

LISTE DES ABREVIATIONS

PB	:	Paire de base
DAPI	:	4,6-diamidino-2-phenylindole
TPM	:	Tours par minutes
SSC	:	Sodium chloride, sodium citrate
NP-40	:	Nonidet P40
SA	:	Semaine d'aménorrhée
CIV	:	Communication intra-ventriculaire
CIA	:	Communication intra-auriculaire
RCIU	:	Retard de croissance intra-utérin

SOMMAIRE

	PAGE
INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. DIAGNOSTIC GENETIQUE PRENATAL	2
1. Définition	2
2. Objectifs	2
II. INDICATIONS DU DIAGNOSTIC GENETIQUE PRENATAL	2
1. En pathologie chromosomique	2
2. En pathologie génique	3
III. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT EN VU DU DIAGNOSTIC GENETIQUE PRENATAL	4
1. Choriocentèse ou placentocentèse	4
2. Amniocentèse	4
3. Cordocentèse	5
4. Adn fœtal circulant	5
IV. ANALYSES GENETIQUES EN VU DU DIAGNOSTIC GENETIQUE PRENATAL	5
1. Analyse des chromosomes	5
1.1 Caryotype fœtal	6
1.2 Hybridation in situ en fluorescence (FISH)	6
2. Analyse moléculaire	7
MATERIEL ET METHODE	
I. MATERIEL BIOLOGIQUE	8
II. METHODES UTILISEES	8
1. Prélèvement	8
2. Hybridation in situ en fluorescence	9
2.1 Principe	9
2.2 Sonde utilisée	10
2.3 Protocole expérimentale	11

a) Préparation de lames à partir d'échantillons de liquide amniotique non cultivés	11
b) Prétraitement des cellules de liquide amniotique non cultivées	11
c) Dénaturation de l'ADN des échantillons	12
d) Préparation de la sonde	13
e) Hybridation	13
f) Lavage post-hybridation	13
g) Lecture et interprétation des lames	14
3. Traitement des données	14
RESULTATS ET DISCUSSION	
I. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	15
1. Age maternel	15
2. Age de grossesse	15
3. Consanguinité	16
4. Antécédent d'anomalie chromosomique	16
II. SIGNES D'APPEL ECHOGRAPHIQUES	16
III. RESULTATS DE LA CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE	18
CONCLUSION GENERALE	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
	21

Présentation de la structure d'accueil

Unité de génétique médicale et d'oncogénétique Laboratoire central d'analyses médicales CHU Hassan II Fès

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est située au deuxième étage du laboratoire central d'analyses médicales. Elle représente une première expérience dans un CHU au Maroc. Elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009 et subdivisée en 3 disciplines (Clinique, cytogénétique et moléculaire)

Génétique clinique (centre diagnostic):

- Consultation de génétique
- Conseil génétique
- Consultation d'oncogénétique
- Avis du médecin généticien dans les services cliniques
- Hôpital de jour en coordination avec les services cliniques.

Génétique chromosomique classique et moléculaire

Génétique moléculaire

Le laboratoire est composé d'un plateau technique spécialisé, comportant 5 salles climatisées :

- Une salle de culture dédiée à la cytogénétique,
- Une salle de préparation des Mix pour PCR avec une hotte PCR,
- Une salle de PCR : complètement automatisée.
- Une salle de migration et d'analyse des produits de PCR
- Une salle de lecture dotée de deux microscopes couplés à des systèmes de capture et de traitement d'images.

L'unité est dirigée par Pr OULDIM Karim, Professeur de l'enseignement supérieur,

Le personnel comporte également:

- Un professeur assistant
- Trois administrateurs,
- Un technicienne
- 5 résidents en formation

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique offre des prestations de service dans le domaine de la génétique médicale. Ces prestations concernent des analyses de cytogénétique classique et moléculaire, des analyses de l'ADN et une consultation de conseil génétique et de dysmorphologie.

INTRODUCTION GENERALE

Chacun de nous à un désir d'avoir un enfant sain et en bonne santé. La génétique a donné naissance au test génétique prénatal. Le diagnostic génétique prénatal est l'ensemble des techniques ayant pour but de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus, tôt durant la grossesse, un certain nombre d'anomalies au stade fœtale ou maladies génétiques pouvant être graves.

L'échographie en est le premier élément déclenchant, car les images échographiques peuvent être à l'origine de la découverte d'une anomalie fœtale.

Le diagnostic prénatal est offert aux futurs parents à risque de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique, et si par malheur, l'enfant est atteint, ils auront le choix d'interrompre ou non la grossesse et de permettre une surveillance et un bon suivi médicale [RODRIGUE, CATHERINE 2007].

Les techniques utilisées pour le diagnostic sont principalement le caryotype fœtal et le diagnostic par FISH (Fluorescent In-Situ Hybridation : Hybridation In-Situ par des Sondes Fluorescentes).

La technique FISH est une technique de cytogénétique moléculaire permettant de localiser directement une région sur un chromosome, et de détecter des anomalies chromosomiques du nombre. On distingue :

- Des anomalies chromosomiques autosomique : telles que la trisomie 21, trisomie 18 et la trisomie 13
- Des anomalies chromosomiques gonosomiques: telle que le syndrome de Turner et Klinefelter.

La précision qu'apporte cette technique, l'accessibilité des sondes du commerce et sa rapidité (24h - 48h) ont en fait une technique très précise et qui prend de l'ampleur de jour en jour.

L'objectif du présent travail consiste en l'étude concrète d'une série diversifiée de patients présentant des indications pour réaliser un examen génétique prénatal. Les patients sont présentés à l'unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du CHU Hassan II de Fès. L'étude va se focaliser sur le côté diagnostique cytogénétique moléculaire par réalisation de l'hybridation in Situ fluorescente (FISH), afin de déceler la présence de toute anomalie de nombre ou de structure chez ces patients.

RapportGratuit.com

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DIAGNOSTIC GENETIQUE PRENATAL

1. DEFINITION

Le dictionnaire permanent de bioéthique et de biotechnologie définit le diagnostic prénatal comme tout diagnostic portant sur l'embryon ou le fœtus humain *in utero* qu'il s'agisse de déceler une anomalie morphologique ou une maladie génétique ou chromosomique actuelle ou une prédisposition à développer une maladie dans le futur.

Le diagnostic génétique prénatal est l'ensemble des techniques visant l'identification tôt durant la grossesse d'un certain nombre d'anomalies au stade fœtal. Il est accompli en vue de déterminer ou prévoir l'état de l'enfant à naître.

Le diagnostic prénatal en génétique s'est développé dans les années 1970 pour répondre à la détresse des couples ayant un enfant T21 et qui souhaiteraient avoir un autre enfant sans prendre le risque d'une récurrence. Depuis, d'autres indications ont été retenues. Reffff

2. OBJECTIFS

Le risque d'un geste invasif doit toujours être mis en balance avec les bénéfices attendus. Cette estimation du risque se fait lors de la consultation obligatoire et préalable à tout acte de diagnostic prénatal :

- Confirmer la justification du diagnostic prénatal.
- Evaluer le risque d'avoir un enfant atteint.
- Expliquer la technique, les modalités et les risques du prélèvement fœtal.
- Exposer le résultat attendu et ses limites.
- Envisager avec le couple les conséquences éventuelles d'un diagnostic positif d'atteinte fœtale.

II. INDICATIONS DU DIAGNOSTIC GENETIQUE PRENATAL

Les anomalies chromosomiques surviennent le plus souvent accidentellement. Le diagnostic prénatal chromosomique est donc essentiellement réalisé chez des couples sans antécédents particuliers mais pour lesquels les moyens de dépistage (échographies, marqueurs sériques maternels) ont défini un risque particulier d'anomalies chromosomiques. En France, le dépistage concerne surtout la trisomie 21, principale aneuploïdie. En 2009, l'Agence de Biomédecine a enregistré la réalisation de 77 272 caryotypes. Ceci a permis l'identification de 3849 anomalies déséquilibrées et la réalisation de 2959 interruptions médicale de grossesse [Agence Biomédecine , 2016].

