

Techniques et méthodologies du diagnostic pré-implantatoire des aneuploïdies

PGD-AS techniques and methodologies

Guillaume Martinez^{1,2}
Radu Harbuz¹
Véronique Satre^{1,2}
Charles Coutton^{1,2}

¹ Centre hospitalier universitaire Grenoble-Alpes, laboratoire de génétique chromosomique, hôpital Couple-Enfant, CHU Grenoble Alpes, CS 10217, Grenoble, France

² Genetic Epigenetic and Therapies of Infertility, Institute for Advanced Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France
<ccoutton@chu-grenoble.fr>

Résumé. Les anomalies chromosomiques de nombre (ou aneuploïdies) sont une cause importante de fausses couches précoces, d'échec de développement embryonnaire ou d'implantation, et peuvent par ailleurs entraîner la naissance d'enfants atteints de pathologies gravement invalidantes. Depuis plusieurs années, les pratiques et les techniques utilisées dans le cadre du diagnostic préimplantatoire (DPI) ont fortement évolué avec l'utilisation de l'hybridation *in situ* fluorescente, de la PCR quantitative fluorescente, des puces à ADN et, enfin, des techniques de séquençage haut débit nouvelle génération. L'évolution rapide et l'efficacité croissante de ces approches ont permis d'envisager l'implémentation du diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies (DPI-A) en routine clinique. Cette revue s'attache à présenter les différentes techniques de recherche des aneuploïdies éprouvées en routine clinique ou actuellement en développement.

Mots clés : diagnostic préimplantatoire (DPI), diagnostic préimplantatoire des aneuploïdies (DPI-A), aneuploïdies, séquençage haut débit

Abstract. Numerical chromosomal abnormalities or aneuploidies are an important cause of early miscarriages, embryonic development failure, implantation failure and can lead to the birth of children with severe pathology. Since many years, preimplantation genetic diagnosis (PGD) practices and techniques have considerably evolved with the use of *in situ* fluorescent hybridization, quantitative fluorescent PCR, DNA chips and finally new generation sequencing techniques. The fast evolution and the increasing efficiency of these approaches allowed to implement PGD for aneuploidy screening in clinical practice. This review aims to present different aneuploidy research techniques that have been clinically proven or are currently under development.

Key words: PGD, PGD-AS, preimplantation genetic diagnosis, aneuploidy, NGS

Il y a bientôt trois décennies, l'équipe du professeur Handyside réalisait le premier diagnostic préimplantatoire (DPI) sur biopsie embryonnaire [1]. Depuis lors, les techniques de diagnostic sur cellule unique se sont perfectionnées et ont évolué au point de permettre l'implémentation du DPI des aneuploïdies embryonnaires (DPI-A) en routine dans les pays autorisés. Historiquement, la technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) [2] a été la première à être appliquée dans le cadre du DPI pour l'étude d'individus présentant des anomalies chromosomiques de structure équilibrées comme les translocations réciproques ou robertsoniennes en

n'étudiant que les quelques chromosomes spécifiquement impliqués dans ces remaniements. L'émergence des nouveaux outils de génétique et génomique a permis le développement des analyses sur tous les chromosomes simultanément, d'abord via la technique de PCR quantitative (q-PCR, pour *quantitative polymerase chain reaction*) [3], puis par analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) [4, 5], et, enfin, par séquençage de nouvelle génération (NGS, pour *next-generation sequencing*) [6] (figure 1). Cet article a pour but de présenter de façon didactique ces différentes évolutions en restant focalisé sur les aspects techniques du DPI-A (figure 2).

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : C. Coutton

doi:10.1684/mte.2019.0729

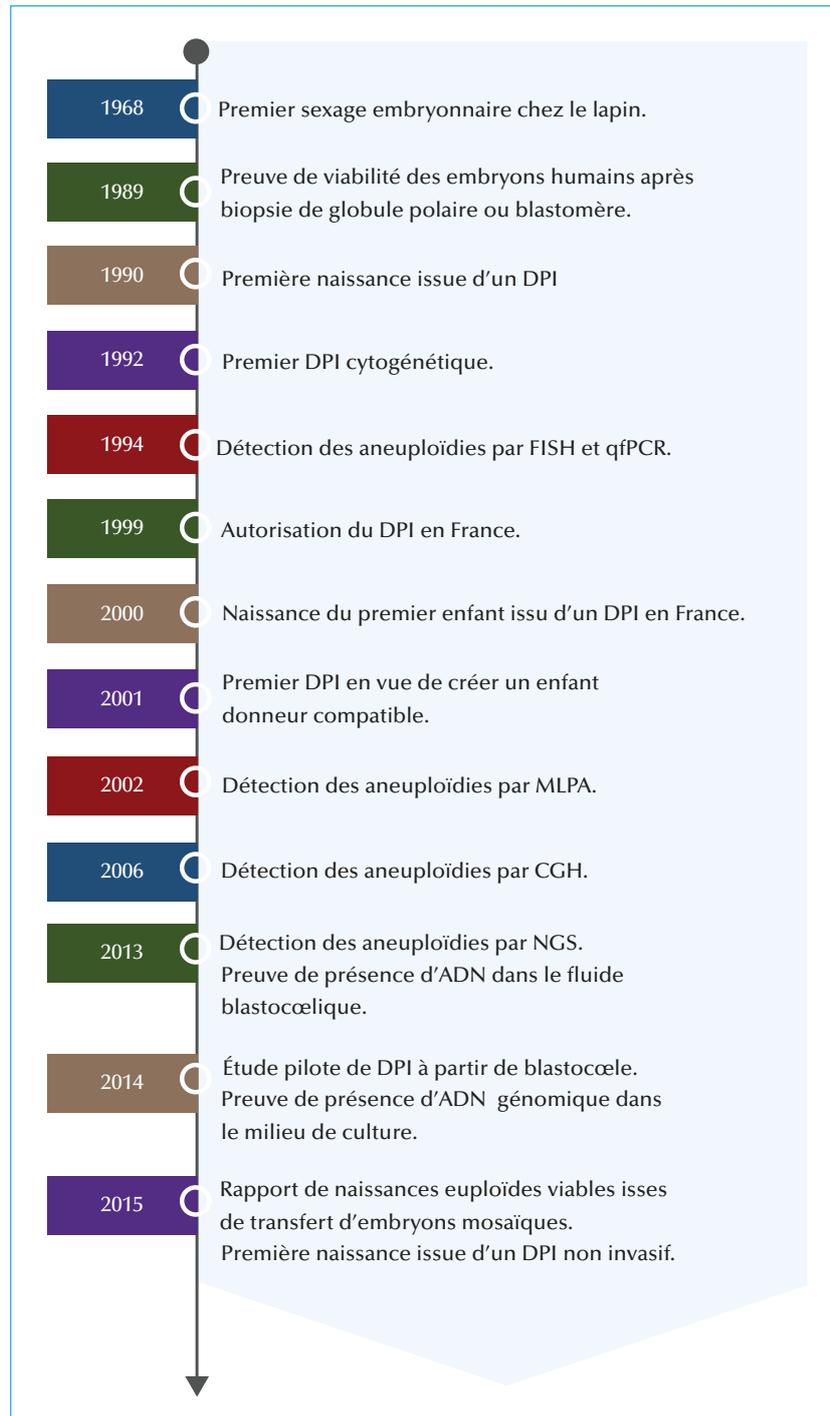


Figure 1. Chronologie des principaux événements marquants de l'histoire du DPI-A.

