

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE MÉDECINE

**ÉCOLE DE SAGES-FEMMES DE STRASBOURG**

**ANNÉE UNIVERSITAIRE 2013-2014**

---

**APPLICATION DE L'ANALYSE CHROMOSOMIQUE  
SUR PUCE À ADN EN DIAGNOSTIC PRÉNATAL**

---

DIPLÔME D'ÉTAT DE SAGE-FEMME  
MÉMOIRE PRÉSENTÉ ET SOUTENU  
PAR

**Sharzad NAIBI**

Née le 04 décembre 1990 à Kaboul

Directeur de mémoire : **Docteur Valérie KREMER**

## REMERCIEMENTS

Au Docteur Valérie KREMER, d'avoir accepté de me guider et de me soutenir dans la réalisation de ce mémoire, merci pour son savoir et sa disponibilité.

À Mme Véronique PAQUET, pour ses conseils en tant que guidante.

À toute l'équipe pédagogique de l'École de Sages-Femmes de Strasbourg pour son encadrement, notamment à Mme Catherine BURGUY pour son écoute et ses encouragements.

À Ivan HERENGER, pour l'intérêt porté à ce mémoire.

À mes amis, pour leur présence réconfortante,  
surtout à mes acolytes du premier rang.

À Monique et Claudia, pour leur soutien sans faille.

À ma maman et à mes frères, pour leur amour et leurs encouragements.

À Nicolas, pour tout.

# Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>1. ACPA.....</b>  | <b>9</b>  |
| 1.1. Technique de la CGH-array.....  | 9         |
| 1.2. Technique de la SNP-array.....  | 12        |
| 1.3. Résolution des puces à ADN.....   | 12        |
| 1.4. Différents types de puces à ADN.....  | 13        |
| <b>2. Variants/ Variations du Nombre de Copies (CNVs).....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3. Interprétation des CNVs.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>4. Limites de l'ACPA.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>5. Applications de l'ACPA en DPN.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>1. Sélection du Matériel.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2. Méthode d'intervention.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>RÉSULTATS.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>1. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis.....</b>  | <b>26</b> |
| 1.1. Objectif.....   | 26        |
| 1.2. Matériel et méthodes.....   | 26        |
| 1.3. Résultats.....  | 28        |
| 1.4. Discussion.....   | 30        |
| <b>2. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound .....</b> | <b>33</b> |
| 2.1. Objectif.....   | 33        |
| 2.2. Matériel et méthodes.....   | 33        |
| 2.3. Résultats.....  | 35        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4. Discussion.....   | 37        |
| <b>3. Prenatal diagnosis using array-CGH : A French experience ....</b>  | <b>40</b> |
| 3.1. Objectif.....   | 40        |
| 3.2. Matériel et méthodes.....   | 40        |
| 3.3. Résultats.....  | 42        |
| 3.4. Discussion.....   | 45        |
| 3.5. Conclusions.....  | 47        |
| <b>DISCUSSION.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>1. Analyse critique des articles.....</b>   | <b>49</b> |
| 1.1. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis.....   | 49        |
| 1.2. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound..... | 53        |
| 1.3. Prenatal diagnosis using array-CGH : A French experience.....   | 56        |
| <b>2. Discussion et confrontation aux données de la littérature.....</b>   | <b>58</b> |
| 2.1. Indications de l'ACPA.....  | 58        |
| 2.2. Difficultés de l'ACPA.....  | 63        |
| 2.3. Importance de l'information donnée.....   | 67        |
| 2.4. Conséquences des résultats de l'ACPA sur la grossesse.....  | 68        |
| <b>CONCLUSION .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>ANNEXES</b>   |           |

# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- ACLF : Association des Cytogénéticiens de Langue Française
- ACOG : American College of Obstetricians and Gynecologists
- ACPA : Analyse Chromosomique sur Puce à ADN
- BAC : Bacterial Artificial Chromosome (Chromosome Bactérien Artificiel)
- CGH-array : Array Comparative Genomic Hybridization (Hybridation Génomique Comparative sur microréseau)
- CNV : Copy Number Variation/Variant (Variant/Variation du Nombre de Copies)
- CN : Clarté Nucale
- CNP : Copy Number Polymorphism (Polymorphisme du Nombre de Copies)
- CPDPN : Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal
- FISH : Fluorescent In Situ Hybridization (Hybridation In Situ en Fluorescence)
- IMG : Interruption Médicale de Grossesse
- kb : Kilobase
- Mb : Mégabase
- ml : Millilitre
- mg : Milligramme
- ng : Nanogramme
- PAC : P1 Artificial Chromosome (Chromosome Artificiel de Phage)
- qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase en temps réel)
- RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin
- SA : Semaine d'Aménorrhée
- SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un Seul Nucléotide)
- VOUS : Variant Of Unknown Significance (Variant de Signification Incertaine)

# INTRODUCTION

Durant la grossesse, trois échographies de dépistage sont obligatoirement proposées au couple vers 12, 22 et 32 semaines d'aménorrhée (SA) (1). Elles permettent notamment de dépister certaines anomalies morphologiques qui sont d'apparition précoce ou tardive. Ces « signes d'appel échographiques » peuvent être évocateurs d'anomalies chromosomiques. La fréquence des anomalies chromosomiques dépistées augmente avec le nombre de signes d'appel échographiques. L'étude rétrospective de Kurjak *et al.* (2) a montré que sur 222 amniocentèses effectuées sur signes d'appel échographiques, 13,5% (30/222) des fœtus présentaient un caryotype anormal. Parmi ces fœtus, 3,2% (7/222) présentaient un signe d'appel échographique, alors que 10,4% (23/222) présentaient au moins deux signes d'appel échographiques. Ainsi, en cas de signes d'appel échographiques, un geste invasif (prélèvement fœtal) est proposé au couple afin de déterminer le caryotype fœtal. Ce prélèvement peut se faire par une ponction de villosités chorales (choriocentèse) à partir de 12 SA, de liquide amniotique (amniocentèse) à partir de 16 SA ou de sang fœtal (cordocentèse) à partir de 20 SA. Le choix du prélèvement se fait en fonction du terme de la grossesse, de la pathologie suspectée, de l'habitude du préleveur, des conditions de prélèvement (position du placenta) et des possibilités techniques du laboratoire (3).

La cytogénétique conventionnelle est basée sur la réalisation d'un caryotype. Ce dernier contribue à la mise en évidence d'anomalies chromosomiques équilibrées (sans perte ou gain de matériel génétique : translocations et inversions) ou déséquilibrées (du nombre ou de la structure des chromosomes). La résolution du caryotype en diagnostic prénatal n'étant que de 10 mégabases (Mb) (4), il est parfois nécessaire de recourir à l'Hybridation In Situ Fluorescente (FISH) dont la résolution est meilleure : de l'ordre de 150 à 250 kilobases (kb). La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire qui consiste à utiliser une sonde fluorescente qui se fixe sur une séquence d'ADN cible. Bien que la FISH soit une technique plus résolutive, il s'agit d'une technique ciblée. Elle n'est donc utilisée que si les signes d'appel échographiques sont évocateurs d'un syndrome génétique spécifique ou lorsqu'il faut préciser des anomalies chromosomiques observées préalablement sur le caryotype (5).

Une nouvelle technique de cytogénétique moléculaire a été développée : l'Analyse Chromosomique sur Puce à ADN ou ACPA, combinant l'avantage du caryotype par son étude « pan-génomique » (couvrant le génome entier) et l'avantage de la FISH par sa résolution plus fine (6).

## 1. ACPA

Le terme « ACPA » a été choisi en France par l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF) et regroupe les techniques permettant l'analyse du génome sur microréseau : la CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization-array*) et la SNP-array (*Single Nucleotide Polymorphism-array*).

L'ACPA permet de mettre en évidence des remaniements chromosomiques déséquilibrés de petite taille, non visibles sur le caryotype. Ces déséquilibres génomiques correspondent à des variations du nombre de copies (CNV pour Copy Number Variant/Variation) par perte (délétion) ou par gain (amplification : duplication, triplification) de matériel chromosomique (7).

### 1.1. Technique de la CGH-array

L'hybridation génomique comparative sur microréseau (CGH-array) a été développée en 1997 par Solinas-Toldo *et al.* (8).

La technique repose sur une hybridation compétitive entre un ADN génomique d'un patient qui est marqué avec un fluorochrome émettant dans le rouge (cyanine 5) et un ADN génomique d'un sujet normal de même sexe (ADN témoin) qui est marqué avec un fluorochrome émettant dans le vert (cyanine 3) (Figure 1). Ces deux ADN correspondent à des cibles et vont être co-hybridés en quantité équivalente sur un microréseau qui se présente sous la forme d'une lame de verre. La lame est composée de nombreux puits et dans chaque puit est fixé un fragment d'ADN

génomique humain connu (sonde) qui est présent en de multiples exemplaires.

Les intensités de fluorescence sont captées par un scanner laser. Puis, un logiciel bioinformatique calcule et normalise un rapport d'intensité de fluorescence (rouge/vert, Cy5/Cy3) entre les deux ADN pour chaque puit. Il établit également une analogie entre la localisation du puit sur le microréseau et dans le génome. Les données analysées sont représentées sous forme d'un graphique. En cas de perte ou de gain de matériel chromosomique, il existe sur la représentation graphique une déviation par rapport au seuil de détection (9).

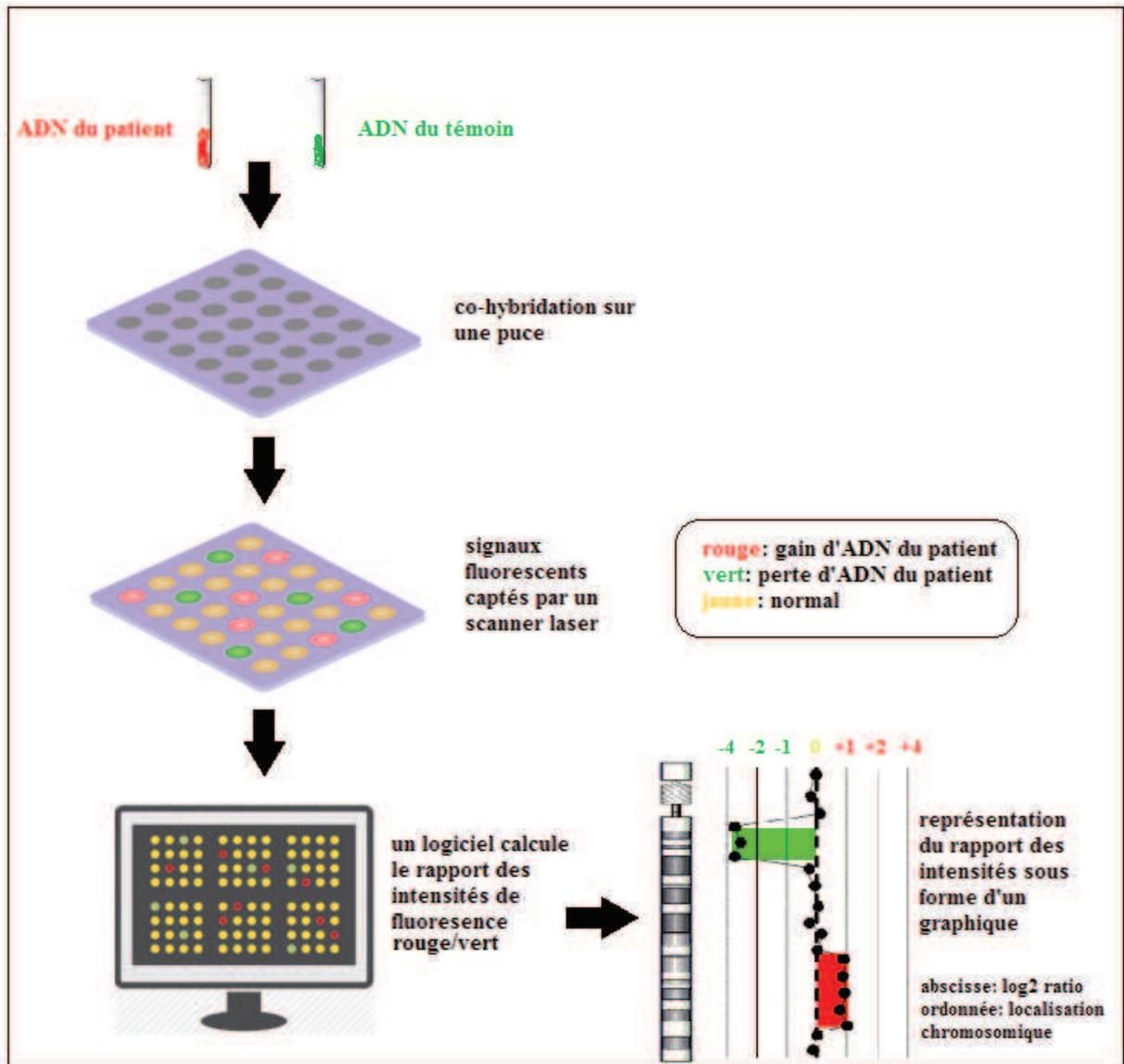
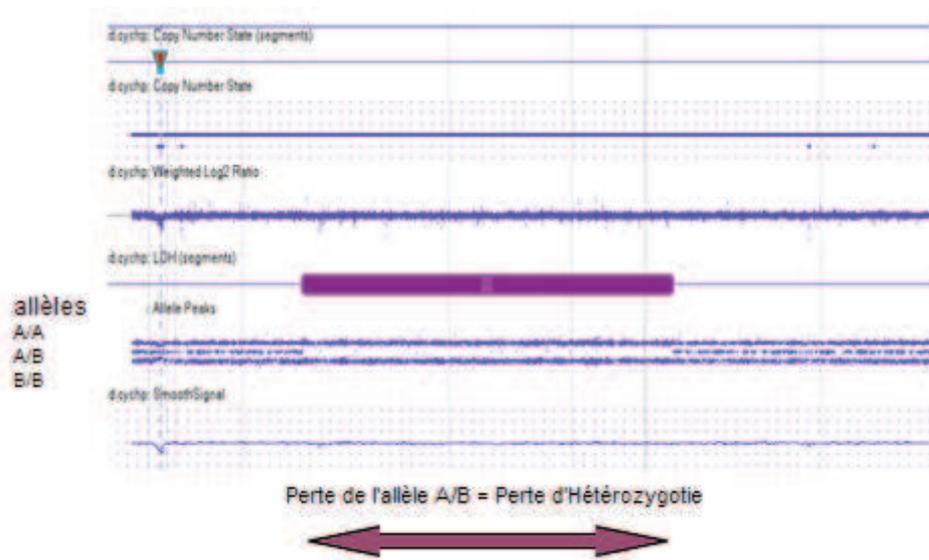


Figure 1. Principales étapes de la CGH-array

## 1.2. Technique de la SNP-array

Le SNP, polymorphisme pour un nucléotide, est un type de polymorphisme ponctuel de l'ADN où deux allèles diffèrent par une seule paire de bases (pb), toutes les 1000 pb environ (10). La SNP-array, ou puce à SNP, diffère de la CGH-array par la comparaison de l'ADN du patient à une référence informatique (il n'y a pas de co-hybridation). Par ailleurs, l'utilisation de ces puces (Illumina®, Affymetrix®) permet de visualiser une perte d'hétérozygotie (perte d'un allèle) pouvant évoquer soit une isodisomie uniparentale (les deux copies du même chromosome sont héritées d'un seul parent), soit une consanguinité (11) (Figure 2).



## 1.3. Résolution des puces à ADN

La résolution de la puce à ADN dépend de la taille des fragments d'ADN, de leur nombre et de la distance entre chaque fragment. Plus une puce à ADN contient un nombre élevé de fragments de petite taille, meilleure sera sa résolution (12).

#### 1.4. Différents types de puces à ADN

Les puces à ADN sont soit pan-génomiques, soit ciblées (spécifiques de certaines régions chromosomiques).

- CGH-array type BAC ou PAC

Les fragments d'ADN fixés sur la lame (sondes) sont des fragments génomiques humains clonés à partir de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ou de PAC (P1 artificial Chromosome). Ces fragments ont une taille variant de 150 à 250 kb et permettent d'obtenir une résolution de 500 kb à 1 Mb (13) (tableau I).