1. PATHOLOGIE CHROMOSOMIQUE

Les indications témoignant de l'existence d'une anomalie chromosomique de nombre (Annexe1) sont :

- **Age maternel avancé** : A l'accouchement le risque de donner naissance à un enfant porteur d'une anomalie chromosomique est plus élevé pour les femmes âgées de plus de 35 ans. Ce risque accru est dû au vieillissement ovulaire. [HURET et DALLAIRE 2006]

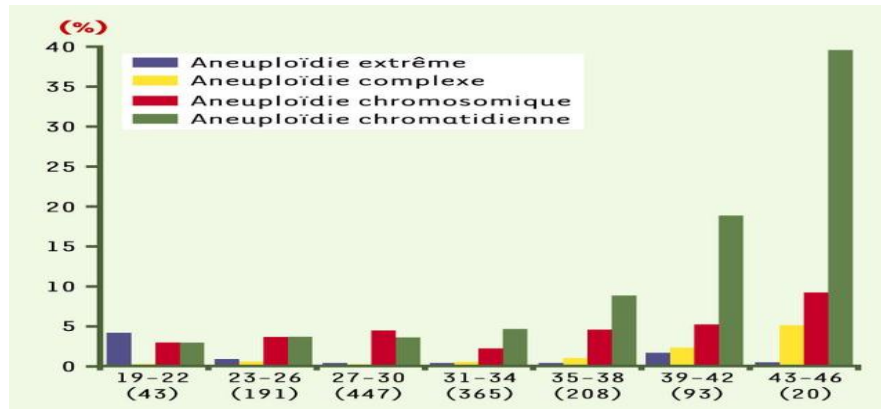


Figure 1 : Distribution des différents types d'aneuploïdies en fonction de l'âge maternel [Hawley RS et al ,1994].

- **Remaniement chromosomique équilibré chez l'un des parents**
- **Antécédents d'enfant porteur d'anomalie chromosomique**
- **Diagnostic de sexe**
- **Signes d'appel échographiques :**
 - ✚ Anomalies cardiaques (Communication auriculo ventriculaire): Trisomie 21 ;
 - ✚ Augmentations de la clarté nucale : aneuploïdie ;
 - ✚ Anomalies conotruncales: Syndrome Vélo cardio facial ;
 - ✚ Hyper-échogénéicité intestinale: Mucoviscidose, trisomie 21 ;
 - ✚ Hernie diaphragmatique: Trisomie 21, 13, 18 ;
 - ✚ Polydactylie: Trisomie 13 ;
- **Signes d'appel biologiques** : Consiste à analyser trois substances particulières caractéristiques de la grossesse qui s'écartent de la moyenne lorsque le fœtus est atteint d'anomalies chromosomiques en particulier la trisomie ou d'un spina bifida.
- **Recherche d'une instabilité chromosomique chez les familles à risque**

2. PATHOLOGIE GÉNIQUE

les indications témoignant de l'existence d'une anomalie génique sont :

- **Affections récessives si les parents hétérozygotes pour cette affection**
- **Affections liées à l'X si la mère est conductrice**
- **Toute maladie mono génique sur une région précise du génome.**

III. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT EN VU DU DIAGNOSTIC PRENATAL GENETIQUE

Elles consistent en des prélèvements d'échantillons fœtaux obtenus directement à partir du fœtus ou indirectement à partir de structures ovulaires annexes telles que le placenta. Ces techniques sont toujours précédées d'un examen échographique s'assurant de la bonne viabilité fœtale, de l'âge gestationnel et de la localisation du placenta. Quatre techniques interviennent à différents stades de la grossesse : Choriocentèse, Amniocentèse, Cordocentèse et l'ADN fœtal circulant. Le choix du type de prélèvement dépend du risque génétique, du terme de la grossesse et du risque lié au prélèvement.

1. CHORIOCENTESE OU PLACENTOCENTESE

Développée en France depuis le début des années 1980, le prélèvement de villosités chorales, ou biopsie de trophoblaste, ou choriocentèse, permet d'obtenir un diagnostic chromosomique, cytogénétique ou biochimique dès la 11^{ème} semaine d'aménorrhée . Le prélèvement de villosités chorales s'effectue en ambulatoire chez une patiente non à jeun et après réalisation d'une échographie permettant de vérifier le terme, la vitalité embryonnaire, et de localiser le trophoblaste et son accessibilité pour le prélèvement. Toujours réalisé sous échoguidage, le prélèvement peut être réalisé par voie transabdominale ou transcervicale. La voie d'abord transabdominale est la plus souvent préférée en raison de sa simplicité et de son taux moindre de complications, notamment infectieuses.

2. AMNIOCENTESE

C'est la technique la plus fréquemment employée. Elle consiste, sous un échoguidage, à introduire une aiguille fine à travers la paroi abdominale ,afin de prélever le liquide amniotique. Des cellules fœtales d'origine digestive haute, du système urinaire de la peau et des membres y baignent et sont récupérées par centrifugation pour analyse cytogénétique, biochimique et moléculaire. Elle est réalisé après 14 semaine de gestation[FAURE, 2002].Le risque de fausses couches est de 0,5% à 1 % et dépend de l'expérience du praticien.

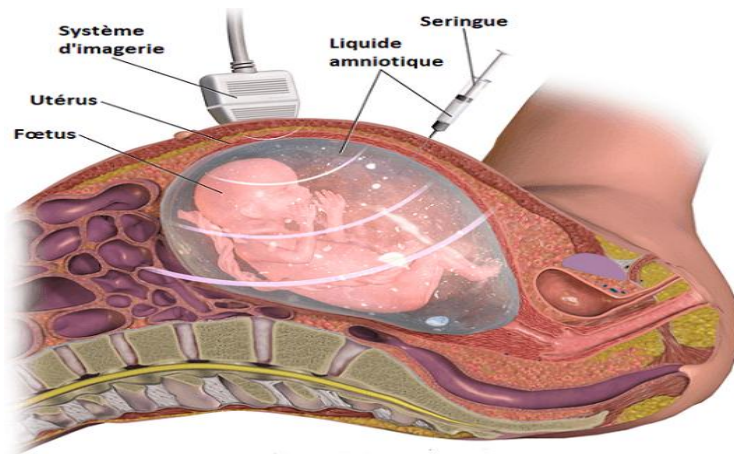


Figure 2 : Schéma légendé d'une amniocentèse. [Bruce Blaus].

3. CORDOCENTESE

La ponction de sang fœtal, prélèvement de sang fœtal ou cordocentèse, est une méthode diagnostique et parfois thérapeutique prénatale (transfusion *in utero*), réalisée depuis le début des années 1980 entre 18 et 40 semaines d'aménorrhée [DAFFOS et al ,1988]. Elle consiste à ponctionner le cordon ombilical dans la veine ombilicale afin de prélever du sang fœtal.

Après installation de la patiente, l'échographie permet de choisir le site de prélèvement situé de manière à permettre l'abord du cordon ombilical au niveau de son insertion placentaire [DAFFOS et al ,1988].

4. ADN FŒTAL CIRCULANT

C'est un ADN libre non contenu dans des cellules qui provient des cellules placentaires en apoptose. Il représente environ 10% de l'ADN total circulant, Il est très fragmenté et de petite taille < 200 pb, présent dès 4^{ème} semaine d'aménorrhée, 7^{ème} semaine d'aménorrhée et plus.

IV. ANALYSES GENETIQUES EN VU DU DIAGNOSTIC PRENATAL GENETIQUE

Les progrès de la médecine et de la génétique ont fait naître des techniques d'analyses génétiques sur l'embryon ou le fœtus afin d'identifier des aneuploïdies, des mutations, syndromes microdélétionnels, ou pour la caractérisation d'anomalies de structure des chromosomes. Plusieurs méthodes d'analyses peuvent être alors utilisées et dépendent de l'indication :

1. ANALYSE DES CHROMOSOMES

Si l'anomalie diagnostiquée cliniquement résulte d'un problème au niveau des chromosomes, on parle d'une anomalie chromosomique. Il peut s'agir d'anomalies de nombre ou de structure.

