of spontaneous abortion: the relative importance of maternal age and obstetrical history*. Fertil. Steril.; 59: 1011-1014.
- Creasy MR, Crolla JA, and Alberman ED, 1976. *A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques*. Hum. Gene. 31, 177-196.
- Czeizel A, Bognar Z and Rocckenbauer M, 1984. *Some epidemiological data on spontaneous abortion in Hungary, 1971-80*. Journal of Epidemiology and Community Health, 38, 143-148.
- Davison EV and Burn J, 1990. Genetic causes of early pregnancy loss. In *Early Pregnancy Failure* Huisjes, HJ and Lind, T, eds., Churchill Livingstone, New York, pp. 55-78.
- Dejmek J, Vojtassak J, Malova J, 1992. *Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol; 46: 129-136.
- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al., 2005. *Diagnostic genome profiling in mental retardation*. Am J Hum Genet; 77(4):606-16.
- Dewald G and Michels VV, 1986. *Recurrent miscarriages: Cytogenetic causes and genetic counseling of affected families*. Clinic. Obstet. Gynecol. 29, 865-885.
- Dewald G, Alvarez MN, Cloutier MD, Kelalis PP, and Gordon H, 1975. *A diploid-triploid human mosaic with cytogenetic evidence of double fertilization*. Clin. Genet; 8, 149-160.
- Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, et al., 2007. *MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages*. Prenat Diagn; 27(8):765-71.
-

-
- Dominguez V, Calle E, Ortega P et al., 1991. *Adjusting risk factors in spontaneous abortion by multiple logistic regressions*. Eur. J. Epidemiol.; 78: 171-174.
- Donaghue C, Roberts A, Mann K., Ogilvie CM, 2003. *Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance*. Prenat Diagn; 23:201-10.
- Dória S, Carvalho F, Ramalho C, Lima V, Francisco T, Machado AP, Brandão O, Sousa M, Matias A, Barros A, 2009. *An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.
- Dória S, Lima V, Carvalho B, et al., 2010. *Application of touch FISH in the study of mosaic tetraploidy and maternal cell contamination in pregnancy losses*. J Assist Reprod Genet 27:657–662.
- Edmonds DK, Lindsay, K., Miller, JF, Williamson, E, and Wood, PJ, 1982. *Early embryonic mortality in women*. Fertil. Steril. 38, 447–453.
- Elghezal H, Hidar S, Mougou S, Khairi H, Saad A, 2007. *Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage*. Fertil Steril.; 88:721–3
- French FE and Bierman JM, 1962. *Probabilities of fetal mortality*. Public Health Re; 77, 835–847.
- Fretts RC, Shmittidil J, Mclean FH et al., 1995. *Increase maternal age and the risk of fetal death*. N. Engl.J.Med; 333: 953-957.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J et al., 2001. *Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)– Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions*. Eur J Hum Genet; 9: 539–47.
- Gadow EC, Lippold S, Otano L, Serafin E, Scarpati R, and Metayoshi T, 1991. *Chromosome rearrangements among couples with pregnancy losses and other adverse reproductive outcomes*. Am. J. Med. Genet. 41, 279–281.
- Gaillard DA, Paradis P, Lallemand AV, et al., 1993. *Spontaneous abortions during the second trimester of gestation*. Arch. Pathol. Lab. Med. 117, 1022–1026.
- Gardner RJM and Sutherland GR, 1996. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Oxford University Press, New York.
- Gelman-Kohan Z, Rosensaft J, Ben-Hur H, Haber A, and Chemke J, 1996. *Cytogenetic analysis of fetal chondrocytes: a comparative study*. Prenat. Diagn. 16(2), 165–168.
- Gerdes T, Kirchhoff M, Bryndorf T, 2005. *Automatic analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification products (exemplified by a commercial kit for prenatal aneuploidy detection)*. Electrophoresis; 26:4327–32.
- Ghilchrist DM, Livingston JE, Hurlburt JA, Wilson RD, 1991. *Recurrent spontaneous pregnancy loss: Investigation and reproductive follow-up*. J Reprod Med; 36: 184-188.
- Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pearce MS, Parker L, 2005. *Temporal changes in the distribution of population risk factors attenuate the reduction in perinatal mortality*. J Clin Epidemiol, 58(12):1299-1307.
- Greenwold N, Jauniaux E, 2002. *Collection of villous tissue under ultrasound guidance to improve the cytogenetic study of early pregnancy failure*. Hum Reprod; 17: 452–56.
- Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, et al., 2003. *Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities*. Health Technol Assess; 7(10):1–146.
- Gross SJ, Bajaj K, Garry D et al, 2011. *Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes*. Prenat Diagn;31:295–66.
- Guyer B, Hoyert DL, Martin JA et al., 1999. *Annual summary of vital statistics-1998*. Pediatrics; 104: 1229-1246.
- Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, et al., 2009. *Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant*. J Med Genet; 46:223–32.
- Hassold T, 1980. *A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions*. Hum. Genet. 32, 723–730.
- Hassold T, 1986. *Chromosome abnormalities in human reproductive wastage*. Trends Genet. 2, 105–110.
- Hassold T, Benham F, and Leppert M, 1988. *Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy*. Am. J. Hum. Genet. 42, 534–541.
-

- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA, 1980. *A cytogenetic study of 1000 abortions*. *Ann Hum Genet* 44:151-164.
- Hassold T, Chiu D, 1985. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet*; 70: 11–17.
- Hassold T, Pettay D, Robinson A, and Uchida I, 1992. *Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45, X conceptuses*. *Hum. Genet.* 89, 647–652.
- Held KR, Kerber S, Kaminsky E et al., 1992. *Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?* *Hum. Genet*; 88, 288–294.
- Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, Vossebeld-Hoff I, Jansen R, vander Luijt RB, et al., 2005. *Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*. *Prenat Diagn*;25(11):1032–9.
- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U, 2003. *The clinical use of karyotyping spontaneous abortions*. *Am J Obstet Gynecol*; 189: 397–400.
- Hook EB and Warburton D, 1983. *The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and severity in genotypes associated with structural X abnormalities of mosaicism*. *Hum. Genet.*; 64, 24–27.
- Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B, 2003. *Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: Advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR*. *Reproduction*; 126:279-97.
- Jacobs PA, 1977. *Epidemiology of chromosome abnormalities in man*. *Am. J. Epidemiol.* 105, 180–191.
- Jacobs PA, 1981. *Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man*. *Am. J. Hum. Genet.* 33, 44–54.
- Jacobs PA, Hassold TJ, 1987. *Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and live births*. In: Vogel F and Sperling K, eds. *Human genetics*. Berlin: Springer-Verlag: 233–44.
- Jacobs PA, Hassold TJ, Matsuyama AM, and Newlands IM, 1978. *Chromosome constitution of gestational trophoblastic disease*. *Lancet* 2, 49.
- Jauniaux E and Burton GJ, 2005. *Pathophysiology of Histological Changes in Early Pregnancy Loss*. *Placenta*, 26, 114-123.
- Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM, Laird S, Li TC, 2001. *Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study*. *Hum Reprod*; 16: 102–06.
- Jonveaux P, 2010. *Technique d'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN et foetopathologie*. *Archives de pédiatrie* ; 17 : 1119–1123.
- Kajii T, Ferrier A, Nikaawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S, 1980. *Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses*. *Hum Genet*; 55:87-98.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. *Science*; 258(5083): 818-821.
- Kalousek DK, Barrett IJ, and McGillivray BC, 1989. *Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18*. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 338–343.
- Kalousek DK, Pantzar T, Tsai M, Paradise B, 1993. *Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3912 cases*. *Birth Defects Orig Artic Ser*; 29: 53–61.
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, and Mikamo K, 1993. *Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation—air drying method*. *Hum. Genet.* 90, 533–541.
- Kirchheisen R and Schroeder-Kurth T, 1991. *Familiäres blasenmolen-syndrom und genetische aspekte dieser gestörten trophoblastentwicklung*. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 51, 560–571.
- Kline J and Stein Z, 1986. *The epidemiology of spontaneous abortion*. In *Early Pregnancy Failure* (Huisjes, H.J. and Lind, T. eds.), Churchill Livingstone, New York, pp. 240–256.
- Kline J, 1989. *Conception to birth—epidemiology of prenatal development*. *Monographs in Epidemiology and Biostatistics*. Oxford, Oxford University Press.

