



**HAL**  
open science

**Chromosome 21 surnuméraire chez l'Homme :  
Caractérisation de l'organisation spatiale du noyau  
interphasique trisomique 21 et Impacts fonctionnels d'une  
matrice extracellulaire de type trisomie 21 sur des cellules  
tumoraux mammaires**

Laetitia Gouas

► **To cite this version:**

Laetitia Gouas. Chromosome 21 surnuméraire chez l'Homme : Caractérisation de l'organisation spatiale du noyau interphasique trisomique 21 et Impacts fonctionnels d'une matrice extracellulaire de type trisomie 21 sur des cellules tumorales mammaires. Génétique humaine. Université Clermont Auvergne, 2024. <tel-04873160>

**HAL Id: tel-04873160**

**<https://hal.science/tel-04873160v1>**

Submitted on 8 Jan 2025

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

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



Copyright - All rights reserved

**Université Clermont Auvergne**

**UFR Médecine et Formations paramédicales**

*Ecole doctorale : Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement.*

Discipline. : Histologie, Embryologie, Cytogénétique

Spécialité : Cytogénétique

*Mémoire en vue de l'obtention de*

**Habilitation à Diriger des Recherches**

Présentée et soutenue publiquement

***le 18 décembre 2024***

***Chromosome 21 surnuméraire chez l'Homme :***

***Caractérisation de l'organisation spatiale du noyau interphasique  
trisomique 21***

***Impacts fonctionnels d'une matrice extracellulaire de type  
trisomie 21 sur des cellules tumorales mammaires***

Par

**Laetitia Gouas**

Née le 23 juin 1978 à Provins (77)

Membres du jury :

Pr Andreï Tchirkov, PU-PH, Université Clermont Auvergne

Président

Pr Mahchid Bamdad, PU-PH, Université Clermont Auvergne

Examineur

Pr DE VOS John, PU-PH, Université de Montpellier

Rapporteur

Pr PELLESTOR Franck, PU-PH, Université de Montpellier

Rapporteur

Pr RAVEL Célia, PU-PH, Université de Rennes 1

Rapporteur

A mon père,

# Remerciements

Depuis l'âge de mes 18 ans, j'ai toujours vu les différents diplômes que je devais obtenir pour réaliser mon rêve de devenir chercheuse comme des portes à ouvrir les unes derrière les autres pour atteindre ce Graal. L'Habilitation à Diriger des Recherches représente l'aboutissement de ce dédale de portes et cela ne m'a jamais fait autant si peur. Que trouverai-je derrière ? Sans doute pas la grande chercheuse que j'aurais aimée être, mais tout simplement moi, que je dois finir par accepter pour enfin trouver ma place.

En tout cas, si l'exercice de rédaction de ce mémoire m'a ramenée 20 ans en arrière, quand il s'agissait alors de soutenir ma thèse d'Université, aujourd'hui il m'offre l'opportunité de faire un petit retour sur le chemin parcouru et l'occasion de remercier sincèrement les personnes qui ont jalonné de leur sourire ou de leur amitié mon parcours.

Je commencerai par le Pr Philippe Vago. Je vous dois beaucoup. Vous m'avez donné ma chance et vous avez placé votre confiance en moi, ce qui m'a toujours été très précieux. Vous avez tellement su faire évoluer votre service pendant toutes ces années, en étant toujours à la pointe des dernières nouveautés technologiques. Je me rappelle avoir commencé certains dossiers de validation de méthode qui n'ont jamais abouti parce que nous devons abandonner la technique pour évoluer vers une nouvelle, toujours plus résolutive. Merci pour le chef de Service que vous avez été, bienveillant et moteur pour votre équipe.

Il y a aussi tout le personnel du service de Cytogénétique médicale, biologistes et techniciennes. Vous êtes les sourires qui illuminent mes journées de travail. Merci ma p'tite Nath pour ta gentillesse et ta douceur. Merci Virginie, Lucie et Cyrille, nos secrétaires de choc. Même si avoir son bureau près du secrétariat n'est pas toujours l'idéal pour se concentrer, il n'en reste pas moins que vous êtes ma bulle d'oxygène. Un grand merci aussi à mes collègues de secteur, Carole, Gaëlle et Céline, j'ai vécu avec vous pas mal d'ascenceurs émotionnels ces dernières années, j'espère que l'avenir nous réservera encore de bons moments ensemble. Et puis un grand merci à ma chère collègue de bureau, Léo. Nous allons avoir la joie de traverser les années ensemble, de continuer à partager nos joies et nos peines, et à nous plaindre tous les ans, au mois d'août, « que tu te rends compte ! on est déjà bientôt à Noël !! ». A ce rythme, la retraite sera vite là...

Un grand merci aussi à Elisabeth Miot-Noirault, Directrice de l'unité IMoST, qui n'a pas craint d'accueillir des cytogénéticiens dans son unité. Mention spéciale pour Emmanuel Moreau, dit Manu, mon chef d'équipe. Tu ne laisses personne sur le côté et tes encouragements sont toujours d'un

grand soutien. Je suis heureuse de poursuivre mon aventure scientifique dans ton équipe. Un merci tout particulier aussi à Eric Debiton qui m'a rejoint sur le projet il y a un peu plus d'un an. Ta bonne humeur, ta gentillesse mais aussi ton acuité scientifique font de nos échanges de super moments de partage. Enfin, à toutes les personnes que je croise chaque fois que je viens au bâtiment Inserm, Sophie, Leslie, Aurélie, Tiffanie, Caroline, Mercedes et j'en oublie sûrement, mais aussi Rohan et Marine, un grand merci pour votre sourire chaleureux.

Et puis, tout le travail qui est présenté dans ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans les étudiants qui ont contribué à faire avancer les projets. J'espère vous avoir apporté autant que ce que j'ai pu apprendre à vos côtés. Vous avez été, chacun et chacune, une source formidable d'enrichissements. Wiem, My-Anne, Nooshin, Alberto...j'espère que vous écrirez vos rêves.

Je remercie également très chaleureusement les professeurs Mahchid Bamdad, Célia Ravel, John De Vos et Franck Pellestor d'avoir accepté de siéger dans mon jury et d'avoir pris du temps à lire mon pavé. Je remercie également le Pr Andreï Tchirkov d'avoir accepté de présider le jury. Vous me faites toutes et tous un grand honneur. J'espère être à la hauteur de nos échanges.

Il me reste aussi à remercier mes amies et ma famille. Ma Chrichri, même si la vie nous a éloigné physiquement, tu es très présente dans mon cœur. Qui aurait dit qu'un petit air de la « Marche funèbre », chantonné à mi-voix en entrant dans une salle de TP de la fac de Jussieu il y a plus de 25 ans de cela, m'aurait fait rencontrer la jeune femme battante et l'amie au soutien indéfectible que tu es. Ma Mimie, ma sœur, ma *warrior*, pas d'autre mot que celui de je t'aime. Ma Moun, ton amour inconditionnel a fait de moi la femme que je suis aujourd'hui et toi mon Poun, tu me manques tellement...

Enfin, les trois hommes de ma vie. Antony, mon compagnon depuis plus de 25 ans, tu es sans doute celui qui croit le plus en moi. Hadrien, mon chéri, ma force tranquille, merci d'être un soutien pour ta maman. Alix, mon petit cœur, du haut de tes 10 ans tu es déjà un grand petit homme. Tu ne le sais peut-être pas mais j'ai fait mienne ta philosophie de vie « Un Ninjago n'abandonne jamais ! ». Je vous aime très fort.

## Liste des abréviations

ACLF : Association des Cytogénéticiens de Langue Française  
ACPA : Analyse chromosomique sur puce à ADN  
ADNc : Acide déoxyribo-nucléique complémentaire  
ADNlc : Acide déoxyribo-nucléique libre circulant  
AZF : Azoospermia factors  
BAC : Chromosome Bactérien Artificiel  
BMAP : pôle médico-technique Biologie Médicale et Anatomie pathologique  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CIL : Comparaison inter-laboratoire  
CIQ : Contrôle Interne Qualité  
CE-IVD : Certification Européenne – In Vitro Diagnostics  
CNV : *Copy Number Variation*  
COFRAC : Comité Français d'Accréditation  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole  
DAQH : Dossier d'Apprentissage, Qualification et Habilitation  
DHOS : Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des soins  
EEQ : Evaluation Externe de la Qualité  
EMQN : *European Molecular Genetics Quality Network*  
LBM : Laboratoire de Biologie Médicale  
LBM-MS : Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Sites  
MEC : Matrice extracellulaire  
MLPA : *Multiplex Ligation Probe Amplification*  
PBS : Tampon Phosphate Salin  
QMF-PCR : Quantitative Multiplex Fluorescent – Polymerization Chain reaction  
qPCR : quantitative Polymerization Chain reaction  
RAQ : Responsable Assurance Qualité  
ROS : Espèce réactive de l'oxygène  
RVI : Réunion de Validation Interprétation  
SIR : *Standardized Incidence Report*  
SNV : *single nucleotide variation*  
SNP : *single nucleotide polymorphism*  
SV : variant de structure  
SVF : Sérum de veau foetal  
TC : Territoire chromosomique  
TD : Travaux dirigés  
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse  
TGNI : Test Génétique Non Invasif de Dépistage de la Trisomie 21

## Liste des figures

**Figure 1** : Organigramme du service de Cytogénétique médicale (CHU Clermont-Ferrand)

**Figure 2** : Evolution du volume de mes enseignements universitaires depuis cinq ans

**Figure 3** : Distribution des territoires chromosomiques 18 et 19 dans le noyau interphasique de lymphocytes

**Figure 4** : Répartition non aléatoire des chromosomes dans le noyau selon la taille des chromosomes et selon leur densité en gènes

**Figure 5** : Modèle d'architecture nucléaire. Caractéristiques structurales qui soutiennent le modèle du Chromosome Territory – Interchromatine Compartment (CT-IC).

**Figure 6** : Microscopie électronique à transmission des cellules de villosités chorales disomiques (gauche) et trisomiques 21 (droite)

**Figure 7** : Analyse morphologique du noyau de fibroblastes, lymphocytes, cellules de villosités chorales disomiques et T21 à l'aide de NucleusJ

**Figure 8** : Distribution radiale relative de douze territoires chromosomiques dans les noyaux de cellules de villosités chorales

**Figure 9** : Positionnement des territoires 21 dans les cellules de villosités chorales T21

**Figure 10** : Position radiale des territoires chromosomiques étudiés en fonction de la taille des chromosomes et de la densité des gènes

**Figure 11** : Comparaison du volume des territoires chromosomiques entre les noyaux des cellules de villosités chorales témoins et T21

**Figure 12** : Volume des territoires chromosomiques en fonction de la taille et de la densité en gènes des chromosomes

**Figure 13** : Diagramme des dix pistes de mécanismes proposés, avec leurs gènes candidats quand il y en a, dans l'effet protecteur d'un chromosome 21 surnuméraire vis-à-vis des cancers solides

**Figure 14** : Croissance de la lignée d'adénocarcinome mammaire MDA-MB 431 sur une MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes trisomique 21

**Figure 15** : Production de MEC par des fibroblastes cutanés euploïdes au bout de 7 jours de confluence

**Figure 16** : Décellularisation de matrice extracellulaire sécrétée *in vitro* par des fibroblastes

**Figure 17** : Evaluation de l'efficacité de la décellularisation fibroblastique par la présence d'ADN résiduel

**Figure 18** : Evaluation de l'efficacité de la décellularisation fibroblastique par le pourcentage de cellules mortes

**Figure 19** : Caractérisation histochimique de la matrice extracellulaire par mise en évidence des fibres de collagène de la matrice extracellulaire décellularisée sécrétée, pendant 7 jours ou 14 jours, par des

fibroblastes cutanés euploïdes, T21 et mammaires euploïdes

**Figure 20** : Quantification des protéines matricielles totales sécrétées par des fibroblastes dermiques euploïdes, T21 et des fibroblastes mammaires euploïdes

**Figure 21** : Concentration d'ADN résiduel au sein des matrices extra-cellulaires sécrétées *in vitro* après décellularisation et traitement avec différentes concentrations de DNase I

**Figure 22** : Morphologie de cellules MDA-MB-468 évaluée par le paramètre d'excentricité avec le logiciel d'analyse Incucyte® Live-Cell Analysis (Sartorius)

**Figure 23** : Excentricité moyenne des cellules MDA-MB-468 à 24h post-ensemencement en fonction du support de culture, MEC euploïde, MEC de type trisomie 21 ou plastique

**Figure 24** : Proportion moyenne de cellules MDA-MB-468 d'aspect fusiforme par image, à 24h post-ensemencement en fonction du support de culture, MEC euploïde, MEC de type trisomie 21 ou plastique

**Figure 25** : Proportion moyenne de cellules MDA-MB-468 d'aspect fusiforme par image, après 24h, 48h et 72h de traitement par TGF $\alpha$  (50 ng/ml) en fonction du support de culture, MEC euploïde, MEC de type trisomie 21 ou plastique

**Figure 26** : Cellules MDA-MB 468 en microcopie à contraste de phase (x40)

**Figure 27** : Expression des gènes codant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux en fonction du support de culture

**Figure 28** : Expression des gènes codant des marqueurs épithéliaux après 24h, 48h, 72h et 96h de traitement des cellules MDA-MB-468 par du TGF $\alpha$

**Figure 29** : Expression du gène *VIM* après 24h, 48h, 72h et 96h de traitement des cellules MDA-MB-468 par du TGF $\alpha$ .

**Figure 30** : Migration des cellules MDA-MB-468 en fonction du support de culture, MEC euploïde, MEC de type trisomie 21 ou plastique

**Figure 31** : Adhérence des cellules MDA-MB-468 en fonction du support de culture MEC euploïde, MEC de type trisomie 21 ou plastique

**Figure 32** : Temps de doublement moyen des cellules MDA-MB 468 en fonction du support de culture MEC euploïde, MEC de type trisomie 21 ou plastique

**Figure 33** : Taux de confluence moyen des cellules MDA-MB 468 en fonction du support de culture

**Figure 34** : Profils morphologiques de la formation des structures cellulaires 3D MDA-MB-468 observés au Cytation3MV™ à J1

**Figure 35** : Suivi du diamètre moyen des structures cellulaires 3D MDA-MB-468, entre J1 et J3, à partir de 1000 cellules ensemencées en présence de différentes concentrations en Geltrex®

**Figure 36** : Suivi de la croissance des sphéroïdes MDA-MB-468 au cours du temps dans un milieu avec 2% Geltrex®

**Figure 37** : Test de viabilité cellulaire des structures cellulaires 3D générées à partir de différentes quantités initiales de cellules MDA-MB-468

**Figure 38** : Suivi du diamètre moyen des structures cellulaires 3D à partir de MDA-MB-468 ayant poussées (ou non) sur une MEC (EUP/T21) produite *in vitro* à différentes concentrations en Geltrex® avec 2000 cellulesensemencées

**Figure 39** : Profil morphologique des structures cellulaires 3D issues de MDA-MB-468 ayant été mises au contact d'une MEC-EUP ou T21 observé au Cytation3MV™ à J2 et J4

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Activités du secteur Maladies rares et Reproduction du service de Cytogénétique médicale

**Tableau 2** : Résumé des expérimentations *in vitro* réalisées au cours du projet en fonction du type de cellules tumorales mammaires et du temps de sécrétion de la MEC par les fibroblastes

**Tableau 3** : Nombre d'images exploitées pour déterminer la proportion de cellules fusiformes dans les conditions de traitement ou de non traitement des cellules par du TGF $\alpha$ .