Au-delà de la technique d'analyse, le matériel biologique utilisé pour le diagnostic a aussi évolué. Si les premiers diagnostics furent réalisés à partir de biopsie de globules polaires ou de biopsies de blastomères issus d'un embryon au troisième jour de culture post-fécondation,

la biopsie de trophoctoderme est aujourd'hui la norme dans de nombreux centres. Des protocoles de biopsie dits « mini-invasifs », du liquide blastocœliquique, ou « non invasifs », avec analyse du milieu de culture embryonnaire, sont d'ores et déjà à l'étude et présenteraient une avancée

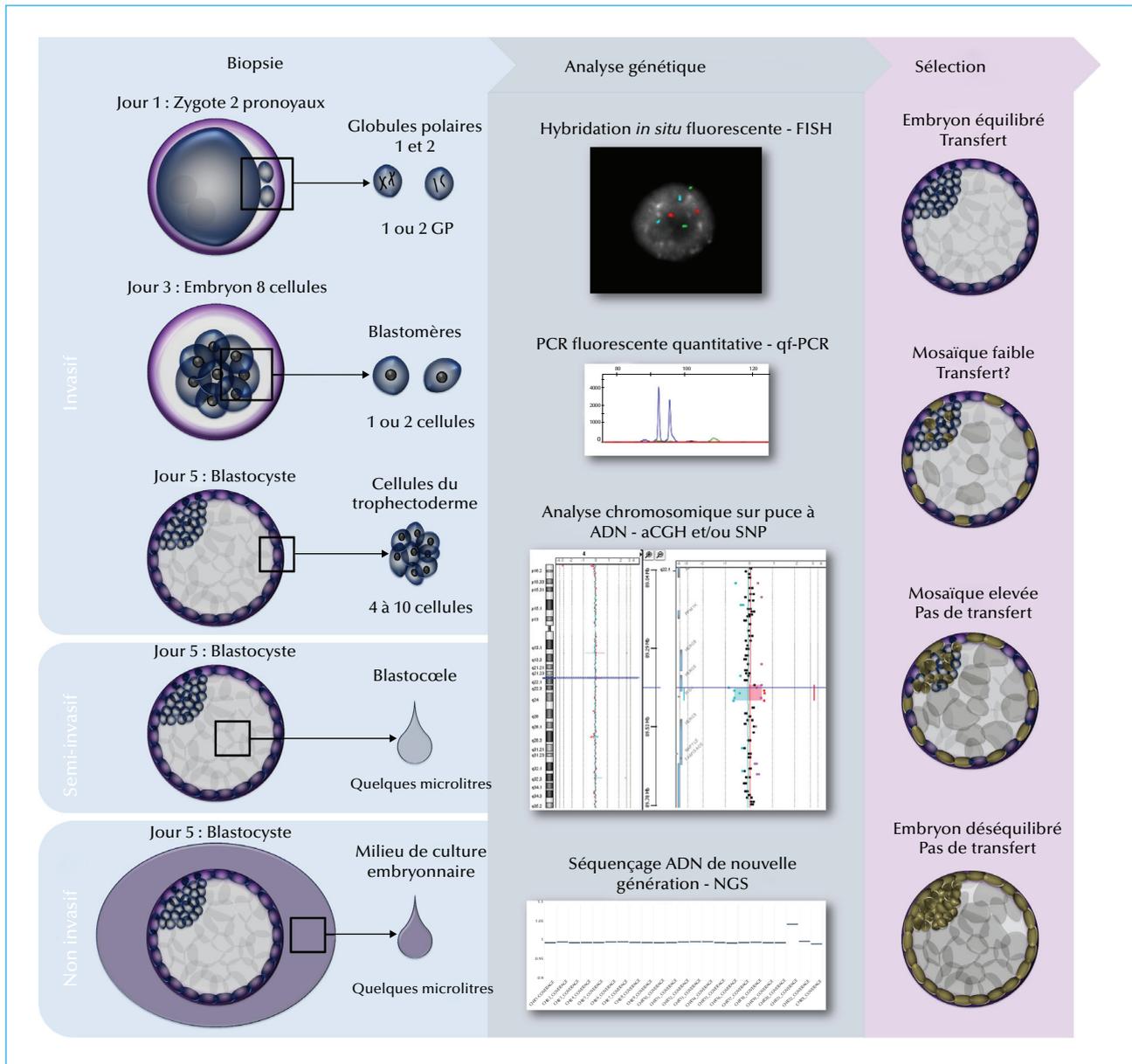


Figure 2. Vue d'ensemble des techniques du DPI-A.

majeure dans le domaine. Cette évolution des produits de biopsie induit inévitablement une nécessité d'adaptation des techniques d'analyse génétique et de leur interprétation (figure 2).

L'hybridation *in situ* fluorescente

La technique de FISH multi-couleur (figure 3) fut la première à être employée pour le DPI-A, avec une première naissance rapportée par Schrurs *et al.* dès 1993 [7]. Elle repose sur l'hybridation complémentaire d'une ou de plusieurs sondes nucléotidiques fluorescentes dirigées contre

différents chromosomes d'intérêt. La technique de FISH peut être réalisée sur des chromosomes métaphasiques ou sur des noyaux en interphase, c'est-à-dire avec la chromatine décondensée. Dans le cadre du DPI-A, c'est la FISH interphasique qui est employée, pour interroger le contenu chromosomique de la cellule embryonnaire. Une fois les régions chromosomiques d'intérêt identifiées, des fluorochromes sont couplés à des oligonucléotides correspondant aux séquences complémentaires des régions d'ADN à cibler.

Avant l'étape d'hybridation *in situ*, différentes étapes de prétraitement sont nécessaires, notamment pour fixer le

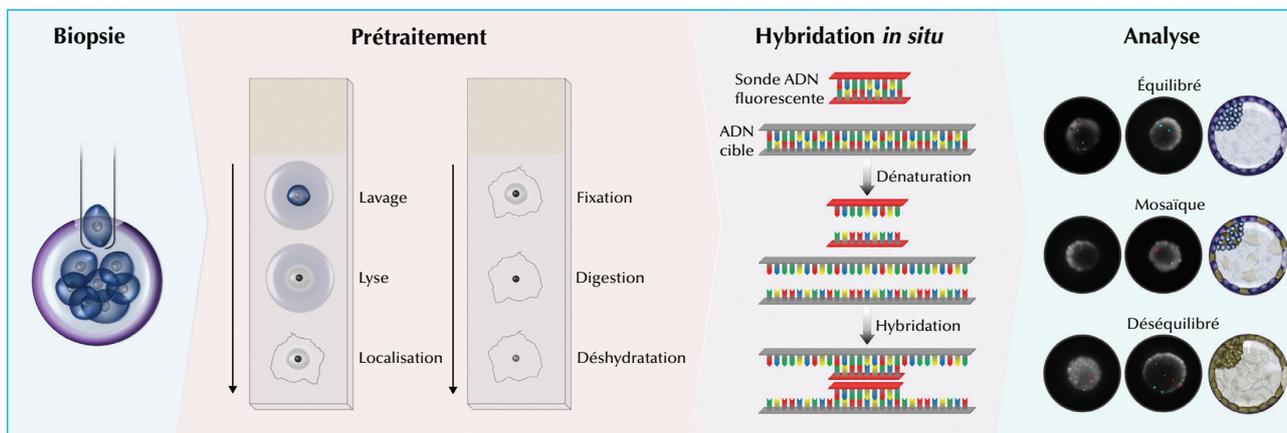


Figure 3. Principe général de la technique de FISH.

