UNIVERSITE BORDEAUX SEGALEN

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2012 Thèse n°1957

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

le 23 novembre 2012

par

Jérôme TOUTAIN

CYTOGENETIQUE PLACENTAIRE DES RETARDS DE CROISSANCE INTRA-UTERINS

Intérêts de la recherche des anomalies chromosomiques limitées au placenta et de l'estimation de la longueur télomérique placentaire

Composition du jury

Président	Pr Philippe VAGO
Rapporteur	Pr Jean-Michel DUPONT
Rapporteur	Dr Franck PELLESTOR
Examinateur	Pr Robert SAURA
Directeur de thèse	Pr Jean-Philippe MERLIO

A notre Président de Thèse,

Monsieur Le Professeur Philippe VAGO

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef du service de Cytogénétique Médicale, CHRU de Clermont-Ferrand

Président de la sous-section Cytologie et Histologie du Conseil National des Universités

Vous avez toujours été bienveillant à notre égard durant notre assistanat,

Vous nous faites l'honneur de présider aujourd'hui ce jury de Thèse,

Soyez assuré de notre profond respect et de notre gratitude

A notre Directeur de Thèse,

Monsieur Le Professeur Jean-Philippe MERLIO

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef du service de Biologie des Tumeurs-Tumorothèque, CHU de Bordeaux

Directeur de l'Equipe d'Accueil 2406 Histologie et Pathologie Moléculaire des Tumeurs, Université Bordeaux Segalen

Vous nous avez accueillis en tant qu'assistant dans votre laboratoire,
Et vous nous avez permis de réaliser dans d'excellentes conditions
La partie expérimentale de cette étude,
Nous espérons pouvoir poursuivre nos travaux de recherche
Avec la formidable équipe universitaire que vous dirigez,

Trouvez ici le témoignage de toute notre reconnaissance et de notre amitié

A nos Rapporteurs,

Monsieur Le Professeur Jean-Michel DUPONT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef du service de Cytogénétique, Hôpital Cochin, AP-HP

Président de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française

Responsable du Diplôme Inter-Universitaire Européen de Cytogénétique

Nous vous remercions d'avoir contribué à notre formation en Cytogénétique

Grâce aux nombreuses conférences que vous organisez

Et à votre enseignement « nîmois » (dont nous gardons un excellent souvenir),

Votre présence dans ce jury nous honore

A nos Rapporteurs,

Monsieur Le Docteur Franck PELLESTOR

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Service de Génétique Moléculaire et Chromosomique, CHU de Montpellier

Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, Université de Montpellier I

Vous nous faites le plaisir et l'honneur de bien vouloir juger ce travail,

Recevez l'expression de nos plus sincères remerciements

A notre Examinateur,

Monsieur Le Professeur Robert SAURA

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Service de Génétique Médicale, Laboratoire de Cytogénétique, CHU de Bordeaux

Coordonateur du Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Prénatal du CHU de Bordeaux

Parmi vos nombreux enseignements, vous nous avez notamment appris « à faire simple »,

Donc merci, pour tout

A,

Monsieur Le Professeur Jacques HOROVITZ

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef du service de Gynécologie-Obstétrique, CHU de Bordeaux

Vous nous avez accompagnés dans tous nos projets de recherche en Médecine Fœtale,
Les travaux réalisés ici n'auraient pas été possibles sans votre implication et votre soutien,
Nous avons eu la chance de pouvoir apprécier vos qualités professionnelles et humaines,

Trouvez ici le témoignage de toute notre reconnaissance et de notre amitié

A,

Monsieur Le Professeur Didier LACOMBE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef du service de Génétique Médicale, CHU de Bordeaux

Directeur de l'Equipe d'Accueil 4576 Maladies Rares : Génétique et Métabolisme, Université Bordeaux Segalen

Vous nous avez accueillis chaleureusement au sein de votre service hospitalier,

Puis vous nous avez soutenus afin que nos projets professionnels se réalisent,

Nous vous témoignons toute notre gratitude et notre plus profond respect

Je remercie également,

L'ensemble du personnel du laboratoire de Cytogénétique – service de Génétique Médicale,
Maternité Pellegrin, CHU de Bordeaux,

Les travaux effectués ici ont été possibles grâce à l'expertise et à l'implication
De chacune de ces personnes,
Je leur exprime toute ma reconnaissance

Les membres de l'équipe d'accueil 2406 Histologie et Pathologie Moléculaire des Tumeurs,
Université Bordeaux Segalen,

J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous,
J'espère que nous pourrons très prochainement collaborer à nouveau

A mes parents,

Qu'ils trouvent ici une justification à mon éloignement...

A ma famille,

A mes amis,

Et à toutes les personnes qui, de près ou loin, ont contribué à la réalisation de ce travail

Table des matières

Liste des Tableaux 16
Liste des Figures 17
Liste des Abréviations 20
Résumé 22
1 Introduction générale 24
1.1 De la viviparité à la placentation 24
1.2 Le placenta humain 26
1.2.1 Spécificités et limites des modèles animaux 26
1.2.2 Implantation et développement 27
1.3 Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) 30
1.3.1 Définition 30
1.3.2 Diagnostic 31
1.3.3 Etiologies 31
1.3.4 Conséquences 32
1.4 Objectifs du travail de thèse 33
1.4.1 RCIU et anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP) 33
1.4.2 RCIU et longueur télomérique placentaire 33
2 Partie I : Réévaluation de l'influence des ACLP sur la croissance fœtale 35
2.1 Résumé 35
2.2 Introduction 36
2.2.1 ACLP : définition et classification 36
2.2.2 ACLP et risque de disomie uniparentale 38
2.2.3 Issues des grossesses associées à une ACLP, trente ans d'études contradictoires... 39
2.3 Matériels et méthodes 40
2.3.1 Cas et population contrôle 40
2.3.2 Technique « bordelaise » de prélèvement des villosités choriales et placentaires 40
2.3.3 Examens cytogénétiques conventionnels des villosités 41
2.3.3.1 Effectué de façon systématique : la « culture » de l'axe mésenchymateux 43
2.3.3.2 Rétrospectif afin de caractériser le type d'ACLP : l'examen dit « direct » du cytotrophoblaste 43
2.3.3.3 Caryotype conventionnel en « bandes R » 44

2.3.3.4 Mise en évidence des ACLP de type 2 et de type 3 44
2.3.4 Amniocentèse de contrôle 45
2.3.5 Recherche d'une disomie uniparentale 45
2.3.6 Evaluation de la croissance fœtale et de l'issue de la grossesse 45
2.3.7 Analyses statistiques 46
2.4 Résultats 46
2.4.1 Description des ACLP de type 2 et de type 3 observées 46
2.4.2 ACLP de type 2 et de type 3 et disomie uniparentale 51
2.4.3 Influence des ACLP sur la croissance fœtale, une distinction entre ACLP de type 2 et de type 3 s'impose 52
2.5 Discussion 54
2.6 Publications 59
2.6.1 Publication n°1 59
2.6.2 Publication n°2 62
2.6.3 Publication n°3 73
2.6.4 Publication n°4 78
3 Partie II: Intérêt de l'estimation de la longueur télomérique placentaire en cas de RCIU 81
3.1 Résumé 81
3.2 Introduction 82
3.2.1 Les télomères 82
3.2.1.1 Structure 82
3.2.1.2 Fonction 85
3.2.1.3 Longueur télomérique et complexe enzymatique télomérase 85
3.2.1.4 Agrégats télomériques 87
3.2.2 Homéostasie de l'oxygène et télomères 88
3.2.3 Homéostasie de l'oxygène et RCIU 89
3.2.4 Longueur télomérique placentaire et RCIU 89
3.2.5 Réarrangements affectant les loci des gènes codant pour les principales sous-unités de la télomérase au niveau placentaire 90
3.2.6 Agrégats télomériques placentaires et RCIU 90
3.3 Matériels et méthodes 91
3.3.1 Cas et population contrôle 91
3.3.2 Biopsies de villosités placentaires 92

3.3.3 Examens cytogénétiques de l'axe mésenchymateux des villosités placentaires.. 93
3.3.3.1 Technique moléculaire rapide d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) 93
3.3.3.2 Caryotype conventionnel..... 94
3.3.4 Examen histo-pathologique des villosités placentaires..... 94
3.3.5 Consentement des patientes à la participation à cette étude..... 95
3.3.6 Estimation de la longueur télomérique placentaire par une technique de FISH quantitative (Q-FISH) 96
3.3.6.1 Principe de la technique de Q-FISH..... 96
3.3.6.2 Mise au point et évaluation des caractéristiques de la technique de Q-FISH .. 97
3.3.7 Estimation de la longueur télomérique placentaire par une technique de Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative (Q-PCR)..... 98
3.3.7.1 Extraction de l'ADN cellulaire 98
3.3.7.2 Principe de la technique de Q-PCR..... 100
3.3.7.3 Evaluation des caractéristiques de la technique de Q-PCR..... 101
3.3.8 Etude des loci portant *hTERC* et *hTERT* au niveau placentaire à l'aide d'une technique de FISH..... 101
3.3.8.1 Choix des sondes d'intérêt 101
3.3.8.2 Culture bactérienne 102
3.3.8.3 Extraction de l'ADN plasmidique..... 102
3.3.8.4 Marquage des sondes d'intérêt par une technique de *nick-translation* 103
3.3.8.5 Evaluation du nombre de copies des loci portant *hTERC* et *hTERT*..... 103
3.3.9 Recherche d'agrégats télomériques au niveau placentaire..... 104
3.3.10 Analyses statistiques 105
3.3.10.1 Calcul du nombre de sujets nécessaires 105
3.3.10.2 Analyses univariées..... 106
3.3.10.3 Analyse multivariée..... 106
3.4 Résultats 106
3.4.1 Patients, examens cytogénétiques et histo-pathologique 106
3.4.2 Longueur télomérique placentaire estimée par une technique de Q-FISH 108
3.4.2.1 Mise au point de la technique de Q-FISH 108
3.4.2.1.1 Profil d'hybridation des sondes télomériques 108
3.4.2.1.2 Intensité de fluorescence télomérique et surface nucléaire 109
3.4.2.1.3 Distribution des intensités de fluorescence télomérique 112

3.4.2.1.4 Influence du temps d'acquisition de la fluorescence sur l'intensité moyenne de fluorescence télomérique 115
3.4.2.1.5 Reproductibilité de l'acquisition et stabilité de la fluorescence télomérique 119
3.4.2.2 La longueur télomérique placentaire est réduite en cas de RCIU 120
3.4.3 Longueur télomérique placentaire estimée par une technique de Q-PCR 122
3.4.3.1 Recherche d'une corrélation entre les duplicatas des ratios T/S 122
3.4.3.2 Les résultats de la technique de Q-PCR confirment ceux de la technique de Q-FISH 123
3.4.4 Etude des loci portant *hTERC* et *hTERT* au niveau placentaire 124
3.4.4.1 Absence d'anomalie de nombre affectant le locus portant *hTERC* 124
3.4.4.2 Absence d'anomalie de nombre affectant le locus portant *hTERT* 126
3.4.5 Absence d'agrégats télomériques au niveau placentaire en cas de RCIU 127
3.5 Discussion 128
3.6 Publication n°5 132
4 Conclusion générale et perspectives 155
5 Bibliographie 159
6 Annexes 175
6.1 Communications scientifiques 175
6.1.1 Publications indexées 175
6.1.2 Publication non indexée 175
6.1.3 Communications orales 175
6.1.3.1 Congrès internationaux 175
6.1.3.2 Congrès nationaux 176
6.1.4 Communications affichées 177
6.1.4.1 Congrès internationaux 177
6.1.4.2 Congrès nationaux 177
6.2 Prix jeune chercheur 2010 Malcolm Ferguson-Smith 178
6.3 Autres 178
6.3.1 Participation à la réalisation d'un film pédagogique traitant de la technique « bordelaise » de biopsie de villosités choriales et placentaires 178
6.3.2 Participation à l'émission de radio « Que cherchent-ils ? » de RCF Bordeaux . 179

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principales caractéristiques des 57 anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et de type 3 observées. 47
Tableau 2. Caractéristiques des grossesses de la population contrôle et des patientes ayant présenté une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 2 et de type 3. 50
Tableau 3. Issues des grossesses compliquées d'une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 2 et de type 3 pour lesquelles une disomie uniparentale a été recherchée. ... 52
Tableau 4. Influence des anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et de type 3 sur l'issue de la grossesse. 52
Tableau 5. Principales caractéristiques des patientes et de leurs grossesses (étude longueur télomérique placentaire). 107

Liste des Figures

Figure 1. Illustration des différents types histologiques de placentation. 25
Figure 2. Illustration du concept des deux vagues successives d'invasion trophoblastique.. .. 29
Figure 3. Illustration des différents types d'anomalies chromosomiques limitées au placenta37
Figure 4. Procédure de réalisation des examens génétiques en cas de suspicion d'une anomalie chromosomique limitée au placenta.. 42
Figure 5. Anomalies chromosomiques limitées au placenta observées.. 49
Figure 6. Poids de naissance en fonction du pourcentage de mosaïcisme des anomalies chromosomiques limitées au placenta. 50
Figure 7. Poids de naissance en fonction du terme pour les grossesses ayant présenté une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 2 et de type 3 et pour la population contrôle. 54
Figure 8. Structure des télomères.. 84
Figure 9. Le complexe télomérase. 87
Figure 10. Procédure de réalisation des examens biologiques à partir des biopsies de villosités placentaires (soin courant et projet de recherche « longueur télomérique placentaire »). 93
Figure 11. Examen histo-pathologique des villosités placentaires. 95
Figure 12. Agrégats télomériques (microscopie 2-Dimension). 105
Figure 13. Microphotographies illustrant les profils d'hybridation des sondes télomériques marquées en rouge au niveau de 9 noyaux interphasiques de villosités placentaires cultivées (contre-coloration 4',6'-diamidino-2-phénylindole, grossissement x630). 109
Figure 14. Intensités de fluorescence télomérique en fonction de la surface des noyaux interphasiques chez une patiente présentant un retard de croissance intra-utérin sévère et chez une patiente contrôle de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 110
Figure 15. Intensité moyenne de fluorescence télomérique en fonction de la surface nucléaire moyenne chez les patientes de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 111
Figure 16. Intensités de fluorescence télomérique en fonction de la surface des noyaux interphasiques au niveau de deux préparations obtenues chez une patiente présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 112

Figure 17. Distribution des intensités de fluorescence télomérique observées au niveau de noyaux interphasiques obtenus après culture des villosités placentaires (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 113
Figure 18. Distribution des intensités de fluorescence télomérique observées au niveau de noyaux interphasiques obtenus après isolement direct des noyaux par une technique de Cytospin™ (histogrammes gris clair) et après culture des villosités placentaires (histogrammes gris foncé), patiente T25724 (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 114
Figure 19. Intensités moyennes de fluorescence télomérique obtenues après une acquisition réalisée de façon automatique par le microscope et une acquisition fixée à 0,40 secondes (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 116
Figure 20. Variations inter-individuelles des intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique de la fluorescence par le microscope (gauche) et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes (droite) chez 24 patientes de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 117
Figure 21. Variations intra-individuelles des intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique de la fluorescence par le microscope et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes chez une patiente contrôle de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 118
Figure 22. Intensités moyennes de fluorescence télomérique observées après des acquisitions répétées 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 et 14 jours après l'hybridation des sondes télomériques PNA au niveau d'une lame Labtek™ (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). 119
Figure 23. Intensités moyennes de fluorescence télomérique placentaire estimées avec une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative en fonction du terme de la biopsie placentaire. 120
Figure 24. Comparaison des intensités moyennes de fluorescence télomérique placentaire estimées avec une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative entre les patientes de la population contrôle de l'étude (cercles gris clair) et les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (cercles gris foncé). 121
Figure 25. Ratios T/S du deuxième duplicata en fonction des ratios T/S du premier duplicata (technique de réaction en chaîne par polymérase quantitative). 123

Figure 26. Longueur télomérique placentaire estimée à la fois par une technique de réaction en chaîne par poymérase quantitative (Q-PCR) et par une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative (Q-FISH) chez les 52 patients de l'étude. 124
Figure 27. Microphotographies illustrant les profils d'hybridation de la sonde BAC RP11-816J6 ciblant le locus portant *hTERC* (locus 3q26.2, couleur rouge) et de la sonde BAC RP11-16N5 contrôle (locus 3q13.13, couleur verte) au niveau de 9 noyaux interphasiques de villosités placentaires cultivées (contre-coloration 4',6'-diamidino-2-phénylindole, grossissement x630). 125
Figure 28. Répartition des profils d'hybridation de la sonde BAC ciblant le locus portant *hTERC* pour les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin (histogrammes gris foncé) et pour la population contrôle (histogrammes gris clair) (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence). 126
Figure 29. Répartition des profils d'hybridation de la sonde BAC ciblant le locus portant *hTERT* pour les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin (histogrammes gris foncé) et pour la population contrôle (histogrammes gris clair) (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence). 127
Figure 30. Evaluation des agrégats télomériques placentaires chez les patientes de l'étude (microscopie 2-Dimension). 128

Liste des Abréviations

2D, 3D: 2-Dimension, 3-Dimension

ACLP : anomalie chromosomique limitée au placenta

ADN : acide désoxyribonucléique

ALT : *Alternative Lengthening of Telomeres*

ARN, RNA : acide ribonucléique

ATCD : antécédent

A, T, C, G : bases azotées de l'ADN (adénine, thymine, cytosine, guanine)

BAC : *Bacterial Artificial Chromosome*

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*

CN : clarté nucale augmentée

CO_2 : dioxyde de carbone

Ct : *Cycle Threshold*

Cyt : cytotrophoblaste

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DCAM : Département Conception et Assistance Multimédia

del : délétion

DNase : désoxyribonucléase

dNTP : désoxyribonucléoside

DUP : disomie uniparentale

dUTP : deoxyuridine triphosphate

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ET : écart-type à la moyenne

FCS : fausse couche spontanée

FISH : hybridation *in situ* en fluorescence

g : force relative de centrifugation

HELLP : *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*

HIF1α : *Hypoxia Inductible Factor 1 alpha*

HT21 : facteurs sériques maternels du 2ème trimestre pathologiques

hTERC : *human TElomerase RNA Component*

hTERT : *human TElomerase Reverse Transcriptase*

IGF : *Insulin Growth Factor*

IMG : interruption de la grossesse pour motif médical

ISPD : *International Society for Prenatal Diagnosis*

kb : kilobase

LB : Luria Bertani

Mes : axe mésenchymateux

MFIU : mort fœtale *in utero*

MMP : métalloprotéase matricielle

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

N/D : donnée non disponible

NP40 : détergent non ionique de lyse cellulaire

NS : non significatif

p, p-value : niveau de significativité statistique

PNA : *Peptide Nucleic Acid*

PSA : antigène prostatique spécifique

Q-FISH : FISH quantitative

Q-PCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative

Ratio T/S : ratio *Telomere-to-Single Copy Gene*

RCIU : retard de croissance intra-utérin

RNase : ribonucléase

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SA : semaine d'aménorrhée

SDS : dodécylsulfate de sodium

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SSC : *Sodium Saline Citrate*

SSS : *Sudden Senescence Syndrome*

TBS : *Tris Buffered Saline*

TE : tris-EDTA

TERT : *TElomerase Reverse Transcriptase*

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TrisHCl : tris acide chlorhydrique

UA : unités arbitraires

v/v : volume/volume

Résumé

Ce travail de thèse se propose d'étudier le retard de croissance intra-utérin sous l'angle de la cytogénétique placentaire, avec deux approches distinctes et complémentaires.

La première approche visera à réévaluer l'influence des anomalies chromosomiques limitées au placenta sur la croissance fœtale, car des études précédentes ont rapporté des résultats contradictoires à ce sujet. La première partie de ce travail permettra en outre d'étudier l'incidence et l'influence de la disomie uniparentale chez les fœtus issus des grossesses compliquées d'une anomalie chromosomique limitée au placenta.

La deuxième approche de notre travail s'intéressera à la longueur de structures chromosomiques particulières, les télomères, au niveau placentaire. Il a récemment été décrit que la longueur des télomères des cellules placentaires était réduite au terme des grossesses compliquées d'un retard de croissance intra-utérin. La longueur télomérique placentaire n'a jamais été évaluée au cours de ces grossesses et pourrait potentiellement être utilisée comme biomarqueur placentaire du retard de croissance intra-utérin. La deuxième partie de ce travail nous permettra également d'évaluer le nombre de copies des régions chromosomiques portant les gènes codant pour les principales sous-unités du complexe enzymatique télomérase et de rechercher la présence d'agrégats télomériques au niveau placentaire en cas de retard de croissance intra-utérin.

Mots-clés

Retard de croissance intra-utérin ; insuffisance placentaire ; biopsie de villosités choriales et placentaires ; anomalie chromosomique limitée au placenta ; disomie uniparentale ; longueur télomérique ; *hTERC* ; *hTERT* ; agrégats télomériques

Summary

This thesis proposes to study intrauterine growth restriction in terms of cytogenetics of placenta, with two distinct and complementary approaches.

The first approach will be to reassess the influence of confined placental mosaicism on fetal growth, as previous studies have reported conflicting results on this issue. The first part of this work will also study the influence of fetal uniparental disomy in case of confined placental mosaicism.

The second approach of our work will focus on the length of terminal chromosomal structures, telomeres, at the placental level. It has recently been reported that telomere length was reduced in placental cells collected at term in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. Placental telomere length has never been evaluated in ongoing pregnancies and it could potentially be used as a placental biomarker of intrauterine growth restriction. The second part of this work will also focus on the copy number of chromosomal regions carrying genes encoding the main subunits of the telomerase enzyme complex and will look for the presence of placental telomeric aggregates in case of intrauterine growth restriction.

Keywords

Intrauterine growth restriction; placental insufficiency; chorionic villus sampling; confined placental mosaicism; uniparental disomy; telomere length; *hTERC*; *hTERT*; telomeric aggregates

1 Introduction générale

1.1 De la viviparité à la placentation

Au cours de l'évolution, la majorité des espèces du règne animal est passée d'une croissance embryonnaire en dehors de l'organisme maternel, l'oviparité, à un développement de l'embryon à l'intérieur de l'organisme maternel, la viviparité (Carter, 2008). Cette stratégie de développement embryonnaire a été sélectionnée lors de l'évolution des espèces car la viviparité permet notamment d'offrir une protection accrue aux embryons et un mode de nutrition pouvant s'adapter à leurs besoins (Vogel, 2005).

Jusqu'en 2008, l'espèce vivipare la plus lointaine ayant été décrite était un reptile marin vivant au Jurassique, il y a 180 millions d'années. Puis un article publié dans la revue scientifique *Nature* a apporté un nouvel éclairage sur l'émergence des espèces vivipares (Long *et al.*, 2008). Les auteurs de cet article avaient en effet réussi à mettre en évidence à l'ouest de l'Australie les restes fossilisés d'un poisson ayant vécu au Dévonien, à l'intérieur duquel un embryon et son cordon ombilical étaient présents. La période du Dévonien s'est déroulée il y a quelques 380 millions d'années.

La viviparité a ensuite autorisé la mise en place et le développement d'un organe de communication particulier entre la mère et son embryon, le placenta. L'existence d'un placenta chez une espèce permet d'emblée de « ranger » cette espèce dans la sous-classe des mammifères euthériens, également dénommés mammifères placentaires. Le placenta s'est alors adapté aux besoins de chacune des espèces de mammifères euthériens.

Du point de vue histologique, différents placentas de type épithéliochorial, endothéliochorial et hémochorial peuvent être rencontrés chez les espèces euthériennes (Figure 1). La placentation épithéliochoriale permet les échanges fœto-maternels grâce à l'apposition de l'épithélium placentaire (le cytotrophoblaste) au niveau de l'épithélium maternel (l'épithélium de la muqueuse utérine). La placentation de type endothéliochorial fait quant à elle communiquer les cellules du trophoblaste avec la périphérie des vaisseaux maternels, après destruction de l'endomètre par le trophoblaste invasif. Concernant la placentation hémochoriale, le trophoblaste envahit, par des mécanismes de lyse ou de substitution selon les espèces, l'endomètre puis la paroi des vaisseaux maternels, ceci ayant pour conséquence l'existence d'un trophoblaste directement bordé par du sang maternel.

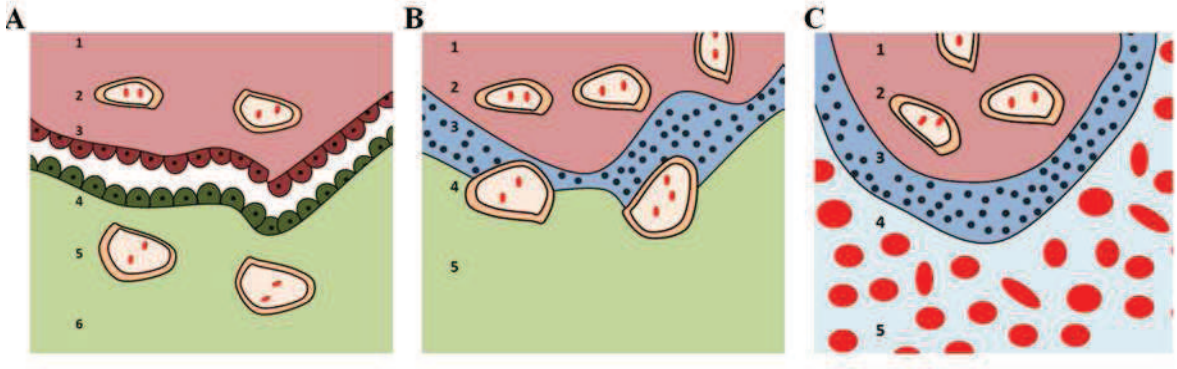


Figure 1. Illustration des différents types histologiques de placentation. A. Placentation de type épithéliochorial. 1 : mésenchyme extra-embryonnaire, 2 : vaisseau placentaire, 3 : cytotrophoblaste, 4 : épithélium de la muqueuse utérine, 5 : vaisseau maternel, 6 : stroma utérin. **B. Placentation de type endothéliochorial.** 1 : mésenchyme extra-embryonnaire, 2 : vaisseau placentaire, 3 : cytotrophoblaste, 4 : vaisseau maternel, 5 : stroma utérin. **C. Placentation de type hémochorial.** 1 : mésenchyme extra-embryonnaire, 2 : vaisseau placentaire, 3 : cytotrophoblaste, 4 : sang maternel, 5 : chambre intervilleuse.

La placentation épithéliochoriale, qui a longtemps été considérée à tort comme un mode primitif de placentation, et la placentation hémochoriale dériveraient d'une placentation endothéliochoriale initialement commune (Vogel, 2005). Cette hypothèse permettrait d'accréditer le principe d'un ancêtre commun vivipare, principe qui prédomine actuellement afin de décrire la phylogénie des mammifères euthériens (Carter, 2008).

La morphologie placentaire peut en outre être variable d'une espèce à une autre. Les principaux types morphologiques placentaires rencontrés sont les suivants : placentas de type diffus, cotylédonaires, zonaires et discoïdes (Wildman, 2006).

À titre d'exemple, une placentation diffuse épithéliochoriale est observée chez le cheval, le type cotylédonaire épithéliochorial chez la vache, la placentation zonaire endothéliochoriale chez le chien et le chat, et le type discoïde hémochorial est la placentation qui est retrouvée chez l'homme, le primate non-humain et le rongeur.

1.2 Le placenta humain

1.2.1 Spécificités et limites des modèles animaux

Bien que l'homme, le primate non-humain et le rongeur partagent un placenta discoïde hémochorial, il existe néanmoins des différences notables entre les placentas de ces trois espèces (pour revue Carter, 2007).

Le placenta du rat ou de la souris est hémotrichorial et organisé sous forme d'un labyrinthe au niveau duquel se rencontrent le sang maternel et les vaisseaux placentaires (Carter et Enders, 2004). Par ailleurs, et contrairement à l'homme, l'invasion trophoblastique de l'endomètre chez ces espèces est réduite. La durée de gestation chez la souris est en outre limitée à trois semaines, ce qui constitue une différence chronologique significative avec l'espèce humaine. Enfin, la prééclampsie ou toxémie gravidique, qui constitue une complication majeure de la grossesse chez l'espèce humaine, ne survient pas lors de la gestation physiologique des espèces murines. L'utilisation à des fins scientifiques de modèles placentaires murins peut ainsi avoir peu d'intérêt afin d'étudier la physiopathologie placentaire des complications rencontrées chez l'espèce humaine.

Les primates supérieurs partagent un placenta hémomonochorial, avec un trophoblaste organisé sous forme villositaire (Carter et Enders, 2004). Cependant, chez les primates non-humains, l'implantation du blastocyste se réalise de façon superficielle, alors que cette implantation est interstitielle chez l'homme. Il semble pourtant exister des mécanismes communs de remodelage des artères spiralées utérines entre le macaque, le babouin et l'homme (Carter, 2007). Ceci est d'un intérêt majeur car le remodelage adéquat de ces artères a été décrit chez l'homme comme un des facteurs clés gouvernant la bonne croissance fœtale et permettant un rôle protecteur contre l'installation d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) associé ou non à une prééclampsie (Khong *et al.*, 1986 ; Burton *et al.*, 2009). Les primates non-humains pourraient ainsi constituer un modèle expérimental animal de choix pour l'étude des RCIU et des prééclampsies rencontrés chez l'espèce humaine. En revanche, la manipulation de primates non-humains en laboratoire peut s'avérer délicate et l'utilisation de ces animaux à des fins scientifiques est en outre onéreuse.

Les spécificités du placenta humain peuvent donc compliquer l'extrapolation à l'homme de résultats expérimentaux obtenus chez l'animal de laboratoire, voire rendre non pertinente

l'utilisation de ces modèles animaux. Il apparait donc intéressant de pouvoir disposer de biopsies placentaires humaines.

S'il est relativement aisé de recueillir des placentas humains à terme, il est en revanche plus difficile d'obtenir des prélèvements de villosités choriales ou placentaires au cours de grossesses évolutives. Pour des raisons éthiques évidentes, ces prélèvements ne peuvent être effectués que s'il existe une indication à réaliser un diagnostic prénatal invasif. Par ailleurs, les recherches doivent dans l'idéal être menées au niveau de reliquats de villosités choriales ou placentaires après la réalisation des examens effectués dans le cadre du soin courant. Cette démarche impose alors de prélever des quantités importantes de fragments villositaires, sans entrainer de risque iatrogène accru, ce qui est techniquement difficile à réaliser (Saura *et al.*, 2010b).

1.2.2 Implantation et développement

Chez l'espèce humaine, l'implantation physiologique du zygote se réalise de façon interstitielle au niveau de l'endomètre et débute au 6ème jour après la fécondation. A ce moment, le zygote se trouve alors au stade blastocyste (James *et al.*, 2012).

Dans un premier temps, le blastocyste s'appose puis adhère par son pôle embryonnaire à l'épithélium de l'endomètre. Au contact de cet épithélium, les cellules périphériques du trophoblaste se multiplient par mitoses. Le trophoblaste se différencie alors en deux tissus : le cytotrophoblaste, composé de cellules capables d'importantes divisions mitotiques spontanées, et le syncytiotrophoblaste, formé par les cellules filles issues des divisions du cytotrophoblate et ayant fusionné en syncytium.

Les cellules du syncytiotrophoblate sont directement en contact avec le stroma de l'endomètre et ont la capacité de le dégrader, notamment grâce à la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP) telles que MMP2 et MMP9 (Staun-Ram *et al.*, 2004 ; Cohen et Bischof, 2007 ; Onogi *et al.*, 2011). Ces métalloprotéases peuvent ainsi digérer la quasi-totalité de la matrice extracellulaire de l'endomètre. Ceci a pour conséquence un enfoncement progressif du blastocyste dans la muqueuse utérine. Au 9ème jour après la fécondation, l'implantation de l'œuf au sein de la paroi utérine est totale. A ce stade, le blastocyste est entièrement entouré par du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste. Dans ce dernier se forment des lacunes.

Puis le syncytiotrophoblaste rencontre les capillaires maternels et les érode. Les lacunes du syncytiotrophoblaste se remplissent alors de sang maternel. Cette étape marque le début de la circulation utéro-lacunaire, vers le 11ème jour après la fécondation.

Le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste s'organisent ensuite en villosités primordiales, ébauches des unités structurales et fonctionnelles du futur placenta appelé chorion à ce stade (Challier et Uzan, 2003). Ainsi, vers le 12ème jour après la fécondation, les villosités primaires sont formées d'un axe de cytotrophoblaste bordé par du syncytiotrophoblaste. Après le 14ème jour, un axe mésenchymateux, issu de la migration des cellules de l'épiblaste caudal, pénètre au centre des villosités (Yong *et al.*, 2011). A ce stade, les villosités primordiales sont des villosités secondaires. Après le 18ème jour, l'apparition de vaisseaux, témoins d'une vasculogenèse et d'une angiogenèse actives, transforme ces villosités secondaires en villosités tertiaires. Les villosités se trouvant libres dans la chambre intervilleuse sont qualifiées de villosités flottantes, les villosités en contact avec l'endomètre sont qualifiées de villosités crampons. Les villosités crampons comportent ainsi des cellules du trophoblaste extra-villeux.

Parallèlement, et afin de contrer « l'envahissement » du blastocyste, les cellules du stroma de l'endomètre sont le lieu de la réaction décidiuale. Cette réaction décidiuale transforme *in fine* l'endomètre en trois caduques : la caduque basilaire (en regard de la zone d'implantation), la caduque ovulaire (entourant l'œuf) et la caduque pariétale (au niveau du reste de la cavité utérine).

Le développement placentaire se poursuit au 1er trimestre avec la migration après la 6ème semaine de cellules du cytotrophoblaste extra-villeux au niveau de la lumière des artères spiralées qui communiquent avec la chambre intervilleuse (Figure 2, gauche) (Pijnenborg *et al.*, 2006). Ce phénomène a été décrit comme la « première vague d'invasion » des cellules du cytotrophoblaste extra-villeux. Les cellules du cytotrophoblaste extra-villeux vont alors venir former un « bouchon cellulaire » obturant la lumière des artères spiralées jusqu'à la fin du 1er trimestre. La mise en place de ce bouchon cellulaire est primordiale afin de garantir jusqu'à la fin du 1er trimestre un environnement pauvre en oxygène au niveau de la chambre intervilleuse. L'hypoxie locale à ce stade de la grossesse permet en effet de préserver l'embryon de concentrations trop élevées en oxygène, qui lui seraient toxiques. Cette hypoxie est par ailleurs favorable à la prolifération des cellules du trophoblaste extra-villeux grâce à

l'induction de facteurs de transcription tels que HIF1α (*Hypoxia Inductible Factor* 1 alpha) et permettrait, en outre, de contrôler l'invasion de ces cellules trophoblastiques *via* l'inhibition de MMP2 (Onogi *et al.*, 2011).

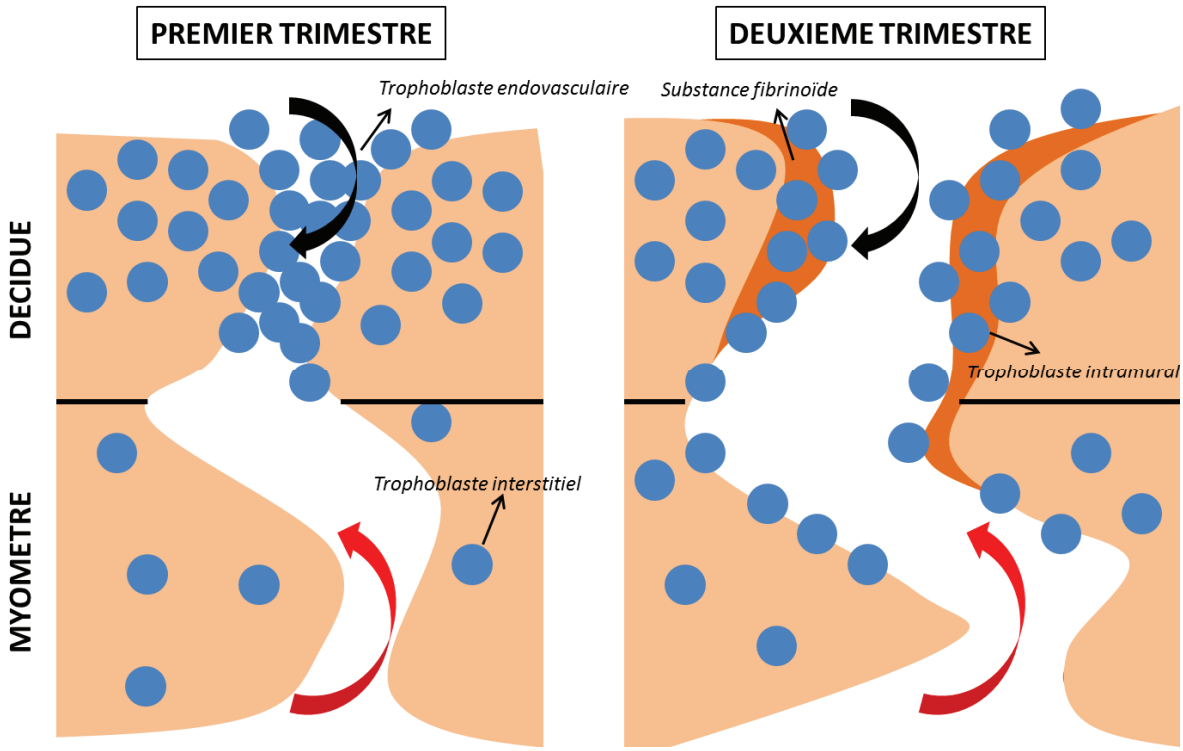


Figure 2. Illustration du concept des deux vagues successives d'invasion trophoblastique. Au 1er trimestre de la grossesse, les cellules du trophoblaste extra-villeux migrent au niveau de la lumière des artères spiralées et obturent cette lumière au niveau décidual (gauche). Au 2ème trimestre, à partir de la 14ème semaine d'aménorrhée, il y a disparition du bouchon de cellules trophoblastiques formé au 1er trimestre puis poursuite de la migration des cellules du trophoblaste extra-villeux vers le myomètre (droite). Flèche rouge : sens du débit sanguin maternel ; flèche noire : sens de la migration des cellules trophoblastiques (d'après Pijnenborg *et al.*, 2006).

Au 2ème trimestre de la grossesse, à partir de la 14ème semaine d'aménorrhée, le bouchon trophoblastique disparait, la « deuxième vague d'invasion » des cellules du trophoblaste extra-villeux peut débuter (Figure 2, droite). Cette deuxième invasion a notamment pour objectif de permettre aux cellules trophoblastiques d'accéder au tiers supérieur du myomètre afin que ces cellules réalisent un remodelage en profondeur des artères utérines (Sankaran et Kyle, 2009). Le remodelage va permettre de faire disparaitre le contingent de cellules musculaires lisses de la média des artères spiralées afin de rendre ces artères atones aux

stimuli vasopresseurs et, par conséquent, permettre la mise en place d'un flux sanguin utéroplacentaire avec un débit augmenté afin de répondre aux besoins du fœtus (Burton *et al.*, 2009). En cas d'altération de ce remodelage vasculaire, le débit sanguin utéroplacentaire risque d'être insuffisant, la chambre intervilleuse peut alors se trouver en situation d'hypoxie relative ou, du fait des fluctuations des concentrations en oxygène, en situation de stress oxydatif (Burton *et al.*, 2009 ; Evain-Brion et Malassiné, 2010). En l'absence de remodelage vasculaire adéquat, un RCIU et/ou des signes clinico-biologiques de prééclampsie (protéinurie associée à hypertension artérielle maternelle) risquent alors de s'installer (Burton *et al.*, 2009).

A la fin du 3ème mois, le placenta est délimité par une plaque choriale en regard du fœtus (issue du mésoblaste extra-embryonnaire tapissant la face interne du cytotrophoblaste) et par une plaque basale (correspond à la caduque basilaire et émettant au 4ème mois des septas en direction de la plaque choriale). Entre ces deux plaques, la chambre intervilleuse avec des villosités flottantes et des villosités attachées à la plaque basale, les villosités crampons. Le placenta a ainsi la particularité d'être un organe « mixte », formé de tissus extra-embryonnaires et maternels. Une fraction du mésoblaste extra-embryonnaire forme un couloir entre le placenta et l'embryon, le pédicule embryonnaire ; cette structure préfigure le futur cordon ombilical.

1.3 Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

1.3.1 Définition

Jusqu'au début des années soixante, un diagnostic de RCIU était posé pour toute grossesse dont le nouveau-né avait un poids de naissance inférieur à 2500 grammes (Robilliard, 2005). Cette définition présentait l'inconvénient majeur d'inclure dans les RCIU l'immense majorité des nouveau-nés prématurés. Si intuitivement il semble évident de prendre en considération l'âge gestationnel dans la définition du RCIU, la prise en compte de cette variable n'a été introduite qu'à partir des années soixante (Lubchenco *et al.*, 193). Lubchenco *et al*. ont ainsi été parmi les premiers à mettre à disposition des courbes de poids de naissance en fonction du terme.

Aujourd'hui, il est communément admis de définir le RCIU comme l'impossibilité du fœtus à réaliser son potentiel génétique de croissance (Fournié *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2008 ; Militello *et al.*, 2009).

1.3.2 Diagnostic

D'après cette définition du RCIU, on comprend aisément qu'il est impossible en pratique courante d'estimer la taille théorique qu'un fœtus doit mesurer d'après son patrimoine génétique. Ainsi, l'échographiste dépiste le RCIU le plus souvent à partir de la 20ème semaine d'aménorrhée lorsque les biométries fœtales (diamètre biparietal, longueur fémorale et périmètre abdominal) sont inférieures au 5ème percentile pour l'âge gestationnel (Barker, 1995). Il convient alors d'utiliser des courbes de références des biométries en fonction de l'âge gestationnel, courbes ayant été établies chez différentes populations (Salomon *et al.*, 2006).

1.3.3 Etiologies

Les RCIU peuvent avoir des étiologies fœtales, placentaires, maternelles ou demeurer idiopathiques.

Parmi les étiologies fœtales, un RCIU peut être diagnostiqué lorsque le fœtus est porteur d'une aneuploïdie à type de trisomie impliquant principalement les chromosomes 13, 18 et 21. Des aneusomies, telles que des délétions impliquant les bras courts du chromosome 4, peuvent également expliquer le RCIU. Pour ces causes chromosomiques, le RCIU est une anomalie échographique rarement isolée et va volontiers être accompagné d'autres anomalies échographiques à type de clarté nucale augmentée, de malformations, de petits signes échographiques d'aneuploïdie etc... Des altérations géniques des protéines impliquées dans la voie de l'IGF (*Insulin Growth Factor*) ont également été décrites comme associées à des RCIU (Randhawa, 2008). Ces étiologies fœtales représenteraient moins de 5% des RCIU diagnostiqués en France (Robilliard, 2005).

Concernant les étiologies placentaires du RCIU, des anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP) ont été décrites comme associées à des RCIU (Robinson *et al.*, 1997). Les ACLP permettraient ainsi d'expliquer certains RCIU, mais les résultats des différentes études menées sur ce sujet sont contradictoires (Fryburg *et al.*, 1993 ; Robinson *et al.*, 1997 ;

Stipoljev *et al.*, 2001 ; Stetten *et al.*, 2004 ; Amor *et al.*, 2006 ; Miura *et al.*, 2006 ; Wilkins-Haug *et al.*, 2006 ; Baffero *et al.*, 2012). L'influence de ces ACLP sur la croissance fœtale fera l'objet de la première partie de ce travail de thèse. Une étiologie placentaire du RCIU est essentiellement suspectée en cas d'anomalies morphologiques du placenta identifiées à l'examen anatomopathologique. Il peut cependant être difficile d'évaluer si ces altérations morphologiques sont la cause ou bien la conséquence du RCIU (Robilliard, 2005). Dans la majorité des cas, ces altérations morphologiques placentaires sont en fait la conséquence d'artériopathies maternelles liées à un défaut de remodelage des artères utéroplacentaires du myomètre (Carles *et al.*, 2009). Des infarctus et des hématomes placentaires, des espaces intervilleux étroits et des villosités placentaires de diamètre réduit pourront alors être mis en évidence à l'examen anatomopathologique de ces placentas (Carles *et al.*, 2009).

Les étiologies maternelles des RCIU regroupent les infections virales (rubéole, cytomégalovirus) et bactériennes (syphilis) (responsables de 1 à 5% des RCIU selon les études) et la consommation de produits toxiques (tabac, alcool, cocaïne, morphine…) (environ 5% des RCIU), mais les étiologies maternelles des RCIU sont largement dominées par les anomalies de vascularisation utéroplacentaires (permettant d'expliquer environ 60% des RCIU) (Ghidini, 1996 ; Robilliard, 2005 ; Sankaran et Kyle ; 2009). Ces anomalies de vascularisation sont attribuées à l'absence de remodelage adéquat des artères spiralées myométriales par les cellules du cytotrophoblaste extra-villeux (Sankaran et Kyle, 2009). Le RCIU peut alors être qualifié de « secondaire à une insuffisance placentaire » ou, plus simplement, de « vasculaire ». Ces anomalies de vascularisation peuvent alors se compliquer de signes clinico-biologiques de prééclampsie.

Environ 30% des RCIU demeurent quant à eux idiopathiques. Il est intéressant de noter que lorsqu'un examen anatomopathologique de ces placentas est pratiqué à la naissance, cet examen retrouve habituellement des altérations morphologiques compatibles avec une anomalie de vascularisation utéroplacentaire (Robilliard, 2005).

1.3.4 Conséquences

Les RCIU se compliquent fréquemment au 3ème trimestre de la grossesse de signes clinico-biologiques de prééclampsie (environ 15% des RCIU avec une anomalie de vascularisation utéroplacentaire dans notre expérience) (Robilliard, 2005). Cette pathologie gravidique est

une pathologie sévère avec un risque de mortalité et morbidité fœtales et de complications maternelles à type de HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*) syndrome (syndrome associant une hémolyse, des troubles hépatiques et plaquettaires) et à type d'éclampsie (Sibai *et al.*, 2005). La seule thérapeutique disponible actuellement est le déclenchement de l'accouchement afin de délivrer le placenta, ceci permet de faire disparaitre les symptômes maternels (Robilliard, 2005). L'enjeu est alors d'éviter une trop grande prématurité.

Par ailleurs, les RCIU sont significativement associés à une augmentation de la mortalité périnatale ainsi qu'à une augmentation de la morbidité infantile et adulte, avec un risque accru de développer des séquelles neurologiques à long terme, des maladies cardiovasculaires, une obésité et un diabète de type 2 (Sibai *et al.*, 2005 ; Barker, 2006 ; Figueras et Gardosi, 2011). Il est à noter que le risque de mortalité périnatale et de morbidité infantile et adulte est inversement corrélé au poids de naissance (Resnik, 2002). Sur la base de ces éléments, le diagnostic et la prise en charge des RCIU constituent ainsi un enjeu important de santé publique.

1.4 Objectifs du travail de thèse

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'étudier les RCIU au niveau placentaire à travers deux approches cytogénétiques distinctes.

1.4.1 RCIU et anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP)

La première approche examinera l'influence des ACLP sur la croissance fœtale, étant donné que ces ACLP ont été décrites par certains auteurs comme associées à un RCIU, alors que pour d'autres auteurs, ces ACLP n'avaient aucune influence sur la croissance fœtale. Devant ces résultats contradictoires, nous avons ainsi souhaité réévaluer, sur la base d'une étude monocentrique rétrospective, l'influence des ACLP sur la croissance fœtale. Cette étude rétrospective nous donnera également l'occasion de faire le point sur l'incidence et l'influence de la disomie uniparentale (DUP) fœtale en cas d'ACLP.

1.4.2 RCIU et longueur télomérique placentaire

La deuxième approche s'appuiera quant à elle sur une étude préliminaire prospective et visera à évaluer au cours de grossesses évolutives l'intérêt de l'estimation au niveau placentaire de la

longueur de structures chromosomiques particulières, les télomères, dans les RCIU secondaires à une insuffisance placentaire. La longueur télomérique a en effet récemment été décrite par deux équipes comme réduite au niveau de placentas collectés à terme de grossesses compliquées de ce type de RCIU. L'estimation de la longueur télomérique placentaire au cours de grossesses évolutives n'a, à notre connaissance, jamais été rapportée. Les résultats de ce travail pourraient permettre d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie placentaire des RCIU secondaires à une insuffisance placentaire et d'apprécier l'intérêt de l'estimation de la longueur télomérique dans le diagnostic de ces complications.

2 Partie I : Réévaluation de l'influence des ACLP sur la croissance fœtale

2.1 Résumé

Objectif : Une étude monocentrique rétrospective a été réalisée à partir de 13809 biopsies de villosités choriales et placentaires effectuées dans notre centre de Médecine Fœtale afin de tester l'influence des ACLP de type 2 et de type 3 sur la croissance fœtale et sur l'issue de la grossesse.

Matériel et méthodes : Afin de caractériser les ACLP de type 2 et de type 3, le caryotype conventionnel des cellules composant l'axe mésenchymateux des villosités a été établi après culture puis, de façon rétrospective, caryotype conventionnel des cellules du cytotrophoblaste a été effectué par un examen « direct ». Devant une anomalie chromosomique pouvant faire suspecter une ACLP de type 2 ou de type 3, un contrôle de la formule chromosomique a été réalisé par amniocentèse. Une recherche de DUP a été effectuée lorsque l'ACLP impliquait les chromosomes 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15 ou 16. La croissance fœtale a été évaluée à partir du terme et du poids de naissance, et les issues de grossesse défavorables ont été définies par la survenue d'une perte fœtale ou d'un décès en période périnatale. Les résultats observés ont été comparés à ceux obtenus chez une population contrôle de patientes tirée au sort.

Résultats : Cinquante-sept ACLP ont été observées (57/13809 = 0,41%) et parmi elles, 37 étaient des anomalies de type 2 et 20 étaient des anomalies de type 3. Aucune DUP n'avait été observée pour les ACLP de type 2 testées, alors que 4 cas avaient été identifiés pour les ACLP de type 3 (4/13 = 30,8%). L'incidence des cas de prématurité, des hypotrophies néonatales et des issues de grossesse défavorables étaient comparables entre les patientes présentant une ACLP de type 2 et la population contrôle. Le nombre de cas de prématurités, d'hypotrophies néonatales et d'issues de grossesse défavorables étaient en revanche plus importants pour les patientes présentant une ACLP de type 3 que pour la population contrôle.

Conclusion : Lorsqu'une ACLP est suspectée, il apparaît essentiel de caractériser le type d'anomalie chromosomique car le type 2 n'a pas d'influence sur la croissance fœtale alors que les grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 sont associées à des nouveau-nés

prématurés et hypotrophes ainsi qu'à des issues de grossesse défavorables, et ce quel que soit le chromosome impliqué dans l'ACLP. Les grossesses compliquées d'une anomalie de type 3 en l'absence de DUP étaient par ailleurs associées à une prématurité et à un petit poids de naissance.

Mots-clés : Biopsie de villosités choriales et placentaires ; anomalie chromosomique limitée au placenta ; croissance fœtale ; disomie uniparentale

2.2 Introduction

2.2.1 ACLP : définition et classification

Les ACLP sont définies par des anomalies chromosomiques présentes au niveau des tissus extra-embryonnaires et absentes des tissus fœtaux (Kalousek et Dill, 1983). Les ACLP s'intègrent dans les discordances cytogénétiques fœtoplacentaires. Ces discordances comprennent ainsi les ACLP (type 1 à type 3) et les mosaïques fœtales vraies (type 4 à type 6) (Farra *et al.*, 2000 ; Grati *et al.*, 2006). Les discordances fœtoplacentaires ont été décrites dans 1 à 2% des biopsies de villosités choriales effectuées dans le cadre du diagnostic prénatal (Ledbetter *et al.*, 1992 ; Hahnemann et Vejerlev, 1997).