-
- Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, et al., 2000. *An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture*. *Am J Hum Genet*; 67(2):320–32.
- Lam AC, Lam ST, Lai KK, Tong TM, Chau TC, 2006. *High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation*. *Clin Biochem*; 39(3):196–202
- Lathi RB and Milki AA, 2002. *Tissue sampling technique affects accuracy of karyotype from missed abortions*. *J. Assist. Reprod. Genet.*; 19(1), 536–538.
- LaVecchia C, Franceschi S, Fasoli M, and Mangioni C, 1982. *Gestational trophoblastic neoplasms in homozygous twins*. *Obstet. Gynecol.* 60, 250–252.
- Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, et al., 2005. *Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations*. *J Med Genet*; 42:121–8.
- Lejeune V, 2006. *Fausse couches spontanées précoces répétées : quelle prise en charge proposée en 2006 ?* *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34 ; 927–937.
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E, 1994. *A simple method for simultaneous R or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes*. *Cytogenet Cell Genet* ; 59 : 311-2.
- Leridon H, 1977. *Human Fertility*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Lindor NM, Ney JA, Gaffey TA, Jenkins RB, Thibodeau SN, and Dewald GW, 1992. *A genetic review of complete and partial hydatidiform moles and nonmolar triploidy*. *Mayo Clin. Proc.* 67, 791–799.
- Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM, 2002. *Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss*. *Hum Reprod Updat* 8:333–343.
- Maneschi F, Zupi E, Marconi D, Valli E, Romanini C, Mancuso S, 1995. *Hysteroscopically detected asymptomatic mullerian anomalies. Prevalence and reproductive implications*. *J Reprod Med*; 40: 684-688.
- Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM, 2004. *Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy*. *Eur J Hum Genet*; 12(11):907–15.
- Mattar R, Mendes ET, 2002. *Abortion*. In: Camano L et al. (eds) *Obstetrics*, 1st edn. Manole, São Paulo.
- McDonough PG, 1988. *The role of molecular mutation in recurrent euploidic abortion*. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 6, 155–161.
- McFadden DE, Kwong LC, Yam IYL, and Langlois S, 1993. *Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting*. *Hum. Genet.* 92, 465–469.
- Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, et al. 2008. *Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes*. *N Engl J Med*; 359:1685–99.
- Menten B, Swerts K, Delle Chiaie B, Janssens S, Buysse1 K, Philippé J and Speleman F, 2009. *Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples*. *BMC Medical Genetics* ; 10:89
- Merviel P, Lanta S, Allier G, Gagneur O, Najas S et al., 2005. *Avortements spontanés à répétition*. *EMC-Gynécologie Obstétrique* 2 ; 278–296.
- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinkas JG, Sykes A, 1980. *Fetal loss after implantation. A prospective study*. *Lancet*; 2:554–6.
- Moerland E, van Hezik RL, van Der ATC, van Beek MW, van den Brule AJ, 2006. *Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) combined with automated spot counting*. *Cell Oncol*; 28(4):151–9.
- Morales C, Sanchez A, Bruguera J, et al., 2008. *Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities*. *Am J Med Genet*; 146A (1):66–70.
- Morssink LP, Sikkema-Raddatz B, Beekhuis JR, deWolf BTHM and Mantingh, A, 1996. *Placental mosaicism is associated with unexplained second-trimester elevation of MshCG levels, but not with elevation of MSAFP levels*. *Prenat. Diagn.* 16, 845–851.
-