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>1</b>
1.1	Etat civil et situation actuelle	1
1.2	Diplômes universitaires	1
1.3	Fonctions hospitalo-universitaires	1
<b>2</b>	<b>Activités Hospitalières</b>	<b>3</b>
2.1	Référente du secteur Maladies rares et Reproduction	3
2.2	Missions de Biologiste	4
2.3	Responsable Assurance Qualité suppléante	9
<b>3</b>	<b>Activités d'Enseignement</b>	<b>10</b>
3.1	Activités des cinq dernières années	10
3.2	Activités antérieures	11
<b>4</b>	<b>Activités de Recherche</b>	<b>13</b>
4.1	Synthèse des travaux de Thèse (2001-2005)	13
4.2	Synthèse des travaux de Recherche clinique (2006 - )	15
4.3	Travaux de Recherche fondamentale (2006 - )	16
4.3.1	Introduction	16
4.3.2	La trisomie 21	18
<b>4.3.2.1</b>	<b>Impacts d'un chromosome 21 surnuméraire sur l'organisation spatiale du noyau interphasique</b>	<b>21</b>
4.3.2.1.1	Contexte et objectifs	21
4.3.2.1.2	Résultats	27
a)	La morphologie des noyaux des cellules de villosités chorales n'est pas altérée par une copie supplémentaire du chromosome 21	27
b)	Des territoires chromosomiques changent leur positionnement radial dans les noyaux trisomiques 21 des cellules de villosités chorales	29
c)	La corrélation entre la taille des chromosomes, la densité en gènes et la disposition radiale des chromosomes n'est pas affectée dans les noyaux des cellules de villosités chorales trisomiques 21	31
d)	Le volume de territoires chromosomiques est modifié par une copie supplémentaire du chromosome 21 dans les noyaux des cellules de villosités chorales	33

<b>4.3.2.2 Impacts <i>in vitro</i> d'une Matrice extracellulaire de type trisomie 21 sur le comportement de cellules tumorales mammaires.....</b>	<b>38</b>
4.3.2.2.1 Contexte.....	38
a) Profil tumoral atypique des patients porteurs d'un syndrome de Down.....	38
b) Trisomie 21 et cancer du sein : facteurs de risque et facteurs protecteurs.....	42
c) Chromosome 21 surnuméraire : hypothèses d'un effet protecteur vis-à-vis des cancers solides.....	43
d) Des constituants matriciels présentent une distribution et une abondance différentes dans les tissus trisomiques 21.....	47
e) De nombreux gènes en lien avec la matrice extracellulaire et les interactions cellules-matrice extracellulaire sont dérégulés positivement dans les cellules et tissus trisomiques 21.....	51
f) Les cellules trisomiques 21 présentent des particularités de comportement <i>in vitro</i> .....	53
g) Objectifs.....	56
4.3.2.2.2 Méthodes et résultats.....	56
a) Matériels biologiques.....	56
b) Sécrétion <i>in vitro</i> de matrice extracellulaire par des fibroblastes : mise au point d'un modèle de culture.....	57
c) Impacts fonctionnels d'une MEC sécrétée <i>in vitro</i> par des fibroblastes trisomiques 21 sur le comportement de cellules mammaires.....	70
c-1) Impacts fonctionnels d'une MEC de type trisomie 21 sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules MDA-MB 468.....	71
c-1.1) Une MEC-T21 impacte la morphologie des cellules MDA-MB 468.....	72
c-1.2) Une MEC-T21 impacte l'expression génique de marqueurs épithéiaux et mésenchymateux des cellules MDA-MB 468.....	80
c-1.3) Une MEC-T21 n'impacte pas la migration cellulaire des cellules MDA-MB 468.....	88
c-2) Impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sur l'adhérence des cellules MDA-MB 468.....	90
c-3) Impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sur la prolifération des cellules MDA-MB 468.....	92
d) Vers un modèle 3D sphéroïde.....	96
4.4 Bilan et perspectives de recherche.....	104
4.4.1 Projet de recherche fondamentale.....	104
4.4.1.1 Caractérisation du modèle de MEC sécrétée <i>in vitro</i> par des fibroblastes dermiques.....	104
4.4.1.1.1 Matrice extracellulaire sécrétée <i>in vitro</i> : origine dermique versus mammaire.....	104

4.4.1.1.2 Caractérisation de la MEC sécrétée <i>in vitro</i> par des fibroblastes 21.....	105
4.4.1.2 Impacts fonctionnels d'une MEC-T21 sécrétée <i>in vitro</i> .....	106
4.4.1.2.1 Validation de l'impact d'une MEC-T21 sur la prolifération cellulaire.....	106
4.4.1.4.2 Etudes approfondies sur l'impact d'une MEC-T21 sur la transition épithélio-mésenchymateuse.....	107
4.4.2 Projet de recherche clinique.....	108
4.5 Encadrements.....	111
4.6 Demandes de financement.....	114
4.7 Missions d'intérêt général.....	115
4.8 Liste des publications scientifiques.....	116
4.9 Liste des communications affichées.....	121
4.10 Bibliographie.....	131
Annexes : Sélection de publications.....	144



# 1. CURRICULUM VITAE

## 1.1 Etat civil et situation actuelle

Laetitia Gouas  
Née le 23 juin 1978 à Provins (77)  
Pacsée - deux enfants  
Nationalité française

Adresse personnelle :  
20, rue Maurice Ravel  
63800 Cournon d'Auvergne

Adresse professionnelle :  
Service de Cytogénétique Médicale  
CHU Estaing  
1, Place Lucie et Raymond Aubrac  
63000 Clermont-Ferrand  
lgouas@chu-clermontferrand.fr / Tel : 04 73 75 07 12

Unité de Recherche :  
UMR1240 Inserm/UCA « Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques » (IMoST)  
58, Rue Montalembert  
63005 Clermont-Ferrand

Situation actuelle :  
Maître de Conférence des Universités et Praticien Hospitalier  
Cytologie, Histologie, Embryologie et Cytogénétique (sous-section CNU 42-02).

## 1.2 Diplômes universitaires

2000 **Maîtrise** « Biologie cellulaire et Physiologie » - Option Génétique moléculaire  
Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) – Mention *Assez bien*  
*Sujet stage* : « Etude de la maturation post-traductionnelle des protéines CFTR mutées R347D, D979R et R347D/D979R. », Inserm U468, Hôpital Henri-Mondor, Créteil, sous la direction du Dr Pascale FANEN.

2001 **DEA** « Biologie de la cellule normale et pathologique »  
Université René Descartes (Paris V) – Mention *Très Bien*  
*Sujet* : « Recherche de mutations dites à faible expressivité dans le gène *KCNQ1* impliqué dans la repolarisation ventriculaire cardiaque », Inserm U523, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, sous la direction du Dr Pascale GUICHENEY.

2001-2005 **Doctorat** « Génétique Humaine »  
Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) – Mention *Très honorable*  
*Titre* : « Aspects génétiques du risque arythmogène : Polymorphismes des canaux ioniques cardiaques et identification d'un nouveau locus responsable du syndrome de Brugada » - Inserm U582, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, Dr Pascale GUICHENEY.

## 1.3 Fonctions hospitalo-universitaires

**Septembre 2006 – septembre 2009** : Ingénieur Recherche et Développement dans le service de Cytogénétique Médicale (Pr Philippe Vago) – CHU de Clermont-Ferrand.

**Depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2009** : Maître de Conférences des Universités en Cytologie Histologie Embryologie Cytogénétique Médicale – Praticien Hospitalier en Cytogénétique Médicale depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2009. Titularisation en septembre 2010, promue à la première classe en 2012, promue à la Hors Classe en 2020.

**2018 - 2022** : Coordination du groupe de recherche « Cytogénétique Constitutionnelle » de l'équipe

TATOO de l'UMR 1240 (INSERM / Université Clermont Auvergne) IMoST « Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques ».

**Depuis 2020** : Référente du secteur « Cytogénétique constitutionnelle » du service de Cytogénétique Médicale (CHU Estaing de Clermont-Ferrand).

## 2. Activités hospitalières

### 2.1 Référente du secteur Maladies rares et Reproduction

Le secteur Maladies rares et Reproduction dont je suis référente auprès de la Direction est actuellement composé de 4 biologistes, le Dr Carole Goumy (MD, PhD) et moi-même en tant que MCU-PH, le Dr Céline Pebrel-Richard (MD) qui est particien-hospitalier (PH) et le Dr Gaëlle Salaun (MD), actuellement praticien hospitalo-universitaire (PHU), d'un ingénieur Mme Eleonore Eymard-Pierre, de deux techniciennes qui assurent les examens moléculaires (ACPA, TGNI, QMF-PCR, recherche microdélétion AZF) et de deux techniciennes qui assurent les examens de cytogénétique conventionnelle en pré- et postnatal (caryotype, FISH, sperm-FISH), soutenues par deux autres techniciennes en poste partagé avec le secteur onco-hématologie du service (Fig. 1).

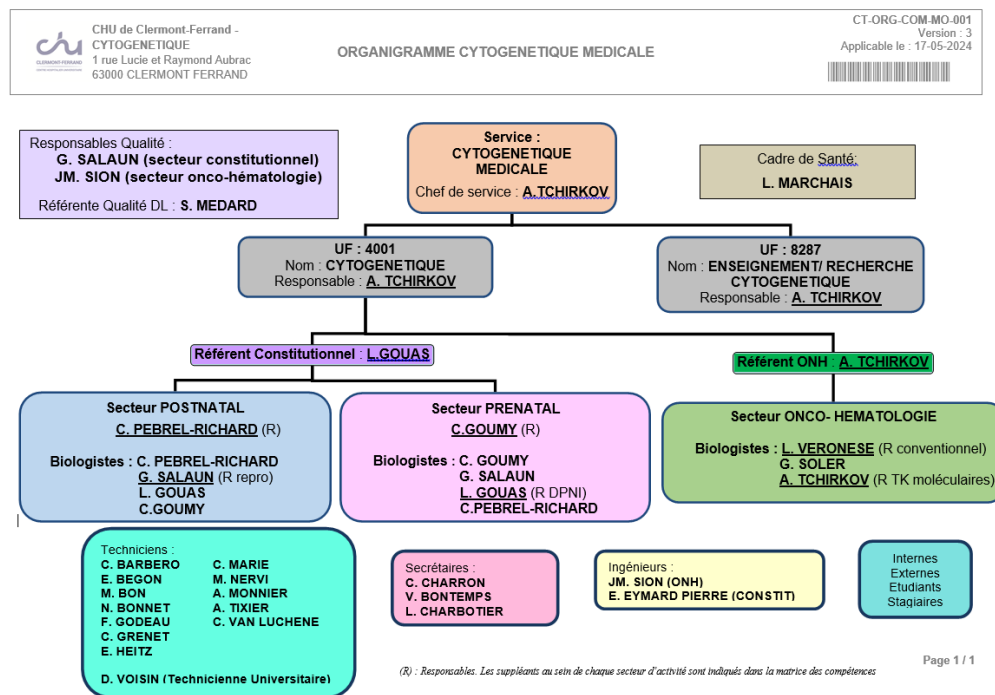


Figure 1 : Organigramme du service de Cytogénétique médicale (CHU Clermont-Ferrand).

En tant que référente, j'ai été sollicitée en 2021 par les Pr Philippe Vago, alors chef du service de Cytogénétique médicale et le Pr Philippe Poirier, chef du pôle Biologie Médicale et Anatomie pathologique (BMAP), pour initier un projet médical partagé entre notre secteur et l'UF de Génétique Moléculaire (Pr I. Creveaux) du service de Biochimie et Génétique Moléculaire (Pr. V. Sapin). Ainsi, des axes de travail avaient pu être dégagés autour de l'optimisation du parcours de soins des patients, l'amélioration de la visibilité de la Génétique biologique constitutionnelle, le renforcement du Centre de Référence Maladies rares (Dr F. Laffargue) et le soutien à des projets institutionnels (Centre de

Diagnostic Pré-Implantatoire, Pr F. Brugnon). Ce projet médical partagé s'inscrivait dans le projet du pôle BMAP de « Site unique » qui consiste à regrouper les deux secteurs du service d'Anatomo-Pathologie sur le site du CHU Estaing et l'ensemble des services du LBM sur le site de la « Tour des Laboratoires » du CHU Gabriel Montpied. Ce projet implique le déménagement du service de Cytogénétique médicale en 2026-2027, pour lequel j'ai été sollicitée dans la réflexion de la future implantation, particulièrement pour le redéploiement des activités moléculaires du secteur Maladies rares et Reproduction.

## **2.2 Missions de Biologiste**

### **Revue de prescription des prélèvements :**

Dans le service, la réception des prélèvements fait l'objet d'une validation par un biologiste qui consiste à vérifier la conformité du prélèvement, contrôler et modifier si besoin la prescription et prendre en charge le prélèvement. En 2022, suite au départ en mobilité du Dr Goumy, j'ai été habilitée à la « réception » des prélèvements sanguins pour le TGNI. En 2023, j'ai été habilitée à la « réception » des prélèvements pour les indications Anomalies du développement et Troubles de la reproduction, et plus récemment, à la réception des prélèvements de prénatal et de foetopathologie.

### **Interprétation des résultats de TGNI :**

J'ai obtenu en 2013 mon agrément pour l'analyse des examens moléculaires appliqués à la cytogénétique (renouvelé en 2018 et 2022), ce qui m'autorise, même si je suis de formation scientifique, à analyser, interpréter et signer des compte-rendu de résultats. Après répartition des missions de validation biologique des différents examens du secteur entre les biologistes, j'ai pris en charge la validation biologique de l'examen de TGNI. Depuis la mise en place en routine de cet examen en 2016, environ 5250 TGNI ont été rendus.

### **Interprétation des données issues du séquençage génome entier par le LBM-MS AuraGen :**

Dans le cadre du Plan France Médecine Génomique 2020-2025, j'ai été habilitée en 2021 comme Biologiste Interpréteur des données de séquençage du génome entier produites par le laboratoire de Biologie médicale multi-sites (LBM-MS) AuraGen. Je participe depuis à l'interprétation des variants de structure chromosomique, déséquilibrés (CNV > 50 pb) et équilibrés, dans les pré-indications « Anomalie du Développement – Syndromes malformatifs sans déficience intellectuelle » et « Leucodystrophies ». Dans le cadre de cette activité et pour ces deux pré-indications, je participe aux réunions d'interprétation biologique (RVI) partagées avec nos collègues de Génétique Moléculaire du CHU de Clermont-Ferrand (Pr Isabelle Creveaux, Dr Caroline Nachury-Janel du service de Biochimie et

Génétique Moléculaire) ou d'autres CHU (Pr Michel Koenig, Service Génétique moléculaire et cytogénomique : Maladies génétiques de l'enfant et de l'adulte, CHU Montpellier) qui assurent, pour leur part, l'interprétation des SNV/InDel (*single nucleotide variation*) issus des données du génome. J'assiste également aux réunions de concertation pluridisciplinaire d'amont avec nos collègues de Génétique clinique du CHU de Clermont-Ferrand (Dr Christine Francannet, Dr Fanny Laffargue, Dr Isabelle Perthus, Dr Florian Cherik, Dr Aurélien Juven, service de Génétique Médicale) pour différentes pré-indications et d'autres collègues cliniciens du neuro-développement (Coordination Pr Odile Boespflug-Tanguy, service de Neurologie et Maladies métaboliques, Hôpital Robert Debré) dans le cadre des Leucodystrophies. Afin de consolider mes connaissances et acquérir de nouvelles compétences, je participe aux réunions (visioconférence) de l'équipe Bioinfo Bio de Grenoble et aux réunions (visioconférence) dédiées aux discussions entre biologistes et j'assiste au séminaire annuel des biologistes AuraGen (depuis 2023) où sont présentées les évolutions des activités de la plateforme AuraGen (*dry et wet-lab*) ainsi que des cas de diagnostic intéressants. Par ailleurs en vue de l'obtention future de l'agrément pour les Analyses de génétique moléculaire non limitées, j'ai suivi la formation à la prise en main du logiciel SeqOne (logiciel d'aide à l'interprétation des SNV) dispensée par l'équipe Bioinfo Bio en 2022, et en 2024 j'ai participé au Workshop d'interprétation des SNV organisé par le réseau NGS-Diag. A ce jour, j'ai réalisé l'interprétation de 51 dossiers, essentiellement sur l'interprétation des CNV et des SV et je regarde en double les SNV/InDel.