Les ACLP sont soit la conséquence d'un accident d'origine méiotique précoce suivi d'un processus de « réparation » d'un zygote initialement trisomique, phénomène décrit alors par le terme anglo-saxon « *fetal rescue* », soit la conséquence d'un accident d'origine mitotique survenant dans les tissus extra-embryonnaires (Robinson *et al.*, 1997). Les ACLP peuvent être des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, être des anomalies homogènes ou présentes en mosaïque, et peuvent concerner tout ou partie des cellules composant les villosités choriales et placentaires (cellules du cytotrophoblaste et/ou de l'axe mésenchymateux) (Hahnemann et Vejerlev, 1997).

En fonction de la localisation placentaire de l'anomalie chromosomique, les ACLP peuvent être classées en trois types (Figure 3) (Kalousek et Vekemans, 1996). Les ACLP de type 1 correspondent à des anomalies chromosomiques exclusivement retrouvées au niveau du cytotrophoblaste (*i.e.* l'anomalie chromosomique est alors uniquement observée à l'examen cytogénétique dit « direct » des villosités choriales, cet examen étudie les métaphases des cellules du cytotrophoblaste). Ces ACLP de type 1 peuvent résulter d'un accident d'origine

méiotique (en général lorsque l'anomalie chromosomique est observée de façon homogène) ou, de façon plus fréquente, d'un accident d'origine mitotique (en général lorsque l'anomalie chromosomique est observée en mosaïque). Pour les ACLP de type 2, l'anomalie chromosomique est limitée à l'axe mésenchymateux des villosités (*i.e.* l'anomalie chromosomique est uniquement observée après la culture des villosités, cet examen étudie les métaphases des cellules de l'axe mésenchymateux). Ces ACLP de type 2 ont pour origine, de façon habituelle, un accident mitotique. Les ACLP de type 3 sont quant à elles définies par la présence d'une anomalie chromosomique retrouvée à la fois au niveau du cytotrophoblaste et de l'axe mésenchymateux des villosités (*i.e.* l'anomalie chromosomique est présente à la fois à l'examen cytogénétique « direct » et après culture des villosités). Ces ACLP de type 3 sont, en règle générale, la conséquence d'un accident d'origine méiotique (Wolstenholme, 1996).

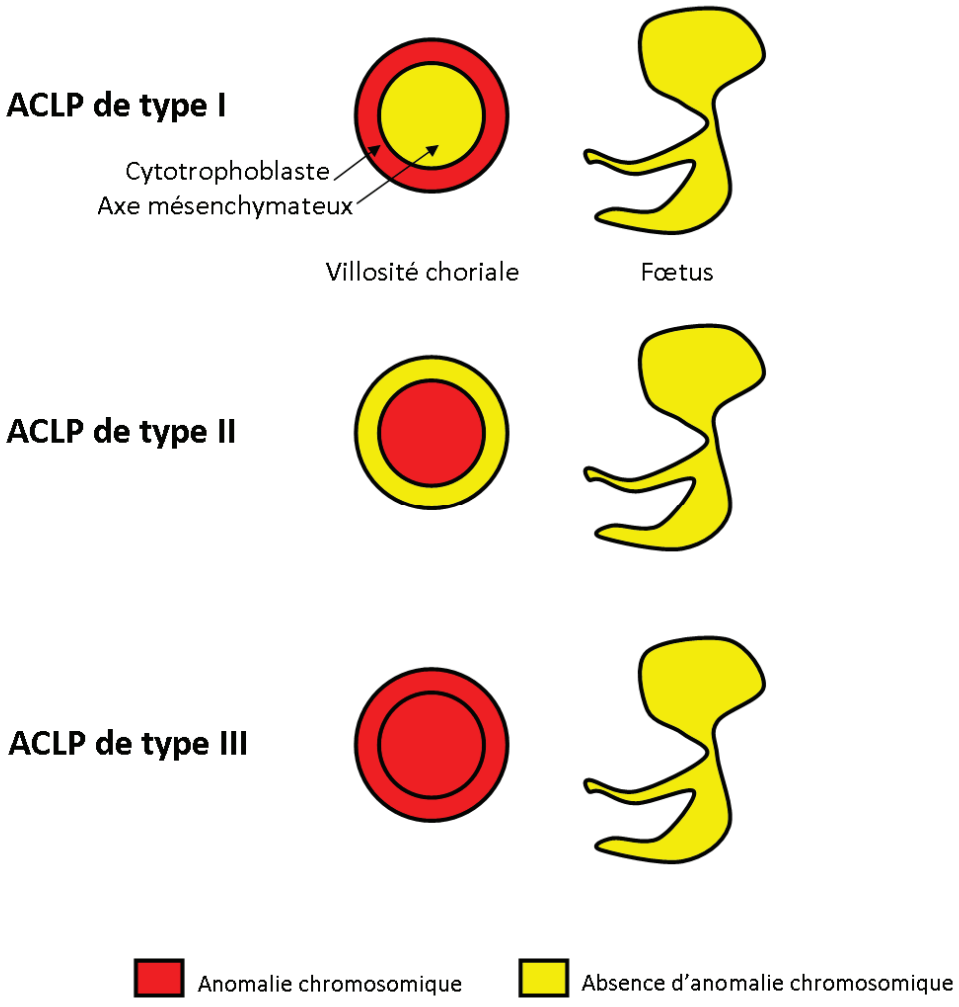


Figure 3. Illustration des différents types d'anomalies chromosomiques limitées au placenta.

2.2.2 ACLP et risque de disomie uniparentale

Si l'ACLP est la conséquence d'une réparation d'un zygote initialement trisomique, il existe alors un risque théorique de 1/3 de survenue d'une DUP chez le fœtus (Hall, 1990). La DUP est définie par la présence de deux chromosomes homologues hérités d'un même parent. La DUP peut être une hétérodisomie ou une isodisomie. Ainsi, si la non-disjonction méiotique à l'origine du zygote trisomique est survenue lors de la première division méiotique, la réparation de la trisomie aura pour conséquence chez le fœtus une hétérodisomie (présence des deux chromosomes homologues du parent). Si la non-disjonction est survenue lors de la deuxième division méiotique, la réparation aura pour conséquence chez le fœtus une isodisomie (présence d'un même chromosome en double exemplaire).

Une DUP pourra, entre autres, être à l'origine de problèmes phénotypiques si le chromosome disomique est porteur de gènes soumis à empreinte parentale. Ainsi, une DUP doit notamment être recherchée devant toute ACLP impliquant :

- le chromosome 6 (l'isodisomie paternelle de ce chromosome a fréquemment pour conséquence un RCIU associé à une macroglossie en période prénatale, ainsi qu'un diabète néonatal transitoire),
- le chromosome 7 (la DUP maternelle de ce chromosome est responsable du syndrome de Silver-Russel),
- le chromosome 11 (la DUP paternelle de ce chromosome permet d'expliquer environ 20% des syndromes de Beckwith-Wiedemann),
- le chromosome 14 (les DUP maternelle et paternelle de ce chromosome ont des expressions cliniques de sévérité variable),
- et le chromosome 15 (syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, en fonction de l'origine parentale du chromosome 15 disomique).

La recherche de DUP du chromosome 16 a quant à elle longtemps posé question (Kotzot et Utermann, 2005). La majorité des patients porteurs d'une DUP impliquant ce chromosome ne présentait aucun phénotype particulier. En revanche, quelques patients présentant une DUP du chromosome 16 identifiée au niveau de l'ADN du sang veineux périphérique ont été décrits avec des anomalies cardiaques. Après la réalisation d'examens complémentaires (du type caryotype conventionnel au niveau des fibroblastes cutanés), il a été identifié que la majorité

de ces patients était en fait porteuse d'une trisomie 16 vraie présente en mosaïque (Kotzot et Utermann, 2005).

Les DUP peuvent en outre révéler une maladie récessive si le chromosome dupliqué est porteur d'un allèle pathologique s'exprimant de façon récessive. Ceci avait notamment permis d'expliquer la mucoviscidose dont souffrait une jeune patiente porteuse d'une isodisomie maternelle du chromosome 7, ce chromosome 7 maternel hérité « en double » était porteur d'un gène muté codant pour CFTR (Voss *et al.*, 1989).

2.2.3 Issues des grossesses associées à une ACLP, trente ans d'études contradictoires

Lorsque le type d'ACLP n'est pas pris en considération, certaines études ont décrit que les issues des grossesses associées à une ACLP apparaissaient majoritairement favorables, avec la naissance d'enfants vivants, de poids et de phénotypes normaux, chez lesquels il ne semblait pas exister de risque augmenté de problèmes développementaux (Fryburg *et al.*, 1993 ; Stetten *et al.*, 2004 ; Amor *et al.*, 2006 ; Miura *et al.*, 2006 ; Baffero *et al.*, 2012).

A contrario, d'autres études ont décrit que les ACLP, toujours sans en préciser le type, étaient associées à un risque augmenté de RCIU (Robinson *et al.*, 1997 ; Stipoljev *et al.*, 2001 ; Wilkins-Haug *et al.*, 2006). Plus précisément, les ACLP d'origine méiotique (ayant *a priori* pour conséquence des ACLP de type 3) ont été décrites comme associées à des RCIU et à des morts fœtales *in utero* (Robinson *et al.*, 1997).

Devant ces contradictions, et bien que la première description chez l'homme par Kalousek et Dill d'une ACLP remonte à bientôt trente ans, la question de l'information à donner aux patients et de la prise en charge médicale à apporter le cas échéant aux grossesses compliquées d'une ACLP demeure toujours d'actualité. Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'influence des ACLP de type 2 et de type 3 sur les issues des grossesses.

Une étude récente a par ailleurs évalué l'influence du pourcentage de cellules placentaires présentant une trisomie 2 limitée au placenta sur l'issue des grossesses (morts fœtales *in utero* et poids de naissance) (Sifakis *et al.*, 2010). Les résultats de cette étude indiquaient que pour environ 15% de ces ACLP il existait un RCIU et qu'un pourcentage élevé de cellules trisomiques était associé à un petit poids de naissance.

A partir d'une série importante biopsies de villosités choriales réalisées dans notre centre de Médecine Fœtale, nous avons recensé les ACLP de type 2 et 3 observées et les DUP associées, et avons testé l'influence de ces anomalies chromosomiques sur la croissance fœtale et sur l'issue de la grossesse (*i.e.* terme et poids de naissance, fausse couche spontanée, mort fœtale *in utero*, décès en période périnatale).

2.3 Matériels et méthodes

2.3.1 Cas et population contrôle

Cette étude monocentrique rétrospective a été réalisée à partir de biopsies de villosités choriales et placentaires effectuées dans notre centre chez 13809 patientes prélevées entre juin 1997 et juin 2009.

Les ACLP mises en évidence chez les 13809 patientes ont dans un premier temps été recensées. Les indications de diagnostic prénatal invasif des patientes ayant présenté une ACLP étaient les suivantes : âge maternel avancé (supérieur à 38 ans), signe d'appel échographique (à type de clarté nucale supérieure au 95ème percentile, de RCIU), antécédent de grossesse avec une anomalie fœtale (anomalie cytogénétique ou génique) ou facteurs sériques maternels du 2ème trimestre de la grossesse plaçant la femme dans un groupe à risque d'attendre un enfant à naître atteint de trisomie 21 (risque supérieur à 1/250).

Les différentes caractéristiques des grossesses des patientes avec ACLP ont été comparées à celles observées chez une population contrôle de patientes de notre centre de Médecine Fœtale. Cette population contrôle a été obtenue après tirage au sort de 198 cas parmi les patientes ayant bénéficié d'un diagnostic prénatal invasif dans notre centre pour les mêmes indications, et chez lesquelles le caryotype après culture des villosités choriales ou placentaires n'avait pas décelé d'anomalie.

2.3.2 Technique « bordelaise » de prélèvement des villosités choriales et placentaires

La technique de biopsie de villosités choriales ou placentaires a été mise en place dans notre centre de Médecine Fœtale en 1983 (Saura *et al.*, 1992). Les ponctions de villosités choriales ou placentaires ont été effectuées après la 12ème semaine d'aménorrhée par six obstétriciens de notre centre expérimentés aux ponctions de villosités choriales et placentaires.

Brièvement, notre technique consistait en une ponction de biopsie de villosités choriales ou placentaires par voie transabdominale en extra-amniotique sous contrôle échographique à l'aide d'une aiguille de 20 gauge préalablement rincée au sérum hépariné, puis reliée à une seringue de 20 ml à l'aide d'un prolongateur en plastique (Saura *et al.*, 2010b).

Il est à noter que l'aiguille de 20 gauge que nous employons pour les biopsies choriales et placentaires entraînait une douleur identique à celle perçue lors de la réalisation d'une amniocentèse, et offrait donc l'avantage de ne pas nécessiter d'anesthésie locale préalable à la ponction, ce qui était nécessaire avec l'aiguille de 18 gauge utilisée par certains auteurs (Vandenbossche *et al.*, 2007 ; Borrell *et al.*, 2008).

En outre, nous précisons que le taux de fausses couches liées au geste avec notre technique de biopsies de villosités choriales et placentaires était similaire à celui que nous avions déploré après amniocentèse (environ 0,50% de fausses couches liées au geste dans notre centre de Médecine Fœtale, quel que soit la méthode de prélèvement utilisée) (Brun *et al.*, 2003).

2.3.3 Examens cytogénétiques conventionnels des villosités

Une fois la biopsie de villosités choriales ou placentaires effectuée, un cytogénéticien avait dans un premier temps contrôlé macroscopiquement la quantité de villosités. Si celle-ci était considérée suffisante, environ 25 mg, les prélèvements villositaires étaient divisés en trois parties inégales (Figure 4) :

- La majeure partie du prélèvement villositaire (quantité supérieure à 20 mg) a été sélectionnée sous loupe binoculaire afin de s'affranchir d'une éventuelle contamination du prélèvement par des cellules maternelles de la caduque, puis :

  - Une minorité de villosités (environ 5 mg) a pu être utilisée, en fonction de l'indication du diagnostic prénatal (par exemple en cas de signe d'appel échographique), afin de rechercher rapidement une des principales aneuploïdies par une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), après digestion enzymatique des villosités (Toutain *et al.*, 2010a),

  - L'autre partie des villosités a systématiquement été mise en culture afin de réaliser un caryotype conventionnel des cellules composant l'axe mésenchymateux des villosités,

- Une minorité des fragments villositaires (quantité inférieure à 5 mg) a parallèlement été soumise à un prétraitement (colchicine, choc hypotonique, fixation) puis a été conservée à 4°C dans l'attente de la réalisation d'un éventuel examen cytogénétique du cytotrophoblaste (l'examen dit « direct » des villosités). Ces fragments villositaires ont été utilisés pour l'examen « direct » uniquement de façon rétrospective et dans les indications suivantes:

- En cas de suspicion d'une contamination par des cellules maternelles persistantes après tri des villosités choriales sous loupe binoculaire pour les caryotypes conventionnels de l'axe mésenchymateux des villosités de formule 46,XX,

- En cas d'anomalie chromosomique observée après culture des villosités choriales pouvant faire suspecter une ACLP (afin de préciser le type d'anomalie (ACLP de type 2 ou de type 3)).

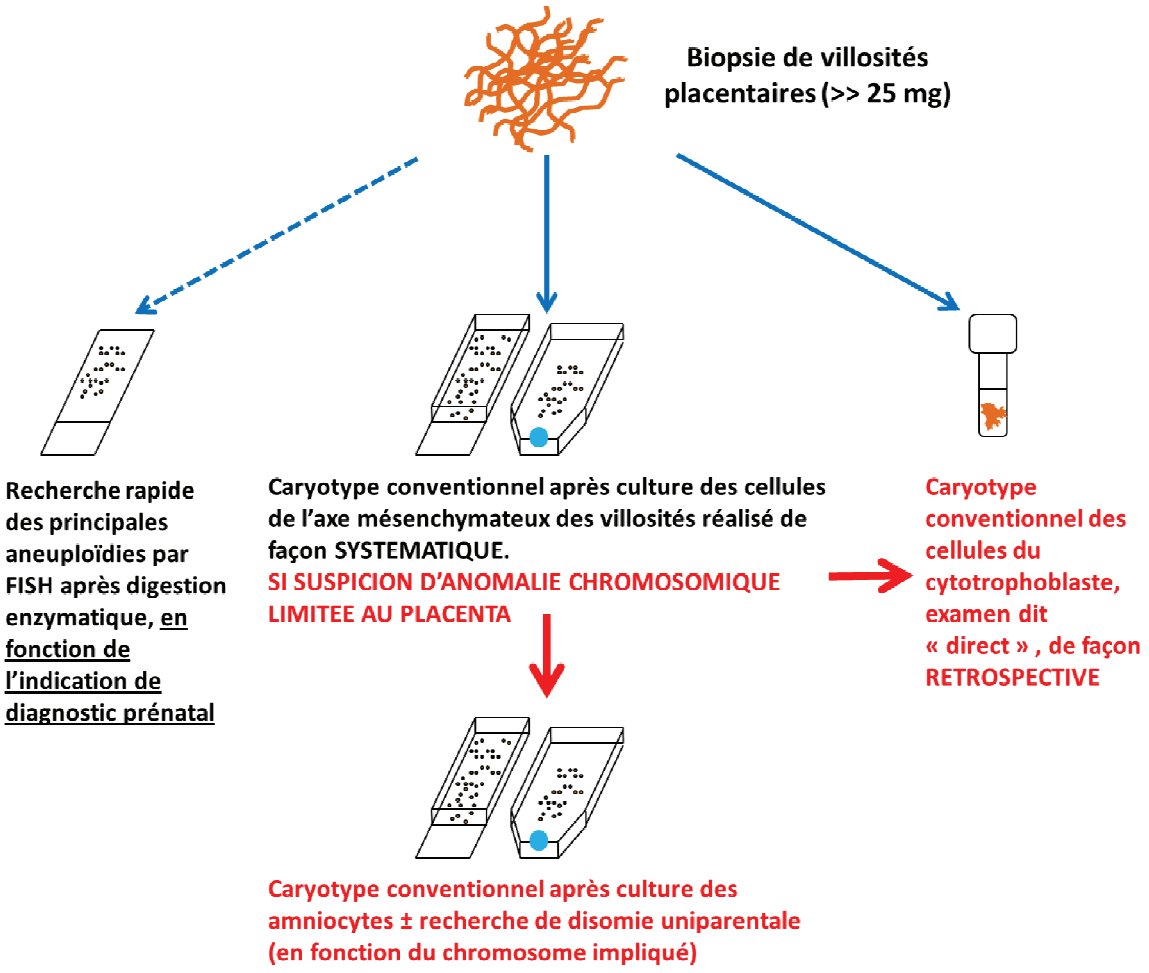


Figure 4. Procédure de réalisation des examens génétiques en cas de suspicion d'une anomalie chromosomique limitée au placenta. Le texte rouge indique les examens effectués spécifiquement en cas de suspicion d'une anomalie chromosomique limitée au placenta.

2.3.3.1 Effectué de façon systématique : la « culture » de l'axe mésenchymateux

Les villosités choriales et placentaires sélectionnées sous loupe binoculaire ont subi un double traitement enzymatique (par une solution de trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) durant 20 à 30 minutes, puis par une solution de collagénase (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) durant 30 à 60 minutes, en fonction de la quantité de villosités). Les cellules ont ensuite été mises en culture dans un milieu de culture CHANG Medium® D (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, Etats-Unis) additionné d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et d'antifongiques (amphotéricine B) au niveau de deux à quatre lames de type Labtek™ disposant d'une chambre de culture (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) et au niveau d'un flacon standard de culture cellulaire 25 cm² Falcon™ (Becton Dickinson France SAS, Le Pont-De-Claix, France). Après quelques jours à l'étuve (réglée à 37°C et 5% de CO_2), les cellules ont été observées sous loupe binoculaire. Si le nombre de cellules était jugé suffisant, les divisions mitotiques étaient alors bloquées au stade (pro)métaphasique par l'ajout au milieu de culture d'une solution de colchicine (solution de KaryoMAX® Colcemid™ à 10µg/ml (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France)). La solution de colchicine était mise en contact avec les cellules durant 3 heures. Les étapes de choc hypotonique et de fixation des préparations chromosomiques ont ensuite été effectuées respectivement par une solution saline (citrate de sodium à 1% (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)) et par un mélange Carnoy (acide acétique et méthanol (2:3 v/v) (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)) à l'aide d'un appareil Tecan MINIPREP 75 (Tecan France S.A.S., Lyon, France) permettant d'automatiser ces deux étapes techniques.

2.3.3.2 Rétrospectif afin de caractériser le type d'ACLP : l'examen dit « direct » du cytotrophoblaste

Les fragments villositaires destinés à l'examen cytogénétique dit « direct » ont été préparés comme décrit précédemment (Simoni *et al.*, 1983). Les villosités ont été placées dans 10 ml d'une solution de RPMI (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) puis 0,15 ml d'une solution de colchicine (solution de KaryoMAX® Colcemid™ à 10µg/ml (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France)) ont été ajoutés. La solution de colchicine a été mise en contact avec les villosités durant 1 heure et 30 minutes. Un choc hypotonique des préparations

chromosomiques a ensuite été réalisé par 10 ml d'une solution saline (citrate de sodium à 1% (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)) durant 30 minutes. Une fixation des préparations chromosomiques a été effectuée par 10 ml d'un mélange Carnoy (acide acétique et méthanol (2:3 v/v) (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)). Cette étape a été renouvelée, puis les villosités ainsi préparées ont été placées à 4°C dans l'attente de l'éventuelle réalisation de l'examen « direct » proprement dit. En cas d'indication de réalisation d'un examen « direct », les villosités ont alors été mises en contact avec un milieu d'éjection (acide acétique et eau distillée (1:1 v/v) (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)) puis dissociées à l'aide d'aiguilles et déposées sur une lame SuperFrost^{TM} Plus (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France). Cette lame a alors été placée sur un étaleur mécanique de cellules ECT85 (Carteau & OTS, Bagnolet, France) chauffé à 37°C, jusqu'à évaporation totale du milieu d'éjection.

2.3.3.3 Caryotype conventionnel en « bandes R »

Pour les préparations chromosomiques obtenues avec les techniques de « culture » et de « direct », le caryotype conventionnel a ensuite été établi après dénaturation thermique à 87°C (dans des solutions de Earle ou de Hank's (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)) et après coloration par une solution de Giemsa (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) afin d'obtenir des chromosomes marqués en « bandes R », à un niveau de résolution d'environ 400 bandes par lot haploïde.

Pour chaque préparation, les chromosomes d'au moins 16 cellules en métaphase ont été dénombrés et au moins 3 caryogrammes ont été établis. L'existence d'une anomalie cytogénétique a été définie par la présence d'une même anomalie chromosomique retrouvée au niveau d'au moins deux cellules en métaphase.

2.3.3.4 Mise en évidence des ACLP de type 2 et de type 3

Les ACLP de type 2 étaient définies par une anomalie chromosomique observée uniquement après culture des villosités choriales (examen « direct » normal) et les ACLP de type 3 étaient définies par une anomalie chromosomique observée après culture des villosités choriales et à l'examen « direct ».

A partir de notre procédure d'examen cytogénétique des villosités choriales et placentaires, uniquement des ACLP de type 2 et de type 3 avaient pu être mises en évidence dans cette étude. Les ACLP de type 1 (absence d'anomalie chromosomique après culture des villosités choriales ou placentaires et examen « direct » anormal) n'ont pas été pas évaluées dans notre étude puisque l'examen « direct » n'a été réalisé que de façon rétrospective, lorsqu'une anomalie chromosomique était mise en évidence après culture des villosités choriales et placentaires.

De la même manière, pour la population contrôle de l'étude, l'examen « direct » n'a été effectué que de façon rétrospective, en cas de suspicion d'une contamination de la culture des cellules de l'axe mésenchymateux par des cellules maternelles de la caduque, ce qui concernait moins de 5% des examens effectués. Dans ces conditions, il était peu probable d'identifier une ACLP de type 1 chez notre population contrôle de patientes.

2.3.4 Amniocentèse de contrôle

En cas de suspicion d'ACLP de type 2 ou 3, et afin d'exclure un mosaïcisme fœtal vrai, un contrôle de la formule chromosomique fœtale a été effectué à partir d'une amniocentèse. L'amniocentèse a été réalisée selon la technique décrite précédemment (Vandenbossche *et al.*, 2008).

2.3.5 Recherche d'une disomie uniparentale

Une recherche d'une DUP a été réalisée lorsque l'ACLP impliquait un chromosome pour lequel des gènes soumis à empreinte avaient été décrits ou suspectés (chromosomes 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15 et 16) (Kotzot et Utermann, 2005 ; Kotzot, 2008). Une recherche de DUP a alors été effectuée à partir de marqueurs micro-satellitaires par le laboratoire de biologie moléculaire du service de génétique médicale du CHU de Bordeaux (Bordeaux, France), selon les techniques décrites précédemment (Grati *et al.*, 2006).

2.3.6 Evaluation de la croissance fœtale et de l'issue de la grossesse

La prématurité a été définie par un terme de naissance inférieur à 37 semaines d'aménorrhée. L'hypotrophie néonatale et l'hypotrophie néonatale sévère ont été respectivement définies par un poids de naissance inférieur au 10ème percentile et au 3ème percentile (Salomon *et al.*, 2007).

Dans ce travail, les issues de grossesse défavorables ont été définies par la survenue d'une fausse couche spontanée, d'une interruption de la grossesse pour motif médical en relation avec l'ACLP, d'une mort fœtale *in utero* ou d'un décès en période périnatale.

2.3.7 Analyses statistiques

La normalité de la distribution des variables quantitatives étudiées a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. En fonction du résultat de ce test, les variables ont été comparées à l'aide du test de Student ou du test de Wilcoxon-Mann Whitney. Les variables qualitatives ont été comparées à l'aide du test du χ^2 ou de Fisher. Le risque de première espèce α a été fixé à 0,05 et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATA 8.0 (Integral Software, Paris, France).

2.4 Résultats

2.4.1 Description des ACLP de type 2 et de type 3 observées

A partir des 13809 biopsies de villosités choriales et placentaires, 57 ACLP de type 2 et de type 3 (57/13809 = 0,41%) ont été mises en évidence. Le Tableau 1 résume les principales caractéristiques des 57 ACLP de type 2 et de type 3 observées.

Tableau 1. Principales caractéristiques des 57 anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et de type 3 observées.

Cas	Age maternel (années)	Indication diagnostic prénatal	Terme biopsie (SA)	Tissu	Caryotype conventionnel	Type d'ACLP	Terme (SA + jour)	Poids de naissance (gr)	Poids de naissance (percentile)	Commentaires
1	36	Ano. écho. (CN)	16	Mes	47,XX,+2[21]/46,XX[9]	2	42	3520	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
2	25	HT21	18	Mes	47,XX,+2[17]/46,XX[13]	2	36+4	2320	<10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
3	35	HT21	22	Mes	47,XX,+2[19]/46,XX[11]	2	37+5	3280	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
4	39	Age maternel	15	Mes	47,XX,+2[N/D]/47,XX,+9[N/D]/46,XX[N/D]	3	37+4	2100	<3ème	Normale à la naissance
				Cyt	47,XX,+2[N/D]/47,XX,+9[N/D]/46,XX[N/D]					
5	41	Age maternel	13	Mes	47,XX,+2p-[17]/46,XX[5]	2	40+6	3100	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
6	39	Age maternel	14	Mes	47,XX,+5[25]/46,XX[5]	2	38+2	2570	<10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
7	36	ATCD (trisomie 21)	13	Mes	47,XX,+6[22]/46,XX[8]	3	29+6	800	<3ème	Normale à la naissance
				Cyt	47,XX,+6					
8	19	Ano. écho. (CN)	13	Mes	47,XY,+7[14]/46,XY[16]	2	37+2	3660	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
9	39	Age maternel	13	Mes	47,XY,+7[9]/46,XY[21]	2	-	-	-	FCS à 17 SA
				Cyt	46,XY					
10	39	Age maternel	13	Mes	47,XY,+7[13]/46,XY[17]	2	40	N/D	N/D	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
11	37	Age maternel	13	Mes	47,XX,+7[9]/46,XX[15]	3	37+5	2030	<3ème	Normale à la naissance
				Cyt	47,XX,+7[7]/46,XX[10]					
12	30	HT21	21	Mes	47,XY,+7[13]/46,XY[2]	3	40+1	3340	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+7[2]/46,XY[14]					
13	40	Age maternel	13	Mes	47,XX,+8[14]/46,XX[10]	2	38	2480	<10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
14	40	Age maternel	15	Mes	47,XX,+8[9]/46,XX[18]	2	37+6	1950	<3ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
15	34	HT21	16	Mes	47,XY,+8[4]/46,XY[15]	2	37	2770	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
16	38	Age maternel	13	Mes	48,XY,+8,+16[5]/46,XY[12]	3	N/D	N/D	N/D	N/D
				Cyt	47,XY,+16[2]/46,XY[10]					
17	33	Ano. écho. (CN)	13	Mes	47,XX,+9[2]/46,XX[12]	2	40+5	3060	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
18	36	ATCD (trisomie 18)	13	Mes	47,XX,+9[9]/46,XX[8]	2	40+1	3500	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
19	30	HT21	19	Mes	47,XY,+9[4]/46,XY[15]	2	39	3630	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
20	37	Age maternel	14	Mes	47,XY,+9[3]/46,XY[18]	3	41+2	3100	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+9[6]/46,XY[5]					
21	40	Age maternel	15	Mes	47,XY,+9[20]/46,XY[6]	3	36+4	2270	<10ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+9[16]/46,XY[4]					
22	41	Age maternel	13	Mes	47,XX,+10[16]/46,XX[14]	2	40	3270	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
23	39	Age maternel	13	Mes	47,XY,+10[16]/46,XY[6]	2	40+1	3920	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
24	28	Ano. écho. (CN)	13	Mes	47,XY,+12[7]/46,XY[8]	2	41+5	4090	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
25	37	Age maternel	15	Mes	47,XX,+12[6]/46,XX[12]	2	39+6	3170	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
26	37	HT21	16	Mes	47,XX,+12[13]/46,XX[4]	2	41+1	3630	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
27	39	Age maternel	14	Mes	47,XX,i(12)(p10)[12]/46,XX[25]	2	41	2860	<10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
28	29	HT21	20	Mes	48,XX,+12[11]/47,XX,+20[3]/46,XX[2]	2	41+3	3660	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
29	38	Age maternel	13	Mes	47,XY,+15[9]/46,XY[9]	2	41	4370	>10ème	Normal à la naissance

Cas	Age maternel (années)	Indication diagnostic prénatal	Terme biopsie (SA)	Tissu	Caryotype conventionnel	Type d'ACLP	Terme (SA + jour)	Poids de naissance (gr)	Poids de naissance (percentile)	Commentaires
				Cyt	46,XY					
30	38	Age maternel	13	Mes	47,XX,+15	3	-	-	-	IMG (syndrome de Prader-Willy)
				Cyt	47,XX,+15					
31	41	Age maternel	15	Mes	47,XY,+16	3	36+6	1800	<3ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+16					
32	33	HT21	17	Mes	47,XY,+16	3	32+1	1240	<10ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+16					
33	27	HT21	19	Mes	47,XX,+16	3	35+1	1630	<3ème	Normale à la naissance
				Cyt	47,XX,+16					
34	28	HT21	19	Mes	47,XY,+16[N/D]/46,XY[N/D]	3	-	-	-	MFIU à 35 SA
				Cyt	47,XY,+16[17]/46,XY[13]					
35	36	HT21	21	Mes	47,XY,+16	3	33	970	<3ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+16					
36	37	HT21	24	Mes	47,XX,+16	3	30	850	<3ème	Décédé à 5 semaines
				Cyt	47,XX,+16					
37	38	Ano. écho. (RCIU)	25	Mes	47,XY,+16[20]/46,XY[10]	3	29	800	<3ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+16[3]/46,XY[17]					
38	38	Age maternel	13	Mes	47,XX,+16[7]/46,XX[12]	2	N/D	N/D	N/D	N/D
				Cyt	46,XX					
39	39	Age maternel	16	Mes	47,XX,+r(17)[6]/46,XX[16]	3	38+3	2200	<3ème	Normale à la naissance
				Cyt	47,XX,+r(17)					
40	N/D	ATCD (MFIU)	18	Mes	47,XX,+17[9]/46,XX[9]	2	39+1	3980	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
41	38	Age maternel	13	Mes	47,XY,+18[N/D]/46,XY[N/D]	2	38+6	3090	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
42	41	Age maternel	13	Mes	47,XY,+18[16]/46,XY[14]	2	39+3	2830	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
43	42	Age maternel	14	Mes	47,XY,+18[6]/46,XY[14]	2	41+2	3400	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
44	33	HT21	15	Mes	47,XX,+18[7]/46,XX[10]	2	39+2	3230	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
45	38	HT21	17	Mes	47,XY,+18[15]/46,XY[15]	2	38+1	3100	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
46	40	Age maternel	14	Mes	47,XY,+20[9]/46,XY[10]	2	38+4	3000	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
47	30	HT21	18	Mes	47,XX,+21[5]/46,XX[12]	2	39	3330	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
48	39	Age maternel	13	Mes	47,XX,+22[17]/46,XX[13]	3	-	-	-	MFIU à 27 SA
				Cyt	47,XX,+22					
49	38	HT21	16	Mes	47,XY,+22	3	37+4	2400	<10ème	Normal à la naissance
				Cyt	47,XY,+22					
50	40	Age maternel	13	Mes	47,XX,+22	3	37+3	2300	<10ème	Normale à la naissance
				Cyt	47,XX,+22					
51	24	HT21	18	Mes	47,XY,+22[7]/46,XY[14]	2	40	2870	<10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
52	38	Age maternel	13	Mes	47,XY,+mar[18]/46,XY[6]	2	40+4	3020	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
53	38	Age maternel	13	Mes	47,XX,+mar[7]/46,XX[8]	2	38+6	3110	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
54	40	Age maternel	15	Mes	47,XY,+mar[14]/46,XY[6]	2	38	3200	>10ème	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					
55	37	ATCD (del(10))	13	Mes	45,X[8]/46,XX[22]	3	38+3	3450	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	45,X[6]/46,XX[24]					
56	42	Age maternel	17	Mes	48,XXXX[8]/47,XXX[3]/46,XX[7]	2	41+5	4080	>10ème	Normale à la naissance
				Cyt	46,XX					
57	38	Age maternel	15	Mes	47,X[10]/46,XY[7]	2	N/D	N/D	N/D	Normal à la naissance
				Cyt	46,XY					

ACLP : anomalie chromosomique limitée au placenta ; ATCD : antécédent ; CN : clarté nuchale ; Cyt : cytotrophoblaste ; FCS : fausse couche spontanée ; HT21 : facteurs sériques maternels du 2ème trimestre pathologiques ; IMG : interruption de la grossesse pour motif médical ; Mes : axe mésenchymateux ; MFIU : mort fœtale *in utero* ; N/D : non déterminé ; RCIU : retard de croissance intra-utérin ; SA : semaine d'aménorrhée ;

Les ACLP étaient des anomalies de type 2 dans 37 cas (37/57 = 64,9% des ACLP de type 2 et 3) et des anomalies de type 3 dans 20 cas (20/57 = 35,1% des ACLP de type 2 et 3). La Figure 5 illustre la distribution du nombre d'ACLP de type 2 et de type 3 en fonction du chromosome impliqué.

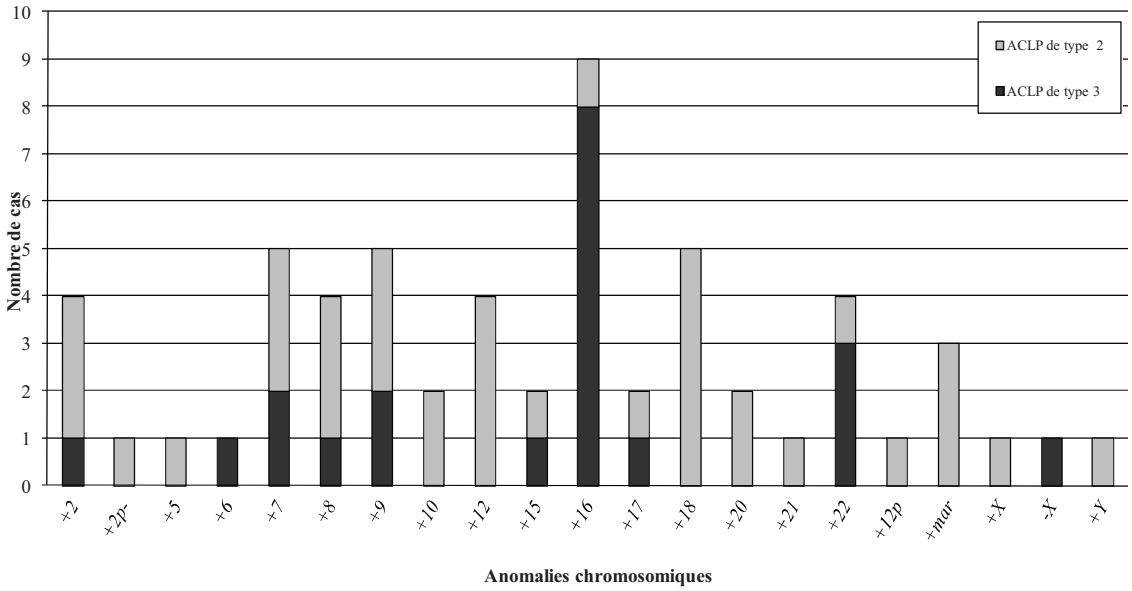


Figure 5. Anomalies chromosomiques limitées au placenta observées. Distribution du nombre d'anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 (gris clair) et de 3 type (gris foncé) en fonction du chromosome impliqué et de l'anomalie chromosomique observée.

Les ACLP étaient des aneuploïdies dans 51 cas (51/57 = 89,5% des ACLP de type 2 et 3 observées) et des anomalies chromosomiques de structure dans 6 cas (6/57 = 11,5% des ACLP de type 2 et 3 observées). Parmi les 51 aneuploïdies, deux ACLP impliquaient deux chromosomes différents (cas n°4 et cas n°16). Les 6 anomalies chromosomiques de structure observées ont concerné les cas n°5, 27, 39, 52, 53 et 54. La totalité des ACLP de type 2 était en mosaïque après culture (37/37 = 100% des ACLP de type 2), alors qu'environ la moitié des ACLP de type 3 était en mosaïque après culture des villosités choriales ou placentaires (Figure 6). Le pourcentage de mosaïcisme après culture des villosités n'était pas associé au poids naissance pour les ACLP de type 2 et 3 (Figure 6).

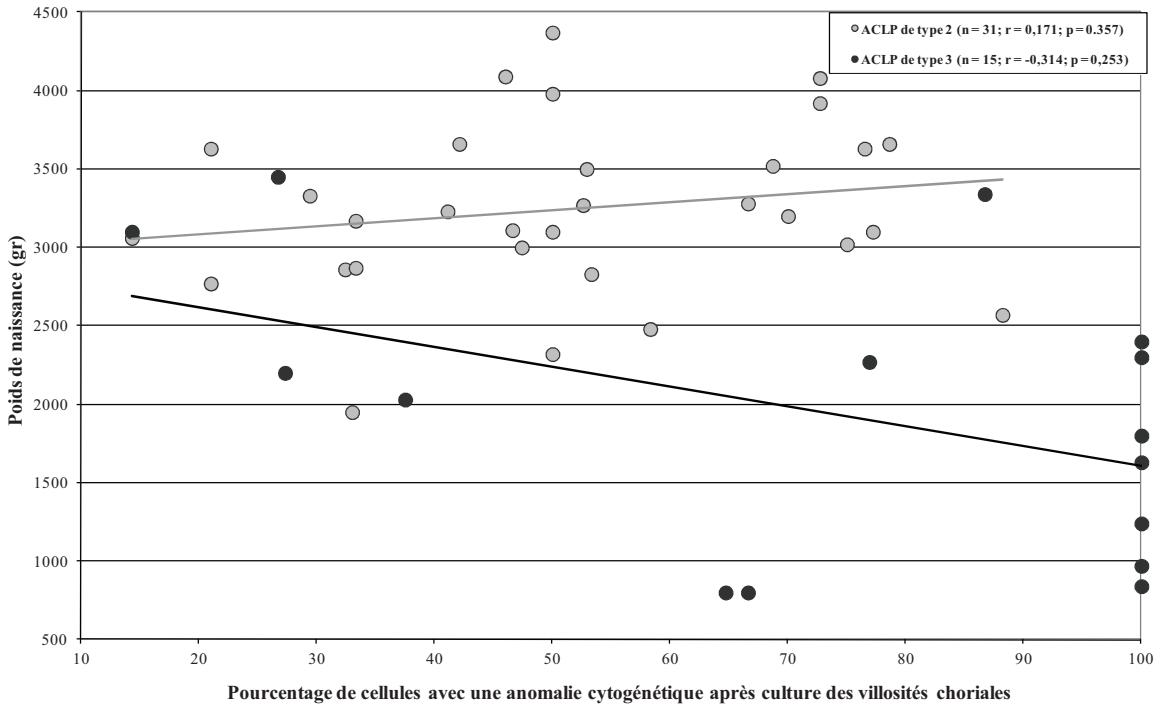


Figure 6. Poids de naissance en fonction du pourcentage de mosaïcisme des anomalies chromosomiques limitées au placenta. Association entre le poids de naissance et le pourcentage de mosaïcisme observé après culture des villosités choriales ou placentaires pour les anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP) de type 2 (cercles gris clair) et de type 3 (cercles gris foncé).

Le Tableau 2 résume l'influence des anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et de type 3 sur les différentes caractéristiques des grossesses.

Tableau 2. Caractéristiques des grossesses de la population contrôle et des patientes ayant présenté une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 2 et de type 3.

Caractéristiques de la grossesse	Population contrôle (n = 198)	ACLP de type 2 et 3 (n = 57)	p-value	ACLP de type 2 (n = 37)	p-value	ACLP de type 3 (n = 20)	p-value
Indication du diagnostic prénatal	100 (50,5)	31 (54,4)		21 (56,8)	NS	10 (50,0)	
- Age maternel (n, %)	35 (17,7)	5 (8,77)	NS	4 (10,8)	NS	1 (5,00)	NS
- Anomalie échographique (n, %)	26 (13,1)	4 (7,02)	NS	2 (5,41)	NS	2 (10,0)	NS
- Antécédent d'anomalie génétique (n, %)	37 (18,7)	17 (29,8)	NS	10 (27,0)	NS	7 (35,0)	NS
- Facteurs sériques maternels 2ème trimestre (n, %)			NS (p=0,063)				NS (p=0,077)
Age maternel (années) (moyenne ± ET)	36,3 ± 5,44	36,1 ± 4,90	NS	35,9 ± 5,40	NS	36,4 ± 3,91	NS
Terme de la biopsie choriale ou placentaire (SA) (moyenne ± ET)	14,4 ± 1,88	15,8 ± 2,99	NS (p=0,061)	15,4 ± 2,36	NS	16,7 ± 3,82	NS (p=0,059)

ACLP : anomalie chromosomique limitée au placenta ; ET : écart-type ; NS : non significatif ; SA : semaine d'aménorrhée.

Les fréquences des différentes indications de diagnostic prénatal invasif étaient identiques entre les patientes présentant une ACLP de type 2 et de type 3 et la population contrôle, même s'il semblait exister pour les ACLP de type 3 une augmentation de la fréquence des diagnostics prénatals réalisés pour facteurs sériques maternels du 2ème trimestre pathologiques (35,0%) en comparaison avec la population contrôle (18,8%) (p = 0,077) (Tableau 2).

Le terme médian de la grossesse au moment de la réalisation de la ponction de villosités choriales ou placentaires était identique entre les patientes présentant une ACLP de type 2 et la population contrôle, alors qu'il apparaissait un peu plus tardif chez les patientes présentant une ACLP de type 3 (p = 0,059) (Tableau 2). Ceci était vraisemblablement en relation avec la fréquence plus importante de diagnostics prénatals effectuées pour facteurs sériques maternels du 2ème trimestre pathologiques pour les ACLP de type 3.

2.4.2 ACLP de type 2 et de type 3 et disomie uniparentale

Les amniocentèses de contrôle effectuées chez les 57 patientes avaient systématiquement révélé des caryotypes conventionnels fœtaux sans anomalie décelée. Ces amniocentèses avaient par ailleurs permis de rechercher une DUP dans 19 cas (19/57 = 33,3% des ACLP de type 2 et de type 3, dont 6 ACLP de type 2 et 13 ACLP de type 3). Aucun cas de DUP n'a été observé chez les patientes présentant une ACLP de type 2 (0/6 = 0% de DUP pour les ACLP de type 2) (Tableau 3). En revanche, 4 cas de DUP ont été mis en évidence chez les patientes présentant une ACLP de type 3 (4/13 = 30,8% de DUP pour les ACLP de type 3). Pour les ACLP de type 3, la fréquence observée de cas de DUP (30,8%) était ainsi en accord avec la fréquence attendue (33,3%) (Hall, 1990). Une isodisomie maternelle des chromosomes 15 avait été observée et avait conduit le couple à demander une interruption de la grossesse pour un syndrome de Prader-Willi (cas n°30). La DUP des chromosomes 16 ne semblait pas avoir d'influence sur les issues des grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 impliquant un chromosome 16 (Tableau 3). Par ailleurs, les grossesses compliquées d'une anomalie de type 3 sans DUP fœtale étaient associées à une prématurité et à un petit poids de naissance (7/8 = 87,5% de prématurité et d'hypotrophie néonatale pour les ACLP de type 3 en l'absence de DUP, cas n°7, 11, 12, 16, 21, 31, 32, 36 et 37) (Tableaux 1 et 3).

Tableau 3. Issues des grossesses compliquées d'une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 2 et de type 3 pour lesquelles une disomie uniparentale a été recherchée.

Type d'ACLP	Patient	Chromosome	Disomie uniparentale	Poids de naissance (centile)	Issue de la grossesse
2	6	5	Absente	< 10ème	Normal à la naissance
2	8	7	Absente	> 10ème	Normal à la naissance
2	9	7	Absente	_	FCS à 17 SA
2	10	7	Absente	N/D	Normal à la naissance
2	29	15	Absente	> 10ème	Normal à la naissance
2	38	16	Absente	N/D	Normal à la naissance
3	7	6	Absente	< 3ème	Normal à la naissance
3	11	7	Absente	< 3ème	Normal à la naissance
3	12	7	Absente	> 10ème	Normal à la naissance
3	16	8,16	Absente	N/D	N/D
3	21	9	Absente	< 10ème	Normal à la naissance
3	30	15	Isodisomie maternelle	_	IMG (syndrome de Prader-Willi)
3	31	16	Absente	< 3ème	Normal à la naissance
3	32	16	Absente	< 10ème	Normal à la naissance
3	33	16	Hétérodisomie maternelle	< 3ème	Normal à la naissance
3	34	16	Hétérodisomie maternelle	_	MFIU à 35 SA
3	35	16	Hétérodisomie maternelle	< 3ème	Normal à la naissance
3	36	16	Absente	< 3ème	Décédé 4 semaines après la naissance
3	37	16	Absente	< 3ème	Normal à la naissance

ACLP : anomalie chromosomique limitée au placenta ; FCS : fausse couche spontannée ; IMG : interruption de la grossesse pour motif médical ; MFIU : mort fœtale *in utero* ; N/D : donnée non disponible ; SA : semaine d'aménorrhée.

2.4.3 Influence des ACLP sur la croissance fœtale, une distinction entre ACLP de type 2 et de type 3 s'impose

Le Tableau 4 résume l'influence des ACLP de type 2 et de type 3 sur l'issue de la grossesse.

Tableau 4. Influence des anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et de type 3 sur l'issue de la grossesse.

Caractéristiques de la grossesse	Population contrôle (n = 198)	ACLP de type 2 et 3 (n = 57)	p-value	ACLP de type 2 (n = 37)	p-value	ACLP de type 3 (n = 20)	p-value
Terme (SA) (moyenne ± ET)	39,0 ± 2,14	38,3 ± 3,02	NS	39,5 ± 1,47	NS	35,7 ± 3,77	p<0,0001
Prématurité (n, %)	21/191 (11,0)	8/50 (16,0)	NS	1/34 (2,94)	NS	7/16 (43,7)	p<0,01
Poids de naissance (gr) (moyenne ± ET)	3 211 ± 575	2 823 ± 894	p<0,01	3 244 ± 530	NS	1 954 ± 875	p<0,0001
Hypotrophie néonatale (n, %)	25/191 (13,1)	19/49 (38,8)	p<0,001	6/33 (18,2)	NS	13/16 (81,2)	p<0,0001
Hypotrophie néonatale sévère (n, %)	6/191 (3,14)	10/49 (20,4)	p<0,001	1/33 (3,03)	NS	9/16 (56,2)	p<0,0001
Sexe (n, % garçons)	101 (51,0)	27 (47,4)	NS	17 (45,9)	NS	10 (50,0)	NS
Issue de grossesse défavorable (n, %)	8 (4,04)	5 (8,77)	NS	1 (2,70)	NS	4 (20,0)	p<0,05

ACLP : anomalie chromosomique limitée au placenta ; ET : écart-type ; SA : semaine d'aménorrhée.

Il n'existait pas de différence des termes de naissance entre les patientes présentant une ACLP (de type de 2 et 3) et la population contrôle (Tableau 4). En revanche, les poids de naissance étaient plus faibles et les hypotrophies néonatales plus fréquentes chez les patientes présentant une ACLP (de type de 2 et 3). La fréquence des issues de grossesses défavorables était identique entre les patientes présentant une ACLP (de type de 2 et 3) et la population contrôle (Tableau 4). Lorsque l'on distinguait les ACLP de type 2 et de type 3, le terme de l'accouchement, la fréquence de nouveau-nés prématurés, le poids de naissance, la fréquence des hypotrophies néonatales et la fréquence des issues de grossesse défavorables étaient identiques entre les patientes présentant une ACLP de type 2 et la population contrôle (Tableau 4, Figure 7). En revanche, les termes de naissance étaient plus précoces et la fréquence de nouveau-nés prématurés plus élevée, pour les patientes présentant une ACLP de type 3 que pour la population contrôle (Tableau 4, Figure 7). En outre, le poids de naissance était plus faible et la fréquence des hypotrophies néonatales plus élevée, pour les patientes présentant une ACLP de type 3. Seuls trois nouveau-nés pour lesquels une ACLP de type 3 avait été mise en évidence étaient nés à terme et eutrophes (cas n°12, 20 et 55) (Tableau 1, Figure 7). Enfin, la fréquence des issues de grossesses défavorables était augmentée chez les patientes présentant une ACLP de type 3 (cas n°30, 34, 36 et 48) (Tableau 1 et 4).

La Figure 7 illustre les poids de naissance en fonction du terme pour les grossesses ayant présentées une ACLP de type 2 et de type 3 et pour la population contrôle.