produit de biopsie sur une lame en verre. Classiquement, le ou les blastomères sont lavés par passages successifs dans des gouttes de milieu de culture puis de lyse. Ce dernier est généralement un milieu hypotonique acide qui va lyser la membrane plasmique de la cellule, libérant ainsi le noyau nu dans la goutte. La membrane nucléaire reste intacte et la position du noyau est matérialisée par une gravure au dos de la lame. Une succession de bains va permettre la fixation (éthanol ou méthanol/acide acétique), la digestion du cytoplasme résiduel (pepsine) puis la déshydratation des cellules (éthanol). Sur une plaque chauffante spécifique aux hybridations sur lame, l'ADN contenu dans le noyau fixé sur la lame va être rapidement dénaturé par la chaleur puis renaturé à plus basse température en présence du mélange des sondes à hybrider. À la fin de l'étape d'hybridation, dont la durée peut varier de quelques heures à une nuit, selon le protocole utilisé, l'excès de sondes non hybridées est éliminé par différents lavages successifs et le noyau est contre-coloré au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, coloration bleue) afin de pouvoir plus aisément le repérer. La dernière étape de la technique de FISH consistera à lire la lame au microscope à épifluorescence afin de révéler les spots fluorescents qui seront la signature de la présence des régions d'intérêt et qui permettront de les dénombrer.

Plusieurs types de sondes sont utilisés pour répondre aux problématiques du DPI :

- les sondes composées de séquences spécifiques d'ADN répété. Elles sont de petite taille (< 1 kb) et s'hybrident à des séquences répétées au sein d'une région chromosomique. Ces sondes sont majoritairement utilisées pour mettre en évidence les régions centromériques des chromosomes,
- les sondes loci-spécifiques sont composées d'une séquence unique dont la taille sera dépendante de son

vecteur de production. Couramment, l'utilisation de chromosomes artificiels bactériens (BAC) permet la production de fragments d'ADN de 100 à 200 kb et les chromosomes artificiels de levures (YAC) autorisent le clonage de fragments allant jusqu'à 2 000 kb.

En DPI-A, ce sont préférentiellement des sondes spécifiques des régions télomériques des chromosomes qui sont utilisées. Plusieurs fragments issus de BAC et positionnés de façon contiguë sur le chromosome sont sélectionnés et marqués ensemble pour obtenir un signal de forte intensité et faciliter l'interprétation.

Dans le cadre de la FISH interphasique et du DPI-A, le nombre de sondes utilisables par hybridation est limité par les chevauchements des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des différents fluorochromes utilisables. Même s'il est possible de réaliser plusieurs hybridations successives sur un même échantillon, l'efficacité de la technique est drastiquement réduite à chaque lavage, compliquant ainsi une interprétation parfois déjà délicate. De ce fait, la recherche d'aneuploïdie par FISH dans le cadre du DPI-A est généralement limitée à l'étude des chromosomes associés aux anomalies les plus fréquentes (chromosomes 13, 15, 18, 21, 22, X et Y) [8].

Au-delà de la technicité nécessaire aux étapes analytiques de la FISH sur cellules uniques, la vraie difficulté de la FISH est l'interprétation visuelle des spots fluorescents. La fragmentation et la superposition des signaux sont courantes et la qualité de l'hybridation et l'efficacité des lavages peuvent être source d'artefacts. On comprend donc que le risque d'erreur technique est multiplié par le nombre de chromosomes analysés, limitant ainsi grandement la portée de l'utilisation de la FISH dans le DPI-A [9]. Malgré ses inconvénients, la FISH fut longtemps le *gold-standard* du DPI-A et reste une technique robuste avec des taux d'échecs inférieurs à 5 % [10].

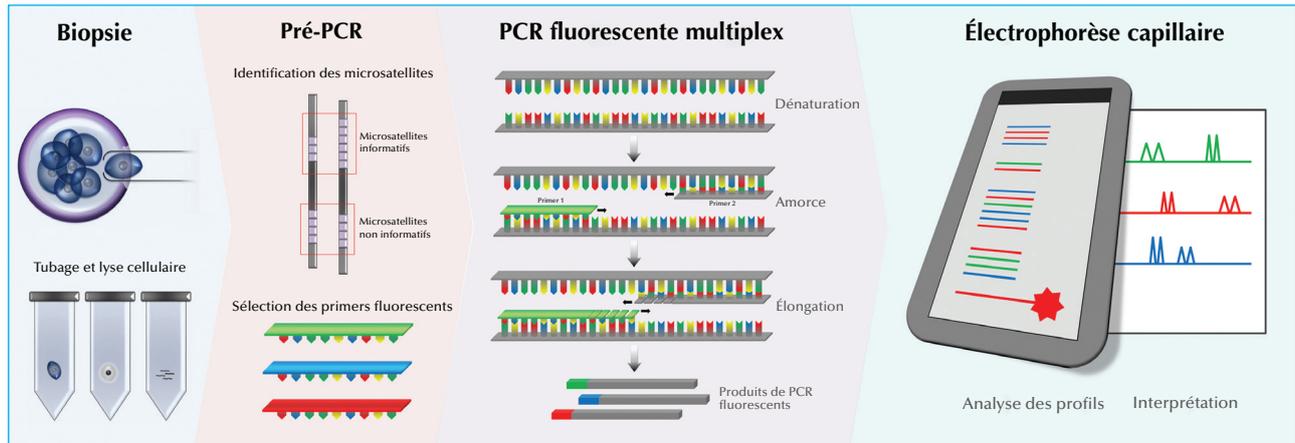


Figure 4. Principe général de la technique de qPCR.

La réaction en chaîne de polymérase quantitative fluorescente

La PCR quantitative fluorescente (qfPCR) peut être utilisée pour la détection des aneuploïdies embryonnaires et repose sur l'amplification simultanée par PCR (PCR multiplex) de plusieurs microsatellites et sur la quantification des signaux ainsi obtenus (figure 4). Un microsatellite est une séquence répétitive du génome, composée d'une unité de base dont la taille varie de un à six nucléotides. Majoritairement introniques, ces séquences sont présentes sur tous les chromosomes, à des loci espèce-spécifiques et avec un nombre de répétitions propre à chaque individu. De plus, chaque individu peut hériter de formes alléliques différentes de chacun de ses parents. Le caractère polymorphe des microsatellites est exploité depuis plusieurs décennies par la médecine légale pour l'identification des individus via la carte d'identité génétique formée par l'ensemble de leurs microsatellites. C'est ce même polymorphisme qui va permettre l'utilisation des microsatellites comme marqueur génétique dans la recherche des aneuploïdies d'un embryon.