Pour identifier ces anomalies chromosomiques, différents examens génétiques peuvent être prescrits selon l'indication parmi lesquels : le caryotype et la technique de FISH ([Hybridation in situ par fluorescence](#)).

1.1. Caryotype fœtal

C'est une technique qui consiste à analyser l'ensemble des chromosomes constituant le patrimoine génétique d'un fœtus. Les cellules amniotiques ou trophoblastiques mises en culture (2 à 3 semaines) de telle sorte à ce que les chromosomes puissent être visualisés au microscope au moment où ils se divisent. Les mitoses sont bloquées en métaphase, les chromosomes sont dispersés par choc hypotonique et grâce à la technique de marquage il y' aura une succession de bandes sur chaque chromosome et on pourra ainsi classer l'ensemble par paire. On vérifie par la suite le nombre, la forme et la structure [RAMBERT, 2018].

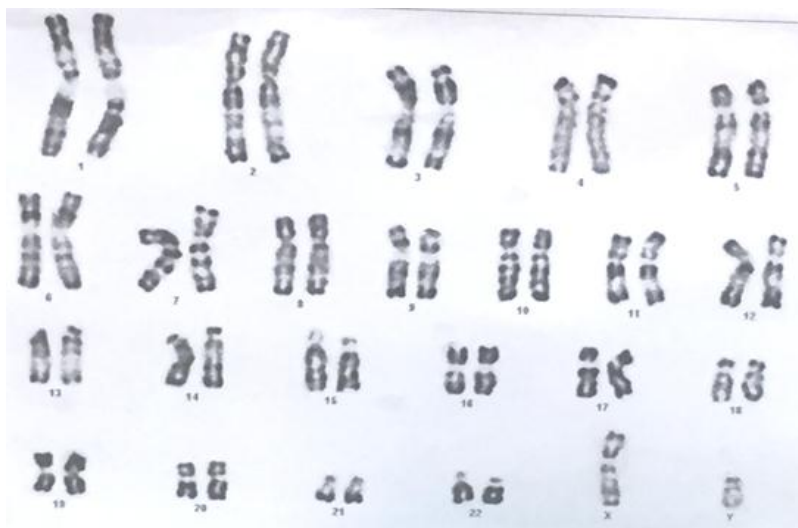


Figure 3 : Caryotype humain homme.

1.2. Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH)

Contrairement au caryotype qui permet une analyse pangénomique, la technique d'hybridation in situ par fluorescence permet de visualiser une zone spécifique d'un chromosome. Elle est donc proposée lorsque les signes cliniques orientent le test génétique vers un chromosome précis.

Principe : L'hybridation in situ (HIS, ou FISH en anglais) consiste à hybrider des sondes sur des préparations cytologiques, « in situ », en l'occurrence sur des préparations interphasiques ou de chromosomes métaphasiques. Les sondes sont marquées avec des fluorochromes . Ce qui permet, selon le fluorochrome utilisé, d'observer au microscope à épi fluorescence des signaux spécifiques.

Avantage : Cet examen est plus rapide, et permet de voir des anomalies de trop petite taille pour être détectées sur le caryotype [MULERIS M et al , 1996].

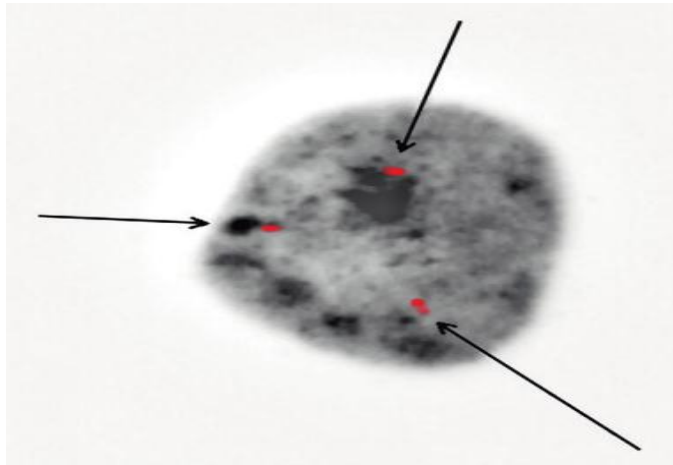


Figure 4 : Hybridation d'un noyau d'amniocyte non cultivé avec une sonde spécifique du chromosome 21q22.

(Présence de trois signaux rouges (flèches) en faveur du diagnostic de trisomie 21).

2. ANALYSE MOLECULAIRE

Le but du diagnostic prénatal moléculaire est l'identification des anomalies géniques par des techniques de biologie moléculaire :

- ✚ Détection directe des mutations quand la mutation est connue et spécifique de la pathologie ;
- ✚ Détection indirecte par étude des polymorphismes autour du gène ;

Le prélèvement de villosités chorales est privilégié en raison de sa précocité. Il permet généralement l'extraction directe d'une quantité suffisante d'ADN pour la recherche de la ou des mutations en cause.

De nouvelles techniques sont de plus en plus utilisées en diagnostic prénatal, notamment la technique d'hybridation génomique comparative sur micro réseau d'ADN ainsi que le séquençage Haut débit sur ADN fœtal circulant qui permet de séquencer plusieurs millions de fragments. Il est indiqué actuellement pour le diagnostic des aneuploïdies tel que la t21.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Il s'agit d'une étude rétrospective étalée sur l'année 2018 se portant sur 13 patientes suivies au service de gynécologie obstétrique du CHU Hassan II Fès.

Un consentement éclairé a été obtenu auprès de toutes les patientes participant à l'étude.

Les données cliniques et para cliniques sont recueillies à partir des dossiers des patientes .

II. METHODES UTILISEES

1. PRELEVEMENT (AMNIOCENTESE)

Après installation de la patiente en respectant une asepsie rigoureuse, l'échographie permet de choisir le site de ponction. On le situe si possible au niveau de la plus grande citerne du liquide amniotique et à distance du placenta.

La ponction transplacentaire ne peut cependant pas toujours être évitée, notamment en cas d'insertion antérieure du placenta. Sa réalisation pourrait augmenter le risque d'allo-immunisation fœto-maternelle mais ne semble pas exposer à un risque plus grand d'avortement [Bombard AT et al,1995]. Le site de ponction doit éviter la région de la plaque chorale riche en vaisseaux.

L'aiguille utilisée est le plus souvent une aiguille de 20 gauges de 9 à 15 cm de long. Sous guidage échographique. L'aiguille est introduite par voie transabdominale sans nécessité de réalisation d'une anesthésie locale préalable [GIORLANDINO et al,1994]. Son passage au travers des membranes doit être franc et rapide pour éviter de refouler l'amnios sans le traverser. L'aiguille en place et le mandrin retiré, le liquide amniotique est prélevé. Les deux premiers millilitres, en raison du risque de contamination par des cellules maternelles, ne sont pas utilisés pour les analyses fœtales [NAGEL et al,1998].

Ensuite, 1 mL de liquide amniotique par semaine d'aménorrhée avant 20 semaines d'aménorrhée ou 20 mL après ce terme sont prélevés et adressés rapidement au laboratoire de cytogénétique et biologie moléculaire .

Après retrait de l'aiguille, l'activité cardiaque fœtale, les mouvements actifs fœtaux et l'absence de saignements sont contrôlés. Au décours d'une surveillance d'au moins deux heures s'assurant de l'absence de survenue d'une hydrorrhée post-amniocentèse, la sortie de la patiente est autorisée.



Figure 5 : Déroulement d'une amniocentèse.

2. HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)

L'hybridation in situ en fluorescence est devenue un outil diagnostique de routine dans les laboratoires de cytogénétique pour caractériser de manière ciblée les microremaniements chromosomiques inférieurs à 3 Mb (Mégabase), non détectables par le caryotype métaphasique

2.1 Principe

L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de visualiser des séquences ADN au sein d'une préparation cellulaire. La technique utilise des sondes simple brin marquées avec un fluorochrome s'hybridant à des séquences spécifiques.