-
- Morton NE, Chiu D, Holland C, Jacobs PA, and Pettay D, 1987. *Chromosome anomalies as predictors of recurrence risk for spontaneous abortion*. Am. J. Med. Genet.; 28: 353–360.
- Mowbry JF, Gibbings C, Liddell H, Reginald P.W., Underwood JL, and Beard RW, 1985. *Control trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal cells*. Lancet 1, 941–943.
- Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B, 1996. *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire : principes et techniques*. Collection Génie génétique G2. Paris : Tec et Doc Lavoisier et Cachan Éditions médicales.
- Müller EE, Locatelli V, Cella S, Penalva A, Novalli A & Cocchi D, 1983 *Prolactin-lowering and -releasing drugs: mechanisms of action and therapeutic applications*. Drugs ; 25 : 399–432.
- Mutter GL, Stewart CL, Chaponot ML, and Pomponio RJ, 1993. *Oppositely imprinted genes H19 and insulinlike growth factor 2 are coexpressed in human androgenic trophoblast*. Am. J. Hum. Genet.; 53: 1096–1102.
- Naylor AF, Warburton D, 1979. Sequential analysis of spontaneous abortion. In: *collaborative study data show that gravidity determines a very substantial rise in risk*. Fertil Steril; 31:282–286.
- Nelen W, Steegers E, Eskes T, Blom HJ, 1997. *Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss*. Lancet; 350: 861.
- Neuber M, Rehder H, Zuther C, Lettau R, and Schwinger E, 1993. *Ployploidies in abortion material decrease with maternal age*. Hum. Genet; 91: 563–566.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M, 2000. *Maternal age and fetal loss: population based register linkage study*. BMJ, 320(7251):1708-1712.
- O'Neill GT and Kaufmann MH, 1987. *Ovulation and fertilization of primary and secondary oocytes in LT/Sv strain mice*. Gamete Res; 18, 27–36.
- Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K, 2000. *Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages*. Fertil Steril; 73:300–4.
- Ogilvie CM, 2003. *Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: Past, present and future*. Pathol Biol (Paris); 51:156-60.
- Olson SB and Magenis RE, 1988. Preferential paternal origin of de novo structural chromosome arrangements. In *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements* (Daniel, A., ed.), Alan R. Liss, New York, pp. 583–599.
- Osborn JF, Cattaruzza MS and Spinelli A, 2000. *Risk of spontaneous abortion in Italy, 1978-1995 and the effect of maternal age, gravidity, marital status and education*. Am. J. Epidemiol.; 151: 312-313.
- Petrosky DL and Borgaonkar DS, 1984. Segregation analysis in reciprocal translocation carriers. *Am. J. Hum. Genet.*; 19: 137–159.
- Rai R et Regan L, 2006. *Recurrent miscarriage*. Lancet; 368: 601–11.
- Raymond EG, Cnattingius S, Kiely JL, 1996. *Effects of maternal age, parity, and smoking on the risk of stillbirth*. Br J Obstet Gynaecol. Apr; 101(4):301-6.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al, 2006. *Global variation in copy number in the human genome*. Nature; 444 (7118):444–54.
- Regan L, 1991. *Recurrent miscarriage*. BMJ; 302: 543–44.
- Richard F, Vogt N, Muleris M, et al., 1994. *Increased FISH efficiency using APC probes generated by direct incorporation of labeled nucleotides by PCR*. Cytogenet Cell Genet; 65: 169-71.
- Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G et al., 2006. *Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH*, J Med Genet, vol. 43, n° 4, p. 353–61.
- Roberts CJ and Lowe CR, 1975. *Where have all the conceptions gone?* Lancet; 1: 498–499.
- Robinson A and Linden MG, 1993. *Clinical Genetics Handbook, 2nd ed*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Robinson WP, Binkert F, Bernasconi, Lorda-Sanchez I, Werder EA, and Schinzel AA, 1995. *Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection*. Am. J. Hum. Genet. 56, 444–451.
- Robinson WP, McFadden DE, and Stephenson M D, 2001. *The Origin of Abnormalities in*
-