- CGH-array type oligonucléotides ou Oligoarray CGH

Les fragments d'ADN (sondes) sont des oligonucléotides d'une taille de 60 pb permettant d'obtenir une résolution de 20 à 200 kb (14).

- SNP-array

Les fragments d'ADN sont des oligonucléotides de 25 à 50 pb et permettent d'obtenir une résolution de quelques dizaines de kb (15).

Tableau I. Différents types de puces à ADN

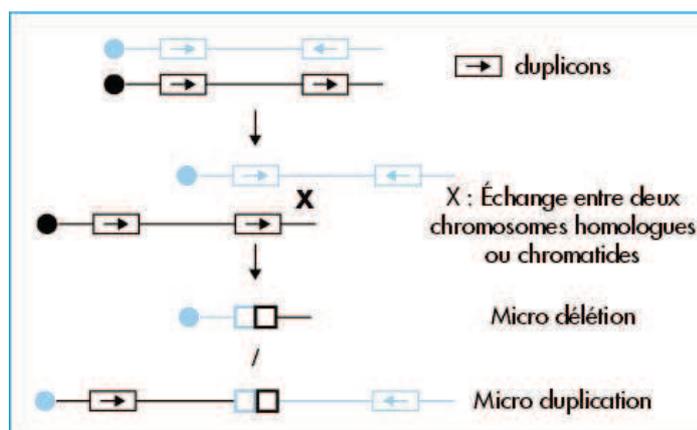
|                            | BAC/PAC                                     | Oligonucléotides                       | Puces à SNP                 |
|----------------------------|---|--|-----------------------------|
| Taille des fragments d'ADN | 150-250 kb                                  | 60 pb                                  | 25 à 50 pb                  |
| Nombre de fragments d'ADN  | 3 000 à 5 000                               | 44 000 à 1 000 000                     | 300 000 à plus de 2 000 000 |
| Résolution                 | 500 kb à 1 Mb                               | 20 à 200 kb                            | quelques dizaines de kb     |
| Exemple de fournisseurs    | Integragen®, BlueGnome®, Array Genomics®... | Agilent®, BlueGnome®, Perkin Elmer®... | Illumina®, Affymetrix® ...  |

Synthèse des données issues de Béri-Dexheimer M. *et al* (2006) (16) , Andrieux. J. (2008) (17), Vialard. F. *et al* (2011) (18).

## 2. Variants/ Variations du Nombre de Copies (CNVs)

Le terme de CNV est apparu avec la CGH-array et se définit comme un fragment d'ADN de plus de 1 kb, présentant un nombre variable de copie (délétion ou amplification) par rapport à un génome de référence (19).

Un des mécanismes d'apparition de ces variations est la recombinaison homologue non allélique. Cette recombinaison est médiée par des duplications segmentaires (séquences répétées) ayant une forte homologie de séquence et pouvant conduire à une duplication et/ou une délétion (20) (Figure 3).



Issue de Keren B. et Sanlaville D. (2008) (21)

Figure 3. Recombinaison homologue non allélique

Il existe trois types de CNVs :

- 1) Les CNVs bénins ou non pathogènes sans conséquence phénotypique. Ces CNVs sont généralement localisés dans des régions pauvres en gènes et n'ayant pas de rôle majeur.  
S'ils sont présents dans plus de 1% de la population, ils sont dits polymorphiques ou CNP (Copy Number Polymorphism). En 2006, Redon *et al.* (22) ont construit la première carte du génome répertoriant des microdélétions et des microduplications, observées chez 270 individus considérés comme normaux et issus de 4 populations différentes. Ils ont ainsi identifié 1447 CNPs.
- 2) Les CNVs pathogènes
- 3) Les CNVs de pathogénicité incertaine, appelés *Variants Of Uncertain Significance* (VOUS). Cette catégorie peut être divisée en deux sous-groupes :
  - les VOUS probablement pathogènes
  - les VOUS probablement bénins

En 2007, Lee *et al.* (23) établissent des critères, appelés « critères de Lee » (annexe I), qui permettent de faciliter la classification des CNVs selon :

- le caractère hérité ou non
- le type de CNV : délétion/duplication
- le contenu en gènes
- la taille du CNV

### 3. Interprétation des CNVs

Lorsqu'un CNV est identifié grâce à l'ACPA, il faut d'abord consulter la base de données *Database of Genomic Variants* (DGV) de Toronto (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) qui répertorie un grand nombre de CNVs polymorphiques (CNP) :

- soit le CNV est répertorié : il s'agit d'un CNP.
- soit le CNV n'est pas répertorié : il peut alors s'agir d'un CNV bénin, d'un CNV pathogène, d'un VOUS ou encore d'un faux positif (Figure 4).

Dans le cas où le CNV n'est pas répertorié, il faut dans un premier temps confirmer le CNV par d'autres techniques telles que la FISH et/ou la PCR quantitative (*Polymerase Chain Reaction*, qPCR) (24). La vérification des délétions et de grandes duplications (>2 Mb) est effectuée par la FISH, alors que la qPCR est utilisée pour les amplifications (duplication, triplication) ou les petites délétions (<200 kb) (11).

Dans un deuxième temps, il faut déterminer le caractère hérité ou *de novo* du CNV par un contrôle parental sur des prélèvements sanguins.

Si le CNV est hérité d'un parent ayant un phénotype anormal identique à celui du patient : le CNV est très probablement un CNV pathogène.

Si le CNV est hérité d'un parent sain : le CNV est soit bénin, soit de pathogénicité incertaine (VOUS).

Si le CNV est *de novo* : le CNV peut être pathogène, bénin ou de pathogénicité incertaine (VOUS) (23-24).

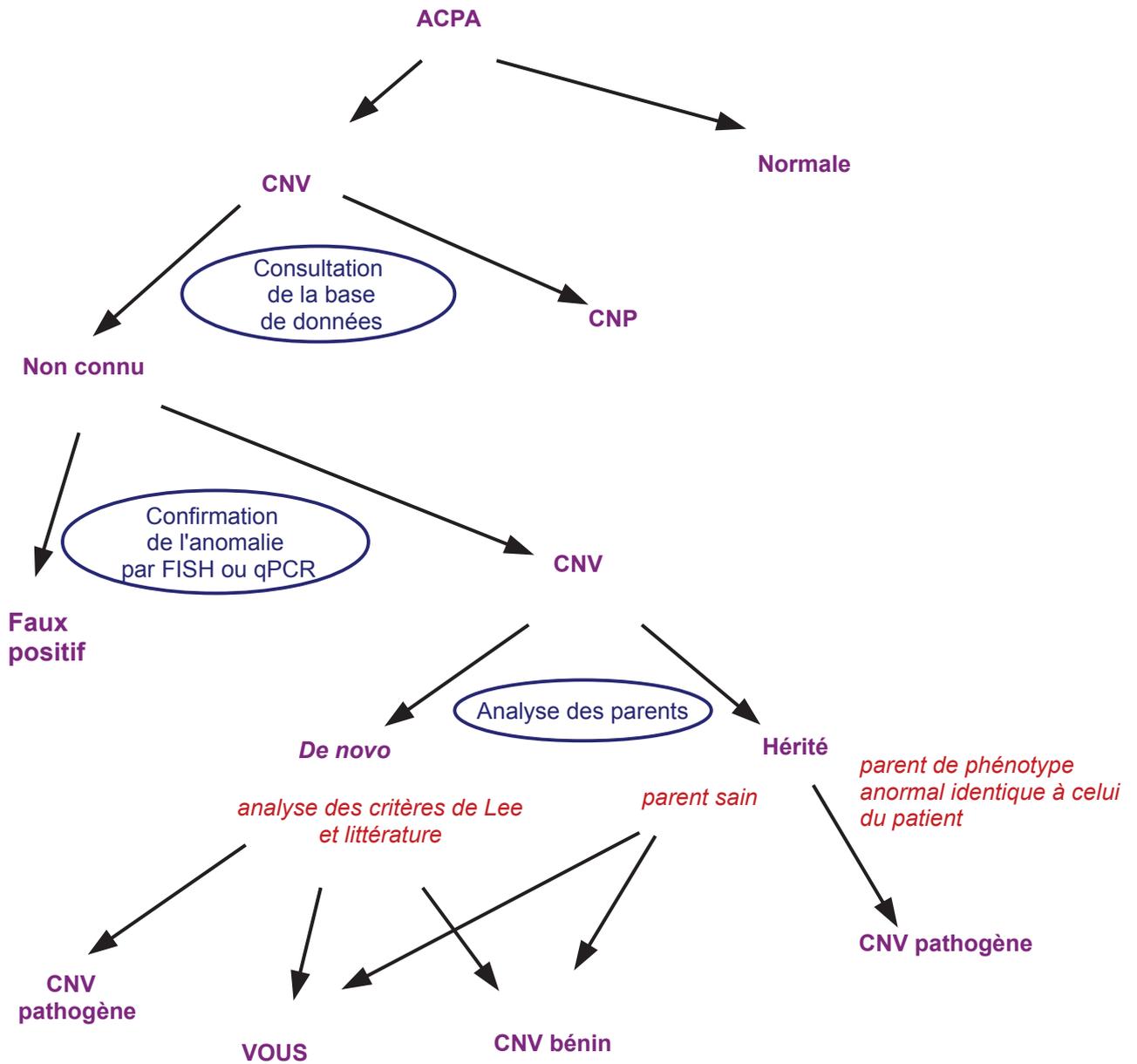
Pour déterminer la causalité d'un CNV, il faut prendre en compte les critères de Lee et les informations rapportées dans différentes bases de données sur la fonction des gènes, l'existence d'autres patients avec le même CNV et l'existence d'un syndrome génétique connu dans cette région. Ces différentes bases de données sont :

- DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources )
- ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced

### Chromosome Aberrations )

- BACH (Base de données d'Anomalies Cytogénétiques Humaines)
- ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays)
- OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)
- PUBMED

Un CNV sera plutôt pathogène s'il est *de novo*, de taille supérieure à 400 kb, riche en gènes et si un autre patient avec le même CNV a déjà été décrit.



ACPA: Analyse Chromosomique par Puce à ADN. CNP: Polymorphisme du Nombre de Copies.  
 CNV: Variant du Nombre de Copies. VOUS: Variant de Signification Incertaine.

Figure 4. Stratégie décisionnelle pour la classification des CNVs

## 4. Limites de l'ACPA

L'ACPA permet de visualiser des microremaniements chromosomiques non visibles sur caryotype. Elle est en moyenne 100 fois plus résolutive qu'un caryotype.

Néanmoins, l'ACPA ne permet pas de détecter :

- les anomalies chromosomiques équilibrées (translocation, inversion) étant donné que l'ACPA est une technique quantitative (25)
- les mosaïques chromosomiques à faible pourcentage, c'est-à-dire de moins de 20% (26)
- les triploïdies par la technique de la CGH-array, étant donné que la proportion de lot haploïde du patient et du témoin par quantité d'ADN hybridée est identique
- les mutations ponctuelles puisque l'ACPA n'est pas une technique de biologie moléculaire analysant chaque base nucléotidique (24)

Par ailleurs, l'interprétation des CNVs n'est pas toujours facile. Pour certains CNVs, la signification phénotypique reste incertaine à ce jour en raison des limites de nos connaissances actuelles sur le génome humain ou de l'absence de publications de patients présentant la même anomalie chromosomique.

La résolution de l'ACPA dépend du type de puces utilisées. Plus la puce est résolutive, plus le nombre de CNVs détectés augmente et plus l'interprétation des résultats se complique avec notamment l'existence des VOUS (22). Le domaine de la recherche génétique et les études établissant une corrélation génotype-phénotype pourraient permettre ultérieurement de réévaluer la causalité de ces CNVs dont l'impact n'était pas clairement identifié initialement.

Une autre difficulté de l'ACPA est la mise en évidence de CNVs sans rapport avec l'indication de la prescription. En effet, l'analyse peut détecter des CNVs dans des gènes de prédisposition au cancer ou impliqués dans des maladies à transmission

autosomique récessive, ainsi que des remaniements chromosomiques acquis dans le cadre d'hémopathies malignes.

Il est donc indispensable de donner une information claire et précise aux parents sur les bénéfices et les limites de l'ACPA.

## 5. Applications de l'ACPA en DPN

Les premières études ayant montré l'intérêt de l'ACPA en période prénatale étaient des études rétrospectives menées sur des fœtus polymalformés morts spontanément in utero ou après une interruption médicale de grossesse (IMG). Dans ces études, 9 à 16% de CNVs pathogènes ont été détectés : 16,3% pour Le Caignec *et al.* (27) en 2005, 15,4% pour Vialard *et al.* (28) en 2009, 10% pour Valduga *et al.* en 2010 (29) et 9,8% pour Schaeffer *et al.* en 2004 (30).

Ces dernières années, des études prospectives en période prénatale ont été menées et ont bien validé l'intérêt et les indications de l'ACPA en prénatal. De ce fait, des recommandations pour l'utilisation de l'ACPA en diagnostic prénatal ont été établies au dernier trimestre 2013 par de nombreuses sociétés savantes (ACLF (31), Collège Américain d'Obstétriciens et de Gynécologues (ACOG) (32), Société Canadienne de Médecine Materno-Fœtale (SCMFM) (33)).

À ce jour, les indications de l'ACPA en période prénatale en France sont :

- en remplacement du caryotype :
  - syndrome polymalformatif (association d'au moins deux anomalies congénitales à l'échographie)
  - Clarté Nucale (CN)  $\geq 3,5$  mm
  - Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU)  $< 3^{\text{ème}}$  percentile isolé, sans étiologie obstétricale

- pour caractériser un remaniement chromosomique observé sur le caryotype :
  - remaniement chromosomique apparemment équilibré (translocation ou inversion) avec signe(s) d'appel échographique(s) et/ou si *de novo*
  - marqueur chromosomique (fragment chromosomique dont l'origine n'est pas identifiée)
  - remaniement chromosomique déséquilibré (34)

La prescription d'une ACPA en DPN doit se faire au sein d'un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal (CPDPN) et des informations concernant l'analyse doivent être données préalablement au couple. Un consentement spécifique devra être signé par le couple et une notice d'information devra leur être remise avant de réaliser l'analyse.

La mise en place de l'ACPA en DPN a soulevé de nombreuses questions : **Quelles sont les meilleures indications en DPN ? Quelles sont les difficultés de l'ACPA en DPN ? Comment pallier à ces difficultés ?**

Notre travail consistera à évaluer, grâce à une étude bibliographique d'articles scientifiques, l'intérêt de l'ACPA en prénatal, les problématiques soulevées par son utilisation en prénatal et les moyens de les surmonter. Nous examinerons la méthodologie des différentes approches expérimentales, la fiabilité des résultats obtenus et les limites rencontrées dans ces études. Enfin nous concluons sur les indications de l'ACPA en diagnostic prénatal.

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. Sélection du Matériel

Afin de réaliser ce mémoire, nous avons recherché des études concernant l'utilisation de l'ACPA en prénatal sur la base de données électroniques Pubmed, Science Direct, et la Cochrane Library en nous servant des mots-clés suivants:

- « array comparative genomic hybridization »
- « oligonucleotide array sequence analysis »
- « prenatal diagnosis »
- « copy number variation »
- « variant of uncertain significance »

Nous avons fait une première sélection d'articles sur lecture des titres et des abstracts. Nous avons ensuite procédé à une deuxième sélection à partir des critères suivants :

- la méthodologie
- la date de publication
- la qualité des périodiques dans lesquels ils ont été publiés
- la renommée des auteurs
- leur intérêt par rapport à la question posée
- la citation dans les références bibliographiques d'autres études et publications parlant du même sujet.

Dans le cadre de notre recherche, nous avons également étudié les références bibliographiques des publications. Ces références ont été recherchées et obtenues sur les moteurs de recherche des périodiques concernés.

## 2. Méthode d'intervention

Nous avons finalement retenu trois articles qui nous ont paru pouvoir répondre à la problématique et pour lesquels nous avons utilisé une grille de lecture standardisée (annexe II).