La première étape technique est la sélection d'un ensemble de microsatellites pour chacun des chromosomes d'intérêt. Lorsqu'un individu est porteur d'un microsatellite qui présente un nombre de répétitions différent sur les allèles paternels et maternels, il est alors possible de faire la discrimination entre ces deux allèles et ce microsatellite est considéré comme informatif. À l'inverse, lorsque le nombre de répétitions d'un microsatellite est identique dans les deux formes alléliques, ces deux allèles ne peuvent être discriminés et le microsatellite est considéré comme non informatif. Le risque de similarité impose l'utilisation minimale de trois microsatellites par chromosome pour obtenir au moins deux microsatellites informatifs. L'ensemble des nombres de répétitions

des microsatellites sélectionnés forme un ensemble propre à un organisme nommé haplotype.

La seconde étape consiste en la sélection des couples d'amorces spécifiques des régions flanquantes des microsatellites d'intérêt pour permettre leur amplification par PCR. Pour que ces amorces puissent s'apparier de façon efficace, elles doivent être complémentaires à la séquence de leur ADN cible simple brin, ne pas trop différer dans leurs températures de fusion (respect de l'équilibre thermodynamique) et ne pas former de structures secondaires. Ces amorces sont marquées par un fluorochrome permettant ainsi de produire des amplifiats fluorescents et sont ainsi être détectables et quantifiables en fin de technique.

L'amplification simultanée de toutes les régions cibles par PCR multiplex permet ensuite d'obtenir, à partir du peu d'ADN issu de la lyse du produit de biopsie (de une à quelques cellules embryonnaires), un grand nombre de copies fluorescentes des microsatellites en une seule réaction chimique. Succinctement, la phase de dénaturation initiale s'effectue à température élevée pour séparer les deux brins de l'ADN matrice, la phase d'appariement permet aux amorces de s'hybrider à leurs températures de fusion optimales, puis la phase d'élongation permet aux polymérases et aux nucléotides présents dans le milieu de synthétiser le brin complémentaire. On obtient donc ainsi un ensemble de produits de PCR fluorescents de longueurs égales aux nombres de répétitions du motif de chaque microsatellite.

Les produits de PCR (ou amplifiats) fluorescents ainsi obtenus seront enfin séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire. Chaque amplifiat, mélangé à un tampon conducteur contenant une quantité d'ions mobiles, migre dans le sens du flux électro-osmotique à l'intérieur d'un capillaire sous l'effet de l'application d'un champ électrique. Les divers produits d'amplification parcourent la longueur du capillaire en des temps

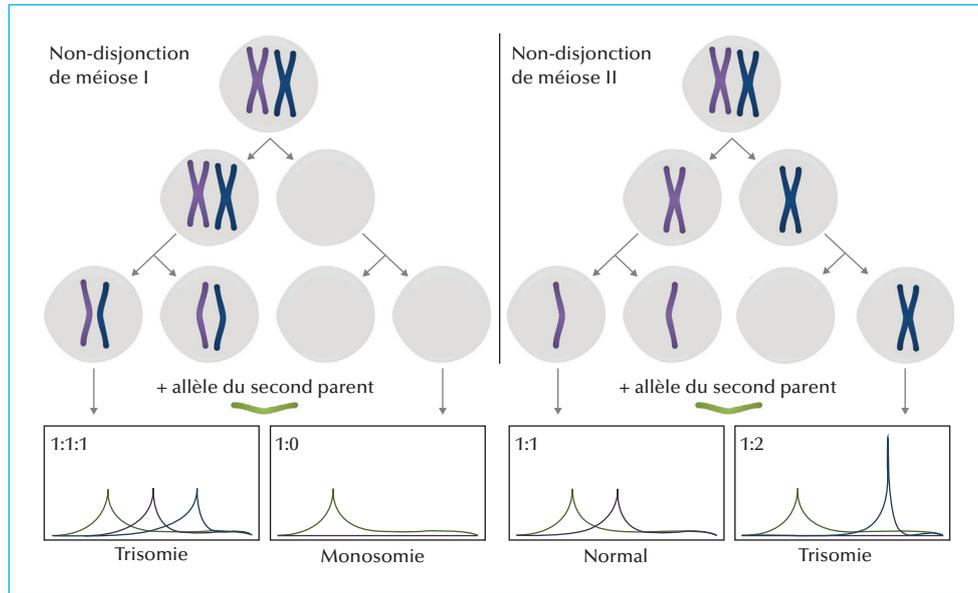


Figure 5. Illustration de différents résultats de qfPCR selon le type d'anomalie méiotique.

différents, qui dépendent principalement de la taille de l'amplifiat (les amplifiats les plus petits migrant le plus vite). Chaque amplifiat est ensuite détecté à la sortie du capillaire par spectrométrie de fluorescence grâce au fluorochrome introduit dans l'amorce. La différence du nombre de répétitions entre les deux formes alléliques de chaque microsatellite rend possible leur discrimination grâce à la variation de taille des amplifiats. Chaque produit de PCR donne ainsi un pic de fluorescence spécifique et l'ensemble des pics obtenus est présenté sous la forme d'un électrophérogramme, représentatif de l'analyse des microsatellites pour l'ensemble des chromosomes. L'interprétation de la présence et de l'intensité des pics de fluorescences permet le diagnostic des aneuploidies éventuellement présentes sur les chromosomes investigués.

La quantification finale de l'intensité des signaux d'un microsatellite pour un locus donné chez un individu euploïde donnera donc deux pics distincts mais avec un rapport d'intensité de fluorescence similaire. La variation naturelle de ce rapport d'intensité est considérée comme acceptable lorsqu'elle est comprise entre 0,8 et 1,4. Dans le cadre d'un individu monosomique pour un chromosome, les microsatellites associés à celui-ci ne produisent qu'un seul pic. Un individu trisomique produit un signal supplémentaire, soit sous la forme d'un troisième pic de même intensité (trois formes alléliques distinctes), soit sous la forme d'un second pic d'une intensité de signal comprise entre 1,8 et 2,4 (deux des formes alléliques sont identiques). Les anomalies de ségrégation en méiose I produisent les formes trialléliques 1:1:1 par la présence des deux chromosomes homologues différents

d'un même parent et les anomalies de ségrégation en méiose II produisent les formes 1:2 par la présence de deux chromosomes identiques issus du même parent (figure 5).

Les puces ADN

L'hybridation génomique comparative sur puce à ADN (CGH-array), ou analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA), est une technique pangénomique qui permet de mettre en évidence des variations du nombre de copies de tout un chromosome (monosomie ou trisomie) ou d'une partie d'un chromosome (délétion ou duplication) [11, 12]. Les réarrangements chromosomiques équilibrés (sans perte ou gain de matériel génétique) tels que les translocations équilibrées ou les inversions ne peuvent pas être identifiés par cette technique.