-
- Recurrent Aneuploidy/Polyploidy*. Am. J. Hum. Genet. 69:1245–1254.
- Rodgers CS, Creasy MR, Fitchett M, Maliszewska CT, Pratt NR, Waters J, 1996. *Solid tissue culture for cytogenetics analysis: a collaborative survey for Association of Clinical Cytogeneticists*. J Clin Pathol; 49:638–41.
- Rosenbuch B & Sterzik K, 1991. *Sperm chromosomes and habitual abortion*. Fertil Steril; 56: 370-372.
- Royal College of Obstetricians and Gynecologists, 1998. *The management of recurrent miscarriage*. Guideline no. 17. London: Royal College of Obstetricians and Gynecologists.
- Sbracia M, Cozza G, Grasso JA, 1996. *Semen parameters and sperm morphology in men in unexplained recurrent spontaneous abortion, before and during a 3 years follow-up period*. Hum Reprod; 11: 117-120.
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, et al., 2004. *Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages*. Am J Hum Genet; 74:1168–74.
- Scherer SW, Lee C, Birney E, et al., 2007. *Challenges and standards in integrating surveys of structural variation*. Nat Genet; 39 (Suppl. 7):S7–15.
- Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, Hackeloer BJ, Kerber S, Kochhan L et al., 2000. *Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk*. Mol Hum Reprod.; 6 (9): 855–60.
- Schnorr TM, Grajewski BA, Hornung LW, 1991. *Video display terminals and the risk of spontaneous abortion*. N Engl J Med; 324: 727-733.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, and Pals G, 2002. *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res. **30**: 57.
- Scott JR, Rote NS, and Branch DW, 1987. *Immunologic aspects of recurrent abortion and fetal death*. Obstet. Gynecol. 70, 645–656.
- Shaffer LG, Coppinger J, Morton SA, et al., 2011. *The development of a rapid assay for prenatal testing of common aneuploidies and microdeletion syndromes*. Prenat Diagn; 31:778–87.
- Sharp A.J., Locke D.P., McGrath S.D., Cheng Z., Bailey J.A., Vallente R.U., et al, 2005. *Segmental duplications and copy-number variation in the human genome*. Am J Hum Genet; 77(1):78–88.
- Shimokawa O, Harada N, Miyake N, et al., 2006. *Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with normal karyotypes*. Am J Med Genet A;140:1931–5.
- Shinawi M, Cheung SW, 2008. *The array CGH and its clinical applications*. Drug Discov Today; 13:760–70.
- Short RV, 1999. *When a conception fails to become a pregnancy*. In *Maternal Recognition of Pregnancy*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 377–387.
- Simpson JL, 1986. *Genetics*. CREOG Basic Science Monograph in Obstetrics and Gynecology. Council on Resident Education in Obstetrics and Fynecology, Washington, DC.
- Simpson JL, Elias S, Meyers CM, Ober C, and Martin AO, 1989. *Translocations are infrequent among couples having repeated spontaneous abortions but no other abnormal pregnancies*. Fertil. Steril; 51: 811–814.
- Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH, 2003. *Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA)*. J Med Genet; 40(12):907–12.
- Slavotinek AM, 2008. *Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays*. Hum Genet; 124:1–17.
- Solveig M and Pflueger V, 2005. *The Cytogenetics of Spontaneous Abortion*. The Principles of Clinical Cytogenetics, pp 323-345.
- Speevak MD, Dolling J, 2008. *Terespolsky D, Blumenthal A, Farrell SA. An algorithm for the prenatal detection of chromosome anomalies by QF-PCR and G-banded analysis*, Prenat Diagn; 28: 1221–6.
- Stephenson MD, 1996. *Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples*. Fertil Steril.; 66:24–7.
- Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP, 2002. *Cytogenetic analysis of miscarriages from*
-

couples with recurrent miscarriage: a casecontrol study. *Hum Reprod*; **17**: 446–51.

Stirrat GM, 1990. *Recurrent miscarriage. Lancet*; **336**: 673–75.

Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Porter TF, Branch DW, 2004 . *Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. Obstet Gynecol*; **104**:784-788.

Summers PR, 1994. *Microbiology relevant to recurrent miscarriage. Clin Obstet Gynecol*; **37**: 722-723.

Szulman AE, 1984. *Syndromes of hydatidiform moles: partial vs. complete. J. Reprod. Med.* **11**, 788–791.

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

Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P, 2003. *Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. Lancet* **361**:983–988.

Ventura SJ, Taffel SM and Mosher WD, 1988. *Estimates of pregnancies and pregnancy rate for the United-States: 1976-1985. Am. J. Public. Health*; **78**:506-511.

Verp MS and Simpson JL, 1985. Amniocentesis for cytogenetic studies. In *Human Prenatal Diagnosis* (Filkins, K. and Russo, J.F., eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 13–48.