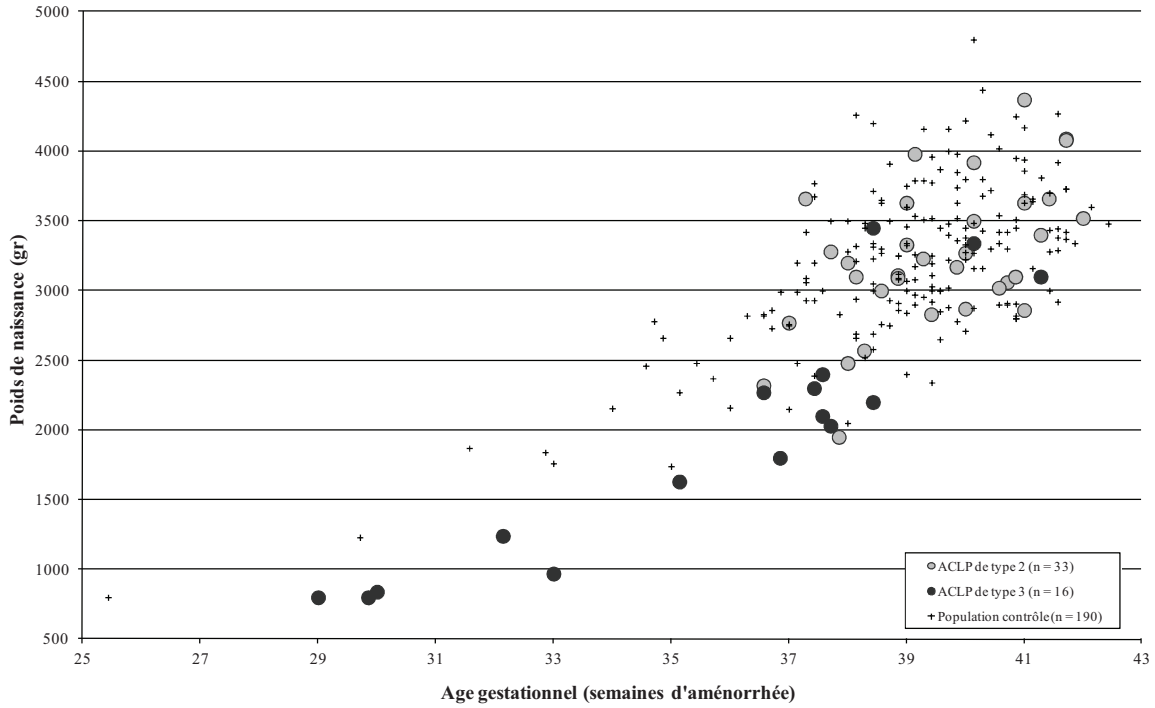


Figure 7. Poids de naissance en fonction du terme pour les grossesses ayant présenté une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 2 et de type 3 et pour la population contrôle. Les anomalies de type 2 sont représentées sous forme de cercles gris clair, les anomalies de type 3 sous forme de cercles gris foncé et la population contrôle sous forme de croix.

2.5 Discussion

À partir de cette étude monocentrique rétrospective, nous présentons une série importante d'ACLP de type 2 et de type 3 dont les caractéristiques des patientes et des issues de grossesse étaient largement documentées.

A partir de 13809 ponctions de villosités choriales, nous avons ainsi observé 57 ACLP de type 2 et de type 3, ce qui représentait une incidence de 0,41% des ponctions de villosités choriales et placentaires réalisées dans notre centre de Médecine Fœtale. Ces anomalies chromosomiques étaient ainsi plus rarement retrouvées dans notre expérience que dans la majorité des publications dans ce domaine, qui décrivaient entre 1 à 2% d'ACLP après ponction de villosités choriales ou placentaires (Ledbetter *et al.*, 1992 ; Fryburg *et al.*, 1993 ; Hahnemann et Vejerlev, 1997 ; Grati *et al.*, 2006). Ce résultat pouvait essentiellement être expliqué par le fait que les ACLP de type 1, qui représentaient environ 50% des ACLP décrites dans la littérature, n'avaient pas été prises en compte dans notre étude (Lestou et

Kalousek, 1998). Ces ACLP de type 1 peuvent uniquement être mises en évidence à l'examen dit « direct » des villosités et, dans notre pratique quotidienne, nous ne réalisons plus de façon systématique cet examen cytogénétique en raison de son manque de fiabilité (Hahnemann et Vejerlev, 1997 ; Toutain *et al.*, 2010a).

Ainsi, les anomalies chromosomiques exclusivement observées à l'examen « direct » des villosités (*i.e.* retrouvées uniquement au niveau des cellules du cytotrophoblaste) sont généralement le résultat d'une non-disjonction mitotique dans la masse cellulaire externe et ont donc peu de chances d'être représentatives du patrimoine chromosomique fœtal (Phillips *et al.*, 1996). Nous préférons ainsi effectuer, à la place de cet examen « direct », des techniques moléculaires rapides, comme la technique de FISH interphasique ciblant les principales aneuploïdies, réalisées à partir de l'axe mésenchymateux des villosités, en raison de la fiabilité de ce tissu (Toutain *et al.*, 2010a ; Toutain *et al.*, 2011).

En outre, la plus faible fréquence d'ACLP mise en évidence dans notre étude pouvait être due à la date du terme de réalisation de la ponction de villosités choriales. Ce terme était en effet plus tardif dans notre étude (le terme médian de la ponction de villosités choriales était de 15 semaines d'aménorrhée) que dans la plupart des études décrivant des ACLP, où les ponctions de villosités choriales étaient effectuée entre la 9ème et 12ème semaine d'aménorrhée (Ledbetter *et al.*, 1992 ; Fryburg *et al.*, 1993). De nombreuses fausses couches spontanées surviennent entre la 5ème et la 12ème semaine d'aménorrhée, et parmi ces fausses couches spontanées, environ un quart ont été décrites comme associées à des ACLP (Lebedev *et al.*, 2004). Ces nombreuses ACLP observées à partir des produits de fausse couche avant la 12ème semaine d'aménorrhée ne pouvaient bien évidemment plus être mises en évidence après la 12ème semaine, terme à partir duquel nous avions effectué les ponctions de villosités choriales.

Par ailleurs, il a été décrit qu'environ 10% des suspicions d'ACLP étaient en réalité des anomalies chromosomiques fœtales vraies (Phillips *et al.*, 1996 ; Grati *et al.*, 2006). Afin de s'affranchir de ces anomalies fœtales vraies, un contrôle du caryotype avait systématiquement été réalisé par amniocentèse pour nos 57 cas d'ACLP de type 2 et 3. Les contrôles du caryotype effectués par amniocentèse avaient montré des formules chromosomiques fœtales strictement normales et nous avaient ainsi permis de porter avec certitude le diagnostic d'ACLP.

Actuellement, en cas de suspicion d'ACLP, nous n'effectuons plus de contrôle du caryotype par amniocentèse de façon systématique, mais nous pouvons être amenés à réaliser ces contrôles dans les indications suivantes :

- Recherche d'une DUP devant une ACLP de type 2 et de type 3 impliquant les chromosomes 6, 7, 11, 14 ou 15,
- Suspicion d'une anomalie chromosomique fœtale présente en mosaïque et impliquant un chromosome pour lequel il peut exister une viabilité à la naissance (essentiellement les trisomies 8, 13, 18 et 21 en mosaïque, en l'absence de signes échographiques).

Concernant les DUP, elles surviennent théoriquement une fois sur trois lorsque le fœtus est issu d'une réparation d'un zygote initialement trisomique (ayant pour origine un accident méiotique, *a priori*, associé aux ACLP de type 3) (Lestou et Kalousek ; 1998 ; Grati *et al.*, 2006). Dans notre étude, aucun cas de DUP n'a été observé à partir des six ACLP de type 2 impliquant un chromosome portant des gènes soumis à empreinte parentale. Ce résultat, certes obtenu à partir d'un faible échantillon (six cas), apportait néanmoins un argument supplémentaire en faveur d'une origine mitotique des ACLP de type 2 (Wolstenholme, 1996). Parmi les 13 cas d'ACLP de type 3 impliquant un chromosome supposé porter des gènes soumis à empreinte parentale, la fréquence observée de DUP était quant à elle en accord avec la fréquence attendue (une DUP était retrouvée environ 1 fois sur 3 au niveau des amniocytes) (Hall, 1990). En revanche, nous n'avons observé qu'un seul cas de DUP ayant potentiellement des conséquences phénotypiques, ayant motivé le couple à demander une interruption de la grossesse (cas n°30, syndrome de Prader-Willi consécutif à une isodisomie maternelle du chromosome 15). Par ailleurs, nous n'avons noté aucune influence de la DUP des chromosomes 16 sur d'éventuelles complications fœtales ou d'anomalies phénotypiques. Ainsi, nous ne recherchons plus en routine la DUP du chromosome 16, des études récentes ont par ailleurs montré qu'il n'existait pas d'influence de la DUP de ce chromosome sur un éventuel phénotype (Eggermann *et al.*, 2004 ; Kotzot, 2008). Pour l'ensemble de nos patientes présentant une ACLP, les DUP avaient ainsi des conséquences phénotypiques de façon exceptionnelle (cas n°30). Il était à signaler qu'en l'absence de DUP, les grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 étaient associées à une prématurité et à une hypotrophie néonatale.

Concernant le terme de naissance, il était à noter que lorsque les ACLP de type 2 et de type 3 étaient « confondues », il n'existait de différence des termes de naissance entre les patientes ayant présenté une ACLP et la population contrôle (Tableau 4). De façon intéressante, lorsque l'on considérait séparément les ACLP de type 2 et de type 3, notre étude mettait en évidence que les ACLP de type 2 n'avaient pas d'influence sur les termes de naissance, alors que les ACLP de type 3 étaient associées à des termes de naissance prématurés. Ce résultat contredisait ceux des études antérieures, pour lesquelles les ACLP n'étaient pas associées à des cas de prématurité (Fryburg *et al.*, 1993 ; Goldberg et Wohferd, 1997 ; Amor *et al.*, 2006 ; Baffero *et al.*, 2012). A notre avis, ce résultat contradictoire pouvait être expliqué, d'une part, par le plus faible échantillonnage des études précédentes et, d'autre part, essentiellement par le fait que ces études n'avaient pas distingué les ACLP de type 2 des ACLP de type 3.

Lorsque l'on considérait l'ensemble des ACLP (*i.e.* les ACLP de type 2 et les ACLP de type 3), ces anomalies étaient, dans notre étude, associées à des hypotrophies néonatales. De façon remarquable, lorsqu'une distinction entre les ACLP de type 2 et 3 était effectuée, ces hypotrophies néonatales n'étaient pas expliquées par les ACLP de type 2, mais uniquement par les ACLP de type 3. La plupart des travaux précédents ne mettaient pas en évidence de risque augmenté d'hypotrophie néonatale à l'issue des grossesses compliquées d'une ACLP (Fryburg *et al.*, 1993 ; Roland *et al.*, 1994 ; Goldberg et Wohferd, 1997 ; Amor *et al.*, 2006 ; Baffero *et al.*, 2012). Comme pour les cas de prématurité, ce résultat contradictoire pouvait être dû à un plus faible effectif des études précédentes et à l'absence de distinction entre ACLP de type 2 et de type 3 par les auteurs de ces études.

Par ailleurs, certains travaux avaient montré qu'un nombre important de cellules aneuploïdes (généralement trisomiques) dans certaines ACLP était associé à des RCIU, alors qu'une faible proportion de cellules aneuploïdes était associée, pour les auteurs de ces études, à un poids de naissance normal (Kalousek *et al.*, 1991 ; Miny *et al.*, 1991 ; Sifakis *et al.*, 2010). Dans notre expérience, le pourcentage de mosaïcisme n'avait aucune influence sur le poids de naissance pour les ACLP de type 2 (Figure 6). Concernant les ACLP de type 3, les aneuploïdies homogènes au niveau de l'axe mésenchymateux étaient, certes, associées à des hypotrophies néonatales, mais pour les autres cas, le pourcentage de cellules en mosaïque après culture des villosités choriales n'était absolument pas associé au poids de naissance (Figure 6). Dans notre étude, les ACLP de type 3 permettaient d'expliquer, à elles seules, les cas

d'hypotrophies néonatales et d'hypotrophies néonatales sévères observées à l'issue des grossesses compliquées d'une ACLP, et ceci de façon indépendante du chromosome impliqué et du pourcentage de cellules aneuploïdes.

Les grossesses compliquées d'une ACLP de type 2 connaissaient des issues favorables, comparables à celles de la population contrôle, alors que les grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 étaient associées à des pertes fœtales. Ces résultats étaient en accord avec ceux des auteurs pour lesquels l'origine méiotique de l'ACLP (ayant pour conséquence, *a priori*, des ACLP de type 3) pouvait expliquer les issues péjoratives des grossesses (Robinson *et al.*, 1997). En revanche, nos résultats allaient à l'encontre des études qui n'avaient pas observé d'association entre la présence d'une ACLP et la survenue d'une issue défavorable de la grossesse (Fryburg et al., 1993 ; Amor *et al.*, 2006 ; Baffero *et al.*, 2012).

Dans notre expérience, la plupart des chromosomes était retrouvée dans les ACLP de type 2. En revanche, la distribution des chromosomes impliqués dans les ACLP de type 3 ne semblait pas se réaliser de façon aléatoire. En effet, pour les ACLP de type 3, nous avons observé majoritairement les chromosomes 7, 9, 16 et 22, alors que certains chromosomes n'étaient jamais impliqués dans les ACLP de type 3 que nous avons observées (Figure 5). Ces observations suggéraient que les remaniements chromosomiques des ACLP de type 2 pouvaient n'avoir qu'une influence très limitée sur le développement placentaire et la croissance fœtale et, *a contrario*, que l'implication de certains chromosomes dans les ACLP de type 3 pourrait ne pas être compatible avec la viabilité et/ou entrainer des fausses couches spontanées précoces.

Il était à déplorer que l'influence des ACLP de type 1 sur l'issue de la grossesse n'ait pas été évaluée dans cette étude. Les ACLP de type 1 sont, habituellement, la conséquence d'un accident mitotique, comme les ACLP de type 2 (Lestou et Kalousek, 1998). Il serait ainsi raisonnable de suggérer que l'influence des ACLP de type 1 sur la croissance fœtale soit très limitée, à l'image des ACLP de type 2, même si ce résultat mériterait d'être établi de façon rigoureuse.

Finalement, lorsqu'une ACLP est suspectée, il apparait fondamental de caractériser précisément le type d'ACLP. En effet, les ACLP de type 2 n'ont pas d'influence sur la

croissance fœtale (nouveau-nés à terme et eutrophes), le praticien pourra alors rassurer le couple quant à l'issue de la grossesse. En revanche, les ACLP de type 3 sont associées à des nouveau-nés prématurés et hypotrophes, ainsi qu'à des issues de grossesse défavorables (*i.e.* interruption de la grossesse pour motif médical en relation avec l'ACLP, mort fœtale *in utero*, décès en période périnatale). Sur la base de ces résultats, il nous semble dorénavant raisonnable de proposer devant tout RCIU inexpliqué un diagnostic prénatal par placentocentèse, plutôt que par amniocentèse, afin de pouvoir rechercher une ACLP de type 3 pouvant expliquer le RCIU. En ce qui concerne les ACLP de type 3 de découverte fortuite, avant la mise en place du RCIU, les résultats de notre étude nous encouragent à proposer aujourd'hui un suivi obstétrical adapté afin prévenir les complications associées à ce type d'ACLP.

2.6 Publications

2.6.1 Publication n°1

Saura R, **Toutain J**, Horovitz J (2010) A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24 000 consecutive cases. Prenat Diagn 30: 387-388.

PRENATAL DIAGNOSIS
Prenat Diagn 2010; **30**: 387–388.
Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

CORRESPONDENCE

A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24 000 consecutive cases

We read with a great deal of interest the article by Calda and Brestak about chorionic villus vacu-sampling using the Vacutainer system (Calda and Brestak, 2009). We take this opportunity to reply to the authors as the published technique and the results obtained were not in agreement with our own practical experience.

Since 1983, in our prenatal diagnostic center we have carried out chorionic villus sampling on more than 24 000 women using first the transcervical route and then the transabdominal route. The transcervical route was used from 1983 to 1988, but we then abandoned this method because of a very high rate of miscarriages linked with the procedure (~4%). Since 1988, we have carried out transabdominal chorionic villus sampling exclusively, using the same technique between the 12th and the 37th week of amenorrhea. The technique we use is based on that described by Smidt-Jensen and Hahnemann (1984). It consists of an extra-amniotic transabdominal chorionic villus sampling puncture, monitored with ultrasound, using a 20-gauge needle rinsed with heparin serum then linked to a 20-mL syringe by a plastic extension tube (Saura *et al.*, 1992). The rate of miscarriage when using the 20-gauge needle in our medical fetal center is the same as for amniocentesis (Brun *et al.*, 2003).

Our first point is that the 20-gauge needle we use for chorionic villus sampling causes no more pain than amniocentesis, and therefore has the advantage of not requiring a local anesthetic prior to the chorionic villus puncture, which is necessary with an 18-gauge needle (Calda and Brestak, 2009; Vandenbossche *et al.*, 2007).

Next, we stress the importance of the quantity of chorionic villi sampled. It is the quantity of chorionic villi fragments that will determine the culture time, and thus ultimately, the advantage of using the chorionic villus sampling method. The smaller this quantity, the longer it takes to obtain conventional karyotyping of the culture. It may take up to 15–20 days, or even longer, if the quantity sampled is less than 5 mg, as reported by the authors. In this case, the advantage to be obtained from chorionic villus sampling is very much reduced and the benefits of choriocentesis over amniocentesis become debatable. Thus, the threshold amount of chorionic villi that is sufficient, and which the authors set at 5 mg, seems to us to be completely inadequate. We believe that a large amount of chorionic material should be sampled (more than 15–20 mg) mainly in order to obtain the conventional karyotype after 6–8 days culture. In our opinion, it is essential to obtain about 15–20 mg of chorionic villi in order to:

- Ensure that the turn-around time for chorionic villi culture is as short as possible (to be able to terminate a pregnancy by curettage by the 14th week of amenorrhea if need be); in our center, with the amount of villi we sample, the median time taken for the culture of chorionic villi is 7 days (Q_1: 6; Q_3: 8).
- Carry out a complementary molecular cytogenetic technique (e.g. interphase fluorescence *in situ* hybridization on the mesenchymal core, if there is an anomaly in the ultrasound) (Toutain *et al.*, 2009).

It is clear that the 18-gauge needle used by the authors may help economize in the equipment used for a particular technique. However, in our experience, with a 20-gauge needle we obtain very much larger quantities than those obtained using the Vacutainer technique they describe. In our opinion, there are two key reasons why we obtain a greater quantity of material: the vacuum extraction system used and the movement of the needle by the person taking the sample. We used a CCD 20-gauge needle (amniocentesis needle, Ref. 1110600; Laboratoire CCD, Paris, France) between 1988 and 2007. As we had leakage problems between this needle and the plastic extension tube, the needle was replaced by an Ovopix needle. With this needle (Ovopix 63, Laboratoire Thiebaud, Margencel, France), we were able to obtain perfect air tightness in the sampling system (needle—extension tube—syringe) and thus carry out extraction in optimal conditions, absolutely essential in order to sample large quantities of chorionic villus fragments. Vacuum extraction was performed by an assistant using a 20-mL syringe linked to the 20-gauge needle by a 15-cm plastic extension tube (Peters Surgical). With this system, a high negative pressure could be produced by the intermittent vigorous pumping of the syringe plunger by the assistant for about 20 s. It is perfectly clear that the extraction carried out using our technique produces a much greater vacuum than that obtained using a Vacutainer tube, where extraction is limited, and hence can remove a large sample of villus material. Moreover, the 'back and forth' movement and simultaneous rotation of the needle applied by the person sampling helps considerably in obtaining large quantities of chorionic villi material. Such movement is possible when there is an extension tube between the needle and the syringe.

Concerning the risk of infection, the argument put forward by the authors that this risk can be reduced by avoiding transfer of the chorionic villus sample between a syringe and an extension tube is a theoretical argument, since after carrying out more than 24 000 choriocenteses, we have had no contamination problem with our chorionic villi cultures.

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Given the protocol and the results obtained by Calda and Brestak, we do not think that their technique, which is apparently so attractive, is satisfactory in practical terms for an extension of the prenatal diagnosis based on chorionic villus sampling, where success depends essentially on the amount of material obtained to reduce culture times (which should be well under 10 days). The chorionic villi culture time of between 9 and 29 days reported by the authors should be considered as a drawback of the chorionic villus vacu-sampling technique using a Vacutainer system. Although this technique may be suitably applied to amniocentesis, in our opinion, it is not appropriate for choriocentesis (Borrell *et al.*, 2008).

Robert Saura, Jérôme Toutain and Jacques Horovitz
CHU de Bordeaux, Fetal Medicine Center, Maternité Hôpital Pellegrin, Bordeaux 33076, France
E-mail: robert.saura@chu-bordeaux.fr
DOI: 10.1002/pd.2476

REFERENCES

Borrell A, Borobio V, Hernandez S, *et al.* 2008. Vacuum container aspiration as a new technique for genetic amniocentesis. *Prenat Diagn* 28(10): 962–963.

Brun JL, Mangione R, Gangbo F, *et al.* 2003. Feasibility, accuracy and safety of chorionic villus sampling: a report of 10741 cases. *Prenat Diagn* 23(4): 295–301.

Calda P, Brestak M. 2009. Chorionic villus vacu-sampling in 377 consecutive cases. *Prenat Diagn* 29(11): 1075–1077.

Saura R, Horovitz J, Taine L, *et al.* 1992. A modified freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 167(5): 1483–1484.

Smidt-Jensen S, Habnemann N. 1984. Transabdominal fine needle biopsy from chorionic villi in the first timester. *Prenat Diagn* 4(3): 163–169.

Toutain J, Epiney M, Begorre M, *et al.* 2009. First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies. *Eur J Obstet Gynecol*. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2009.12.015.

Vandenbossche F, Horovitz J, Guyon F, *et al.* 2008. Pain experience during chorionic villus sampling and amniocentesis: a preliminary study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 136(2): 189–193.

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

2.6.2 Publication n°2

Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R (2010) Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. Prenat Diagn 30: 1155-1164.

PRENATAL DIAGNOSIS
Prenat Diagn 2010; 30: 1155–1164.
Published online 8 October 2010 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/pd.2631

Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3

Jérôme Toutain[1,2]*, Cécile Labeau-Gatizere[2,3], Thomas Barnetche[4], Jacques Horovitz[2,3] and Robert Saura[1,2]

[1]*Cytogenetic Laboratory, Department of Medical Genetics, Pellegrin University Hospitals (Maternity), Place Amélie Raba-Léon, 33076 Bordeaux, France*
[2]*University Victor Segalen (Bordeaux 2), 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France*
[3]*Department of Obstetrics and Gynecology, Pellegrin University Hospitals (Maternity), Place Amélie Raba-Léon 33076 Bordeaux, France*
[4]*Department of Rheumatology, Pellegrin University Hospitals, Place Amélie Raba-Léon 33076 Bordeaux, France*

Objective To study the influence of types 2 and 3 confined placental mosaicism (CPM) on pregnancy outcome.

Method From 13 809 chorionic villus samplings (CVSs), karyotype after long-term cultured villi (LTC-villi) was systematically performed. Next, in case of suspicion of CPM, karyotype after short-term cultured villi (STC-villi) was established to define type 2 CPM (chromosomal abnormality limited to the mesenchymal core) or type 3 CPM (chromosomal abnormality found both in the cytotrophoblast and the mesenchymal core). Confirmatory amniocentesis was performed to exclude fetal mosaicism. Uniparental disomy (UPD) testing was carried out when the abnormal cell line involved chromosomes 5, 6, 7, 15 or 16.

Results Fifty-seven CPM cases were observed (57/13 809 = 0.41%) and of these, 37 were type 2 and 20 were type 3 CPM. Incidence of preterm infants, neonatal hypotrophy and adverse pregnancy outcome were comparable between patients in whom type 2 CPM was demonstrated and the control population. In contrast, for the type 3 CPM the incidence of these factors was higher than for the control population.

Conclusion When a CPM is suspected, it appears essential to determine type, since type 2 has no effect on fetal development and type 3 is associated with preterm infants, low birth weight and adverse pregnancy outcome. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: chorionic villus sampling; confined placental mosaicism; fetal development; uniparental disomy

INTRODUCTION

Confined placental mosaicism (CPM) is defined as the presence of chromosomal abnormalities in the extraembryonic tissue which are absent from the fetal tissue (Kalousek and Dill, 1983). CPM is observed in 1 to 2% of chorionic villus samplings (CVSs) carried out for prenatal diagnosis between the 9th and 12th weeks of amenorrhea (WA) (Ledbetter *et al*., 1992; Hahnemann and Vejerslev, 1997). These chromosomal abnormalities are usually the result of an early accident of meiotic origin followed by a 'repair' process carried out on a zygote that was originally trisomic, a phenomenon described as 'fetal rescue' or an accident of mitotic origin in the extraembryonic tissue (Robinson *et al*., 1997). CPM may be a numerical or a structural chromosomal abnormality, it may be non-mosaic or mosaic and concern all or some of the cells that make up the chorionic villi (cytotrophoblast cells and/or cells from the mesenchymal core) (Hahnemann and Vejerslev, 1997).

*Correspondence to: Jérôme Toutain, Laboratoire de Cytogénétique, Service de Génétique Médicale, Maternité Pellegrin, CHU de Bordeaux, Place Amélie Raba-Léon Bordeaux 33076, France. E-mail: jerome.toutain@chu-bordeaux.fr

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

CPM can therefore be classified into three types according to the location on the placenta of the chromosomal abnormality (Kalousek and Vekemans, 1996). In type 1 CPM, the chromosomal abnormality is found exclusively in the cytotrophoblast (i.e. the chromosomal abnormality is observed only after short-term culture villi (STC-villi)). These type 1 CPM may be the result of an accident of meiotic origin (usually when the chromosomal abnormality observed is non-mosaic) or, more frequently, an accident of mitotic origin (usually when the chromosomal abnormality is mosaic) (Wolstenholme, 1996). For type 2 CPM, the chromosomal abnormality is limited to the mesenchymal core of the chorionic villi [i.e. the chromosomal abnormality is observed only after long-term culture villi (LTC-villi)]. Type 2 CPM is usually the result of a mitotic accident. Type 3 CPM is defined as the presence of a chromosomal abnormality found both in the cytotrophoblast and in the mesenchymal core of the chorionic villi (i.e. the chromosomal abnormality is present both after STC-villi and LTC-villi). Type 3 CPM is, generally speaking, the result of an accident of meiotic origin.

When the type of CPM is not taken into consideration, some studies have shown that the outcome of pregnancies complicated by CPM appears to be predominantly favorable, with live babies being born, of normal weight and phenotype and with apparently no increased risk

Received: 7 April 2010
Revised: 20 July 2010
Accepted: 20 August 2010
Published online: 8 October 2010

of development problems (Fryburg *et al.*, 1993; Stetten *et al.*, 2004; Amor *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2006). Other studies, however, again without specifying CPM type, have described CPM as being associated with an increased risk of intrauterine growth retardation (Robinson *et al.*, 1997; Stipoljev *et al.*, 2001; Wilkins-Haug *et al.*, 2006). More precisely, meiotic CPM (hence necessarily type 3) has been described as being linked with intrauterine growth retardation and fetal death *in utero* (Robinson *et al.*, 1997).

Given these contradictions, the question of what information to give patients and what medical care to provide, if any, in the case of pregnancies complicated by CPM is still under discussion. Although types 2 and 3 CPM are usually the result of accidents of mitotic and meiotic origin, respectively, no study to date has looked specifically at the influence of these CPM types on pregnancy outcome. Based on a large series of trophoblast biopsies performed in our Fetal Medicine Center, we report cases of types 2 and 3 CPM that were observed and examine the influence of these chromosomal abnormalities on pregnancy outcome (i.e. spontaneous abortion, fetal death *in utero*, term and birth weight).

MATERIALS AND METHODS

Patients

This retrospective monocenter study was based on CVS performed on 13 809 patients between June 1997 and June 2009. The indications for prenatal diagnosis were advanced maternal age (over 38 years old), fetal ultrasound anomalies [nuchal translucency (NT) above the 95th percentile, intrauterine growth retardation], previous pregnancy with fetal abnormality (genetic or cytogenetic abnormality) or second trimester maternal serum screening for Down syndrome (risk higher than 1/250). The control patient population was chosen by drawing lots to obtain 198 patients from our Fetal Medicine Center who had had a prenatal diagnosis for the same indications, and in whom the karyotype was strictly normal after LTC-villi.

Sampling procedure and cytogenetic examination of chorionic villi

The CVSs were performed after the 12th WA by six obstetricians experienced in this procedure (Saura *et al.*, 1992). Extra-amniotic transabdominal sampling of the chorionic villi was carried out under ultrasound control (Saura *et al.*, 2010). In all cases, the villi samples were divided into two unequal parts:

1. A minority of villi fragments (<5 mg) underwent pretreatment (colchicine, hypotonic shock and fixation) and was then preserved until a later possible cytogenetic examination of the cytotrophoblast (STC-villi). These villi fragments were used retrospectively for STC-villi for the following indications:
   (a) In cases where there was suspected contamination by maternal cells, after the chorionic villi had been sorted under a binocular microscope,
   (b) In cases where chromosome abnormality was observed after culture of the chorionic villi which could indicate CPM [to specify the type of abnormality (type 2 or 3 CPM)].
   The villi fragments to be used for STC-villi were then prepared as described previously (Simoni *et al.*, 1983).
2. The rest of the villi samples (usually >20 mg) were selected under the binocular microscope to ensure that there was no maternal cell contamination. The selected chorionic villi were subjected to enzyme digestion (collagenase and trypsin-EDTA treatments) to isolate a maximum number of cells that make up the mesenchymal core. These cells were then cultivated, as previously described (Toutain *et al.*, 2010).

The conventional karyotype was established after Giemsa staining and heat denaturation ('R-bands') at a level of resolution of about 400 bands per haploid set. For each preparation, the chromosomes of at least 16 cells in metaphase were counted and at least 3 karyograms were established.

Type 2 CPM was defined when a chromosomal abnormality was observed only after LTC-villi (STC-villi normal), and type 3 CPM was defined as a chromosomal abnormality observed after LTC-villi and also in STC-villi. By carrying out cytogenetic examination of the chorionic villi in this way, only types 2 and 3 CPM were highlighted in our study. Type 1 CPM (absence of chromosome abnormality after LTC-villi and abnormal STC-villi) was not assessed in our study as the STC-villi was only carried out retrospectively, when a chromosome abnormality was revealed after LTC-villi.

Control amniocentesis

When type 2 or 3 CPM was suspected, and to exclude true fetal mosaicism, the fetal chromosomal formula was tested by amniocentesis.

Uniparental disomy

Uniparental disomy (UPD) testing was carried out on genomic DNAs when the CPM involved a chromosome for which imprinting genes had been described or suspected (chromosomes 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15 and 16) (Kotzot and Utermann, 2005; Kotzot, 2008). In such cases, UPD testing was based on microsatellite markers, as described previously (Grati *et al.*, 2006).

Pregnancy outcome

Pregnancy outcome was assessed on the basis of the following parameters: notion of spontaneous abortion, fetal death *in utero*, term, birth weight and phenotype anomalies observed at birth. Prematurity was defined as

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/pd

birth before 37 WA. Neonatal hypotrophy and severe neonatal hypotrophy were defined as birth weight below the 10th and 3rd percentile, respectively (Salomon *et al.*, 2007). In this study, adverse pregnancy outcome was defined as the occurrence of a spontaneous abortion, termination of pregnancy related to CPM or fetal death *in utero*.

Statistics

Qualitative data (expressed as percentages) were compared using Chi-square test (χ^2), or Fisher exact test if necessary. Quantitative data (expressed as mean ± SD) were compared using Student's-*t* test or Mann–Whitney test if needed. The association between birth weight and the percentage of karyotypically abnormal cells observed after LTC-villi for types 2 and 3 CPM was studied using the Spearman correlation test.

A significant threshold of 5% was considered and statistical analyses were performed using STATA 8.0 intercooled software.

RESULTS

Based on the analysis of 13 809 CVSs, 57 types 2 and 3 CPM (57/13 809 = 0.41%) were found (Table 1). Controls performed by amniocentesis in the 57 patients always showed normal chromosomal formulae. Thirty-seven of these were type 2 CPM (37/57 = 64.9% of types 2 and 3 CPM) and 20 were type 3 CPM (20/57 = 35.1% of types 2 and 3 CPM) (Figure 1). There was aneuploidy in 51 cases of CPM (51/57 = 89.5% of types 2 and 3 CPM) and in six cases this was structural abnormality (6/57 = 11.5% of types 2 and 3 CPM). Of these 51 aneuploid cases, 2 involved two different chromosomes (case nos. 4 and 16). The six structural chromosome abnormalities involved case nos. 5, 27, 39, 52, 53 and 54. All the cases of type 2 CPM were mosaic after LTC-villi (37/37 = 100% of type 2 CPM), whereas only about half of the cases of type 3 CPM were mosaic after LTC-villi (Figure 2).

The frequency of the various indications for prenatal diagnosis was identical in patients presenting with types 2 and 3 CPM and the control population, although in cases of type 3 CPM there did seem to be more prenatal diagnosis for second trimester maternal serum screening for Down syndrome (35.0%) than in the control population (18.8%) (Table 2).

The median pregnancy term for carrying out CVS was identical in patients with type 2 CPM and the control population, whereas it was later in patients with type 3 CPM (Table 2).

UPD testing was carried out in 19 cases (19/57 = 33.3% of types 2 and 3 CPM). No case of UPD was observed in patients with a type 2 CPM (0/6 = 0% of UPD for type 2 CPM) (Table 3). However, four cases of UPD were detected in patients with a type 3 CPM (4/13 = 30.8% of UPD for type 3 CPM), which was in agreement with the expected frequency (33.3%). One case of maternal isodisomy of chromosome 15 had been observed and as a result the couple had requested a termination of pregnancy for Prader-Willi syndrome [1/57 = 1.75% of types 2 and 3 CPM (case no. 30)] (Tables 1 and 3). UPD of chromosome 16 did not seem to affect the outcome of pregnancies complicated by a type 3 CPM involving chromosome 16 (Table 3).

Pregnancy term, frequency of premature newborns, birth weight, frequency of neonatal hypotrophy and frequency of adverse pregnancy outcomes were identical in patients with type 2 CPM and the control population (Table 2, Figure 3). On the other hand, in patients presenting a type 3 CPM, term was earlier and the frequency of premature newborns was higher than in the control population (Table 2, Figure 3). Birth weight was also lower and the frequency of neonatal hypotrophy was higher for patients presenting a type 3 CPM. Only three newborns for whom a type 3 CPM had been observed were born at term and eutrophic (case nos. 12, 20 and 55) (Table 1). The percentage of chromosomal anomalies after LTC-villi was not linked with birth weight for types 2 and 3 CPM (Figure 2). Finally, the frequency of adverse pregnancy outcomes was identical in patients with a type 2 CPM [1/37 = 2.70% (case no. 9)] and the control population (8/198 = 4.04%), whereas it was higher in patients with a type 3 CPM [4/20 = 20% (case nos. 30, 34, 36 and 48)] (Tables 1 and 2).

DISCUSSION

Based on this monocenter study, we are able to present a large series of cases of types 2 and 3 CPM where patient characteristics and pregnancy outcomes were for the most part well documented. Drawing on 13 809 CVSs, we were able to observe 57 types 2 and 3 CPM, which represents an incidence of 0.41% of the CVS carried out in our Fetal Medicine Center. Thus in our experience, these chromosomal abnormalities were found less frequently than was the case in the majority of publications in this field, which usually describe between 1 and 2% of CPM after CVS (Ledbetter *et al.*, 1992; Fryburg *et al.*, 1993; Hahnemann and Vejerslev, 1997; Grati *et al.*, 2006). This result can mainly be attributed to the fact that type 1 CPM, which represents about 50% of the CPM described in the literature, was not taken into account in our study (Lestou and Kalousek, 1998). In fact, on a day-to-day basis in practice we no longer carry out STC-villi systematically, mainly because it is unreliable (Hahnemann and Vejerslev, 1997; Toutain *et al.*, 2010). Chromosomal abnormalities observed exclusively after STC-villi (i.e. found only in the cytotrophoblast cells) are generally the result of a mitotic nondisjunction in the outer cell mass and there is therefore a small chance that they will be representative of the fetus (Phillips *et al.*, 1996). Instead of STC-villi, we prefer to carry out reliable molecular techniques based on the mesenchymal core of the villi, such as interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques targeting the main aneuploidies (Toutain

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 1—Description of the types 2 and 3 confined placental mosaicisms

Patients	Maternal age	Prenatal diagnosis indication	CVS term (WA)	Tissue	Karyotype	CPM type	Gestation age (WA)	Birth weight (gr)	Birth weight (percentile)	Comments
1	36	AFUS (NT)	16.6	Mes	47, XX,+2[21]/46, XX[9]	2	42.0	3520	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
2	25	MSS	18.1	Mes	47, XX,+2[17]/46, XX[13]	2	36.6	2320	< 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
3	35	MSS	22.0	Mes	47, XX,+2[19]/46, XX[11]	2	37.7	3280	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
4	39	Maternal age	15.3	Mes	47, XX,+2[NA]/47, XX,+9[N/A]/46, XX[N/A]	3	37.6	2100	< 3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+2[N/A]/47, XX,+9[N/A]/46, XX[N/A]					
5	41	Maternal age	13.4	Mes	47, XX,+2p-[17]/46, XX[5]	2	40.9	3100	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
6	39	Maternal age	14.9	Mes	47, XX,+5[25]/46, XX[5]	2	38.3	2570	< 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
7	36	ATCD (trisomy 21)	13.7	Mes	47, XX,+6[22]/46, XX[8]	3	29.9	800	< 3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+6					
8	19	AFUS (NT)	13.6	Mes	47, XY,+7[14]/46, XY[16]	2	37.3	3660	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
9	39	Maternal age	13.3	Mes	47, XY,+7[N/A]/46, XY[N/A]	2	—	—	—	SA at 17 WA
				Cyt	46, XY					
10	39	Maternal age	13.1	Mes	47, XY,+7[13]/46, XY[17]	2	40.0	N/A	—	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
11	37	Maternal age	13.0	Mes	47, XX,+7[9]/46, XX[15]	3	37.7	2030	< 3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+7[7]/46, XX[10]					
12	30	MSS	21.6	Mes	47, XY,+7[17]/46,XY[3]	3	40.1	3340	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+7[2]/46, XY[14]					
13	40	Maternal age	13.6	Mes	47,XX,+8[14]/46, XX[10]	2	38.0	2480	< 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
14	40	Maternal age	15.7	Mes	47, XX,+8[9]/46, XX[18]	2	37.9	1950	< 3rd	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
15	34	MSS	16.4	Mes	47, XY,+8[4]/46, XY[15]	2	37.0	2770	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
16	38	Maternal age	13.9	Mes	48, XY,+8,+16[5]/46, XY[12]	3	N/A	N/A	—	N/A
				Cyt	47, XY,+16[3]/46, XY[15]					
17	33	AFUS (NT)	13.0	Mes	47, XX,+9[3]/46, XX[18]	2	40.7	3060	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
18	36	ATCD (trisomy 18)	13.3	Mes	47, XX,+9[9]/46, XX[8]	2	40.1	3500	> 10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

19	30	MSS	19.1	Mes	47, XY,+9[4]/46, XY[15]	2	39.0	3630	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
20	37	Maternal age	14.0	Mes	47, XY,+9[3]/46, XY[18]	3	41.3	3100	>10th	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+9[12]/46, XY[10]					
21	40	Maternal age	15.6	Mes	47, XY,+9[20]/46, XY[6]	3	36.6	2270	<10th	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+9[16]/46, XY[4]					
22	41	Maternal age	13.1	Mes	47, XX,+10[16]/46, XX[14]	2	40.0	3270	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
23	39	Maternal age	13.9	Mes	47, XY,+10[16]/46, XY[6]	2	40.1	3920	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
24	28	AFUS (NT)	13.4	Mes	47, XY,+12[7]/46, XY[8]	2	41.7	4090	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
25	37	Maternal age	15.3	Mes	47, XX,+12[6]/46, XX[12]	2	39.9	3170	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
26	37	MSS	16.7	Mes	47, XX,+12[13]/46, XX[4]	2	41.1	3630	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
27	39	Maternal age	14.6	Mes	47, XX,i(12)(p10)[12]/46, XX[25]	2	41.0	2860	<10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
28	29	MSS	20.1	Mes	48, XX,+12[11]/47, XX,+20[3]/46, XX[2]	2	41.4	3660	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
29	38	Maternal age	13.4	Mes	47, XY,+15[9]/46, XY[9]	2	41.0	4370	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
30	38	Maternal age	13.0	Mes	47, XX,+15	3	—	—	—	TOP (Prader-Willi syndrome)
				Cyt	47, XX,+15					
31	41	Maternal age	15.0	Mes	47, XY,+16	3	36.9	1800	<3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+16					
32	33	MSS	17.7	Mes	47, XY,+16	3	32.1	1240	<10th	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+16					
33	27	MSS	19.1	Mes	47, XX,+16	3	35.1	1630	<3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+16					
34	28	MSS	19.0	Mes	47, XY,+16[14]/46, XY[9]	3	—	—	—	IUFD at 35 WA
				Cyt	47,XY,+16[17]/46, XY[13]					
35	36	MSS	21.0	Mes	47, XY,+16	3	33.0	970	<3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+16					
36	37	MSS	24.3	Mes	47, XX+16	3	30.0	850	<3rd	Death at 4 weeks of life
				Cyt	47, XX,+16					
37	38	AFUS (IUGR)	25.2	Mes	47, XY,+16[23]/46, XY[10]	3	29.0	800	<3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XY,+16[3]/46, XY[17]					
38	38	Maternal age	13.9	Mes	47, XX,+16[7]/46, XX[12]	2	N/A	N/A	—	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Prenat Diagn 2010; 30: 1155–1164.
DOI: 10.1002/pd

Table 1—(*Continued*)

Patients	Maternal age	Prenatal diagnosis indication	CVS term (WA)	Tissue	Karyotype	CPM type	Gestation age (WA)	Birth weight (gr)	Birth weight (percentile)	Comments
39	39	Maternal age	16.4	Mes	47, XX,+r(17)[6]/46, XX[16]	3	38.4	2200	<3rd	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+r(17)					
40	ND	ATCD (IUFD)	18.6	Mes	47, XX,+ 17[9]/46, XX[9]	2	39.1	3980	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
41	38	Maternal age	13.1	Mes	47, XY,+18[NA]/46, XY[N/A]	2	38.9	3090	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
42	41	Maternal age	13.7	Mes	47, XY,+18[16]/46, XY[14]	2	39.4	2830	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
43	42	Maternal age	14.0	Mes	47, XY,+18[NA]/46, XY[N/A]	2	41.3	3400	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
44	33	MSS	15.1	Mes	47, XX,+18[7]/46, XX[10]	2	39.3	3230	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
45	38	MSS	17.2	Mes	47, XY,+18[15]/46, XY[15]	2	38.1	3100	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
46	40	Maternal age	14.0	Mes	47, XY,+20[9]/46, XY[10]	2	38.6	3000	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
47	30	MSS	18.9	Mes	47, XX,+21[5]/46, XX[12]	2	39.0	3330	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
48	39	Maternal age	13.1	Mes	47, XX,+22[17]/46, XX[13]	3	—	—	—	IUFD at 27 WA
				Cyt	47, XX,+22					
49	37	MSS	16.3	Mes	47, XY,+22	3	37.6	2400	<10th	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+22					
50	40	Maternal age	13.0	Mes	47, XY,+22	3	37.4	2300	<10th	Normal at delivery
				Cyt	47, XX,+22					
51	24	MSS	18.6	Mes	47, XY,+22[7]/46, XY[14]	2	40.0	2870	<10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
52	38	Maternal age	13.0	Mes	47, XY,+mar[18]/46, XY[6]	2	40.6	3020	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
53	38	Maternal age	13.6	Mes	47, XX,+mar[7]/46, XX[8]	2	38.9	3110	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
54	40	Maternal age	15.0	Mes	47, XY,+mar[14]/46, XY[6]	2	38.0	3200	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					
55	37	ATCD (del(10))	13.9	Mes	45,X[8]/46, XX[22]	3	38.4	3450	>10th	Normal at delivery
				Cyt	45,X[6]/46, XX[24]					
56	42	Maternal age	17.4	Mes	48, XXXX[8]/47, XXX[3]/46, XX[7]	2	41.7	4080	>10th	Normal at delivery
				Cyt	46, XX					
57	38	Maternal age	15.3	Mes	47,X[10]/46, XY[7]	2	N/A	N/A	—	Normal at delivery
				Cyt	46, XY					

AFUS, abnormal findings on ultrasound scan; ATCD, antecedent; CPM, confined placental mosaicism; CVS, chorionic villus sampling; Cyt, cytotrophoblast; IUFD, intrauterine fetal death; IUGR, intrauterine growth restriction; Mes, mesenchymal core; MSS, maternal serum screening (2nd trimester); N/A, data not available; NT, nuchal translucency; SA, spontaneous abortion; TOP, termination of pregnancy; WA, week of amenorrhea.

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

DOI: 10.1002/pd

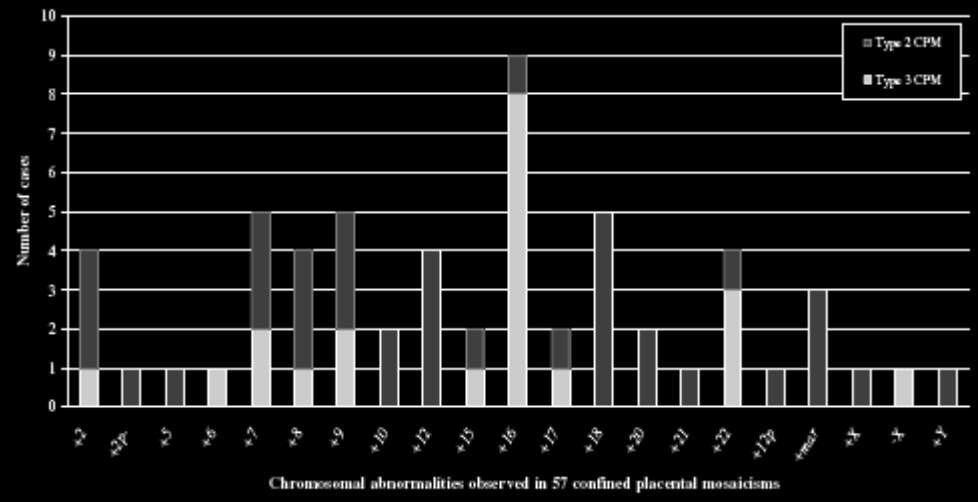


Figure 1—Distribution of chromosomal abnormalities in types 2 and 3 confined placental mosaicisms

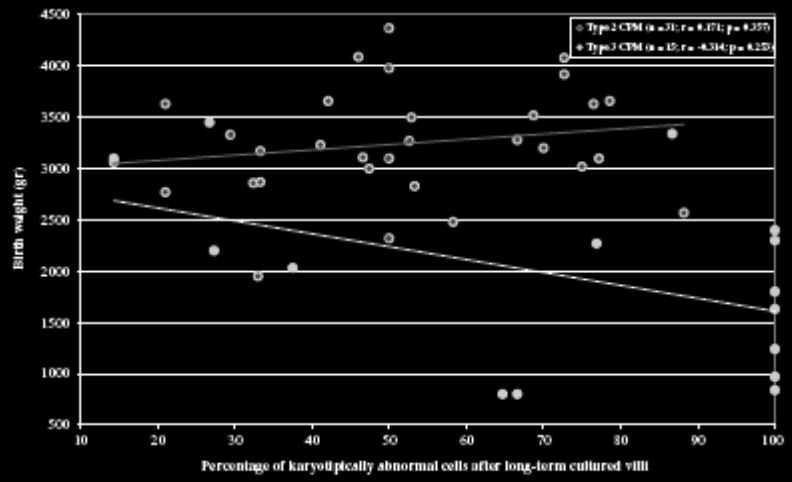


Figure 2—Association between the birth weight and the percentage of karyotypically abnormal cells observed after long-term cultured villi for types 2 and 3 confined placental mosaicisms

et al., 2010). Moreover, the lower frequency of CPM in our study may be due to the stage in the pregnancy when CVS was performed. This was indeed later in our study (median limit for CVS at 15 WA) than in most studies describing CPM frequencies, where CVS is performed between the 9th and 12th WA (Ledbetter *et al.*, 1992; Fryburg *et al.*, 1993). Many spontaneous abortions occur between the 5th and 12th WA and of these, about 25% have been described as being associated with CPM (Lebedev *et al.*, 2004). The many CPM cases observed on the basis of the products of spontaneous abortions before the 12th WA could therefore no longer be observed after 12th WA, the point at which we carried out CVS.

It has also been reported that about 10% of suspected CPM are in fact true fetal chromosomal abnormalities (Phillips *et al.*, 1996; Grati *et al.*, 2006). To discount these, a karyotype control was carried out systematically by amniocentesis for our 57 cases of types 2 and 3 CPM. These controls revealed chromosomal formulae

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Prenat Diagn 2010; 30: 1155–1164.
DOI: 10.1002/pd

Table 2—Influence of types 2 and 3 confined placental mosaicisms on pregnancy characteristics

Pregnancy characteristics	Control population (n = 198)	Types 2 and 3 CPM (n = 57)	P value	Type 2 CPM (n = 37)	P value	Type 3 CPM (n = 20)	P value
Prenatal diagnosis indication							
Maternal age (n, %)	100 (50.5)	31 (54.4)	NS	21 (56.8)	NS	10 (50.0)	NS
Abnormal findings on ultrasound scan (n, %)	35 (17.7)	5 (8.77)	NS	4 (10.8)	NS	1 (5.00)	NS
Previous pregnancy with fetal anomaly (n, %)	26 (13.1)	4 (7.02)	NS	2 (5.41)	NS	2 (10.0)	NS
Maternal serum screening (2nd trimester) (n, %)	37 (18.7)	17 (29.8)	NS	10 (27.0)	NS	7 (35.0)	NS
Maternal age (years) (mean ± SD)	36.3 ± 5.44	36.1 ± 4.90	NS	35.9 ± 5.40	NS	36.4 ± 3.91	NS
Chorionic villus sampling term (WA) (mean ± SD)	14.4 ± 1.88	15.8 ± 2.99	$P = 2.10^{-3}$	15.4 ± 2.36	NS	16.7 ± 3.82	$P < 10^{-4}$
Gestational age (WA) (mean ± SD)	39.0 ± 2.14	38.3 ± 3.02	NS	39.5 ± 1.47	NS	35.7 ± 3.77	$P < 10^{-4}$
Prematurity (n, %)	21/191 (11.0)	8/50 (16.0)	NS	1/34 (2.94)	NS	7/16 (43.7)	$P < 10^{-4}$
Birth weight (gr) (mean ± SD)	3 211 ± 575	2823 ± 894	$P = 9.10^{-4}$	3 244 ± 530	NS	1954 ± 875	$P < 10^{-4}$
Neonatal hypotrophy (n, %)	25/191 (13.1)	19/49 (38.8)	$P < 10^{-4}$	6/33 (18.2)	NS	13/16 (81.2)	$P < 10^{-4}$
Severe neonatal hypotrophy (n, %)	6/191 (3.14)	10/49 (20.4)	$P < 10^{-4}$	1/33 (3.03)	NS	9/16 (56.2)	$P < 10^{-4}$
Sex (n, % boys)	101 (51.0)	27 (47.4)	NS	17 (45.9)	NS	10 (50.0)	NS
Adverse pregnancy outcome (n, %)	8 (4.04)	5 (8.77)	NS	1 (2.70)	NS	4 (20.0)	$P = 3.10^{-3}$

CPM, confined placental mosaicism; WA, week of amenorrhea.

that were strictly normal, thus enabling us to confirm CPM diagnosis with certainty. At present, in case of suspected CPM, we no longer systematically carry out karyotyping by amniocentesis, but we may perform this test in the following cases:

(1) Testing for UPD in a type 3 CPM involving chromosomes 7, 11, 14 or 15
(2) Mosaic chromosomal abnormality involving potentially viable chromosomes (essentially mosaicism of trisomies 13, 18 and 21 in the absence of fetal ultrasound anomaly)

Concerning UPD, this occurs in theory in one case in three when the fetus has undergone repair to a zygote that was originally trisomic (originating in a previous meiotic accident, associated with type 3 CPM) (Lestou and Kalousek, 1998; Grati *et al.*, 2006). In our study, no case of UPD was observed in the six type 2 CPM involving chromosomes carrying imprinting genes. This result is a further argument in favor of type 2 CPM resulting from an accident of mitotic origin (Wolstenholme, 1996). Among the 13 cases of type 3 CPM involving chromosomes carrying imprinting genes, the frequency of UPD observed was in agreement with the expected frequency. On the other hand, we observed only one clinically relevant case of UPD, which resulted in the couple requesting a termination of pregnancy (case no. 30: Prader-Willi syndrome following maternal isodisomy of chromosome 15). Nor did we observe any influence of UPD for chromosome 16 on any fetal or phenotype complications. Hence, we no longer routinely screen for UPD for chromosome 16, which has been shown in recent studies to have no influence on a possible phenotype (Eggermann *et al.*, 2004; Kotzot, 2008).