Les premières techniques d'hybridation génomique comparative sur cellule unique (fibroblastes, lymphocytes, cellules épithéliales, amniocytes et blastomères humains) ont été réalisées sur des chromosomes en métaphase ou sur des puces de type BAC peu résolutive [13, 14]. Les puces à oligonucléotides plus résolutive et les puces à SNP (*single nucleotide polymorphism*) ont été testées quelques années plus tard [15, 16]. Les puces de type BAC ou à oligonucléotides permettent la détection des anomalies du nombre de copies dans une région, alors que les puces à SNP sont en mesure de détecter ces mêmes anomalies mais également de réaliser un génotypage [17, 18]. Ceci permet, en étudiant des centaines de milliers, et jusqu'à des millions de variations nucléotidiques (SNV)

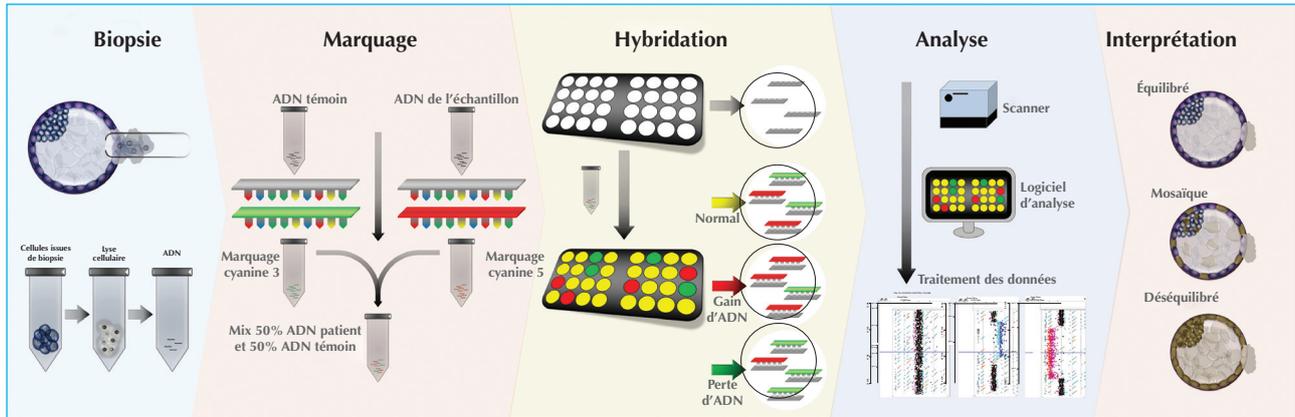


Figure 6. Principe général de la technique de CGH-array.

du génome, de caractériser l'ensemble des variants SNP homozygotes et hétérozygotes d'un individu [19].

Le principe des puces à oligonucléotides repose sur la comparaison de la quantité d'ADN présente au niveau d'une région génomique, entre un ADN à tester et un ADN contrôle (témoin). L'ADN à tester et celui du témoin sont fragmentés puis marqués par un fluorochrome de couleur différente (cyanine 5 et cyanine 3). Un mélange d'une même quantité des deux ADN marqués est ensuite déposé sur une puce à ADN. Cette puce est une lame de verre sur laquelle sont fixés des fragments d'ADN spécifiques des différentes régions du génome. Les deux ADN marqués fluorescents vont se lier de façon compétitive à leurs séquences complémentaires. Après cette étape d'hybridation, un scanner mesure les intensités de fluorescence au niveau de chacune des régions puis ces ratios de fluorescence sont analysés par des logiciels spécifiques et les résultats sont exprimés sous forme visuelle pour chacun des chromosomes. Lorsque l'ADN à tester et le témoin ont la même quantité d'ADN (deux copies chacun), la courbe est sur le zéro (aucune déviation). Lorsqu'il existe une délétion de l'ADN à tester (une seule copie de la région au lieu de deux), la courbe est déviée sur -1, à gauche de la ligne de base. Lorsqu'il existe une duplication de l'ADN à tester (trois copies de la région au lieu de deux), la courbe est déviée sur + 0,58, à droite de la ligne de base (figure 6).

Actuellement, plusieurs nanogrammes d'ADN sont nécessaires pour réaliser ces techniques. Or une cellule unique ne comporte qu'une très faible quantité d'ADN (7 pg). Une étape d'amplification de tout le génome (WGA, pour *whole genome amplification*) se révèle donc indispensable avant la réalisation d'une CGH-array sur cellules uniques comme dans le cadre du DPI-A. Trois méthodes sont couramment utilisées pour cette amplification : l'amplification de type PCR, l'amplification de type MDA (pour *multiple displacement amplification*), qui permet de générer des fragments amplifiés de plus grande

taille que la PCR, et avec une plus grande fiabilité, ou encore une combinaison de MDA et de PCR (MDA-PCR). Divers facteurs peuvent impacter la qualité et la fiabilité de l'amplification, parmi lesquels [20] :

- la richesse en guanine (G) et en cytosine (C) de la région du génome,
- le phénomène d'élimination d'allèle (ADO, pour *allele drop out*), qui consiste en l'amplification d'un seul allèle sur les deux,
- la fréquence des erreurs d'incorporation de nucléotides au cours de l'amplification,
- la présence d'amplifications aberrantes peut perturber l'interprétation du test pour les variations du nombre de copies.

Le phénomène d'élimination d'allèle et l'amplification allélique préférentielle peuvent être source d'erreur dans les études des SNV. En fonction du type d'analyse réalisée, une méthode d'amplification du génome peut être préférée à une autre [6, 21-23]. Par exemple, pour l'étude de nombre de copies, les techniques d'amplification par PCR et MDA-PCR sont à privilégier, car le biais d'amplification est moins fort sur des cycles supplémentaires d'amplification [6, 21-23]. Ces limites, liées à l'amplification, sont à prendre en compte car le défi majeur dans l'analyse du génome d'une cellule unique dans le cadre du diagnostic préimplantatoire est la discrimination entre les artefacts liés à l'amplification et les vrais variants génétiques présents dans la cellule avant cette amplification. Cela est d'autant plus à prendre en considération que cette technologie est rapidement devenue la technique de référence dans une grande partie des laboratoires de DPI, notamment pour la détection d'aneuploïdie [24-26].