L'hybridation de la sonde à l'ADN cellulaire est visible par détection directe à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les cellules provenant d'échantillons de liquide amniotique sont montées sur des lames de verre, l'ADN des échantillons ainsi fixé est dénaturé sous forme simple brin, puis hybridé aux sondes CEP 18/X/Y et LSI 13/21. Après l'hybridation, l'excès des sondes non hybridées est éliminé au cours d'une série de lavages.

Les chromosomes et les noyaux sont contrecolorés avec le colorant DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole).

L'hybridation des sondes ADN CEP 18/X/Y et LSI 13/21 est examinée à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission adéquats permettant de visualiser les signaux fluorescents intenses orange, verts et bleus. (Annexe 2)

La procédure FISH permet l'énumération visuelle des chromosomes 13, 18, 21, X et Y dans les noyaux interphasiques grâce à la sonde CEP 18/X/Y qui contient un mélange de sondes ADN fluorescentes à marquage direct spécifiques des régions D18Z1, DXZ1 e DYZ3

des chromosomes 18, X et Y, respectivement et La sonde LSI 13/21 qui contient un mélange de séquences d'ADN uniques s'hybridant dans la région 13q14 du chromosome 13 et des séquences d'ADN uniques complémentaires des loci D21S259, D21S341 et D21S342 contenus dans les régions 21q22.13 à 21q22.2 sur le bras long du chromosome 21.

2.2 Sonde utilisée (Annexe 3)

AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit (Vysis CEP 18/X/Y - alpha satellite / LSI 13/21) (**Figure 6**) Sonde utilisant la technologie brevetée d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) appliquée aux amniocytes non cultivés, permet de détecter les trisomies 13 (syndrome Patau), 18 (syndrome d'Edwards) et 21 (syndrome de Down) et les aneusomies des chromosomes sexuels en à peine 24 heures

Chaque kit AneuVysion comporte :

- ✚ cinq sondes FISH emballées en deux mélanges de sondes ;
- ✚ contre-colorant DAPI ;
- ✚ notice d'utilisation présentant des informations détaillées sur le protocole.



Figure 6 : Kit de sonde ADN multicolore AneuVysion.

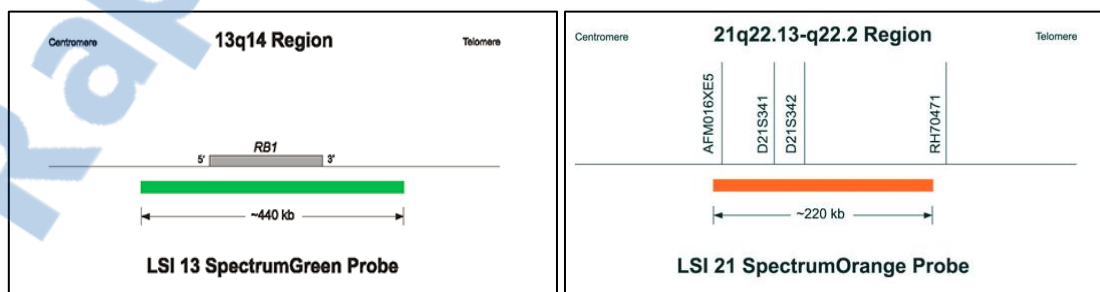


Figure 7 : Représentation schématique de l'hybridation de sonde ADN multicolore AneuVysion.

2.3 Protocole expérimentale (Annexe 4)

a) Préparation de lames à partir d'échantillons de liquide amniotique non cultivés

Pour commencer on centrifuge 5 ml d'échantillon de liquide amniotique entier pendant 5 minutes à 2500 t/min (l'échantillon ne doit apparaître ni sanglant ni marron). On remet le culot en suspension dans 4 ml de trypsine, et on l'incube dans un bain-marie à 37 °C pour au moins 15 minutes.

On centrifuge la suspension pendant 5 minutes à 2500 t/min. On remet le culot en suspension dans 5 ml de KCl (0.56%), et on l'incube pendant 20 minutes dans un bain-marie à 37 °C. Ensuite on ajoute 2 ml de fixateur (méthanol/acide acétique glacial : 3/1) aux cellules où à la solution hypotonique, et on centrifuge délicatement. On centrifuge la suspension pendant 5 minutes à 2500 t/min et on remet le culot dans 1 ml de fixateur frais.

Il faut conserver les échantillons fixés à 4 °C pendant au moins 30 minutes ou jusqu'à ce que le test FISH soit prêt à être effectué. Pour une conservation à long terme, on conserve les échantillons fixés à -20 °C (5 °C dans un fixateur).

Avant de monter les cellules sur les lames, on ajuste le volume de la suspension cellulaire en fonction de la taille du culot. Si nécessaire, notamment après une conservation prolongée (plus d'un mois), on lave les culots avec du fixateur.

Pour préparer les lames en vue d'un test FISH, on dépose la suspension cellulaire directement sur une ou deux lames en verre froides pour créer 2 zones d'hybridation (15 à 25 µl de suspension cellulaire par zone).

b) Prétraitement des cellules de liquide amniotique non cultivées

La méthode suivante peut être utilisée pour prétraiter les lames préparées à partir d'échantillons de liquide amniotique non cultivé. Cette procédure est recommandée pour l'obtention de résultats FISH optimaux. Ce prétraitement s'applique tout particulièrement aux échantillons prélevés à un stade avancé de la grossesse et aux échantillons à hybrider immédiatement après la préparation des lames.

On place la lame préparée à partir d'amniocytes non cultivés dans du SSC 2X pendant 1 heure à 37 °C. Ensuite on la place dans une solution active de pepsine récemment préparée pendant 13 minutes à 37 °C, et on la rince dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à température ambiante pendant 5 minutes.

On Place la lame dans une solution de post-fixation (formaldéhyde à 0,95 % : 1,3 ml de formaldéhyde a 37 %, 0,23 g de MgCl₂ et 48,7 ml de PBS. On la conserve à 4 °C, et on

l'utilise dans le mois qui suit.) pendant 5 minutes à température ambiante, et on la rince dans du PBS aussi à température ambiante pendant 5 minutes.

On sèche la lame, on l'immerge dans de l'éthanol (70%) à température ambiante et on la laisse pendant 1 minute.

On retire la lame de l'éthanol (70%), et on répète l'étape précédente avec de l'éthanol (85%), puis avec de l'éthanol (100%). Finalement on dénature la lame.

c) Dénaturation de l'ADN des échantillons :

On préchauffe la chambre d'hybridation à 37 °C avant de préparer les lames. On ajoute la solution de dénaturation dans un vase Coplin au bain-marie à 73 °C pendant au moins 30 minutes, et on vérifie sa température avant son utilisation.

On vérifie que le pH de la solution de dénaturation se situe entre 7.0 et 8.0 avant chaque utilisation. On dénature l'ADN des échantillons en immergeant les lames préparées dans la solution de dénaturation à 73 °C pendant 5 minutes (Ne pas dénaturer plus de 4 lames à la fois par vase Coplin).

A l'aide de pinces, on retire les lames de la solution de dénaturation et on les place immédiatement dans une solution de lavage à l'éthanol (70 %) à température ambiante. Par la suite on agite la lame pour éliminer le formamide, et on la laisse dans l'éthanol pendant 1 minute.

On élimine l'excès d'éthanol de la lame en touchant le bord inférieur avec un papier buvard et on essuie le dessous de la lame avec un chiffon de laboratoire. Ensuite, on place la lame sur une plaque chauffante, dont la température est comprise entre 45 et 50 °C pour une durée de 2 minutes au maximum avant d'appliquer la solution de sondes.