## **Développement et accréditation de l'activité de cytogénétique moléculaire du secteur**

### **Maladies rares et Reproduction :**

En tant que Dr es Sciences et de par ma formation en biologie moléculaire appliquée à la Génétique Humaine, j'ai également pour mission d'implémenter, en suivant les évolutions technologiques, et de mettre en application, suivant la norme ISO15189, des techniques de dosage génique appliquées à la cytogénétique afin d'optimiser l'exploration des patients en cytogénétique constitutionnelle prénatale (signes d'appel échographiques, mort fœtale *in utero*...) et postnatale (retard mental, malformations viscérales, dysmorphie, pathologies de la reproduction...).

A mon arrivée dans le service en 2006, j'ai réalisé l'implémentation de la MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification, MRC-Holland) pour la recherche de déséquilibres génomiques au niveau des extrémités subtélomériques et dans 21 régions chromosomiques impliquées dans des syndromes micro-délétionnels et micro-duplicationnels responsables de retard mental syndromique ou non. Ainsi, entre 2006 et 2013, plus de 2000 patients ont pu bénéficier de cet examen dans le cadre de leur diagnostic chromosomique. En 2012, j'ai implémenté l'examen de Prénatal BoBs (Perkin Elmer). Il était fondé sur la technologie BACs-on-Beads™ (BoBs) qui consistait en l'hybridation de l'ADN d'échantillons

sur des sondes d'ADN de type BAC (Chromosome Bactérien Artificiel) couplées à des billes de polystyrène distinguables par un cytomètre Luminex®. L'analyse « Prénatal BoBs » permettait de rechercher des pertes ou des gains en matériel génomique pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y et de neuf régions impliquées dans des microremaniements chromosomiques avec une fréquence 1:4.000 à 1:200.000. Entre 2012 et 2016, environ 600 prélèvements fœtaux ont été analysés par cette approche.

Après avoir suivi une formation en Belgique, j'ai mis en place en mars 2016 le Test ADN libre circulant (ADNlc) de dépistage de la trisomie 21 ou Test Génétique Non Invasif de Dépistage de la Trisomie 21 (TGNI) avec le kit Clarigo® (Multiplicom Agilent). Le test Clarigo® (CE-IVD) était une approche ciblée reposant sur le séquençage massif parallèle de 4.000 amplicons issus des chromosomes 13, 18, 21 et X. Chaque amplicon contenait des SNP permettant d'estimer la fraction fœtale de l'ADNlc. J'ai eu en charge la réalisation des tests et la rédaction du dossier de validation de méthode de cet examen qui a fait l'objet, en mai 2018, d'une évaluation sur site par le COFRAC dans le cadre de l'extension de la portée d'accréditation du LBM du CHU de Clermont-Ferrand. En 2019, le service s'est doté d'un extracteur automatique d'ADN et j'ai eu en charge la gestion de la maîtrise de portée concernant cette évolution de la technique. Par ailleurs, de 2018 à 2020, j'ai été la coordinatrice du réseau national des utilisateurs du test Clarigo®. J'ai collaboré avec l'équipe Recherche et Développement de Multiplicom Agilent pour valider le test Clarigo® sur les grossesses gémellaires (poster, 2019). En 2021, la société Multiplicom Agilent a annoncé l'arrêt de la production des réactifs du test Clarigo®. J'ai œuvré auprès de la Direction du Laboratoire et du pôle de Biologie Médicale et d'Anatomie Pathologique du CHU de Clermont-Ferrand pour permettre de pérenniser cette offre de dépistage auprès des services de maternité et de Gynécologie-obstétrique de la région Auvergne. Ainsi, le service de Cytogénétique médicale a été équipé en 2021 de la solution VeriSeq2 (Illumina), une approche pangénomique de séquençage massif parallèle permettant le dépistage de la trisomie 21 mais également celui d'autres aneuploïdies et d'anomalies segmentaires (> 7 Mb), et j'ai participé à sa mise en place avec l'aide de notre ingénieur. J'ai réalisé la maîtrise de portée portant sur l'évolution technologique de l'examen et le dossier de validation de méthode du test. J'assure la qualité de cet examen en organisant les programmes de contrôles qualité interne et externe (EMQN). A ce titre, En 2019 et en 2020 j'ai organisé la comparaison inter-laboratoire pour le test Clarigo® entre les 10 centres du réseau national de l'époque, avant l'arrêt de la commercialisation du test. Depuis 2021, je fais partie du groupe de travail de l'ACLF sur le TGNI et j'ai participé aux discussions portant sur la version 2 du guide intitulé « Recommandations sur la conduite à tenir devant l'identification d'anomalies chromosomiques fœtales autres que les trisomies 13, 18 et 21 par l'étude de l'ADNlc ». Je suis donc responsable de cet examen dans le service.

En collaboration avec notre ingénieur, en 2008, j'ai également participé au développement de

l'activité d'Analyse Chromosomique sur puce à ADN (ACPA) mais je n'ai pas eu en charge son dossier de validation de méthode.

De 2006 à 2011, puis à partir de 2015, j'ai pris en charge la responsabilité de l'examen moléculaire permettant de diagnostiquer des microdélétions du locus AZF (AZFa, AZFb et AZFc). Cet examen est fondé sur l'amplification simultanée par PCR classique de six marqueurs génétiques. Il est réalisé pour une quarantaine de patients par an, en moyenne, souffrant d'infertilité (azoospermie, oligospermie..). J'ai ainsi eu la responsabilité de son accréditation en 2020 (ajout ligne de portée, dossier de vérification et validation de méthode) et j'en assure la qualité en organisant les programmes de contrôles qualité interne et externe (organismes Instand jusqu'en 2022 puis EMQN). En 2023, j'ai fait évoluer l'offre de diagnostic de cet examen en développant une analyse étendue à de nouveaux marqueurs des locus AZFa et AZFb par QMF-PCR. Cette analyse permet de différencier les délétions partielles ou complètes de ces régions ce qui permet de se prononcer quant aux chances de succès d'une extraction de spermatozoïdes matures sur tissu testiculaire du patient.

#### **Rédaction de demandes de financement Innovation :**

Dans le cadre du développement de techniques moléculaires appliquées à la cytogénétique, et plus particulièrement du séquençage massif parallèle, j'ai participé à la rédaction de dossiers de demande de soutien local au développement d'une technologie innovante auprès de la Commission Innovation du CHU de Clermont-Ferrand : « Dépistage Prénatal Non Invasif de la trisomie 21 (DPNI T21) - Validation clinique au CHU de Clermont-Ferrand, 2015 » (demande financée), « Optimisation de l'exploration cytogénétique par séquençage haut débit de patients présentant une anomalie du développement, 2016 » (demande financée), et plus récemment en tant que co-porteur du projet « Apport du RNA-Seq dans le diagnostic des maladies rares : malformations congénitale multiples sans déficience intellectuelle et Déficience intellectuelle syndromique » (demande financée).

#### **Habilitation à la réalisation technique des examens moléculaires et à leur validation technique :**

Ma formation en biologie moléculaire me permet de pouvoir prendre en charge techniquement certains examens (ACPA, TGNI, AZF) en cas de besoin (sous-effectif en cas de congés maladie par exemple), je suis donc également habilitée sur le DAQH Technicien Biologie Moléculaire Constitutionnel. Je suis de même habilitée sur le DAQH Ingénieur constitutionnel et intervins donc à ce titre à la validation technique de nos examens moléculaires (ACPA, TGNI, AZF, QMF-PCR) et dans la fabrication de sondes FISH à façon. Chaque année, l'ACPA est réalisée pour 500 patients en moyenne (pré- et postnatal) et une cinquantaine de sonde FISH est fabriquée pour réaliser les vérifications

d'anomalies chromosomiques de grande taille suspectées par ACPA.

### Formation continue

Je participe également à la formation du personnel du service mais également de celui d'autres services hospitaliers sur le plan technique par le biais d'animation d'ateliers (Atelier Pratique de quantification génique, 12ème Congrès annuel de l'AFC, 10-12 octobre 2007 ; Journée Thématique de quantification génique au congrès annuel de l'AFC, 30 mai 2008, Paris ; Deuxième réunion nationale des utilisateurs du système CEQ GexP, Beckman Coulter, 24 mars, Paris ; Séminaires du Consortium des utilisateurs du test Clarigo®, 1 à 2 fois par an de 2016 à 2020) et de réunions pour la formation permanente du personnel (TGNI, 2016, service de Cytogénétique Médicale ; TGNI Réunions Transversales du LBM, CHU Clermont-Ferrand, 2016). Je participe également à la formation des étudiants en DES de Biologie Médicale/DES de Génétique Médicale par la réalisation d'exposés concernant notre spécialité et par leur formation au TGNI et à l'interprétation des variants de structure issus du séquençage du génome entier.

Dans le cadre de ma propre formation continue, je suis également membre de différentes sociétés savantes tels que le Collège Hospitalier et Universitaire des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens (CHEC) pour lequel j'ai été membre élue du bureau de 2019 à 2022, l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (ACLF) pour laquelle je participe au groupe de travail sur le dépistage non invasif de la Trisomie 21, le réseau « AchroPuce » et le réseau « NGS Diag ».

Au total, mon activité hospitalière s'inscrit dans le volume d'activités du secteur Maladies Rares et Reproduction suivant :

<b>Activités Maladies Rares et Reproduction du service de Cytogénétique Médicale</b>			
Année	Prélèvements	Analyses	TOTAL B+BHN
2019	2495	4017	4361577
2020	2019	3340	2615330
2021	2311	3573	3013949
2022	2143	4117	2955412
2023	2076	3729	2748655

Tableau 1 : Activités du secteur Maladies rares et Reproduction du service de Cytogénétique médicale

### **2.3 Responsable Assurance Qualité suppléante**

En 2024, la biologiste qui assurait précédemment la mission de Responsable Assurance Qualité (RAQ) a cédé ses fonctions au Dr Gaëlle Salaun. Néanmoins, Mme Salaun est en cours de formation aux analyses de génétique moléculaire dans le service de Biochimie et Génétique moléculaire (Pr V. Sapin) et elle occupera un poste de praticien hospitalier à 50% de son temps dans l'UF de Génétique moléculaire de ce service à compter du 1<sup>er</sup> novembre 2024. J'ai accepté d'assurer un rôle de RAQ suppléante afin de nous répartir les différentes missions inhérentes au secteur Maladies rares et Reproduction. Ainsi, j'ai en charge le suivi des programmes de qualité interne (CIQ/CIL) et externe (EEQ) ainsi que le suivi des indicateurs des différents examens de notre secteur.

### 3. Activités d'Enseignement

#### 3.1 Activités des cinq dernières années

Depuis mon arrivée en septembre 2006 dans le service de Cytogénétique Médicale du CHU de Clermont-Ferrand, j'exerce mon activité pédagogique dans le Département universitaire de Cytologie Histologie Embryologie Cytogénétique de la Faculté de Médecine de l'Université d'Auvergne de Clermont-Ferrand dirigé par Pr. P. Vago de 2000 à 2022, puis par le Pr A. Tchirkov depuis 2022. Nous dispensons des enseignements d'embryologie, d'histologie, de cytogénétique et de cytologie en PASS (ex-PACES), DFGSM2, DFGSM3, Master 1, DU/DIU, Licence, IFMEM, Maïeutique, Odontologie, Licence Pro, Orthoptie, Orthophonie, IFSO.

L'équipe pédagogique est aujourd'hui constituée d'1 PU-PH (P. A. Tchirkov) et de 3 MCU-PH (L. Gouas, C. Goumy, L. Véronèse) et d'1 PHU (Dr G. Salaün jusqu'au 1<sup>er</sup> novembre 2024). Depuis de nombreuses années, le volume d'heures d'enseignement du Département universitaire est très conséquent (en moyenne 800 heures EqTD annuelles). Pour ma part, j'interviens dans l'enseignement de l'Histologie, l'Embryologie, de la Génétique et de la Cytogénétique dans diverses formations de l'UFR de Médecine et des formations paramédicales, et par le passé, des UFR de Pharmacie et d'Odontologie. Le volume de mes enseignements (en heures équivalent TD) dans ces formations au cours des cinq dernières années est présenté dans la figure ci-dessous (Fig. 2). Depuis la refonte de la maquette de la licence 1 - UE Sciences pour la Santé portée par l'UFR de Pharmacie en 2020-2021 dans laquelle les enseignements d'Histologie et Embryologie ont été supprimés, je réalise en moyenne 62h équivalent TD par an.

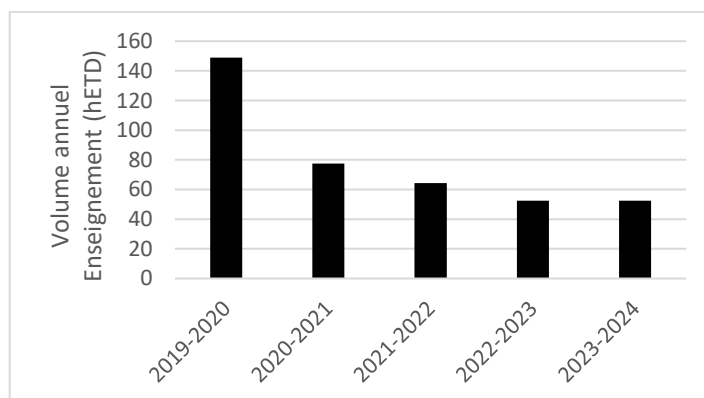


Figure 2 : Evolution du volume de mes enseignements universitaires depuis cinq ans

#### Activités d'enseignement (en heure) et responsabilités pédagogiques pour l'année 2023-2024 :

##### **Premier cycle des études médicales :**

- PASS : Co-responsable des Blocs spécifiques Médecine/Maïeutique/Odontologie et Pharmacie (23h de CM, 600 étudiants). Je dispense 1h d'histologie sur les méthodes d'étude des cellules et des tissus

- DFGSM2 :
  - Responsable de l'EC Histologie et Embryologie du système nerveux et organes des sens dans l'UE Neurosensoriel et Psychiatrie (4h CM et 10,5h de TD, 240 étudiants). Je dispense les 4h de CM et réalise 1,5h de TD, les autres heures étant assurées par un moniteur.
  - Responsable de l'EC Histologie et Embryologie dans l'UE cardiovasculaire (3h CM et 7h de TD, 240 étudiants). Je dispense les 3h de CM et réalise 1h de TD.
- DFGSM2 et DFGSMa2 : UE de remise à niveau des cours de PASS pour les étudiants ayant eu un parcours autre que PASS (L.AS1, L.AS2, autre passerelle) : Cours sous forme de capsules vidéo et 1h d'ED sur les méthodes d'étude des cellules et des tissus
- DFGSM3 : Santé reproductive, causes et prévention de l'infertilité : 1h de CM sur Infertilité et Cytogénétique
- DFGSM3 : Module optionnel UE Cytogénétique médicale appliquée : 1h de CM sur le séquençage du génome

#### **Formations paramédicales :**

- Institut de formation de manipulateurs d'électroradiologie médicale (IFMEM) : 2h de CM sur la Vie cellulaire (cycle cellulaire, différenciation, apoptose)
- Orthophonie 1ère année : 6h de CM et 2h de TD en Embryologie générale, embryologie crânio-faciale et histologie/embryologie de l'oreille
- Maïeutique 2ème année : Co-responsable de l'EC Histologie/Embryologie et Cytogénétique (22h CM et 4h ED, 35 étudiants). Je dispense 6h de CM et 2h d'ED sur l'histologie et le développement normal et pathologique du système nerveux et l'histologie et le développement normal et pathologique du cœur.