Regarding birth term, our study showed that type 2 CPM had no influence, whereas type 3 CPM was associated with premature births. This result contradicts results from earlier studies where there was no link between CPM and prematurity (Fryburg *et al.*, 1993; Goldberg *et al.*, 1997; Amor *et al.*, 2006). In our opinion, this contradictory result can be explained first by the smaller samples in previous studies, and second mainly by the fact that these studies did not distinguish between types 2 and 3 CPM.

When we consider all cases of CPM in our study (i.e. types 2 and 3) these chromosomal abnormalities were linked with neonatal hypotrophy. Interestingly, when the distinction is made between types 2 and 3 CPM, neonatal hypotrophy does not occur in type 2 CPM, but only in type 3. The majority of earlier studies revealed no increased risk of neonatal hypotrophy as an outcome in pregnancies complicated by CPM (Fryburg *et al.*, 1993; Roland *et al.*, 1994; Goldberg *et al.*, 1997; Amor *et al.*, 2006). As in cases of prematurity, this contradictory result could be due to the smaller number of cases in the earlier studies and the fact that they made no distinction between types 2 and 3 CPM.

It must also be noted that some studies showed that a large number of aneuploid cells (generally trisomic) in CPM was linked with intrauterine growth retardation, whereas for the authors a small proportion of aneuploid cells was associated with normal birth weight (Kalousek *et al.*, 1991; Miny *et al.*, 1991; Sifakis *et al.*, 2010). In our study, the percentage of karyotypically abnormal

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 3—Uniparental disomy and pregnancy outcome for types 2 and 3 confined placental mosaicisms

CPM type	Patient	Chromosome	UPD	Birth weight (percentile)	Pregnancy outcome
2	6	5	Absent	<10th	Normal at delivery
2	8	7	Absent	>10th	Normal at delivery
2	9	7	Absent	—	SA at 17 WA
2	10	7	Absent	N/A	Normal at delivery
2	29	15	Absent	>10th	Normal at delivery
2	38	16	Absent	N/A	Normal at delivery
3	7	6	Absent	<3rd	Normal at delivery
3	11	7	Absent	<3rd	Normal at delivery
3	12	7	Absent	>10th	Normal at delivery
3	16	8,16	Absent	N/A	N/A
3	21	9	Absent	<10th	Normal at delivery
3	30	15	Maternal uniparental isodisomy	—	TOP (Prader-Willi syndrome)
3	31	16	Absent	<3rd	Normal at delivery
3	32	16	Absent	<10th	Normal at delivery
3	33	16	Maternal uniparental heterodisomy	<3rd	Normal at delivery
3	34	16	Maternal uniparental heterodisomy	—	IUFD at 35 WA
3	35	16	Maternal uniparental heterodisomy	<3rd	Normal at delivery
3	36	16	Absent	<3rd	Death at 4 weeks of life
3	37	16	Absent	<3rd	Normal at delivery

CPM, confined placental mosaicism; IUFD, intrauterine fetal death; N/A, data not available; SA, spontaneous abortion; TOP, termination of pregnancy; UPD, uniparental disomy; WA, week of amenorrhea.

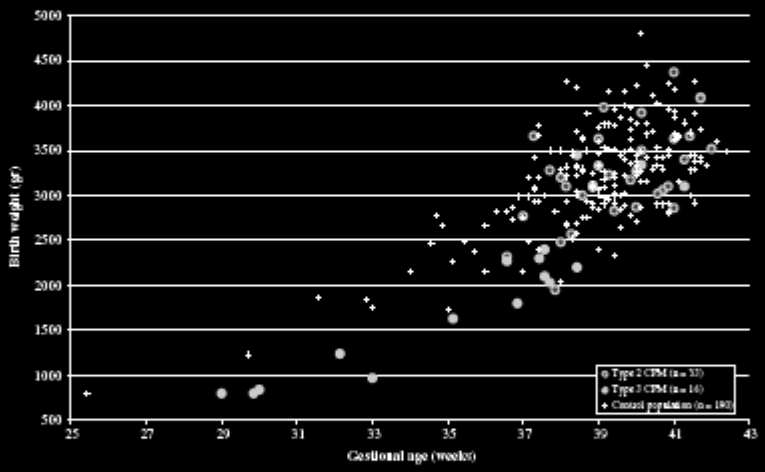


Figure 3—Weight and gestation at delivery for the types 2 and 3 confined placental mosaicisms and control population

cells after LTC-villi had no influence on birth weight for type 2 CPM (Figure 2). For type 3 CPM, however, cases of non-mosaic karyotypically abnormal cells in the mesenchymal core were indeed linked with neonatal hypotrophies, but for the other cases, the percentage was definitely not linked with birth weight (Figure 2). In our experience, type 3 CPM alone could account for the cases of neonatal hypotrophy and severe neonatal hypotrophy observed as an outcome in pregnancies complicated by CPM, and this was independent of percentage of aneuploid cells if any.

Pregnancy outcomes with type 2 CPM were comparable with those in the control population, whereas type 3 CPM was associated with fetal losses. These results agreed with those of authors for whom the meiotic origin of CPM (thus resulting in a type 3 CPM) could account for the adverse pregnancy outcomes (Robinson *et al.*, 1997). On the other hand, our results run counter to studies where no association was observed between CPM and adverse pregnancy outcomes (Fryburg *et al.*, 1993; Amor *et al.*, 2006).

In our experience, the majority of chromosomes were found in type 2 CPM. However, the distribution of chromosomes involved in type 3 CPM does not seem to be entirely random, as we observed mostly chromosomes 7, 9, 16 and 22, with some chromosomes never

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.
Prenat Diagn 2010; 30: 1155–1164.
DOI: 10.1002/pd

being observed in the type 3 CPM cases that we report (Figure 1). These observations suggested that the chromosomal abnormalities that occur in type 2 CPM may have only a very limited influence on placental and fetal development and that, on the contrary, the involvement of certain chromosomes in type 3 CPM could result in non-viability and/or cause early spontaneous abortions, as previously described (Lestou and Kalousek, 1998).

The effect of type 1 CPM on pregnancy outcome has not been assessed in this study. The majority of cases of type 1 CPM are the result of a mitotic accident, just like type 2 CPM (Lestou and Kalousek, 1998). One can therefore reasonably assume that the effect of type 1 CPM on fetal development, like that of type 2 CPM, is very limited, even if this has still to be proved.

Finally, when a CPM is suspected, it is clearly essential to define precisely which type of CPM it is. As type 2 CPM does not affect fetal development (term and eutrophic newborns), the practitioner can reassure the couple about the outcome of the pregnancy. However, type 3 CPM is associated with premature and hypotrophic newborns, and thus with unfavorable pregnancy outcomes (i.e. termination of pregnancy associated with CPM, fetal death *in utero*). Specially adapted obstetrical monitoring should then be put in place to prevent potential complications associated with type 3 CPM.

REFERENCES

Amor DJ, Neo WT, Waters E, Heussler H, Pertile M, Halliday J. 2006. Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 26: 443–448.

Eggermann T, Curtis M, Zerres K, Hughes HE. 2004. Maternal uniparental disomy 16 and genetic counseling: new case and survey of published cases. *Genet Couns* 15: 183–190.

Fryburg JS, Dimaio MS, Yang-Feng TL, Mahoney MJ. 1993. Follow-up of pregnancies complicated by placental mosaicism diagnosed by chorionic villus sampling. *Prenat Diagn* 13: 481–494.

Goldberg JD, Wohlferd MM. 1997. Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 176: 1349–1352.

Grati FR, Grimi B, Frascoli G, *et al.* 2006. Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities in chorionic villi. *Eur J Hum Genet* 14: 282–288.

Hahnemann JM, Vejerslev LO. 1997. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)-fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *Am J Med Genet* 70: 179–187.

Kalousek DK, Dill FJ. 1983. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science* 221: 665–667.

Kalousek DK, Vekemans M. 1996. Confined placental mosaicism. *J Med Genet* 33: 529–533.

Kalousek DK, Howard-Peebles PN, Olson SB, *et al.* 1991. Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 11: 743–750.

Kotzot D. 2008. Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 100–105.

Kotzot D, Utermann G. 2005. Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet A* 136: 287–305.

Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA. 2004. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur J Hum Genet* 12: 513–520.

Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, *et al.* 1992. Cytogenetic results from the US collaborative study on CVS. *Prenat Diagn* 12: 317–345.

Lestou VS, Kalousek DK. 1998. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 79: F223–F226.

Miny P, Hammer P, Gerlach B, *et al.* 1991. Mosaicism and accuracy of prenatal cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling and placental biopsies. *Prenat Diagn* 11: 581–589.

Miura K, Yoshiura K, Miura S, *et al.* 2006. Clinical outcome of infants with confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause. *Am J Med Genet A* 140A: 1827–1833.

Phillips OP, Tharapel AT, Lerner JL, Park VM, Wachtel SS, Shulman LP. 1996. Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 174: 850–855.

Robinson WP, Barrett IJ, Bernard L, *et al.* 1997. Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. *Am J Hum Genet* 60: 917–927.

Roland B, Lynch L, Berkowitz G, Zinberg R. 1994. Confined placental mosaicism in CVS and pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 14: 589–593.

Salomon LJ, Bernard JP, de Stavola B, Kenward M, Ville Y. 2007. Birth weight and size: charts and equations. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 36: 50–56.

Saura R, Horovitz J, Taine L, *et al.* 1992. A modified freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 167: 1483–1484.

Saura R, Toutain J, Horovitz J. 2010. A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24 000 consecutive cases. *Prenat Diagn* 30: 387–388.

Sifakis S, Staboulidou I, Maiz N, Velissariou V, Nicolaides KH. 2010. Outcome of pregnancies with trisomy 2 cells in chorionic villi. *Prenat Diagn* 30: 329–332.

Simoni G, Brambati B, Danesino C, *et al.* 1983. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet* 63: 349–357.

Stetten G, Escallon CS, South ST, McMichael JL, Saul DO, Blakemore KJ. 2004. Reevaluating confined placental mosaicism. *Am J Med Genet A* 131: 232–239.

Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miskovic B, Kurjak A. 2001. Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case control study of placentas at delivery. *Fetal Diagn Ther* 16: 4–9.

Toutain J, Epiney M, Begorre M, *et al.* 2010. First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 149: 143–146.

Wilkins-Haug L, Quade B, Morton CC. 2006. Confined placental mosaicism as a risk factor among newborns with fetal growth restriction. *Prenat Diagn* 26: 428–432.

Wolstenholme J. 1996. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn* 16: 511–524.

2.6.3 Publication n°3

Labeau-Gaüzere C, Horovitz J, Brun JL, Saura R, **Toutain J** (2011) Confined placental mosaicisms a priori from meiotic origin : analysis of ten cases. Gynecol Obstet Fertil 39: 117-120.

Gynécologie Obstétrique & Fertilité 39 (2011) 117–120

TRIBUNE DES INTERNES

Anomalies chromosomiques limitées au placenta a priori d'origine méiotique : à propos de dix cas

Confined placental mosaicims a priori from meiotic origin: Analysis of 10 cases

C. Labeau-Gaüzere [a,b], J. Horovitz [a,b], J.-L. Brun [a,b], R. Saura [b,c], J. Toutain [b,*,c]

[a] *Service de gynécologie-obstétrique, maternité Pellegrin, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux, France*
[b] *Université Victor-Segalen, Bordeaux 2, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France*
[c] *Laboratoire de cytogénétique, service de génétique médicale, maternité Pellegrin, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux, France*

Reçu le 14 décembre 2010 ; accepté le 27 décembre 2010

Résumé

Cette étude rétrospective monocentrique s'est intéressée aux anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP) *a priori* d'origine méiotique (i.e. anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 3 homogènes). À partir d'une série de 14 967 biopsies de trophoblaste effectuées dans notre centre de médecine foetale, dix ACLP de type 3 homogènes ont été mises en évidence. Ces anomalies impliquaient uniquement les chromosomes 15, 16 ou 22. Les grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 homogène étaient associées à des termes de naissance prématurés et des hypotrophies néonatales. Ainsi, lorsqu'une anomalie chromosomique limitée au placenta est suspectée, cette étude souligne la nécessité de bien caractériser son type afin de prévenir un très probable retard de croissance intra-utérin associé aux ACLP de type 3 homogènes et adapter la prise en charge obstétricale le cas échéant.
© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

This retrospective monocenter study focused on confined placental mosaicisms *a priori* from meiotic origin (i.e. non-mosaic type 3 confined placental mosaicisms). From a series of 14,967 chorionic villus samplings performed in our Fetal Medicine Center, 10 non-mosaic type 3 confined placental mosaicisms were identified. These abnormalities only involved chromosomes 15, 16 or 22. Pregnancies complicated by these confined placental mosaicisms were associated with prematurity and neonatal hypotrophy. Thus, when a confined placental mosaicism is suspected, this retrospective study highlighted the need to characterize the type of confined placental mosaicism to prevent the probable intra-uterine growth retardation and to adapt the obstetrical monitoring if necessary.
© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Mots clés : Anomalies chromosomiques limitées au placenta ; Origine méiotique ; Disomie uniparentale ; Prématurité ; Hypotrophie néonatale

Keywords: Confined placental mosaicism; Meiotic origin; Uniparental disomy; Prematurity; Neonatal hypotrophy

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : jerome.toutain@chu-bordeaux.fr (J. Toutain).

1297-9589/$ see front matter © 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.gyobfe.2010.12.008

1. INTRODUCTION

Les anomalies chromosomiques limitées au placenta (ACLP) sont définies par des anomalies chromosomiques présentes au niveau des tissus extra-embryonnaires et absentes des tissus fœtaux [1]. Ces ACLP sont retrouvées dans à 1 à 2 % des biopsies de villosités choriales effectuées dans le cadre du diagnostic prénatal réalisé entre neuf et 12 semaines d'aménorrhée (SA) [2]. Ces anomalies sont essentiellement des ACLP de types 1 et 2 en mosaïque et plus rarement des ACLP de type 3 homogènes. Les ACLP de type 1 et 2 sont définies par une anomalie cytogénétique limitée respectivement au cytotrophoblaste et à l'axe mésenchymateux des villosités choriales [3]. Les ACLP de type 3 homogènes sont, quant à elles, définies par une anomalie chromosomique retrouvée de façon homogène à la fois au niveau du cytotrophoblaste et de l'axe mésenchymateux. Ainsi, pour ces ACLP de type 3, l'anomalie chromosomique est présente, de façon homogène, à la fois à l'examen cytogénétique « direct » ciblant le cytotrophoblaste et après culture des villosités choriales ciblant l'axe mésenchymateux.

Les ACLP sont la conséquence d'un accident d'origine mitotique dans les tissus extra-embryonnaires, ou bien la conséquence d'un accident d'origine méiotique précoce suivi d'un processus de « réparation » d'un zygote initialement trisomique [3]. Les ACLP « mitotiques » sont, en général, à l'origine d'ACLP de type 1 ou de type 2 en mosaïque, alors que les ACLP « méiotiques » sont le plus souvent à l'origine d'ACLP de type 3 homogènes [3].

Les ACLP d'origine méiotique ont été décrites comme des ACLP de pronostic défavorable, associées à des retards de croissance intra-utérins sévères et/ou des morts fœtales *in utero* [4]. Par ailleurs, ces ACLP d'origine méiotique se compliquent le plus souvent par des hypotrophies néonatales sévères [4]. *A contrario*, les ACLP de type 1 et de type 2, d'origine mitotique, connaissent des issues de grossesse comparables à celles de la population générale, sans problèmes développementaux particuliers [5].

Nous rapportons, dans ce travail, les cas d'ACLP de type 3 homogènes, *a priori* d'origine méiotique, mises en évidence dans notre centre de médecine fœtale au cours des 13 dernières années.

2. PATIENTES ET MÉTHODES

Cette étude rétrospective monocentrique a été réalisée à partir de biopsies de villosités choriales effectuées chez 14 967 patientes bénéficiant d'un diagnostic prénatal dans notre Centre de médecine fœtale entre juin 1997 et décembre 2010.

Les ponctions de villosités choriales ont été effectuées après la douzième SA par six obstétriciens expérimentés aux ponctions de villosités choriales. Les villosités choriales ont été prélevées à l'aide d'une aiguille de 20-gauge par voie transabdominale, en extra-amniotique, sous contrôle échographique [6].

Tableau 1
Principales caractéristiques des grossesses compliquées d'une anomalie chromosomique limitée au placenta de type 3 homogène.

Cas	Âge maternel (années)	Terme choriocentèse (SA)	Indication DPN	Risque FSM 2e trimestre	β-HCG (MoM)	Formule choriocentèse	Formule amniocentèse	Terme (SA + jours)	Poids de naissance (percentile)	Disomie uniparentale	Commentaires
1	38	13	Âge maternel	–	–	47,XXX,+15	46,XX	–	–	Isodisomie maternelle	IMG
2	36	21	FSM 2e trimestre	1/8	7,81	47,XY,+16	46,XY	33	< 3e	Hétérodisomie maternelle	EVBP
3	41	15	Âge maternel	–	–	47,XY,+16	46,XY	36 + 6	< 3e	Absence	EVBP
4	37	24	FSM 2e trimestre	1/142	13,9	47,XX,+16	46,XX	30	< 3e	Absence	Décès à 5 semaines
5	27	19	FSM 2e trimestre	1/43	10,6	47,XX,+16	46,XX	35 + 1	< 3e	Hétérodisomie maternelle	EVBP
6	33	17	FSM 2e trimestre	1/147	5,14	47,XY,+16	–	32 + 1	< 10e	–	EVBP
7	24	19	FSM 2e trimestre	1/40	6,29	47,XX,+16	–	–	–	–	MFIU (avant 19 SA)
8	40	13	Âge maternel	–	–	47,XX,+22	46,XX	37 + 3	< 10e	–	–
9	38	16	FSM 2e trimestre	1/12	18	47,XY,+22	–	37 + 4	< 10e	–	EVBP
10	41	14	Âge maternel	–	–	47,XY,+22	–	–	–	–	Grossesse en cours

DPN : diagnostic prénatal ; EVBP : enfant vivant bien portant ; FSM : facteurs sériques maternels ; IMG : interruption volontaire de la grossesse pour raisons médicales ; MFIU : mort fœtale in utero ; SA : semaine d'aménorrhée.

Le caryotype conventionnel a été établi après coloration et dénaturation thermique (bandes R) à un niveau de résolution d'environ 400 bandes par lot haploïde. Les ACLP de type 3 étaient définies par une anomalie chromosomique observée à l'examen « direct » et après culture des villosités choriales.

En cas de suspicion d'une ACLP, et afin d'exclure un mosaïcisme fœtal, un contrôle de la formule chromosomique fœtale à partir d'une amniocentèse a pu être proposé.

Une recherche de disomie uniparentale a été réalisée lorsque l'ACLP impliquait un chromosome pour lequel des gènes soumis à empreinte avaient été décrits ou suspectés.

L'hypotrophie néonatale et l'hypotrophie néonatale sévère ont été respectivement définies par un poids de naissance inférieur au dixième et au troisième percentiles.

3. RÉSULTATS

À partir de 14 967 biopsies de villosités choriales effectuées dans notre centre de médecine fœtale, dix ACLP de type 3 homogènes (10/14 967 = 0,67 ‰) ont été mises en évidence. Ces ACLP de type 3 homogènes étaient dans tous les cas des aneuploïdies impliquant les chromosomes 15, 16 ou 22. Le Tableau 1 résume les principales caractéristiques des grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 homogène. Les indications de diagnostic prénatal étaient des facteurs sériques maternels du deuxième trimestre plaçant la femme dans la groupe à risque d'attendre un enfant à naître atteint de trisomie 21 (6/10 = 60,0 %) ou un âge maternel avancé (4/10 = 40,0 %). Les amniocentèses de contrôle effectuées le cas échéant avaient toujours montré des formules chromosomiques normales. Une isodisomie maternelle du chromosome 15 avait été observée et avait conduit le couple à demander une interruption médicale de grossesse pour un syndrome de Prader-Willi (cas n° 1). La disomie uniparentale du chromosome 16 ne semblait pas avoir d'influence sur les issues des grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 homogène impliquant ce chromosome (cas n° 2 à cas n° 7). Le terme médian de l'accouchement des grossesses compliquées d'une ACLP de type 3 homogène était de 35 + 1 SA. Pour ces grossesses, l'hypotrophie néonatale était constante. Une mort fœtale *in utero* et un décès à cinq semaines ont, par ailleurs, été observés (cas n° 7 et n° 4, respectivement).

4. DISCUSSION

À partir de 14 967 ponctions de villosités choriales réalisées dans notre centre de médecine fœtale, nous avons observé dix ACLP de type 3 homogènes, ce qui représentait une incidence de 0,67 ‰ des biopsies de villosités choriales effectuées. Ces anomalies chromosomiques étaient ainsi retrouvées de façon exceptionnelle dans notre expérience, comme dans la littérature [2].

Parmi les dix cas d'ACLP de type 3 homogènes décrites dans ce travail, six cas avaient été recrutés sur l'indication de facteurs sériques maternels du deuxième trimestre plaçant la femme dans la groupe à risque d'attendre un enfant à naître atteint de trisomie 21 [7]. Chez ces patientes, il est intéressant de noter que le taux de β-HCG était considérablement augmenté, avec des valeurs comprises entre 5,14 et 18,0 MdM dans notre étude. Les quatre autres patientes, présentant une ACLP de type 3 homogènes dans notre étude, avaient bénéficié d'un diagnostic prénatal pour âge maternel avancé (supérieur à 38 ans), le dosage des facteurs sériques maternels du deuxième trimestre n'avait donc pas été proposé à ces patientes.

Dans notre expérience, comme dans la littérature, la distribution des chromosomes impliqués dans les ACLP de type 3 homogènes ne se réalisait pas de façon aléatoire [3]. En effet, nous n'avons observé que les chromosomes 15, 16 et 22 dans les ACLP de type 3 homogènes que nous rapportons. Ces observations suggéraient ainsi que l'implication d'autres chromosomes dans les ACLP de type 3 homogènes pourrait ne pas être viable et/ou entraîner des fausses-couches spontanées précoces.

Nous avons observé un cas de disomie uniparentale avec des conséquences phénotypiques, ayant conduit le couple à demander une interruption médicale de grossesse (cas n° 1 : syndrome de Prader-Willi consécutif à une isodisomie maternelle du chromosome 15). Par ailleurs, nous n'avons noté aucune influence de la disomie uniparentale du chromosome 16 sur d'éventuelles complications fœtales ou d'anomalies phénotypiques. Dorénavant, nous ne rechercherons plus la disomie uniparentale du chromosome 16 dans le cadre sanitaire. Des études récentes ont, par ailleurs, confirmé qu'il n'existait pas d'influence de la disomie uniparentale de ce chromosome sur un éventuel phénotype [8].

Concernant le terme de naissance, notre étude mettait en évidence que les ACLP de type 3 homogènes étaient associées à des termes de naissance prématurés. Ce résultat allait à l'encontre des conclusions de nombreuses études, pour lesquelles les ACLP n'étaient pas associées à des cas de prématurité [9,10]. En outre, les ACLP de type 3 homogènes de notre étude étaient systématiquement associées à des hypotrophies néonatales. La plupart des travaux antérieurs ne mettaient pas en évidence de risque augmenté d'hypotrophie néonatale à l'issue des grossesses compliquées d'une ACLP [9,10]. À notre avis, ces résultats contradictoires pouvaient essentiellement être expliqués par le fait que les études précédentes n'avaient pas pris en considération les types d'ACLP (types 1, 2 ou 3) ou leur origine (mitotique ou méiotique).

Finalement, lorsqu'une ACLP est suspectée, cette étude soulignait la nécessité de bien caractériser le type d'ACLP (types 1, 2 ou 3, anomalie homogène ou en mosaïque) afin de prévenir un très probable retard de croissance intra-utérin associé aux ACLP de type 3 homogènes et adapter la prise en charge obstétricale le cas échéant.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt.

RÉFÉRENCES

[1] Kalousek DK, Dill FJ. Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. Science 1983;221:665–7.

[2] Hahnemann JM, Vejerslev LO. European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC) – fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. Am J Med Genet 1997;70:179–87.

[3] Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. Prenat Diagn 1996;16:511–24.

[4] Robinson WP, Barrett IJ, Bernard L, et al. Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. Am J Hum Genet 1997;60:917–27.

[5] Toutain J, Labeau-Galizere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R. Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2. Prenat Diagn 2010;30:1155–64.

[6] Horovitz J, Toutain J, Saura R. A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24,000 consecutive cases. Prenat Diagn 2010;30:387–8.

[7] Morssink LP, Sikkema-Raddatz B, Beekhuis JR, De Wolf BT, Mantingh A. Placental mosaicism is associated with unexplained second-trimester elevation of MShCG levels, but not with elevation of MSAFP levels. Prenat Diagn 1996;16:845–51.

[8] Eggermann T, Curtis M, Zerres K, Hughes HE. Maternal uniparental disomy 16 and genetic counseling: new case and survey of published cases. Genet Couns 2004;15:183–90.

[9] Amor DJ, Neo WT, Waters E, Heussler H, Pertile M, Halliday J. Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism. Prenat Diagn 2006;26:443–8.

[10] Goldberg JD, Wohlferd MM. Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. Am J Obstet Gynecol 1997;176:1349–52.

2.6.4 Publication n°4

Toutain J, Horovitz J, Saura R. Type 3 confined placental mosaicism of meiotic origin requires close obstetrical monitoring. Prenat Diagn, *In Press*

CORRESPONDENCE

Type 3 confined placental mosaicism of meiotic origin requires close obstetrical monitoring

CORRECTED PROOF

We read with considerable interest the article published by Baffero *et al.* entitled '*Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome*'.[1] This article deals with risk factors and outcomes of pregnancies complicated by confined placental mosaicism (CPM). From a series of 6835 chorionic villus sampling (CVS), 115 CPM of which the pregnancy characteristics and outcomes were known, were compared with 230 control pregnancies. It is therefore an important monocentric study on CPM and its obstetrical complications, and we congratulate the authors on their work. The main results did surprise us, however, and we would like to take this opportunity to respond.

From the results of this study the authors conclude that there is no increased risk of an unfavorable pregnancy outcome in cases of CPM.[1] They therefore recommend that patients should be reassured in such cases, which surprised us. Although in the majority of cases of CPM pregnancy outcomes are favorable, in cases of type 3 CPM (CPM of meiotic origin) pregnancy outcomes are associated, in our experience, with intrauterine growth restriction and intrauterine fetal death.[2]

The study that we carried out on this subject, based on 13 809 CVS, clearly showed that the 20 cases of type 3 CPM identified (20/13 809 = 0.15%) were associated with neonatal hypotrophy (13/16 = 81.2% of type 3 CPM) and unfavorable pregnancy outcomes (6/20 = 20.0% of type 3 CPM) (2 intrauterine fetal death, 1 termination for Prader–Willi syndrome resulting from CPM involving trisomy 15, and 1 perinatal death).[2] The outcomes for the 37 type 2 CPM in our study were comparable with those found in the general population. Figure 1 gives a good illustration of our main results. Our study showed that it was essential to characterize the CPM precisely to offer suitable obstetrical monitoring in cases of type 3 CPM associated with viability (mainly the type 3 CPM that concern trisomies 16 and 22), and conversely, to reassure couples in cases of type 2 CPM. Our study did not look at type 1 CPM, because we no longer carry out systematically short-term culture of the cytotrophoblast because this extra-embryonic tissue can be unreliable, and because type 1 CPM is essentially mitotic in origin.[3,4] F1

Indeed, in ~~2007~~, Robinson *et al.* identified that CPM of meiotic origin was associated with intrauterine growth restriction, whereas this was not the case for CPM, which is mitotic in origin.[5] Meiotic CPM is mainly type 3 (usually homogenous after long-term culture), whereas mitotic CPM is mainly type 1 and type 2 (always with mosaicism after

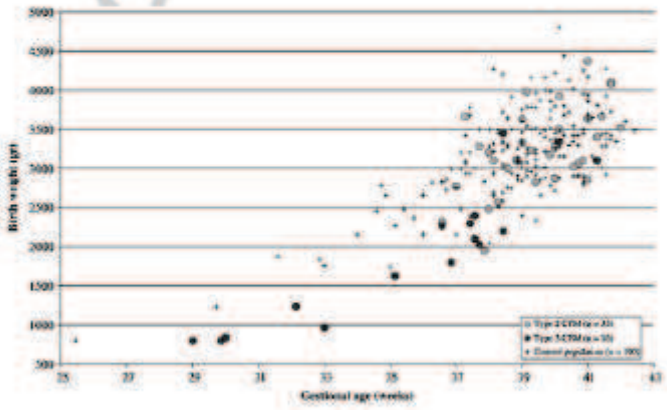


Figure 1 Weight and gestation at delivery for the type 2 (light grey circles) and type 3 (dark grey circles) confined placental mosaicisms and control population (black crosses)

© 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

long-term culture).[3,6] This was consistent with the results that we reported, where cases of type 3 CPM were associated with intrauterine growth restriction and intrauterine fetal death.[3,5] This study by Robinson *et al.* is now the definitive article in this field, and we are surprised that Baffero *et al.* did not cite it. On the basis of this article, and our own experience, we feel that it would be unsafe to systematically give patients reassurance when CPM is found, as suggested by Baffero *et al.* in their conclusions. Above all, it is essential to eliminate a type 3 CPM that would require specifically adapted obstetrical care.

In our opinion, the contradictory results reported by Baffero *et al.* can mainly be explained by the small number of type 3 CPM in their study (13 type 3 CPM, 13/6835 = 0.19%), whereas we had 20 cases (20/13 809 = 0.14%).[1,2] We are therefore in agreement about the proportion of type 3 CPM that Baffero *et al.* describe but the larger numbers of CVS in our study obviously enabled us to identify more cases. This could account for the differences in statistical significance observed concerning the pregnancy outcomes for the type 3 CPM. It would have been better if the authors had given details about the outcomes of the type 3 CPM pregnancies that they identified.

To conclude, despite the conclusions reached by Baffero *et al.* and on the basis of key studies and our own experience, we maintain that it is essential to determine the type of CPM exactly, as type 3 CPM, which is essentially meiotic in origin, definitely requires appropriate obstetrical monitoring.[2,5]

Jérôme Toutain, Jacques Horovitz and Robert Sarda

Centre de Médecine Foetale, Maternité Pellegrin, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
*Correspondence to: Jérôme Toutain. E-mail: jerome.toutain@chu-bordeaux.fr

Funding sources: None
Conflicts of interest: None declared

PROOF

REFERENCES

1. Baffero GM, Somigliana E, Crovetto F, *et al.* Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome. Prenat Diagn 2012;doi: 10.1002/pd.3965.
2. Toutain J, Labeau-Galtasse C, Barnetche T, *et al.* Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. Prenat Diagn 2010;30:1155–64.
3. Toutain J, Soler G, Horovitz J, Sarda R. Prenatal diagnosis on chorionic villi using molecular techniques should be performed from mesenchymal core rather than from direct villi. Prenat Diagn 2011;31:1111–2.
4. Lestou VS, Kalousek DK. Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. Arch Dis Child Fetal Neonatal 1998;Bd 79:F223–F226.
5. Robinson WP, Bernard L, *et al.* Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. Am J Hum Genet 1997;60:917–27.
6. Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. Prenat Diagn 1996;16:511–24.

3 Partie II: Intérêt de l'estimation de la longueur télomérique placentaire en cas de RCIU

3.1 Résumé

Objectif : Des études récentes ont montré que la longueur télomérique était significativement réduite au niveau de placentas collectés aux termes de grossesses compliquées d'un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire. La longueur télomérique placentaire au cours des grossesses présentant un RCIU n'a jamais été estimée. Ceci constituait l'objectif primaire de cette étude.

Matériel et méthodes : Dans notre centre de Médecine Fœtale, des biopsies de villosités placentaires ont été effectuées chez 24 patientes présentant un RCIU sévère *a priori* secondaire à une insuffisance placentaire (cas) et chez 28 patientes ayant bénéficié d'un diagnostic prénatal par placentocentèse pour d'autres indications (population contrôle). Les biopsies placentaires ont été réalisées entre la 17ème et la 37ème semaine d'aménorrhée pour les cas et la population contrôle. Des examens cytogénétiques (technique rapide de FISH ciblant les principales aneuploïdies et caryotype conventionnel de l'axe mésenchymateux des villosités) et un examen histo-pathologique à la recherche d'arguments en faveur d'un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire ont été réalisés au niveau des villosités placentaires dans le cadre du soin courant des patientes. Pour cette étude, une estimation relative de la longueur télomérique placentaire a été obtenue à l'aide d'une technique de FISH quantitative (Q-FISH) utilisant des sondes télomériques de type *Peptide Nucleic Acid* (PNA) et un microscope automatisé. Une technique de Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) quantitative (Q-PCR) a été effectuée afin de confirmer les résultats obtenus avec la technique de Q-FISH. Le nombre de copies des loci portant les gènes codant le fragment d'ARN matrice (*hTERC*) et la sous-unité catalytique (*hTERT*) nécessaires au complexe enzymatique télomérase a en outre été évalué au niveau des biopsies placentaires par une technique de FISH. Une comparaison du nombre de noyaux interphasiques placentaires présentant un profil d'hybridation pouvant faire discuter la présence d'agrégats télomériques a également été effectuée chez les cas et la population contrôle.

Résultats : Il n'existait pas de différence statistiquement significative des termes de réalisation des biopsies placentaires entre les cas et la population contrôle (termes moyens : 29 semaines

d'aménorrhée + 5 jours pour les cas et 27 semaine d'aménorrhée + 6 jours pour la population contrôle, p = NS). Aucune anomalie cytogénétique n'avait été mise en évidence avec la technique de FISH ciblant les principales aneuploïdies et au caryotype conventionnel chez l'ensemble des patientes de l'étude. L'examen histo-pathologique des villosités placentaires des patientes avec un RCIU sévère avait montré des altérations morphologiques compatibles avec un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire pour 21 des 24 placentas examinés (21/24 = 87,5%). L'intensité de fluorescence télomérique des sondes PNA mesurée avec la technique de Q-FISH était significativement plus faible chez les cas avec RCIU que chez la population contrôle (p < 0,001). Le ratio T/S moyen mesuré avec la technique de Q-PCR était significativement plus faible chez les cas avec RCIU que chez la population contrôle (p < 0,001). Ces résultats indiquaient que la longueur télomérique était significativement réduite au niveau placentaire au cours des grossesses compliquées d'un RCIU. Aucune influence du terme de la biopsie placentaire sur l'intensité de fluorescence télomérique n'avait été notée pour les cas et la population contrôle, suggérant que la longueur télomérique placentaire moyenne était déterminée précocement au cours de la grossesse. Aucune anomalie de nombre des loci portant *hTERC* et *hTERT* n'avait été identifié par FISH pour les cas et la population contrôle. Les noyaux interphasiques placentaires des cas et de la population contrôle ne présentaient pas d'agrégats télomériques.

Conclusion : Les résultats obtenus dans cette étude indiquent notamment que la longueur télomérique est réduite au niveau placentaire au cours des grossesses compliquées d'un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire.

Mots-clés : Retard de croissance intra-utérin ; insuffisance placentaire ; biopsie de villosités placentaires ; longueur télomérique ; *hTERC* ; *hTERT* ; agrégats télomériques

3.2 Introduction

3.2.1 Les télomères

3.2.1.1 Structure

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques situées à la partie terminale des chromosomes. Plus précisément, ces structures sont constituées chez les mammifères d'une séquence répétitive d'hexamères TTAGGG associée à des protéines spécifiques du complexe

shelterin (Figure 8) (O'Sullivan *et al.*, 2004 ; Houben *et al.*, 2008 ; Diotti et Loayza, 2011 ; Zhu *et al.*, 2011 ; Stewart *et al.*, 2012).

Chez l'homme, la séquence nucléotidique répétitive télomérique TTAGGG est organisée selon une structure double brin mesurant de 2 à 20 kb et selon une structure simple brin terminale mesurant de 50 à 500 nucléotides (de Lange, 2005). La longueur télomérique a été évaluée dans différents tissus et il a été observé que cette longueur télomérique moyenne varie d'un tissu à un autre (Houben *et al.*, 2008). En outre, pour un type cellulaire donné, cette longueur télomérique moyenne varie également entre les cellules et, au sein de la même cellule, la longueur des télomères peut différer entre deux chromosomes (de Lange, 2005).

La séquence nucléotidique des télomères est protégée par un complexe multi-protéique spécialisé disposant de protéines aptes à reconnaître les séquences d'ADN télomérique double et simple brins, le complexe shelterin. Ce complexe protéique est composé des six protéines suivantes: TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 et RAP1 (Figure 8) (de Lange, 2005 ; Stewart *et al.*, 2012). TRF1 et TRF2 sont des homodimères issus de deux gènes paralogues et ces protéines se lient avec une forte affinité à la séquence nucléotidique double brin des télomères (de Lange, 2005). TIN2 a quant à elle la capacité de se lier à la fois à TRF1 et à TRF2 et, par conséquent, de réaliser un pont entre ces deux protéines. TPP1 est ensuite recrutée par TIN2, puis TPP1 recrute à son tour POT1. Cette dernière protéine a la capacité de se lier à l'extrémité 3' libre des séquences télomériques. Enfin, RAP1 est retrouvée au sein du complexe shelterin associée à TRF2.

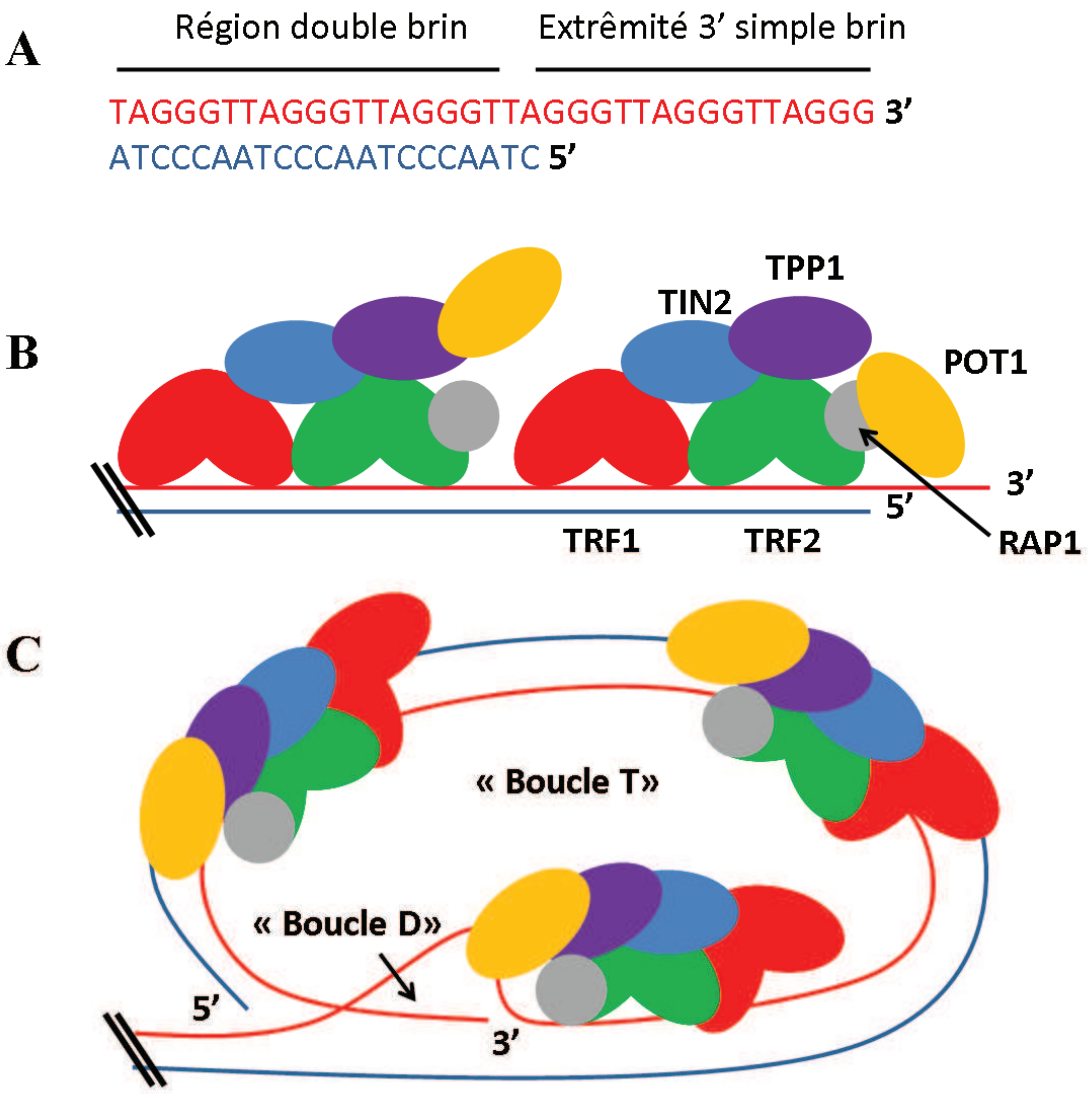


Figure 8. Structure des télomères. A. ADN télomérique constitué d'une séquence répétitive d'héxamères TTAGGG organisée sous forme double brin et sous forme simple brin à l'extrémité 3' terminale. B. Le complexe protéique shelterin se lie à la fois aux séquences d'ADN télomérique double brin et simple brin grâce à des interactions protéines-ADN spécifiques. C. Formation de la « boucle T » nécessitant l'insertion de l'extrémité simple brin au niveau de la séquence double brin et créant la « boucle D » au niveau de la séquence double brin déplacée (d'après Stewart *et al.*, 2012).

L'extrémité 3' simple brin peut venir s'associer avec des séquences télomériques de la région nucléotidique double brin et ainsi former une « boucle télomérique », également dénommée « boucle D » (Figure 8) (Stewart *et al.*, 2012). La formation de cette « boucle D » a pour conséquence le déplacement d'une partie de la séquence télomérique double brin et la formation d'une large « boucle de déplacement », la « boucle T ». Les « boucles D » et les

« boucles T » ont été objectivées par des techniques de microscopie électronique, mais il est actuellement difficile de savoir si ces structures sont présentes au niveau de toutes les séquences télomériques (Nikitina et Woodcock, 2004 ; Stewart *et al.*, 2012).

3.2.1.2 Fonction

Les télomères peuvent en quelque sorte être considérés comme des « capuchons de protection » placés à l'extrémité des chromosomes (Stewart *et al.*, 2012). En 1939, il avait été noté par Barbara McClintock que les chromosomes du maïs étaient sensibles aux radiations, ce qui avait pour effet d'entrainer des cassures double brin de l'ADN et d'engendrer des recombinaisons illégitimes entre les chromosomes (McClintock, 1939). Ce phénomène intéressait l'immense majorité des segments chromosomiques, mais Barbara McClintock avait observé que ces recombinaisons se produisaient à une fréquence bien moindre au niveau des extrémités des chromosomes. A l'époque, elle avait déjà suggéré que les extrémités chromosomiques devaient être protégées, car ces extrémités devaient jouer un rôle majeur dans la stabilité du génome.

Du point de vue moléculaire, il a aujourd'hui été démontré que les protéines du complexe shelterin et la « boucle D » empêchent en pratique aux extrémités télomériques d'être reconnues comme des cassures double-brin de l'ADN. Lorsqu'elles sont repérées, ces cassures peuvent notamment permettre de recruter des protéines impliquées dans les voies de signalisation d'ATM et d'ATR et ainsi entraîner un arrêt du cycle cellulaire et une entrée de la cellule en apoptose (Meulmeester *et al.*, 2005 ; Thanasoula *et al.*, 2012). A ce titre, les télomères permettent ainsi de protéger la cellule de phénomènes de dégradation.

Par ailleurs, les protéines télomériques du complexe shelterin évitent aux extrémités chromosomiques de fusionner entre elles par un mécanisme de ligature non homologue des extrémités d'ADN (mécanisme de « *Non-Homologous End-Joining* ») (O'Sullivan et Karlseder, 2010).

3.2.1.3 Longueur télomérique et complexe enzymatique télomérase

Le vieillissement physiologique des cellules somatiques engendre une diminution progressive de la longueur de leurs télomères du fait, d'une part, de l'incapacité de l'ADN polymérase à répliquer complètement l'extrémité 5' télomérique au cours de la division mitotique (Gilson et

Géli, 2007). Ainsi, l'amorce ARN du dernier fragment d'Okazaki est éliminée, mais la séquence correspondante d'ADN ne peut être répliquée du fait de l'absence d'activité ADN-polymérase dans le sens 3'→5'. D'autre part, le stress oxydatif participe également à l'érosion progressive de la longueur des séquences télomériques (von Zglinicki, 2002). Les cellules somatiques humaines ne disposent généralement pas de mécanismes capables de compenser cette perte de longueur télomérique. *In fine* une longueur télomérique réduite déclenche un arrêt de la division mitotique, ce processus définit la sénescence réplicative (Houben *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2011). Cette capacité des télomères à limiter la prolifération cellulaire peut être considérée comme un mécanisme protecteur de type suppresseur de tumeur (Artandi et DePinho, 2010).

Cependant, dans certaines circonstances, telles que l'embryogenèse ou la prolifération des cellules souches, les cellules doivent être capables de pouvoir se diviser sans la contrainte d'un raccourcissement télomérique progressif (Stewart *et al.*, 2012). La longueur télomérique est alors maintenue grâce à un complexe enzymatique disposant d'une activité transcriptase inverse spécialisée, la télomérase (Nicholls *et al.*, 2011). Cette enzyme est capable d'ajouter des séquences d'ADN télomérique spécifiques à l'extrémité chromosomique afin de compenser la perte des séquences survenue au cours de la réplication de l'ADN.

La télomérase est notamment constituée d'une sous-unité catalytique TERT, codée par *hTERT* (porté par le locus 5p15.33), et d'un fragment d'ARN matrice TERC, codé par *hTERC* (porté par le locus 3q26.2) (Figure 9) (Artandi et DePinho, 2010). Le complexe télomérase est également composé de la dyskérine, une protéine cruciale pour le bon assemblage du complexe. La dyskérine est en outre associée à trois petites protéines : NHP2, NOP10 et GAR10. Enfin, TCAB1 reconnait l'extrémité 3' de TERC et permet notamment de localiser le complexe télomérase au niveau nucléaire.

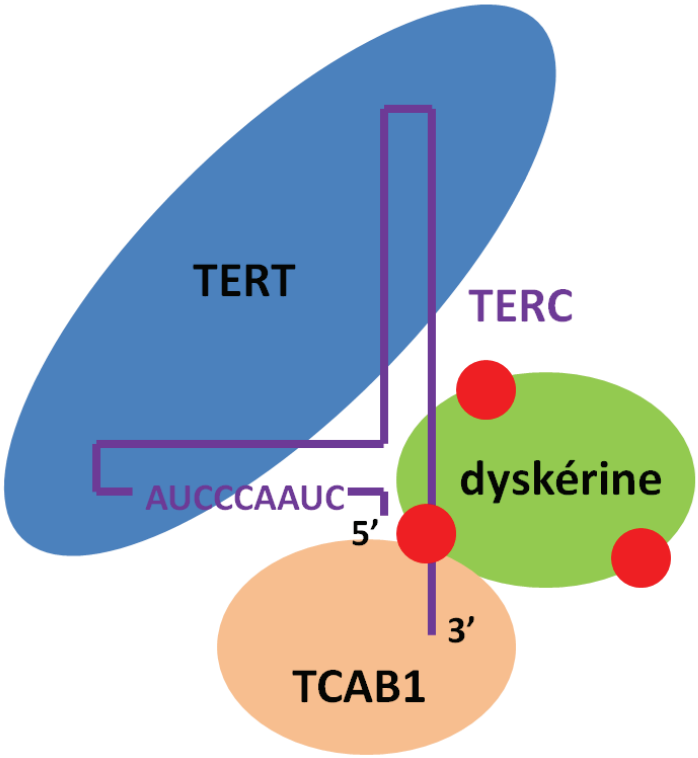


Figure 9. Le complexe télomérase. La télomérase est une réverse transcriptase qui a la capacité d’ajouter des répétions télomériques à l’extrémité des chromosomes. La sous-unité catalytique est représentée par TERT et la matrice d’ARN par TERC. La dyskérine est une protéine cruciale au bon assemblage du complexe télomérase. Elle est associée à trois petites protéines : NHP2, NOP10 et GAR10, représentées ici sous forme de cercles rouges. TCAB1 reconnait l’extrémité 3’ de TERC et interagit avec la dyskérine (d’après Artandi et DePinho, 2010).

Il est à noter que le complexe télomérase est actif dans la majorité des cellules tumorales (Cesare et Reddel, 2010). Dans certaines conditions pathologiques tumorales, les télomères peuvent également être allongés par un mécanisme de recombinaison homologue indépendant du complexe télomérase, ce mécanisme est connu sous l’acronyme ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) (Cesare et Reddel, 2010).

3.2.1.4 Agrégats télomériques

Les récents progrès de l’imagerie 3-Dimension (3D) du noyau interphasique ont autorisé l’analyse fine de l’organisation spatiale des télomères (Mai et Garini, 2006). Il a ainsi pu être montré que les télomères se répartissent de façon homogène dans le noyau interphasique des

cellules durant les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (Weierich *et al.*, 2003). De façon remarquable, la distribution nucléaire des télomères change lorsque la cellule s'engage en phase G2, les télomères s'alignent alors au niveau du centre du noyau et forment en quelque sorte un « disque télomérique » (Chuang *et al.*, 2004). Par ailleurs, les télomères dans le noyau ne se superposent pas les uns aux autres, chacun des télomères dispose d'un espace tridimensionnel l'entourant qui lui est propre (Chuang *et al.*, 2004).

Une différence importante de l'organisation télomérique entre les cellules normales et les cellules tumorales a pu être mise en évidence grâce à l'imagerie 3D. Il a en effet été identifié une sorte de signature télomérique des cellules tumorales (Chuang *et al.*, 2004). A l'inverse des cellules normales, pour lesquelles les télomères disposaient d'un espace tridimensionnel propre, les télomères des cellules tumorales ont tendance à s'agréger les uns aux autres et ainsi former des agrégats télomériques. Il est à noter que la formation de ces agrégats est indépendante de la longueur des télomères et de l'activité télomérase (Louis *et al.*, 2005). La présence d'agrégats télomériques dans certains types tumoraux participerait à la formation de réarrangements chromosomiques *via* des mécanismes de « *breakage/fusion/bridge* » (Mai et Garini, 2006).