REMARQUE : Si le temps d'hybridation est tel que la lame est prête plus de 2 minutes avant la sonde, la lame devra rester dans le vase contenant de l'éthanol à 100 %. Ne pas sécher les lames à l'air avant de les placer sur la plaque chauffante pour lames.

d) Préparation de la sonde

On laisse la sonde atteindre la température ambiante en vue de diminuer la viscosité et de permettre un pipetage précis. On passe au vortex pour homogénéiser. Par la suite on centrifuge les tubes brièvement (1 à 3 secondes) dans une micro centrifugeuse pour rassembler le contenu au fond des tubes. On passe à nouveau délicatement au vortex pour mélanger.

e) Hybridation

On applique 10 µl de mélange de sondes CEP 18/X/Y sur une zone d'hybridation de la lame, et 10 µl de mélange de sondes LSI 13/21 sur l'autre zone d'hybridation. On place immédiatement une lamelle en verre de 22 mm × 22 mm sur la solution de sondes. Ensuite on laisse la solution se répartir de manière homogène sous la lamelle. Il faut éviter les bulles d'air qui peuvent influencer sur l'hybridation.

On scelle comme suit la lamelle avec du rubber cement : aspirer le rubber cement avec une seringue de 5 ml. Mettre un peu de rubber cement à la périphérie de la lamelle en débordant sur la lame afin de sceller la lamelle.

Finalement on place la lame dans la chambre d'hybridation préchauffée à 37°C, tout en couvrant hermétiquement la chambre et on laisse incubé à 37°C pour une durée de 24 heures.

f) Lavage post-hybridation

Pour commencer on ajoute le SSC 0,4X/NP-40 à 0,3 % dans un vase Coplin. On préchauffe la solution de SSC 0,4X/NP-40 (0,3 %) en plaçant le vase Coplin dans le bain-marie à 73 °C, pendant au moins 30 minutes, ou jusqu'à ce que la température de la solution atteigne 73°C.

On ajoute le SSC 2X/NP-40 à 0,1 % dans un second vase Coplin, et on le place à température ambiante. On jete les deux solutions de lavage après 1 jour d'utilisation. Ensuite on retire le rubbercement et les lamelles, et on place immédiatement la lame dans le vase Coplin (contenant du SSC 0,4X/NP-40 à 0,3 % à 73 °C). On agite la lame pendant environ 3 secondes, puis on les laisse incubé 2 minutes.

On retire chaque lame de la solution de lavage, et on les place dans un vase de SSC 2X/NP-40 à 0,1 % à température ambiante pendant 5 à 60 secondes, après les avoir agitées pendant 1 à 3 secondes au moment de les placer dans la solution. Par la suite on laisse les lames sécher à l'air dans l'obscurité (un tiroir fermé ou une étagère dans un placard fermé suffit). On applique 10 µl de contre-colorant DAPI II sur chaque zone cible de la lame, et on pose une lamelle en verre par-dessus. Pour finir on conserve la lame dans l'obscurité avant de procéder à l'énumération des signaux.

g) Lecture et interprétation des lames (Annexe5)

La lecture se fait avec un microscope à fluorescence avec des FILTRES adaptés aux fluorochromes des sondes utilisés.(Figure 9). On fait le comptage d'au moins 100 noyaux afin d'établir le nombre des chromosomes 13,18,21,X et Y.



Figure 8 : Microscope binoculaire à épifluorescence adapté à la FISH et au caryotype.

3. TRAITEMENT DES DONNEES

Dans notre série d'études nous avons utilisé des calculs mathématiques pour obtenir les moyens de l'âge maternel , l'âge de grossesse et la consanguinité de notre population étudié, ainsi que le programme Microsoft Excel pour représenter nos résultats sous forme de diagrammes et histogrammes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Il s'agit d'une étude rétrospective étalée sur l'année 2018 se portant sur 13 patientes suivies au service de gynécologie obstétrique du CHU Hassan II Fès.

1. AGE MATERNEL

L'âge des patientes de notre série varie entre 25 ans et 37 ans avec une moyenne d'âge de 31 ans, la tranche d'âge la plus représentée est celle entre 30 ans et 35 ans avec une moyenne de 61,53%.

L'âge est un facteur de risque prouvé dans les trisomies. une étude tunisienne, rapportée sur le diagnostic prénatal, avait montré que la principale indication chez la population tunisienne du diagnostic prénatal était l'âge avancé, supérieur à 35 ans, dans 65,5% des cas. Alors que les malformations fœtales objectivées par échographie était rapportée dans 8,23%.

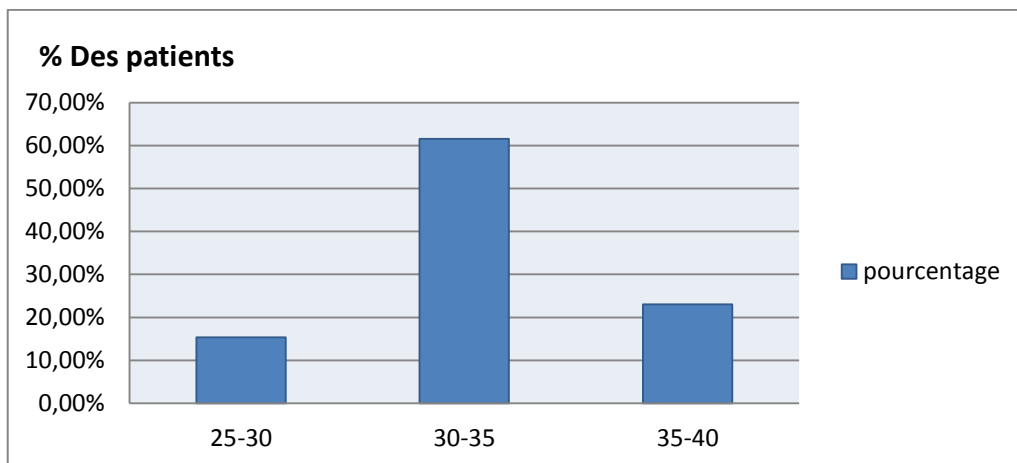


Figure 9 : Répartition des nombres de cas en fonction des tranches d'âge

Dans cette série d'étude les patientes âgées de moins de 30 ans ont un pourcentage de 15,38%. Ce pourcentage augmente jusqu'à atteindre son maximum à 61,53% dans la tranche] 30 ; 35]. Cette valeur diminue à 23,07% dans la tranche] 35 ; 40] .

Les patientes les plus diagnostiquées ont un âge plus de 30 ans, ces résultats nous font que confirmer que le risque d'avoir une aneuploïdie, est lié à l'âge maternel. Par exemple le facteur de risque d'avoir une trisomie 21 est 1/1500 à l'âge de 20 ans, 1/1000 à 30 ans, 1/250 à 38 ans, 1/100 à 40 ans, 1/30 à 45 ans[CNGOF,2018].

2. AGE DE GROSSESSE

L'amniocentèse a été réalisée au cours du 2ème trimestre chez 8 patientes, l'âge de grossesse varie entre 18 SA et 32 SA, avec un âge moyen de 24 SA.

3. CONSANGUINITE

La consanguinité a été rapportée chez 46,15% de notre population étudiée.

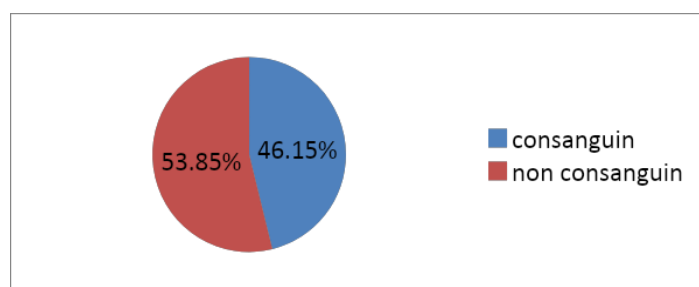


Figure 10 : Diagramme de répartition des patientes en fonction de la consanguinité

Ce diagramme représente un taux important de consanguinité qui est de 46,15 %. Au Maroc, la consanguinité est estimée à plus de 15 %, pourtant, ce taux reste relativement élevé et pourrait augmenter le risque de maladies autosomiques récessives [KADIRI,2017].

4. ANTECEDENT D'ANOMALIE CHROMOSOMIQUE

Dans notre série d'études une seule patiente avait des antécédents familiaux d'anomalies chromosomiques.