Vialard F et Molina G, 2010. *Les nouvelles technologies d'analyse du génome : quelles utilisations en diagnostic prénatal ? Gynécologie Obstétrique & Fertilité* ; **39** (1) : 32-41.

Vialard F, Simoni G, Aboura A, et al., 2011. *Prenatal BACs-on-Beads: a new technology for rapid detection of aneuploidies and*

microdeletions in prenatal diagnosis. Prenat Diagn; **31**:500–8.

Vinatier D, Dufour P, Bénard J, Leroy JL, 1998. *Avortements spontanés à répétition. Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), Gynécologie.

Warburton D, Byrne J, and Canki N, 1991. *Chromosome Anomalies and Prenatal Development: An Atlas. Oxford Monographs on Medical Genetics* No. 20. Oxford University Press, New York.

Warburton D, Kline J, Stein Z., Hutzler M, Chin A, and Hassold T, 1987. *Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 272 women with two karyotyped spontaneous abortions. Am. J. Hum. Genet*; **41**, 465–483.

Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M, 1980. Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: data from the New York city study. In: *Porter IH, Hook EB (eds) Human embryonic and fetal death. Academic Press, New York London*, pp 261-287

Wilcox AJ, Weinberg, CR, O'Connor, JF, et al., 1988. *Incidence of early loss of pregnancy. N. Engl. J. Med.* **319**, 189–194.

Wilkinson DG, 1994. *In situ hybridization: a practical approach. The practical approach series. In: Rickwood D, Hames BD, eds. New York: IRL Press-Oxford University Press.*

Yamamoto M and Wantanabe G, 1979. *Epidemiology of gross chromosome anomalies at the early stage of pregnancy. Contrib. Epidemiol.* **1**, 101–106.

Yusuf R, and Naeem R, 1997. *Personal communication* ;258:818–21.

Annexes

Annexe 1 :

Questionnaire

Nom :

Prénom :

Age :

Adresse :

Profession:

Groupage:

Antécédents familiaux :

- Médicaux :
- Chirurgicaux :

Antécédents personnels :

- Médicaux :
- Chirurgicaux :
- Gynéco obstétriques :

Gestations:

Parité:

ABRT:

- Age de grossesse:
- Curetage : oui non

Antécédents de malformations:

- Oui Non
- Type de malformation:

Antécédents de malformations dans la fratrie :

- Oui Non
- Type de malformation:

Rapport de consanguinité :

Degré de consanguinité :

Grossesse actuelle:

DDR:

Age de grossesse:

Test de grossesse: Oui Non

Premier Trimestre: - Bilan sanguin

- Sérologie: - toxoplasmose
- rubéole

- Ecographie précoce

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

- Echographie malformative
-

Annexes 2 :

Table 1. SALSA MLPA P036-E1 Human Telomere-3 probemix

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 §	1p	TNFRSF4	02269-L01751	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3p	CHL1	01721-L01329	03-000.34
151	4p	PIGG (FLJ20265)	02005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6p	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC8A (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 +	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24 (Acrocentric chromosome)
227 +	14q-cen	CCNB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.86 (Acrocentric chromosome)
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36 (Acrocentric chromosome)
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
283 +	21q-cen	RBM11	01739-L01311	21-014.51 (Acrocentric chromosome)
289 +	22q-cen	BID	01740-L01310	22-016.61 (Acrocentric chromosome)
298	Xp/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52 (PAR1 region)
307	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	02392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH1	02013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330 §	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	01746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
355	7q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
361	8q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
379	10q	PAOX (PAO)	09142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
411	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
441	18q	RBFA (C18orf22)	01758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458	20q	OPRL1	02688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telom.)