3.2.2 Homéostasie de l'oxygène et télomères

Des facteurs environnementaux peuvent modifier la longueur des télomères. Parmi ces facteurs, il est dorénavant admis que le stress oxydatif induit une diminution significative de la longueur télomérique (von Zglinicki, 2002 ; Houben *et al.*, 2008 ; Menon *et al.*, 2012). Dans un premier temps, des modèles de culture cellulaire ont permis d'établir que la sénescence réplicative n'était pas uniquement induite par un raccourcissement télomérique consécutif aux divisions mitotiques successives (von Zglinicki, 2002). Puis il a été identifié que la sénescence réplicative pouvait être accélérée par un stress oxydatif chronique, ayant pour conséquence une accumulation de cassures simple brin télomériques, difficilement réparables par la cellule (Petersen *et al.*, 1998). Les cellules exposées un stress oxydatif ont ainsi, en moyenne, des télomères plus courts que des cellules placées en normoxie (von Zglinicki, 2002). Il a donc été suggéré d'utiliser la mesure de la longueur télomérique comme marqueur biologique des tissus subissant un stress oxydatif.

Par ailleurs, il a été montré que l'hypoxie était à l'origine dans certains tissus, comme le placenta, d'une surexpression de la sous-unité catalytique TERT de l'enzyme télomérase *via* l'induction du facteur de transcription HIF1α (Nishi *et al.*, 2004). Dans ces cellules, la surexpression de TERT va alors être à l'origine de l'existence d'une activité télomérase et, par conséquent, du maintien ou de l'allongement de la longueur des télomères.

3.2.3 Homéostasie de l'oxygène et RCIU

La physiopathologie des RCIU liés à une insuffisance placentaire est imparfaitement comprise, mais ces pathologies sont habituellement la conséquence, comme indiqué dans l'introduction de ce travail, d'un défaut d'invasion des artères spiralées par les cellules du trophoblaste extra-villeux. L'absence de remodelage adéquat des artères spiralées permet alors à ces artères de maintenir tout ou partie de leur capacité de vasoconstriction (Brosens *et al.*, 2002). Ceci a pour conséquence une ischémie-reperfusion de la chambre intervilleuse, avec *in fine* une hypoperfusion locale (Miller *et al.*, 2008 ; Tsatsaris *et al.*, 2008 ; Tuuli *et al.*, 2011). Intuitivement, on pourrait s'attendre à ce que cette hypoperfusion de la chambre intervilleuse entraîne une hypoxie locale (Biron-Shental *et al.*, 2010). Les études menées sur le sujet nous indiquent toutefois que l'ischémie-reperfusion engendrerait un stress oxydatif au niveau de la chambre intervilleuse (Takagi *et al.*, 2004 ; Burton *et al.*, 2009 ; Tuuli *et al.*, 2011). Ce stress oxydatif pourrait ainsi théoriquement favoriser un raccourcissement télomérique des villosités placentaires.

3.2.4 Longueur télomérique placentaire et RCIU

Sur la base de ces éléments, deux études se sont récemment intéressées à la mesure de la longueur des télomères au niveau de placentas à terme de grossesses présentant un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire (Davy *et al.*, 2009 ; Biron-Shental *et al.*, 2010). De façon intéressante, les auteurs de ces études ont pu mettre en évidence que la longueur télomérique était significativement diminuée au niveau des placentas à terme des grossesses présentant ce type de RCIU.

Si la longueur télomérique a été mesurée au niveau de placentas à terme de grossesses présentant un RCIU, ce type d'étude n'a pas encore été réalisé sur des échantillons prélevés au cours de grossesses évolutives. L'objectif primaire de la deuxième partie de ce travail de thèse était ainsi de réaliser une estimation de la longueur des télomères au niveau placentaire

au cours de grossesses évolutives présentant un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire. Cette étude pourrait, d'une part, participer à la compréhension de la physiopathologie de ces RCIU et, d'autre part, permettre d'évaluer l'intérêt de la mesure de la longueur télomérique placentaire comme biomarqueur de ces complications de la grossesse.

3.2.5 Réarrangements affectant les loci des gènes codant pour les principales sous-unités de la télomérase au niveau placentaire

Par ailleurs, Biron-Shental *et al.* avaient identifié qu'au niveau des placentas à terme de grossesses présentant un RCIU, il n'existait pas d'anomalie du nombre de copies du locus portant *hTERC*, alors qu'un gain de ce locus était observé chez les placentas contrôles (Biron-Shental *et al.*, 2011). Ce résultat inattendu, obtenu à partir d'un faible échantillonnage (cinq placentas à terme de patientes avec RCIU et cinq placentas à terme de patientes contrôle), pourrait en partie expliquer la difficulté des cellules trophoblastiques à maintenir une longueur télomérique adéquate en cas de RCIU.

Le nombre de copies des loci portant les gènes codant pour le fragment d'ARN matrice (*hTERC*) et pour la sous-unité catalytique (*hTERT*) de l'enzyme télomérase mériterait donc d'être évalué au niveau placentaire à partir d'un échantillonnage significatif afin d'avancer dans la compréhension de la physiopathologie des RCIU. L'étude du nombre de copies des loci portant *hTERC* et *hTERT* constituait l'objectif secondaire de ce travail.

3.2.6 Agrégats télomériques placentaires et RCIU

L'étude de Biron-Shental *et al.* publiée en 2010 avait, d'une part, permis de confirmer le raccourcissement télomérique placentaire décrit initialement par Davy *et al.*, et d'autre part, avait recherché la présence d'agrégats télomériques au niveau placentaire (Davy *et al.*, 2009 ; Biron-Shental *et al.*, 2010).

Biron-Shental *et al.* avaient dans un premier temps étudié la longueur télomérique par une technique de FISH appliquée à des noyaux interphasiques de coupes de villosités placentaires fixées par le formol, ce qui leur avait permis d'évaluer ensuite la présence d'agrégats télomériques au niveau de ces préparations avec une technique de microscopie 2-dimension (2D). Biron-Shental *et al.* avaient identifié un pourcentage significativement plus important de noyaux interphasiques présentant des agrégats télomériques chez les patientes présentant

une prééclampsie associée ou non à un RCIU (agrégats télomériques présents dans environ de 10% des noyaux interphasiques examinés) que chez les patientes présentant un RCIU isolé (3,50% des noyaux avec agrégats télomériques) et chez les patientes de la population contrôle (1,60% des noyaux avec agrégats télomériques). Dans cette étude, il n'existait pas de différence statistiquement significative du pourcentage de noyaux avec des agrégats télomériques entre les patientes présentant un RCIU isolé et les patientes de la population contrôle. Les auteurs avaient alors conclu que ces agrégats télomériques pourraient être une caractéristique chromosomique des cellules placentaires en cas de prééclampsie.

Bien que notre étude s'intéresse aux patientes présentant un RCIU sévère et n'inclut pas spécifiquement des patientes présentant des signes clinico-biologiques de prééclampsie, nous avons souhaité recenser la survenue de ces signes clinico-biologiques chez ces patientes et évaluer la présence d'agrégats télomériques au niveau placentaire, avec une technique de microscopie 2D comparable à celle utilisée par Biron-Shental *et al.*. L'évaluation de ces agrégats télomériques constituait le troisième objectif de notre étude.

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Cas et population contrôle

Cette étude préliminaire monocentrique prospective a été effectuée entre novembre 2010 et janvier 2012. Cinquante-deux patientes enceintes entre 17 semaines d'aménorrhée + 6 jours et 37 semaines d'aménorrhée + 2 jours et chez lesquelles un diagnostic prénatal invasif était indiqué ont été incluses dans cette étude. Parmi ces patientes, 24 présentaient un RCIU sévère (*i.e.* RCIU avec des biométries fœtales inférieures au 3ème percentile, en l'absence d'anomalie chromosomique identifiée au caryotype conventionnel, d'infection virale (en particulier absence d'infection au cytomégalovirus), de malformation congénitale ou de tabagisme maternel) (cas). Vingt-huit patientes constituaient la population contrôle de cette étude (*i.e.* patientes ne présentant pas de RCIU et chez lesquelles un diagnostic prénatal invasif avait été effectué pour un âge maternel avancé, des facteurs sériques maternels du 2ème trimestre plaçant la femme dans un groupe à risque d'attendre un enfant à naître atteint de trisomie 21, un antécédent d'anomalie chromosomique ou génique, ou la présence d'une anomalie échographique isolée, en l'absence d'anomalie chromosomique identifiée au caryotype conventionnel) (contrôles).

Les critères suivants ont été recensés : âge maternel, âge gestationnel, nombre de grossesses, nombre d'enfants, poids et terme de naissance, ainsi que la survenue de signes clinico-biologiques de prééclampsie au cours de la grossesse. Une prééclampsie était déclarée lorsque une hypertension artérielle (pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg et diastolique supérieure à 90 mmHg) était associée à une protéinurie (supérieure à 300 mg par 24 heures) (Backes *et al.*, 2011).

3.3.2 Biopsies de villosités placentaires

Les 52 patientes de cette étude se sont vues proposer un diagnostic prénatal par placentocentèse. Les ponctions de villosités placentaires ont été effectuées par des praticiens expérimentés de notre centre de Médecine Fœtale par voie trans-abdominale, en extra-amniotique (Saura *et al.*, 2010b). Bien que l'estimation du poids des villosités placentaires prélevées soit arbitraire, la quantité prélevée de villosités pouvait être considérée comme supérieure à 25 mg pour chacune des biopsies pratiquées (Newport *et al.*, 1986).

Les prélèvements de villosités placentaires ont ensuite été fractionnés afin de réaliser (Figure 10):

- une recherche rapide des principales aneuploïdies par une technique de FISH,
- l'établissement du caryotype conventionnel des cellules composant l'axe mésenchymateux des villosités,
- un examen histo-pathologique (pour les patientes présentant un RCIU sévère),
- une estimation de la longueur placentaire par une technique de Q-FISH, une étude des loci portant *hTERC* et *hTERT* et une évaluation des agrégats télomériques placentaires,
- et une estimation de la longueur télomérique placentaire par une technique de Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) quantitative (Q-PCR) afin de confirmer les résultats obtenus avec la technique de Q-FISH.

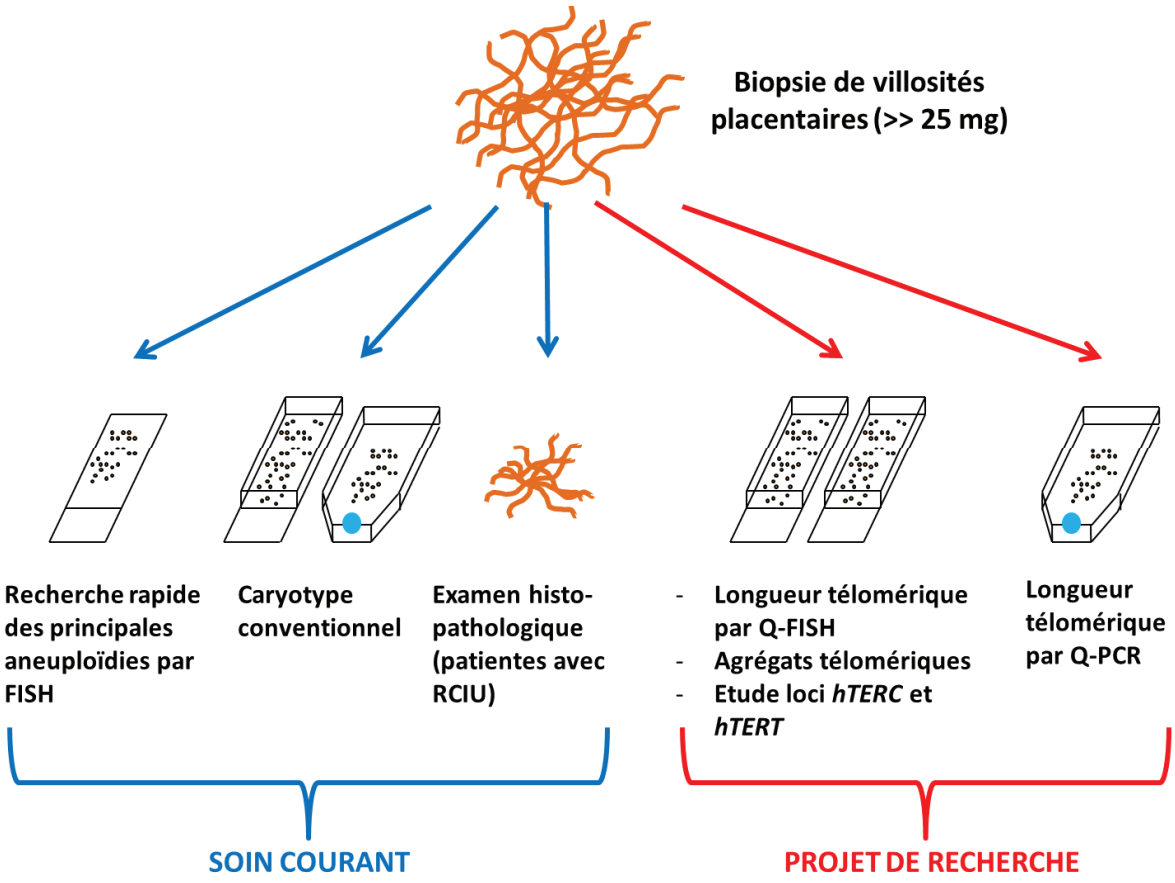


Figure 10. Procédure de réalisation des examens biologiques à partir des biopsies de villosités placentaires (soin courant et projet de recherche « longueur télomérique placentaire »). Une partie des villosités placentaires est utilisée dans le soin courant des patientes (gauche), l'autre partie des villosités est utilisée afin de répondre aux objectifs du projet de recherche (droite).

3.3.3 Examens cytogénétiques de l'axe mésenchymateux des villosités placentaires

3.3.3.1 Technique moléculaire rapide d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Pour chacune des biopsies placentaires, un examen cytogénétique rapide à la recherche des principales aneuploïdies (*i.e.* anomalies chromosomiques affectant les chromosomes 13, 18, 21 et les gonosomes) a été effectué par une technique de FISH (Abbott Molecular, Rungis, France). Dans un souci de fiabilité du résultat cytogénétique, cette technique de FISH a été réalisée au niveau des cellules composant l'axe mésenchymateux des villosités placentaires (Toutain *et al.*, 2011). A cet effet, les villosités placentaires ont été digérées par de la trypsine puis par de la collagénase (paragraphe 2.3.3.1 de ce manuscrit) (Kooper et al., 2009 ; Toutain *et al.*, 2010a).

3.3.3.2 Caryotype conventionnel

Le caryotype conventionnel a ensuite été établi après culture des villosités placentaires au niveau de 2 à 4 lames de type Labtek^{TM} disposant d'une chambre de culture (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) et dans un flacon standard de culture cellulaire 25 cm² Falcon^{TM} (Becton Dickinson France SAS, Le Pont-De-Claix, France) (paragraphe 2.3.3.1 de ce manuscrit). Après quelques jours de culture (en moyenne 7 jours), les préparations métaphasiques ont été dénaturées par la chaleur et colorées par le Giemsa (*i.e.* obtention du caryotype conventionnel avec un marquage des chromosomes en « bandes R ») (paragraphe 2.3.3.3 de ce manuscrit).

3.3.4 Examen histo-pathologique des villosités placentaires

Un examen histo-pathologique des villosités placentaires a été effectué chez les patientes présentant un RCIU sévère après fixation par du formol tamponné et inclusion en paraffine des villosités placentaires non lavées et non triées. Des coupes de ces préparations ont alors été colorées par un mélange trichromique d'hématoxyline, d'éosine et de safran. L'observation sous microscope optique a permis de rechercher les principales caractéristiques histo-pathologiques associées aux RCIU secondaires à une insuffisance placentaire, notamment :

- Un diamètre des villosités de taille réduite,
- Des amas nucléaires périvillositaires (*i.e.* présence de nœuds syncitiaux),
- Et la présence de dépôts de fibrine dans la chambre intervilleuse (Roberts et Post, 2008 ; Carles *et al.*, 2009 ; Tomas *et al.*, 2010 ; Vedmedovska *et al.*, 2011).

La Figure 11 illustre ces principales caractéristiques histo-pathologiques retrouvées au niveau placentaire en cas de RCIU secondaire à une insuffisance placentaire.

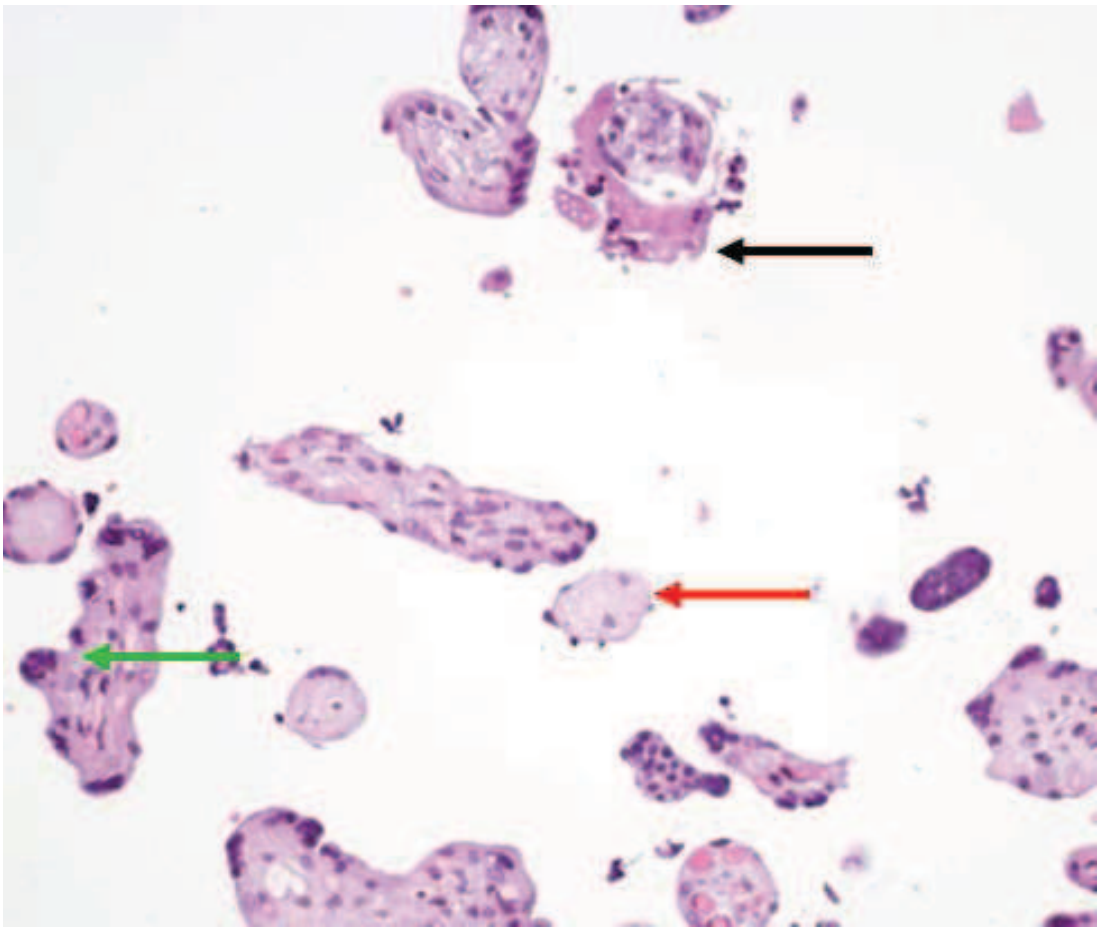


Figure 11. Examen histo-pathologique des villosités placentaires. Microphotographie illustrant les principales caractéristiques histo-pathologiques observées au niveau de villosités placentaires chez une patiente présentant un retard de croissance intra-utérin secondaire à une insuffisance placentaire (coloration trichromique à l'hématoxyline, l'éosine et au safran, grossissement x400). La flèche noire indique un dépôt de fibrine, la flèche rouge indique une villosité placentaire de diamètre réduit et la flèche verte indique un amas nucléaire périvillositaire (nœud syncitial).

3.3.5 Consentement des patientes à la participation à cette étude

Les examens cytogénétiques et histo-pathologiques décrits précédemment ont été effectués dans le cadre du soin courant des patientes de notre centre de Médecine Fœtale.

Afin de répondre aux trois objectifs de notre projet de recherche (estimation de la longueur télomérique, étude des loci portant *hTERC* et *hTERT* et évaluation des agrégats télomériques au niveau placentaire), nous avons eu besoin de mettre en culture des villosités placentaires non utilisées pour le soin courant des patientes (Figure 10). Notre projet s'intégrait donc dans le cadre de la recherche biomédicale non interventionnelle réalisée à partir de reliquats

d'échantillons biologiques effectués dans le cadre du soin courant. Une information aux patientes et le recueil oral de leur non-opposition étaient ainsi nécessaires préalablement à la réalisation de ce projet de recherche. Nous avons donc informé les patientes de l'utilisation possible, pour ce projet, des reliquats des villosités placentaires prélevées.

3.3.6 Estimation de la longueur télomérique placentaire par une technique de FISH quantitative (Q-FISH)

Les villosités placentaires excédentaires ont dans un premier temps été utilisées afin d'estimer la longueur télomérique placentaire par une technique de Q-FISH.

3.3.6.1 Principe de la technique de Q-FISH

La technique de Q-FISH présentée dans ce travail reposait sur l'utilisation de sondes télomériques fluorescentes de type PNA dont la fluorescence a été acquise et mesurée de façon automatique à l'aide d'une caméra et d'un logiciel spécifique. Les PNA sont des molécules synthétiques, analogues des acides nucléiques, mais dont le squelette phosphatidique a été remplacé par une structure pseudopeptidique (Pellestor *et al.*, 2008). La charge négative portée au niveau du squelette phosphatidique des acides nucléiques est absente de la structure des PNA. Il n'existe donc pas de phénomènes de répulsion de type électrostatique entre les PNA et les acides nucléiques. Ainsi, les duplex PNA/acides nucléiques présentent une spécificité d'appariement et de stabilité supérieures à celles des duplex d'acides nucléiques.

En pratique, une partie des villosités placentaires excédentaires a été mise en culture au niveau de deux lames Labtek^{TM} (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France), selon le protocole habituel effectué afin d'établir le caryotype conventionnel après culture (Figure 10 et paragraphe 2.3.3.1). Après quelques jours de culture, les cellules ont été fixées par un mélange Carnoy (acide acétique et méthanol (2:3 v/v) (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)), puis les lames ont été stockées à -20°C dans l'attente de la réalisation de la technique de Q-FISH proprement dite. Les lames ont alors été prétraitées à l'aide du kit Telomere PNA FISH Dako (Dako France SAS, Trappes, France). Les lames ont ainsi été successivement placées dans une solution de Tris Buffer Saline (TBS) 1X pendant 2 minutes, dans une solution de formaldéhyde à 3,70% pendant 2 minutes, dans une solution de TBS 1X pendant 10 minutes, dans une solution de protéinase K pendant 10 minutes, puis dans

une solution de TBS 1X pendant 10 minutes (Dako France SAS, Trappes, France). Les acides nucléiques ont ensuite été dénaturés pendant 3 minutes dans une solution de formamide concentrée à 70% et chauffée à 71°C dans un bain-marie thermostaté. Parallèlement, des sondes fluorescentes de type PNA ciblant les séquences télomériques et marquées en Cyanine 5 (Panagene, Daejeon, Corée du Sud) ont été dénaturées pendant 5 minutes dans un bain-marie porté à 81°C. Les sondes dénaturées ont alors été déposées sur les lames Labtek^{TM}, puis l'ensemble a été placé pendant 1 heure et 30 minutes dans une enceinte thermostatée Hybrite (Abbott Molecular, Rungis, France) portée à 30°C afin de réaliser l'hybridation des sondes télomériques sur les acides nucléiques. Après lavage des hybrides non spécifiques avec des solutions de citrate de sodium salin (solutions de SSC), les acides nucléiques ont été contre-colorés par du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Etats-Unis).

Les lames ont alors été placées au niveau d'un microscope Axio Imager 2 disposant d'une source à épi-fluorescence (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Allemagne) et d'une caméra monochrome haute résolution CoolCube 1m (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Allemagne). Ce microscope était relié au logiciel Metafer4 qui permettait de réaliser une automatisation des acquisitions et un traitement informatique des images obtenues (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Allemagne).

3.3.6.2 Mise au point et évaluation des caractéristiques de la technique de Q-FISH

Dans un premier temps, le logiciel avait été programmé afin de repérer les objets d'intérêt, ici des noyaux interphasiques marqués au DAPI bien individualisés les uns des autres. Une surface nucléaire minimale (100 µm²) et maximale (400 µm²) étaient indiquées à l'appareil. De même, une tolérance de la forme des noyaux interphasiques était renseignée à l'aide du paramètre « concavité ». L'acquisition de la fluorescence des sondes PNA télomérique a été réalisée à l'aide d'un objectif à immersion 63x. Dans un premier temps, l'acquisition de la fluorescence a été effectuée de façon automatique par la caméra, puis pendant un temps fixé à 0,40 secondes pour tous les noyaux. Le microscope automatisé était programmé pour acquérir 1000 noyaux interphasiques correctement hybridés. Pour chacun de ces noyaux, la surface nucléaire et l'intensité de fluorescence télomérique totale étaient notamment recensées. Cette technique de Q-FISH nous permettait ainsi d'obtenir l'intensité de fluorescence télomérique totale de chacun des noyaux capturés par la caméra. La moyenne arithmétique de ces

intensités de fluorescence télomérique a ensuite été retenue pour chacune des préparations. Plus l'intensité moyenne de fluorescence télomérique était élevée, plus la longueur télomérique était supposée être importante.

Différentes caractéristiques de la technique de Q-FISH ont ensuite été évaluées, notamment :

- l'influence de la surface nucléaire moyenne sur l'intensité moyenne de fluorescence télomérique,
- le mode de distribution des intensités de fluorescence télomérique,
- l'influence du temps d'acquisition de l'intensité de fluorescence télomérique des noyaux interphasiques sur l'intensité de fluorescence télomérique moyenne (temps d'acquisition automatiquement défini par l'appareil ou temps d'acquisition fixé à 0,40 secondes pour chacun des noyaux),
- et la reproductibilité de l'acquisition des intensités de fluorescence des sondes télomériques par l'appareil et la stabilité de cette fluorescence, en mesurant les intensités de fluorescence d'une même lame 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 et 14 jours après l'hybridation des sondes télomériques.

3.3.7 Estimation de la longueur télomérique placentaire par une technique de Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative (Q-PCR)

L'autre partie des villosités placentaires en excès a été mise en culture dans un flacon standard de culture cellulaire 25 cm² Falcon™ (Becton Dickinson France SAS, Le Pont-De-Claix, France) (Figure 10). Après quelques jours, les cultures cellulaires à confluence ont été décollées par l'ajout de trypsine puis les culots cellulaires ont été conservés à -20°C dans une solution de RPMI (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France), dans l'attente de l'extraction de l'ADN cellulaire.

3.3.7.1 Extraction de l'ADN cellulaire

L'ADN a été extrait selon une méthode saline, comme décrit précédemment (Prochazkova *et al.*, 2007). Les culots cellulaires ont dans un premier temps été lavés par 1 ml d'une solution stérile de PBS 1X (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France). A cet effet, les cellules ont été remises en solution dans du PBS puis centrifugées à 1300 g (g : force relative de centrifugation) pendant 10 minutes à 4°C. Cette étape a été renouvelée une fois. Le surnageant a ensuite été retiré, puis 350 µl d'une solution de NP40 à 0,10% (Sigma-Aldrich

Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) ont été ajoutés aux culots cellulaires afin de réaliser une première lyse membranaire. Après une douce agitation au Vortex, les tubes ont été centrifugés à 13000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été retiré, puis 150 µl d'une solution de *Nuclei Lysis Buffer* (constituée de NaCl, de Tris HCL, d'EDTA et de SDS (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France)), 45 µl d'une solution de SDS à 10% et 150 µl d'une solution de protéinase K (constituée de 80 µl d'une solution de protéinase K à 25 mg/ml (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) et de 920 µl d'une solution d'EDTA à 2 mM/SDS 1 %) ont été ajoutés aux culots de noyaux cellulaires afin de fragiliser les membranes nucléaires. Les tubes ont alors été recouverts de Parafilm® (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) puis déposés pendant toute une nuit sur un portoir flottant dans un bain-marie réglé à 42°C sous agitation contrôlée. Le lendemain matin, 200 µl d'une solution d'acétate d'ammonium ont été ajoutés afin de réaliser une précipitation des protéines, puis les tubes ont été agités au Vortex pendant 15 secondes. Après 15 minutes de temps de contact des cellules avec la solution d'acétate d'ammonium, les tubes ont été centrifugés à 13000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants ont alors été récupérés puis centrifugés à nouveau. Cette étape a été renouvelée deux fois. A l'issue de ces centrifugations, les surnageants ont été récupérés, puis deux volumes (soit environ 800 µl) d'une solution d'éthanol absolu de qualité « biologie moléculaire » ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN cellulaire extrait. Les tubes ont alors été placés à -80°C pendant 4 heures, puis ont été centrifugés à 13000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les surnageants ont ensuite été enlevés, puis 500 µl d'une solution d'éthanol à 70° ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés par retournement, puis les ADN précipités ont été laissés en contact avec la solution d'éthanol pendant 15 minutes dans de la glace. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 13000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants ont été retirés, puis les ADN extraits ont été mis en suspension dans 80 µl d'une solution de TE 1X (Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l., Saint-Quentin Fallavier, France) et placés pendant 20 minutes au bain-marie réglé à 65°C, afin d'éliminer les DNases susceptibles d'hydrolyser l'ADN. La qualité (rapport entre l'absorbance à 260 nm et l'absorbance à 280 nm de la solution d'ADN cellulaire extraite) et la quantité de l'ADN extrait ont ensuite été évaluées à l'aide d'un NanoDrop™ ND-1000 (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). Les ADN extraits ont ensuite été conservés à -80°C dans l'attente d'une estimation de la longueur télomérique par une technique de Q-PCR.

3.3.7.2 Principe de la technique de Q-PCR

La longueur télomérique a été estimée à l'aide de la technique de Q-PCR adaptée de techniques décrites précédemment (Cawthon, 2002 ; Cawthon, 2009). Brièvement, cette technique de Q-PCR reposait sur l'utilisation d'une solution Brilliant III Ultra-Fast SYBR™ Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies France, Massy, France) et de deux couples d'amorces :

- séquences du couple d'amorces télomériques spécifiques (5'→3') :
    - « telg », sens :
      ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT,
    - « telc », anti-sens :
      TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA,
- séquences du couple d'amorces encadrant un gène de référence (ici *PSA*) (5'→3') :
    - sens : AGGCTGGGGCAGCATTGAAC,
    - anti-sens : CACCTTCTGAGGGTGAACTTG (EUROGENTEC France SAS, Angers, France)

Le mélange réactionnel pour chacun des tubes était le suivant :

- 23 µl de la solution Brilliant III Ultra-Fast SYBR™ Green QPCR Master Mix,
- 0,5 µl de la solution contenant les amorces sens à 10 µM,
- 0,5 µl de la solution contenant les amorces anti-sens à 10 µM,
- 1 µl de la solution d'ADN dilué à 100 ng/µl.

Pour chaque échantillon, deux tubes ont été préparés afin de réaliser une quantification des produits d'amplification en duplicatas. L'estimation de la longueur télomérique par la technique de Q-PCR a ensuite été effectuée à l'aide du système Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies France, Massy, France), selon les cycles de PCR décrits précédemment (Cawthon, 2002). Des mesures des « *Cycle Threshold* » (Ct) ont alors été obtenues en prenant en compte le cycle de PCR à partir duquel le niveau de fluorescence des produits d'amplification dépassait significativement celui du bruit de fond.

Pour chaque patient le rapport moyen (1/Efficacité «amorces télomériques »$^{Ct\ «\ tél\ »}$)/(1/Efficacité amorces PSA$^{Ct\ «\ PSA\ »}$) a ensuite été retenu et dénommé ici « ratio

Telomere-to-Single Copy Gene » (ratio T/S), comme décrit précédemment (Simon, 2003). Plus le ratio T/S était élevé, plus la longueur télomérique était supposée être importante.

3.3.7.3 Evaluation des caractéristiques de la technique de Q-PCR

Les caractéristiques de la technique de Q-PCR d'estimation de la longueur télomérique ont été évaluées, dans un premier temps, en réalisant une corrélation des ratios T/S des duplicatas, puis en comparant les résultats obtenus par les techniques de Q-PCR et de Q-FISH chez les 52 patientes de notre étude.

3.3.8 Etude des loci portant *hTERC* et *hTERT* au niveau placentaire à l'aide d'une technique de FISH

L'étude du nombre de copies des loci portant *hTERC* et *hTERT* a été réalisée à l'aide de techniques de FISH avec des sondes ciblant ces loci.

3.3.8.1 Choix des sondes d'intérêt

Des sondes de type *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) ciblant spécifiquement les loci portant *hTERC* et *hTERT* et des sondes contrôles ont été sélectionnées à l'aide de la base de données mise à disposition par le *UCSC Genome Bioinformatics Group* de l'Université de Californie (Santa Cruz, CA, Etats-Unis) (www.genome.ucsc.edu) et après une revue de la littérature scientifique effectuée à partir d'une consultation de la base PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

Les sondes BAC sélectionnées étaient les suivantes :

- sonde BAC ciblant les locus portant *hTERC* : RP11-816J6 (locus 3q26.2) (Yokoi *et al.*, 2003),
- sonde BAC contrôle pour RP11-816J6 : RP11-16N5 (locus 3q13.13),
- sonde BAC ciblant les locus portant *hTERT* : RP11-117B23 (locus 5p15.33) (Mendrzyk *et al.*, 2005),
- sonde BAC contrôle pour RP11-117B23 : RP11-19F12 (locus 5p13.1) (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France).

Les bactéries contenant les sondes BAC d'intérêt ont dans un premier été mises en culture, puis l'ADN des BAC a été extrait et marqué par des fluorochromes à l'aide d'une technique de *nick-translation*, comme décrit précédemment (Prochazkova, 2003).

3.3.8.2 Culture bactérienne

Les sondes BAC étaient insérées dans des vecteurs plasmidiques offrant une résistance au chloramphénicol au sein de bactéries transformées (ici *Escherichia coli*). L'étape préliminaire de culture visait à augmenter la quantité de sondes BAC et se réalisait en présence de l'antibiotique de sélection. Des cultures cellulaires successives ont été effectuées dans des boîtes de Petri contenant du milieu Luria Bertani (LB) Agar (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) placées à 37°C sous agitation pendant 5 à 8 heures. La phase exponentielle de croissance bactérienne était régulièrement contrôlée par la mesure de la densité optique au spectrophotomètre réglé à 600 nm. Une fois la phase exponentielle de croissance bactérienne atteinte, une partie des bactéries était à nouveau mise en culture dans du milieu LB-Agar. Les cultures bactériennes étaient ensuite centrifugées à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis l'ADN plasmidique a été extrait.

3.3.8.3 Extraction de l'ADN plasmidique

Les ADN plasmidiques ont été extraits à l'aide du kit QIAfilter Plasmid Maxi (QIAGEN S.A.S., Courtabœuf, France), selon le protocole recommandé par le fournisseur. Le culot bactérien a ainsi été remis en suspension dans 4 ml de tampon P1 (Tris-HCl à 50 mM, EDTA 10 mM, RNase A à 0,1 mg/ml), puis 4 ml de tampon P2 (NaOH à 200 mM, SDS 1%) ont été additionnés. Une incubation du mélange ainsi obtenu a été effectuée pendant 5 minutes à température ambiante afin de réaliser une lyse cellulaire. Afin de précipiter les protéines bactériennes, 4 ml d'un tampon P3 (acétate de potassium à 3 M) ont ensuite été ajoutés. Le mélange a alors été placé au niveau d'une colonne de purification de l'ADN plasmidique, puis l'ADN plasmidique a été élué grâce à une solution tampon spécifique. L'ADN plasmidique a ensuite été précipité par 3,50 ml d'isopropanol et le mélange a été centrifugé à 12000 g pendant 30 minutes à 4°C. La présence d'ADN a été contrôlée par une migration sur gel d'agarose à 0,8%, puis sa concentration a été estimée par une mesure de la densité optique au spectrophotomètre réglé à 600 nm. La concentration d'ADN a alors été ajustée, avec de l'eau distillée, à une concentration comprise entre 0,2 et 0,8 µg/µl.

3.3.8.4 Marquage des sondes d'intérêt par une technique de *nick-translation*

La technique de *nick-translation* est une technique enzymatique de marquage des acides nucléiques par des désoxyribonucléosides (dNTP) pouvant être révélés dans un second temps (marquage indirect) ou par des dNTP disposant d'un fluorochrome (marquage direct).

La technique de *nick-translation* reposait sur l'action conjuguée de deux enzymes : la DNase I et l'ADN polymérase I (kit de *nick-translation* (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France)). La réaction de *nick-translation* s'est déroulée pendant 2 heures à 15°C. La DNase I a réalisé dans un premier temps des coupures (de l'anglais *nick*, entaille) de l'ADN simple brin, coupures se produisant de façon aléatoire. Au niveau de ces coupures, l'ADN polymérase I a ensuite exercé son activité exonucléasique dans le sens 5'→3'. Puis la polymérase a synthétisé de façon partielle un nouveau brin complémentaire au brin intact dans le sens 5'→3' grâce à son activité polymérasique et à l'aide de dNTP dont l'un était marqué ici par un fluorochrome (Cyanine 3 deoxyuridine triphosphate (dUTP) ou Spectrum Green dUTP (Abbott Molecular, Rungis, France)). L'ADN polymérase I a finalement laissé des coupures à distance des sites de coupure initiaux, d'où la terminologie de « *nick-translation* » (déplacement de coupures).

Les ADN ont ensuite été précipités par de l'éthanol absolu, en présence d'ADN Cot-1 (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France). Le mélange a ensuite été lavé avec de l'éthanol à 70%, séché, puis resuspendu dans un tampon d'hybridation (formamide déionisée à 50%, sulfate de dextran à 10%, 2SSC).

3.3.8.5 Evaluation du nombre de copies des loci portant *hTERC* et *hTERT*

Les lames Labtek^{TM} ayant initialement servi à estimer la longueur télomérique par la technique de Q-FISH ont ensuite été utilisées afin d'évaluer le nombre de copies des loci d'intérêt. Douze lames Labtek^{TM} préparées chez les 24 cas présentant un RCIU et 12 lames Labtek^{TM} préparées chez les 28 contrôles de cette étude ont alors été tirées au sort.

Après dénaturation des acides nucléiques et des sondes BAC pendant 5 minutes dans une solution de formamide à 70% chauffée à 71°C, les différents mélanges de sondes BAC (« sonde locus *hTERC* + sonde témoin » ; « sonde locus *hTERT* + sonde témoin ») ont été hybridées à 37°C durant toute une nuit au niveau des 24 lames Labtek^{TM} sélectionnées, puis

un lavage des hybrides non spécifiques et une contre-coloration des acides nucléiques avec du DAPI ont été effectués. Le logiciel Metafer4 a été reprogrammé afin d'évaluer le nombre de signaux de chacune des sondes utilisées. Trois cents noyaux interphasiques correctement hybridés ont alors été sélectionnés par le microscope automatique. Au niveau de ces noyaux, le nombre de sondes d'intérêt et de sondes témoin a notamment permis d'estimer :

- le pourcentage de noyaux interphasiques présentant une absence de gain ou de perte des loci examinés (*i.e.* autant de signaux des sondes d'intérêt que de signaux des sondes témoin),
- le pourcentage de noyaux interphasiques présentant des pertes relatives du locus d'intérêt (par exemple deux signaux du locus d'intérêt et trois signaux du locus témoin),
- le pourcentage de noyaux interphasiques présentant des gains relatifs du locus d'intérêt (par exemple deux signaux du locus d'intérêt et un signal du locus témoin),
- et le pourcentage de noyaux interphasiques présentant des gains absolus du locus d'intérêt (*i.e.* trois signaux ou plus du locus d'intérêt et deux signaux du locus témoin).

3.3.9 Recherche d'agrégats télomériques au niveau placentaire

Le pourcentage de noyaux interphasiques placentaires présentant des d'agrégats télomériques a été évalué chez les 52 patientes de notre étude par une approche de microscopie 2D. A cet effet, les images enregistrées des noyaux interphasiques hybridés avec les sondes télomériques utilisées pour la technique de Q-FISH ont été rétrospectivement analysées. De façon arbitraire, nous avons choisi d'examiner les 200 premiers noyaux capturés par la caméra et avons dénombré, en aveugle, les noyaux présentant un profil d'hybridation analogue à celui rapporté par Biron-Shental *et al.* comme correspondant, en microscopie 2D, à la présence d'agrégats télomériques (Figure 12) (Biron-Shental *et al.*, 2010).

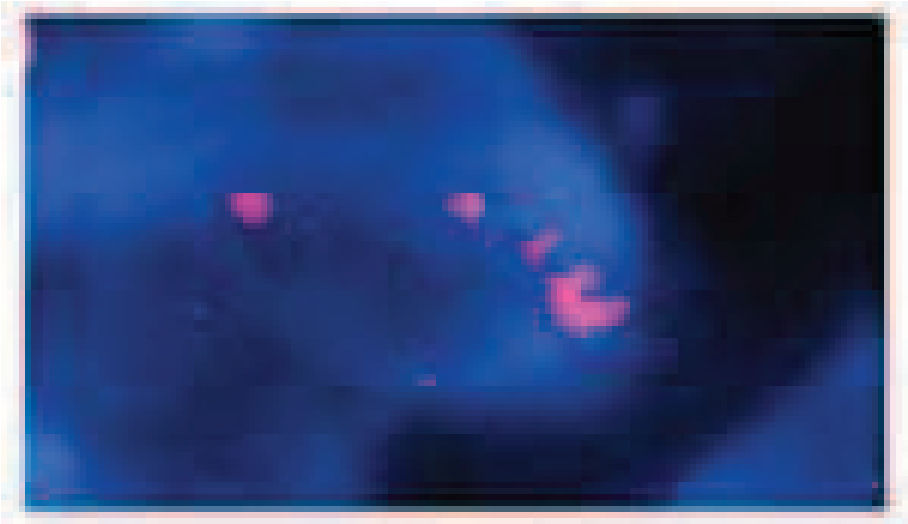


Figure 12. Agrégats télomériques (microscopie 2-Dimension). Microphotographie prise par Biron-Shental *et al.* qui illustre un noyau interphasique au niveau duquel des sondes FISH marquées en rouge ciblant les séquences télomériques s'agrègent et forment, pour les auteurs, des agrégats télomériques (Biron-Shental *et al.*, 2010).

3.3.10 Analyses statistiques

3.3.10.1 Calcul du nombre de sujets nécessaires

Le calcul du nombre de sujets à inclure afin de comparer la longueur télomérique placentaire entre les cas et les contrôles avec une puissance statistique de 80% au risque α de 5% a été réalisé à l'aide d'un utilitaire mis à disposition sur Internet (http://www.anastats.fr/stats/Telechargement.htm#puissance) (AnaStats, Rilly-Sur-Vienne, France) et sur la base des résultats obtenus par Davy *et al.* et de nos tests préliminaires (Davy *et al.*, 2009).

Davy *et al*. avaient observé une longueur télomérique diminuée d'environ 15% au niveau des placentas à terme des grossesses compliquées d'un RCIU, en comparaison avec des placentas prélevés à la naissance chez des témoins. Par ailleurs, nos tests préliminaires ont montré que la variabilité de la technique de Q-FISH était d'environ 20%.

Dans ces conditions, il était ainsi *a priori* nécessaire d'inclure 24 patientes dans chacun des groupes afin d'obtenir une puissance statistique de 80%. En cas d'absence de différence statistiquement significative entre les deux groupes de patientes, une puissance statistique de 90% serait recherchée, et nécessiterait alors d'inclure 32 patientes dans chacun des groupes.

3.3.10.2 Analyses univariées

L'évaluation de la normalité de la distribution des mesures observées avec les techniques de Q-FISH et de Q-PCR a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les analyses statistiques univariées des variables quantitatives ont été réalisées à l'aide des tests de Student, de Wilcoxon-Mann Whitney et de Pearson, selon le facteur d'étude et la variable de réponse étudiés. Le niveau de significativité des tests statistiques a été fixé à 5% et le logiciel STATA 8.0 (Integral Software, Paris, France) a été utilisé pour réaliser les analyses univariées.

3.3.10.3 Analyse multivariée

Afin de s'affranchir de l'influence de certaines covariables sur l'estimation de la longueur télomérique placentaire observée avec la technique de Q-FISH, une analyse multivariée, à l'aide d'une régression logistique, a été effectuée par l'équipe de Biostatistique INSERM U897 (ISPED, Université Bordeaux Segalen, France).

Les covariables prises en compte dans le modèle étaient : l'âge maternel, le nombre de grossesses, le nombre d'enfants et le terme de ponction des villosités placentaires. Le niveau de significativité des tests statistiques a été fixé à 5% et le logiciel R (www.r-project.org) a été utilisé pour réaliser l'analyse multivariée.

3.4 Résultats

3.4.1 Patients, examens cytogénétiques et histo-pathologique

Les caractéristiques des patientes et de leurs grossesses sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Principales caractéristiques des patientes et de leurs grossesses (étude longueur télomérique placentaire).

Caractéristiques	Population contrôle (n=28)	Patientes avec RCIU (n=24)	p-value
Indication du diagnostic prénatal (n ; %)	- Age maternel avancé (10/28 ; 35,7) - HT21 (4/28 ; 14,3) - Antécédent (3/28 ; 10,7) - Ano. écho. (11/28 ; 39,3)	RCIU sévère (24/24 ; 100)	
Age maternel (années) (moyenne ± ET)	34 ± 7	29 ± 7	<0,05
Gravida (n) (médiane (Q1-Q3))	3 (2-3)	2 (1-3)	NS
Para (n) (médiane (Q1-Q3))	1 (0-2)	1 (0-2)	NS
Terme de la biopsie choriale ou placentaire (SA) (moyenne ± ET)	27 ± 6	29 ± 5	NS
Terme de naissance (SA) (moyenne ± ET)	39 ± 2	36 ± 2	<0,01
Poids de naissance (gr) (médiane (Q1-Q3))	3299 ± 719	1932 ± 458	<0,001
Signes clinico-biologiques de prééclampsie (n, %)	0/28 (0)	3/24 (12,5)	

Ano. écho : anomalie échographique ; HT21 : facteurs sériques maternels du 2ème trimestre pathologiques ; RCIU : retard de croissance intra-utérin ; SA : semaines d'aménorrhée ; UA : unités arbitraires.

L'âge maternel moyen était plus élevé chez les patientes de la population contrôle que chez les patientes présentant un RCIU ($p < 0,05$), ceci était en relation avec le nombre important de patientes de la population contrôle ayant bénéficié d'un diagnostic prénatal pour « âge maternel avancé » (10/28 = 35,7%) (Tableau 5). Il n'existait pas de différence statistiquement significative du nombre de grossesses, du nombre d'enfants et du terme de la biopsie placentaire entre les cas présentant un RCIU et la population contrôle de cette étude (p = NS) (Tableau 5).

Aucune anomalie cytogénétique n'avait été identifiée chez les patientes de l'étude avec la technique rapide de FISH à la recherche des principales aneuploïdies et au caryotype conventionnel. Ceci indiquait notamment que les RCIU identifiés chez les cas de notre étude n'étaient pas expliqués par une anomalie chromosomique identifiable au caryotype conventionnel.

L'examen histo-pathologique des villosités placentaires des patientes présentant un RCIU montrait la présence d'altérations morphologiques compatibles avec un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire pour 21 des 24 placentas examinés (21/24 = 87,5%).

Comme attendu, les termes de naissance étaient plus précoces et les poids de naissance étaient diminués chez les cas présentant un RCIU en comparaison avec les contrôles ($p < 0,01$) (Tableau 5).

Parmi les 24 patientes avec un RCIU, 3 (3/24 = 12,5%) ont présenté des signes clinico-biologiques de prééclampsie au cours de leur grossesse (Tableau 5). Aucune patiente contrôle de l'étude n'a développé de signes clinico-biologiques de prééclampsie (0/28 = 0%).

3.4.2 Longueur télomérique placentaire estimée par une technique de Q-FISH

3.4.2.1 Mise au point de la technique de Q-FISH

3.4.2.1.1 Profil d'hybridation des sondes télomériques

La Figure 13 présente des noyaux interphasiques obtenus après culture de villosités placentaires et hybridés avec des sondes télomériques de type PNA marquées en rouge avec la Cyanine 5.

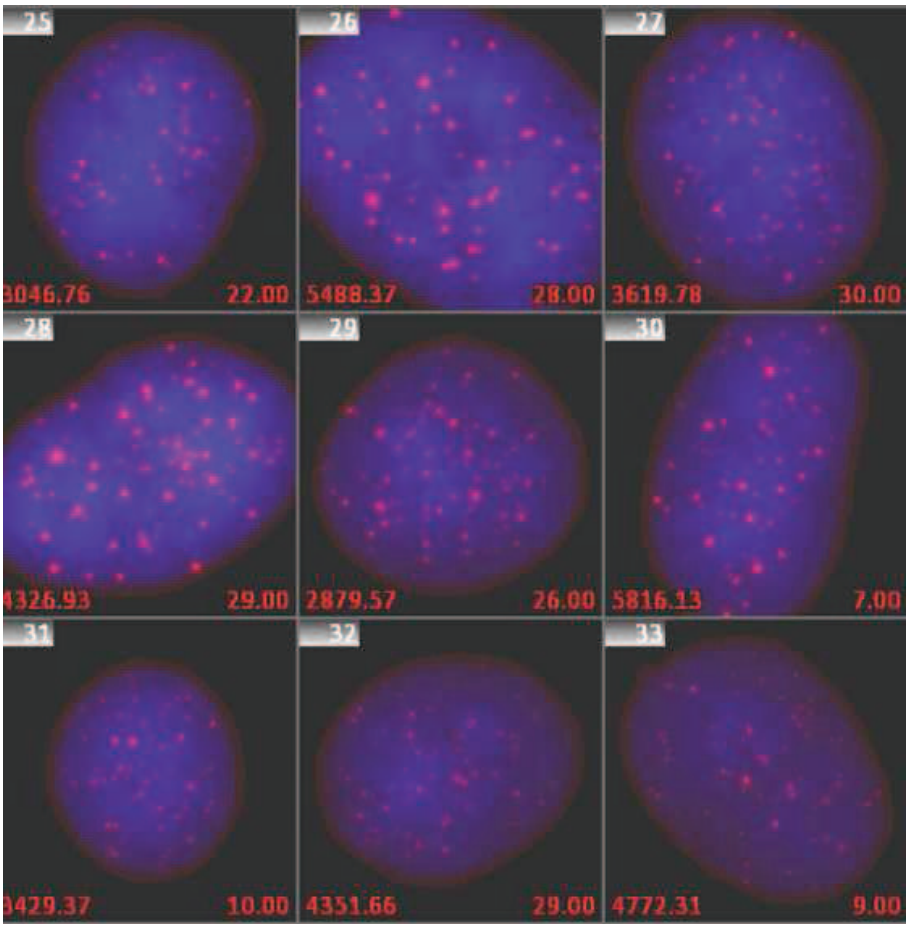


Figure 13. Microphotographies illustrant les profils d'hybridation des sondes télomériques marquées en rouge au niveau de 9 noyaux interphasiques de villosités placentaires cultivées (contre-coloration 4',6'-diamidino-2-phénylindole, grossissement x630).