II. SIGNES D'APPEL ECHOGRAPHIQUE

Le diagnostic prénatal est indiqué devant la présence d'anomalies morphologiques à l'échographie. Dans notre étude, toutes nos patientes avaient des signes d'appel échographiques.

Les principaux signes d'appel échographiques devant lesquels l'amniocentèse a été réalisée sont :

- Retard de croissance intra-utérin présent chez 38,46% des grossesses
- Hydramnios 30,7%.
- Malformations cardiaques avec un pourcentage de 30,7% .

Feldman et al ont réalisé une étude sur 301 patientes, afin de déterminer l'avantage de la FISH (sonde de 21, 18, 13, X et Y) dans le diagnostic prénatal des aneuploïdies. Les patientes présentant des anomalies fœtales ont été incluses dans l'étude.

Les anomalies ont été réparties en anomalies échographiques majeures , présentes chez 88 patientes soit 29,9% , et anomalies mineures présentes chez 70,07%.

Dans notre étude, l'indication de l'amniocentèse a été posée devant la présence de critères mineurs dans 71% des cas, ce taux est proche de celui rapporté par d'autres études internationales .

Le diagnostic prénatal était demandé par le praticien chez 3 parturientes dans notre série devant la présence de malformations cardiaques. Un seul cas avait la tétralogie de Fallot , chez qui la recherche du syndrome de Digeorge en utilisant la sonde 22q11 s'est révélée normale ; Le deuxième fœtus était diagnostiqué pour trisomie 18 on mosaïque .

Une études réalisée par MOORE et al sur (Prénatal diagnosis of aneuploidy and deletion 22q11.2 in fetuses with ultra sound detection of cardiac defects) , avait objectivée que la principale cause de malformations cardiaques était la trisomie 18 dans 36,9% des cas rapportée avec aneuploïdie, 3% des fœtus avec un caryotype normal avait une délétion 22q11.

Le nombre limitée des cas dans notre étude, liée essentiellement à l'indication très restreinte de la réalisation du diagnostic prénatal devant les limites de la plateforme technique pour la réalisation de l'amniocentèse (geste qui nécessite une gynécologue entraînée) explique les différences des résultats.

Dans la même étude la technique principale de prélèvement était l'amniocentèse chez 182 patientes, et CVS chez 115 patientes, alors que notre étude n'as inclus que des prélèvements sur amniocentèse, ce qui est expliqué par la bonne maitrise de la technique par les gynécologues du centre hospitalier Hassan II, Fès.

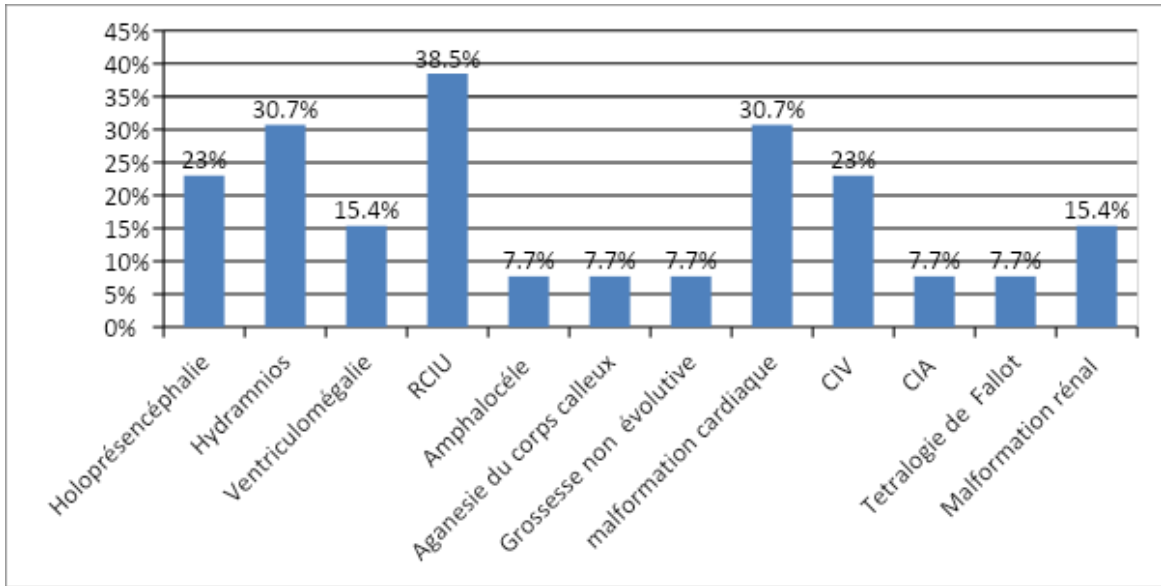


Figure 11 : Répartition en histogramme du pourcentage des différents signes échographiques chez nos patientes

III. RESULTATS DE LA CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

Les principaux syndromes suspectés dans notre série étaient la trisomie 18 chez 3 fœtus.

Parmi les 13 fœtus chez qui l'amniocentèse a été réalisée avec une étude cytogénétique FISH, seulement 5 grossesses ont présenté une aneuploïdie. La trisomie 18 a été diagnostiquée chez 3 fœtus de notre série (60%), dont un avait une trisomie 18 en mosaïque et un autre fœtus avait un syndrome de Klinefelter associé à la trisomie 18.

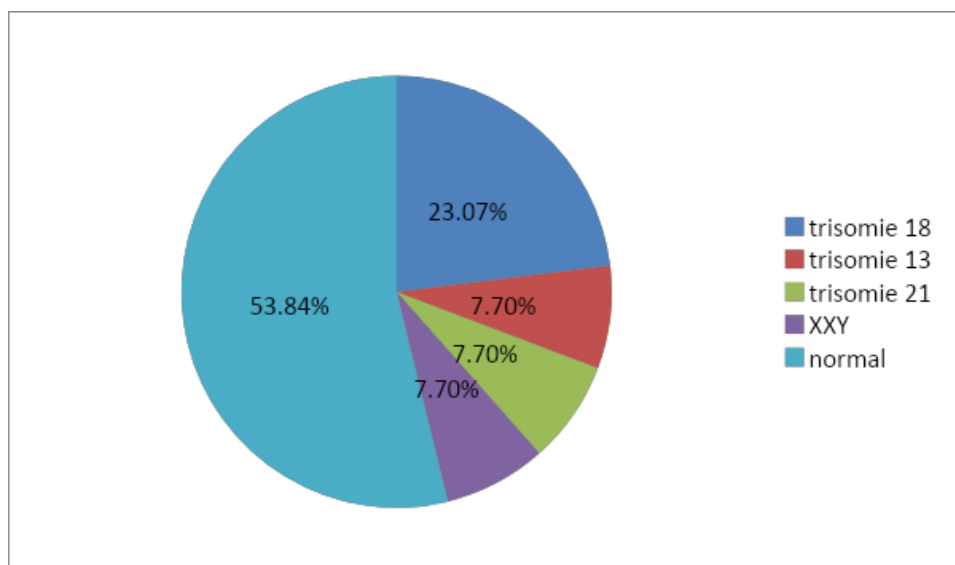


Figure 12 : Diagramme du pourcentage des différents résultats de FISH

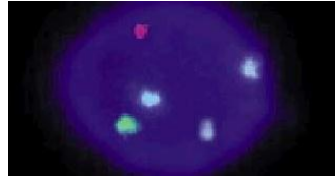


Figure 13 : Analyse d'un amniocyte non cultivé hybridé avec l'AneuVysion 18/X/Y

Trois signaux "aqua" indiquent trois copies du chromosome 18, un signal vert indique une copie du chromosome X et un signal orange indique une copie du chromosome Y.

	notre étude	Feldman et al
trisomie 21	7,7%	43,75%
trisomie 18	23,07%	31,25%
trisomie 13	7,7%	9,37%
MONOSOMIE X		1,25%
Triploidie		3,11%

Feldamn rapporte que dans 3,8% des cas avec FISH normal, le caryotype conventionnel avait rapporté des anomalies chromosomiques . Ces anomalies ne peuvent pas être décelées par méthode FISH , vu que les sonde utilisées ciblent uniquement les chromosomes 21 , 13 , 18 et X,Y et ne permettent pas ainsi une analyse pangénomique.