#### **Formation Master**

- Master 1 Reproduction humaine : de la physiologie et la pathologie. 1h de CM sur Infertilité et cytogénétique

#### **Autres**

Participation aux ECOS facultaires

Certification nationale Examineur ECOS réalisé en 2024

Encadrement du tutorat de PASS pour mes enseignements (correction des colles et concours blancs)

#### **3.2 Activités antérieures**

➤ PACES (UFR Médecine et des professions paramédicales)

2010- 2020 : Responsable des Enseignements dirigés d'Histologie et Embryologie (8 séances, > 1000 étudiants)

2018/2019 et 2019/2020 : Enseignante Référente (100 étudiants)

Depuis la rentrée 2020-2021, PACES remplacé par PASS, suppression des séances d'ED.

- Licence 1 – UE Sciences pour la Santé (UFR Pharmacie)
  - 2017 - 2020 : Responsable de l'EC2 Embryologie, Histologie et Organogenèse du premier semestre et des EC2 Embryologie, Histologie et Organogenèse et EC3 Cytogénétique Médicale du second semestre (> 400 étudiants, 5 enseignants, 2 doctorants contractuels)
  - 2019/2020 - Enseignante Référente (40 étudiants)
  - 2019/2020 – Membre du Comité d'Evaluation des Vœux sur Parcoursup pour le portail « Sciences de la Vie/Chimie/ Nutrition-Pharmacologie » pour la rentrée 2020-2021
  - Depuis la rentrée 2020-2021, refonte de la maquette, suppression des cours d'Histologie et Embryologie.
- DFGSO2 – UFR Odontologie
  - 2020 – 2022 : Responsable des enseignements d'Histologie pour l'UE Biologie (3 enseignants, 16h, > 150 étudiants)
  - Rentrée 2022-2023 : suppression des enseignements d'histologie.
- DFGSMa2 (UFR Médecine et des professions paramédicales) – UE Embryologie et Histologie générales
  - 2020 – 2022 : Responsable de l'enseignement d'histologie de l'UE Génétique Médicale (2 enseignants, 12h, > 30 étudiants)
- PASS Mineur Santé
  - 2020 – 2022 : Responsable de l'UE Embryologie et Histologie générales du Bloc spécifique Odontologie (3 enseignants, 26h, > 100 étudiants)
- Responsabilité administrative
  - 2018 - 2020 : Responsable du logiciel QCM Direct (Exatech) pour l'UFR Médecine et des Professions paramédicales (édition d'épreuve type QCM, évaluations continues et terminales)

## **4. Activités de Recherche**

### **4.1 Synthèse des travaux de thèse (2001 – 2005)**

J'ai réalisé mes travaux de Doctorat dans l'équipe Inserm U582 dirigée par le Dr Pascale Guicheney. Mes travaux, intitulés « Aspects génétiques du risque arythmogène : polymorphismes des canaux ioniques cardiaques et identification d'un nouveau locus responsable du syndrome de Brugada », avaient pour objectif de contribuer à la découverte des facteurs génétiques impliqués dans le risque d'arythmies ventriculaires chez les patients atteints des syndromes du QT long congénital (SQTL) et de Brugada. Ainsi, j'ai mené en parallèle deux projets : l'un portant sur l'identification de facteurs génétiques impliqués dans la durée de la repolarisation ventriculaire chez des sujets *a priori* sains de la population générale et le second sur l'identification d'un nouveau locus génétique responsable du syndrome de Brugada.

#### **1. Identification de facteurs génétiques impliqués dans la durée de la repolarisation ventriculaire chez des sujets *a priori* sains de la population générale**

Cette étude a nécessité au préalable la sélection d'une population de 2008 sujets *a priori* sains à partir d'individus volontaires français (cohorte D.E.S.I.R (Données Epidémiologiques sur le Syndrome de Insulino-Résistance)). A partir de cette population, différents groupes de sujets ont été sélectionnés en fonction de la durée de leur intervalle QTc.

##### **1.a) Recherche de mutations dites silencieuses sur le plan clinique dans le gène *KCNQ1* chez des sujets *a priori* sains de la population générale.**

La longueur de l'intervalle QTc reflète la durée de la repolarisation ventriculaire cardiaque sur l'électrocardiogramme (ECG). Dans le SQTL, la longueur de l'intervalle QTc est anormalement prolongée (> 440 ms). De nombreuses mutations ont été décrites dans le gène *KCNQ1*. Certaines de ces mutations sont associées à un phénotype peu sévère (faible voire absence d'allongement de l'intervalle QTc, faible incidence d'arythmies) suggérant que des mutations silencieuses sur le plan clinique peuvent être présentes dans la population générale.

Ainsi, j'ai recherché par dHPLC et séquençage si des mutations du gène *KCNQ1* pouvaient expliquer les valeurs les plus élevées, mais considérées comme normales, de l'intervalle QTc chez des individus sains de la population générale.

Parmi les 100 sujets présentant les intervalles QTc les plus longs (403-442 ms) de la population saine de 2008 sujets, nous avons identifié deux individus porteurs d'une mutation (Y148X et delS276). Les

sujets porteurs de ces mutations présentent des intervalles QTc limites (438 et 442 ms) mais sont potentiellement à risque de développer des arythmies ventriculaires dans des conditions de réduction de la réserve de courants repolarisants (**Gouas L et al, New *KCNQ1* mutations leading to haploinsufficiency in a general population; Defective trafficking of a KvLQT1 mutant. Cardiovasc Res. 2004).**

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Isabelle Baro (Inserm U533, Nantes).

### **1.b) Etude d'association génétique entre des polymorphismes des canaux ioniques cardiaques et la durée de l'intervalle QTc**

Dans la population générale, la longueur de l'intervalle QTc est très variable d'un individu à un autre (340-440 ms) mais des études de jumeaux mono- et dizygotes ont montré que la durée de la repolarisation ventriculaire pouvait être déterminée génétiquement.

J'ai entrepris la recherche des déterminants génétiques de la repolarisation ventriculaire en partant de l'hypothèse que des polymorphismes de canaux ioniques impliqués dans la genèse du potentiel d'action ventriculaire pouvaient être de bons candidats.

J'ai ainsi réalisé une étude d'association génétique entre des polymorphismes de canaux ioniques cardiaques et la durée de l'intervalle QTc et confirmé l'association génétique des polymorphismes rs757092 de *KCNQ1* et rs3815459 *KCNH2* avec la durée de la repolarisation ventriculaire chez des sujets sains de la population générale (**Gouas L et al, Association of *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2* and *SCN5A* polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. Eur J Hum Genet. 2005; Gouas L et al, Confirmation of associations between ion channel gene SNPs and QTc interval duration in healthy subjects. Eur J Hum Genet. 2007-cf Annexes)**

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de Beverley Balkau (Inserm U468, Villejuif) et de Laurence Tiret (Inserm U425, Paris).

## **2. Identification d'un nouveau locus responsable du syndrome de Brugada**

Le syndrome de Brugada (BS) est une pathologie rare à transmission autosomique dominante, caractérisée par une élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites V1-V3 sur l'ECG et un risque important de mort subite. Sa physiopathologie n'est que partiellement élucidée car des mutations n'ont été identifiées que dans le gène *SCN5A* codant la sous-unité  $\alpha$  du canal sodique cardiaque  $Na_v1.5$  chez seulement 20% des patients BS. J'ai réalisé des analyses de liaison génétique sur génome entier dans deux grandes familles BS avec une histoire de mort subite pour lesquelles le gène *SCN5A* a été exclu. Un locus de 3.4 Mb présent chez tous les sujets atteints des deux familles a été identifié sur le chromosome 17.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Jacques Schott (Inserm U533, Nantes).

En parallèle à ces travaux, j'ai été impliquée au cours de ma thèse dans la recherche de mutation dans le gène *SCN5A* chez des familles atteintes du syndrome de Brugada et pour certaines d'entre elles, j'ai participé à la mise en évidence d'une mutation conduisant à une relation génotype/phénotype atypique (**Six I et al, The occurrence of Brugada syndrome and isolated cardiac conductive disease in the same family could be due to a single *SCN5A* mutation or to the accidental association of both diseases. Europace. 2008**).

#### **4.2 Synthèse des travaux de Recherche Clinique (2006 – )**

J'ai été le porteur d'un projet de recherche clinique sur la « physiopathologie des anomalies de la clarté nucale (CN) chez le fœtus entre 11 et 14 semaines d'aménorrhée ». Mes travaux dans cette thématique portaient sur la recherche de remaniements déséquilibrés cryptiques par les techniques moléculaires de la cytogénétique, en particulier la MLPA, pour la recherche de microremaniements intrachromosomiques et pour l'exploration des régions subtélomériques.

Il existe une relation bien démontrée entre la présence d'une CN épaisse et l'existence d'anomalies chromosomiques. Dans la majorité des études publiées, la recherche d'anomalies chromosomiques chez les fœtus avec une CN épaisse est réalisée par l'étude du caryotype standard. En présence d'une CN épaisse, le risque d'aneuploïdie est augmenté et la prévalence de trisomies 13, 18, 21, de monosomie X (45,X) ou de triploïdies augmente avec l'épaisseur de la clarté nucale<sup>1</sup>.

Néanmoins, dans environ 70-80% des cas (selon les études), toute épaisseur de la clarté nucale confondue, aucune anomalie chromosomique visible sur le caryotype fœtal n'est identifiée<sup>2</sup>.

Nous avons analysé 106 fœtus présentant une CN > 3 mm (92 prélèvements de villosités chorales, 11 liquides amniotiques, 3 produits de fausse couche) par MLPA. Après culture, l'ADN génomique a été extrait des cellules (NucleoSpin Blood, Macherey-nagel) et 100 ng d'ADN ont été utilisés pour l'exploration des régions subtélomériques (SALSA P036/P070) et de 21 régions chromosomiques (SALSA P245) par MLPA (MRC-Holland, Pays-Bas). Les produits de PCR ont été séparés sur un séquenceur automatique (GeXP Genome Lab, Beckman-Coulteur) et la quantification réalisée avec Excel. La MLPA n'a pas été interprétable dans 5 cas. Un variant bénin (dup(8)pter) a été mis en évidence chez un fœtus. Une monosomie 18qter associée à une trisomie 5pter ont été identifiées et confirmées par FISH chez un fœtus ayant présenté une CN de 5,3 mm à 13 SA puis une cardiopathie complexe.

Ces résultats ont montré que l'application en routine de la MLPA pour l'exploration de ces régions chromosomiques en cas d'anomalies de la CN semblait avoir un intérêt limité puisque l'incidence d'anomalie cryptique était inférieure à 1%. Néanmoins, si seuls les fœtus présentant une CN épaisse associée à une autre malformation étaient pris en compte, l'incidence de ces variants pathogènes

cryptiques s'élevait à 2,7%.

Ce projet avait reçu un avis favorable du CHU de Clermont-Ferrand qui avait participé à son financement à hauteur de 13.000,0 Euros (PHRC local 2009-2011). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (**Gouas L et al, Prenatal Screening of 21 Microdeletion/Microduplication Syndromes and Subtelomeric Imbalances by MLPA in Fetuses with Increased Nuchal Translucency and Normal Karyotype. Cytogenet Genome Res. 2015, cf Annexes**)

De par ma contribution au diagnostic chromosomique pré- et postnatal dans le service, j'ai également participé à des études réalisées par l'équipe de cytogénétique constitutionnelle sur l'observation de cas cliniques intéressants pour la communauté scientifique et médicale, notamment par les approches de MLPA, Prénatal BoBs<sup>®</sup> et CGH sur puces à ADN. (**Blanc P, Gouas L, et al. Trisomy 20q caused by interstitial duplication 20q13.2: clinical report and literature review. Am J Med Genet A. 2008 May 15;146A(10):1307-11; Goumy C, Gouas L, et al.. Prenatal detection of cryptic rearrangements by multiplex ligation probe amplification in fetuses with ultrasound abnormalities. Genet Med. 2010 ; Mellali S, Haoud K, Gouas L, Khaled MB, Vago P, Moulessehou S. Prenatal BoBs<sup>TM</sup> in the cytogenetic analysis of products of spontaneous miscarriage. S Afr Med J. 2015 Sep 19;105(10):870-3 ; Goumy C, Gay-Bellile M, Salaun G, Kemeny S, Eymard-Pierre E, Biard M, Pebrel-Richard C, Vanlieferinghen P, Francannet C, Tchirkov A, Laurichesse H, Rouzade C, Gouas L, Vago P. A novel 2q14.1q14.3 deletion involving GLI2 and RNU4ATAC genes associated with partial corpus callosum agenesis and severe intrauterine growth retardation. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2016 Sep;106(9):793-7**). J'ai également rédigé une revue sur les méthodes de dosage génique appliquées en cytogénétique médicale (**Gouas L, Goumy C, et al. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. Pathol Biol (Paris). 2008 Sep;56(6):345-53. Epub 2008 Jun 2, cf Annexes**).

#### **4.3 Travaux de Recherche Fondamentale (2006 – )**

##### **4.3.1 Introduction**

Dans le cadre du plan quinquennal 2012-2016, l'équipe de cytogénétique avait intégré l'équipe d'accueil ERTiCa, « Equipe de Recherche sur le Traitement Individualisé des Cancers », dirigée par le Professeur Frédérique Penault-Llorca dont la thématique était l'amélioration des thérapies ciblées dans le cancer du sein en prenant comme modèle d'étude les tumeurs basal-like triple-négatives. Au sein de cette équipe, notre groupe, dirigé alors par le Prof. Philippe Vago, avait pour thématique « Conséquences fonctionnelles des remaniements chromosomiques ». Dans cette thématique, j'ai développé un projet visant à mieux comprendre l'impact d'un chromosome 21 surnuméraire sur l'organisation tridimensionnelle des territoires chromosomiques dans le noyau interphasique.

Lors du plan quadriennal 2017-2020, l'EA ERTiCa a fusionné avec l'UMR INSERM 990 Imagerie Moléculaire et Thérapies vectorisées (IMTV) et l'EA 7283 Cancer Resistance Exploring Targeting

(CREAT), pour former l'UMR INSERM/UCA 1240 « Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques (IMoST) », dirigée par le Pr Elisabeth Miot-Noirault. Cette unité a pour objectif la mise à jour de nouvelles cibles et le transfert clinique d'outils pour le traitement et le suivi thérapeutique, essentiellement en oncologie. J'ai intégré l'équipe TATOO « Targets and Tools for imaging and therapy » (Dr F. Degoul pour la direction 2017-2021, Dr E. Moreau pour la direction 2021 à nos jours). Les objectifs de cette équipe sont de développer des outils de ciblage innovants pour des cibles pertinentes dans le cadre de l'imagerie et/ou de thérapies ciblées, depuis la conception moléculaire jusqu'à la validation préclinique en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces objectifs impliquent des recherches translationnelles depuis la biologie (identification de cibles pertinentes), la chimie (conception de molécules, synthèse et radiomarquage) jusqu'au domaine préclinique (modèles *in vitro*, pharmacologie cellulaire et expérimentale, imagerie *in vivo* et mécanistique).

C'est au sein de cette équipe que j'ai développé ma thématique de recherche « Interactions cellules tumorales mammaires/matrice extracellulaire T21 », au travers de modèles cellulaires 2D et 3D, dans le cadre d'un axe thématique de l'équipe s'intéressant au microenvironnement tumoral.

### 4.3.2 La trisomie 21

#### *Un tableau clinique à large spectre*

En 1956, Marthe Gautier mit en évidence l'existence d'un chromosome supplémentaire chez des personnes présentant une déficience intellectuelle et des traits phénotypiques similaires et en 1959, ce chromosome surnuméraire fut identifié comme étant un chromosome 21, ce qui permit d'établir la première relation génotype-phénotype dans le cadre d'un nouveau syndrome appelé alors Trisomie 21 (T21)<sup>3</sup>. La trisomie 21 est la plus fréquente des anomalies chromosomiques autosomiques de nombre et l'une des principales causes de déficience intellectuelle.