1/ Wapner R, Lese Martin C, Levy B, Ballif B, Eng C, Zachary J, *et al.* Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med* 2012;367:2175-2184 (35)

2/ Schaffer L, Rosenfeld J, Dabell M, Coppinger J, Bandholtz A, Ellison J, *et al.* Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn* 2012;32:986-995 (36)

3/ Rooryck C, Toutain J, Cailley D, Bouron J, Horovitz J, Lacombe D, *et al.* Prenatal diagnosis using array-CGH: A French experience. *Eur J Med Genet* 2013;56:341-345 (37)

# RÉSULTATS

# 1. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis (35)

## 1.1. Objectif

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la fiabilité, l'efficacité et la rentabilité de l'ACPA par rapport au caryotype dans le cadre du DPN.

## 1.2. Matériel et méthodes

- Recrutement des patientes et prélèvement des échantillons

Entre octobre 2008 et juillet 2011, l'étude a été proposée à toutes les femmes enceintes de singleton qui s'étaient présentées à un des vingt-neuf centres de DPN, dans le but d'effectuer une choriocentèse ou une amniocentèse pour les indications suivantes : âge maternel avancé, signes d'appel échographiques, calcul de risque élevé par les marqueurs sériques maternels, et autres.

Les avantages et les risques de l'ACPA ont été expliqués aux patientes tels que le risque de détecter des CNVs incertains ou de déceler des CNVs impliqués dans des maladies d'apparition tardive. Les patientes ayant accepté l'étude devaient signer un consentement.

Les choriocentèses ont été effectuées de manière habituelle et pour les amniocentèses 10 millilitres (ml) supplémentaires ont été recueillis. Tous les échantillons ont été envoyés au même laboratoire de cytogénétique (Integrated Genetics®) afin de réaliser une culture cellulaire et un caryotype. Un échantillon de liquide amniotique (7-10 ml) ou de villosités choriales (au moins 2 milligrammes (mg) de tissu) anonymisé a été dans un deuxième temps envoyé à un des quatre laboratoires qui réalisent l'ACPA, accompagné des prélèvements sanguins

périphériques de chacun des parents. Les fœtus pour lesquels une mosaïque a été mise en évidence sur le caryotype ont été exclus.

- Analyses des échantillons par puce à ADN

Les ADNs fœtaux ont d'abord été extraits selon les protocoles du laboratoire, puis testés afin de détecter une éventuelle contamination par de l'ADN maternel (Identifier kit, Applied Biosystems®). Les prélèvements présentant une contamination supérieure à 10% ont été exclus.

Ensuite, les résultats de l'ACPA ont permis de classer les échantillons selon quatre groupes : vrai positif, vrai négatif, faux positif et faux négatif pour les aneuploïdies ainsi détectées, en comparaison avec les résultats du caryotype. La deuxième phase de l'analyse consistait à étudier les résultats observés en fonction des CNVs non vus sur le caryotype, du succès ou de l'échec de l'analyse et de la capacité de l'ACPA à identifier des anomalies cytogénétiques rares observées sur le caryotype.

Les deux puces utilisées par les quatre laboratoires étaient une puce 44K (44 000 oligonucléotides) de la société Agilent® et trois d'entre eux utilisèrent également une puce pan-génomique Genome-Wide Human SNP Array 6.0® (1,8 millions d'oligonucléotides) d'Affymetrix®.

Les ADN extraits des prélèvements sanguins des parents ont également été analysés pour déterminer si les CNVs détectés chez le fœtus étaient hérités ou *de novo*. Les CNVs *de novo* ont tous été confirmés par une deuxième méthode : la FISH ou la qPCR.

- Classification des échantillons

Un centre de coordination des données (George Washington University of Biostatistics Center) a recueilli l'ensemble des résultats des quatre laboratoires, a consulté les bases de données des CNVs et les a classé en :

- CNVs probablement bénins : les variants de petite taille ne contenant pas de

- gènes importants et n'entraînant pas d'anomalies échographiques,
- CNVs pathogènes : les variants incluant une région impliquée dans un phénotype anormal bien défini
  - VOUS

Les VOUS ont été soumis à un comité consultatif composé de généticiens et de conseillers en génétique qui ont écarté les variants n'ayant pas d'impact clinique important et les ont définis comme étant bénins.

Aucun CNV bénin n'a été communiqué aux patients.

- Analyse statistique

Le logiciel SAS software de la SAS Institute® a été utilisé pour l'analyse statistique.

### 1.3. Résultats

Au total, 6537 femmes ont été colligées durant la période de l'étude. 4450 ont accepté de participer à l'étude et 4406 échantillons de bonne qualité ont été obtenus (dont 2275 villosités choriales et 2131 liquides amniotiques). Parmi ces 4406 patientes, 1109 présentaient des anomalies échographiques, 2054 avaient un âge maternel avancé (38,5 ans +/- 2,5), 827 avaient un calcul de risque élevé pour les marqueurs sériques, et 416 avaient d'autres raisons.

Sur les 4406 échantillons, 4391 (99,7%) étaient de bonne qualité pour réaliser une ACPA, 8 (0,18%) présentaient une contamination maternelle supérieure à 10%, et 7 (0,16%) présentaient un échec de la culture cellulaire ou de la réalisation du caryotype. Parmi les 4391 échantillons de bonne qualité, pour 58 une mosaïque a été mise en évidence sur le caryotype, et pour 51 l'extraction d'ADN ou la réalisation de l'ACPA avait échoué. Ainsi, 4282 échantillons ont pu être utilisés pour faire un caryotype et une ACPA.

- Anomalies détectées par le caryotype

Parmi ces 4282 analyses, il a été détecté 321 (317+4) (7,5%) trisomies touchant les chromosomes autosomes les plus fréquents, 57 (1,3%) aneuploïdies touchant les chromosomes sexuels, 40 (0,93%) remaniements chromosomiques de la structure équilibrés, 22 (0,51%) remaniements chromosomiques de la structure déséquilibrés, 17 (0,4%) triploïdies et 3 (0,07%) marqueurs chromosomiques. Ainsi 460 caryotypes étaient anormaux.

Toutes ces anomalies ont également été identifiées par l'ACPA, à l'exception des anomalies chromosomiques de la structure équilibrées, des triploïdies et d'un marqueur chromosomique (ce dernier était constitué uniquement d'hétérochromatine donc sans conséquence phénotypique).

- Anomalies détectées par l'ACPA lorsque le caryotype réalisé préalablement était considéré comme normal

Sur les 3822 échantillons sans anomalie chromosomique visible sur le caryotype, 1399 CNVs ont été mis en évidence :

- 1234 (32,3%) CNVs bénins
- 35 (0,9%) CNVs reconnus comme pathogènes
- 130 (3,40%) VOUS dont 69 probablement bénins, et 61 probablement pathogènes

Au total, 96 (35+69), soit 2,5%, CNVs ont été considérés comme potentiellement pathogènes, avec un intervalle de confiance (IC) des proportions à 95% entre 2,1 et 3,1 (IC 95% [2,1;3,1]).

Les différentes anomalies retrouvées ont été classées en fonction de l'indication du DPN dans le tableau II.

Tableau II. Fréquence et classification des CNVs détectés par ACPA lorsque le caryotype normal, en fonction des différentes indications de DPN

| Indications pour le DPN                           | Caryotype normal | CNVs bénins        | CNVs pathogènes | VOUS                |                         | Total des CNVs pathogènes*          |
|---|------------------|--------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|-------------------------------------|
|   |                  |                    |                 | Probablement bénins | Probablement pathogènes |                                     |
|   | Nombre           | Nombre (%)         | Nombre (%)      | Nombre (%)          | Nombre (%)              | Nombre (%)<br>[IC 95%]              |
| Âge maternel avancé                               | 1966             | 628 (31,9)         | 9 (0,5)         | 37 (1,9)            | 25 (1,3)                | <b>34 (1,7)</b><br><b>[1,2;2,4]</b> |
| Calcul de risque élevé par les marqueurs sériques | 729              | 247 (33,9)         | 3 (0,4)         | 13 (1,8)            | 9 (1,2)                 | <b>12 (1,6)</b><br><b>[0,9;2,9]</b> |
| Anomalies échographiques                          | 755              | 247 (32,7)         | 21 (2,8)        | 16 (2,1)            | 24 (3,2)                | <b>45 (6,0)</b><br><b>[4,5;7,9]</b> |
| Autre**   | 372              | 112 (30,1)         | 2 (0,5)         | 3 (0,8)             | 3 (0,8)                 | <b>5 (1,3)</b><br><b>[0,6;3,1]</b>  |
| <b>Total</b>                                      | <b>3822</b>      | <b>1234 (32,3)</b> | <b>35 (0,9)</b> | <b>69 (1,8)</b>     | <b>61 (1,6)</b>         | <b>96 (2,5)</b><br><b>[2,1;3,1]</b> |

\* Total des CNVs pathogènes et des VOUS reconnus comme probablement pathogènes

\*\* Les autres indications de DPN comprennent les antécédents familiaux d'anomalie chromosomique, les antécédents lors d'une précédente grossesse, et les demandes exclusives des patientes

#### 1.4. Discussion

Il a été montré que l'ACPA est équivalente à l'analyse du caryotype en prénatal pour les détections des aneuploïdies les plus fréquentes. L'ACPA a également permis d'identifier 6,0% de CNVs pathogènes chez des fœtus porteurs de malformations congénitales avec un caryotype considéré comme normal.

Parmi 130 VOUS mis en évidence chez tous les fœtus, peu importe l'indication, il était difficile de classer 94 VOUS en CNVs bénins ou pathogènes. L'étude ayant commencé 5 ans avant la publication, les données ont été réinterprétées afin d'être en accord avec la littérature et les bases de données contemporaines. Parmi ces 94

VOUS, 30 sont désormais classés comme étant définitivement des CNVs pathogènes, 8 comme étant des CNVs bénins, et 56 restent de signification incertaine. Ainsi, le taux de CNVs incertains détectés par ACPA et dont la pathogénicité reste incertaine est de 1,5%.

Par ailleurs, l'analyse directe des échantillons a préférentiellement été choisie pour éviter d'éventuels artefacts (apparition d'anomalies chromosomiques) liés à la culture cellulaire et pour diminuer le délai de rendu des résultats.

Les triploïdies ne sont pas détectées par la technique de CGH-array (contrairement à la SNP-array), néanmoins les malformations observées dans les triploïdies sont d'apparition très précoce.

Les translocations et les inversions chromosomiques équilibrées sont retrouvées sur 0,08 à 0,09% des prélèvements réalisés en prénatal mais ne sont pas détectables par l'ACPA car il n'y a ni gain, ni perte de matériel génétique. Cependant, une anomalie équilibrée héritée, n'ayant pas de conséquence sur la grossesse en cours, reste intéressante à mettre en évidence afin de pouvoir donner un conseil génétique pour les grossesses ultérieures (risque de déséquilibre pour la descendance). De plus, dans les réarrangements chromosomiques apparemment équilibrés *de novo* identifiés grâce au caryotype, il y a 6,7% de risque d'apparition de malformations congénitales. L'apparition de ces malformations pourrait être la conséquence d'une perte ou d'un gain de matériel génomique au niveau des points de cassure du remaniement chromosomique, ce qui peut être détectée grâce à l'ACPA.

Dans ce cas, si l'ACPA est normale, il serait nécessaire de faire des investigations plus approfondies afin de calculer le risque résiduel d'un réarrangement équilibré et de déterminer si une analyse génomique supplémentaire est indispensable.

Actuellement, un geste invasif est proposé lorsque le risque d'aneuploïdie calculé est supérieur ou égal à 1/270. Dans cette étude, 1,7 % (1/60) des CNVs pathogènes ont été détectés pour des indications de DPN autres que des signes d'appel échographiques. Si d'autres études confirment ce pourcentage, il serait approprié de proposer un geste invasif suivi d'une ACPA à toutes les femmes enceintes. Par ailleurs, le Collège Américain de Gynécologie-Obstétrique (ACOG) suggère que

toutes les femmes enceintes, quel que soit le risque, devraient avoir la possibilité de recourir à un geste invasif. Lors du conseil génétique, les risques des prélèvements fœtaux, la fréquence et la gravité des résultats obtenus par ACPA doivent être évoqués. De plus, il faudrait limiter l'identification des aneuploïdies les plus fréquentes par des gestes invasifs puisqu'elles sont désormais détectables par des dépistages non-invasifs.

## **2. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound (36)**

### 2.1. Objectif

L'objectif principal de cette étude était de montrer l'intérêt diagnostique de l'ACPA pour des grossesses où des signes d'appel échographiques ont été observés. Le but était de calculer les taux de détection des CNVs pathogènes pour une malformation congénitale précise.

### 2.2. Matériel et méthodes

Entre juillet 2004 et décembre 2011, des prélèvements fœtaux tels que des échantillons de liquide amniotique, de villosités chorales, de sang fœtal mais également des produits de conception ont été récoltés par le laboratoire. Le but était d'obtenir un diagnostic cytogénétique grâce à l'utilisation d'abord de puces ciblées sur des régions chromosomiques connues comme étant délétères, puis de nouvelles versions de puces qui étaient pan-génomiques (puces Signature Genomics de Perkin Elmer®).

Toutes les données présentées dans cette étude ont été recueillies lors d'une procédure d'ACPA cliniquement approuvée.

En excluant les prélèvements ayant échoué, 5003 échantillons ont été récoltés pour diverses indications, dont 2858 pour signes d'appel échographiques.

En raison d'une forte probabilité d'obtenir des CNVs, les échantillons pour lesquels une anomalie chromosomique a été mise en évidence sur le caryotype, ceux issus d'un fœtus mort ou ceux pour lesquels une histoire familiale a été notée (antécédents d'anomalies chromosomiques chez l'un des parents) ont été exclus de ces 2858 cas.

Les IMG effectuées en raison de signes d'appel échographiques n'étaient pas considérées comme des morts fœtales et ont donc été incluses dans la cohorte.

Les CNVs ont été classés en 3 catégories : les CNVs sans signification clinique (CNVs bénins connus ou non), les CNVs de pathogénicité incertaine (VOUS), ou les CNVs pathogènes.

Tous les cas ont été analysés par l'auteur J.A Rosenfeld et classés d'abord en fonction des différents signes d'appel échographiques détaillés sur le formulaire du laboratoire ou sur le compte-rendu échographique, puis en fonction des résultats obtenus (CNVs bénins, pathogènes ou VOUS).

Les VOUS ont été réanalysés ultérieurement par les auteurs J.A. Rosenfeld et L.G. Schaffer qui ont reclassé certains en CNVs bénins ou CNVs pathogènes, grâce à l'actualisation de la littérature et à leur propre expérience acquise.

Les signes d'appel échographiques ont été classés en :

- 1) anomalies de la structure de plusieurs systèmes organiques
- 2) anomalies de la structure d'un système organique
- 3) anomalies isolées de la croissance
- 4) anomalies isolées de la quantité de liquide amniotique
- 5) une anomalie mineure
- 6) plusieurs anomalies mineures
- 7) plusieurs anomalies non structurales, telles que le RCIU, les anomalies de quantité de liquide amniotique et les anomalies mineures

Les anomalies mineures incluaient les kystes du plexus choroïde, les foyers hyperéchogènes cardiaques ou intestinaux, les raccourcissements isolés des os longs, les absences des os propres du nez, les artères ombilicales uniques, les persistance de la veine ombilicale droite, les écarts importants entre le premier et le

deuxième orteil, et les clinodactylies du cinquième doigt.

Le taux de détection pour un signe d'appel échographique a été calculé si celle-ci a été répertoriée au moins vingt fois (associée ou non à d'autres malformations).

Par ailleurs, les résultats anormaux étaient classés en fonction de la taille du remaniement chromosomique : les CNVs d'une taille supérieure à 10 Mb (détectables sur le caryotype) et les CNVs d'une taille inférieure à 10 Mb (non visibles sur le caryotype).

### 2.3. Résultats

Au total, 2858 prélèvements réalisés chez des fœtus pour lesquels des signes d'appel échographiques ont été mis en évidence ont bénéficié d'une ACPA.

L'âge moyen maternel était de 31,8 ans et 44% des femmes avaient un âge avancé ( $\geq 35$  ans au moment de l'accouchement).

La majorité des prélèvements a été testée grâce à des puces de type oligonucléotides pan-génomiques (n=2161, 76%) et le reste grâce à des puces de type BAC pan-génomiques (n=506, 18%) ou ciblées (n=191, 7%).