3.4.2.1.2 Intensité de fluorescence télomérique et surface nucléaire

La Figure 14 illustre les intensités de fluorescence des sondes télomériques (exprimées en unités arbitraires (UA)) en fonction de la surface des noyaux interphasiques (exprimée en μm^2), mesurées avec la technique de Q-FISH au niveau de deux lames de type Labtek^{TM}, l'une provenant d'une patiente présentant un RCIU (cercles gris foncé) et l'autre provenant d'une patiente de la population contrôle de l'étude (cercles gris clair). Les cercles de taille supérieure représentent les valeurs moyennes observées au niveau de chacune des lames.

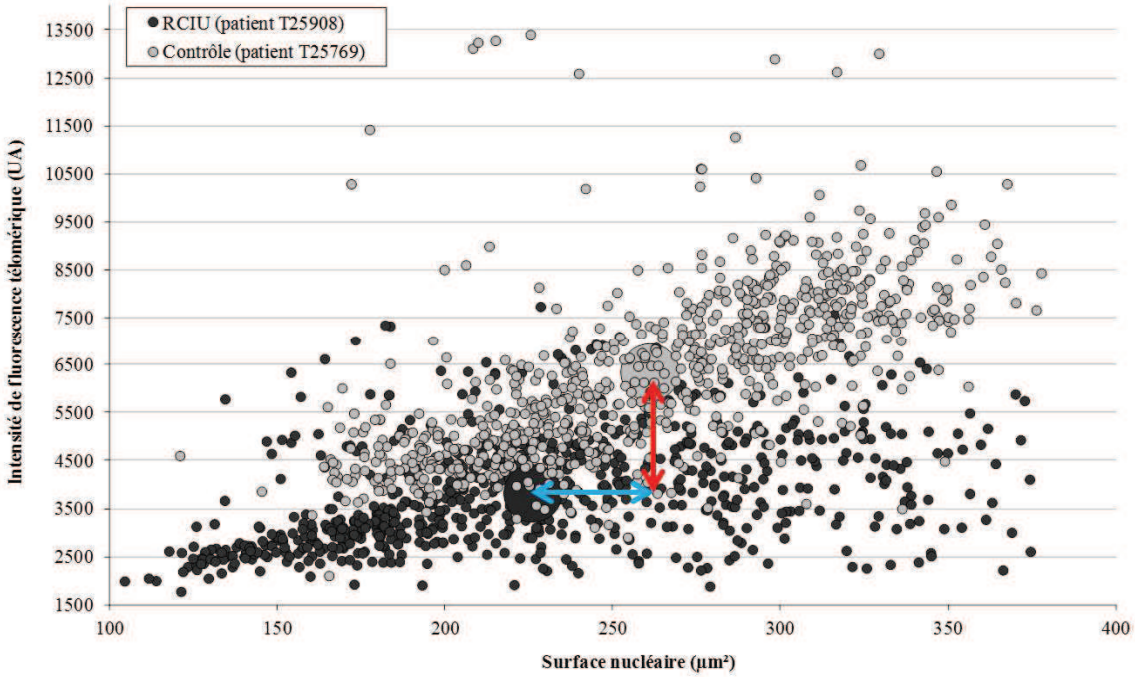


Figure 14. Intensités de fluorescence télomérique en fonction de la surface des noyaux interphasiques chez une patiente présentant un retard de croissance intra-utérin sévère et chez une patiente contrôle de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). Mesures effectuées au niveau de noyaux obtenus après culture de villosités placentaires chez une patiente présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (cercles gris foncé) et chez une patiente contrôle de l'étude (cercles gris clair). Les cercles de taille supérieure représentent les valeurs moyennes observées chez la patiente présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (cercle gris foncé élargi) et chez la patiente contrôle de l'étude (cercle gris clair élargi).

Il était intéressant de noter que l'intensité de fluorescence télomérique moyenne était réduite d'environ 2000 UA chez la patiente présentant un RCIU (Figure 14, flèche rouge). La surface nucléaire moyenne était également réduite d'environ 50 µm² chez cette patiente (Figure 14, flèche bleue). Par ailleurs, il existait une association entre l'intensité de fluorescence des sondes télomérique et la surface nucléaire au niveau des préparations de ces deux patientes ($p < 0{,}0001$).

Sur la base de ces résultats, nous avons souhaité évaluer s'il existait une association entre la longueur télomérique et la surface nucléaire. A cet effet, nous avons recherché l'existence d'une association entre les intensités moyennes de fluorescence télomérique et les surfaces nucléaires moyennes observées chez les cas et les témoins de notre étude (Figure 15).

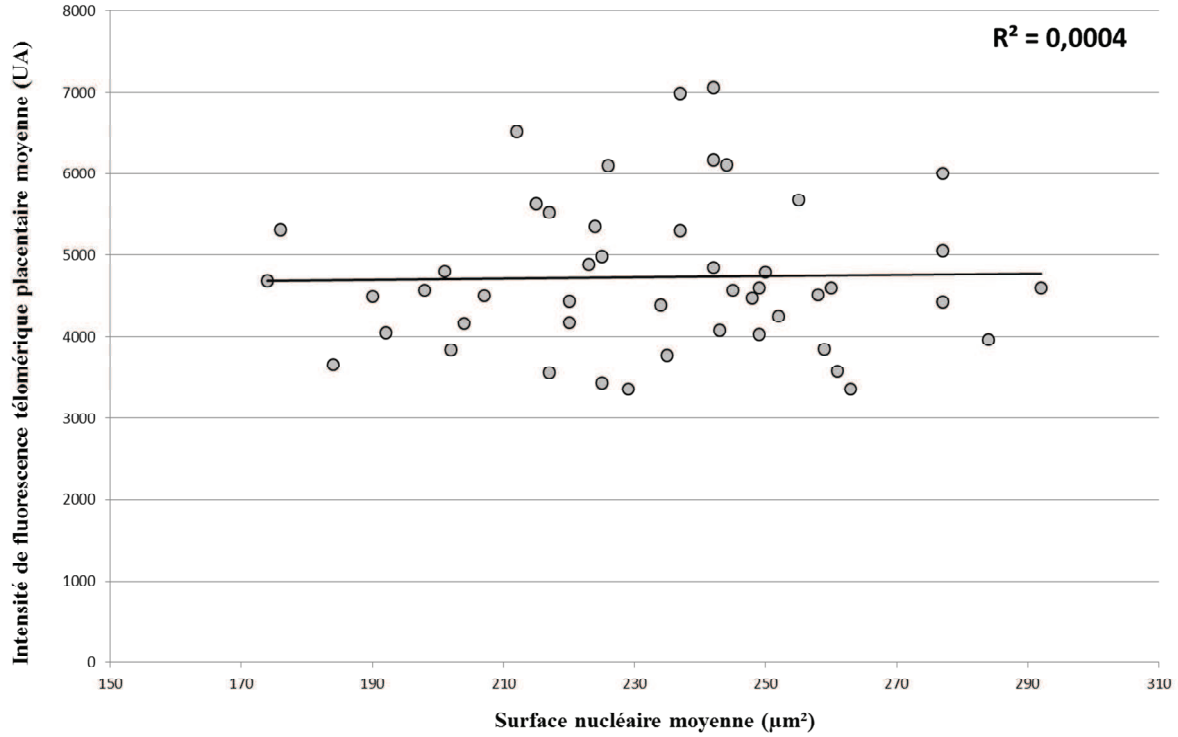


Figure 15. Intensité moyenne de fluorescence télomérique en fonction de la surface nucléaire moyenne chez les patientes de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). Absence d'association entre les intensités moyennes de fluorescence télomérique et les surfaces nucléaires moyennes chez les patientes de l'étude (*p* = non significatif).

Si pour une préparation donnée il existait une association entre l'intensité de fluorescence télomérique et la surface nucléaire (Figure 14), il n'existait pas d'association entre les intensités moyennes de fluorescence télomérique et les surfaces nucléaires moyennes chez les patientes de notre étude (*p* = NS) (Figure 15). Ce résultat indiquait que chez les patientes de notre étude, l'intensité moyenne de fluorescence télomérique et la surface nucléaire moyenne étaient des variables indépendantes.

La Figure 16 illustre les intensités de fluorescence des sondes télomériques (exprimées en UA) en fonction de la surface des noyaux interphasiques (exprimée en µm²), mesurées avec la technique de Q-FISH au niveau de deux lames de type Labtek^{TM} provenant d'une patiente présentant un RCIU (lame n°1 : cercles gris foncé, lame n°2 : cercles gris clair).

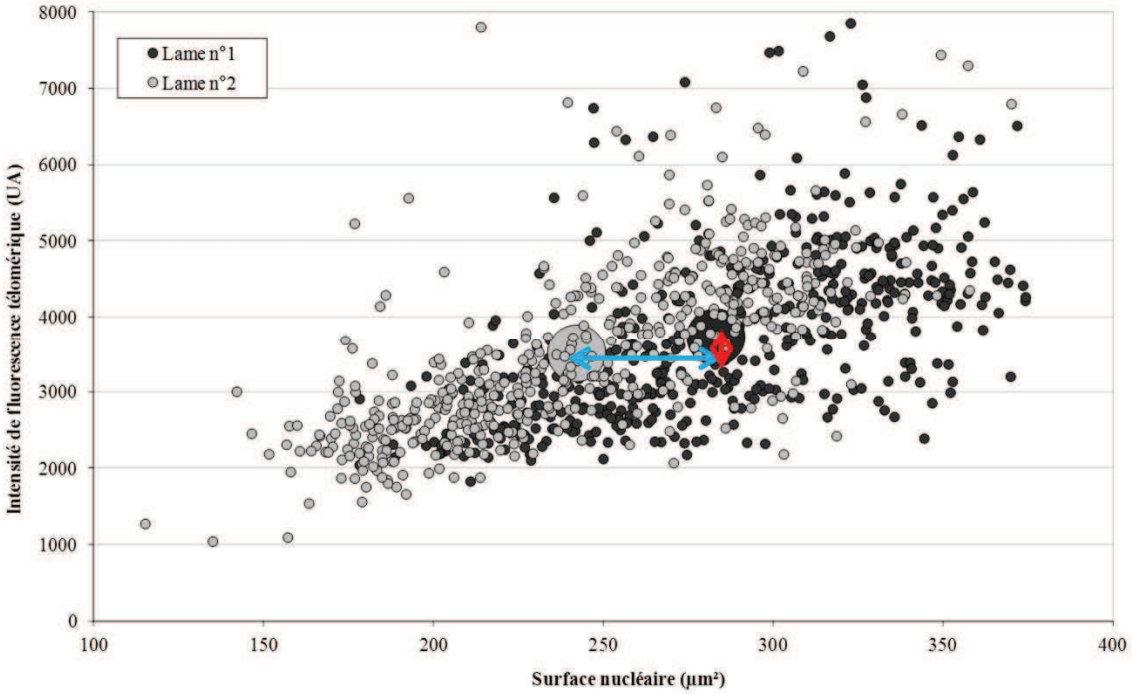


Figure 16. Intensités de fluorescence télomérique en fonction de la surface des noyaux interphasiques au niveau de deux préparations obtenues chez une patiente présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). Les cercles gris foncé représentent les noyaux interphasiques de la lame Labtek^{TM} n°1 et les cercles gris clair ceux de la lame Labtek^{TM} n°2. Les cercles de taille supérieure représentent les valeurs moyennes observées pour la lame Labtek^{TM} n°1 (cercle gris foncé élargi) et pour la lame Labtek^{TM} n°2 (cercle gris clair élargi).

Il était intéressant de noter que l'intensité de fluorescence télomérique moyenne était proche entre les deux lames obtenues chez cette patiente (Figure 16, flèche rouge). La surface nucléaire moyenne était quant à elle réduite d'environ 60 µm² pour la lame n°2 (Figure 16, flèche bleue). Cette différence entre les surfaces nucléaires pourrait être le reflet de la variabilité inter-préparation chez une patiente donnée.

3.4.2.1.3 Distribution des intensités de fluorescence télomérique

Nous avons ensuite évalué la distribution des intensités de fluorescence télomérique des noyaux interphasiques pour chacune des lames Labtek^{TM} hybridées avec les sondes PNA. A titre d'exemple, la Figure 17 illustre la distribution des intensités de fluorescence télomérique

observées chez deux patientes présentant un RCIU (Figure 17.A et 17.B) et chez deux patientes issues de la population contrôle (Figure 17.C et 17.D).

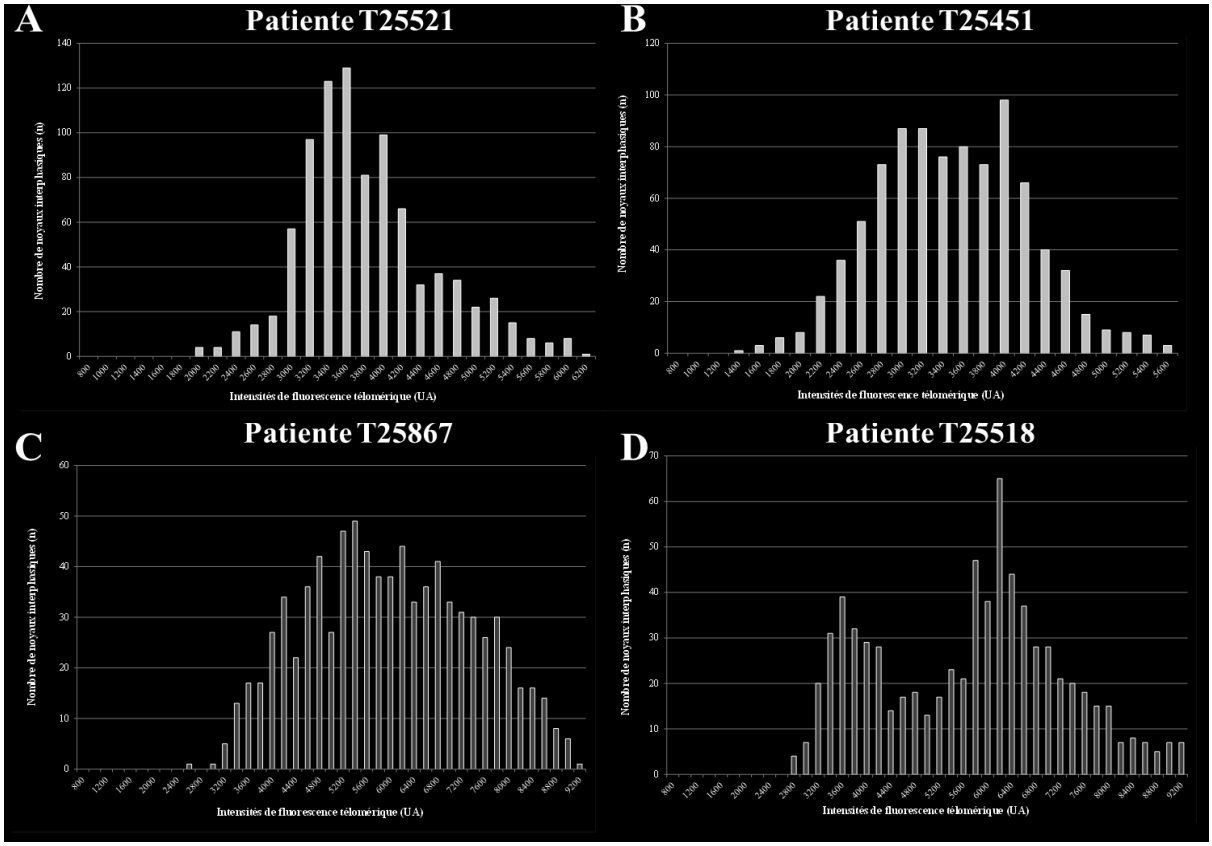


Figure 17. Distribution des intensités de fluorescence télomérique observées au niveau de noyaux interphasiques obtenus après culture des villosités placentaires (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). A et B. Patientes T25521 et T25451 présentant un retard de croissance intra-utérin. C et D. Patientes T25867 et T25518 issues de la population contrôle de l'étude.

Pour ces quatre préparations, il était intéressant de noter que les intensités de fluorescence télomérique observées n'étaient pas distribuées normalement ($p < 0{,}001$). Si graphiquement les distributions des intensités de fluorescence télomérique des Figures 17.A, 17.B et 17.C s'approchaient d'une distribution normale, la distribution de la Figure 17.D était quant à elle clairement bimodale. Des résultats comparables étaient observés pour les autres lames Labtek^{TM} hybridées avec les sondes télomériques PNA. Pour des raisons de « facilité », la moyenne arithmétique des intensités de fluorescence télomérique a tout de même été retenue pour chacune des préparations de Q-FISH.

Afin d'apprécier l'influence de la culture cellulaire sur la distribution des intensités de fluorescence télomérique, des lames ayant été préparées pour rechercher rapidement une aneuploïdie par une technique de FISH (Figure 10, gauche) ont été dénaturées puis hybridées avec des sondes télomériques PNA. Les noyaux interphasiques présents sur ces lames avaient directement été étalés grâce à une cytocentrifugeuse Cytospin^{TM} (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) et, par conséquent, ces noyaux n'avaient pas subi l'influence de la culture cellulaire. La Figure 18 présente les distributions des intensités de fluorescence télomérique placentaire observées en l'absence de culture des noyaux interphasiques (technique de Cytospin^{TM}, histogrammes gris clair) et après culture des villosités placentaires (histogrammes gris foncé) chez une patiente de l'étude.

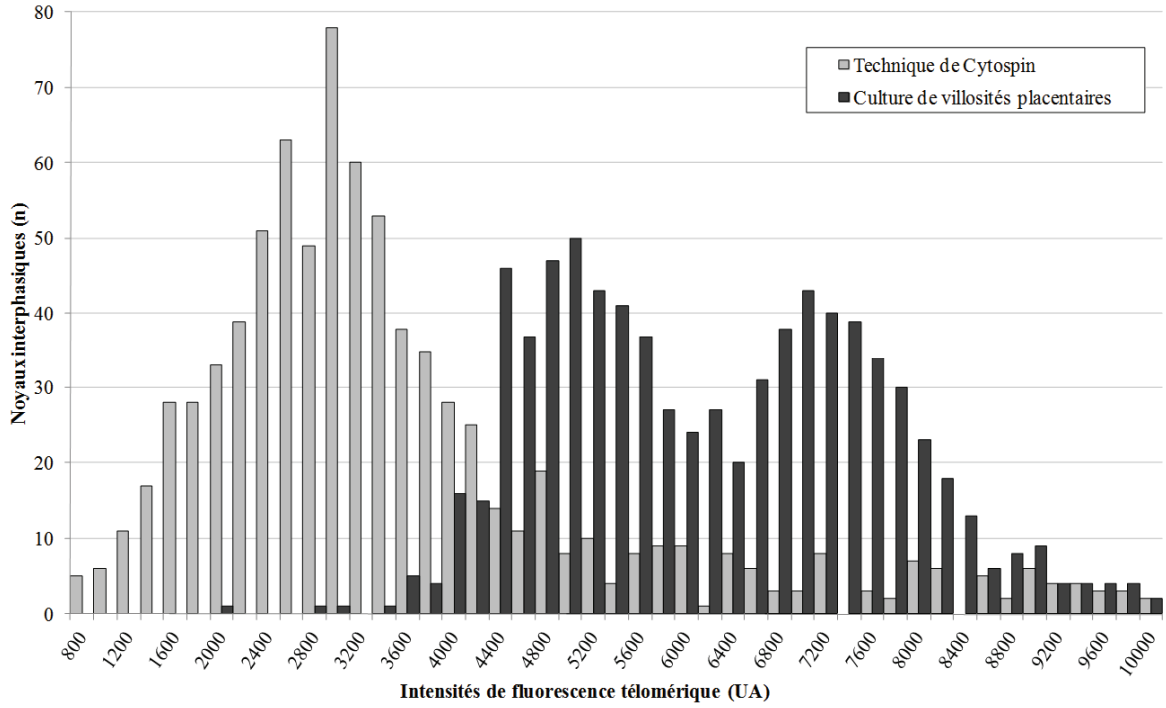


Figure 18. Distribution des intensités de fluorescence télomérique observées au niveau de noyaux interphasiques obtenus après isolement direct des noyaux par une technique de Cytospin^{TM} (histogrammes gris clair) et après culture des villosités placentaires (histogrammes gris foncé), patiente T25724 (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative).

D'une part, les intensités de fluorescence télomérique moyennes étaient très différentes entre les deux préparations chez la patiente T25724, ceci pourrait être expliqué par un prétraitement différent des noyaux interphasiques pour les préparations de Cytospin^{TM} et de culture cellulaire. D'autre part, la distribution des intensités de fluorescence des noyaux obtenus après culture des villosités placentaires était bimodale, alors qu'un seul pic, distribué normalement, apparaissait pour la technique de Cytospin^{TM}. De façon intéressante, ce résultat suggérait une influence de la culture cellulaire sur la distribution des intensités de fluorescence télomérique.

3.4.2.1.4 Influence du temps d'acquisition de la fluorescence sur l'intensité moyenne de fluorescence télomérique

Par ailleurs, nous avons souhaité évalué la contribution de certains paramètres de la technique de Q-FISH dans la variabilité des mesures des intensités de fluorescence télomérique. Parmi ces paramètres, le temps d'acquisition de la fluorescence des sondes télomériques par la caméra du microscope nous a semblé pouvoir influencer de façon significative la mesure de la fluorescence. Par défaut, le logiciel Metafer4 était programmé pour acquérir la fluorescence télomérique de façon automatique. Nous avons ainsi acquis la fluorescence des sondes télomériques au niveau de 24 lames Labtek^{TM} obtenues chez 12 cas et 12 témoins de l'étude (acquisition automatique). Nous avons ensuite reprogrammé le logiciel Metafer4 afin d'acquérir la fluorescence des sondes télomériques pendant un temps fixé à 0,40 secondes pour chacun des noyaux interphasiques pour les 24 préparations (acquisition « temps fixe »). La Figure 19 illustre les intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition « temps fixe » en fonction des intensités observées en acquisition automatique.

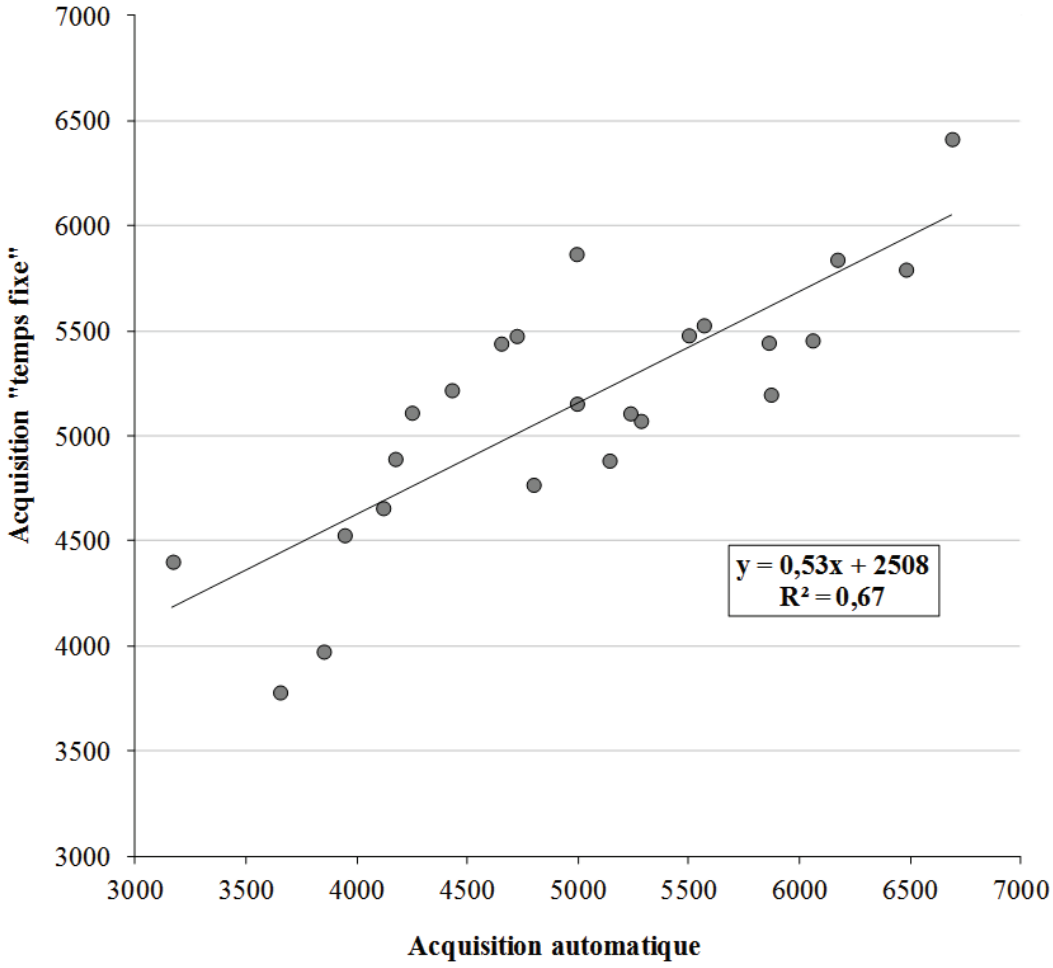


Figure 19. Intensités moyennes de fluorescence télomérique obtenues après une acquisition réalisée de façon automatique par le microscope et une acquisition fixée à 0,40 secondes (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). Existence d'une association statistiquement significative entre les intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique (abscisse) et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes (ordonnée) chez 24 patientes de l'étude ($p < 0,0001$).

Il existait une association statistiquement significative entre les intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition fixée à 0,40 secondes et avec une acquisition automatique au niveau des 24 préparations étudiées ($p < 0,001$) (Figure 19). Il était cependant à noter que la droite de régression entre les points avait pour équation $y=0,53x+2508$, alors qu'une droite de régression avec une équation proche de $y=x$ aurait pu être attendue.

La Figure 20 illustre les variations inter-individuelles des intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique et avec une acquisition « temps fixe » au niveau de lames Labtek^{TM} obtenues chez 24 patientes.

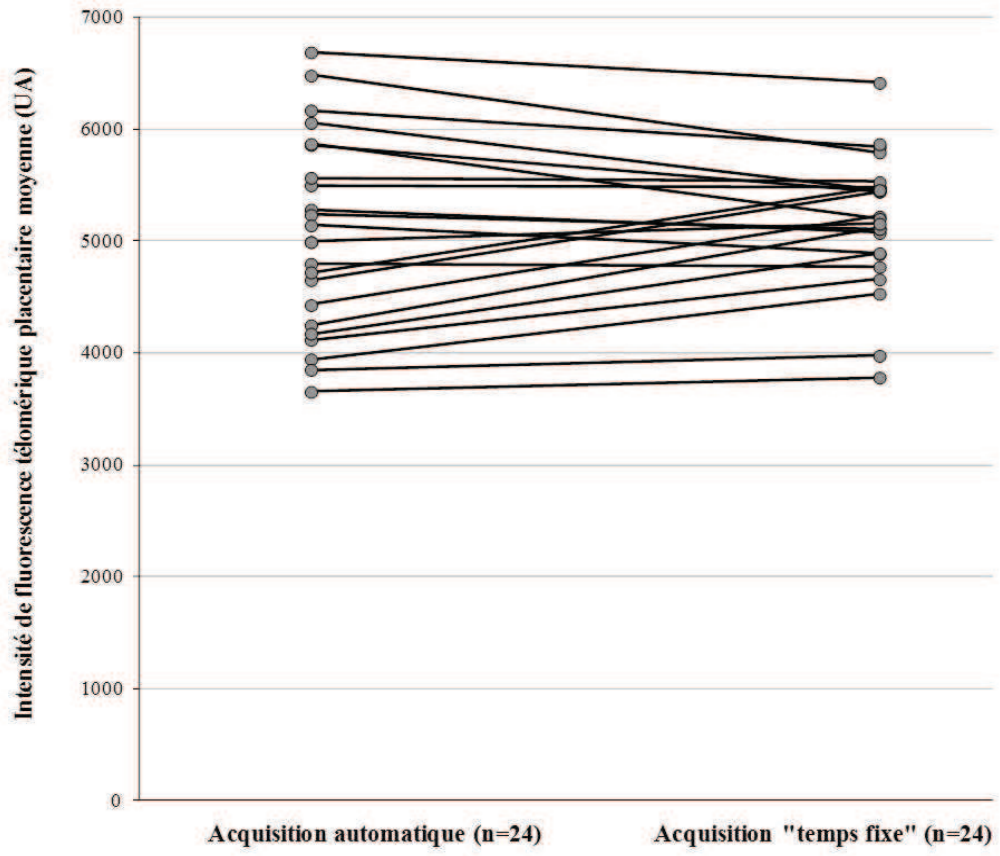


Figure 20. Variations inter-individuelles des intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique de la fluorescence par le microscope (gauche) et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes (droite) chez 24 patientes de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative).

Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les mesures effectuées avec l'acquisition automatique et avec l'acquisition « temps fixe » au niveau des 24 échantillons testés (p = NS). Il était toutefois à noter des coefficients de variation respectifs de 18,7% et 11,7% pour les intensités moyennes de fluorescence observées avec l'acquisition automatique et l'acquisition « temps fixe ». Ceci pouvait suggérer une plus faible variabilité des mesures de l'intensité de fluorescence télomérique avec l'acquisition « temps fixe » et, par conséquent, une meilleure estimation de la longueur télomérique avec ce type d'acquisition. Afin

d'accréditer cette hypothèse, nous avons évalué au niveau intra-individuel la variabilité des deux types d'acquisition. A cet effet, chez une patiente contrôle de l'étude, quatre lames de type Labtek^{TM} ont été ensemencées et hybridées avec les sondes télomériques PNA. L'intensité moyenne de fluorescence télomérique a ensuite été acquise en automatique puis en « temps fixe » pour ces quatre lames (Figure 21).

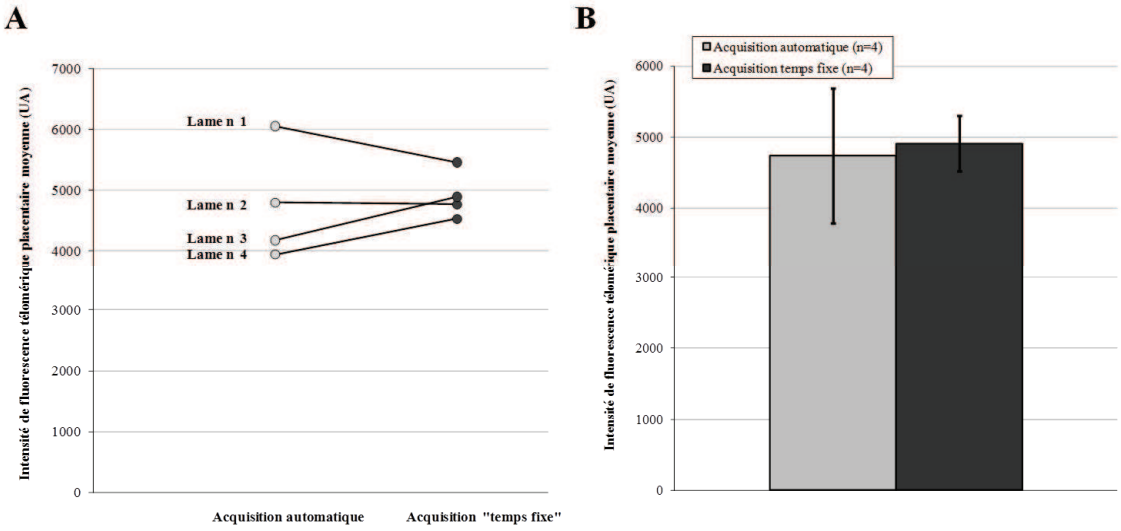


Figure 21. Variations intra-individuelles des intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique de la fluorescence par le microscope et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes chez une patiente contrôle de l'étude (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative). A. Variations des intensités moyennes de fluorescence télomérique estimées avec une acquisition automatique de la fluorescence par le microscope (gauche) et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes (droite) au niveau de 4 lames Labtek^{TM} provenant de la patiente T26004. B. Comparaison des intensités moyennes de fluorescence télomérique (± écart-type) mesurées avec une acquisition automatique par le microscope (histogramme gris clair) et avec une acquisition fixée à 0,40 secondes (histogramme gris foncé).

De façon intéressante, les coefficients de variation étaient respectivement de 20,0% et 8,00% pour les intensités moyennes de fluorescence observées avec l'acquisition automatique et avec l'acquisition « temps fixe » au niveau des quatre lames hybridées chez cette patiente. Ce résultat était en faveur d'une moindre variabilité de la mesure des intensités de fluorescence télomérique avec l'acquisition « temps fixe ». Ce type d'acquisition a donc été retenu pour la suite de l'étude.

3.4.2.1.5 Reproductibilité de l'acquisition et stabilité de la fluorescence télomérique

Par ailleurs, nous avons ensuite tiré au sort une lame Labetk™ hybridée avec les sondes télomériques PNA, puis avons réalisé des acquisitions répétées des intensités de fluorescence de cette lame 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 et 14 jours après l'hybridation des sondes télomériques. Cette procédure nous permettait notamment d'évaluer la reproductibilité de l'acquisition des intensités de fluorescence par l'appareil et la stabilité de la fluorescence. La Figure 22 illustre les résultats obtenus.

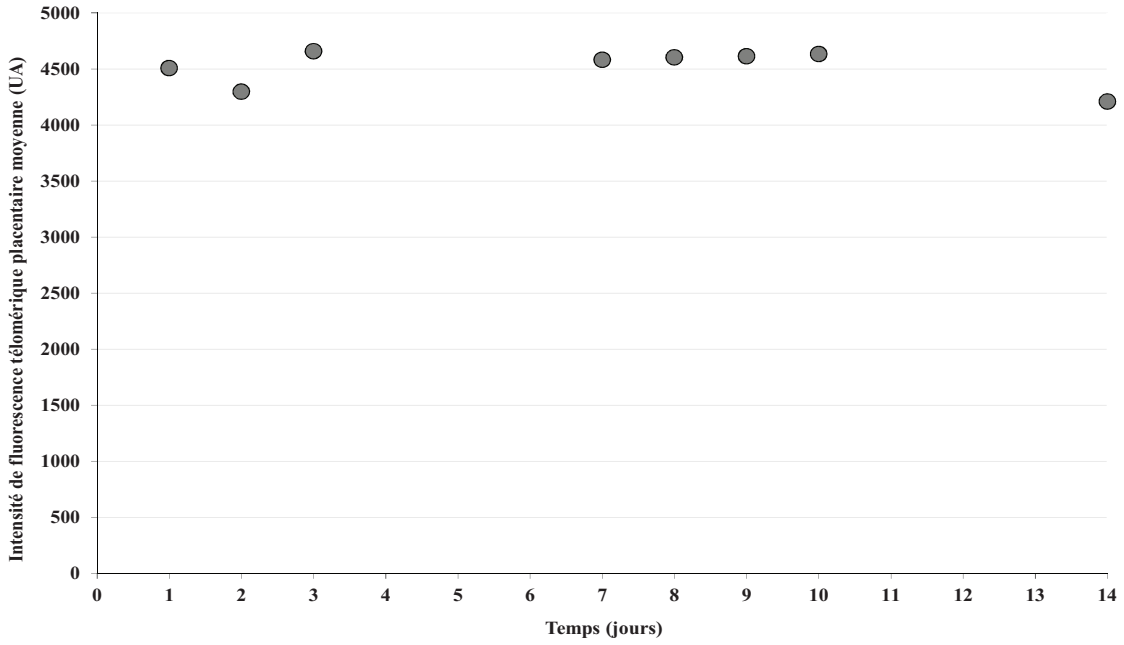


Figure 22. Intensités moyennes de fluorescence télomérique observées après des acquisitions répétées 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 et 14 jours après l'hybridation des sondes télomériques PNA au niveau d'une lame Labtek™ (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative).

Le coefficient de variation des mesures présentées dans la Figure 22 était faible, avec une valeur de 3,72%. Ce résultat indiquait, d'une part, que l'acquisition des intensités de fluorescence par l'appareil était reproductible et, d'autre part, que l'intensité de la fluorescence des sondes télomérique PNA était stable, du moins pendant les deux semaines qui suivaient l'hybridation de ces sondes.

Sur la base de ces résultats, l'intensité de fluorescence télomérique des sondes PNA des deux lames Labtek^{TM} préparées pour chacune des patientes de l'étude a été mesurée à l'aide d'une acquisition fixée à 0,40 secondes, dans un délai inférieur à une semaine après l'étape d'hybridation. La valeur de l'intensité de fluorescence télomérique retenue pour chaque patiente était la moyenne des valeurs moyennes observées de chacune des lames.

3.4.2.2 La longueur télomérique placentaire est réduite en cas de RCIU

La technique de Q-FISH a été effectuée avec succès sur les lames Labtek^{TM} préparées pour les 52 patientes de notre étude. La Figure 23 illustre les intensités de fluorescence télomérique placentaire en fonction du terme de la biopsie placentaire pour les cas avec RCIU et pour la population contrôle de l'étude.

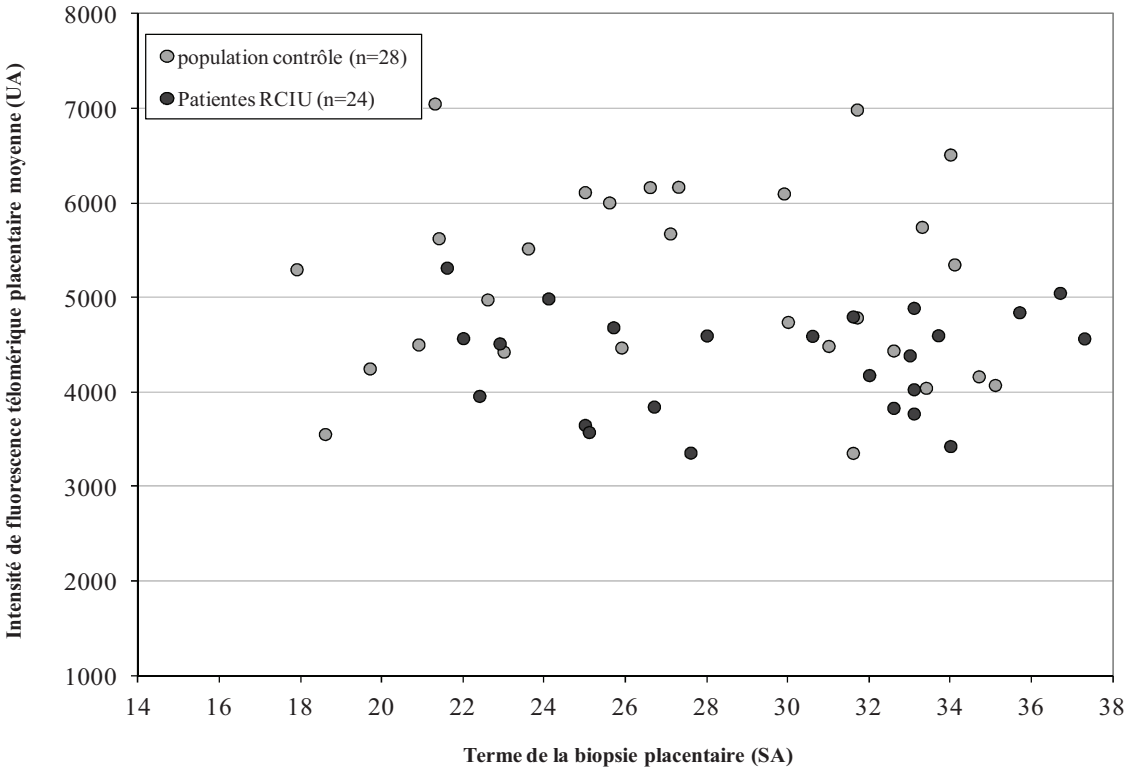


Figure 23. Intensités moyennes de fluorescence télomérique placentaire estimées avec une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative en fonction du terme de la biopsie placentaire. Les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin sévère sont représentées en cercles gris foncé et les patientes de la population contrôle de l'étude sont représentées en cercles gris clair.

La distribution des intensités moyennes de fluorescence télomérique placentaire suivait une loi normale (p = NS). L'intensité moyenne de fluorescence télomérique placentaire était diminuée chez les cas présentant un RCIU (4336 ± 553, moyenne ± écart-type (ET), UA) en comparaison avec les contrôles (5166 ± 1003, moyenne ± ET, UA) ($p < 0,001$) (Figure 24).

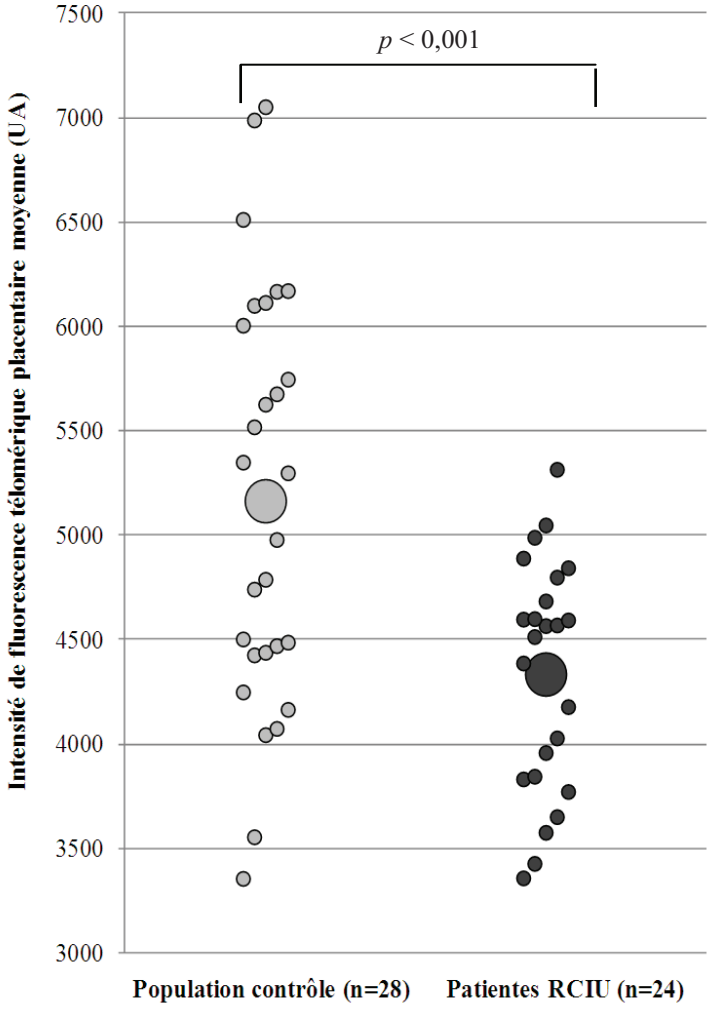


Figure 24. Comparaison des intensités moyennes de fluorescence télomérique placentaire estimées avec une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative entre les patientes de la population contrôle de l'étude (cercles gris clair) et les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (cercles gris foncé). Les cercles de taille supérieure représentent les moyennes des intensités de fluorescence télomérique des patientes de la population contrôle de l'étude (cercle gris clair élargi) et des patientes présentant un retard de croissance intra-utérin sévère (cercle gris foncé élargi). L'intensité moyenne de fluorescence télomérique est significativement diminuée chez les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin sévère ($p < 0,001$).

L'analyse multivariée à l'aide d'une régression logistique (ajustement avec les covariables suivantes : âge maternel, nombre de grossesses, nombre d'enfants et terme de la ponction des villosités placentaires) confirmait la diminution d'intensité de fluorescence télomérique placentaire chez les patientes présentant un RCIU et montrait qu'il n'existait pas d'influence des covariables retenues sur la longueur télomérique placentaire. En outre, cette analyse statistique multivariée indiquait qu'une diminution de 1000 UA d'intensité de fluorescence télomérique placentaire était associée à un risque accru d'un facteur 4 de RCIU sévère.

Aucune influence du terme de la biopsie placentaire sur l'intensité de fluorescence télomérique n'avait été notée pour les cas présentant un RCIU, pour les contrôles et pour l'ensemble des patientes de cette étude (cas + contrôles) (p = NS). Ce résultat pourrait notamment suggérer que le raccourcissement télomérique placentaire s'installerait précocement au cours des grossesses présentant un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire.

3.4.3 Longueur télomérique placentaire estimée par une technique de Q-PCR

3.4.3.1 Recherche d'une corrélation entre les duplicatas des ratios T/S

La Figure 25 illustre les ratios T/S mesurés pour les duplicatas n°2 en fonction des ratios T/S mesurés pour les duplicatas n°1.

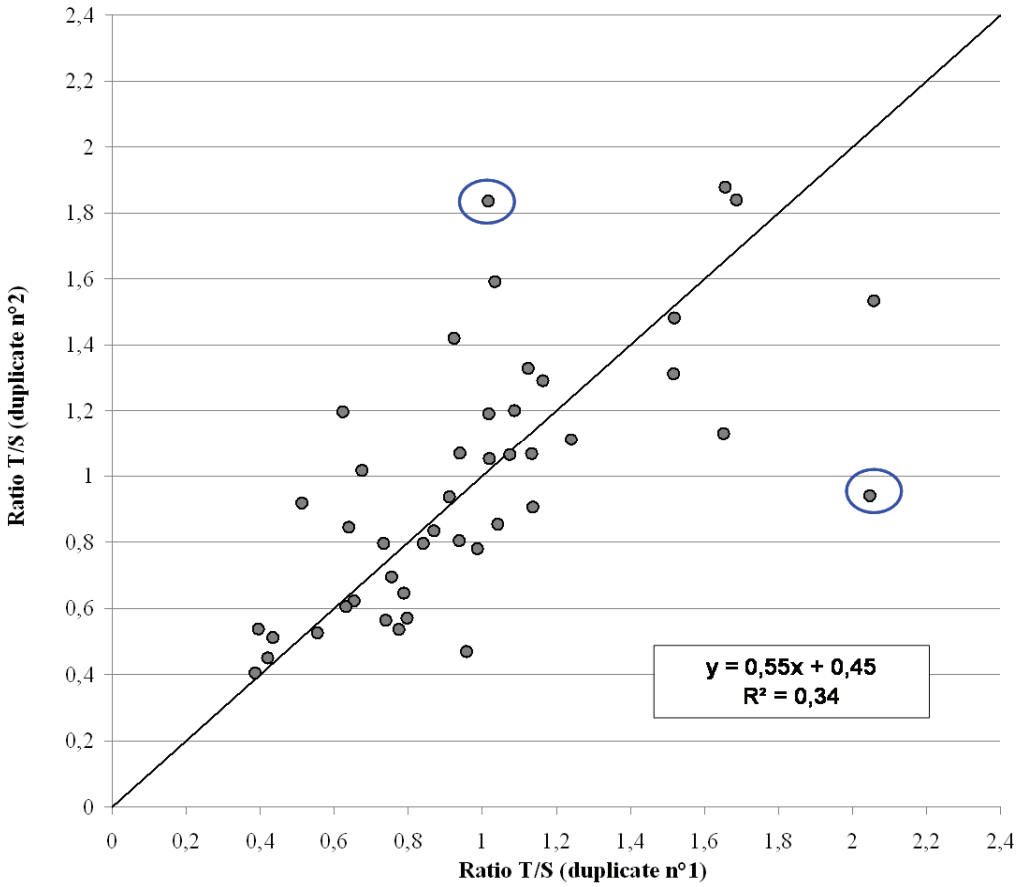


Figure 25. Ratios T/S du deuxième duplicata en fonction des ratios T/S du premier duplicata (technique de réaction en chaîne par polymérase quantitative). Existence d'une association statistiquement significative entre les ratios T/S mesurés avec le premier duplicata (abscisse) et le deuxième duplicata (ordonnée) ($p < 0,001$).

Il existait une association statistiquement significative entre les mesures des ratios T/S des duplicatas ($p < 0,001$). Il était cependant attendu une distribution des points de la Figure 25 autour d'une droite d'équation $y=x$, mais certains points s'écartaient de façon importante de cette droite (Figure 25, points entourés d'un cercle bleu). Ceci justifiait de réaliser les mesures de rations T/S en duplicatas.

3.4.3.2 Les résultats de la technique de Q-PCR confirment ceux de la technique de Q-FISH

Chez les 52 patientes de notre étude, la distribution des ratios T/S observés avec la technique de Q-PCR suivait une loi normale (p = NS). La technique de Q-PCR indiquait que la longueur télomérique placentaire moyenne était réduite chez les cas présentant un RCIU (ratio T/S :

0,78 ± 0,26, moyenne ± ET, sans unité) en comparaison avec les contrôles (ratio T/S : 1,19 ± 0,40, moyenne ± ET, sans unité) ($p < 0,001$) (Figure 26.A).

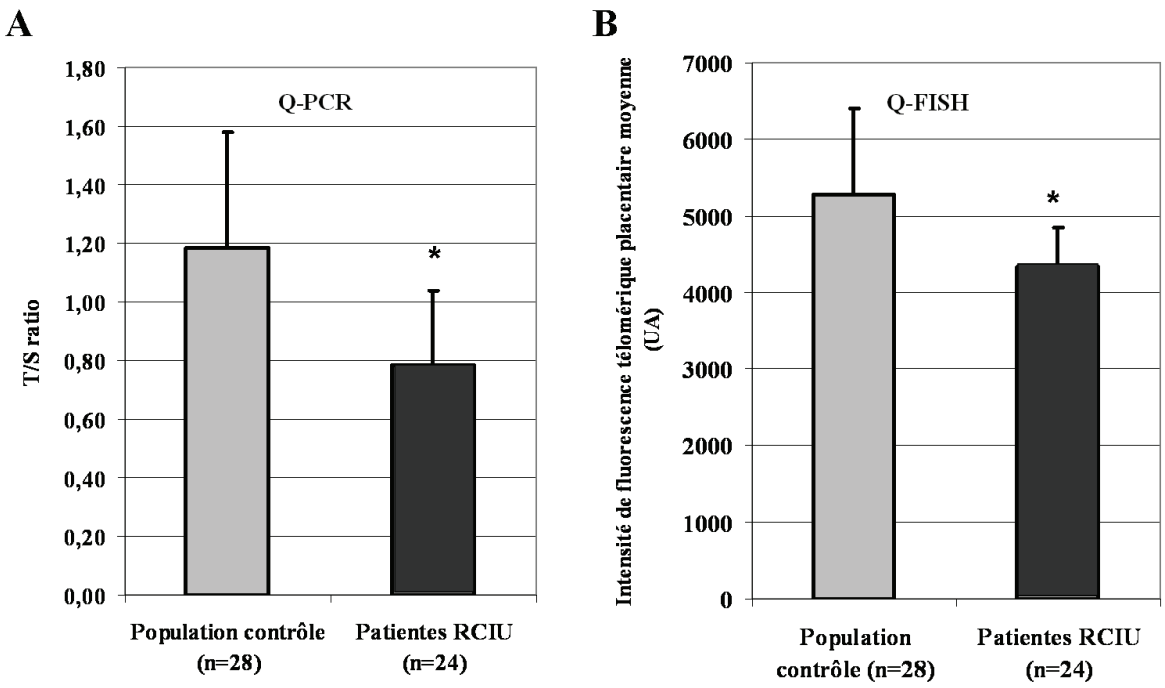


Figure 26. Longueur télomérique placentaire estimée à la fois par une technique de réaction en chaîne par poymérase quantitative (Q-PCR) et par une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence quantitative (Q-FISH) chez les 52 patients de l'étude. Comparaison des longueurs télomériques moyennes (± écart-type) estimées (A) par une technique de Q-PCR et (B) par une technique de Q-FISH chez les patientes issues de la population contrôle de l'étude (histogrammes gris clair) et les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin secondaire à une insuffisance placentaire (histogrammes gris foncé) (* : $p < 0,001$).