La trisomie 21 complète ou partielle est la cause génomique du syndrome de Down. Une trisomie 21 libre est présente chez 95 % des individus atteints du syndrome de Down et résulte d'une non-disjonction maternelle au moment de la méiose I (~66 %) ou de la méiose II (~21 %), ou d'une non-disjonction paternelle à la méiose I (~3 %) ou méiose II (5 %). Elle peut également résulter d'une non-disjonction mitotique après la formation du zygote (5 %) et être ainsi à l'origine d'une trisomie 21 en mosaïque. Dans les 5% des cas restants, la trisomie 21 est dite non-libre. Elle résulte, dans la grande majorité des cas, d'une translocation dite robertsonienne, qui correspond à la fusion d'un chromosome 21 avec un autre chromosome acrocentrique (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) accompagnée de la perte de leurs bras courts. Exceptionnellement, il s'agit d'une trisomie 21 partielle résultant, la plupart du temps, de la malségrégation méiotique d'une translocation réciproque contenant la région critique DSCR (Down Syndrome Critical Region), située en 21q22.2q22.3. La trisomie 21 partielle est rare et est associée à une gamme de symptômes qui varient en fonction de la longueur de la région du chromosome 21 tripliquée<sup>4</sup>.

La trisomie 21 est l'anomalie chromosomique responsable de déficience intellectuelle la plus fréquente à la naissance, avec approximativement une naissance sur 600 à 800, mais de seulement de 1/1 500 à 2 000 naissances vivantes en France, du fait de l'existence d'un dépistage prénatal. L'incidence varie en fonction de l'âge maternel avec un risque qui augmente au-delà de 35 ans<sup>5</sup>.

Les patients porteurs d'une trisomie 21 présentent une symptomatologie variée qui touche tous les systèmes. Cependant, la prévalence et la sévérité de ces manifestations cliniques présentent une grande variabilité interindividuelle. Les symptômes les plus constamment rencontrés sont l'hypotonie, visible dès la naissance, et la déficience intellectuelle.

Les caractéristiques physiques des patients porteurs d'une T21 permettent souvent à eux seuls d'évoquer le diagnostic, et ce, dès la naissance. L'hypotonie musculaire est constante et présente dès la naissance. Elle se traduit par un « bébé mou », passif avec une faiblesse des cris. L'hypotonie évolue mais reste présente toute la vie et participe au retard des acquisitions motrices.

La déficience intellectuelle est également une constante mais celle-ci est d'intensité variable allant d'un déficit modéré à sévère qui affecte notamment les capacités d'apprentissage et de raisonnement<sup>6</sup>. On estime qu'environ la moitié des personnes porteuses de trisomie 21 sont capables d'accéder à la lecture et l'écriture et à une assez bonne autonomie. Il existe néanmoins une grande variabilité interindividuelle aussi bien des performances cognitives que du déclin intellectuel. Des troubles du comportement sont possibles, surtout de type adaptatif (anxiété, dépression), ainsi qu'une hyper-activité avec déficit de l'attention.

La dysmorphie faciale est également commune à l'ensemble des patients porteurs d'une trisomie 21. Elle se traduit par un os occipital plat, un visage de type lunaire (arrondi et plat), des fentes palpébrales obliques en haut et en dehors, un nez court (lié à une hypotrophie des os propres du nez), une petite bouche avec des lèvres et une langue épaisses, cette dernière faisant fréquemment protrusion. Les oreilles sont de petite taille, rondes et basses implantées, la nuque est courte et plate avec un excès de peau et les cheveux ont une implantation basse au niveau du front. Les premières vertèbres cervicales présentent souvent des malformations. Un hypertélorisme et un épicanthus sont classiquement décrits.

Les individus porteurs d'une trisomie 21 se caractérisent également par un corps trapu, un bassin étroit, un abdomen distendu, parfois des scoliose malformatives et des malformations des membres : mains larges avec des doigts courts et présentant un pli palmaire unique. Les pieds sont souvent plats, en lien avec un affaissement de la voûte plantaire. La laxité articulaire augmentée est le principal facteur des problèmes ostéo-articulaires dans la trisomie 21 (scoliose, luxation de hanche, genu valgum, pieds plats, hallux valgus ou varus).

Les malformations viscérales font partie des traits inconstants du syndrome de Down. Les malformations cardiaques congénitales sont souvent présentes chez ces patients avec une prévalence chez les nouveaux-nés estimée entre 33 et 56%<sup>7</sup>. Les plus communes sont le canal atrio-ventriculaire, la communication interventriculaire, la communication interauriculaire, la tétralogie de Fallot et la persistance du canal artériel. Elles représentent la première cause de mortalité dans l'enfance avec les infections respiratoires. La maladie de Hirschsprung est 50 fois plus fréquente que dans la population

générale, le risque de sténose duodénale est quant à lui 300 fois plus élevé. La trisomie 21 est également associée à d'autres malformations telles que l'atrésie de l'œsophage, l'imperforation anale<sup>8</sup>.

Les patients porteurs d'une trisomie 21 présentent une sensibilité accrue aux infections, en particulier de la sphère oto-rhino-laryngologique. Les patients ne sont pas immunodéficients mais il existe de nombreuses anomalies du système immunitaire : anomalies morphologiques et fonctionnelles du thymus, taux anormalement élevés et activité fonctionnelle réduite des lymphocytes T et « natural killer », diminution du taux des lymphocytes B circulants<sup>9</sup>.

Il existe fréquemment un retard de croissance intra-utérin modéré, la croissance se poursuivant ensuite entre -2 et -3 déviations standard pour atteindre une taille finale moyenne d'environ 160 cm chez l'homme et 145 cm chez la femme. Une surcharge pondérale (surpoids, obésité) est fréquemment observée. La puberté survient normalement, mais la ménopause tend à être plus précoce que dans la population générale.

### 4.3.2.1 Impacts d'un chromosome 21 surnuméraire sur l'organisation spatiale du noyau interphasique

L'étude de l'impact d'un chromosome 21 surnuméraire sur l'organisation spatiale des territoires chromosomiques dans le noyau interphasique a fait l'objet des travaux de thèse de Sciences, que j'ai supervisés sur le plan technique, du Dr Stéphan Kémény, thèse qu'il a menée sous la direction du Pr P. Vago et soutenue en octobre 2017. Ces travaux ont été publiés 2018 dans la revue *Chromosoma* (**Kemeny S et al. Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. *Chromosoma*. 2018 Jun;127(2):247-259. PMID: 29238858 – cf Annexes**). Ils ont été réalisés en collaboration avec le Pr Christophe Tatout, de l'équipe « Dynamique de la chromatine et du Noyau 3D » de l'unité de Recherche iGReD « Institut Génétique, Reproduction et Développement » de Clermont-Ferrand.

#### 4.3.2.1.1 Contexte et objectifs

Comme je l'ai évoqué précédemment, il existe une grande variabilité phénotypique dans le syndrome de Down, avec des caractéristiques phénotypiques dites constantes comme la déficience intellectuelle, des traits dysmorphiques et une hypotonie musculaire à la naissance, et des traits phénotypiques dits inconstants, dont l'incidence et la gravité varient considérablement d'un patient à l'autre, comme des malformations cardiaques ou des malformations gastro-intestinales<sup>10-11</sup>. Les mécanismes sous-jacents à cette expressivité variable sont encore peu compris et l'origine de cette variabilité phénotypique fait toujours l'objet de nombreuses recherches.

La caractéristique des personnes porteuses d'une trisomie 21 étant la présence d'un chromosome 21 surnuméraire, de nombreuses recherches ont porté sur l'expression des gènes portés par ce chromosome. Une augmentation globale de l'expression des gènes en trois copies chez les patients porteurs de trisomie 21 a été mise en évidence<sup>12-13</sup>. Une étude de 2007 a montré cependant que seuls 25% des gènes trisomiques étaient surexprimés par rapport à des sujets contrôles<sup>14</sup>. Les résultats concernant la modification de l'expression des gènes disomiques dans les cellules T21 étaient plus divergents. L'hypothèse de « l'effet de dosage génique » était née et il a été avancé que le phénotype trisomique 21 résultait directement de la surexpression de gènes individuels et/ou groupes de gènes portés par ce chromosome. La mise en évidence de la région DSCR (*Down Syndrome Critical Region*) a été un argument en faveur de cette hypothèse et a abouti à la notion de « gènes candidats ». En se fondant sur cette hypothèse, plusieurs groupes ont essayé, avec plus ou moins de succès, d'identifier les modifications d'expression génique pouvant être associées aux symptômes observés chez les

patients. Néanmoins, l'expression de la plupart des gènes variant naturellement d'une personne à l'autre, il est par conséquent extrêmement difficile d'identifier les altérations liées exclusivement à la trisomie 21 et celles dues à la variation naturelle entre individus. L'équipe de Stylianos Antonarakis a eu la chance très rare de disposer du génome d'un couple de jumeaux monozygotes discordants pour la trisomie 21. Après avoir éliminé les variations inter-individuelles, les chercheurs se sont focalisés sur les modifications d'expression génique attribuées exclusivement à la trisomie 21. Ils ont ainsi constaté que les gènes voisins au sein d'un même chromosome étaient dérégulés de manière identique dans les cellules trisomiques<sup>15</sup>. D'une manière générale, chaque chromosome était divisé en domaines (GEDD) qui comprenaient des gènes ayant un niveau relativement similaire de transcription. Chez le jumeau trisomique, les domaines étaient parfois surexprimés, parfois sous-exprimés, en comparaison avec leur expression chez le jumeau sain. Il est apparu que les domaines surexprimés chez le jumeau trisomique correspondaient à des portions d'ADN connues pour interagir préférentiellement avec la périphérie du noyau. Cette étude montrait pour la première fois que les cellules trisomiques subissaient des modifications de la structure interne de leur génome conduisant à une altération du profil d'expression des gènes et que ces changements n'affectaient pas seulement le chromosome 21 mais bien l'ensemble du génome. Des études ultérieures explorant les GEDDs dans des cellules humaines trisomiques 21 ou murines (trois copies d'une région de 23 Mb de Mmu16 orthologue du chromosome 21 humain contenant 148 gènes) ont d'abord remis en question l'existence des GEDDs puis ont montré que les limites des GEDDs étaient corrélées aux limites des domaines d'association topologique (TAD), des unités de structure de chromatine d'ordre supérieur qui sont enrichies en gènes co-régulés<sup>16-18</sup>.

Une deuxième hypothèse, celle du « developmental instability hypothesis », suggère qu'un petit nombre de gènes surexprimés du chromosome 21 serait responsable d'une dérégulation transcriptionnelle, secondaire et globale, à l'échelle du génome. En effet, l'existence d'une dérégulation transcriptionnelle globale à l'échelle du génome en présence d'un chromosome 21 surnuméraire a clairement été observée dans différents types cellulaires de patients trisomiques 21 mais également dans des cellules issues de modèles murins de la trisomie 21<sup>19</sup>. Ainsi, cette dérégulation transcriptionnelle a été observée chez l'Homme, en période fœtale, dans des amniocytes<sup>12,20,21</sup>, le placenta<sup>20,22</sup>, des fibroblastes<sup>23</sup>, du tissu cardiaque<sup>21,23,24</sup>, et du tissu cérébral<sup>21</sup>, et en période post-natale, dans des lymphocytes<sup>25</sup> et du tissu cérébral<sup>14,21</sup>. Certains travaux de Costa et al. (2011) ont montré que, dans des cellules progénitrices endothéliales de patients trisomiques 21, il existait un enrichissement en transcrits issus de régions du génome non annotées comme locus transcriptionnellement actifs<sup>26</sup>. L'ensemble de ces données suggère que de nombreux domaines du génome peuvent être sous l'influence d'un environnement régulateur inadéquat en présence d'un chromosome 21 surnuméraire.

Les hypothèses de « l'effet de dosage génique » et du « developmental instability hypothesis » ne sont pas mutuellement exclusives et il est probable que les traits phénotypiques du syndrome de Down résultent en partie d'une sur-expression de gènes situés sur le chromosome 21 mais aussi en partie d'une dérégulation transcriptionnelle globale du génome.

Dans le noyau en interphase, la chromatine est organisée en structures tridimensionnelles (3D) multi-échelles, comprenant des territoires chromosomiques, des compartiments chromatinien A/B, des domaines d'association topologique (TAD) et des boucles de chromatine. Cette architecture génomique organisée hiérarchiquement régule la transcription des gènes, qui à son tour est essentielle à divers processus biologiques notamment au cours du développement embryonnaire. Des altérations dans cette organisation 3D ou dans des protéines structurales clés peuvent être à l'origine de mécanismes pathologiques de maladies telles que des anomalies congénitales du développement et le cancer<sup>27-28</sup>. Chez les mammifères, la chromatine n'occupe pas tout le volume du noyau et laisse apparaître des lacunes, qui définissent le compartiment interchromatinien, dans lesquelles sont concentrées les « machineries » de maturation des transcrits. Les approches d'hybridation *in situ* avec des sondes détectant spécifiquement un chromosome ont permis d'assigner à chaque chromosome un volume spécifique appelé territoire chromosomique<sup>29</sup>.

Les territoires chromosomiques (TC) sont confinés dans un espace limité du noyau interphasique, stable au cours du cycle cellulaire et ne semblent pas disposés au hasard. Une distribution radiale des territoires a été décrite, avec certains chromosomes préférentiellement positionnés vers l'extérieur, et d'autres plutôt situés vers l'intérieur du noyau. La distribution des territoires des chromosomes 18 et 19 est un cas d'école : le chromosome 18, qui est pauvre en gènes, est généralement localisé à la périphérie du noyau ; le chromosome 19, plus riche en gènes, occupe une position plus interne<sup>30</sup> (Fig. 3).

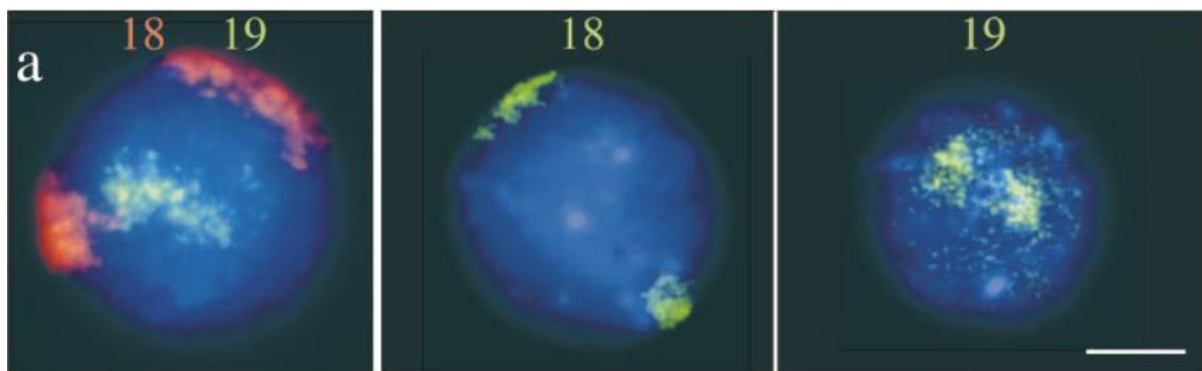


Figure 3 : Distribution des territoires chromosomiques 18 et 19 dans le noyau interphasique de lymphocytes (Croft et al. (1999)<sup>30</sup>)

La densité en gènes n'est pas le seul facteur déterminant dans la position radiale d'un territoire : la taille du chromosome semble aussi entrer en jeu<sup>31,32</sup> (Fig. 4). Les chromosomes de grande taille se localiseraient en périphérie du noyau alors que les chromosomes de petite taille seraient localisés au centre. De plus, la position relative des chromosomes les uns par rapport aux autres peut être conservée. C'est le cas par exemple des territoires des chromosomes 12, 14 et 15 qui semblent souvent être regroupés dans les noyaux de lymphocytes<sup>33</sup>.