CONCLUSION GENERALE

Aujourd'hui les obstétriciens ont réussi à réaliser des prélèvements ovulaires sous le terme "Diagnostic prénatal génétique" pour détecter les anomalies chromosomiques, de maladies génétiques mais aussi l'infection fœtale et l'anémie fœtale. Le nombre de prélèvements a augmenté en premier lieu du fait de l'évolution des techniques de cytogénétique, de génétique moléculaire couplée à une meilleure connaissance des maladies génétiques et des anomalies génétiques à leur origine, et en second lieu du fait de l'amélioration des performances de dépistage et de diagnostic des échographistes en période prénatale. Les prélèvements fœtaux sont des gestes invasifs intra-ovulaires qui présentent des risques maternels et fœtaux.

Selon l'étude réalisée l'âge maternel supérieur à 30 ans représente 84,6% de nos patientes, ce résultat ne fait que confirmer que le risque d'avoir une aneuploïdie est lié à l'âge maternel.

Dans notre série d'études la technique principale de prélèvement était l'amniocentèse, ces prélèvements liés essentiellement à l'indication dont les principales étaient la RCIU 38,5%, Hydramnios 30,7% et des malformations cardiaques 30,7%.

L'étude cytogénétique moléculaire confirme la présence d'une aneuploïdie chez 5 grossesses, dont 3 fœtus avaient une trisomie 18.

L'inconvénient des techniques Fish sur noyaux est qu'elles permettent uniquement de répondre à la question présence ou absence de la séquence génomique reconnue par la sonde. En aucun cas, on ne peut avoir d'information sur la morphologie du chromosome étudié par la sonde ni sur le nombre et la structure des autres chromosomes. À ce jour, un caryotype fœtal est réalisé systématiquement en complément des techniques de Fish interphasique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Bombard AT, Powers JF, Carter S, et al. 1995 Procedure-related fetal losses in transplacental versus nontransplacental genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol*; 172: 868–72
- Caine, A., Maltby, A. E., Parkin, C. A., Waters, J. J., & Crolla, J. A. (2005). Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *The Lancet*, 366(9480), 123–128. doi:10.1016/s0140-6736(05)66790-6
- Daffos F, Forestier F, Kaplan C, Cox W. 1988 Prenatal diagnosis and management of bleeding disorders with fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol*; 158 : 939–46
- De Freminville - Renaud Tourain - Dernière mise à jour: Août 2007
- Feldman, B., Ebrahim, S. A. D., Hazan, S. L., Gyi, K., Johnson, M. P., Johnson, A., & Evans, M. I. (2000). Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies. *American Journal of Medical Genetics*, 90(3), 233–238. doi:10.1002/(sici)1096-8628(20000131)90:3<233::aid-ajmg9>3.0.co;2-q
- Giorlandino C, Morbili L, Bilanconi E, et al 1994. Transplacental amniocentesis: is it really a higher risk procedure? *Prenat Diagn*; 14: 803–6.
- Hawley RS, Frazier JA, Rasooly R. Separation anxiety 1994: The etiology of nondisjunction in flies and people. *Hum Mol Genet* ; 3 : 1521-8.
- Heloise Rambert Tests ADN : le grand fantasme des bébés parfaits
- Kadiri Ghaliya Publié le 01 mai 2017 à 16h48 - Mis à jour le 01 mai 2017 à 16h48
- Louis Dallaire 14 18:18:41 CET 2019

- Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B. 1996 Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire. Principes et techniques. Cachan : Tec et Doc/EM Inter;.
- Nagel H, Vandenbussche F, Keirse M, et al 1998. Amniocentesis before 14 completed weeks as an alternative to transabdominal chorionic villus sampling: a controlled trial with infants followup. Prenat Diagn; 18 : 465–75
- Rodrigue, Catherine 2007, "Le diagnostic prénatal ou un bébé « normal » svp !", Les ateliers de l'éthique, vol. 2, no. 2, Automne, pp. 28-34
- Witters, I., Devriendt, K., Legius, E., Matthijs, G., Van Schoubroeck, D., Van Assche, F. A., & Fryns, J.-P. (2002). Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH). Prenatal Diagnosis, 22(1), 29–33. doi:10.1002/pd.225
- www.agence-biomedecine.fr
- www.santepubliquefrance.fr

ANNEXES

ANNEXE 1 : Anomalies chromosomiques de nombre .

Les anomalies chromosomiques constitutionnelles constituent une cause fréquente d'anomalie du développement embryo-fœtal. Elles surviennent le plus souvent au cours de la méiose, pendant la formation de l'un des deux gamètes. Les anomalies chromosomiques sont à l'origine d'environ 50 % des avortements spontanés survenant pendant le premier trimestre de la grossesse.

LES ANOMALIES DE NOMBRE DES CHROMOSOMES

Un caryotype normal comporte 23 paires de chromosomes , soit 46 chromosomes et ces anomalies peuvent être homogènes (présentes dans toutes les cellules), ou en mosaïque (présentes dans une proportion variable de cellules).

L'origine des anomalies homogènes se situe soit au moment de la méiose pendant le processus qui aboutit à la formation des cellules reproductrices soit lors des premières divisions mitotiques du zygote, (ovule) après la fécondation. Le facteur de risque prédominant des anomalies de disjonction chromosomique méiotique est l'âge maternel élevé.

On parle de trisomie en présence d'un chromosome supplémentaire, d'une monosomie en cas de perte d'un des deux chromosomes d'une paire chromosomique. Les trisomies les plus fréquentes à la naissance sont les trisomies 21, 18 et 13 et la trisomie 8 en mosaïque. Les trisomies des chromosomes sexuels sont très fréquentes et portent aussi bien sur l'X que sur l'Y : 47,XXX ; 47,XXY ; 47,XYY....

a. Trisomie 21 (syndrome de Down)

La trisomie 21 (T21), ou syndrome de Down, est une aneuploïdie (anomalie chromosomique de nombre des chromosomes). Elle est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire (3 chromosomes au lieu de 2). C'est l'anomalie chromosomique la plus fréquente. Elle concerne 1 fœtus sur 700.

Le seul facteur de risque connu est l'âge maternel, avec schématiquement un risque de 1/1500 à l'âge de 20 ans, 1/1000 à 30 ans, 1/250 à 38 ans, 1/100 à 40 ans, et 1/30 à 45 ans.

La triade clinique classique associe des anomalies morphologiques, malformatives, et une hypotonie avec déficience intellectuelle plus ou moins sévère[FREMINVILLE et TOURAINE, 2007].

b. TRISOMIE 18 (SYNDROME D'EDWARDS)

La trisomie 18 est une anomalie chromosomique due à la présence d'un chromosome 18 supplémentaire. Elle est caractérisée par un retard de croissance, de malformations viscérales touchant tous les organes dont le cœur dans plus de 90 %, les

membres (pieds bots, mains et doigts repliés et fixés), le tube neural (anencéphalie, spina bifida) le tube digestif, les reins, la face (fente labio-palatine). Plus de 95 % des fœtus atteints décèdent in utero. Hypotonie et difficultés de succion dans les premières semaines évoluent vers une hypertonie, avec quasi-absence de contact. Un retard psychomoteur sévère est constant [VERLOES,2008].

c. TRISOMIE 13 (SYNDROME DE PATAU)

La trisomie 13 est une anomalie chromosomique due à la présence d'un chromosome 13 supplémentaire. Elle est caractérisée par l'association de malformations cérébrales (holoprosencéphalie notamment), de dysmorphie faciale avec fréquence des fentes labio-palatines, d'anomalies oculaire (microphthalmie), de malformations des mains (polydactylie), de malformations viscérales (cardiopathie) et d'un retard psychomoteur très sévère. Plus de 95 % des fœtus atteints décèdent in utero. La présentation neurologique est sévère : hypotonie, hyporéactivité avec quasi-absence de contact. Les anomalies faciales sont variables. La moitié des enfants décèdent le premier mois et 90 % avant 1 an de complications cardiaques, rénales ou neurologiques.