Le caryotype était normal pour 2052 (72%) fœtus. Pour les autres, soit le caryotype a été effectué en même temps que l'ACPA (n=465, 16%), soit le caryotype était inconnu ou ininterprétable (n=341, 12%).

Sur les 2858 prélèvements fœtaux, 6,5% de CNVs pathogènes et 4,8% de VOUS ont été détectés. Lorsque seuls les cas avec un caryotype normal sont pris en compte, le taux de détection de CNV pathogènes peut être considéré comme identique, soit 6,2%.

Parmi les 2858 cas, 61 présentaient des signes d'appel échographiques non spécifiques et 5 ont été classés dans la catégorie « autre » car ne correspondaient

pas aux anomalies précédemment décrites : ces 66 cas ont été exclus des analyses ultérieures.

En considérant les quatre principales catégories d'anomalies vues à l'échographie (d'un seul système organique, de plusieurs systèmes organiques, non structurales, et les autres), le taux de détection des VOUS ne dépendait pas de l'indication de l'étude ( $\chi^2=5,82$  ,  $df=3$  ,  $p=0,12$ ).

- Anomalies d'un seul système organique

Parmi 1519 cas porteurs d'une anomalie ou de plusieurs anomalies dans un seul système organique, le taux de CNVs pathogènes était de 5,3% ( $p=0,30$ , Test Exact de Fisher).

Parmi 254 cas porteurs d'anomalies dans un seul système organique associées à un RCIU, une anomalie de la quantité de liquide amniotique ou à des signes mineurs, le taux de CNVs pathogènes était de 7,1% ( $p=0,30$ ).

Le taux de détection n'était pas significativement différent entre les divers systèmes touchés ( $\chi^2=14,1$ ,  $df=8$ ,  $p=0,08$ ).

Dans ce groupe, 82% (81/99) de ces CNVs pathogènes avaient une taille inférieure à 10 Mb, donc non détectables sur le caryotype.

- Anomalies de plusieurs systèmes organiques

Dans ce groupe, 9,5% (77/808) de CNVs pathogènes ont été identifiés dont 68% (52/77) avaient une taille inférieure à 10 Mb.

Le taux de détection de ces CNVs était significativement plus élevé dans le groupe présentant des anomalies de plusieurs systèmes organiques que dans le groupe présentant des anomalies touchant un seul système organique ( $p<0,001$ ).

- Signes mineurs

Dans 5,5% (24/435) des cas présentant un signe mineur, un CNV pathogène a été identifié.

Le taux de détection des CNVs pathogènes pour les anomalies isolées non structurelles était significativement plus bas (2,8% , 6/211) que celui pour les anomalies multiples (9,5%, 77/808), mais pas statistiquement différent de celui des anomalies touchant un seul système (5,6%, 99/1773 avec  $p=0,10$ ).

#### 2.4. Discussion

- Augmentation de la résolution grâce à l'ACPA

Étant donné que l'étude a été menée principalement sur des fœtus avec un caryotype normal, la majorité des CNVs détectés se situait en dessous du seuil de résolution du caryotype en prénatal (<10 Mb). Parmi les cas présentant une anomalie de la structure, 82 % (81/99) des CNVs pathogènes étaient <10 Mb, contre 68 % (52/77) pour les cas présentant plusieurs anomalies de la structure.

Les auteurs ont montré que le taux de détection des CNVs pathogènes était proche des valeurs rapportées par Lee *et al.*(38) qui avaient détecté 10,5% de CNVs pathogènes pour les fœtus présentant une seule anomalie (5,6% dans cette étude) et 15,4% pour les fœtus avec deux anomalies ou plus, avec des caryotypes normaux (9,5% dans cette étude).

En comparant cette étude avec celle de Staebler *et al.* (39), les auteurs supposent que le taux de détection des anomalies chromosomiques par l'ACPA serait d'environ 50% supérieur à celui des techniques de cytogénétiques classiques pour ces grossesses.

- Augmentation du rendement des CNVs pour une anomalie fœtale spécifique

L'étude a permis de révéler un taux de CNVs pathogènes de 4,2% pour la catégorie « hydronéphrose isolée ou pyélectasie » (1/24, il s'agissait d'un cas avec pyélectasie et mégavessie), de 12,5% pour les « anomalies vertébrales isolées » (1/8, il s'agissait d'un cas avec hémivertèbres), et de 6,7% pour « les reins dysplasiques multikystiques isolés » (1/15). Ces résultats prouvent l'intérêt de faire une ACPA si de telles anomalies fœtales sont mises en évidence à l'échographie.

Pour certaines anomalies fœtales, le taux de détection était très important : 7,9% (48/580) de CNVs pathogènes ont été détectés pour les malformations cardiaques congénitales, 8,6% (60/699) pour les anomalies du système nerveux central, 8,5% (45/530) pour les anomalies musculo-squelettiques, 5,0% (4/80) pour les anomalies gastro-intestinales, 4,5% (16/352) pour les augmentations de la CN, et 6,3% (6/96) pour une CN isolée  $\geq 4$  mm.

- Avantages et incertitudes de l'ACPA

L'identification d'anomalies chromosomiques non vues sur le caryotype fœtal permet une meilleure exploration des caryotypes parentaux, une meilleure compréhension de l'étiologie des anomalies fœtales, une aide pour la prise en charge de la grossesse, d'établir un pronostic précis, et d'obtenir des informations utiles au conseil génétique pour une grossesse ultérieure. En effet, certaines anomalies comme l'holoprosencéphalie sont de mauvais pronostic voire létales, mais il reste important pour la famille qu'un diagnostic étiologique soit posé. Par ailleurs, il ne faut pas négliger la possibilité de découvrir des VOUS.

- Limites de cette étude

Les informations obtenues dépendaient des questionnaires fournis par le laboratoire. Les définitions de certaines anomalies vues à l'échographie divergeaient d'un site de référence à l'autre. De plus, la confirmation postnatale des anomalies

morphologiques n'était pas accessible.

Dans certains cas, d'autres signes d'appel échographiques associés pouvaient exister, mais ils n'étaient pas considérés : ils ne faisaient pas partie des critères d'inclusion. Ainsi, il pourrait y avoir une surestimation du taux de détection pour les signes d'appel échographiques isolés. Ceci expliquerait que le taux de détection pour certaines malformations congénitales isolées était plus élevé que celui où plusieurs anomalies vues à l'échographie s'associaient (pied bot isolé : 13,6%, pied bot associé à une autre signe d'appel échographique : 8,1%).

Dans l'ensemble, le taux de détection des signes d'appel échographique multiples était significativement supérieur à celui des signes d'appel échographiques isolés, ce qui prouve que la plupart des indications à effectuer une ACPA étaient bonnes.

## 2.5. Conclusions

Le taux de détection des anomalies chromosomiques est clairement augmenté et plus particulièrement si l'indication concerne des signes d'appel échographiques. Ces résultats confortent l'avis de l'ACOG qui approuve l'utilisation systématique de l'ACPA en présence d'anomalies morphologiques fœtales.

### **3. Prenatal diagnosis using array-CGH : A French experience (37)**

#### 3.1. Objectif

L'objectif principal de cette étude était de proposer une stratégie pour l'application de l'ACPA en prénatal et pour aider à l'interprétation des CNVs.

Les auteurs espèrent que cette publication permette d'encourager le développement de l'ACPA dans les centres n'ayant pas encore débuté cette activité en routine en prénatal et puisse conduire à établir des recommandations dans ce domaine.

#### 3.2. Matériel et méthodes

- Patientes

Un dépistage prénatal par FISH sur des noyaux interphasiques et un caryotype ont été effectués chez 224 fœtus. En fonction de ces résultats, une ACPA a été réalisée ou non. Parmi ces 224 fœtus, 213 présentaient des signes d'appel échographiques et 11 des anomalies chromosomiques sur le caryotype.

Les indications pour la réalisation d'une ACPA ont été divisées en 4 groupes :

- groupe 1 : les anomalies chromosomiques de la structure apparemment équilibrées ou des marqueurs chromosomiques surnuméraires mis en évidence sur le caryotype
- groupe 2 : une CN>3,5 mm au premier trimestre de la grossesse
- groupe 3 : l'association d'au moins deux signes d'appel échographiques
- groupe 4 : les signes d'appel échographiques majeurs justifiant une IMG, quels que soient les résultats des analyses cytogénétiques

Lors du conseil génétique, les parents étaient informés de l'utilisation possible de l'ACPA, en expliquant ses avantages et ses limites. La stratégie diagnostique adoptée consistait à réaliser dans un premier temps une FISH sur noyaux interphasiques, pour rechercher les aneuploïdies les plus fréquentes. Dans un second temps, si aucune aneuploïdie n'avait été mise en évidence, un caryotype et une ACPA étaient réalisés parallèlement.

Si aucune anomalie chromosomique n'avait été détectée par l'une des trois techniques de cytogénétique, la patiente bénéficiait systématiquement d'un suivi échographique rapproché.

- Méthodes

Tous les prélèvements étaient réalisés dans le centre de Médecine Fœtale de Bordeaux. Ils étaient obtenus principalement par biopsie de villosités chorales ou de placenta ou plus rarement par ponction de liquide amniotique entre 12 et 35 SA.

De grandes quantités de villosités chorales (>30mg) ont été ponctionnées par voie transabdominale extra-amniotique avec une aiguille de 20 gauge.

Les extractions d'ADN pouvaient se faire à partir du tissu frais. Ainsi, les villosités chorales ont subi une double digestion enzymatique (trypsine puis collagénase), afin de réaliser les analyses cytogénétiques préférentiellement sur l'axe mésenchymateux des villosités chorales (et non le cytotrophoblaste), qui se rapproche plus de l'origine embryonnaire.

La quantité de matériel était suffisante pour effectuer les différentes analyses :

- FISH réalisée sur des noyaux interphasiques (Aneuvysion™ kit, Abbott Laboratories, Abbott Park®, IL, USA)
- caryotype obtenu par l'examen direct sur villosités chorales
- caryotype obtenu sur les cultures cellulaires (bandes R, résolution d'environ 400 bandes)

- l'APCA
- d'autres techniques moléculaires
- étude histologique du placenta

Pour l'ACPA, l'ADN était d'abord extrait sur un minimum de 5 mg de villosités chorales digérées ou sur 10 ml de liquide amniotique (Wizard manual kit, Promega®). Puis, 500 nanogrammes (ng) d'ADN de chaque prélèvement étaient étiquetés deux fois (cyanine 3 et cyanine 5) et hybridés sur des puces type oligonucléotides 8x60K d'Agilent Technologies® (60 000 oligonucléotides). La numérisation des données a été réalisée par le scanner G2565B (Agilent Technologies®). Puis l'analyse des données brutes a été effectuée par le logiciel Feature Extraction 9.5.3.1 pour le calcul du ratio de fluorescence et par le logiciel Workbench pour la localisation des déséquilibres chromosomiques sur le génome.

Les délétions et duplications étaient prises en considération si 8 sondes déviantes consécutives étaient détectées par l'algorithme ADM2 fixé à un seuil de 5 (résolution en moyenne de 400 kb). Les CNVs ont ensuite été analysés grâce au logiciel Cartagenia ([www.cartagenia.com](http://www.cartagenia.com)) qui consulte automatiquement plusieurs bases de données pour l'interprétation.

Une étude moléculaire de 16 marqueurs microsatellites (Powerplex PP16, Promega®) répartis sur l'ensemble du génome a été systématiquement réalisée chez le fœtus et chez ses deux parents, afin de vérifier l'absence de contamination maternelle de l'échantillon.

### 3.3. Résultats

Pour les 213 fœtus présentant des signes d'appel échographiques, la FISH a mis en évidence 64 anomalies chromosomiques dont 56 aneuploïdies communes (touchant

les chromosomes 13, 18 et 21 et sexuels) et 8 triploïdies (soit 30% d'anomalies chromosomiques détectées).

Le caryotype a confirmé ces 64 anomalies chromosomiques et a pu en identifier 7 autres pour ces 213 fœtus (soit 33% d'anomalies chromosomiques détectées). Le caryotype a également révélé 11 anomalies chromosomiques chez des fœtus dont l'indication de réalisation d'une analyse cytogénétique était un âge maternel avancé, ou des marqueurs sériques du premier ou du second trimestre élevés.

En tout, pour les 213 fœtus avec anomalies morphologiques, 71 avaient un caryotype anormal et 142 un caryotype normal (tableau III).

L'ACPA a été effectuée sur 160 prélèvements : 142 caryotypes normaux et 18 caryotypes anormaux pour lesquels les réarrangements chromosomiques étaient à caractériser. Le taux d'anomalies chromosomiques détecté par l'ACPA selon les 4 groupes précédemment décrits est de 50% (9/18) pour le groupe 1 (caractérisation des anomalies chromosomiques identifiés sur le caryotype). Il varie de 5,3 à 16,6% (moyenne 12%) pour les groupes 2, 3 et 4 (signes d'appel échographiques divers).

Tableau III. Classification des CNVs pathogènes selon les indications

| Indication   | Total des échantillons | CNVs pathogènes  | Numéro de l'échantillon | Anomalies échographiques  | Type d'anomalie                            | Taille de l'anomalie (kb)       | Analyses parentales   | Issue de la grossesse |
|--|------------------------|------------------|-------------------------|---|--|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| CN >3,5mm (groupe 2)   | 57                     | <b>3 (5,3%)</b>  | 10                      | hyperclarté nucale: hygroma kystique persistant, aplasie des os du nez.   | délétion<br>délétion                       | 8 940<br>273                    | de novo<br>de novo    | IMG                   |
|  |                        |                  | 11                      | CN=3,5 mm   | délétion                                   | <b>13 420</b>                   | de novo               | IMG                   |
|  |                        |                  | 12                      | CN=9mm  | délétion                                   | 2 520                           | de novo               | IMG                   |
| Anomalies mineures du 1 <sup>er</sup> ou 2 <sup>ème</sup> trimestre (groupe 3) | 36                     | <b>6 (16,6%)</b> | 13                      | Grossesse triple dont un fœtus :aplasie des os du nez et membres courts.  | délétion                                   | 405                             | de novo               | Foeticide sélectif    |
|  |                        |                  | 14                      | RCIU, hydramnios, dysmorphie faciale, reins hyperéchogènes.   | délétion                                   | 1 655                           | de novo               | IMG                   |
|  |                        |                  | 15                      | petits reins, hydramnios  | délétion<br>duplication                    | 1 734<br>8 387                  | de novo<br>de novo    | Né vivant             |
|  |                        |                  | 16                      | dysmorphie faciale, pyélectasie, micropenis.  | délétion                                   | <b>12 068</b>                   | t(2;7)                | IMG                   |
|  |                        |                  | 17                      | RCIU modéré, membres fins, hypomobilité.  | duplication<br>délétion                    | <b>13 004</b><br>6 700          | maternelle<br>de novo | IMG                   |
|  |                        |                  | 18                      | <b>agénésie du corps calleux</b> , pyélectasie.   | duplication                                | <b>146 280</b>                  | de novo               | IMG                   |
|  |                        |                  | 19                      | RCIU, micromélie, hydramnios, syndrome polymalformatif.   | délétion                                   | 3 024                           | hérité du père        | IMG                   |
| Anomalies échographiques sévères (groupe 4)                                    | 49                     | <b>7 (14,3%)</b> | 20                      | anasarque, reins hyperéchogènes, ascite abdominale, hypomobilité.   | délétion                                   | 8 097                           | hérité du père        | IMG                   |
|  |                        |                  | 21                      | RCIU, micromélie, dysmorphie craniofaciale, hydramnios, malposition des mains, hypoplasie rénale, cardiopathie. | duplication<br>délétion                    | <b>99 312</b><br>3 214          | t(9;22)<br>paternelle | IMG                   |
|  |                        |                  | 22                      | microcéphalie, cardiopathie   | délétion                                   | 2 520                           | de novo               | IMG                   |
|  |                        |                  | 23                      | reins multikystiques, anamnios  | délétion                                   | 2 799                           | de novo               | IMG                   |
|  |                        |                  | 24                      | cardiopathie, agénésie rénale unilatérale, hydramnios   | délétion<br>duplication                    | <b>10 302</b><br><b>11 022</b>  | t(2;20)<br>maternelle | IMG                   |
|  |                        |                  | 25                      | agénésie du corps calleux, pyélectasie bilatérale, RCIU, moelle épinière anormale                               | 2 délétions:<br>(mosaïque 70%)<br>délétion | 1 800<br><b>15 573</b><br>1 940 | de novo<br>de novo    | IMG                   |
|  |                        |                  |                         |   |  |                                 |                       |                       |

En rouge: les anomalies &gt;10 Mb

### 3.4. Discussion

La FISH sur noyaux interphasiques (non cultivés) est une technique rapide de dépistage d'aneuploïdies à utiliser en première intention en cas de signes d'appel échographiques, puisqu'elle a permis de diagnostiquer 30 % d'aneuploïdies. Ce taux est en accord avec d'autres études.