La résolution des techniques sur cellule unique varie de 1 à 4 Mb, ce qui est moins résolutif que lorsque l'ADN est obtenu à partir d'un grand nombre de cellules mais permet néanmoins la détection des aneuploïdies

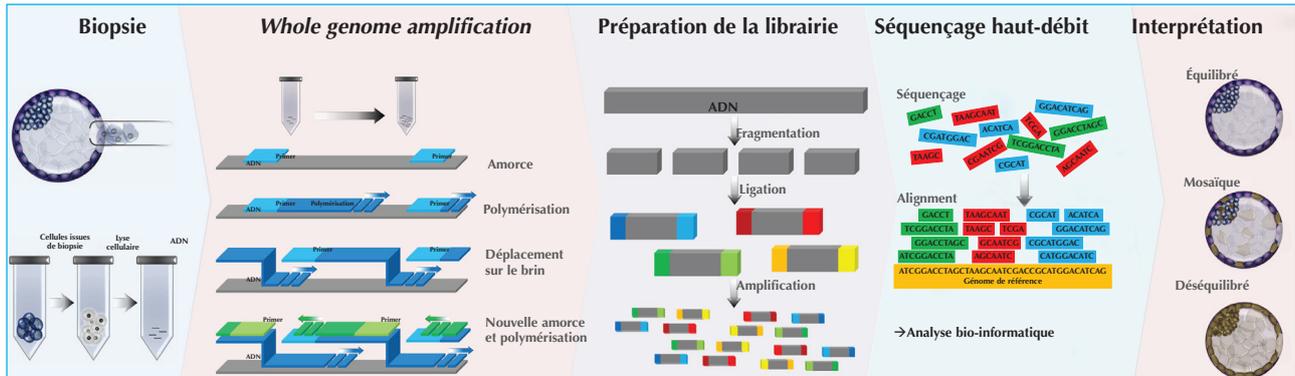


Figure 7. Principe général de la technique de séquençage haut débit (NGS).

et d'un nombre important de remaniements chromosomiques déséquilibrés [20, 27].

Les analyses peuvent être réalisées sur deux types de prélèvement : soit la biopsie d'un blastomère au troisième jour de développement embryonnaire, soit la biopsie de trophoctoderme (plusieurs cellules) au stade de blastocyste [28]. L'avantage du trophoctoderme est la plus grande quantité de cellules, qui facilite l'amplification et la réalisation de la technique.

Séquençage de nouvelle génération

La génétique, dans son ensemble, a été marquée durant cette dernière décennie par l'émergence d'une nouvelle technologie de séquençage pangénomique, communément appelée séquençage de nouvelle génération (NGS, pour *next-generation sequencing*). Cette approche a repoussé les limites analytiques en permettant d'obtenir en seulement quelques jours (moins de trois) la séquence complète du génome humain pour un ou plusieurs échantillons simultanément. Les performances de cette approche et la diminution rapide des coûts ont imposé le NGS comme référence dans de nombreuses applications en recherche et en routine clinique. Le DPI-A n'y a pas fait exception, et le NGS a rapidement supplanté les technologies précédentes comme la FISH, la qfPCR et l'ACPA dans cette application.

L'objectif du DPI-A par NGS n'est pas d'analyser la séquence nucléotidique complète du génome de l'embryon mais de rechercher une sur- ou une sous-représentation statistiquement significative de fragments d'ADN d'un chromosome, par rapport à d'autres chromosomes. Cette approche nécessite donc de compter un grand nombre de molécules d'ADN (*counting*) afin de pouvoir discriminer significativement les embryons euploïdes de ceux porteurs d'anomalies chromosomiques

(aneuploïdes). Il existe différentes plateformes et technologies permettant de répondre à cet objectif. Dans cet article seul sera abordé le principe général du NGS appliqué au DPI-A, sans rentrer dans les spécificités et détails de chaque plateforme et technologie de NGS.

Le processus analytique reste complexe et consiste schématiquement en quatre étapes (*figure 7*) : la préparation de l'échantillon avec extraction des acides nucléiques, l'amplification clonale des molécules d'ADN, le séquençage et enfin l'analyse bio-informatique des données grâce à des algorithmes qui varient selon les différents tests et approches mais dont la finalité est d'évaluer une quantité relative sur la base d'un test statistique.

Extraction des acides nucléiques et pré-amplification

L'extraction de l'ADN peut se faire à partir d'un ou deux blastomères obtenus sur des embryons à J3 ou à partir de biopsies de trophoctoderme sur des embryons à J5 (à partir de 5-10 cellules). Aujourd'hui, cette dernière option est privilégiée car elle permet de limiter l'effet délétère de la biopsie sur l'embryon [29] et de diminuer le risque d'un mosaïcisme cellulaire [30]. Cette stratégie d'extraction au stade blastocyste impose cependant le plus souvent une congélation de l'embryon et son transfert différé. Néanmoins, les avancées dans la vitrification des embryons garantissent une qualité et un potentiel d'implantation des embryons vitrifiés semblables à ceux des embryons frais transférés directement [31]. Il a par ailleurs été décrit qu'un transfert des embryons décongelés dans un cycle différé diminue drastiquement les risques d'hyperstimulation ovarienne. Qu'il soit extrait d'un ou de deux blastomères ou d'une biopsie de trophoctoderme, la quantité d'ADN obtenue reste extrêmement faible et largement insuffisante pour la réalisation des techniques de NGS sur un prélèvement natif. Pour cette raison, l'ADN extrait devra obligatoirement subir une étape de préamplification

(WGA) permettant d'obtenir plus de matériel génétique avant de procéder au séquençage. Cette étape de pré-amplification de l'ADN, bien que fiable, peut entraîner des biais d'amplification (certaines régions étant plus amplifiées que d'autres) et ainsi fausser artificiellement l'interprétation finale de l'analyse génétique [32, 33].

Constitution d'une librairie d'ADN et amplification clonale des fragments d'ADN

L'étape qui suit l'extraction de l'ADN est la production d'une librairie, c'est-à-dire une banque de fragments d'ADN qui sont ensuite séquencés. L'ADN, en fonction des protocoles, peut être fragmenté ou non en petites séquences de quelques centaines de paires de bases. Ces fragments peuvent aussi subir une étape d'enrichissement pour sélectionner uniquement des séquences d'intérêt. Dans le cadre du DPI-A, l'analyse est réalisée sur le génome complet, aucune étape d'enrichissement n'étant ainsi nécessaire en amont. Les fragments d'ADN peuvent ensuite être modifiés, par exemple avec l'ajout d'adaptateurs (petits oligonucléotides de séquence connue), qui permettront notamment leur amplification simultanée ultérieure. Avant de pouvoir être séquencés, ces fragments d'ADN devront être amplifiés de façon clonale afin d'augmenter le signal de détection. Les méthodes d'amplification varient selon les types de séquenceurs : PCR en émulsion, PCR en pont (*bridge PCR*), etc. Des index ou amorces d'indexation peuvent aussi être ajoutés pour attribuer un « code à barres unique » à chaque échantillon d'ADN pour son identification spécifique et permettre ainsi de grouper et d'analyser plusieurs échantillons en une seule technique de séquençage (multiplexage).

Le séquençage

Il existe différentes méthodes de séquençage. Les plus répandues actuellement sont le pyroséquençage (chimiluminescence), la synthèse avec terminateurs réversibles (fluorochromes), la ligation et enfin le semi-conducteur (voir [34] pour revue). Dans l'ensemble, le principe général reste le même. Après l'amplification clonale du fragment d'ADN, le brin complémentaire de chaque fragment cloné est néosynthétisé. À chaque incorporation d'un nouveau nucléotide, un signal (photon ou proton en fonction des méthodes de séquençage) est détecté, permettant de déterminer quel nucléotide vient d'être incorporé. À la fin des cycles de séquençage, l'ensemble des fragments aura été séquencé en parallèle (simultanément). L'ensemble de ces données brutes de séquençage seront enregistrées dans un fichier appelé FASTQ. Ces fichiers peuvent contenir des valeurs de qualité du séquençage (score Phred ou Q-score) qui évalue le degré de confiance du séquençage (FASTQC).