Le ratio T/S moyen était ainsi diminué de 34,5% au niveau placentaire chez les patientes avec un RCIU. Chez ces patientes, l'intensité moyenne de fluorescence télomérique placentaire mesurée avec la technique de Q-FISH était quant à elle diminuée 16,1%.

3.4.4 Etude des loci portant *hTERC* et *hTERT* au niveau placentaire

3.4.4.1 Absence d'anomalie de nombre affectant le locus portant *hTERC*

La Figure 27 présente les profils d'hybridation de la sonde BAC RP11-816J6 ciblant le locus portant *hTERC* (locus 3q26.2, couleur rouge) et de la sonde BAC RP11-16N5 contrôle (locus 3q13.13, couleur verte) au niveau de noyaux interphasiques obtenus après culture de villosités placentaires.

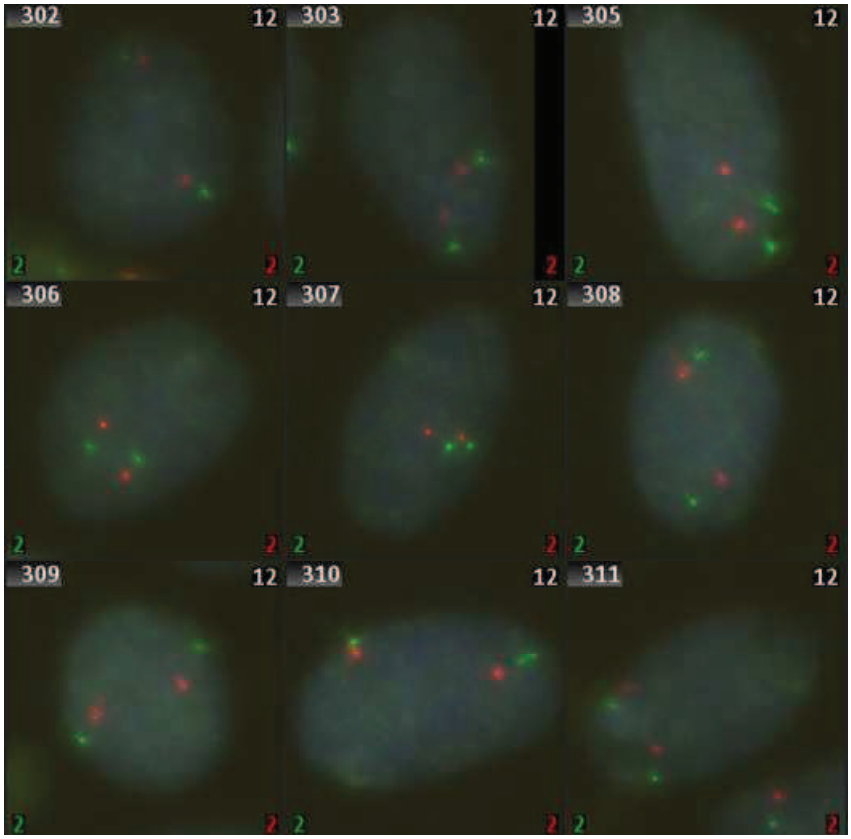
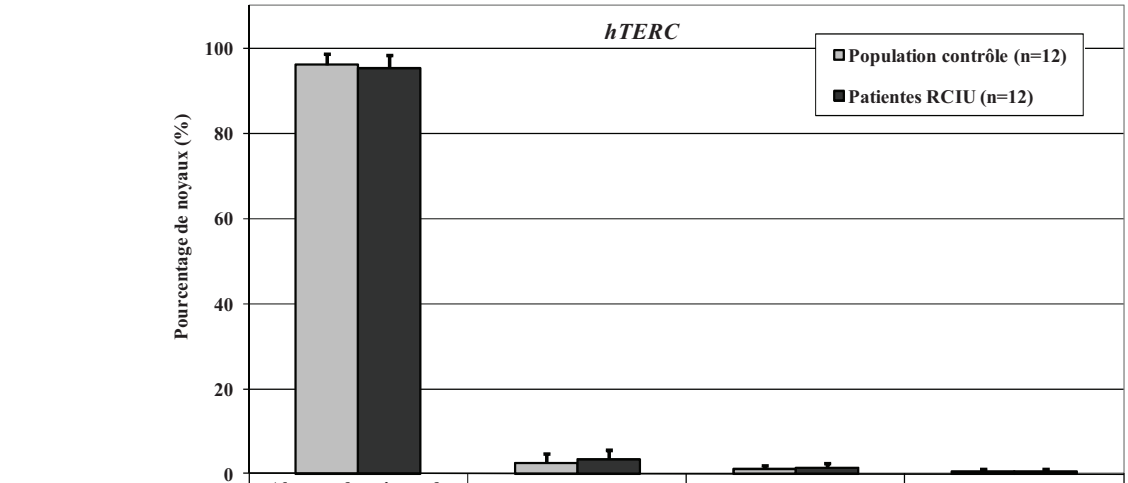


Figure 27. Microphotographies illustrant les profils d'hybridation de la sonde BAC RP11-816J6 ciblant le locus portant *hTERC* (locus 3q26.2, couleur rouge) et de la sonde BAC RP11-16N5 contrôle (locus 3q13.13, couleur verte) au niveau de 9 noyaux interphasiques de villosités placentaires cultivées (contre-coloration 4',6'-diamidino-2-phénylindole, grossissement x630).

La Figure 28 illustre la répartition des différents profils d'hybridation de la sonde BAC ciblant le locus portant *hTERC* pour les patientes présentant un RCIU et pour la population contrôle.



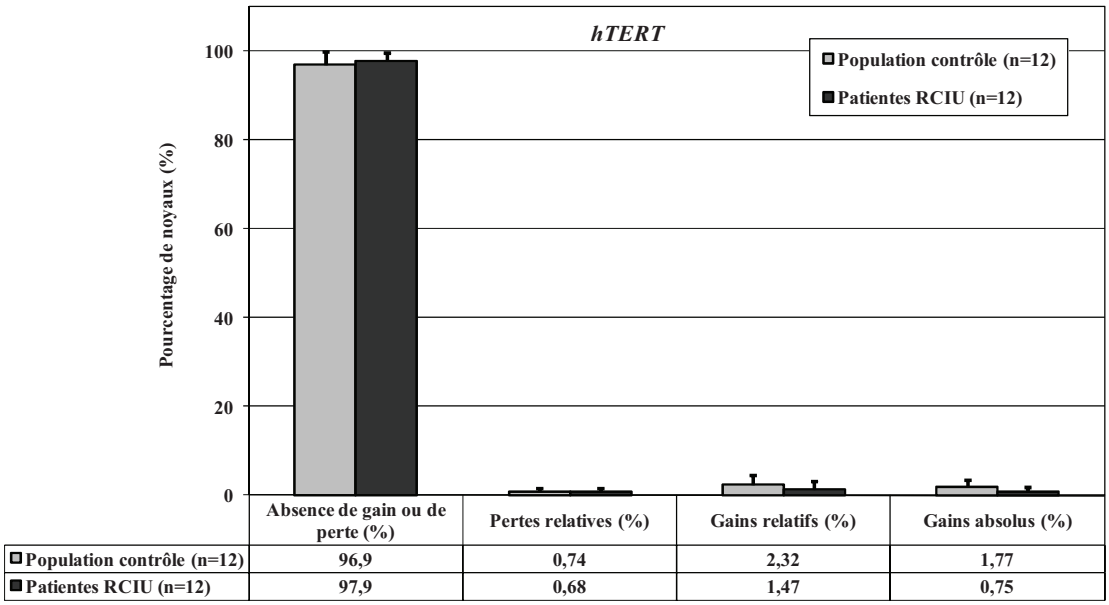
	Absence de gain ou de perte (%)	Pertes relatives (%)	Gains relatifs (%)	Gains absolus (%)
Population contrôle (n=12)	96,3	2,49	1,18	0,48
Patientes RCIU (n=12)	95,3	3,28	1,39	0,64

Figure 28. Répartition des profils d'hybridation de la sonde BAC ciblant le locus portant *hTERC* pour les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin (histogrammes gris foncé) et pour la population contrôle (histogrammes gris clair) (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence).

Il n'existait pas de différence des profils d'hybridation de cette sonde BAC ciblant le locus portant *hTERC* entre les patientes présentant un RCIU et les patientes de la population contrôle (p = NS).

3.4.4.2 Absence d'anomalie de nombre affectant le locus portant *hTERT*

De même, aucune différence des profils d'hybridation de la sonde BAC ciblant le locus portant *hTERT* n'avait été notée entre les patientes présentant un RCIU et la population contrôle (p = NS) (Figure 29).



	Absence de gain ou de perte (%)	Pertes relatives (%)	Gains relatifs (%)	Gains absolus (%)
Population contrôle (n=12)	96,9	0,74	2,32	1,77
Patientes RCIU (n=12)	97,9	0,68	1,47	0,75

Figure 29. Répartition des profils d'hybridation de la sonde BAC ciblant le locus portant *hTERT* pour les patientes présentant un retard de croissance intra-utérin (histogrammes gris foncé) et pour la population contrôle (histogrammes gris clair) (technique d'hybridation *in situ* en fluorescence).

3.4.5 Absence d'agrégats télomériques au niveau placentaire en cas de RCIU

La Figure 30.A illustre un noyau interphasique avec un profil d'hybridation compatible avec la présence d'agrégats télomériques (flèche rouge). La Figure 30.B représente le pourcentage de noyaux interphasiques avec un profil d'hybridation compatible avec la présence d'agrégats télomériques chez les cas avec RCIU (cercles gris foncé) et chez la population contrôle de l'étude (cercles gris clair).

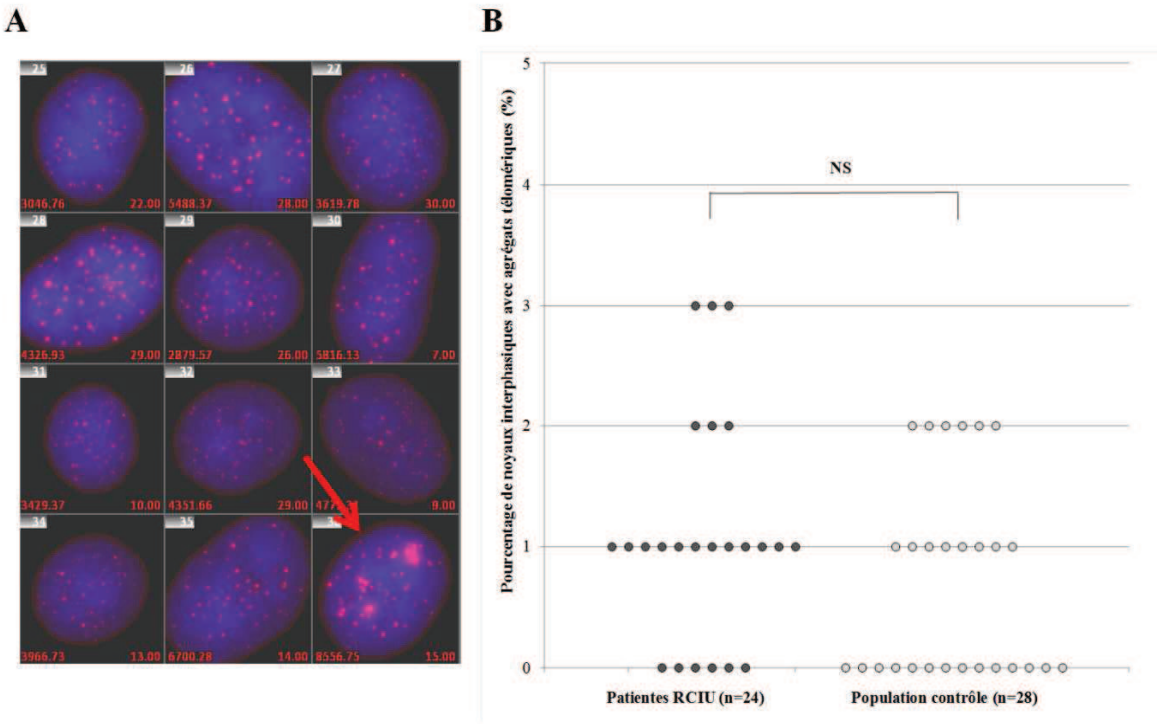


Figure 30. Evaluation des agrégats télomériques placentaires chez les patientes de l'étude (microscopie 2-Dimension). A. Microphotographies illustrant les profils d'hybridation des sondes télomériques marquées en rouge au niveau de 12 noyaux interphasiques de villosités placentaires cultivées (contre-coloration 4',6'-diamidino-2-phénylindole, grossissement x630). La flèche rouge indique un noyau interphasique avec un profil d'hybridation pouvant faire discuter la présence d'agrégats télomériques. B. Comparaison du pourcentage de noyaux interphasiques avec un profil d'hybridation pouvant faire discuter la présence d'agrégats télomériques entre les patientes avec un retard de croissance intra-utérin sévère (cercles gris foncé) et les patientes de la population contrôle (cercles gris clair) (p = non significatif (NS)).

Chez les cas et la population contrôle de l'étude, le nombre de noyaux présentant un profil d'hybridation compatible avec la présence d'agrégats télomériques était identique (p = NS) et inférieur ou égal à 3%.

3.5 Discussion

Dans notre centre de Médecine Fœtale, nous réalisons depuis bientôt 30 ans plus de 80% des diagnostics prénatals par choriocentèse et placentocentèse, plutôt que par amniocentèse, et ce, à tous les âges gestationnels (Brun *et al.*, 2003 ; Saura *et al.*, 2010b). Nous avons ainsi effectué à ce jour plus de 26000 choriocentèses et placentocentèses. Ces techniques de prélèvements présentent notamment l'avantage d'un délai d'obtention du caryotype

conventionnel après culture plus court qu'après la réalisation d'une amniocentèse (Saura *et al.*, 2010b).

En outre, nous sommes un des rares centres à proposer systématiquement aux patientes présentant un RCIU idiopathique de réaliser un diagnostic prénatal par placentocentèse, plutôt que par amniocentèse, afin d'une part, rechercher une ACLP pouvant expliquer le retard de croissance et, d'autre part, effectuer un examen histo-pathologique à la recherche d'arguments en faveur d'une origine « vasculaire » du retard de croissance (Carles *et al.*, 2009 ; Toutain *et al.*, 2010b).

Il est à noter que les résultats que nous rapportons ici ont pu être obtenus notamment grâce aux quantités importantes de fragments villositaires prélevées de notre centre (Saura *et al.*, 2010b). Ces importantes quantités de matériel placentaire prélevées n'entraînaient pas de risque iatrogène accru et nous ont permis de disposer de villosités excédentaires après avoir effectué les examens cytogénétiques et histo-pathologiques réalisés dans le cadre du soin courant des patientes. Le matériel villositaire excédentaire a été utilisé ici afin d'estimer la longueur télomérique placentaire par deux techniques moléculaires (techniques de Q-FISH et de Q-PCR), étudier les éventuels remaniements des loci portant *hTERC* et *hTERT* et rechercher la présence d'agrégats télomériques placentaires.

La technique de Q-FISH a été appliquée avec succès à l'ensemble des biopsies placentaires de notre étude. Cette technique de Q-FISH montrait que la longueur télomérique placentaire était réduite au cours des grossesses présentant un RCIU. Aucune influence du terme de la biopsie placentaire sur la longueur télomérique n'avait par ailleurs été notée. Notre étude indiquait ainsi que le raccourcissement de la longueur télomérique placentaire s'installait précocement au cours des grossesses avec un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire. Il ne s'agissait donc pas d'un phénomène survenant de façon tardive, n'apparaissant qu'au terme des grossesses présentant un RCIU, comme rapporté dans un premier temps (Davy *et al.*, 2009 ; Biron-Shental *et al.*, 2010). Nos résultats suggéraient ainsi que le raccourcissement des télomères des villosités placentaires, vraisemblablement sous l'influence du stress oxydatif occasionné par le remodelage inadéquat des artères spiralées, soit une conséquence précoce des perturbations de l'homéostasie de l'oxygène décrites au niveau de la chambre intervilleuse au cours de ces grossesses (Tuuli *et al.*, 2011).

Les résultats de l'estimation de la longueur télomérique placentaire par la technique de Q-FISH avaient été confirmés par une technique de Q-PCR. Il était intéressant de noter que la différence de longueur télomérique moyenne entre les patientes avec RCIU et les patientes de la population contrôle était plus importante avec la technique de Q-PCR (différence moyenne entre les cas et les contrôles de 34,5%) qu'avec la technique de Q-FISH (différence moyenne entre les cas et les contrôles de 16,1%). Ceci semblait indiquer que les caractéristiques de la technique de Q-PCR étaient probablement meilleures que celles de la technique de Q-FISH pour estimer la longueur télomérique placentaire. La technique de Q-PCR d'estimation télomérique que nous avons utilisée avait été décrite précédemment comme une technique présentant de bonnes caractéristiques (Aviv *et al.*, 2011). Il avait par ailleurs été suggéré que l'estimation de la longueur télomérique par la technique de Q-FISH pouvait être perturbée par une auto-fluorescence des préparations (O'Sullivan *et al.*, 2004). Ceci pourrait expliquer la moins bonne performance de la technique de Q-FISH pour mettre en évidence la différence de longueur télomérique entre nos cas avec RCIU et nos contrôles. A l'avenir, il nous parait donc souhaitable de privilégier l'estimation de la longueur télomérique placentaire avec la technique de Q-PCR que nous avons utilisée ici, ou à l'aide de la technique de Q-PCR multiplexe récemment décrite (Cawthon, 2009).

Nous n'avons pas observé au niveau placentaire d'anomalie de nombre affectant le locus portant *hTERC.* Ce résultat allait à l'encontre de celui rapporté par Biron-Shental et *al.,* (Biron-Shental *et al.*, 2011). Ces auteurs avaient en effet décrit que le nombre de copies de *hTERC* était diminué au niveau des placentas à terme des grossesses avec un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire, en comparaison avec des placentas issus de grossesses contrôle. Précisément, ils avaient observé que des gains du locus portant *hTERC* étaient présents au niveau de plus de 8% des noyaux interphasiques des placentas à terme des grossesses contrôle, alors que ces gains n'étaient retrouvés qu'au niveau d'environ 3% des noyaux interphasiques des placentas à terme des grossesses avec RCIU. Les auteurs avaient alors fait l'hypothèse que des gains de *hTERC* pourraient se mettre en place au niveau placentaire de façon physiologique au cours de la grossesse. Ce phénomène serait altéré au cours des grossesses présentant un RCIU. Les auteurs avaient étudié cinq préparations de villosités placentaires à terme pour les grossesses présentant un RCIU et cinq préparations de villosités placentaires à terme pour les grossesses contrôle. Nous avons ici étudié un

échantillonnage plus important (12 lames pour chacun des groupes), hybridé les sondes FISH au niveau de noyaux interphasiques non tronqués et dénombré automatiquement les signaux fluorescents de 300 noyaux interphasiques. Cette méthode ne nous a pas permis de confirmer la présence de gains de *hTERC* au niveau placentaire au cours des grossesses des patientes contrôle.

Il nous a semblé également intéressant d'examiner les éventuelles anomalies de nombre affectant le locus portant *hTERT*. Il a en effet été montré que l'expression de TERT était étroitement corrélée à la présence d'une activité télomérase au niveau placentaire (Nishi *et al.*, 1999). En ce qui concerne les dérégulations de TERT au niveau placentaire en cas de RCIU, certains auteurs ont observé une absence d'activité télomérase en relation avec une diminution de l'expression de TERT, alors que l'activité télomérase et l'expression de TERT étaient maintenues au niveau placentaire pour les grossesses sans complication (Izutsu *et al.*, 2006 ; Davy *et al.*, 2009 ; Biron-Shental *et al.*, 2010). Pour ces auteurs, l'expression altérée de TERT serait ainsi un facteur limitant à l'activité télomérase au niveau placentaire. Par conséquent, une diminution de l'expression de TERT pourrait expliquer le raccourcissement télomérique que nous rapportons au cours des grossesses présentant un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire. Il était intéressant de noter qu'en cas de prééclampsie, des études indiquaient que TERT était surexprimé au niveau placentaire (Nishi *et al.*, 2004 ; Geifman-Holtzman *et al.*, 2010). Même si nous n'avons pas étudié ici l'expression de TERT, notre étude soulignait néanmoins qu'une dérégulation de son expression n'était *a priori* pas expliquée par une anomalie de nombre affectant le locus portant *hTERT*. Il serait plus probable qu'en cas de RCIU, la diminution d'expression de TERT au niveau placentaire soit liée à une *down regulation* de *hTERT* ou à l'existence de transcrits d'épissage alternatif (Izutsu *et al.*, 2006).

Concernant la recherche d'agrégats télomériques placentaires, nous n'avons pas mis en évidence ces agrégats chez nos cas avec un RCIU ou chez la population contrôle de notre étude. Des agrégats télomériques placentaires avaient été rapportés chez les patientes présentant une prééclampsie, avec ou sans RCIU (Biron-Shental *et al.*, 2010). Chez ces patientes, les auteurs avaient ainsi observé, au niveau de coupes de villosités placentaires à terme hybridées avec des sondes télomériques de FISH, environ 10% des noyaux présentant des agrégats télomériques. Trois patientes de notre étude ont présenté des signes clinico-

biologiques de prééclampsie, mais nous n'avons pas observé un nombre significatif de noyaux interphasiques placentaires avec des agrégats télomériques chez ces patientes. La technique utilisée par Biron-Shental *et al.*, et dans notre étude était une technique de microscopie 2-D, qui n'est pas la technique de référence afin de mettre en évidence des agrégats télomériques. A cet effet, il aurait été souhaitable d'utiliser une technique de microscopie 3-D permettant d'objectiver la présence de ces agrégats.

Nous avons uniquement examiné dans ce travail la longueur télomérique au niveau placentaire, plus particulièrement au niveau des cellules composant l'axe mésenchymateux des villosités placentaires. Il aurait été intéressant d'étudier la longueur télomérique au niveau des amniocytes au cours des grossesses présentant un RCIU. Nous pensons toutefois que la longueur télomérique au niveau des amniocytes n'est pas altérée durant ces grossesses. En effet, Davy *et al.,* ont montré qu'au moment de l'accouchement, la longueur des télomères était identique au niveau des cellules du sang du cordon pour les grossesses avec un RCIU et pour les grossesses contrôle, alors que la longueur télomérique placentaire était réduite au moment de l'accouchement en cas de RCIU (Davy *et al.*, 2009). Les résultats de Davy *et al.,* suggéraient que la longueur télomérique des amniocytes ne devrait pas être modifiée en cas de RCIU secondaire à une insuffisance placentaire, mais il serait intéressant de le démontrer.

En résumé, cette étude était la première à rapporter que la longueur télomérique placentaire était réduite au cours de la grossesse chez les patientes présentant un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire. Ce résultat pourrait notamment permettre d'envisager l'utilisation de l'estimation de la longueur télomérique placentaire, ou des molécules concourant à sa régulation, comme biomarqueur des RCIU.

3.6 Publication n°5

Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Cappellen D, Jarne A, Chevret E, Ferrer J, Idrissi Y, Pelluard F, Carles D, Maugey-Laulon B, Lacombe D, Horovitz J, Merlio JP, Saura R. Reduced placental telomere length in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. PLoS One, *In Press*

TITLE

Reduced placental telomere length during pregnancies complicated by intrauterine growth restriction

AUTHORS

Jérôme TOUTAIN[1,2], Martina PROCHAZKOVA-CARLOTTI[1], David CAPPELLEN[1,3], Ana JARNE[4], Edith CHEVRET[1], Jacky FERRER[1], Yamina IDRISSI[1], Fanny PELLUARD[1,5], Dominique CARLES[5], Brigitte MAUGEY-LAULON[6], Didier LACOMBE[2,7], Jacques HOROVITZ[8,9], Jean-Philippe MERLIO[1,3] and Robert SAURA[2,9]

AFFILIATIONS

[1] Univ. Bordeaux, Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs, EA 2406, F-33000 Bordeaux, France

[2] CHU Bordeaux, Génétique médicale, F-33000 Bordeaux, France

[3] CHU Bordeaux, Biologie des tumeurs, F-33600 Pessac, France

[4] Univ. Bordeaux, ISPED INSERM U897 Equipe de biostatistique, F-33000 Bordeaux, France

[5] CHU Bordeaux, Pathologie, F-33000 Bordeaux, France

[6] CHU Bordeaux, Imagerie anté-natale, de l'enfant et de la femme, F-33000 Bordeaux, France

[7] Univ. Bordeaux, Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, F-33000 Bordeaux, France

[8] CHU Bordeaux, Gynécologie-obstétrique et médecine fœtale, F-33000 Bordeaux, France

[9] Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

ABSTRACT

Objectives: Recent studies have shown that telomere length was significantly reduced in placentas collected at delivery from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction secondary to placental insufficiency. Placental telomere length measurement during ongoing pregnancies complicated by intrauterine growth restriction has never been reported. This was the main objective of our study. *Method*: In our center, late chorionic villus samplings were performed between 18 and 37 weeks of amenorrhea in 24 subjects with severe intrauterine growth restriction (cases) and in 28 subjects with other indications for prenatal diagnosis (controls). Placental insufficiency was assessed by histo-pathological examination. Relative measurement of telomere length was carried out prospectively by quantitative Fluorescent *In Situ* Hybridization using fluorescent Peptide Nucleic Acid probes on interphase nuclei obtained from long-term cultured villi and with an automated epifluorescent microscope. A quantitative Polymerase Chain Reaction technique was performed to confirm the quantitative Fluorescent *In Situ* Hybridization results. The number of copies of gene loci encoding the RNA template (*hTERC*) and the catalytic subunit (*hTERT*) of the enzyme complex telomerase were also estimated in these placentas by Fluorescent *In Situ* Hybridization. *Results*: Mean fluorescence intensity of telomere probes estimated by quantitative Fluorescent *In Situ* Hybridization was significantly less for cases compared to controls ($p < 0.001$). This result indicated that mean telomere length was significantly reduced in placentas during pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. Reduced telomere length was confirmed by the quantitative Polymerase Chain Reaction technique. No copy number variation of the *hTERC* and *hTERT* loci was noticed for cases, or for controls. *Conclusion*: This study clearly demonstrates a reduction of placental telomere length in ongoing pregnancies (from 18 to 37 weeks of amenorrhea) complicated by severe intrauterine growth restriction secondary to placental insufficiency.

INTRODUCTION

Intrauterine growth restriction (IUGR) is a common complication of pregnancy which can be defined as the failure of the fetus to reach the size for which it is genetically programmed [1,2]. In common practice, IUGR is usually detected from 20 weeks of amenorrhea (WA) onwards and is diagnosed when fetal biometrics are less than the tenth percentile [3]. Theoretically therefore, IUGR is diagnosed in 10% of pregnancies. IUGR is associated with an increase in infant mortality and with childhood and adult morbidity, with an increased risk of cardiovascular illness, obesity, and type 2 diabetes [4,5]. The diagnosis and medical care of IUGR therefore represent a key issue for public health.

IUGR can be caused by infectious agents, chromosomal or genetic abnormalities, congenital malformations or maternal smoking; however, in the majority of cases, it is secondary to placental insufficiency [6,7]. There are often complications with these IUGRs in the third trimester of pregnancy, with clinical-biological signs of preeclampsia [8]. The physiopathology of IUGRs associated with placental insufficiency is not fully understood, but these pathologies are usually the result of a failure of trophoblast invasion, which notably results in an intermittent blood flow of the intervillous space [1,9,10]. This in turn contributes locally to produce oxidative stress [10].

Telomeres are located at the ends of chromosomes comprising a repeating hexamer sequence TTAGGG and associated proteins [11,12,13]. Physiologically, telomeres are mainly involved in chromosome stabilization, protecting them from end-to-end fusion or degradation. The aging of somatic cells generates a gradual decrease in the length of their telomeres. Ultimately this process results in mitotic cell division coming to an end and the cell enters senescence and/or apoptosis [12,13]. The telomere length of some cells, such as hematopoietic stem cells or germ cells, is maintained, however, thanks to the activity of the enzyme complex telomerase [14]. This enzyme consists notably of a fragment of RNA template, coded by *hTERC* (carried on locus 3q26.2), and a catalytic subunit, coded by *hTERT* (carried on locus 5p15.33). Telomere length has been assessed in different tissues and has been shown to vary from one tissue to another [12]. Apart from the influence of tissues, telomere length can also be modified by environmental factors, and it is now recognized that oxidative stress can cause a significant shortening of telomere length [15]. It has been suggested that the measurement

of telomere length could be used as a biological marker for tissues suffering oxidative stress [12,15,16].

On the basis of all these points, two teams recently measured telomere length in placentas collected at delivery from pregnancies complicated by IUGR secondary to placental insufficiency [17,18]. Interestingly, these authors were able to show that telomere length was significantly reduced in these placentas.

In addition, one team reported that in placentas collected at delivery from pregnancies complicated by IUGR, no copy number variations of the *hTERC* gene were observed, whereas in the controls, there were gains of the locus encoded to *hTERC* [19]. This surprising result, obtained from only a small number of placentas (5 placentas with IUGR and 5 placentas as controls), support a relative loss of *hTERC* gene copy number in placentas with IUGR that could contribute to the reduction of telomere length.

However all the above telomere length measurements had been performed in placentas collected at delivery from pregnancies complicated by IUGR and not on villus material obtained from ongoing pregnancies. The primary aim of this study was therefore to estimate placental telomere length during pregnancies complicated by severe IUGR in subjects who underwent prenatal diagnosis by late chorionic villus sampling (CVS).The secondary objective of the study was to evaluate the placental copy number of loci carrying *hTERC* and *hTERT* in a larger cohort.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The research protocol for this study, the relief of oral information to the patient and oral consent recording by the physician had been approved by the Bordeaux University Hospital's Institutional Review Board. The study was based on remaining biological samples discarded after the medical routine care. All samples and data had been anonymized.

Subjects

This prospective monocentric study was carried out between November 2010 and January 2012. Fifty-two subjects were included whose pregnancies were between 17 WA + 6 days and 37 WA + 2 days and for whom an invasive prenatal diagnosis was indicated. Among these subjects, 24 had severe IUGR (i.e. with fetal biometrics less than the third percentile and without cytomegalovirus infection, congenital malformation or maternal smoking) (cases). There were 28 controls for this study. These were subjects who did not have a fetus with IUGR and who had undergone prenatal diagnosis for advanced maternal age, second trimester maternal serum screening (risk > 1/250 of having a child with trisomy 21), family history of chromosome or gene abnormalities (prenatal diagnosis for "antecedent"), isolated anomaly under ultrasound, and who were non-smokers (controls). As telomere length was shown to be reduced in trisomy 21 amniocytes, cases and controls were informed of the possibility of finding a cytogenetic abnormality with the Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique to detect the main aneuploidies and/or after the conventional karyotyping and that they would be excluded from this study if so [20].

The following information was recorded: maternal age, gestational age, number of pregnancies (gravida), number of children (para), pregnancy term and birth weight, also any clinical-biological signs of preeclampsia in the course of the pregnancy (high maternal blood pressure associated with proteinuria) [21].

Chorionic villus sampling

The 52 subjects in the study were offered prenatal diagnosis by late CVS. Extra-amniotic placental villi were sampled trans-abdominally by experienced physicians from our fetal medicine center [22]. The amount of placental villi sampled was greater than 30 mg for each biopsy [23].

The villi samples were then divided up to perform the following analyses: cytogenetic analysis (rapid detection of the main aneuploidies and conventional karyotyping), standard histo-pathological examination (for cases with IUGR), estimation of placental telomere length (using a quantitative FISH (Q-FISH) technique and a quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) technique), and evaluation of copy number of the loci carrying *hTERC* and *hTERT*.

Cytogenetic examination

For each placental biopsy, a rapid cytogenetic examination was carried out to detect the main aneuploidies (i.e. anomalies in chromosomes 13, 18, 21 and the gonosomes) using a FISH technique (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA). To ensure reliable cytogenetic results, this FISH technique was performed on cells from the mesenchymal core of the placental villi after enzymatic digestion of villi by trypsin then by collagenase [24,25]. Conventional karyotyping was established on cultured placental villi, after Giemsa staining and heat denaturation ('R-bands') at a level of resolution of about 400 bands per haploid set.

Histo-pathological examination

A standard histo-pathological examination was carried out on the placental villi of cases with IUGR after the samples were first fixed with buffered formalin then embedded in paraffin. Sections were performed and hematoxylin-eosin-saffron staining was carried out. The main placental histo-pathological characteristics associated with IUGR secondary to placental insufficiency were examined: presence of villi that were small in size, perivillous nuclear clusters (i.e. presence of syncytial knots) and perivillous fibrin deposition [26,27,28,29].

Estimating placental telomere length

After the cytogenetic and histo-pathological examinations, surplus placental villi were used to estimate placental telomere length.

About 5 mg of the placental villi were cultured on Labtek^{TM} chamber slides (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) [30]. After 5 to 10 days, the cells were harvested and fixed with a mixture of acetic acid and methanol (2:3, v/v). Placental telomere length in these preparations was estimated using a Q-FISH technique using Peptide Nucleic Acid (PNA) fluorescent

probes. The slides were successively immersed in a solution of Tris Buffered Saline (TBS) 1X for 2 minutes, in a solution of 3.7% formaldehyde for 2 minutes, in a solution of TBS 1X for 10 minutes, in a solution of proteinase K for 10 minutes, and in a solution of TBS 1X for 10 minutes (Dako, Glostrup, Denmark). The nucleic acids were then denatured for 3 minutes in a 70% concentration formamide solution and warmed to 71°C in a water bath with thermostat control. At the same time, PNA fluorescent probes targeting the telomere sequences and stained with Cyanine 3 (Panagene, Daejeon, Korea) were denatured for 5 minutes in a water bath warmed to 81°C. The denatured probes were then placed on the Labtek™ chamber slides, and these were all put into a Hybrite™ automated co-denaturation oven (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) at 30°C for 1.5 hours to hybridize the telomere probes on the nucleic acids. The slides were then successively immersed in a rinse solution for 1 minute and in a wash solution warmed to 65°C for 5 minutes (Dako, Glostrup, Denmark). After counterstaining the nucleic acids with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), the slides were placed under an Axio Imager 2 microscope with an epi-fluorescence source (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). The microscope was linked to the Metafer 4 software for automated image acquisition and processing (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Germany). The automated microscope was programmed to acquire 1000 correctly hybridized interphase nuclei. For each of these nuclei, total telomere fluorescence intensity of PNA probes was recorded. The arithmetic mean of total telomere fluorescence intensities of PNA probes was then used for each preparation. The higher the mean telomere fluorescence intensity of PNA probes, the longer the telomere length was assumed to be. The intra-assay and inter-assay variability for the Q-FISH technique were 10.2% and 14.3%, respectively.

The remaining surplus placental villi were cultured in flasks. After 10 to 20 days, the cell cultures that had reached confluence were detached using trypsin and the cell pellets were preserved at -20°C until cellular DNA was extracted using a saline method described previously [31]. The extracted DNA was preserved at -80°C until telomere length was estimated using a Q-PCR technique, as described previously [32]. Briefly, this technique was based on telomere primers ("telg" (sense), 5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3'; "telc" (anti-sense), 5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA-3'), primers surrounding a reference gene (in this study we used the *prostate-specific antigen* (*PSA*) gene, sense, 5'-AGGCTGGGGCAGCATTGAAC-3'; anti-sense, 5'-

CACCTTCTGAGGGTGAACTTG-3') (Eurogentec SA, Seraing, Belgium) and a Brilliant III Ultra-Fast SYBR^{TM} Green QPCR Master Mix solution (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Estimation of telomere length by Q-PCR was performed using the Stratagene Mx3005p system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the PCR cycles described previously [32]. Ct measurements were performed in duplicate and for each subject the mean ratio (1/Efficiency "telomere primers"$^{Ct\ "tel"}$)/(1/Efficiency "PSA primers"$^{Ct\ "PSA"}$) was calculated, called here the "T/S ratio", as described previously [33]. The higher the T/S ratio, the longer the telomere length was assumed to be. The intra-assay and inter-assay variability for the Q-PCR technique were 7.24% and 11.7%, respectively.

Copy number of the loci carrying *hTERC* and *hTERT*

A copy number evaluation of the loci carrying *hTERC* (locus 3q26.2) and *hTERT* (locus 5p15.33) was performed using a FISH technique with bacterial artificial chromosome (BAC) probes RP11-816J6 (locus 3q26.2) and RP11-117B23 (locus 5p15.33), respectively (BlueGnome, Cambridge, UK). The control probes used in this study were BAC probes RP11-16N5 (locus 3q13.13) for *hTERC,* and RP11-19F12 (locus 5p13.1) for *hTERT* (BlueGnome, Cambridge, UK). The Labtek^{TM} chamber slides used originally to estimate telomere length by the Q-FISH technique were next used to evaluate the copy number of the loci of interest. Twelve of the Labtek^{TM} chamber slides prepared for the 24 cases with an IUGR and 12 prepared for the 28 controls were randomly selected. After denaturation of the nucleic acids and the probes for 5 minutes in 70% formamide solutions, the different mixtures from the BAC probes ("locus *hTERC* probe + control probe"; "locus *hTERT* probe + control probe") were successively hybridized at 37°C overnight on the 24 selected slides. The Metafer 4 software was reprogrammed in order to count the number of signals from each probe. Three hundred correctly hybridized interphase nuclei were selected by the automated microscope. In these nuclei, the ratio between the number of probes of interest and the number of control probes gave the percentage of interphase nuclei showing an absence of gain or loss of the loci examined (i.e. as many signals from probes of interest as signals from control probes), the percentage showing relative losses of the locus of interest (e.g. two signals from the locus of interest and three signals from the control locus), the percentage showing relative gains of the locus of interest (e.g. two signals from the locus of interest and one signal from the control locus) and the percentage showing absolute gains of the locus of

interest (i.e. three signals or more from the locus of interest and two signals from the control locus).

Statistics

Distributions of the Q-FISH and Q-PCR measurements were tested for normality with the Shapiro-Wilk test. Univariate analyses of quantitative variables were performed using either the Student's t-test , the Wilcoxon-Mann Whitney test or the Pearson's correlation test, whichever was appropriate. A multivariate analysis was carried out using a logistic regression to estimate the influence of certain covariates (maternal age, number of pregnancies, number of children and term of placental biopsy) on the mean telomere fluorescence intensity of PNA probes observed with the Q-FISH technique. The significance level was set at an á level of 0.05 and STATA 8.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) and R (www.r-project.org) softwares were used for statistical analyses.

RESULTS

Subjects, cytogenetic and histo-pathological examinations

The characteristics of the subjects and their pregnancies are summarized in Table 1. Maternal age was significantly lower for cases (29 ± 7, mean ± standard deviation (SD), years) compared to controls (34 ± 7, mean ± SD, years) ($p < 0.05$), probably due to the high number of controls who had performed prenatal diagnosis for advance maternal age (10/28 = 35.7%) (Table 1). There was no statistically significant difference in number of pregnancies (gravida), number of children (para) and term of placental biopsy between cases with an IUGR and controls (p = non-significant (NS), Student's t-test or Wilcoxon-Mann Whitney test) (Table 1). Cytogenetic analysis (rapid detection of the main aneuploidies by FISH and conventional karyotyping) did not show any fetal chromosomal abnormalities in the subjects of the study. In 21 of the 24 placentas of cases with IUGR (87.5%), standard histo-pathological examination of the placental villi showed morphological characteristics compatible with an IUGR secondary to placental insufficiency. As expected, birth term was earlier and birth weight was lower in cases with an IUGR compared with the controls ($p < 0.01$, Student's t-test) (Table 1). Of the 24 cases with an IUGR, 3 (12.5%) presented clinical-biological signs of preeclampsia during their pregnancy. None of the controls developed clinical-biological signs of preeclampsia.

Estimation of placental telomere length

Figure 1A illustrates the telomere fluorescence intensities of PNA probes as a function of pregnancy term of placental biopsy for the cases with IUGR and the controls (Q-FISH technique). The placental telomere fluorescence intensities followed a normal distribution (p = NS, Shapiro-Wilk test). The mean placental telomere fluorescence intensity of PNA probes was less in the cases with an IUGR (4336 ± 553, mean ± SD, arbitrary units) compared with the controls (5166 ± 1003, mean ± SD, arbitrary units) ($p < 0.001$, Student's t-test) (Figure 2A). The mean telomere fluorescence intensity of PNA probes was thus 16.1% less in the placentas of cases with an IUGR. Multivariate analysis by logistic regression (adjustment for maternal age, number of pregnancies, number of children, and term of placental biopsy) confirmed the decrease in placental telomere fluorescence intensity in cases with an IUGR ($p < 0.001$). Multivariate analysis also revealed that the covariates selected (maternal age, number of pregnancies, number of children and term of placental biopsy) had no influence on placental telomere length (p = NS). The results of the multivariate analysis could be

interpreted as follows, a decrease of 1000 arbitrary units of placental telomere fluorescence with the Q-FISH technique would predispose to a 4 times higher risk of severe IUGR.

Figure 1B illustrates the T/S ratios as a function of pregnancy term of placental biopsy for the cases with IUGR and the controls (Q-PCR technique). The T/S ratios followed a normal distribution (p = NS, Shapiro-Wilk test). The Q-PCR technique confirmed that mean placental telomere length was reduced in the cases with an IUGR (ratio T/S: 0.78 ± 0.26, mean ± SD, no unit) compared with the controls (T/S ratio: 1.19 ± 0.40, mean ± SD, no unit) ($p < 0.001$, Student's t-test) (Figure 2B). The mean T/S ratio was therefore 34.5% less in the placentas of the cases with an IUGR. Q-PCR and Q-FISH results were significantly associated ($p = 0.026$, Pearson's correlation test).

Regarding the term of placental biopsy, no influence on placental telomere fluorescence intensity or T/S ratios was observed for either cases with IUGR, controls or all subjects in this study (cases + controls) (p = NS, Pearson's correlation test).

Copy number of the loci carrying *hTERC* and *hTERT*

There was no difference in the hybridization profiles of the BAC probe targeting the locus carrying *hTERC* between cases with an IUGR and the controls (p = NS, Wilcoxon-Mann Whitney test); in particular, no gains of this locus were observed in the 24 placentas studied (Figure 3A). The same was true for the BAC probe targeting the locus carrying *hTERT* (p = NS, Wilcoxon-Mann Whitney test) (Figure 3B).

DISCUSSION

In our fetal medicine center, more than 80% of our prenatal diagnoses consist of early and late CVS, rather than amniocentesis, whatever the pregnancy term [22,34]. For 30 years, we have therefore performed more than 26,000 early and late CVS [22]. These procedures have notably the advantage of providing a conventional karyotype after 6-8 days culture, which is quicker than with amniocentesis [22]. In addition, we propose a prenatal diagnosis by late CVS to patients with an idiopathic IUGR, rather than by amniocentesis, the aim being, on the one hand, to look for a confined placental mosaicism which could explain the fetal growth restriction and, on the other hand, to perform a standard histo-pathological examination to provide arguments supporting a placental origin of the IUGR [27,30].

The Q-FISH technique was used successfully on all the Labtek^{TM} chamber slides prepared from the placental biopsies. It showed that mean placental telomere length was reduced between 18 and 37 WA in pregnancies with severe IUGR. Gestational age at the term of placental biopsy had no influence on telomere length. This result could notably suggest that the reduction of placental telomere length takes place early in the pregnancies with an IUGR secondary to placental insufficiency. Reduced placental telomere length does not appear to be only a late phenomenon, appearing towards the end of pregnancies with an IUGR, as initially reported [17,18].

Results from placental telomere length estimation using the Q-FISH technique were confirmed by the Q-PCR technique. It was interesting to note that the difference in mean telomere length between the cases with IUGR and the controls was much greater with Q-PCR (mean difference 34.5%) than with Q-FISH (mean difference 16.1%), which seems to indicate that the Q-PCR technique is probably more sensitive for estimating telomere length than the Q-FISH technique. Indeed, the Q-PCR technique that we used had been described previously as having some good characteristics and it had also been suggested that estimating telomere length by an automated Q-FISH technique could be biased by the auto-fluorescence of preparations [11,35]. This could account for the lower performance of the Q-FISH technique in showing the difference in telomere length between our cases with IUGR and our controls. In future, it will therefore probably be advisable to prefer the Q-PCR technique that we used here to estimate placental telomere length.

We observed no placental copy number variation of the locus carrying *hTERC* in our cases with IUGR and in our controls. This result are at clear variance with those reported by Biron-Shental *et al.* who stated that the number of copies of the locus carrying *hTERC* was less in placentas collected at delivery from pregnancies complicated by an IUGR secondary to placental insufficiency [19]. Indeed, they observed that gains of this locus were present in over 8% of interphase nuclei in placentas at delivery in their controls, whereas these gains were only found in about 3% of interphase nuclei in placentas collected at delivery from their cases with IUGR. The authors then hypothesized that *hTERC* gains could be a physiological process that takes place in the placenta and that such phenomenon could be altered in pregnancies with an IUGR. However, these authors studied 5 placental villi collected at delivery from pregnancies with an IUGR and 5 collected at delivery from control pregnancies. In our study of a larger cohort (12 samples for each group), the number of signals from BAC probes was automatically counted from 300 interphase nuclei. With this method we were unable to confirm the presence of *hTERC* gains in the placenta during our control pregnancies and visual inspection of our slides did not also detect such phenomemon.

We also aimed at determining the copy number of the locus carrying *hTERT* gene. Indeed, it has been shown that TERT expression is closely correlated with the presence of telomerase activity in the placenta [36]. In patients with an IUGR, some authors have noted an absence of telomerase activity in the placenta related to reduced TERT expression, whereas telomerase activity and TERT expression were maintained in placentas in pregnancies without complications [17,18,37]. TERT expression would be a limiting factor on telomerase activity at placental level, and as a result, its lower expression could account for the reduction of telomere length that we report during pregnancies with an IUGR secondary to placental insufficiency. Although we have not considered TERT expression here, our study did not find any placental copy number variation affecting the locus carrying the *hTERT* gene. The reduced TERT expression in the placenta is likely linked with a down-regulation of *hTERT* or with alternative RNA splicing of transcripts of this gene in cases of IUGR [37].

In this study we have only estimated telomere length in the placenta. It would be interesting also to study telomere length in amniocytes during pregnancies complicated by an IUGR. Davy *et al.* demonstrated that, at delivery, cord blood cell telomere length was identical in pregnancies with an IUGR and in control pregnancies, whereas placental telomere length was

reduced in the cases with IUGR [17]. Based on such results, one would hypothesize that telomere length would not be reduced in amniocytes during pregnancies complicated by IUGR but such fact remains to be determined.

In summary, this study is the first to show that placental telomere length is reduced during pregnancy in patients with a severe IUGR secondary to placental insufficiency, and that this is the case from 18 to 37 weeks of amenorrhea. This placental telomere reduction in pregnancies with IUGR is consistent with studies that identified oxidative stress and a lack of telomerase activity in these placentas [10,18,37]. The absence of this activity is likely to be explained by a decrease in the expression of TERT [18,19,36,37]. Therefore, telomerase activity together with TERT expression has to be investigated in such placentas in order to evaluate the usefulness of these markers in the pathophysiology and the diagnosis of IUGR.

REFERENCES

[1] Miller J, Turan S, Baschat AA (2008) Fetal growth restriction. Semin Perinatol 32: 274-280.

[2] Militello M, Pappalardo EM, Ermito S, Dinatale A, Cavaliere A, Carrara S (2009) Obstetric management of IUGR. J Prenat Med 3 :6-9.

[3] Barker DJ (1995) Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today 9: 418-423.

[4] Barker DJ (2006) Adult consequences of fetal growth restriction. Clin Obstet Gynecol 49: 270-283.

[5] Figueras F, Gardosi J (2011) Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. Am J Obstet Gynecol 204: 288-300.

[6] Ghidini A (1996) Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. Obstet Gynecol Surv 51: 376-382.

[7] Sankaran S, Kyle PM (2009) Aetiology and pathogenesis of IUGR. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 23: 765-777.

[8] Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. Lancet 365: 785-799.

[9] Tsatsaris V, Fournier T, Winer N (2008) Pathophysiology of preeclampsia. J Gynecol Obstet Biol Reprod 37: 16-23.

[10] Tuuli MG, Longtine MS, Nelson DM (2011) Review: Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy. Placenta 32 Suppl 2: S109-118.

[11] O'Sullivan JN, Finley JC, Risques RA, Shen WT, Gollahon KA, Moskovitz AH, Gryaznov S, Harley CB, Rabinovitch PS (2004) Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms. Cytometry A 58: 120-131.

[12] Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ (2008) Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? Free Radic Biol Med 44: 235-246.

[13] Zhu H, Belcher M, van der Harst P (2011) Healthy aging and disease: role for telomere biology? Clin Sci (Lond) 120: 427-440.

[14] Nicholls C, Li H, Wang JQ, Liu JP (2011) Molecular regulation of telomerase activity in aging. Protein Cell 2: 726-738.

[15] von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 27: 339-344.

[16] Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, Taylor RN (2012) Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. PLoS One 7: e31136.

[17] Davy P, Nagata M, Bullard P, Fogelson NS, Allsopp R (2009) Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. Placenta 30: 539-542.
[18] Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, Amiel A (2010) Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 202: 381.e1-7.
[19] Biron-Shental T, Kidron D, Sukenik-Halevy R, Goldberg-Bittman L, Sharony R, Fejgin MD, Amiel A (2011) TERC telomerase subunit gene copy number in placentas from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. Early Hum Dev 87: 73-75.
[20] Sukenik-Halevy R, Biron-Shental T, Sharony R, Fejgin MD, Amiel A (2011) Telomeres in trisomy 21 amniocytes. Cytogenet Genome Res 135: 12-18.
[21] Backes CH, Markham K, Moorehead P, Cordero L, Nankervis CA, Giannone PJ (2011) Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. J Pregnancy 2011: 214365.
[22] Saura R, Toutain J, Horovitz J (2010) A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24 000 consecutive cases. Prenat Diagn 30: 387-388.
[23] Newport M, Coleman DV, McPherson K (1986) Estimation of the weight of chorionic villus samples obtained from first trimester pregnancies by transcervical aspiration. Prenat Diagn 6: 265-269.
[24] Toutain J, Soler G, Horovitz J, Saura R (2011) Prenatal diagnosis on chorionic villi using molecular techniques should be performed from mesenchymal core rather than from direct villi. Prenat Diagn 31: 1111-1112.
[25] Toutain J, Epiney M, Begorre M, Dessuant H, Vandenbossche F, Horovitz J, Saura R (2010) First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 149: 143-146.
[26] Roberts DJ, Post MD (2008) The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. J Clin Pathol 61: 1254-1260.
[27] Carles D, Pelluard F, Mangione R, Liquier A, Horovitz J, Saura R (2009) Advantages and limitations of chorionic villous sampling. Bull Acad Natl Med 193: 675-689.