Pour l'ACPA, le taux moyen de détection des CNVs cliniquement significatifs (12%) était plus élevé que les taux moyens décrits dans les dernières publications : 2,7% (pour 2497 fœtus) (38), 3,3% (1037 fœtus) (40), 4,2% (1075 fœtus) (41), ou 5,3% (5003 fœtus) (42).

Ce taux se rapproche des pourcentages d'anomalies chromosomiques découvertes par ACPA en postnatal dans les retards mentaux syndromiques (12,2% pour 33 études concernant 21 698 patients) (43).

Le taux de détection de cette étude diffère selon les groupes : le taux était très élevé pour le groupe d'anomalies morphologiques fœtales sévères (groupe 4, 14,3%) mais plus faible que celui du groupe d'anomalies morphologiques mineures (groupe 3, 16,6%). Ces pourcentages sont à interpréter avec précaution au vu du faible nombre de patients. Néanmoins, ces observations permettent de considérer l'association d'au moins deux signes d'appel échographiques, même mineurs, comme une bonne indication pour réaliser une ACPA.

Les auteurs ont identifié 4 fœtus porteurs d'une microdélétion 22q11.2, dont trois qui correspondent à la délétion récurrente du syndrome de DiGeorge et un associé à une duplication 9q provenant d'une malségrégation d'une translocation paternelle équilibrée t(9;22). Pour ces 4 fœtus, les signes d'appel échographiques étaient hétérogènes et atypiques n'évoquant pas le syndrome de DiGeorge, ce qui ne permettait pas d'utiliser la FISH ciblée sur le locus 22q11.2. Néanmoins, l'ACPA a permis d'identifier le syndrome microdélétionnel chez ces fœtus.

Deux cas, dont l'indication était une augmentation isolée de la CN, ont été difficiles à traiter. Le premier présentait une duplication de 2,5 Mb en 22q11.2 hérité du père « sain » et le deuxième une délétion de 2,6 Mb en 16p13.11p12.3 héritée de la mère, correspondant à un syndrome microdélétionnel avec pénétrance incomplète. Dans les deux cas, les parents ont souhaité poursuivre la grossesse, après avoir obtenu des informations claires sur l'anomalie chromosomique détectée. Ainsi, le diagnostic de syndromes microdélétionnels ou microduplicationnels avec pénétrance incomplète n'a pas présenté de problème éthique dans cette étude.

De plus, les auteurs pensent que les régions associées à des syndromes avec pénétrance incomplète devraient être explorées. Ils ont donc choisi des puces pan-génomiques plutôt que des puces ciblées. D'après eux, une puce ciblée représente une perte d'information qui pourrait être donnée au couple.

La puce 60K d'une résolution de 400 kb limite considérablement le risque de faux-positifs et la détection de VOUS.

De plus, les auteurs n'ont pas eu de grandes difficultés à interpréter les CNVs, même dans les régions « mal connues ». La stratégie adoptée comportait plusieurs étapes : d'abord déterminer si le CNV était hérité ou *de novo* (en étudiant sur les parents la région chromosomique concernée), rechercher ces régions sur les bases de données internationales (DECIPHER, ISCA, ECARUCA, DGV), analyser le nombre et les fonctions des gènes inclus dans la région concernée, et essayer d'établir un lien entre ces gènes et les anomalies fœtales vues à l'échographie. Il est primordial d'établir une corrélation génotype-phénotype pour prendre une décision finale.

Une des limites de l'ACPA est la non détection des triploïdies. Néanmoins, avec la stratégie diagnostique adoptée par les auteurs, qui consistait à utiliser la FISH en première intention, les triploïdies ont été systématiquement détectées.

Une autre limite de l'ACPA est son manque de sensibilité à détecter des mosaïques faibles. Dans l'étude, une mosaïque de trisomie 21 à 40% et de trisomie 9q à 60% a été identifiée.

### 3.5. Conclusions

Les auteurs pensent que cette étude permet d'éclaircir l'intérêt de l'ACPA pour le diagnostic prénatal et de proposer une stratégie simple et fiable. Ils espèrent que ce travail contribuera à éditer des guides de bonne pratique dans ce domaine.

# **DISCUSSION**

Dans cette discussion générale, nous allons tout d'abord effectuer une analyse critique de chaque article avant de confronter ces données à celles de la littérature, afin d'essayer de répondre à notre problématique.

## **1. Analyse critique des articles**

### 1.1. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis

Cette étude récente (2012) a été publiée dans la revue américaine The New England Journal of Medicine avec un facteur d'impact de 53,658 en 2013. La NEJM est à ce jour la revue médicale la plus prestigieuse. Depuis sa publication, l'étude a été citée 81 fois par d'autres auteurs.

L'auteur principal de cet article, Ronald J. Wapner, est un médecin et chercheur de renommée internationale, spécialisé dans la génétique de la reproduction. Il est l'auteur ou co-auteur de plus de 250 publications qui ont fait avancer la recherche et la pratique clinique dans le domaine de la médecine maternelle et fœtale. Les autres auteurs ont également publié plusieurs études sur l'ACPA, son utilisation en diagnostic prénatal et postnatal. De plus, ils ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

L'article suit le schéma de l'IMReD (Introduction, Matériel et Méthode, Résultats et Discussion).

L'objectif est clairement défini : évaluer l'efficacité, la fiabilité et la rentabilité de l'ACPA par rapport au caryotype, pour les diagnostics prénataux.

Pour y répondre, les auteurs ont réalisé une étude de cohorte prospective en simple aveugle, ce qui correspond au grade B des recommandations (présomption scientifique), c'est-à-dire un niveau II de preuve scientifique. C'est la méthode la plus adaptée à ce type d'étude, avec un bon niveau de preuve. Par ailleurs, cette étude multicentrique a permis d'inclure un grand échantillon et a limité les biais de sélection géographique ou ethnique.

Les critères d'inclusion sont les femmes enceintes pour lesquelles un DPN a été proposé pour diverses raisons : âge maternel avancé, signes d'appel échographiques, marqueurs sériques élevés, et autres. Cette catégorie « autres » n'a été définie que dans la partie résultats, en note de bas de tableau. La période d'inclusion est précisée. Les critères d'exclusion sont explicitement détaillés grâce à une figure, mais n'ont pas été entièrement abordés dans le texte.

Le facteur étudié est la détection d'anomalies chromosomiques par ACPA. Le critère de jugement est la détection des CNVs par ACPA, que le caryotype n'a pas pu révéler. Ce critère est justifié.

L'étude a été approuvée par les comités d'éthique de tous les sites participants et les auteurs se sont portés garant de l'exactitude des données et du suivi du protocole qui est disponible sur NEJM.org. De plus, toutes les femmes acceptant de participer à l'étude devaient signer un formulaire de consentement où les avantages et les risques de l'ACPA étaient expliqués.

La méthode est bien détaillée, du prélèvement des échantillons jusqu'aux résultats. Cependant, les échantillons anonymisés ont été envoyés dans un deuxième temps dans un des quatre laboratoires d'ACPA, mais le choix de ce laboratoire n'est pas précisé. Ceci peut constituer un biais de méthode et d'évaluation.

Pour l'analyse, deux types de puces à ADN ont été choisis. Néanmoins, les résultats pour chaque puce utilisée ne sont pas détaillés, de même que la résolution choisie. En effet, cela aurait été intéressant de connaître le pourcentage de CNVs détectés par chacune des puces. Étant donné que la puce 44K d'Agilent® est moins résolutive que la puce SNP 6.0 d'Affymetrix®, on s'attendrait à avoir plus de CNVs avec la puce SNP 6.0 d'Affymetrix®.

De plus, les différentes anomalies morphologiques des fœtus ne sont pas précisées, ni leur nombre. Les auteurs auraient pu constituer deux sous-groupes : un signe d'appel échographique versus au moins deux signes d'appel échographiques, puisque le taux de remaniements chromosomiques détectés est d'autant plus élevé que le nombre de malformations est important.

Les résultats publiés par les auteurs permettent de répondre à leur problématique. Le logiciel utilisé est précisé. Les tests statistiques comprennent le calcul de

l'intervalle de confiance à 95%, précisé dans les tableaux des résultats et dans le texte. Un échantillon de 4000 patientes a été initialement choisi afin d'atteindre la sensibilité attendue. Un an après le début de l'étude, les auteurs avaient recalculé le nombre de patientes à inclure (4400) afin de garantir une puissance statistique et d'obtenir une borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% d'au moins 99%, pour une sensibilité observée de 100%, en supposant que 367 participantes auraient un caryotype anormal.

Les résultats obtenus sont proches des résultats d'autres études sur le même sujet : il y a une bonne cohérence externe. Par ailleurs, les résultats sont donnés selon les quatre groupes distincts, cités dans les critères d'inclusion, mais pour le groupe « autres » les pourcentages retrouvés sont additionnés. Il est peu judicieux d'avoir mis dans le même groupe les antécédents familiaux d'anomalies chromosomiques, les antécédents lors d'une précédente grossesse et les analyses de convenance, puisque ces trois groupes sont indépendants.

Les auteurs ont choisi de calculer le pourcentage de microremaniements chromosomiques retrouvés lorsque le caryotype est considéré comme normal, ce qui est pertinent puisque le but de l'étude était de comprendre ce que l'ACPA pouvait apporter de plus que le caryotype.

Ils ont retenu 6,0% (n=45) de CNVs pathogènes (incluant les CNVs pathogènes et VOUS potentiellement pathogènes) détectés pour les fœtus présentant des signes d'appel échographiques. En réalité, si nous ne tenons pas compte des VOUS potentiellement pathogènes, les auteurs n'ont détecté que 2,8% (n=21) de CNVs pathogènes pour la catégorie « signe d'appel échographique ». Le taux bas de 2,8% peut être lié au fait que la puce 44 K d'Agilent® a été plus fréquemment utilisée par rapport à la puce SNP 6.0 d'Affymetrix® (aucune mention dans l'article). En effet, comme la puce 44K est moins résolutive, elle ne détecte pas autant de CNVs. Or, il est avéré que plus la résolution de la puce est élevée, plus le nombre de CNVs détectés est important.

Le taux de CNVs pathogènes détectés pour la catégorie « âge maternel avancé » était 0,5% (n=9) et non 1,7% (n=34) et pour la catégorie « marqueurs sériques maternels » 0,4% (n=3) et non 1,6% (n=12).

Les différentes bases de données consultées pour classer les CNVs n'ont pas été nommées. Ceci peut être à l'origine d'un biais d'évaluation.

Les auteurs ont choisi de faire des analyses directes sur les échantillons, sans mise en culture préalable. C'est un choix compréhensible puisqu'il permet de gagner du temps, précieux en période prénatale.

La discussion porte sur les résultats de l'étude et fait bien ressortir les éléments discutables.

Toutefois, l'issue de grossesse de toutes ces participantes n'a pas été précisée. Cela aurait été intéressant de connaître par exemple le pourcentage d'IMG après réception des résultats. Néanmoins, les enfants, chez lesquels des CNVs ont été mis en évidence dans cette étude prénatale, sont suivis au long terme afin de comprendre les variations phénotypiques liées à ces CNVs.

Au final, les auteurs répondent à leur objectif de départ et obtiennent de bons résultats de détection d'anomalies chromosomiques, non vues sur le caryotype. Néanmoins, ils concluent que l'ACPA devrait être proposée à toutes les femmes enceintes. Cependant, dans la catégorie « autres », incluant les analyses faites pour convenance maternelle, 1,6% de VOUS (6/372) ont été détectés. Les patientes effectuant cette demande sont par définition très anxieuses. Accepter de faire une ACPA pour les rassurer n'est pas une solution puisqu'il est possible de détecter des VOUS, qui génèrent d'autant plus d'anxiété. Ainsi, il ne faut certainement pas proposer une ACPA à toutes les femmes enceintes.

Cette étude permet d'apporter des éléments de réponse à notre problématique.

## 1.2. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound

Cette étude récente de 2012 a été publiée dans la revue Prenatal Diagnosis dont le facteur d'impact était de 2,683 en 2013. L'article a été cité 16 fois depuis sa publication.

L'auteur principal, Lisa G. Shaffer, est un médecin spécialisé en ACPA. Tous les auteurs de cet article sont des employés du laboratoire Signature Genomic Laboratories® (Spokane, WA), ce qui conduit à un conflit d'intérêt, précisé dans l'article. Ils ont déjà publié sur le sujet (42).

L'abstract est bien mené et l'article suit la structure IMReD.

L'objectif principal est explicitement défini : montrer l'intérêt diagnostique de l'ACPA pour des grossesses où des signes d'appel échographiques ont été mis en évidence.

Le facteur étudié est la détection d'anomalies chromosomiques par l'ACPA.

Le critère de jugement principal est le type d'anomalies fœtales observées à l'échographie.

Cette étude rétrospective correspond au grade C des recommandations (faible niveau de preuve), c'est-à-dire un niveau IV de preuve scientifique.

Les critères d'inclusion et d'exclusion sont expliqués et pertinents. Cependant, les échantillons reçus par le laboratoire comprenaient des « produits de conception », terme vague et non défini. De plus, les auteurs ne précisent pas la provenance de ces échantillons.

Les différentes bases de données consultées pour définir les différents CNVs ne sont pas précisées. Néanmoins, les CNVs ont été classés comme étant bénins ou pathogènes par une seule personne. Ceci constitue un point positif puisqu'il évite un éventuel facteur de confusion.

Les puces utilisées pour l'ACPA (puces ciblées et pan-génomiques) ont été fournies par le laboratoire où travaillent les auteurs et ont été vérifiées sur le site de leur laboratoire. Ceci constitue un biais de sélection et un conflit d'intérêt non négligeable.

Cette étude est suffisamment puissante : elle a permis de récolter 5003 échantillons, dont 2858 ont été inclus, soit 57% de la population initiale.

De plus, les résultats des diverses anomalies échographiques sont classés selon plusieurs groupes, retrouvés aussi bien dans le texte que dans des tableaux. Il aurait été plus compréhensible de structurer ces données en un tableau résumant ces quatre groupes.

Le test statistique utilisé est le test du  $\chi^2$  qui a permis d'extraire des p valeurs. Cependant, aucun des tests effectués n'est significatif au niveau  $\alpha=0,05$ . Le Test Exact de Fisher a également été utilisé, pour comparer le pourcentage de CNVs pathogènes entre les anomalies touchant plusieurs systèmes organiques et les anomalies n'en touchant qu'un.

Nous avons pu recalculer les différents résultats à partir des données présentées. De plus, les pourcentages de CNVs pathogènes retrouvés sont bien détaillés en fonction du type de puce utilisée. Par ailleurs, les auteurs ont précisé la taille de l'anomalie détectée, ce qui est intéressant puisque les anomalies >10 Mb auraient pu être détectées par le caryotype. Ceci constitue un bon moyen de montrer l'apport de l'ACPA par rapport au caryotype.

Afin de répondre à notre problématique, nous avons regroupé les échantillons en deux groupes de signes d'appel échographiques : 1 signe d'appel échographique contre au moins 2 signes d'appels échographiques. Pour le premier groupe, nous avons calculé 5,3% de CNVs pathogènes (81/1519), et pour le deuxième groupe 8,9% (95/1062). Ce calcul nous permet d'homogénéiser ces résultats avec d'autres études. Par ailleurs, l'auteur précise que le taux de détection de CNVs délétères pour le groupe des anomalies fœtales isolées est probablement surestimé puisque certaines malformations fœtales n'étaient pas répertoriées dans l'étude.