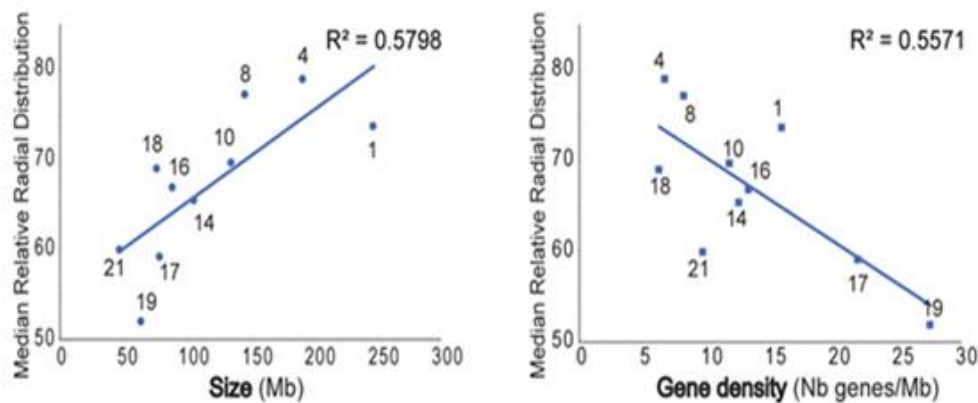


Figure 4 : Répartition non aléatoire des chromosomes dans le noyau selon la taille des chromosomes et selon leur densité en gènes (Heride et al. (2010)<sup>32</sup>)

D'autre part, l'organisation globale des territoires chromosomiques serait préservée tout au long de l'interphase et transmise aux cellules filles lors de la mitose<sup>34</sup>. La distribution des territoires chromosomiques peut varier selon le type cellulaire, notamment en fonction de la forme du noyau<sup>35</sup>.

Les territoires chromosomiques seraient parcourus par des canaux plus ou moins larges qui formeraient le réseau de l'espace interchromatinien. Ce réseau doit être perçu comme un jeu de protrusions et d'invaginations plutôt que comme un ensemble de tubes uniformes. L'espace interchromatinien serait composé de larges lacunes, dont le diamètre pourrait dépasser plusieurs micromètres, et de canaux plus fins mesurant à peine quelques nanomètres. Cet arrangement permettrait l'accessibilité du génome aux molécules indispensables à la fonction du noyau qui circuleraient dans les canaux interchromatiniens. Ce modèle d'organisation du noyau répond au nom de CT-IC (Chromosome Territory - Interchromatin compartment) et est largement répandu dans la littérature<sup>36</sup> (Fig. 5). Cette organisation en territoires chromosomiques séparés les uns des autres par un espace interchromatinien interconnecté et riche en composants intervenant lors des processus de transcription et d'épissage suggère que la production et la maturation des ARN pourraient avoir lieu à la surface des territoires<sup>37</sup>.

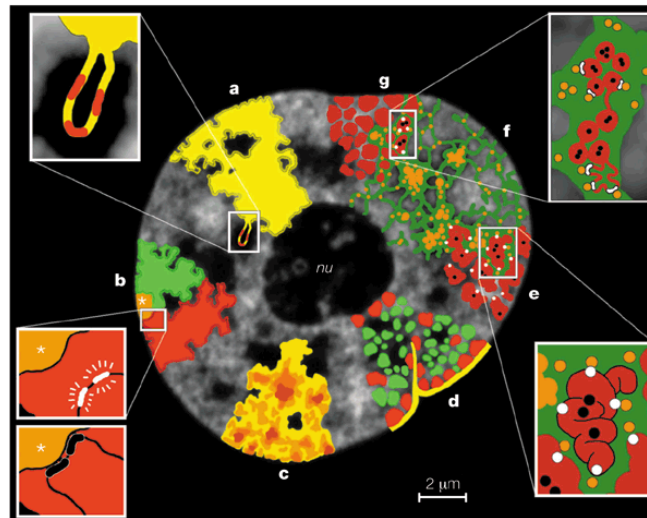


Figure 5 : Modèle d'architecture nucléaire. Caractéristiques structurales qui soutiennent le modèle du *Chromosome Territory – Interchromatine Compartment (CT-IC)*

**a.** Représentation d'un TC avec une boucle de chromatine et plusieurs gènes actifs (rouge). **b.** Les TC contiennent des domaines où se répartissent les bras chromosomiques courts (p) et longs (q) et un domaine centromérique (astérisque). Insertion : modèle topologique de la régulation de gènes, les gènes activement transcrits (blanc) sont situés sur une boucle de chromatine qui est éloignée de l'hétérochromatine centromérique alors que le recrutement des mêmes gènes (noir) au niveau l'hétérochromatine centromérique conduit à leur mise sous silence. **c.** Les TC ont une densité de chromatine variable (brun foncé, haute densité, jaune clair, faible densité). **d.** Visualisation des TC selon leur mode de réplication : précoce (vert), réplication moyenne à tard (rouge). La chromatine pauvre en gène (rouge) est préférentiellement située à la périphérie nucléaire et en contact étroit avec la lame nucléaire (jaune). **e.** les gènes actifs (points blancs) sont à la surface des fibres de chromatine alors que les gènes silencieux (points noirs) sont situés vers l'intérieur de la structure. **f.** Le modèle CT-IC prédit que le compartiment interchromatinien (vert) contient des complexes (points oranges) et des domaines non chromatinisés (agrégations des point d'orange) pour la transcription, l'épissage, la réplication et la réparation de l'ADN. **g.** Territoire chromosomique avec sa chromatine (rouge) et compartiment interchromatinien (vert) : les gènes actifs (points blancs) se trouvent à la surface des domaines, alors que les gènes silencieux (points noirs) se situent à l'intérieur (Cremer T et al. (2001)<sup>36</sup>)

Selon ce modèle, la position d'un gène dans un territoire chromosomique devrait donc influencer les modalités de son expression. Bien que la généralité du phénomène soit discutée<sup>38</sup>, de telles corrélations peuvent être observées dans un certain nombre de cas comme par exemple un gène porté par le chromosome X inactif dans un état transcriptionnel inactif est plutôt localisé au centre du territoire spécifiquement assigné au chromosome X inactif, tandis qu'un gène porté par le chromosome X inactif mais échappant à l'inactivation semble plutôt localisé en périphérie du territoire

correspondant<sup>39</sup>.

Il est intéressant de noter que des réarrangements chromosomiques telles que des translocations peuvent affecter l'organisation des territoires chromosomiques et la transcription des gènes proches du point de cassure, mais aussi situé à des loci plus éloignés<sup>40</sup>. Les aneuploïdies constituent un autre type d'anomalie chromosomique susceptible d'impacter l'organisation des territoires chromosomiques, mais peu d'études se sont intéressées à ce cas de figure<sup>15,41</sup>.

Dans ce travail, notre hypothèse était que la présence d'un chromosome 21 surnuméraire modifiait l'organisation spatiale des chromosomes au sein du noyau pendant l'interphase et que ces modifications altèreraient les relations fonctionnelles entre l'architecture nucléaire des chromosomes et l'expression des gènes. Ainsi, dans ce contexte, des gènes pourraient être relocalisés (vers le centre ou la périphérie nucléaire) et la modification de leur environnement « nucléaire » pourrait perturber la régulation de leur activité transcriptionnelle.

Afin de tester cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à la disposition radiale des territoires chromosomiques de différents chromosomes à partir de cellules de villosités chorales trisomiques 21. Le choix de ce type cellulaire reposait sur le fait que deux études montraient une dérégulation de nombreux gènes disomiques dans des cellules de villosités chorales en culture en cas de trisomie 21<sup>20,22</sup> et que la disposition radiale des territoires chromosomiques dans le noyau de ces cellules n'avait jamais été explorée.

Pour tester notre hypothèse, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

1/ La présence d'un chromosome 21 surnuméraire entraîne-t-elle une altération de la morphologie cellulaire et nucléaire des cellules ? une modification du volume nucléaire des cellules trisomiques ? L'objectif était de comparer le volume des noyaux trisomiques 21 à celui de noyaux diploïdes.

2/ Quel(s) critère(s) entre(nt) en jeu dans la disposition radiale des territoires chromosomiques dans le noyau des cellules de villosités chorales disomiques ? Les objectifs étaient de déterminer la position radiale des TC de différents chromosomes et de comparer cette organisation à ce qui avait été décrit dans la littérature après corrélation de celle-ci à la taille des chromosomes et à leur densité en gène.

3/ Quelle est la position radiale des trois TC21 ? L'objectif était de déterminer la position radiale des 3 TC21 et de la comparer à celle observée pour les deux TC21 des cellules disomiques.

4/ Quel est le positionnement (ou profil de proximité) des trois TC21 les uns par rapport aux autres dans les cellules trisomiques ? L'objectif était de décrire les distances séparant les 3 TC21 dans les cellules T21.

5/ La présence d'un chromosome 21 surnuméraire entraîne-t-elle une modification de la position radiale des autres TC ? L'objectif était de déterminer la position radiale des TC de différents chromosomes dans les noyaux de cellules trisomiques 21 et de comparer ces données avec celles

obtenues dans les noyaux de cellules disomiques.

#### 4.3.2.1.2 Résultats

La première étape de ce travail a consisté en la mise en place d'un protocole de FISH-3D adapté à des cultures de villosités chorales.

Douze paires de territoires chromosomiques ont été explorés à l'aide des sondes de peinture chromosomique (sondes commerciales Kreatech). Ces territoires ont été choisis pour être le plus représentatif possible de l'ensemble du génome. Compte tenu des critères qui semblent influencer le positionnement non aléatoire des chromosomes au sein du noyau, les chromosomes ont été choisis en fonction de leur taille (avec des chromosomes de grande taille et des chromosomes de petite taille) et en fonction de leur densité en gènes (avec des chromosomes à forte densité en gènes et des chromosomes à faible densité en gènes). Six couples de sondes de peintures ont ainsi été formés et l'association en couple de sondes a été réalisée de manière aléatoire. Les noyaux et les territoires chromosomiques d'intérêt ont été analysés après acquisition en microscopie confocale et reconstitution en 3D à l'aide d'un logiciel d'analyse dédié (IMARIS®). Six cultures issues de villosité chorales trisomiques 21 et 3 cultures issues de villosités chorales contrôles ont été étudiées. Les échantillons ont été choisis avec un âge gestationnel similaire entre les différents prélèvements allant de 13 à 15 semaines d'aménorrhées ainsi qu'en respectant le sexe chromosomique avec 3 échantillons XX et 3 échantillons XY pour les prélèvements trisomiques 21 et 2 échantillons XY et 1 échantillon XX pour les contrôles.

#### **a) La morphologie des noyaux des cellules de villosités chorales n'est pas altérée par une copie supplémentaire du chromosome 21**

La morphologie cellulaire étant une manifestation à grande échelle importante de l'état organisationnel et physiologique global des cellules, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission pour évaluer l'ultrastructure des cellules et du noyau. Les cellules de villosités chorales cultivées ont conservé des caractéristiques de fibroblastes mésenchymateux avec un cytoplasme abondant, une large membrane ondulée et de gros noyaux sans différence entre les cellules disomiques et T21 (Fig. 6).

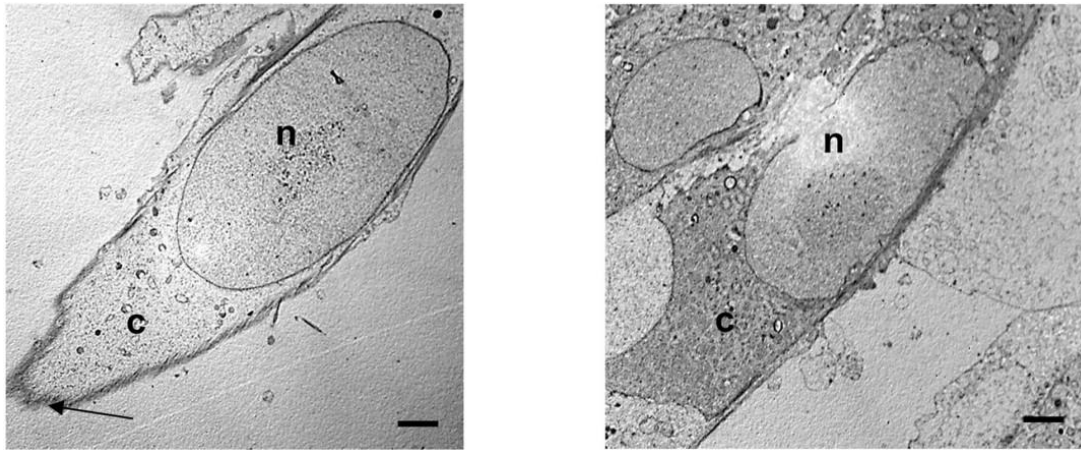


Figure 6 : Microscopie électronique à transmission des cellules de villosités chorales disomiques (gauche) et trisomiques 21 (droite). Les cellules sont relativement indifférenciées avec un gros noyau ellipsoïde (n), un cytoplasme indifférencié (c) et une large membrane ondulée (flèche). Barre d'échelle = 2 nm

La disposition radiale des territoires chromosomiques et sa corrélation avec la taille des chromosomes ont été bien décrites dans les fibroblastes, mais cette disposition peut être modifiée dans d'autres types de cellules notamment en lien avec la forme du noyau<sup>35</sup>. Pour mieux décrire la forme du noyau des cellules de villosités chorales disomiques et T21, nous avons comparé leur morphologie à celle de noyaux de fibroblastes et de lymphocytes par imagerie 3D à l'aide d'un plugin ImageJ appelé NucleusJ<sup>42</sup>. La forme nucléaire a été étudiée en calculant les indices d'allongement, de planéité et de sphéricité pour caractériser leur morphologie 3D. Comme prévu, l'allongement et la planéité étaient significativement plus élevés pour les noyaux des fibroblastes que pour les noyaux des lymphocytes, tandis que la sphéricité de ces derniers était significativement plus faible (Fig. 7.A). Les noyaux des cellules de villosités chorales disomiques et T21 présentaient des valeurs d'allongement et de planéité inférieures mais une sphéricité supérieure par rapport aux noyaux des fibroblastes (Fig. 7.B). Bien que les paramètres de forme nucléaire soient statistiquement différents, ils étaient plus proches des paramètres de forme du noyau des fibroblastes que des paramètres du noyau lymphocytaire. L'analyse morphométrique a montré que la forme des noyaux des cellules de villosités chorales est plus cohérente avec la forme nucléaire des fibroblastes que celle des lymphocytes. Aucun changement majeur de la morphologie nucléaire n'a été observé dans les noyaux des cellules de villosités chorales T21 par rapport aux noyaux des cellules des villosités chorales disomiques.