L'analyse bio-informatique

La masse importante de données brutes fournies par les séquenceurs est ensuite triée et analysée selon différents critères à travers un *pipeline* informatique, c'est-à-dire un assemblage de différents programmes (logiciels et algorithmes mathématiques ou statistiques). L'analyse bio-informatique permet dans un premier temps de comparer les séquences obtenues (appelées *reads*) avec des séquences génomiques de référence connues, afin de les affecter à leur chromosome d'origine (= alignement des séquences). L'ensemble de ces données alignées de séquençage est enregistré dans un fichier appelé BAM. Le nombre de *reads* à une position donnée du génome définit la profondeur du séquençage. Dans le cadre du DPI-A, un séquençage génomique complet à faible profondeur (0,5-1 ×) est généralement suffisant [20, 35]. Cette stratégie permet aussi d'envisager de séquencer plusieurs patients en même temps, la capacité analytique des séquenceurs dépendant, entre autres, de la profondeur de lecture.

Après la réattribution des séquences à chaque chromosome, l'objectif final des algorithmes d'analyse est de mettre en évidence une sur- ou une sous-représentation du nombre de séquences d'ADN d'un chromosome ou d'une région chromosomique en particulier. Il existe plusieurs algorithmes et méthodes pour répondre à cet objectif. Le plus souvent, ces algorithmes utilisent une approche de comptage (*counting*) par segmentation. De façon très simplifiée, le génome est tout d'abord segmenté en régions, généralement ≥ 1 Mb, appelé bin. Le nombre de *reads* est comptabilisé pour chaque *bin*. Ce nombre est ensuite comparé à la médiane des *reads* de l'ensemble des *bins* des autres chromosomes, servant ainsi de référence interne au sein du même échantillon. Cette approche permet au final de mettre en évidence un excès ou une diminution statistiquement significative du nombre de *reads* comptés sur un chromosome ou un intervalle (voir [36] pour détails). C'est cet excès ou cette diminution de séquences obtenues pour un chromosome donné qui constitue la signature d'une anomalie de nombre des chromosomes ou d'une région chromosomique. Les résultats peuvent se visualiser à la manière des résultats de CGH-array, permettant une interprétation plus aisée du statut de ploïdie sur l'ensemble des chromosomes.

Perspectives : séquençage de troisième génération

Une nouvelle génération de séquenceurs haut débit (séquenceurs de troisième génération) est actuellement en train de voir le jour et pourrait rapidement remplacer l'ancienne génération dans de nombreuses applications, y compris le DPI-A [37]. Ces séquenceurs permettent de générer de plus longs fragments d'ADN sans avoir besoin de cloner les fragments pour amplifier le signal. Ces séquenceurs de troisième génération présentent ainsi

Tableau 1. Comparaison des différentes technologies disponibles pour le DPI-A.

	FISH	qfPCR	aCGH	SNP array	NGS
Méthode					
Résolution (Mb)	0,1-0,5	20	6	6	3
Temps de rendu des résultats (heures)	24	24	72	72	72
Utilisable sur biopsie à J3	Oui	Oui	±	±	±
Utilisable sur biopsie à J5	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Utilisable sur ADN libre (liquide blastocélique ou milieu de culture)	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Congélation obligatoire	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Préamplification du génome obligatoire	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Anomalies détectées					
Screening des aneuploïdies	± [§]	± [*]	Oui	Oui	Oui
Remaniements équilibrés	Non	Non	Non	Non	Non
Remaniements déséquilibrés	Oui	± [*]	Oui	Oui	Oui
Microdélétions	Oui %	± [*]	Oui [#]	Oui [#]	Oui [#]
Microduplications	Non	± [*]	Oui [#]	Oui [#]	Oui [#]
Polyploïdie	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Disomie uniparentale	Non	± [*]	Non	Oui	Non
Détection des mosaïques	± [§]	Non	Oui si > 20 %	Oui si > 20 %	Oui si > 20 %

[§] Limité par le nombre de sondes utilisables. ^{*} Limité par la combinaison d'amorces de PCR utilisables. [#] En fonction de la résolution

l'avantage de séquencer plus rapidement que ceux de seconde génération et à un coût relativement moins élevé. Cependant, ces technologies génèrent beaucoup plus d'erreurs de séquençage et doivent être encore évaluées avant leur transfert en routine.

Limites, puissances, perspectives

Limites/puissance

Les techniques du DPI-A sont aujourd'hui toutes largement validées et offrent une robustesse compatible avec une utilisation en clinique [20]. Chacune présente cependant des avantages et des contraintes spécifiques (*cf. supra* et *tableau 1*). Les techniques du DPI-A ne sont en outre pas égales quant au type d'anomalies chromosomiques détectables (*tableau 1*). Le choix d'une technique par rapport à une autre conditionnera ainsi le choix des tests qui pourront être proposés aux couples. Enfin, le choix d'une technologie aura un impact au-delà des simples résultats de génétique et notamment sur l'organisation des différentes étapes du DPI-A en amont (temps de culture des embryons, timing et type de biopsies) et en aval (congélation, timing du transfert) de l'analyse génétique.

Perspectives : les diagnostics préimplantatoires des aneuploïdies mini-invasif ou non invasif

La découverte de la présence d'ADN génomique dans le liquide blastocélique ou dans le milieu de culture embryonnaire a permis d'envisager d'autres possibilités que les biopsies de blastomères ou de trophoctoderme [38-42]. On parle ainsi de DPI-A mini-invasif quand celui-ci est réalisé à partir d'une ponction de liquide blastocélique (qui serait moins délétère qu'une biopsie de trophoctoderme), et non invasif quand il est réalisé à partir de l'ADN directement extrait du milieu de culture de l'embryon.

L'extraction de l'ADN à partir du liquide blastocélique impose de réaliser l'aspiration du liquide dans la cavité blastocélique, une technique facile à mettre en œuvre et qui peut s'intégrer dans le cadre de la vitrification mais qui est semi-invasive [43, 44]. En outre, et surtout, les volumes de liquide obtenus sont réduits et les quantités d'ADN extrêmement faibles, rendant l'analyse génétique très délicate [33]. L'ADN libre circulant identifié dans le milieu de culture provient quant à lui des cellules embryonnaires en apoptose, expulsées dans le milieu extérieur. Cette expulsion cellulaire serait un mécanisme préférentiel de réparation des embryons avec des anomalies chromosomiques ; l'ADN présent dans le milieu de culture refléterait

ainsi principalement le contenu des cellules aneuploïdes. Récemment, des chercheurs ont contredit cette hypothèse en démontrant que ce phénomène était aussi fréquemment observable pour les embryons euploïdes que pour les embryons avec des cellules aneuploïdes [42]. Plusieurs études ont montré la faisabilité des études génétique à partir de cet ADN extrait des milieux de culture [33]. Cependant, la quantité d'ADN extrait reste très faible et les conditions à une extraction optimale de l'ADN circulant dans le milieu de culture restent à discuter [33, 41]. Surtout, le risque de contamination par des sources d'ADN maternel ou exogène reste très important, et constitue une limite majeure de cette approche non invasive [33, 45].