La discussion des auteurs est bien menée. Ils étayaient les avantages de l'ACPA, mais également ses inconvénients et ses limites. De plus, ils confrontent leurs résultats à d'autres études traitant du même sujet (38). Les auteurs ont estimé que le taux de détection de CNVs pathogènes de 5,6% est proche des 10,5% observés dans l'étude de Lee *et al.*(38). Ce taux est en cohérence avec les 5,3% retrouvés dans une autre étude publiée par ces mêmes auteurs (42).

Par ailleurs, les informations concernant les anomalies fœtales ont été récoltées par des questionnaires fournis par le laboratoire. Les auteurs précisent bien dans leur discussion que ceci peut constituer un biais. En effet, il s'agit d'un biais de méthode.

Les auteurs citent également le type de malformations congénitales non observées durant cette étude et proposent ainsi de réaliser d'autres études portant sur un plus grand nombre de cas.

Cette étude est intéressante puisqu'elle a permis de calculer le pourcentage de CNVs pathogènes retrouvés pour chaque type de malformations congénitales observées à l'échographie.

La conclusion des auteurs est cohérente avec l'objectif de l'étude et apporte un élément de réponse à notre problématique.

### 1.3. Prenatal diagnosis using array-CGH : A French experience

L'étude a été publiée récemment, en 2013, dans l'European Journal of Medical Genetics dont le facteur d'impact était de 1,685 en 2013. Elle a été citée 8 fois depuis sa publication. Les auteurs ont déjà publié des articles concernant l'ACPA. L'auteur principal, Caroline Rooryck, est un médecin biologiste responsable notamment des tests diagnostiques du laboratoire de génétique moléculaire de Bordeaux.

L'abstract n'est pas structuré, mais l'article respecte la structure IMReD.

L'objectif principal est défini : proposer une stratégie pour l'application de l'ACPA en prénatal et pour aider à l'interprétation des CNVs.

Les auteurs ont réalisé une étude de cohorte prospective, constituant ainsi la méthode la plus adaptée. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont explicitement décrits, mais la période d'inclusion n'est pas précisée. De plus, la cohorte totale de 224 fœtus est plus petite que d'autres études sur le sujet (35). Les fœtus ont été répartis selon quatre groupes : ceux avec un caryotype anormal, une CN>3,5mm, des anomalies fœtales mineures et des anomalies fœtales majeures (justifiant une IMG).

Le facteur étudié est la découverte d'anomalies chromosomiques par l'ACPA pour chacun de ces quatre groupes. Le critère de jugement principal est la détection de CNVs pathogènes pour chaque groupe.

La méthode est bien détaillée, précisant la réalisation des différents prélèvements, les puces et les logiciels utilisés, et les bases de données consultées.

Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau clair et intelligible, et sont tous expliqués dans le texte. Afin de décrire ces résultats, les auteurs ont établi des statistiques descriptives. Les définitions des anomalies fœtales qu'ils ont considérées comme étant mineures ou majeures ne sont pas données, pouvant ainsi constituer un biais d'évaluation. Les auteurs ont simplement précisé que les malformations sévères justifient une IMG. D'après Dechelotte et Delezoïde (2005) (44), une anomalie mineure est définie comme une « variation anatomique du normal, sans conséquence sur la survie, et facilement réparable » et une anomalie majeure

comme une anomalie « compromettant la santé ou la survie ». Pourtant, le fœtus 18 présentant une agénésie du corps calleux a été classé dans le groupe des anomalies mineures. Ce classement peut être discuté car pour d'autres auteurs, il s'agirait plutôt d'une malformation majeure.

Cette étude présente beaucoup d'avantages. Tout d'abord, les résultats incluent les fœtus dont la CN est supérieure à 3,5mm, mettant en évidence 5,3% de CNVs pathogènes, ce qui est très intéressant. De plus, les quatre catégories de fœtus représentent les différentes indications actuelles de recours à l'ACPA en France, permettant de confirmer le choix de ces indications. Par ailleurs, plusieurs anomalies chromosomiques d'une taille supérieure à 10 Mb (concernant les échantillons 11,15,16,18,21,24 et 25) n'ont pas été vues sur le caryotype. Ceci souligne les limites du caryotype et l'intérêt de l'ACPA pour la détection d'anomalies chromosomiques déséquilibrées.

La puce utilisée dans cette étude est la puce pan-génomique 60K d'Agilent®. Sa résolution moyenne est de 400 kb. Le choix de cette puce est intéressante car elle permet de limiter le nombre de VOUS rendant difficile le conseil génétique en prénatal, tout en conservant une analyse du génome entier.

La discussion des auteurs est bien construite. Ces derniers ont réalisé une large confrontation de leurs résultats à beaucoup d'études traitant du même sujet (38). Ceci a permis de montrer que cette étude présente une bonne cohérence externe. Par ailleurs, les auteurs insistent sur le fait de donner une explication claire et précise des anomalies chromosomiques détectées, pour permettre aux parents de prendre une décision adaptée.

La conclusion des auteurs répond clairement à leur objectif.

Cette étude est très complète puisqu'elle balaye l'ensemble des avantages et des difficultés de l'ACPA. Elle permet de suivre une stratégie simple et efficace en DPN. Elle apporte des informations importantes pour répondre à notre problématique.

## 2. Discussion et confrontation aux données de la littérature

### 2.1. Indications de l'ACPA

- Signes d'appel échographiques
  - a) Au moins deux anomalies congénitales

Dans l'étude de Shaffer *et al.* (36), 8,9% (95/1062) de CNVs pathogènes ont été détectés chez des fœtus avec deux signes d'appel échographiques, ces CNVs n'auraient pas été détectés sur le caryotype dans 2/3 des cas en raison de leur taille inférieure à 10 Mb. L'étude de Vialard *et al.* (28) a mis en évidence 10,2% (4/39) de CNVs pathogènes. Dans l'étude de Le Caignec *et al.* (27), le taux de détection de CNVs pathogènes chez des fœtus porteurs d'au moins trois malformations était de 8,16% (4/49).

En définitive, lorsque le caryotype est normal chez des fœtus polymalformés, il y a un véritable intérêt à réaliser une ACPA, puisqu'en moyenne 10% d'anomalies chromosomiques déséquilibrées sont détectées en plus grâce à l'ACPA. Les recommandations de l'application de l'ACPA en DPN en France repose sur cette observation. Elles préconisent sa réalisation lorsqu'au moins deux malformations congénitales sont associées. Le taux de détection de CNV pathogènes sera d'autant plus élevé que le nombre de malformations congénitales est important.

L'ACPA doit se substituer au caryotype pour ces indications (passage en première intention) étant donné que non seulement des remaniements de petite taille sont détectés grâce cette technique, mais bien entendu aussi les déséquilibres visibles sur le caryotype. Néanmoins, il faut exclure une aneuploïdie (soit par un examen direct des villosités chorionales, soit par une FISH) avant toute analyse sur puce à ADN, comme le suggère les résultats de l'étude de Rooryck *et al.* (37), où 30% d'aneuploidies ont pu être détectées avant la réalisation d'une ACPA grâce à cette

stratégie.

Nous pouvons ainsi proposer une stratégie décisionnelle de l'ACPA en DPN (Figure 5), en nous basant sur les données de la littérature.

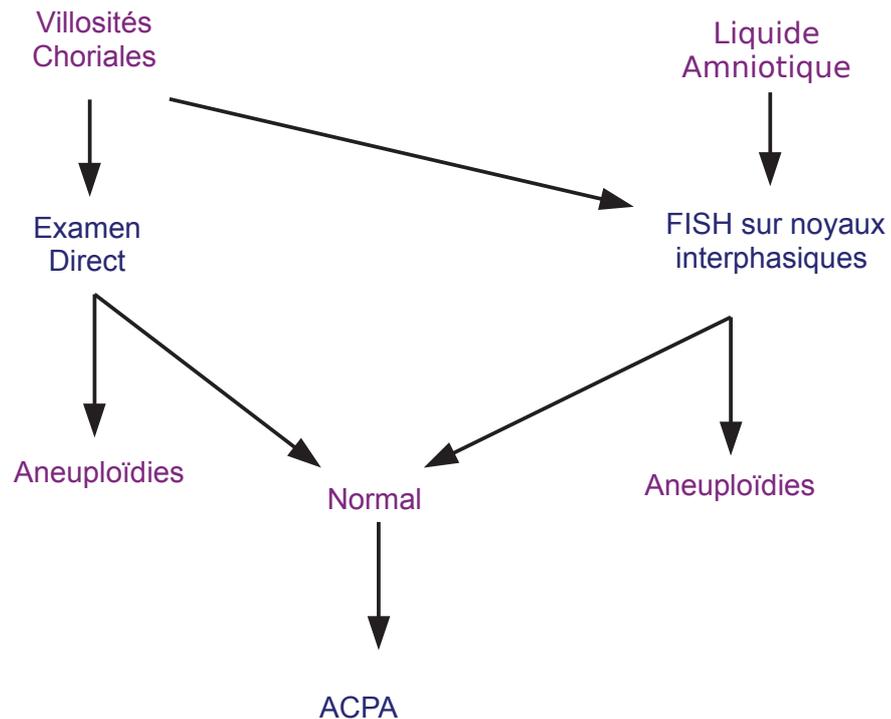


Figure 5. Proposition d'une stratégie décisionnelle de l'ACPA en DPN

Par ailleurs, l'étude de Shaffer *et al.* retrouve 5,3 % (81/1519) de CNVs pathogènes chez des fœtus porteurs d'un signe d'appel échographique (42). Certaines anomalies morphologiques isolées ont un taux de détection de CNVs délétères très intéressants telles que les anomalies cérébrales (15,1% dans les holoprosencéphalies), les anomalies cardiaques (9,5% dans les hypoplasies du cœur gauche). De ce fait, la question de l'application de l'ACPA peut se poser pour certaines malformations congénitales isolées.

## b) Hyperclarté nucale

L'hyperclarté nucale se définit comme une CN > 3mm (45) ou une CN > 95<sup>ème</sup> percentile en fonction de la longueur crânio-caudale de l'embryon (46).

Peu d'études indiquent le taux de CNVs pathogènes détectés lorsque la clarté nucale est augmentée de manière isolée, avec un caryotype considéré comme normal. L'étude de Rooryck *et al.* (37) a indiqué un pourcentage de 5,3% pour une CN  $\geq$  3,5 mm et celle de Shaffer *et al.* (36), un pourcentage de 6,3% pour une CN  $\geq$  4mm. Ce taux constitue un bon élément de compréhension de l'indication de réalisation d'une ACPA lorsque la CN est supérieure ou égale à 3,5mm et isolée.

## c) RCIU inférieur au 3<sup>ème</sup> percentile

Peu d'études précisent la proportion de patientes dont l'indication d'ACPA était un RCIU isolé <3<sup>ème</sup> percentile. L'étude de Shaffer *et al.* (36) a permis de mettre en évidence 2,6% de CNVs pathogènes lorsqu'il s'agit d'un RCIU. Néanmoins, l'importance du retard de croissance n'était pas précisée dans cet article.

La réalisation d'une ACPA devant un RCIU sans étiologie obstétricale semble être justifiée.

- Caractérisation d'un remaniement chromosomique identifié sur le caryotype

La caractérisation d'un remaniement chromosomique déséquilibré mis en évidence sur le caryotype (translocation, délétion, duplication, marqueur chromosomique) permet de faire une corrélation génotype-phénotype et de donner ainsi un conseil génétique précis aux parents.

Dans l'étude de Wapner *et al.* (35), un marqueur chromosomique a pu être considéré comme bénin car il n'était constitué que d'hétérochromatine (sans conséquence

phénotypique). Les parents ont ainsi pu être rassurés.

Pour les anomalies chromosomiques de la structure apparemment équilibrées (translocation, inversion), non héritées et associées à des signes d'appel échographiques, l'ACPA permet de rechercher au niveau des points de cassure des CNVs pouvant être responsables de malformations fœtales, mais aussi de mettre en évidence des CNVs pathogènes sur des régions chromosomiques différentes de celles impliquées dans l'anomalie chromosomique équilibrée observée initialement.

L'étude de Fiorentino *et al.* (47) est une étude prospective qui souligne bien cette indication. Le but de cette étude était d'utiliser l'ACPA en première intention pour des grossesses avec un risque *a priori* faible de détecter des microremaniements microscopiques. Pour cela, les auteurs avaient inclus 3000 patientes, dont 2904 caryotypes fœtaux étaient considérés comme normaux et 25 prélèvements présentaient des anomalies chromosomiques observées sur le caryotype. L'ACPA a été réalisée pour 4 anomalies chromosomiques de la structure, considérées comme équilibrées. Pour un fœtus, une délétion de 5,2 Mb a été révélée au niveau d'un point de cassure de l'un des chromosomes impliqués dans la translocation apparemment équilibrée *de novo*.

- Marqueurs sériques élevés du 1<sup>er</sup> trimestre ou du 2<sup>ème</sup> trimestre

Fiorentino *et al.* (47) n'ont détecté aucun CNV pathogène lorsque les marqueurs sériques étaient élevés. L'étude de Wapner *et al.* (35) montre un pourcentage de 0,4%, soit 3 CNVs pathogènes retrouvés parmi les fœtus ayant un caryotype considéré comme normal. Néanmoins, une étude antérieure de Shaffer *et al.* (42) a mis en évidence 5,2% (5/77) de CNVs pathogènes lorsque les marqueurs sériques étaient augmentés, avec un caryotype fœtal normal.

L'intérêt de réaliser une ACPA pour un marqueur sérique augmenté reste très discutable, comme le souligne les deux premiers articles. En effet, le pourcentage de CNVs pathogènes détectés est très faible pour cette indication. L'ACLF n'a pas retenu cette indication en France.

- Âge maternel avancé

Dans la même étude de Fiorentino *et al.* (47), 0,5 % des CNVs pathogènes (6/1118) ont été détectés pour un âge maternel supérieur ou égal à 35 ans au moment de la conception. Shaffer *et al.* (42) ont quant à eux un taux de 0,3% de CNVs pathogènes (1/346) (l'âge maternel n'était pas précisé). Dans l'étude prospective de Lee *et al.* (38) menée sur 3120 fœtus avec un caryotype normal, 1,6% (30/1911) de CNVs pathogènes étaient détectés chez des fœtus dont l'âge maternel dépassait 34 ans.

Ces études démontrent que le pourcentage de détection de CNVs pathogènes pour l'indication d'un âge maternel avancé est bas. L'âge maternel avancé ne constitue donc pas une bonne indication de recours à l'ACPA.

- ACPA pour convenance maternelle

Parmi les études ayant précisé les résultats des ACPA réalisées sur demande maternelle, aucun CNV pathogène n'a été détecté pour l'étude de Shaffer *et al.* (42), 0,4% ont été retrouvés pour Fiorentino *et al.* (47), 0,4% également pour Lee *et al.* (38).

Le taux de détection de CNVs pathogènes reste trop faible pour valider l'application de l'ACPA dans le cadre de demandes pour convenance maternelle, ce d'autant plus que le bénéfice de l'ACPA dans cette indication est inférieur au risque de fausse-couche lié au geste invasif (1-2 %). Par ailleurs, le taux de détection des CNVs pathogènes n'est pas nul, celui des VOUS ne l'est donc pas non plus, comme le démontre l'étude de Wapner *et al.* (35). La mise en évidence des VOUS tend à augmenter l'anxiété maternelle chez ces femmes qui sont déjà angoissées avant la réalisation de l'analyse. À ce jour, la réalisation d'une ACPA pour convenance maternelle n'est pas acceptée en France (36).

## 2.2. Difficultés de l'ACPA

- Délai de rendu des résultats

En période prénatale, le délai de rendu des résultats est un facteur notable puisque la plupart des malformations sont vues au cours de l'échographie du 2<sup>ème</sup> trimestre vers 22 SA, soit au 5<sup>ème</sup> mois de grossesse. Il est donc important de commencer les examens complémentaires le plus rapidement possible, tout en laissant le temps aux parents d'assimiler les différentes informations (annonce des malformations fœtales, proposition d'un geste invasif et d'analyses complémentaires).