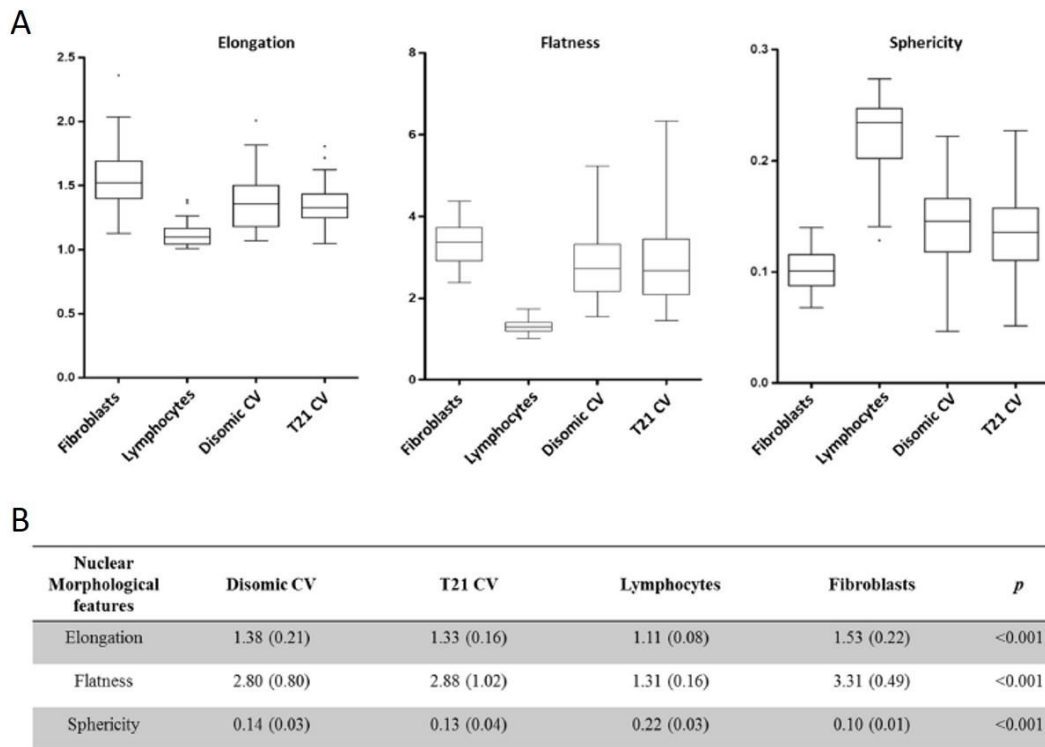


Figure 7 : Analyse morphologique du noyau de fibroblastes, lymphocytes, cellules de villosités choriales disomiques et T21 à l'aide de NucleusJ. **A** : Les paramètres morphométriques d'allongement, de planéité et de sphéricité sont présentés sous forme de boîtes à moustaches de Tukey avec un intervalle interquartile (25-75 %), une médiane (ligne horizontale) et des moustaches indiquant les valeurs minimales et maximales, à l'exception des valeurs aberrantes. *n* = 50 pour chaque type nucléaire. **B** : Analyse statistique de l'analyse morphométrique. Les valeurs moyennes et les écarts types entre parenthèses sont indiqués, ainsi que les valeurs de *p*, estimées par ANOVA ou Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc pour les comparaisons multiples : Tukey-Kramer post ANOVA ou Dunn après Kruskal-Wallis.

**b) Des territoires chromosomiques changent leur positionnement radial dans les noyaux trisomiques 21 des cellules de villosités choriales**

Dans le noyau en interphase, les chromosomes sont organisés en territoires chromosomiques distincts qui peuvent être délimités en tant que sous-volumes nucléaires par FISH 3D. Nous avons testé si un chromosome 21 supplémentaire modifiait l'organisation spatiale des chromosomes disomiques et pouvait modifier leurs positions radiales. La position radiale relative de 12 territoires chromosomiques, choisis pour représenter de manière adéquate une large gamme de tailles linéaires et de densités de gènes parmi les chromosomes humains, a été étudiée par FISH 3D dans les cellules

des villosités chorales disomiques et T21. La position radiale du TC1 ( $r = 0,65 \pm 0,11$  dans 83 noyaux disomiques contre  $0,68 \pm 0,14$  dans 115 noyaux T21,  $p = 0,007$ ) et du TC3 ( $r = 0,66 \pm 0,14$  dans 85 noyaux disomiques contre  $r = 0,71 \pm 0,11$  dans 113 noyaux T21,  $p < 0,001$ ) a été modifiée et a adopté une position plus périphérique dans les noyaux T21 tandis que les TC du chromosome 21 n'ont montré aucun changement de position dans les noyaux T21 ( $r = 0,54 \pm 0,15$  dans 75 noyaux disomiques contre  $r = 0,54 \pm 0,18$  dans 112 noyaux T21,  $p = 0,8$ ) (Fig. 8).

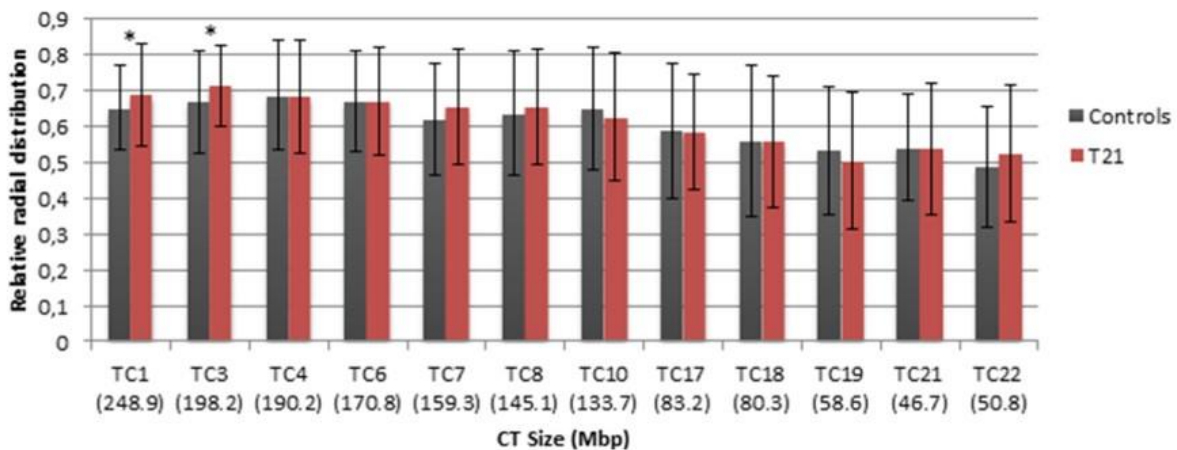


Figure 8 : Distribution radiale relative de douze territoires chromosomiques dans les noyaux de cellules de villosités chorales. Valeurs moyennes  $\pm$  écart type des distributions radiales relatives ( $r_1/r_0$ ) dans les noyaux disomiques (gris) et T21 (rouge). Les altérations significatives de la position radiale observées pour les TC1 ( $p < 0,007$ ) et TC3 ( $p < 0,001$ ) sont indiquées (\*).

Pour analyser le positionnement relatif des trois chromosomes 21 dans les cellules trisomiques, nous avons mesuré les distances  $d_1$ ,  $d_2$  et  $d_3$  définies comme étant respectivement la distance la plus petite, la distance intermédiaire et la distance la plus grande entre les centres de masse de ces trois territoires (Fig. 9). Nous avons constaté que 10,5 % des noyaux trisomiques avaient trois TC équidistants et que 36,5 % des noyaux avaient un TC équidistant des deux autres. La distance moyenne la plus basse ( $d_1$ ) et la plus grande ( $d_3$ ) entre deux TC21 étaient respectivement de  $4,34 \pm 1,37$  et  $8,01 \pm 2,34$   $\mu\text{m}$ . Enfin, nous avons observé que dans 55,8 % des noyaux T21, l'un des TC21 était significativement plus éloigné des deux autres TC21 ( $p < 0,001$ ,  $n = 107$  noyaux) suggérant que les TC21 adoptent une organisation spécifique dans les noyaux des cellules trisomiques.

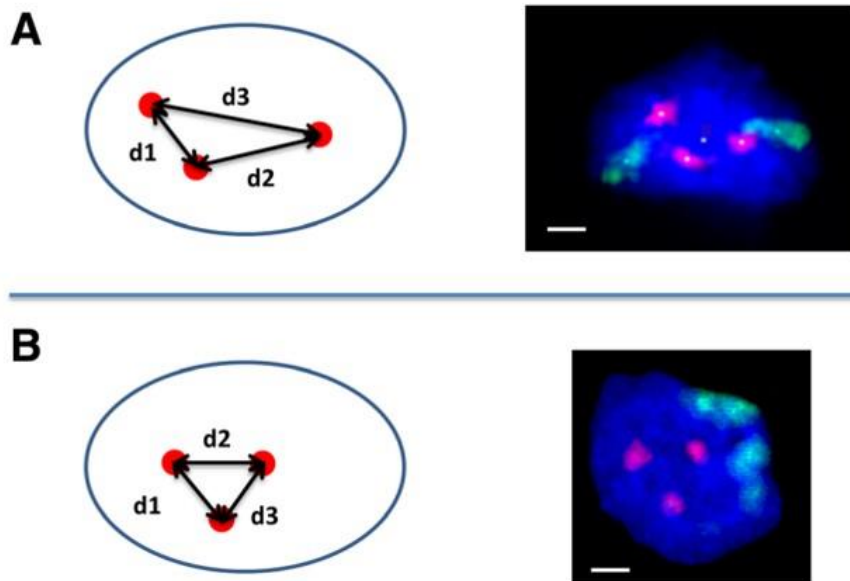


Figure 9 : Positionnement des territoires 21 dans les cellules de villosités chorales T21. Distances absolues, d1, d2 et d3 entre les centres de masse des trois territoires 21 (rouge) dans les noyaux T21 (n = 107). Barre d'échelle 3  $\mu$ m. **A** : Exemple de deux chromosomes 21 localisés à proximité l'un de l'autre et distants du chromosome restant. **B** : Exemple de trois chromosomes localisés à une distance équivalente l'un par rapport à l'autre.

**c) La corrélation entre la taille des chromosomes, la densité en gènes et la disposition radiale des chromosomes n'est pas affectée dans les noyaux des cellules de villosités chorales trisomiques 21**

Plusieurs facteurs peuvent participer à l'organisation des territoires chromosomiques dans l'espace nucléaire, notamment la taille des chromosomes, la densité en gènes, la forme du noyau et des interactions avec la périphérie nucléaire<sup>32</sup>. Nous avons étudié la corrélation entre la position radiale des territoires et la taille des chromosomes d'une part, et la corrélation entre la position radiale et la densité génétique, d'autre part, pour déterminer si ces facteurs peuvent influencer la distribution radiale des TC dans les noyaux des cellules de villosités chorales.

Lorsque les positions radiales relatives sont tracées en fonction de la longueur moyenne de chaque chromosome (Fig. 10.A), une forte corrélation positive émerge ( $R^2 = 0,8914$ ), indiquant que les petits chromosomes se localisent préférentiellement à des positions plus proches du centre du noyau tandis que les grands chromosomes sont plus souvent situés proche de la périphérie. Ces résultats concordent avec les études précédentes réalisées sur des fibroblastes et renforcent notre confiance dans le fait que les cellules de villosités chorales en culture constituent un système modèle pertinent. Cette corrélation a été conservée entre les noyaux disomiques ( $R^2 = 0,8627$ ) et trisomiques ( $R^2 =$

0,7738), ce qui suggère que la copie supplémentaire du chromosome 21 n'a pas modifié la corrélation (Fig. 10.B, C). La régression linéaire (Fig. 10.D) montre qu'il existe une faible corrélation négative entre la densité génique et la position nucléaire des chromosomes sélectionnés ( $R^2 = 0,2887$ ). Ces résultats indiquent que les chromosomes riches en gènes se situent préférentiellement à l'intérieur du noyau tandis que les chromosomes pauvres en gènes se trouvent à la périphérie des noyaux des cellules de villosités chorales. En comparant les noyaux disomiques et trisomiques 21, la relation entre la densité génique et la position nucléaire des chromosomes a été conservée ( $R^2 = 0,257$  dans les noyaux disomiques et  $R^2 = 0,207$  dans les noyaux trisomiques 21) (Fig. 10.E, F).

Pris ensemble, nos résultats de FISH-3D indiquent que les corrélations entre la taille des chromosomes ou la densité génique et la position radiale des TC ne sont pas altérées par un chromosome 21 supplémentaire.

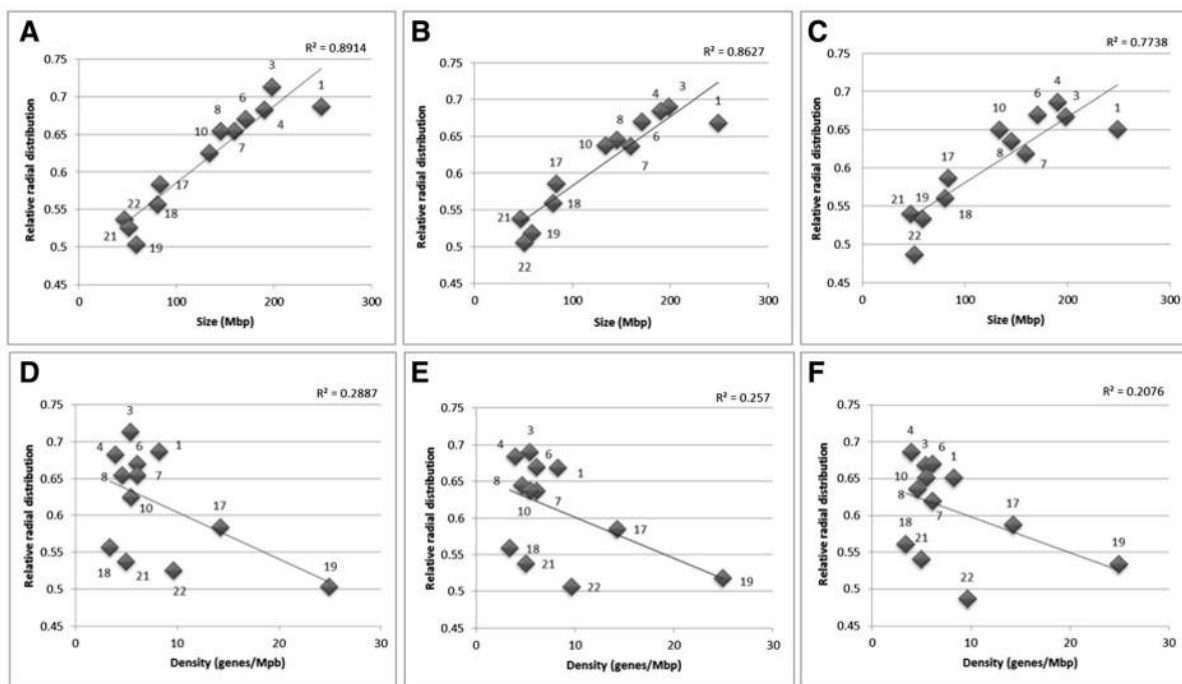


Figure 10 : Position radiale des territoires chromosomiques étudiés en fonction de la taille des chromosomes et de la densité des gènes. La position radiale relative de chaque territoire est représentée en fonction de la taille des chromosomes exprimée en Mbp pour **A** tous les noyaux, **B** les noyaux des cellules de villosités chorales disomiques et **C** les noyaux des cellules de villosités chorales T21. La distribution radiale relative en fonction de la densité en gènes exprimée en gènes/Mbp pour **D** tous les noyaux, **E** les noyaux des cellules de villosités chorales disomiques et **F** les noyaux des cellules de villosités chorales T21. Les coefficients de corrélation  $R^2$  sont donnés pour chaque graphique. Les relations entre les variables quantitatives ont été étudiées à l'aide de coefficients de corrélation (Pearson ou Spearman selon la distribution statistique).

**d) Le volume de territoires chromosomiques est modifié par une copie supplémentaire du chromosome 21 dans les noyaux des cellules de villosités chorales**

Nous avons évalué le volume du noyau des cellules trisomiques et disomiques afin de déterminer si la taille du noyau pouvait être affectée par la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Les volumes nucléaires des cellules T21 ( $710,5 \pm 304,1 \mu\text{m}^3$ ,  $n = 674$ ) et des cellules disomiques ( $734,8 \pm 282,3 \mu\text{m}^3$ ,  $n = 533$ ) n'étaient pas significativement différents entre les deux types de noyaux ( $p = 0,90$ ). Ainsi, un chromosome 21 supplémentaire qui représente environ 1 % de l'ensemble du génome humain n'affecte pas significativement le volume nucléaire des cellules T21. Nous nous sommes également intéressés à l'impact d'un chromosome 21 surnuméraire sur le volume des territoires chromosomiques. Le volume de chaque TC a été normalisé par rapport au volume du noyau correspondant avant d'étudier les relations entre les volumes des TC et la longueur des chromosomes ou leur densité en gènes.