Des travaux comparatifs ont déjà été menés sur fluide blastocélique seul via des techniques de qPCR [46] et CGH-array [38, 39, 47, 48], avec des taux de concordance obtenus entre 62 et 97,1 %. Des recherches équivalentes sur milieu de culture seuls ont été réalisées par qPCR [41, 46], CGH array [45, 49] et NGS [42, 50, 51] avec des taux de concordance compris entre 33 et 87,7 %. Le pourcentage d'échantillons informatifs varie de 3,5 à 85,7 %. Enfin, des études menées à partir de prélèvement cumulant fluides blastocéliques et milieux de culture ont obtenu par NGS des taux compris entre 45 et 100 % [52, 53]. L'absence de robustesse des protocoles actuels n'est, à ce jour, pas compatible avec une utilisation en routine mais le nombre croissant de publications sur le sujet démontre un intérêt réel du monde scientifique à poursuivre dans cette voie.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344(6268): 768-70.
- Philip B, Bryndorf J, Christensen TB. Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Prenat Diagn* 1994; 14(13): 1203-15.
- Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 1993; 2(1): 43-50.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12): e57.
- Menten B, Buysse K, Vandesompele J, et al. Identification of an unbalanced X-autosome translocation by array CGH in a boy with a syndromic form of chondrodysplasia punctata brachytelephalangi type. *Eur J Med Genet* 2005; 48(3): 301-9.
- Voet T, Kumar P, Van Loo P, et al. Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(12): 6119-38.
- Schrurs BM, Winston RM, Handyside AH. Preimplantation diagnosis of aneuploidy using fluorescent in-situ hybridization: evaluation using a chromosome 18-specific probe. *Hum Reprod* 1993; 8(2): 296-301.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(1): 91-7.
- Swansbury J, Min T, Aruliah S. Fluorescence in situ hybridization methods and troubleshooting applied to fixed cell suspensions. *Methods Mol Biol* 2011; 730: 13-31.
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril* 2007; 88(1): 53-61.
- Fiorentino F. Array comparative genomic hybridization: its role in preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012; 24: 203-9.
- Munné S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Curr Genomics* 2012; 13: 463-70.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(4): 1214-8.
- Le Caignec C, Spits C, Sermon K, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(9): e68.
- Fiegler H, Geigl JB, Langer S, et al. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(3): e15.
- Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, et al. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(15): e105.
- Treff NR, Su J, Tao X, Northrop LE, Scott RT. Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(6): 335-43.
- Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, et al. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2011; 95(5): 1786.e5-8.
- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010; 47(10): 651-8.
- Vermeesch JR, Voet T, Devriendt K. Prenatal and preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet* 2016; 17(10): 643-56.
- Zong C, Lu S, Chapman AR, Xie XS. Genomewide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science* 2012; 338(6114): 1622-6.
- Treff NR, Northrop LE, Kasabwala K, Su J, Levy B, Scott RT. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. *Fertil Steril* 2011; 95(5): 1606-12.e1-2.
- de Bourcy CF, De Vlaminck I, Kanbar JN, Wang J, Gawad C, Quake SR. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PLoS One* 2014; 9(8): e105585.

24. Alfaraoui S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011 ; 26(6) : 1560-74.
25. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011 ; 26(7) : 1925-35.
26. Vanneste E, Melotte C, Voet T, et al. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Hum. Reprod* 2011 ; 26(4) : 941-9.
27. Dimitriadou E, Zamani Esteki M, Vermeesch JR. Copy number variation by array analysis of single cells following whole genome amplification. *Methods Mol Biol* 2015 ; 1347 : 197-219.
28. Mir P, Mateu E, Mercader A, et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet* 2016 ; 33(1) : 59-66.
29. De Vos A, Staessen C, De Rycke M, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod* 2009 ; 24(12) : 2988-96.
30. Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophoctoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2013 ; 28(8) : 2298-307.
31. Wong KM, van Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2017 ; 3 : CD011184.
32. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 2001 ; 11 : 1095-9.
33. Farra C, Choucair F, Awwad J. Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept. *Hum Reprod* 2018 ; 33(12) : 2162-7.
34. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008 ; 9 : 387-402.
35. Baslan T, Kendall J, Ward B, et al. Optimizing sparse sequencing of single cells for highly multiplex copy number profiling. *Genome Res* 2015 ; 25 : 714-24.
36. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014 ; 101(5) : 1375-82.
37. Wei S, Weiss ZR, Gaur P, Forman E, Williams Z. Rapid preimplantation genetic screening using a handheld, nanopore-based DNA sequencer. *Fertil Steril* 2018 ; 110(5) : 910-6.
38. Palini S, Galluzzi L, De Stefani S, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online* 2013 ; 26(6) : 603-10.
39. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A, et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil Steril* 2014 ; 102(6) : 1692-9.e6.
40. Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol Hum Reprod* 2014 ; 20(12) : 1238-46.
41. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril* 2017 ; 107(1) : 220-8.
42. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod* 2018 ; 33(4) : 745-56.
43. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reprod* 2002 ; 17 : 744-51.
44. Van Landuyt L, Polyzos NP, De Munck N, Blockeel C, Van de Velde H, Verheyen G. A prospective randomized controlled trial investigating the effect of artificial shrinkage (collapse) on the implantation potential of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2015 ; 30(11) : 2509-18.
45. Feichtinger M, Vaccari E, Carli L, et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reprod Biomed Online* 2017 ; 34(6) : 583-9.
46. Galluzzi L, Palini S, Stefani S, et al. Extracellular embryo genomic DNA and its potential for genotyping applications. *Future Sci OA* 2015 ; 1(4) : FSO62.
47. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R, et al. Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil Steril* 2015 ; 104(2) : 418-25.
48. Magli MC, Pomante A, Cafueri G, et al. Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertil Steril* 2016 ; 105(3) : 676-83.
49. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril* 2016 ; 106(6) : 1312-8.
50. Xu J, Fang R, Chen L, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for *in vitro* fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; 113(42) : 11907-12.
51. Liu W, Liu J, Du H, Ling J, Sun X, Chen D. Non-invasive preimplantation aneuploidy screening and diagnosis of beta thalassemia IVSII654 mutation using spent embryo culture medium. *Ann Med* 2017 ; 49(4) : 319-28.
52. Li P, Song Z, Yao Y, et al. Preimplantation genetic screening with spent culture medium/blastocoel fluid for *in vitro* fertilization. *Sci Rep* 2018 ; 8(1) : 9275.
53. Kuznetsov V, Madjunkova S, Antes R, et al. Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PLoS One* 2018 ; 13(5) : e0197262.