L'ACPA peut se faire sur de l'ADN extrait soit directement sur villosités choriales, liquide amniotique ou sang fœtal, soit après culture cellulaire de villosités choriales ou de liquide amniotique. Le principal avantage de l'analyse sur de l'ADN extrait directement sur un tissu frais est de diminuer le temps de rendu des résultats. En effet, une culture cellulaire retarde l'analyse de deux semaines en moyenne, ce qui peut représenter une perte précieuse de temps en période prénatale, d'autant plus si le prélèvement est réalisé au troisième trimestre de la grossesse. Certains auteurs comme Wapner *et al.* (35) ou Rooryck *et al.* (37) ont privilégié une extraction directe dans leurs études. Gruchy *et al.* (48) ont effectué une étude prospective en 2012 sur 48 grossesses considérées à haut risque (RCIU et/ou au minimum deux malformations congénitales). Ils ont cherché à comparer les résultats de l'ACPA entre une analyse directe sur liquide amniotique et une analyse sur des cellules préalablement mises en culture. Ils ont utilisé une puce BAC (BlueGnome®) sur les 38 échantillons présentant un caryotype considéré comme normal. Ils ont conclu que l'ADN extrait directement d'un échantillon de liquide amniotique était de meilleure qualité et en plus grande quantité que l'ADN issu de la culture cellulaire. Les résultats de l'ACPA étaient identiques entre les deux types d'extraction. La faisabilité de l'ACPA sur des prélèvements fœtaux frais est clairement démontrée.

L'ACPA peut donc être réalisée sur de l'ADN extrait de tissu frais permettant ainsi un gain de temps précieux, surtout lorsque l'ACPA est faite tardivement dans la

grossesse.

Un autre avantage de l'extraction directe est de limiter les artefacts liés à la culture cellulaire.

Selon les recommandations de l'ACLF, plus de 90% des résultats doivent être rendus dans les six semaines suivant la réception du prélèvement si un caryotype est réalisé simultanément à l'ACPA, ou dans les deux semaines si le caryotype n'est pas réalisé. Dans ce dernier cas, il est néanmoins préconisé de mettre en œuvre une culture de sécurité (de secours) afin de pallier à un éventuel échec de l'ACPA (49).

- Détection de VOUS

La principale difficulté de l'ACPA est la détection de VOUS étant donné que l'impact du CNV sur le phénotype du fœtus est incertain. En effet, la proportion de VOUS retrouvée dans les différentes études était plus ou moins importante. Wapner *et al.* (35) ont détecté 3,4% de VOUS (130/3822). En 2009, Kleeman *et al.* (50) ont retrouvé 2% de VOUS. Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur 50 échantillons et dont les indications de l'ACPA étaient les malformations congénitales et/ou l'observation d'un RCIU, avec un caryotype considéré comme normal. Parmi ces 50 prélèvements issus de fœtus, 17 cas présentaient plus de deux malformations congénitales et 33 cas une seule malformation congénitale. Evangelidou *et al.* (51) ont mis en évidence 4% de CNVs incertains (1/25) chez des fœtus ayant soit un caryotype normal et porteurs de malformations congénitales, soit une anomalie chromosomique équilibrée sans malformation fœtale associée. La méta-analyse de Hillman *et al.* (52) effectuée sur 8 études, a montré un pourcentage de VOUS de l'ordre de 1,1% sur les 751 prélèvements. L'étude prospective de Tyreman *et al.* (53) a été réalisée sur 106 échantillons prénataux présentant des signes d'appel échographiques, avec un caryotype considéré comme normal. Les auteurs ont mis en évidence 12,3% de VOUS.

Le taux de détection de VOUS est donc très variable selon les études : entre 1 et 12%.

L'indisponibilité des échantillons parentaux constitue un facteur considérable qui tend à augmenter le pourcentage de VOUS, comme indiqué dans les différentes études. Analyser l'ADN des deux parents n'est pas toujours possible, ce qui entraîne une grande perte d'information pour l'interprétation des résultats. La connaissance du statut de transmission du CNV est une aide à la classification. Néanmoins un CNV hérité d'un parent sain n'est pas toujours bénin comme le montre l'étude rétrospective de D'Amours *et al.* (48) sur 49 fœtus à caryotype normal. Leur étude a montré que certains CNVs hérités d'un parent sain peuvent rester incertains. Le fœtus 36 présentait plusieurs signes d'appel échographiques (CN à 7,9mm, rétrécissement des os du nez, microcéphalie et artère ombilicale unique). L'ACPA avait mis en évidence une délétion 7p14.3p14.2 de 3,67 Mb chez ce fœtus polymalformé. Les analyses avaient montré que ce CNV était hérité de la mère dont le phénotype était considéré comme normal. Néanmoins, ce CNV est décrit comme un VOUS à cause de sa taille, des gènes contenus et des phénotypes variables décrits dans la littérature. Ainsi, certains CNVs restent encore incertains, même si la transmission parentale est établie, en raison de la variabilité d'expression et de la pénétrance incomplète de ce CNV. Ceci souligne l'importance des informations consultables dans les différentes bases de données permettant d'établir une corrélation génotype-phénotype.

- Détection de CNVs sans rapport avec l'indication de la prescription

L'ACPA peut mettre en évidence des CNVs n'ayant aucun rapport avec l'indication initiale. Tout comme les VOUS, ce type de CNV peut être problématique en diagnostic prénatal. En effet, il peut être éthiquement difficile de savoir si ce CNV doit être révélé aux parents. Le « Guide des Bonnes Pratiques de l'ACPA en Période Prénatale » rappelle que les CNVs figurant dans le compte rendu doivent avoir un intérêt clinique et un impact potentiel pour la grossesse en cours. De ce fait, les CNVs rapportés aux parents sont :

- les CNVs concernant des gènes tumoraux s'ils présentent un intérêt dans la prise en charge de l'enfant et/ou d'un apparenté

- les CNVs en relation avec des maladies liées à l'X
- les CNVs concernant des délétions homozygotes contenant des gènes responsables de maladies récessives
- les CNVs qui sont impliqués dans des maladies de révélation tardive ou des facteurs de prédisposition, seulement s'il existe un bénéfice direct pour le fœtus ou sa famille (49)

Dans l'étude de Yatsenko *et al.* (55), 4 CNVs détectés concernaient le statut de porteur d'une maladie génétique récessive ou liée à l'X et une susceptibilité à une maladie dominante de révélation tardive.

- Puce ciblée versus puce pan-génomique

Les puces utilisées pour l'ACPA jouent un rôle essentiel dans la détection de CNVs pathogènes et de VOUS.

Les puces ciblées sur des régions impliquées dans des pathologies connues permettent une interprétation précise des résultats et évitent la mise en évidence de VOUS ou de CNVs sans rapport avec l'indication initiale. L'inconvénient avec une telle puce est l'absence de détection des microremaniements non encore décrits à ce jour. En effet, une délétion interstitielle 12q22q23.2 de 7,2 Mb *de novo* a pu être mise en évidence en prénatal chez un fœtus porteur d'un hygroma colli, d'un RCIU, d'une microcéphalie et d'un micrognathisme, grâce à une puce de type BAC pan-génomique (IntegraChip v7.2®) d'une résolution de 500 kb. Cette délétion n'aurait pas été détectée avec une puce ciblée (24).

De nombreuses études utilisant des puces pan-génomiques soulignent bien la corrélation entre la résolution de la puce à ADN et le nombre de CNVs détectés.

D'Amours *et al.* (54) ont utilisé trois puces pan-génomiques, plus ou moins résolutive. La puce BAC de faible résolution SignatureChip WG® (contenant 4685 BAC) n'a pas permis d'identifier de CNV pathogène et de VOUS. La puce type oligonucléotides SignatureChip OS v1.1® (contenant 105 000 oligonucléotides) a mis en évidence 1 CNV pathogène (1/16, soit 6,25%) et 2 VOUS (2/16, soit 12,5%). La puce type oligonucléotides de meilleure résolution encore, SignatureChip OS v2.0/CGX-12® (contenant 135 000 oligonucléotides), a permis d'identifier 3 CNVs pathogènes (3/26, soit 11,5%) et 4 VOUS (4/26, soit 15,3%). Ces résultats montrent que des puces plus résolutive détectent plus de CNVs pathogènes mais aussi plus de VOUS.

En définitive, pour éviter une trop grande perte d'information, il faudrait utiliser une puce pan-génomique plutôt qu'une puce ciblée. Et pour minimiser la mise en évidence de VOUS, il faudrait choisir une puce avec une résolution moyenne (entre 400 kb et 1 Mb). La résolution d'une puce couvrant l'ensemble du génome doit être adaptée au mieux afin de limiter le nombre de VOUS, tout en permettant la détection de CNVs pathogènes. Cette adaptation peut se faire soit par le choix de la puce utilisée (puce de type BAC), soit au moment de l'analyse en réglant les critères d'analyse (seuil de détection), ou les deux (49).

### 2.3. Importance de l'information donnée

Avant toute prescription d'une APCA, il est primordial de donner certaines informations aux parents, afin de les aider à mieux comprendre les résultats pouvant être obtenus par cette analyse. Ces explications peuvent être données par un conseiller en génétique, un médecin généticien, un gynécologue ou une sage-femme du CPDPN. En plus des explications orales, un document écrit (notice d'information) concernant l'ACPA doit être remis au couple. Plusieurs points doivent être abordés lors de la consultation : la technique de l'ACPA, ses bénéfices, ses limites, les résultats incertains et les résultats non attendus (49).

Pratiquement tous les auteurs insistent sur l'importance de donner une information claire et précise avant l'ACPA et surtout après, au moment du rendu des résultats. Dans leur étude, Rooryck *et al.* (37) ont présenté deux cas difficiles de CNVs hérités d'un parent sain. En effet, les résultats correspondaient à des syndromes génétiques connus (microduplication 22q11.2 et microdélétion 16p13p11) mais la difficulté du conseil génétique reposait sur le fait qu'il s'agissait de pathologies avec une pénétrance incomplète et une variabilité d'expression (le phénotype est donc imprévisible), pouvant être hérité d'un parent sain. Les parents avaient reçu une information explicite quant aux différentes possibilités phénotypiques de leur enfant à naître et avaient décidé de poursuivre la grossesse, ce qui n'aurait peut-être pas été le cas en l'absence d'explications précises.

Evangelidou *et al.* (51) ont mené une étude prospective sur 64 échantillons issus de prélèvements foetaux. D'après eux, l'état d'esprit des parents après l'annonce d'une malformation congénitale doit être pris en compte. Ces derniers ne sont pas prêts à entendre les différentes informations concernant la malformation de leur enfant à naître, ou encore l'existence des différentes techniques d'analyses complémentaires. Ils sont généralement en état de choc, de surdité psychique. De ce fait, les auteurs recommandent d'écrire ces informations afin que les parents puissent les relire calmement avant de donner leur consentement pour les analyses génétiques comme l'ACPA. Ainsi, il est impératif de bien leur expliquer oralement et par écrit la technique de l'ACPA et surtout ses limites. Les parents doivent bien comprendre que l'ACPA ne peut pas détecter toutes les maladies génétiques (résolution de la puce) et que certains résultats sont de signification incertaine. Ainsi, ils aborderont mieux les résultats de l'analyse et pourront prendre leur propre décision, dans le meilleur intérêt pour l'enfant à naître.

#### 24. Conséquences des résultats de l'ACPA sur la grossesse

Un DPN soulève la question d'une IMG. La demande d'une IMG émane du couple, mais la décision d'accepter ou non l'IMG reste sous la dépendance de l'équipe du

CPDPN.

- CNV pathogène

La détection d'un CNV pathogène permet d'établir un pronostic précis de l'enfant à naître et de faciliter le choix des parents quant à l'issue de la grossesse. En effet, lorsqu'un diagnostic a clairement été posé, il peut être plus facile pour un couple d'opter pour une IMG sans se culpabiliser. Les demandes d'IMG dans le cadre d'anomalies chromosomiques sont généralement acceptées par le CPDPN.

La mise en évidence d'un CNV pathogène permet également de donner un conseil génétique adapté pour tout futur projet parental.

Si le CNV est hérité un DPN chromosomique (utilisation de la technique ayant permis de confirmer le CNV : FISH ou qPCR) pourra être proposé au couple pour une grossesse future, en raison d'un antécédent d'anomalie chromosomique.

Si ce CNV n'est pas hérité, le risque de récurrence de la même anomalie chromosomique reste faible pour la descendance du couple (risque de l'ordre de 1%). Néanmoins, un DPN chromosomique peut être proposé au couple pour une grossesse ultérieure en raison d'un risque résiduel qui correspond à l'existence d'une mosaïque germinale chez l'un des parents.

- VOUS

La mise en évidence d'un VOUS ne permet généralement pas au CPDPN de proposer une IMG au couple. Le VOUS ne peut pas non plus faire l'objet d'un DPN lors d'une future grossesse. Néanmoins, certains VOUS récurrents connus peuvent présenter une variabilité phénotypique importante tels que les microdélétions 16p13.11. Dans l'article de Rooryck *et al.* (37), un fœtus avec une CN > 7 mm était porteur d'une délétion de 2,6 Mb en 16p13.11p12.3, héritée de la mère qui présentait uniquement des difficultés scolaires. Ce VOUS correspond à un syndrome microdélétionnel récurrent avec pénétrance incomplète, décrivant des tableaux

cliniques plus ou moins sévères pouvant associer une microcéphalie, des anomalies cérébrales, un retard de développement, des troubles comportementaux et une épilepsie. Étant donné que ces VOUS peuvent conduire à des tableaux sévères, l'acceptation de l'IMG devient discutable si le fœtus présente des malformations décrites dans le syndrome.

Il est important de noter que les décisions prises au sein du CPDPN se font toujours au cas par cas.

Dans les prochaines années, grâce à l'évolution des connaissances dans le domaine de la génétique, le point de vue sur certains VOUS récurrents va sûrement changer et rendre l'IMG plus facilement accessible.

Par ailleurs, d'après la Loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique, une affection qualifiée comme étant grave et incurable au moment du diagnostic, permet au CPDPN de délivrer une attestation de gravité qui rendrait légale l'IMG (56). Ainsi en cas de signe d'appel échographique majeur mettant en jeu le pronostic vital de l'enfant, peu importe le résultat de l'ACPA, la demande d'IMG pourra être acceptée par le CPDPN. Dans le cas où les signes d'appel échographiques ne justifient pas à eux seuls l'IMG, la détection d'un CNV pathogène peut aider le CPDPN à accepter la demande du couple.

Les résultats apportés par nos différentes études, ainsi que leur confrontation aux données de la littérature ont permis de répondre à certains points de notre problématique.

Nous avons répondu à la question « Quelles sont les meilleures indications de l'ACPA en DPN ? ».

L'intérêt de l'ACPA en DPN est prouvé mais pas pour toutes les indications choisies dans les différentes études. En effet, l'apport de l'ACPA est clair en cas de signes d'appel échographiques ou pour caractériser un remaniement chromosomique vu sur le caryotype. Pour les indications telles que l'âge maternel avancé, les marqueurs sériques élevés, ou encore pour convenance maternelle, les bénéfices de l'ACPA

sont moindres.

Nous avons répondu aux deux autres questions « Quelles sont les difficultés soulevées par l'ACPA en DPN ? Quels sont les moyens pour y remédier ? ».

En effet, le délai de rendu des résultats est un facteur important en période prénatale. Ceci est d'autant plus vrai si la détection de malformations congénitales et le prélèvement fœtal ont lieu au dernier trimestre de la grossesse. Par ailleurs, il ne faut pas négliger qu'une IMG peut être d'autant plus difficile à accepter pour une femme, que sa grossesse est avancée. Afin de diminuer ce délai, les analyses peuvent être réalisées sur de l'ADN extrait directement sur des prélèvements fœtaux, sans mise en culture préalable (villosités choriales, liquide amniotique, sang fœtal).