[28] Tomas SZ, Roje D, Prusac IK, Tadin I, Capkun V (2010) Morphological characteristics of placentas associated with idiopathic intrauterine growth retardation: a clinicopathologic study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 152: 39-43.
[29] Vedmedovska N, Rezeberga D, Teibe U, Melderis I, Donders GG (2011) Placental pathology in fetal growth restriction. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 155: 36-40.
[30] Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R (2010) Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. Prenat Diagn 30: 1155-1164.
[31] Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguiet G, Sobotka J, Vergier B, Belaud-Rotureau MA, Beylot-Barry M, Merlio JP (2007) Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. Genes Chromosomes Cancer 46: 828-838.
[32] Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res 30: e47.
[33] Simon P (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics 19: 1439-1440.
[34] Brun JL, Mangione R, Gangbo F, Guyon F, Taine L, Roux D, Maugey-Laulom B, Horovitz J, Saura R (2003) Feasibility, accuracy and safety of chorionic villus sampling: a report of 10741 cases. Prenat Diagn 23: 295-301.
[35] Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E (2011) Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. Nucleic Acids Res 39: e134.
[36] Nishi H, Ohyashiki K, Fujito A, Yahata N, Ohyashiki JH, Isaka K, Takayama M (1999) Expression of telomerase subunits and localization of telomerase activation in hydatidiform mole. Placenta 20: 317-323.
[37] Izutsu T, Izutsu N, Iwane A, Takada A, Nagasawa T, Kanasugi T, Sugiyama T (2006) Expression of human telomerase reverse transcriptase and correlation with telomerase activity in placentas with and without intrauterine growth retardation. Acta Obstet Gynecol Scand 85: 3-11.
[38] Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). Mol Cell Biol 24: 6076-6083.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Placental telomere length estimated from late chorionic villus samplings by two quantitative techniques. A. Quantitative Fluorescence *In Situ* Hybridization (Q-FISH). Telomere fluorescence intensity of Peptide Nucleic Acid probes (arbitrary units) as a function of pregnancy term of placental biopsy (expressed in weeks of amenorrhea (WA)) for the 28 controls (light grey circles) and the 24 cases with intrauterine growth restriction (IUGR) (dark grey circles). B. Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR). T/S ratios (no unit) as a function of pregnancy term of placental biopsy (expressed in WA) for the 28 controls (light grey circles) and the 24 cases with IUGR (dark grey circles).

Figure 2: Comparison of placental telomere length between controls and cases with intrauterine growth restriction (IUGR), with two quantitative techniques. A. Quantitative Fluorescence *In Situ* Hybridization (Q-FISH). Mean placental telomere fluorescence intensity of Peptide Nucleic Acid probes with the Q-FISH technique ± standard deviation (arbitrary units) for the 28 controls (light grey histogram) and the 24 cases with IUGR (dark grey histogram) (**: $p < 0.001$, Student's t-test). B. Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR). Mean placental telomere T/S ratio with the Q-PCR technique ± standard deviation (no unit) for the 28 controls (light grey histogram) and the 24 cases with IUGR (dark grey histogram) (**: $p < 0.001$, Student's t-test).

Figure 3: Copy number evaluation by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) of the loci carrying *hTERC* and *hTERT* in late chorionic villus samplings. A. Percentage of interphase nuclei displaying no gain or loss, relative losses, relative gains, and absolute gains of *hTERC* locus with the FISH technique ± standard deviation (%) for 12 controls (light grey histograms) and 12 cases with intrauterine growth restriction (IUGR) (dark grey histograms) randomly selected ($p =$ non-significant (NS), Student's t-test). B. Percentage of interphase nuclei displaying no gain or loss, relative losses, relative gains, and absolute gains of *hTERT* locus with the FISH technique ± standard deviation (%) for 12 controls (light grey histograms) and 12 cases with IUGR (dark grey histograms) randomly selected ($p =$ NS, Student's t-test).

TABLES

Table 1: Main characteristics of the subjects and their pregnancies.

Characteristics	Controls (n=28)	Cases with IUGR (n=24)	p-value
Indication for prenatal diagnosis (n, %)	- Advanced maternal age (10/28, 35.7) - Second trimester MSS (4/28, 14.3) - Antecedent (3/28, 10.7) - US anomaly (11/28, 39.3)	Severe IUGR (24/24, 100)	
Maternal age (years) (mean ± SD)	34 ± 7	29 ± 7	< 0.05
Gravida (n) (median (Q1-Q3))	3 (2-3)	2 (1-3)	NS
Para (n) (median (Q1-Q3))	1 (0-2)	1 (0-2)	NS
CVS term (WA) (mean ± SD)	27 ± 6	29 ± 5	NS
Pregnancy term (WA) (mean ± SD)	39 ± 2	36 ± 2	< 0.01
Birth weight (g) (mean ± SD)	3299 ± 719	1932 ± 458	< 0.001

CVS: chorionic villus sampling; g: grams; IUGR: intrauterine growth restriction; MSS: second trimester maternal serum screening; NS: non-significant; US: ultrasound; WA: weeks of amenorrhea.

Figure 1

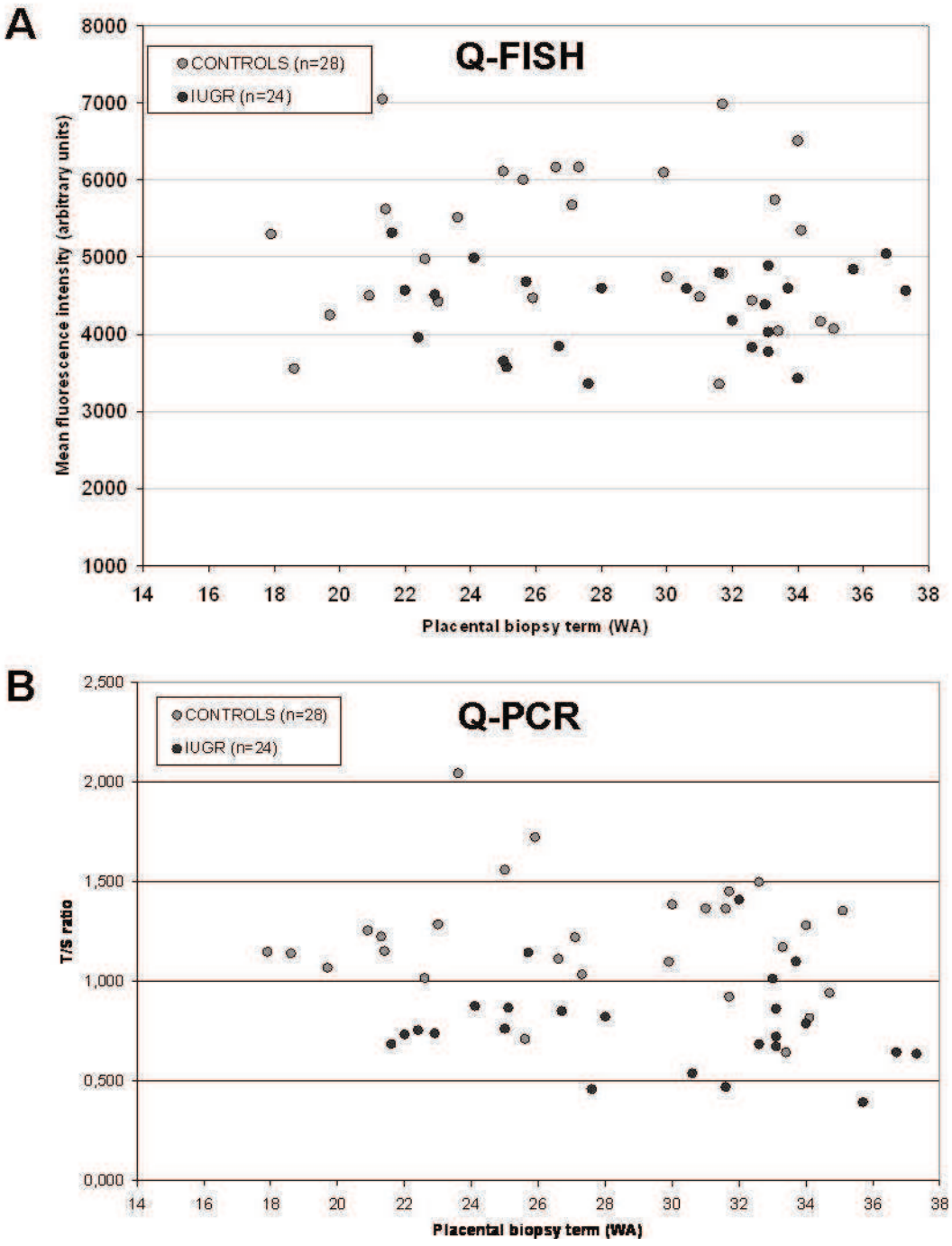

A
Q-FISH
CONTROLS (n=28)
IUGR (n=24)
Mean fluorescence intensity (arbitrary units)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
Placental biopsy term (WA)
B
Q-PCR
CONTROLS (n=28)
IUGR (n=24)
T/S ratio
2,500
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
Placental biopsy term (WA)

Figure 2

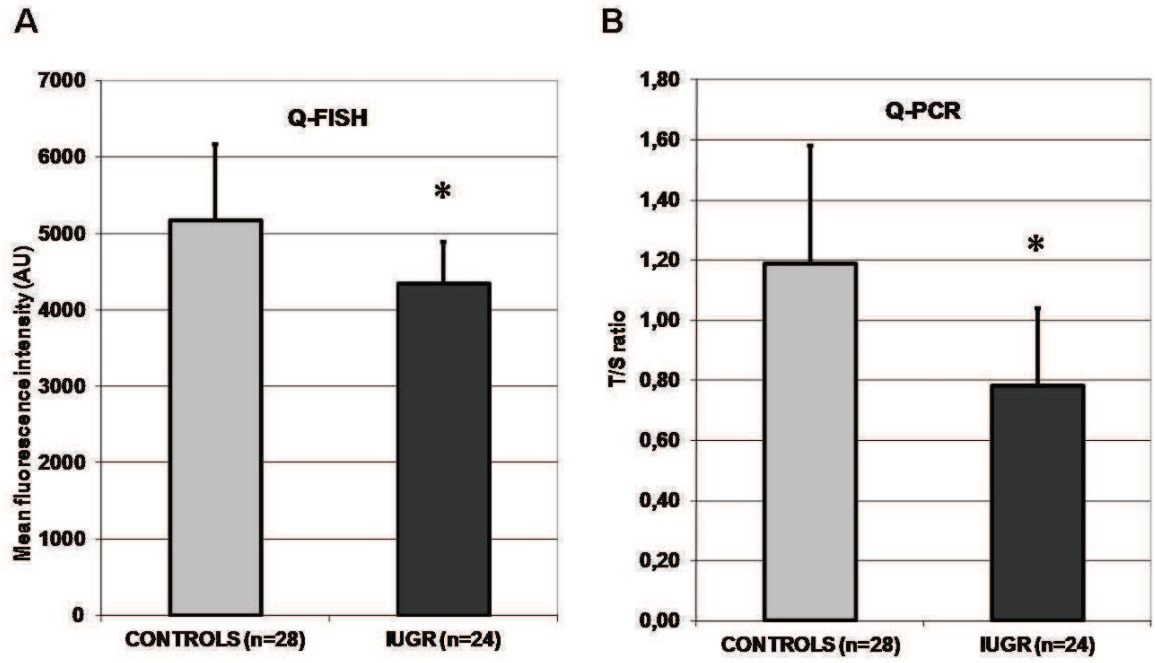
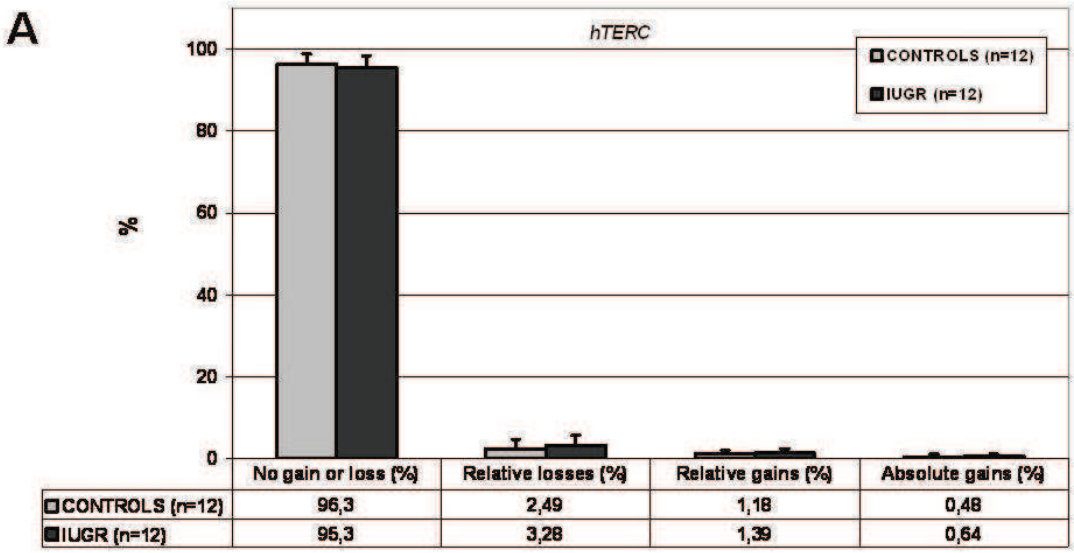
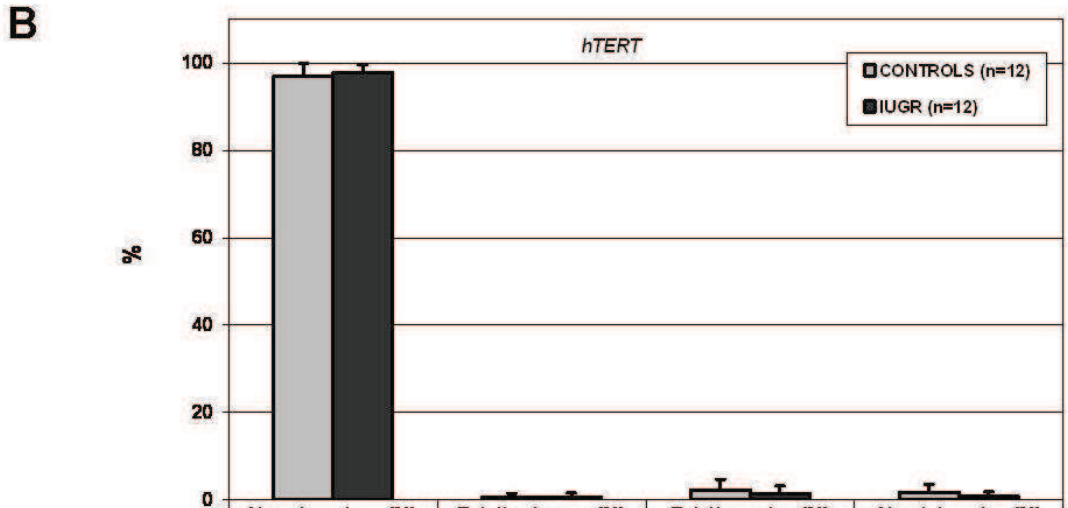

A
Q-FISH
Mean fluorescence intensity (AU)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
CONTROLS (n=28)
IUGR (n=24)
B
Q-PCR
T/S ratio
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
*
CONTROLS (n=28)
IUGR (n=24)

Figure 3



	No gain or loss (%)	Relative losses (%)	Relative gains (%)	Absolute gains (%)
CONTROLS (n=12)	96,3	2,49	1,18	0,48
IUGR (n=12)	95,3	3,28	1,39	0,64



	No gain or loss (%)	Relative losses (%)	Relative gains (%)	Absolute gains (%)
CONTROLS (n=12)	96,9	0,74	2,32	1,77
IUGR (n=12)	97,9	0,68	1,47	0,75

4 Conclusion générale et perspectives

L'étude du placenta humain au cours de la grossesse nécessite habituellement la réalisation de biopsies de villosités choriales ou placentaires. Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, ces biopsies ne peuvent être pratiquées, pour des raisons éthiques évidentes, qu'en cas d'indication de diagnostic prénatal invasif.

En France, dans ces indications, une amniocentèse est dans l'immense majorité des cas proposée et pratiquée. Ainsi, dans les centres français, une amniocentèse est effectuée dans plus de 80% des diagnostics prénatals invasifs (Saura *et al.*, 2010a). Les choriocentèses et placentocentèses représentent moins de 20% des techniques invasives de prélèvements utilisées en diagnostic prénatal sur notre territoire. Il est en outre à signaler que dans ces centres, lorsqu'une choriocentèse ou une placentocentèse est pratiquée, la quantité de fragments villositaires prélevée est le plus souvent réduite, « *permettant à peine de réaliser les examens (cyto)génétiques nécessaires au soin courant des patientes* » (Saura *et al.*, 2010a). Ainsi, ces biopsies ne permettent habituellement pas de disposer de reliquats de villosités, nécessaires à la réalisation de certains projets de recherche.

Dans notre centre de Médecine Fœtale, nous avons la particularité de réaliser plus de 90% des diagnostics prénatals par choriocentèse ou placentocentèse (Saura *et al.*, 2010a ; Saura *et al.*, 2010b). La technique de biopsie placentaire utilisée dans notre centre a été mise en place en 1983. Depuis cette date, la technique de biopsie a connu des évolutions successives, et plus de 26000 biopsies ont été effectuées dans notre centre à ce jour (Saura *et al.*, 2010b). L'« expérience bordelaise » acquise nous permet aujourd'hui d'obtenir une très bonne qualité et une grande quantité de fragments villositaires (quantité supérieure à 25 mg dans la majorité des cas), sans risque iatrogène accru. Nous avons ainsi la possibilité de disposer de reliquats de villosités choriales ou placentaires, indispensables notamment afin d'étudier la longueur télomérique placentaire par la technique de Q-FISH rapportée dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Dans notre centre, la réalisation *quasi* systématique d'une biopsie de villosités choriales ou placentaires nous a permis d'effectuer l'importante étude monocentrique rétrospective des ACLP présentée dans la première partie de ce travail. Il est à noter que nous rapportons ici la plus grande étude monocentrique à ce sujet. Le caractère monocentrique de l'étude nous a

permis de recueillir une information homogène concernant les examens (cyto)génétiques et les issues des grossesses. Ceci a largement contribué à permettre de préciser l'influence respective des ACLP de type 2 et de type 3 sur la croissance fœtale (Toutain *et al.*, 2010b). Précédemment, deux importantes études traitant des discordances fœtoplacentaires n'avaient pas réussi à identifier les différences que nous rapportons entre les issues des grossesses compliquées d'une ACLP de type 2 et de type 3 (Hahnemann et Vejerslev, 1997 ; Grati et *al.*, 2006 ; Toutain *et al.*, 2010b). Ceci pouvait être dû au fait que ces deux études étaient des études multicentriques impliquant de nombreux centres (jusqu'à 85 centres dans l'étude de Grati *et al*.) ayant des pratiques diagnostiques souvent différentes ne permettant pas toujours de recueillir une information homogène (Hahnemann et Vejerslev, 1997 ; Grati et *al.*, 2006).

Les mécanismes physiopathologiques responsables de l'altération de la croissance fœtale en cas d'ACLP de type 3 ne sont, à notre connaissance, pas encore élucidés. Peu d'études se sont intéressées aux caractéristiques histo-pathologiques des placentas en cas d'ACLP (Young *et al.*, 2009 ; Goodfellow *et al.*, 2011). L'étude de Young *et al.*, effectuée à partir de 69 placentas provenant de grossesses compliquées d'une ACLP, n'avait pas identifié d'altération morphologique évidente à l'examen anatomopathologique standard de ces placentas (Young *et al.*, 2009). Goodfellow et *al.*, avaient quant à eux décrit les caractéristiques histo-pathologiques placentaires d'une ACLP avec une « double trisomie » (trisomies 12 et 15 limitées au placenta). Ces auteurs avaient alors identifié des villosités avec un diamètre élargi et présentant des artérioles avec un excès de muscle lisse (Goodfellow *et al.*, 2011). A l'avenir, il pourrait être intéressant de réaliser un examen anatomopathologique des placentas à l'issue des grossesses compliquées d'une ACLP de type 2 et de type 3, afin de rechercher des éléments placentaires pouvant expliquer les RCIU observés en cas d'ACLP de type 3.

La deuxième partie de ce travail s'intéressait à l'estimation de la longueur télomérique placentaire au cours de grossesses évolutives chez des patientes présentant un RCIU secondaire à une insuffisance placentaire. Afin d'estimer cette longueur télomérique, nous avons notamment mis au point une technique de Q-FISH appliquée à des noyaux interphasiques obtenus après culture de villosités placentaires. De façon intéressante, cette technique de Q-FISH nous a permis d'identifier que les intensités de fluorescence des sondes télomériques n'étaient pas distribuées normalement et que, dans certains cas, ces intensités étaient clairement distribuées de façon bimodale (Figures 17 et 18). Les sondes télomériques

hybridées dans un second temps au niveau de noyaux interphasiques « non cultivés » (*i.e.* préparés par une technique de Cytospin^{TM}) n'avaient jamais montré de distribution bimodale de leur fluorescence (Figure 18). Par ailleurs, il a été démontré que le potentiel prolifératif des clones cellulaires en culture suivait une distribution bimodale (Smith et Whitney, 1980). Deux cellules issues d'une même division mitotique en culture peuvent ainsi disposer d'une capacité de doublement différente, avec une cellule entrant rapidement en sénescence réplicative alors que l'autre continue à se diviser (Jones *et al.*, 1985). Cette entrée soudaine en sénescence de certaines cellules en culture a été décrite comme le « *Sudden Senescence Syndrome* » (SSS) (Rubelj et Vondracek, 1999). Des travaux ont étudié l'implication de la longueur télomérique dans le SSS et ont rapporté que les cellules sénescentes disposeraient de télomères plus courts (Martin-Ruiz *et al.*, 2004 ; Bendix *et al.*, 2010). Il serait très intéressant d'examiner, au niveau de nos préparations de culture, la relation existant entre la longueur télomérique et la sénescence des cellules.

Il existait une variabilité inter-individuelle importante de la longueur télomérique placentaire estimée avec les techniques de Q-FISH et de Q-PCR, en particulier chez la population contrôle de l'étude (coefficient de variation de l'intensité de fluorescence télomérique observé avec la technique de Q-FISH chez la population contrôle : 1003/5166 = 19,4%). Cette variabilité pourrait, en partie, être expliquée par les techniques utilisées (coefficient de variation des intensités moyennes de fluorescence mesurées au niveau de quatre lames d'une même patiente de 8,00%, Figure 21). Il a par ailleurs été décrit récemment l'existence d'un polymorphisme de type *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) porté par *hTERC* et associé à une diminution de la longueur télomérique des leucocytes du sang veineux périphérique d'adultes (Njajou *et al.*, 2010). Ce SNP est présent à une fréquence allélique de l'ordre de 25% chez les individus de race blanche. Il serait intéressant de génotyper ce SNP au niveau de l'ADN placentaire, afin de tester son influence sur l'intensité de fluorescence télomérique mesurée chez les patientes de notre étude.

La diminution de la longueur télomérique placentaire que nous rapportons au cours des grossesses présentant un RCIU était en accord avec les études ayant identifié une absence d'activité télomérase au niveau de ces placentas (Izutsu *et al.*, 2006 ; Davy *et al.*, 2009). Cette absence d'activité enzymatique serait vraisemblablement expliquée par une diminution de l'expression de TERT (Nishi *et al.*, 1999 ; Izutsu *et al.*, 2006 ; Davy *et al.*, 2009 ; Biron-

Shental *et al.*, 2010). Nous souhaitons ainsi examiner prochainement l'activité télomérase et l'expression de TERT au niveau placentaire afin d'évaluer l'intérêt de ces marqueurs dans la physiopathologie et le diagnostic du RCIU.

En outre, nous souhaiterions élargir notre étude à la recherche des gènes dont l'expression placentaire est dérégulée en cas de RCIU secondaires à une insuffisance utéro-placentaire à l'aide d'une approche transcriptome. Aucune étude à notre connaissance n'a à ce jour étudié le profil d'expression génique placentaire au niveau de biopsies de villosités placentaires prélevées au cours de grossesses évolutives présentant ce type de RCIU. Une étude récente a recherché les profils d'expression génique placentaire au niveau de placentas collectés aux premiers et deuxièmes trimestres de la grossesse, après interruption de la grossesse pour motif médical pour différentes indications (Uusküla *et al.*, 2012). De façon intéressante, cette étude a identifié des variations dans le temps de l'expression de certains gènes placentaires. Par ailleurs, une surexpression placentaire de *STC1* (stanniocalcin-1), impliqué dans la formation osseuse et le développement musculaire, a notamment été décrite par les auteurs en cas de RCIU et de prééclampsie. Il serait ainsi intéressant de réaliser au niveau des reliquats de villosités placentaires prélevées dans notre centre une étude de l'expression des gènes placentaires dérégulés en cas de RCIU secondaire à une insuffisance utéro-placentaires. Une surexpression de certains gènes au niveau placentaire pourrait potentiellement être détectable au niveau du sang veineux périphérique maternel, ce qui pourrait alors permettre d'envisager ultérieurement une étude non invasive de ces biomarqueurs.

5 Bibliographie

A

Amor DJ, Neo WT, Waters E, Heussler H, Pertile M, Halliday J (2006) Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism. Prenat Diagn 26: 443-448.

Artandi SE, DePinho RA (2010) Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis 31: 9-18.

Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E (2011) Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. Nucleic Acids Res 39: e134.

B

Backes CH, Markham K, Moorehead P, Cordero L, Nankervis CA, Giannone PJ (2011) Maternal preeclampsia and neonatal outcomes. J Pregnancy 2011: 214365.

Baffero GM, Somigliana E, Crovetto F, Paffoni A, Persico N, Guerneri S, Lalatta F, Fogliani R, Fedele L (2012) Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome. Prenat Diagn. 32:1102-1108.

Barker DJ (1995) Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today 9: 418–423.

Barker DJ (2006) Adult consequences of fetal growth restriction. Clin Obstet Gynecol 49: 270-283.

Bendix L, Horn PB, Jensen UB, Rubelj I, Kolvraa S (2010) The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. Aging Cell 9: 383-397.

Bianchi DW, Chitty LS, Deprest J, Ghidini A, Shaffer LG, Hughes RE (2011) The 2010 Malcolm Ferguson-Smith Young Investigator Award. Prenat Diagn 31: 923-924.

Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, Amiel A (2010) Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 202: 381.e1-7.

Biron-Shental T, Kidron D, Sukenik-Halevy R, Goldberg-Bittman L, Sharony R, Fejgin MD, Amiel A (2011) TERC telomerase subunit gene copy number in placentas from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. Early Hum Dev 87: 73-75.

Borrell A, Borobio V, Hernandez S, Cobo T, Arigita M, Sanchez A (2008) Vacuum container aspiration as a new technique for genetic amniocentesis. Prenat Diagn 28: 962-963.

Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA (2002) The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. Am J Obstet Gynecol 187: 1416-1423.

Brun JL, Mangione R, Gangbo F, Guyon F, Taine L, Roux D, Maugey-Laulom B, Horovitz J, Saura R (2003) Feasibility, accuracy and safety of chorionic villus sampling: a report of 10741 cases. Prenat Diagn 23: 295-301.

Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS (2009) Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. Placenta 23:S43-48.

C

Calda P, Brestak M (2009) Chorionic villus vacu-sampling in 377 consecutive cases. Prenat Diagn 29: 1075-1077.

Carles D, Pelluard F, Mangione R, Liquier A, Horovitz J, Saura R (2009) Advantages and limitations of chorionic villous sampling. Bull Acad Natl Med 193: 675-689.

Carter AM, Enders AC (2004) Comparative aspects of trophoblast development and placentation. Reprod Biol Endocrinol 2: 46.

Carter AM (2007) Animal models of human placentation--a review. Placenta 28 Suppl A: S41-47.

Carter AM (2008) What fossils can tell us about the evolution of viviparity and placentation. Placenta 29: 930-931.

Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res 30: e47.

Cawthon RM (2009) Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. Nucleic Acids Res 37: e21.

Cesare AJ, Reddel RR (2010) Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. Nat Rev Genet 11: 319-330.

Challier JC, Uzan S (2003) The human placenta and its pathologies: focus on oxygen. Med Sci (Paris) 19:1111-1120.

Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2004) The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. BMC Biol 2: 12.

Cohen M, Bischof P (2007) Factors regulating trophoblast invasion. Gynecol Obstet Invest 64: 126-130.

D

Davy P, Nagata M, Bullard P, Fogelson NS, Allsopp R (2009) Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. Placenta 30: 539-542.

de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev 19: 2100-2110.

Diotti R, Loayza D (2011) Shelterin complex and associated factors at human telomeres. Nucleus 2: 119-135.

E

Eggermann T, Curtis M, Zerres K, Hughes HE (2004) Maternal uniparental disomy 16 and genetic counseling: new case and survey of published cases. Genet Couns 15: 183-190.

Evain-Brion D, Malassiné A (2010) Le placenta humain. Editions Médicales Internationales, 198 p.

F

Farra C, Giudicelli B, Pellissier MC, Philip N, Piquet C (2000) Fetoplacental chromosomal discrepancy. Prenat Diagn 20: 190-193.

Figueras F, Gardosi J (2011) Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. Am J Obstet Gynecol 204: 288-300.

Fournié A, Kessler S, Biquard F, Parant O, Connan L (2004) Hypotrophie, retard de croissance intra-utérin, souffrance fœtale chronique. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 5-076-E-10.

Fryburg JS, Dimaio MS, Yang-Feng TL, Mahoney MJ (1993) Follow-up of pregnancies complicated by placental mosaicism diagnosed by chorionic villus sampling. Prenat Diagn 13: 481-494.

G

Geifman-Holtzman O, Xiong Y, Holtzman EJ, Hoffman B, Gaughan J, Liebermann DA (2010) Increased placental telomerase mRNA in hypertensive disorders of pregnancy. Hypertens Pregnancy 29: 434-435.

Ghidini A (1996) Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. Obstet Gynecol Surv 51: 376-382.

Gilson E, Géli V (2007) How telomeres are replicated. Nat Rev Mol Cell Biol 8: 825-838.

Goldberg JD, Wohlferd MM (1997) Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. Am J Obstet Gynecol 176: 1349-1352.

Goodfellow LR, Batra G, Hall V, McHale E, Heazell AE (2011) A case of confined placental mosaicism with double trisomy associated with stillbirth. Placenta 32: 699-703.

Grati FR, Grimi B, Frascoli G, Di Meco AM, Liuti R, Milani S, Trotta A, Dulcetti F, Grosso E, Miozzo M, Maggi F, Simoni G (2006) Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities in chorionic villi. Eur J Hum Genet 14: 282-288.

H

Hahnemann JM, Vejerslev LO (1997) European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)--fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. Am J Med Genet 70: 179-187.

Hall JG (1990) Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. Am J Hum Genet 46: 857-873.

Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ (2008) Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? Free Radic Biol Med 44: 235-246.

I

Izutsu T, Izutsu N, Iwane A, Takada A, Nagasawa T, Kanasugi T, Sugiyama T (2006) Expression of human telomerase reverse transcriptase and correlation with telomerase activity in placentas with and without intrauterine growth retardation. Acta Obstet Gynecol Scand 85: 3-11.

J

James JL, Carter AM, Chamley LW (2012) Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? Placenta 33: 327-334.

Jones RB, Whitney RG, Smith JR (1985) Intramitotic variation in proliferative potential: stochastic events in cellular aging. Mech Ageing Dev 29: 143-149.

K

Kalousek DK, Dill FJ (1983) Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. Science 221: 665-667.

Kalousek DK, Howard-Peebles PN, Olson SB, Barrett IJ, Dorfmann A, Black SH, Schulman JD, Wilson RD (1991) Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism. Prenat Diagn 11: 743-750.

Kalousek DK, Vekemans M (1996) Confined placental mosaicism. J Med Genet 33: 529-533.

Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986) Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. Br J Obstet Gynaecol 93: 1049-1059.

Kooper AJ, Faas BH, Feuth T, Creemers JW, Zondervan HH, Boekkooi PF, Quartero RW, Rijnders RJ, van der Burgt I, van Kessel AG, Smits AP (2009) Detection of chromosome aneuploidies in chorionic villus samples by multiplex ligation-dependent probe amplification. J Mol Diagn 11: 17–24.

Kotzot D, Utermann G (2005) Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. Am J Med Genet A 136: 287-305.

Kotzot D (2008) Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. Ultrasound Obstet Gynecol 31: 100-105.

L

Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA (2004) Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. Eur J Hum Genet 12: 513-520.

Ledbetter DH, Zachary JM, Simpson JL, Golbus MS, Pergament E, Jackson L, Mahoney MJ, Desnick RJ, Schulman J, Copeland KL, et al. (1992) Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. Prenat Diagn 12: 317-345.

Lestou VS, Kalousek DK (1998) Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 79: F223-226.

Long JA, Trinajstic K, Young GC, Senden T (2008) Live birth in the Devonian period. Nature 453: 650-652.

Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztejn Z, Kutter F, Chuang TCY, Moshir S, Mougey V, Chuang AYC, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2005) c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nuclei. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9613-9618.

Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E (1963) Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of gestation. Pediatrics 32: 793-800.

M

Mai S, Garini Y (2006) The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. J Cell Biochem 97: 904-915.

Martin-Ruiz C, Saretzki G, Petrie J, Ladhoff J, Jeyapalan J, Wei W, Sedivy J, von Zglinicki T (2004) Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. J Biol Chem 279: 17826-17833.

McClintock B (1939) The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 25: 405-416.

Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, Kokocinski F, Benner A, Stange DE, Neben K, Fiegler H, Carter NP, Reifenberger G, Korshunov A, Lichter P (2005) Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. J Clin Oncol 23: 8853-8862.

Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, Taylor RN (2012) Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. PLoS One 7: e31136.

Meulmeester E, Pereg Y, Shiloh Y, Jochemsen AG (2005) ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. Cell Cycle 4: 1166-1170.

Militello M, Pappalardo EM, Ermito S, Dinatale A, Cavaliere A, Carrara S (2009) Obstetric management of IUGR. J Prenat Med 3 :6-9.

Miller J, Turan S, Baschat AA (2008) Fetal growth restriction. Semin Perinatol. 32: 274-280.

Miny P, Hammer P, Gerlach B, Tercanli S, Horst J, Holzgreve W, Eiben B (1991) Mosaicism and accuracy of prenatal cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling and placental biopsies. Prenat Diagn 11: 581-589.

Miura K, Yoshiura K, Miura S, Kondoh T, Harada N, Yamasaki K, Fujimoto Y, Yamasaki Y, Tanigawa T, Kitajima Y, Shimada T, Yoshida A, Nakayama D, Tagawa M, Yoshimura S, Wagstaff J, Jinno Y, Ishimaru T, Niikawa N, Masuzaki H (2006) Clinical outcome of infants with confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause. Am J Med Genet A 140A: 1827-1833.

N

Newport M, Coleman DV, McPherson K (1986) Estimation of the weight of chorionic villus samples obtained from first trimester pregnancies by transcervical aspiration. Prenat Diagn 6: 265-269.

Nicholls C, Li H, Wang JQ, Liu JP (2011) Molecular regulation of telomerase activity in aging. Protein Cell 2: 726-738.

Nikitina T, Woodcock CL (2004) Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. J Cell Biol 166: 161-165.

Nishi H, Ohyashiki K, Fujito A, Yahata N, Ohyashiki JH, Isaka K, Takayama M (1999) Expression of telomerase subunits and localization of telomerase activation in hydatidiform mole. Placenta 20: 317-323.

Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). Mol Cell Biol 24: 6076-6083.

Njajou OT, Blackburn EH, Pawlikowska L, Mangino M, Damcott CM, Kwok PY, Spector TD, Newman AB, Harris TB, Cummings SR, Cawthon RM, Shuldiner AR, Valdes AM, Hsueh WC (2010) A common variant in the telomerase RNA component is associated with short telomere length. PLoS One 5: e13048.

O

Onogi A, Naruse K, Sado T, Tsunemi T, Shigetomi H, Noguchi T, Yamada Y, Akasaki M, Oi H, Kobayashi H (2011) Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells

through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. Placenta 32: 665-670.

O'Sullivan JN, Finley JC, Risques RA, Shen WT, Gollahon KA, Moskovitz AH, Gryaznov S, Harley CB, Rabinovitch PS (2004) Telomere length assessment in tissue sections by quantitative FISH: image analysis algorithms. Cytometry A 58: 120-131.

O'Sullivan RJ, Karlseder J (2010) Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 171-181.

P

Pellestor F, Paulasova P, Hamamah S (2008) Peptide nucleic acids (PNAs) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis. Curr Pharm Des 14:2439-2444.

Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T (1998) Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. Exp Cell Res 239: 152-160.

Phillips OP, Tharapel AT, Lerner JL, Park VM, Wachtel SS, Shulman LP (1996) Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling. Am J Obstet Gynecol 174: 850-855.

Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. Placenta 27: 939-958.

Prochazkova M (2003) Recherche d'anomalies cytogénétiques spécifiques des lymphomes T cutanés primitifs. Thèse : Sciences biologiques et médicales : Bordeaux II.

Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguiet G, Sobotka J, Vergier B, Belaud-Rotureau MA, Beylot-Barry M, Merlio JP (2007) Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. Genes Chromosomes Cancer 46: 828-838.

R

Randhawa RS (2008) The insulin-like growth factor system and fetal growth restrictionn. Pediatr Endocrinol Rev 6: 235-240.

Resnik R (2002) Intrauterine growth restriction. Obstet Gynecol 99: 490-496.

Roberts DJ, Post MD (2008) The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. J Clin Pathol 61: 1254-1260.

Robilliard D (2005) Intérêt de l'analyse histologique des biopsies de villosités choriales dans le bilan du retard de croissance intra-utérin. Thèse : Médecine : Bordeaux II.

Robinson WP, Barrett IJ, Bernard L, Telenius A, Bernasconi F, Wilson RD, Best RG, Howard-Peebles PN, Langlois S, Kalousek DK (1997) Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. Am J Hum Genet 60: 917-927.

Roland B, Lynch L, Berkowitz G, Zinberg R (1994) Confined placental mosaicism in CVS and pregnancy outcome. Prenat Diagn 14: 589-593.

Rubelj I, Vondracek Z (1999) Stochastic mechanism of cellular aging--abrupt telomere shortening as a model for stochastic nature of cellular aging. J Theor Biol 197: 425-438.

S

Salomon LJ, Duyme M, Crequat J, Brodaty G, Talmant C, Fries N, Althuser M (2006) French fetal biometry: reference equations and comparison with other charts. Ultrasound Obstet Gynecol 28: 193-198.

Salomon LJ, Bernard JP, de Stavola B, Kenward M, Ville Y (2007) Birth weight and size: charts and equations. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 36: 50-56.

Sankaran S, Kyle PM (2009) Aetiology and pathogenesis of IUGR. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 23: 765-77.

Saura R, Horovitz J, Taine L, Roux D, Hocke C, Maugey B, Vergnaud A (1992) A modified freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling. Am J Obstet Gynecol 167: 1483-1484.

Saura R, Toutain J, Dessuant H, Taine L, Horovitz J (2010a) Marqueurs du premier trimestre : mise en place et conséquence, expérience française. Communication orale présentée au colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF), Aix-en-Provence (France).

Saura R, Toutain J, Horovitz J (2010b) A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24 000 consecutive cases. Prenat Diagn 30: 387-388.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. Lancet 365: 785-799.

Sifakis S, Staboulidou I, Maiz N, Velissariou V, Nicolaides KH (2010) Outcome of pregnancies with trisomy 2 cells in chorionic villi. Prenat Diagn 30: 329-332.

Simon P (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics 19: 1439-1440.

Simoni G, Brambati B, Danesino C, Rossella F, Terzoli GL, Ferrari M, Fraccaro M (1983) Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. Hum Genet 63: 349-357.

Smith JR, Whitney RG (1980) Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. Science 207: 82-84.

Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. Reprod Biol Endocrinol 2: 59.

Stetten G, Escallon CS, South ST, McMichael JL, Saul DO, Blakemore KJ (2004) Reevaluating confined placental mosaicism. Am J Med Genet A 131: 232-239.

Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM (2012) Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. Mutat Res 730: 12-19.

Stipoljev F, Latin V, Kos M, Miskovic B, Kurjak A (2001) Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation. A case control study of placentas at delivery. Fetal Diagn Ther 16: 4-9.

T

Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Ohira S, Konishi I (2004) Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. Virchows Arch 444:49-55.

Thanasoula M, Escandell JM, Suwaki N, Tarsounas M (2012) ATM/ATR checkpoint activation downregulates CDC25C to prevent mitotic entry with uncapped telomeres. EMBO J 31: 3398-3410.

Tomas SZ, Roje D, Prusac IK, Tadin I, Capkun V (2010) Morphological characteristics of placentas associated with idiopathic intrauterine growth retardation: a clinicopathologic study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 152: 39-43.

Toutain J, Epiney M, Begorre M, Dessuant H, Vandenbossche F, Horovitz J, Saura R (2010a) First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 149: 143-146.

Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R (2010b) Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. Prenat Diagn 30: 1155-1164.

Toutain J, Soler G, Horovitz J, Saura R (2011) Prenatal diagnosis on chorionic villi using molecular techniques should be performed from mesenchymal core rather than from direct villi. Prenat Diagn 31: 1111-1112.

Tsatsaris V, Fournier T, Winer N (2008) Pathophysiology of preeclampsia. J Gynecol Obstet Biol Reprod 37: 16-23.

Tuuli MG, Longtine MS, Nelson DM (2011) Review: Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy. Placenta 32 Suppl 2: S109-118.

U

Uusküla L, Männik J, Rull K, Minajeva A, Kõks S, Vaas P, Teesalu P, Reimand J, Laan M (2012) Mid-gestational gene expression profile in placenta and link to pregnancy complications. PLoS One 7:e49248.

V

Vandenbossche F, Horovitz J, Guyon F, Verret C, Saura R (2008) Pain experience during chorionic villus sampling and amniocentesis: a preliminary study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 136: 189-193.

Vedmedovska N, Rezeberga D, Teibe U, Melderis I, Donders GG (2011) Placental pathology in fetal growth restriction. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 155: 36-40.

von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 27: 339-344.

Vogel P (2005) The current molecular phylogeny of Eutherian mammals challenges previous interpretations of placental evolution. Placenta 26:591-596.

Voss R, Ben-Simon E, Avital A, Godfrey S, Zlotogora J, Dagan J, Tikochinski Y, Hillel J (1989) Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: could uniparental disomy be common in humans? Am J Hum Genet 45: 373-380.

W

Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T, Solovei I (2003) Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. Chromosome Res 11: 485-502.

Wildman DE, Chen C, Erez O, Grossman LI, Goodman M, Romero R (2006) Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 3203-3208.

Wilkins-Haug L, Quade B, Morton CC (2006) Confined placental mosaicism as a risk factor among newborns with fetal growth restriction. Prenat Diagn 26: 428-432.

Wolstenholme J (1996) Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. Prenat Diagn 16: 511-524.

Y

Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J (2003) TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res 9: 4705-4713.

Yong PJ, von Dadelszen P, McFadden DE, Barrett IJ, Kalousek DK, Robinson WP (2009) Placental weight in pregnancies with trisomy confined to the placenta. J Obstet Gynaecol Can 31: 605-610.

Yong PJ, McFadden DE, Robinson WP (2011) Developmental origin of chorionic villus cultures from spontaneous abortion and chorionic villus sampling. J Obstet Gynaecol Can 33: 449-452.

Z

Zhu H, Belcher M, van der Harst P (2011) Healthy aging and disease: role for telomere biology? Clin Sci (Lond) 120: 427-440.

6 Annexes

6.1 Communications scientifiques

6.1.1 Publications indexées

Toutain J, Horovitz J, Saura R. Type 3 confined placental mosaicism of meiotic origin requires close obstetrical monitoring. Prenat Diagn, *In Press*

Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Cappellen D, Jarne A, Chevret E, Ferrer J, Idrissi Y, Pelluard F, Carles D, Maugey-Laulon B, Lacombe D, Horovitz J, Merlio JP, Saura R. Reduced placental telomere length in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. PLoS One, *In Press*

Labeau-Gaüzere C, Horovitz J, Brun JL, Saura R, **Toutain J** (2011) Confined placental mosaicisms a priori from meiotic origin : analysis of ten cases. Gynecol Obstet Fertil 39: 117-120.

Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R (2010) Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between type 2 and type 3. Prenat Diagn 30: 1155-1164.

Saura R, **Toutain J**, Horovitz J (2010) A freehand ultrasonographically guided technique in transabdominal chorionic villus sampling in more than 24 000 consecutive cases. Prenat Diagn 30: 387-388.

6.1.2 Publication non indexée

Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Horovitz J, Saura R (2010) Influence des anomalies chromosomiques limitées au placenta sur l'issue de la grossesse : une distinction entre les anomalies de type 2 et de type 3 s'impose. Médecine Fœtale et Echographie en Gynécologie 83: 28-35.

6.1.3 Communications orales

6.1.3.1 Congrès internationaux

Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Chevret E, Cappellen D, Ferrer J, Soler G, Merlio JP, Horovitz J, Saura R. Decreased telomere length in placentas during pregnancies

complicated with intra-uterine growth restriction. Communication orale présentée à la 16ème conférence de l'International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), juin 2012 – Miami (Etats-Unis).

Toutain J, Labeau-Gaüzere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R. Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between type 2 and type 3. Communication orale présentée en récompense du Prix Malcolm Ferguson-Smith 2010 à la 16ème conférence de l'International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), juin 2012 – Miami (Etats-Unis).

6.1.3.2 Congrès nationaux

Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Chevret E, Cappellen D, Ferrer J, Merlio JP, Horovitz J, Saura R. Reduced placental telomere length in pregnancies complicated by intra-uterine growth restriction. Communication orale retenue au colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF), septembre 2012 – Paris (France).

Toutain J, Prochazkova-Carlotti M, Merlio JP, Horovitz J, Saura R. Intérêt de l'estimation de la longueur télomérique placentaire au 2ème et 3ème trimestre dans les RCIU : Etude prospective chez 52 patientes. Communication orale présentée au Club de Médecine Fœtale, mai 2012 – Saint-Omer (France).

Toutain J, Labeau-Gauzëre C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R. Anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et de type 3 et issues de la grossesse. Communication orale présentée au colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF), septembre 2010 – Aix-en-Provence (France).

Saura R, Vandenbossche F, **Toutain J**, Horovitz J. Technique de biopsie de villosités choriales « bordelaise » : une solution pour lever le malentendu entre préleveurs et cytogénéticiens ? Communication orale présentée au Club de Médecine Fœtale, mai 2010 - Dijon (France).

Horovitz J, **Toutain J**, Vandenbossche F, Saura R. Choriocentèses et placentocentèses : aspects obstétricaux, cytogénétiques (et histologiques). Communication orale

présentée aux 33èmes Journées Nationales du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF), décembre 2009 – Paris (France).

Toutain J, Labeau C, Begorre M, Epiney M, Mangione R, Maugey-Laulom B, Vandenbossche F, Roux D, Amat S, Brun JL, Horovitz J, Saura R. Anomalies chromosomiques limitées au placenta impliquant les chromosomes 16 et 22 : relation avec les β-CGH (facteurs sériques maternels) et conséquences sur le développement foetal. Communication orale présentée à la réunion du groupement de Bordeaux et du Sud-Ouest du CNGOF, octobre 2009 – Bordeaux (France).

Saura R, **Toutain J**, Epiney M, Vandenbossche F, Horovitz J. Anomalies chromosomiques limitées au placenta de type 2 et 3: conséquences sur le développement foetal (64 cas sur 15 154 choriocentèses avec culture). Communication orale présentée au Club de Médecine Fœtale, mai 2009 - Cernay-la-Ville (France).

6.1.4 Communications affichées

6.1.4.1 Congrès internationaux

Saura R, **Toutain J**, Labeau-Gaüzere C, Barnetche T, Horovitz J. Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: distinction between type 2 and 3 CPM is required. Présentation affichée à la 15ème conférence de l'International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), juillet 2010 – Amsterdam (Pays-Bas).

Saura R, Pelluard F, **Toutain J**, André G, Horovitz J, Carles D. Advantages and limitations of histopathologic analysis of chorionic villous sampling. Présentation affichée à la 15ème conférence de l'International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), juillet 2010 – Amsterdam (Pays-Bas).

6.1.4.2 Congrès nationaux

Toutain J. Retards de croissance intra-utérins inexpliqués : Intérêts de la recherche des anomalies chromosomiques limitées au placenta et de l'estimation de la longueur télomérique placentaire. Présentation affichée à la Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, mars 2012 – Arcachon (France).

Toutain J. Retards de croissance intra-utérins inexpliqués : Aspects cytogénétiques, histologiques et moléculaires au cours de grossesses évolutives. Présentation affichée à la Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, avril 2011 – Arcachon (France).

Toutain J, Vandenbossche F, Coateven F, Horovitz J, Saura R. Anomalies chromosomiques limitées au placenta impliquant les chromosomes 16 et 22 : relation avec les facteurs sériques maternels (β-HCG) et conséquences sur le développement fœtal. Présentation affichée aux 5èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale, janvier 2010 – Strasbourg (France).

6.2 Prix jeune chercheur 2010 Malcolm Ferguson-Smith

En hommage au Professeur Malcolm Ferguson-Smith, généticien de renom et fondateur du journal *Prenatal Diagnosis*, un « *Young Investigator Award* » portant son nom récompense chaque année depuis 2007 un article publié dans le journal *Prenatal Diagnosis* rédigé par un premier auteur âgé de moins de 40 ans (Bianchi *et al.*, 2011).

Les critères retenus pour l'attribution de ce prix sont les suivants : importance scientifique de la thématique de recherche, originalité du projet de recherche et nombre de téléchargements de la version électronique de l'article.

Nous avons eu l'honneur d'être les lauréats 2010 de ce prix pour notre article intitulé « *Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3* » (Toutain *et al.*, 2010b ; Bianchi *et al.*, 2011). A ce titre, nous avons reçu un financement afin de pouvoir assister à la 16ème conférence de l'*International Society for Prenatal Diagnosis* (ISPD) qui s'est déroulée à Miami (Etats-Unis) en juin 2012. Lors de cette manifestation, nous avons eu le plaisir de présenter oralement notre travail.

6.3 Autres

6.3.1 Participation à la réalisation d'un film pédagogique traitant de la technique « bordelaise » de biopsie de villosités choriales et placentaires

A l'initiative du Professeur Jacques HOROVITZ, chef de service de Gynécologie-Obstétrique au CHU de Bordeaux, nous avons participé à la réalisation d'un film pédagogique traitant de

la technique de biopsie de villosités choriales et placentaires effectuée au centre de Médecine Fœtale du CHU de Bordeaux. Le film a été produit par le Département Conception et Assistance Multimédia (DCAM) de l'Université Bordeaux 2.

Ce film pédagogique est aujourd'hui librement accessible sur le site Internet « canal-u » à l'adresse suivante :
www.canal-u.tv/video/universite_bordeaux_segalen_dcam/choriocenteses_et
_placentocenteses_des_2e_et_3e_trimestres.6788

Nous avons par ailleurs présenté ce film au Festival International du Film Médical (FILMED) qui s'est tenu à Amiens (France) en décembre 2010.

6.3.2 Participation à l'émission de radio « Que cherchent-ils ? » de RCF Bordeaux

« Que cherchent-ils ? » est le titre d'une émission que diffuse tous les lundis à 19h30 la radio locale Radios Chrétiennes Francophones (RCF) Bordeaux. Cette émission permet aux doctorants de 2ème ou 3ème année de venir parler de leurs travaux de recherche, de leur thèse, de leur parcours et de leurs projets. Nous avons eu l'opportunité de participer à cette émission au cours de laquelle Mmes Marie-Françoise LAVILLE et Véronique de PONCHEVILLE nous ont interviewés.