Table 1. SALSA MLPA P070-B2 Human Telomere-5 probemix

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

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

SALSA MLPA P245-A2 Microdeletion probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	TNFRSF4 Probe 2269–L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	GATA3 Probe 7632–L07317	10p	DiGeorge region 2 (10p)
142	PFAFH1B1 Probe 4120–L03532	17p13.3	Miller-Dieker region
148	MECP2 Probe 9310–L09999	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
154	NSD1 Probe 2595–L08077	5q35.3	Sotos syndrome
160	UBE3A Probe 4620–L00863	15q12	Prader-Willi / Angelman
166	GABRD Probe 4690–L07966	1p36.33	1p36 deletion syndrome
172	CREBBP Probe 3087–L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi syndrome
178	GNB1 Probe 2890–L07968	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184	MECP2 Probe 9311–L10002	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
190 *	SEMA7A Probe 8380–L10003	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
196	CLDN5 Probe 1218–L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202	MECP2 Probe 3409–L02797	Xq28	MECP2 / Xq28 duplication
208	GP1BB Probe 5464–L10114	22q11.21	DiGeorge syndrome
214	NDN Probe 6282–L01542	15q11.2	Prader-Willi / Angelman
220	PAX6 Probe 3253–L02690	11p13	Wagr syndrome
226	MAPT Probe 7856–L08385	17q21.31	"17q21 microdeletion"
232	LETM1 Probe 4190–L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
238	PFAFH1B1 Probe 1443–L08394	17p13.3	Miller-Dieker region
247	SNRPN Probe 2026–L10004	15q12	Prader-Willi / Angelman
253 †	SHANK3 Probe 10181–L11409	22q13.33	22q13 / Phelan-Mcdermid
260	NF1 Probe 3778–L11180	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
267	FANCL Probe 8386–L11411	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"
274	LRRC48 Probe 1452–L00936	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283	CRR9 Probe 1126–L00684	5p15.3	Cri du Chat syndrome
292	SNRPN Probe 1318–L07970	15q12	Prader-Willi / Angelman
297	DMD Probe 1412–L01059	Xp21.2	Chromosome X control probe
303	LLGL1 Probe 1453–L08499	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
310	ELN Probe 1333–L00876	7q11.23	Williams syndrome
319	TGFBR1 Probe 4652–L04036	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
325	CYP11A1 Probe 6811–L06406	15q24.1	"15q24 deletion syndrome"
335	NF1 Probe 2508–L02620	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
342	MAPT Probe 7857–L08501	17q21.31	"17q21 microdeletion"
349	Hs.538604 Probe 1232–L07388	10p15.1	DiGeorge region 2 (10p)
359	DLG1 Probe 8395–L08249	3q29	"3q29 deletion syndrome"
364	ELN Probe 1336–L00878	7q11.23	Williams syndrome
373	SNAP29 Probe 1235–L00773	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 †	SHANK3 Probe 10182–L11174	22q13.33	22q13 / Phelan-Mcdermid
391	LIMK1 Probe 1337–L02333	7q11.23	Williams syndrome
401	TRPS1 Probe 3081–L07411	8q24.12	Langer-Giedion syndrome
409	TGFBR1 Probe 4653–L10006	9q22.33	"9q22.3 deletion syndrome"
418	DLG1 Probe 8401–L08255	3q29	"3q29 deletion syndrome"
427	EIF3S3 Probe 1108–L00679	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
436	TERT Probe 3761–L02477	5p15.33	Cri du Chat syndrome
445	WHSC1 Probe 6058–L05513	4p16.3	Wolf-Hirschhorn region
454	NSD1 Probe 2600–L02071	5q35.3	Sotos syndrome
465 †	RAI1 Probe 9440–L11412	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
472	CRHR1 Probe 7859–L07620	17q21.31	"17q21 microdeletion"
486	REL Probe 9860–L10628	2p16.1	"2p16.1 deletion syndrome"

* A special label was used for GATA3, this probe is related to the HealthKit product

Annexe 3 :