La détection de VOUS et de CNVs sans lien avec l'indication initiale est un réel problème en DPN. Il est indispensable de leur donner une information claire et appropriée sur la technique de l'ACPA et ses limites, avant toute analyse. Si les parents sont correctement informés, ils sont parfaitement capables de comprendre la notion de pronostic incertain lié à la variabilité d'expression et à la pénétrance incomplète des VOUS. Le but de l'ACPA étant de détecter un maximum de CNVs pathogènes, il faut privilégier l'utilisation des puces pan-génomiques plutôt que des puces ciblées, afin d'éviter une trop grande perte d'information. Néanmoins, les puces pan-génomiques trop résolutes tendent à augmenter le taux de détection de CNVs et donc inévitablement de VOUS. Ainsi, il est préconisé d'utiliser une puce CGH-array de type BAC ayant une résolution moyenne de 500 kb, ou une puce CGH-array de type oligonucléotides ou encore une SNP-array, tout en diminuant le seuil de détection des microremaniements chromosomiques. Cette stratégie diagnostique permet une étude de l'ensemble du génome tout en limitant le risque de mettre en évidence des VOUS.

# CONCLUSION

L'ACPA a révolutionné le diagnostic de microremaniements chromosomiques déséquilibrés tant en période postnatale que prénatale. Son analyse résolutive permet de mettre en évidence des CNVs pathogènes non visibles sur le caryotype. Le taux élevé de détection de CNVs pathogènes retrouvé dans la littérature permet de comprendre les indications retenues en France pour la réalisation d'une ACPA en première intention en prénatal : signes d'appel échographiques, RCIU isolé et CN >3,5 mm. L'ACPA est également utilisée en prénatal pour caractériser une anomalie chromosomique vue sur le caryotype. Les indications exclues sont un signe d'appel échographique isolé, les marqueurs sériques, l'âge maternel avancé et la convenance maternelle.

L'utilisation de plus en plus fréquente de l'ACPA a soulevé beaucoup d'interrogations et de problèmes éthiques. En effet, mettre en évidence des VOUS et des CNVs pathogènes sans rapport avec l'indication initiale augmente les difficultés du conseil génétique. De ce fait, il est primordial qu'avant toute ACPA, le couple reçoive une information claire, loyale et appropriée, concernant la technique et les différents résultats pouvant être obtenus, comme le précise l'article L-2131 du Code de la Santé Publique, relative aux devoirs envers les patients (57).

Afin de détecter le maximum de CNVs pathogènes tout en limitant la mise en évidence de VOUS, une puce pan-génomique avec une résolution moyenne (de 400kb à 1 Mb environ) serait un bon compromis.

Il est important de noter qu'avant toute analyse, le couple est vu en consultation par un médecin, un conseiller en génétique ou une sage-femme du CPDPN. La sage-femme occupant une place importante dans le suivi de la grossesse, elle doit être capable de répondre aux questions qui lui sont posées concernant l'ACPA.

L'ACPA nécessite la réalisation d'un prélèvement fœtal qui présente un risque de fausse couche de 1-2%. Le DPN non invasif avec l'étude de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel étant de plus en plus étudié, il sera peut-être possible un jour d'effectuer une ACPA chez le fœtus à partir d'un prélèvement sanguin maternel.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Collège de la Haute Autorité de Santé. Rapport d'évaluation technologique. Echographies foetales à visée médicale et non médicale: définitions et compatibilité. [Internet]. 2012 [cité 15 janv 2014]. Disponible sur: [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-06/rapport\\_echographies\\_foetales\\_vde.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-06/rapport_echographies_foetales_vde.pdf)
2. Kurjak A, Kos M, Stipoljev F, Latin V, Funduk-Kurjak B, Kos M, et al. Ultrasonic markers of fetal chromosomal abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;85(1):105-108.
3. Colmant C, Senat M-V. Techniques de prélèvements foetaux. Elsevier Masson. 2012.
4. Keren B, Schluth-Bolard C, Egea G, Sanlaville D. Nouvelles méthodes d'analyse globale du génome humaine. *Arch Pédiatrie.* 2010;17:1605-1608.
5. Pasternak JJ. Génétique moléculaire humaine. Une introduction aux mécanismes des maladies héréditaires. [Internet]. De Boeck. 1999 [cité 17 nov 2013]. 513 p. Disponible sur: [http://books.google.fr/books?id=kaKACVc\\_gf4C&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=false](http://books.google.fr/books?id=kaKACVc_gf4C&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=false)
6. Lapierre J, Cacheux V, Collot N, Da Silva F, Hervy N, Rivet D. Comparison of comparative genomic hybridization with conventional karyotype and classical fluorescence in situ for prenatal and postnatal diagnosis of unbalanced chromosome abnormalities. *Ann Genet.* 1998;(41):133-140.
7. Delpech M. Les puces à ADN. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000;58(1):29-38.
8. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosom Cancer.* 1997;(20):399-407.
9. Jonveaux P. Foetal chromosome technique by microarray-based comparative genomic hybridization. *Arch Pédiatrie.* 2010;17:1119-1123.

10. Freedman M, Penney KL, Stram D, Le Marchand L, Hirschhorn J, Kolonel L, et al. Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort. *Hum Mol Genet.* 2004;13(20):2431-2441.
11. Malan V, Romana S. Analyse chromosomique sur puce à ADN (CGH array): principe et application en diagnostic prénatal. *Rev Médecine Périnatale.* 2012;4(2):67-79.
12. Schoumans J, Anderlid B-M, Blennow E, Teh BT, Nordenskjold M. The performance of CGH array for the detection of cryptic constitutional chromosome imbalances. *J Med Genet.* 41:192-202.
13. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998;20:207-211.
14. Barrett M, Scheffer A, Ben-Dor A, Sampas N, Lipson D, Kincaid R, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(51):17765-11770.
15. Lockwood W, Chari R, Chi B, Lam W. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:139-148.
16. Béri-Dexheimer M, Bonnet C, Chambon P, Brochet K, Grégoire M-J, Jonveaux P. L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (puces à ADN) en pathologie chromosomique constitutionnelle. *Pathol Biol.* 2007;55:13-18.
17. Andrieux J. Pucés à ADN (CGH array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques. *Pathol Biol.* 2008;56:368-374.
18. Vialard F, Molina Gomes D. Les nouvelles technologies d'analyse du génome: quelles utilisations en diagnostic prénatal. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 2011;39(39):32-41.

19. Bartholdi D. Génétique médicale: Copy number variants (CNV). A l'origine de maladies, un facteur de risque ou une variante de la norme sans signification? *Forum Méd Suisse*. 2008;8:1007-1008.
20. Feuk L, Carson A, Scherer S. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2006;7:85-97.
21. Keren B, Sanlaville D. Nouveaux outils diagnostiques du retard mental. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie*. 2008;11(4):230-241.
22. Redon R, Ishikawa S, Fitch K, Feuk L, Perry G, Andrews T, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444-454.
23. Lee C, Iafrate A, Brothman A. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet*. 2007;39:48-54.
24. Kremer V. Hygroma Colli au premier trimestre de la grossesse. Intérêt de la CGH-array devant un hygroma colli isolé chez les foetus à caryotype normal. [Strasbourg]: Université Louis Pasteur. Faculté de médecine.; 2009.
25. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset J, Sukno S, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet*. 2009;52(5):291-296.
26. Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, et al. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet*. 2006;43:353-361.
27. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet*. 2005;42(2):121-128.

28. Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, Quarello E, Escalona A, Le Sciellour C, et al. Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther.* 2009;25(2):277-284.
29. Valduga M, Philippe C, Bach Segura P, Thierbauges O, Milton A, Beri M, et al. A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn.* 2010;30(4):333-341.
30. Schaeffer A, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter D, Martin C. Comparative Genomic Hybridization–Array Analysis Enhances the Detection of Aneuploidies and Submicroscopic Imbalances in Spontaneous Miscarriages. *Am J Hum Genet.* 2004;74(6):1168-1174.
31. ACLF. eACLF- Association des Cytogénéticiens de Langue Française. [Internet]. [cité 15 févr 2014]. Disponible sur: <http://www.eaclf.org/>
32. The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion - The Use of Chromosomal Microarray Analysis in Prenatal Diagnosis. [Internet]. 2013 [cité 15 févr 2014]. Disponible sur: [https://www.acog.org/Resources\\_And\\_Publications/Committee\\_Opinions/Committee\\_on\\_Genetics/The\\_Use\\_of\\_Chromosomal\\_Microarray\\_Analysis\\_in\\_Prenatal\\_Diagnosis](https://www.acog.org/Resources_And_Publications/Committee_Opinions/Committee_on_Genetics/The_Use_of_Chromosomal_Microarray_Analysis_in_Prenatal_Diagnosis)
33. The SMFM Board & Staff. The Society for Maternal-Fetal Medicine [Internet]. [cité 15 févr 2014]. Disponible sur: <https://www.smfm.org/>
34. Gijsbers A, Lew J, Bosch C, Schuurs-Hoeijmakers J, Haeringen A, Den Hollander N, et al. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1394-1402.
35. Wapner R, Lese Martin C, Levy B, Ballif B, Eng C, Zachary J, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2175-2184.

36. Shaffer L, Rosenfeld J, Dabell M, Coppinger J, Bandholtz A, Ellison J, et al. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn.* 2012;32:986-995.
37. Rooryck C, Toutain J, Cailley D, Bouron J, Horovitz J, Lacombe D, et al. Prenatal diagnosis using array-CGH: a French experience. *Eur J Med Genet.* 2013;56(7):341-345.
38. Lee C, Lin S, Shih J, Lin T, Su Y. Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2012;119(5):614-625.
39. Staebler M, Donner C, Van Regemorter N, Duprez L, De Maertelaer V, Devreker F, et al. Should determination of the karyotype be systematic for all malformations detected by obstetrical ultrasound? *Prenat Diagn.* 2005;25(5):567-573.
40. Fiorentino F, Caiazzo F, Napolitano S, Spizzichino L, Bono S, Sessa M, et al. Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases. *Prenat Diagn.* 2011;31(13):1270-1282.
41. Breman A, Pursley A, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino C, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):351-361.
42. Shaffer L, Dabell M, Fisher A, Coppinger J, Bandholtz A, Ellison J, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2012;32(10):976-985.

43. Miller D, Adam M, Aradhya S, Biesecker L, Brothman A, Carter N, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-764.
44. Dechelotte P, Delezoïde A. Pathologie du développement - Malformations congénitales. Campus d'Anatomie Pathologique. 2005.
45. Nicolaides K, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *Br Med J.* 1992;304:867-869.
46. Snijders R, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides K. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Sreening Group. *The Lancet.* 1998;352(9125):343-346.
47. Fiorentino F, Napolitano S, Caiazza F, Sessa M, Bono S, Spizzichino L, et al. Chromosal microarray analysis as a first-line test in pregnancies with a priori low risk for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:725-730.
48. Gruchy N, Decamp M, Richard N, Jeanne-Pasquier C, Benoist G, Mittre H, et al. Array CGH analysis in high-risk pregnancies: comparing DNA from cultured cells and cell-free fetal DNA. *Prenat Diagn.* 2012;32(4):383-388.
49. Réseau Achropuce, Groupe ACPA et DPN. Guide des bonnes pratiques de l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) en période prénatale. [Internet]. 2013 [cité 16 janv 2014]. Disponible sur: <http://www.eaclf.org/docs/ACPA/guide%20bonnes%20pratiques%20ACPA%20DPNv1.pdf>

50. Kleeman L, Bianchi D, Shaffer L, Rorem E, Cowan J, Craigo S, et al. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn.* 2009;29(13):1213-1217.
51. Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, et al. Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting : advantages, challenges and review of the literature. *BioMed Res Int.* 2013;2013:1-14.
52. Hillman S, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan D, Davison E, Maher E, et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(1):6-14.
53. Tyreman M, Abbott K, Willatt L, Nash R, Lees C, Whittaker J, et al. High resolution array analysis: diagnosing pregnancies with abnormal ultrasound findings. *J Med Genet.* 2009;46(8):531-541.
54. D'Amours G, Kibar Z, Mathonnet G, Fetni R, Tihy F, Désilets V, et al. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. *Clin Genet.* 2010;81(2):128-141.
55. Yatsenko S, Davis S, Hendrix N, Surti U, Emery S, Canavan T, et al. Application of chromosomal microarray in the evaluation of abnormal prenatal findings. *Clin Genet.* 2013;84:47-54.
56. LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique | Legifrance [Internet]. [cité 15 févr 2014]. Disponible sur: [http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F4D65D02CE735813615639F917262EF3.tpdjo16v\\_1?cidTexte=JORFTEXT000024323102&dateTexte=20140215](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=F4D65D02CE735813615639F917262EF3.tpdjo16v_1?cidTexte=JORFTEXT000024323102&dateTexte=20140215)

57. Code de la santé publique - Article L2131-1 | Legifrance [Internet]. [cité 10 nov 2013]. Disponible sur: <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006687390&dateTexte=&categorieLien=cid>

# **ANNEXES**

ANNEXE I. Facteurs influençant l'évaluation des CNVs.

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

Source: Lee C, Iafrate A, Brothman A. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. Nat Genet 2007;39:48-54.

ANNEXE II : Grille de lecture standardisée de la méthode globale de lecture critique

| L'information existe-t-elle pour huit questions?   | La façon d'aborder la question est-elle correcte?   | Si non, cela menace-t-il la validité de l'étude?   |
|--|---|--|
| <b>1. Objectif</b><br>. Pronostic, évolution<br>. Test diagnostique<br>. Impact d'une intervention<br>. Etiologie, causalité   | Y a-t-il une hypothèse?   |  |
| <b>2. Type d'étude</b><br>. Rapport de cas, série de cas<br>. Etude transversale<br>. Etude cas-témoin<br>. Etude de cohorte<br>. Essai contrôlé                         | Le type d'étude est-il approprié à la question posée?   | Si non, les résultats de l'étude sont-ils totalement inutiles?   |
| <b>3. Facteur(s) étudié(s)</b><br>. Exposition<br>. Intervention<br>. Test diagnostique  | Sont-ils bien décrits?<br>Comment sont-ils mesurés?<br>*Même méthode de mesure chez tous les sujets dans tous les groupes?<br>Mesure à l'aveugle?<br>Y a-t-il une comparaison indépendante avec le <i>gold standard</i> ?   | .Si non, ce biais de mesure menace-t-il la validité de l'étude?<br>.Si non, ce biais menace-t-il la validité de l'étude?   |
| <b>4. Critère(s) de jugement</b>   | Comment sont-ils mesurés?<br>*Idem question 3<br>Tous les critères de jugement pertinents sont-ils évalués?   | Idem question 3<br>.Si non, ceux qui ont été oubliés sont-ils importants?  |
| <b>5. Population source et sujets étudiés</b>  | . La sélection est-elle correcte?<br>. Y a-t-il randomisation?<br>. Les groupes diffèrent-ils par des caractéristiques autres que les facteurs étudiés?<br>. Quelle est la proportion de sujets atteignant la fin du suivi?<br>. Y a-t-il pour le test un large éventail de patients? | . Si non, ce biais menace-t-il la validité externe?<br>. Si non, ce biais menace-t-il la validité interne?<br>. Si elle n'est pas optimale, la validité interne est-elle menacée?<br>. Si non, ce biais menace-t-il la validité externe? |
| <b>6. Facteurs de confusion potentiels et biais</b>  | . Sont-ils tous envisagés?<br>. Sont-ils bien contrôlés?  | . Si non, cela invalide-t-il l'étude?  |
| <b>7. Analyses statistiques</b><br>. Intervalle de confiance?<br>. Test statistique?<br>a) si résultats positifs<br>b) si résultats négatifs<br>. Force de l'association | Taille de l'échantillon suffisante?<br>. Cliniquement intéressant?<br>. Puissance du test, taille de l'échantillon  | . Si non, les résultats sont-ils inutiles?<br>. Si non, l'étude est-elle utile?<br>. Si insuffisant, l'étude est-elle : utile ou non concluante?   |
| <b>8. Conclusion des auteurs?</b><br>. Réponses aux questions?<br>. Vérification de l'hypothèse?<br>. Objectif atteint?  | Les conclusions répondent-elles à l'objectif?   | En somme :<br>. Les résultats sont-ils acceptables appliqués à la population-source?<br>= <b>VALIDITE</b><br>. Les résultats sont-ils acceptables pour votre propre pratique?<br>= <b>APPLICABILITE</b>                                  |

Source : Landrison G. Méthode globale de lecture critique d'articles médicaux à l'usage de l'étudiant et du praticien. Paris: Frison-Roche;1996.