d. SYNDROME DE TURNER




Le syndrome de Turner est une affection chromosomique liée à l'absence complète (monosomie X) ou partielle d'un chromosome X. L'origine en est accidentelle, liée à une non-disjonction des chromosomes sexuels lors de la méiose avec perte d'un chromosome X. Les formes partielles ou en mosaïque peuvent avoir des conséquences plus modérées. Cette affection concerne un nouveau-né féminin sur 2500 : son incidence à la conception est beaucoup plus élevée mais de nombreuses conceptions 45,X conduisent à une fausse-couche au premier ou deuxième trimestre.



e. SYNDROME DE KLINEFELTER

Le syndrome de Klinefelter regroupe un ensemble d'anomalies chromosomiques caractérisées chez l'humain par la présence d'au moins un chromosome sexuel X supplémentaire. L'origine en est accidentelle, liée à une non-disjonction des chromosomes sexuels lors de la méiose. Le facteur de risque essentiel de survenue est l'âge maternel avancé. La formule chromosomique est 47,XXY.

Ce syndrome concerne un individu de sexe masculin sur 600. Ce syndrome est responsable d'un dysfonctionnement testiculaire responsable d'un défaut pubertaire et d'une infertilité fréquente. Le développement cognitif est superposable à celui de la population générale ; des difficultés d'apprentissage légères et inconstantes (notamment retard d'acquisition du langage) sont parfois observées. Le développement physique est normalement masculin, en dehors d'un retard des signes pubertaires.

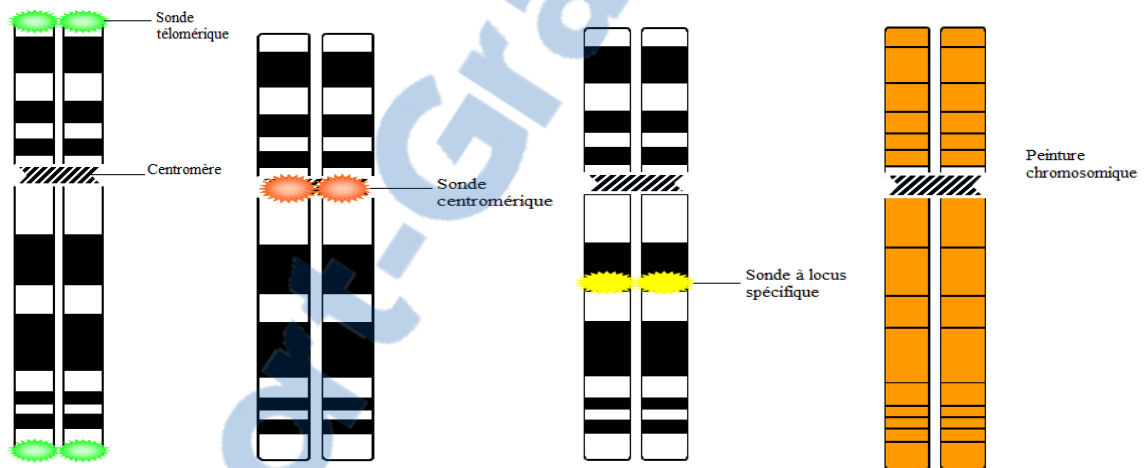
ANNEXE 2 : Visualisation d'hybridation

CHROMOSOME	CYTOGENIC LOCATION/STS	PROBE NAME	FLUOROPHORE
18	18p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP 18 SpectrumAqua	
X	Xp11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	Vysis CEP X SpectrumGreen	
Y	Yp11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	Vysis CEP Y SpectrumOrange	

CHROMOSOME	CYTOGENIC LOCATION/STS	PROBE NAME	FLUOROPHORE
13	13q14	Vysis LSI 13 SpectrumGreen	
21	21q22.13-q22.2	Vysis LSI 21 SpectrumOrange	

ANNEXE 3 Différents types de sondes sont :

- Les sondes locus spécifiques
- Les sondes centromériques
- Les sondes télomériques
- Les sondes subtélomériques
- Les sondes de peinture chromosomique.



ANNEXE 4 :

Réactifs nécessaires

- Solution de lavage : 20 X SSC
- Solution de lavage : 2 X SSC / 0,1% NP40
- Solution de lavage : 0,4 X SSC / 0,3% NP40
- Solution de déshydratation : éthanol 70%,85% et 100%
- Solution de dénaturation : (70% formamide / 2 X SSC)
- Sondes **CEP 18/X/Yet LSI 13/21**
- Tampon d'hybridation des sondes
- Contre-colorant : DAPI
- Eau distillée

Préparation des réactifs

SSC 20X (pH 5.3)

Pour préparer cette solution, mélanger :

66 g SSC 20X

200 ml Eau purifiée

250 ml Volume final

Mélanger soigneusement. Mesurer le pH à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre. Ajuster le pH à 5.3 avec de l'HCl concentré, si nécessaire. Amener le volume final à 250 ml. Filtrer à travers une unité de filtration avec des pores de 0,45 µm de diamètre.

Conserver dans

un récipient hermétique à température ambiante pendant 6 mois au maximum.

Solution de dénaturation :

Pour préparer cette solution, mélanger :

49 ml Formamide

7 ml SSC 20X, pH 5.3

14 ml Eau purifiée

70 ml Volume final

Homogénéiser soigneusement puis placer dans un vase Coplin en verre. Mesurer le pH à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre. Vérifier que le pH se situe entre 7.0 et 8.0. Conserver la solution couverte à une température comprise entre 2 et 8 °C. La solution peut être utilisée pendant 1 semaine. Vérifier le pH avant chaque utilisation.

Solutions de lavage à l'éthanol

Préparer des dilutions de 70 %, 85 % et 100 % utilisant de l'éthanol à 100 % et de l'eau purifiée. Ajouter 70 ml de chaque solution dans un vase Coplin et conserver à température ambiante jusqu'à 6 mois. Les solutions employées dans ce test peuvent être utilisées pendant 1 semaine sauf en cas d'évaporation, ou si la solution devient trop diluée en raison d'une utilisation excessive.

Solution de lavage NP-40 à 0,3 % dans du SSC 0,4X

Pour préparer cette solution, mélanger :

950 ml Eau purifiée

20 ml SSC 20X, pH 5.3

3 ml NP-40

1 000 ml Volume final

Mélanger soigneusement. Mesurer le pH à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre. Ajuster le pH entre 7.0 et 7.5 avec du NaOH 1N.

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau purifiée. Filtrer à travers une unité de filtration avec des pores de 0,45 µm de diamètre. Conserver la solution non utilisée dans un récipient hermétique à température ambiante jusqu'à 6 mois. Jeter la solution utilisée au cours du test à la fin de la journée.

Solution de lavage NP-40 à 0,1 % dans du SSC 2X

Pour préparer cette solution, mélanger :

100 ml SSC 20X, pH 5.3

849 ml Eau purifiée

1 ml NP-40

1 000 ml Volume final

Mélanger soigneusement. Mesurer le pH à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre. Ajuster le pH entre 7.0 et 7.5 avec du NaOH 1N.

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau purifiée. Filtrer à travers une unité de filtration avec des pores de 0,45 µm de diamètre. Ajouter 70 ml dans un vase Coplin et maintenir à température ambiante. Conserver la solution non utilisée dans un récipient hermétique à température ambiante jusqu'à 6 mois. Jeter la solution utilisée au cours du test à la fin de la journée.

ANNEXE 5 : Matériel Requis

- Agitateur mécanique



- Bain-Marie
- Balance de précision
- **Microcentrifugeuse**



- Chronomètres
- Microscope à Epifluorescence
- PH-Mètre
- Thermomètre calibré
- Agitateur Vortex
- Platine d'hybridation **THERMOBRITE**