Réactifs et matériel pour la FISH

- *Trypsine / EDTA* : Trypsin EDTA solution 100 ml SIGMA Ref. T3924
- *KCl* : ampoule plastique fournie par la Pharmacie du CHU
Solution diluée au 1/20, à préchauffer à l'étuve 37°C.
- *Acide acétique*: acide acétique 99,7 % minimum Réf : 1000631000 ELVETEC
- *Méthanol technique* : fourni par la Pharmacie du CHU
- *RNase* : Ribonucléase A 250 mg lyophilisé SIGMA Ref. R6513
Reprendre dans 10 ml de 2xSSC pH 7 et alicoter à 400 µl dans microtubes
- *PBS* : Tampon PBS 4x1 litre BIOMERIEUX Ref. 75 511
Reprendre la poudre dans 1 litre d'eau stérile
- *0.04 SSC- 2 SSC* : Tampon 20xSSC 1 litre SIGMA Ref.S6639
A diluer avant emploi dans eau stérile et à stocker au réfrigérateur
- *Pepsine* : Pepsine 5 g SIGMA Réf. P6887
Reprendre dans 50 ml d'eau stérile et alicoter à 500 µl
- *HCl* : HCL 1N ampoules Titrisol pour 1 litre Réf. 109970 ELVETEC
- *NP40* : NP40 2x1 ml VYSIS Réf. 32 804818
Diluer 100 µl de NP40 dans 100 ml de 2xSSC
- *Dapi II*: Dapi II 2x500 µl VYSIS Réf. 32 804831
- *Vectashield*: Vectashield 10 ml Réf. VH1000 Valbiotech SA
- *Lame*: 76x26x1 mm bords rodés dépolie 2 faces LABONORD Réf. 5305103
- *Lamelle* : Lamelles 24x60 LABONORD Réf. 5305060

Réactifs et consommable pour la MLPA

Barettes Microtubes Eppendorf safe lock 0,2 ml.
Eau stérile Aliquotée en tube 1.5 ml, T° ambiante ou congelée
SALSA MLPA buffer / SALSA MLPA Probemix P036-E1 Telomere 3 - P070-B1 Télomère
5 - P245-A2 Microdeletion 1 /Ligase-65 Buffer A / Ligase-65 Buffer B / SALSA PCR Buffer/
SALSA Enzyme Dilution Buffer / SALSA PCR Primer mix / SALSA Polymérase (MRC-
Holland- Mélange SLS + 600nt (Beckman-Coulter)
Standard de taille 600nt (Beckman-Coulter)
Cartouche de gel (Beckman-Coulter)
Tampon de migration (Beckman-Coulter) - Huile minérale (Sigma)
Plaques ECHANTILLON et TAMPON
Plaques ECHANTILLON et TAMPON neuves (Beckman-Coulter)

Annexe 4 :

Préparation des mix d'Hybridation, de Ligation et de PCR (mixes réalisés sous la hotte)

Décongeler les réactifs pour Hybridation, Ligation et PCR à T° ambiante (sauf enzymes)+ H₂O.

- Vortexer le tampon SALSA MLPA buffer, Ligase-65 Buffer A (bouchon blanc), Buffer B, PCR Buffer, Enzyme dilution buffer, primer mix .

- Vortexer plus doucement les sondes SALSA MLPA Probemix

- Centrifuger brièvement

- Dans des tubes de 0,5 ml appelés P036, P070 et P245:

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

1,5µl*N+1,5 de SALSA MLPA buffer

1,2µL*N+1,5 d'H₂O stérile

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

3µL*N+2 de Ligase-65 Buffer A,
3µL*N+2 de Ligase-65 Buffer B,
25µL*N+2 d'H₂O,

- Vortexer

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

2µL*N+2 de SALSA PCR Buffer,
1µL*N+2 de SALSA Enzyme Dilution Buffer,
1µL*N+2 de SALSA PCR Primer mix,
15.75µL*N+2 H₂O,

- Vortexer

- Congeler les mix LIG et PCR à -20°C pour le JOUR2.

N.B : Attention, les amorces sont fluorescentes et donc sensibles à la lumière, ne pas laisser le tube sous une source lumineuse.

Préparation de la migration électrophorétique

- Prendre les plaques 96 puits spéciales séquenceur (plaque TAMPON et plaque ECHANTILLON) (veiller à utiliser au maximum les plaques en cours).
- Sortir le tampon de séparation, l'huile et le mélange SLS+600 nt du frigo (décongeler tube si nécessaire).

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

- Vortexer le tube de SLS +600nt
 - Distribuer 30µL de SLS+600nt dans la plaque ECHANTILLON pour séquenceur
 - Avec la pipette multicanaux, répartir 1µl de produit PCR.
 - Déposer une goutte d'huile dans chaque puits
 - Centrifuger la plaque
 - Dans la plaque TAMPON, répartir du tampon de séparation au $\frac{3}{4}$ de chaque puit.
-