Nous avons observé que les volumes des TC1 et TC17 étaient significativement plus petits dans les noyaux T21 (Fig. 11).

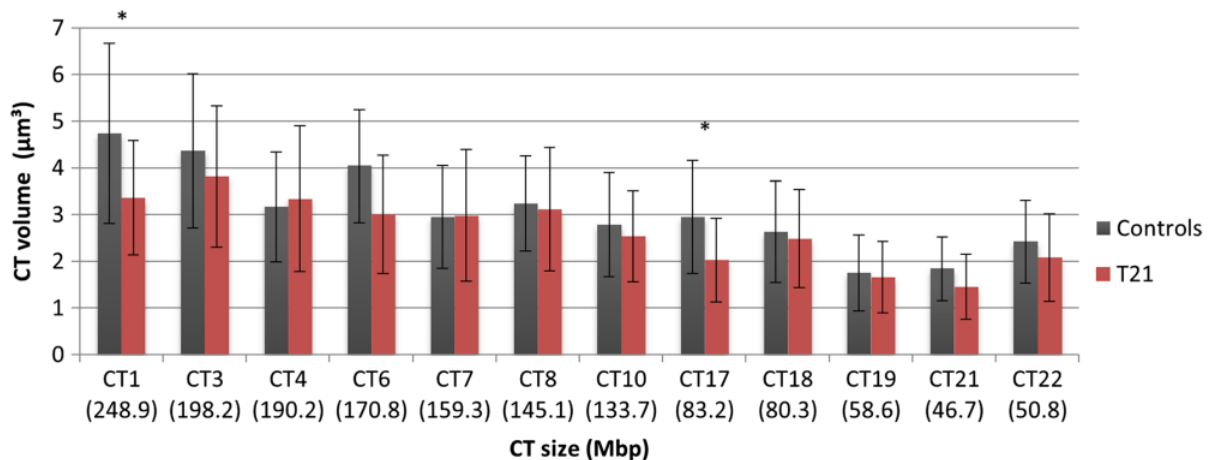


Figure 11 : Comparaison du volume des territoires chromosomiques entre les noyaux des cellules de villosités chorales témoins et T21. Les chromosomes ont été classés de gauche à droite en fonction de leur taille exprimée en Mbp (entre parenthèses) du plus grand (à gauche) au plus petit (à droite). Les graphiques à barres représentent le volume normalisé de chaque TC dans les cellules de villosités chorales témoins (gris foncé) et dans les cellules de villosités chorales T21 (rouge). Les TC1 ( $n = 83$  et  $n = 115$  noyaux dans les cellules disomiques et trisomiques respectivement,  $p = 0,002$ ) et TC17 ( $n = 81$  et  $n = 112$  noyaux dans les cellules disomiques et trisomiques respectivement,  $p = 0,04$ ) sont significativement plus petits dans les cellules T21.

Nous avons également observé une forte corrélation positive entre la longueur des chromosomes et le volume TC moyen ( $R^2 = 0,871$ ) avec un coefficient de corrélation très similaire dans les deux types de noyaux ( $R^2 = 0,7995$  dans les noyaux disomiques et  $R^2 = 0,8292$  dans les noyaux T21) (Fig. 12.A). En revanche, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les volumes TC moyens et la densité en gènes ( $R^2 = 0,04$ ), que les noyaux soient disomiques ou trisomiques (Fig. 12.B).

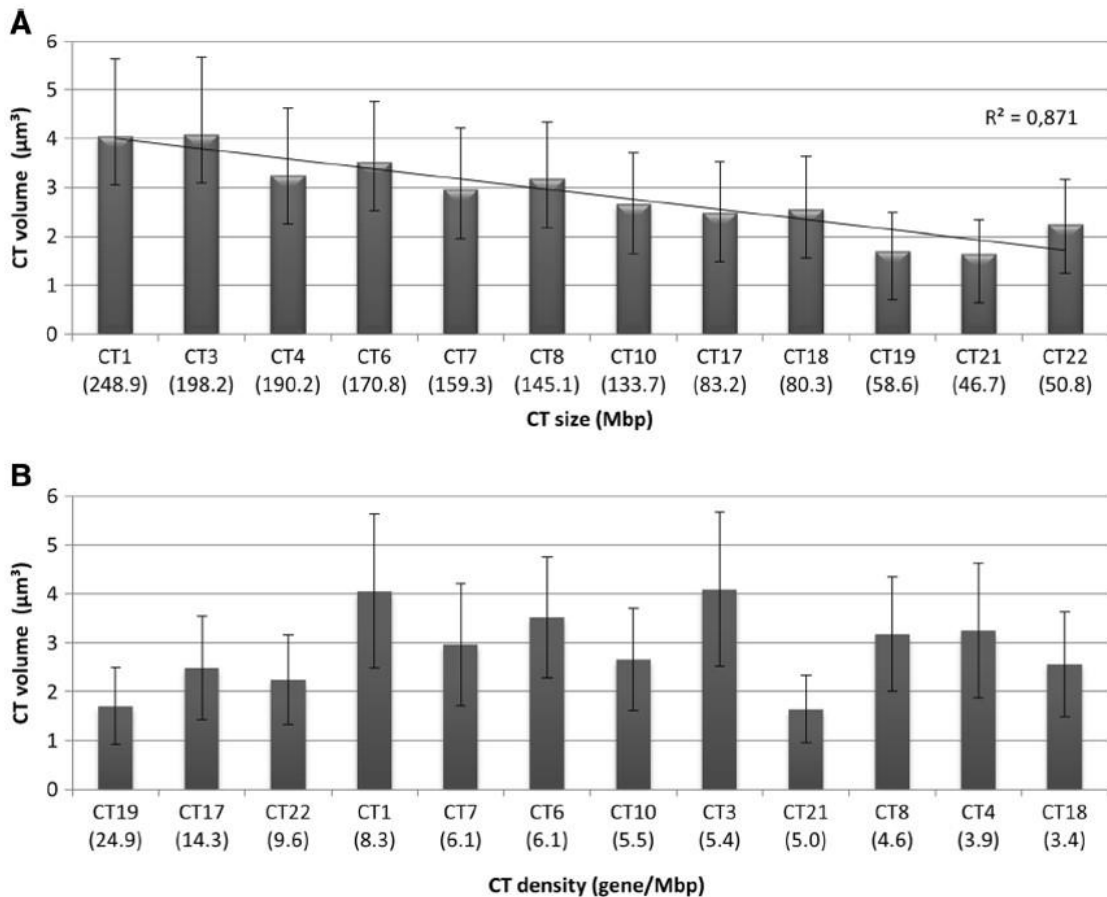


Figure 12 : Volume des territoires chromosomiques en fonction de la taille et de la densité en gènes des chromosomes. **A** : Les chromosomes ont été classés de gauche à droite en fonction de leur taille exprimée en Mbp (entre parenthèses) du plus grand (à gauche) au plus petit (à droite). **B** : Les chromosomes ont été classés de gauche à droite en fonction de leur densité en gènes (gène/Mbp), du chromosome le plus riche au chromosome le plus pauvre en gènes. Les graphiques à barres représentent le volume normalisé moyen de chaque TC (noyaux de cellules de villosités chorales disomiques et T21). Les barres d'erreur représentent la déviation standard.  $R^2$  : coefficient de corrélation entre la taille du chromosome et le volume Cdu TC. Les relations entre les variables quantitatives ont été étudiées à l'aide de coefficients de corrélation (Pearson ou Spearman selon la distribution statistique).

De nombreuses études ont évalué l'organisation et le positionnement de territoires chromosomiques entiers dans le noyau cellulaire, mais très peu ont abordé cette question dans les cellules aneuploïdes qui représentent un modèle naturel et simple de déséquilibre du contenu chromosomique. Ici, nous avons utilisé des cellules en culture dérivées de villosités chorales du placenta en début de gestation de grossesses trisomiques 21 pour étudier l'effet d'un chromosome surnuméraire sur l'organisation des territoires chromosomiques.

Les cellules cultivées à partir des villosités chorales proviennent du mésenchyme extraembryonnaire et présentent *in vitro* une apparence de type fibroblaste, un cytoplasme abondant et un gros noyau. La microscopie électronique à transmission a confirmé la présence d'un cytoplasme étendu et ramifié entourant un noyau large et allongé et a également permis d'observer un froissement de la membrane, une caractéristique du processus de locomotion des fibroblastes et des cellules de type fibroblaste.

Des analyses morphométriques des noyaux de cellules de villosités chorales cultivées ont été réalisées pour comparaison avec les noyaux de lymphocytes et de fibroblastes cultivés qui ont servi à la plupart des études de distribution des TC. Les paramètres de sphéricité, d'élongation et de planéité ont été déterminés pour les noyaux diploïdes et trisomiques 21 et pour les noyaux des lymphocytes et des fibroblastes. Sans surprise, les trois paramètres de forme des noyaux des lymphocytes étaient sensiblement différents de ceux des noyaux des fibroblastes et des cellules de villosités chorales, les lymphocytes présentant les noyaux les plus sphériques et les moins plats et allongés. La sphéricité, l'élongation et la planéité des noyaux des cellules de villosités chorales étaient pratiquement les mêmes que pour les noyaux des fibroblastes, ce qui suggère que les cellules des villosités chorales ont des noyaux plats-ellipsoïdaux. Il convient de noter que la présence d'un chromosome 21 surnuméraire n'a eu aucune répercussion sur le volume et la forme du noyau, ni sur l'ultrastructure cellulaire. Nos résultats sont en accord avec les résultats de Hervé et al. (2016) qui ont montré un volume nucléaire similaire entre les cellules trisomiques 18, ou trisomiques 21, et les cellules disomiques<sup>41</sup>. L'absence de changement dans le volume nucléaire pour les cellules avec trisomie 21 est cohérente avec l'observation que le contenu en ADN contribue très peu à la régulation de la taille du noyau<sup>43</sup>, bien que dans notre cas, la copie supplémentaire du chromosome 21 ne représente que 1 % de la taille totale du génome.

Des études de microscopie optique ont montré que les chromosomes à faible densité génique ont tendance à se localiser vers la périphérie nucléaire tandis que les chromosomes à forte densité génique occupent une position plus centrale dans les noyaux sphériques<sup>30,44</sup>. Dans les noyaux ellipsoïdes plats humains, les territoires chromosomiques semblent s'organiser en fonction de la taille des chromosomes plutôt que de leur densité en gènes<sup>35</sup>. Notre étude de FISH 3D a montré que le positionnement des TC dans les noyaux de cellules de villosités chorales en culture est corrélé à la taille des chromosomes plutôt qu'à la densité en gènes. Nos résultats sont en plein accord avec les

conclusions de Bolzer et al. (2005) montrant que la position radiale non aléatoire des TC est corrélée à la taille des chromosomes dans les fibroblastes, confirmant la pertinence de notre système de cellules en culture et la précision de nos procédures analytiques. Néanmoins, nos résultats montrent que la corrélation de la position radiale des TC avec la taille et la densité génique coexiste dans les noyaux ellipsoïdaux plats des cellules de villosités chorales humaines. La forte corrélation positive entre la position des TC et la taille du chromosome et la faible corrélation négative entre la position des TC et la densité génique que nous avons observées pourraient refléter la coexistence de cellules cycliques et quiescentes dans les cultures cellulaires primaires utilisées pour la FISH 3D. En effet, une disposition des TC radiale corrélée à la densité génique a été rapportée dans les fibroblastes cycliques humains<sup>30</sup> tandis que des dispositions radiales corrélées à la taille des chromosomes ont été observées dans les fibroblastes quiescents<sup>31,35</sup>. La forte corrélation entre la position radiale du TC et la taille du chromosome et la faible corrélation entre la position radiale du TC et la densité génique n'étaient pas altérées dans les noyaux trisomiques 21, ce qui suggère que les caractéristiques globales qui régissent les arrangements de chromatine d'ordre supérieur ne sont pas perturbées en présence d'un chromosome 21 supplémentaire.

Notre étude était la première à analyser le positionnement du TC pour 12 chromosomes, représentatifs de 51 % du génome, dans des cellules de villosités chorales de trisomie 21 en culture. Les TC des chromosomes 1 et 3 ont montré une position significativement plus périphérique mais nous n'avons observé aucun changement dans la position des territoires chromosomiques 21. Hervé et al. (2016) ont trouvé aucun changement dans l'arrangement orbital des TC 21 dans les amniocytes et les cellules des villosités chorales en culture<sup>41</sup>. Le chromosome 21 appartient à la famille des chromosomes acrocentriques qui coopèrent ensemble pour former des nucléoles. Il a été montré que l'arrangement orbital des TC 21 s'écarte d'un arrangement aléatoire, forcé par la contrainte des nucléoles de maintenir une position médiane<sup>32</sup>. Il est tentant de spéculer que l'association des chromosomes abritant des régions organisatrices nucléolaires (NOR) aux nucléoles peut représenter une contrainte fonctionnelle ou physique qui explique l'absence de relocalisation de ces TC dans l'espace nucléaire. Malgré l'absence de relocalisation significative des TC 21, nous avons observé que deux TC 21 se localisaient fréquemment à proximité l'un de l'autre et à distance du troisième. Nos résultats corroborent les conclusions de Paz et al. (2013), mais les mécanismes à l'origine d'un modèle de distribution particulier restent à élucider<sup>45</sup>.

La relocalisation de territoires de chromosomes diploïdes a été observée dans des lignées cellulaires tumorales avec un caryotype altéré, y compris en cas de translocations chromosomiques, que le chromosome relocalisé soit impliqué ou non dans l'événement de translocation<sup>40,46</sup>. Par exemple, les territoires du chromosome 17 se déplacent vers une position plus périphérique dans les noyaux des cellules lymphoblastoïdes équilibrées  $t(11;22)$ <sup>40</sup>. Il est intéressant de noter que la relocalisation de TC

a également été observée dans une lignée cellulaire cancéreuse avec un caryotype presque normal<sup>46</sup>. Notre étude souligne qu'un TC 21 supplémentaire a le potentiel de modifier la position d'autres TC, mais les mécanismes qui déterminent quels territoires se déplaceront et vers quelle direction doivent être abordés en utilisant un grand nombre de types de cellules de trisomie 21 (ou de cellules aneuploïdes en général).

Chez les patients atteints du syndrome de Down, une dérégulation globale a été observée pendant la période postnatale dans les lymphocytes<sup>25</sup> et le tissu cérébral<sup>14,21</sup> et pendant la période foetale dans les amniocytes<sup>12,20,21</sup>, les cellules des villosités choriales<sup>20,22</sup>, les fibroblastes<sup>23</sup>, le tissu cardiaque<sup>23,24</sup> et le tissu cérébral<sup>21</sup>. Nous supposons que le chromosome 21 surnuméraire pourrait être associé à la dérégulation globale du transcriptome par relocalisation de TC et relocalisation de gènes au sein des TC qui ne modifient pas leur position radiale apparente. Paz et al. (2015) ont trouvé une différence dans la position 3D relative des gènes *DYRK1A* et *SOD1*, tous deux localisés sur le chromosome 21, au sein du même noyau trisomique 21, et cette distribution distincte était associée à des différences dans les niveaux d'expression de ces gènes<sup>47</sup>. Dans le noyau en interphase, le génome forme des interactions étendues, à courte ou longue portée, de boucles de chromatine au sein et entre les chromosomes<sup>48</sup>. La relocalisation de chromosomes ou de gènes dans les noyaux des cellules des porteurs de trisomie 21 peut perturber ou créer de nouvelles interactions *cis* et *trans* entre les gènes co-régulés ou les gènes initialement régulés de manière indépendante, respectivement. Cependant, la question de savoir si l'architecture spatiale nucléaire dicte ou dépend de la fonction du génome reste entièrement ouverte.

En plus des TC relocalisés, nous avons observé une compaction accrue de deux TC (chromosomes 1 et 17) dans les noyaux T21. Le volume des TC n'a pas forcément fait l'objet d'études approfondies dans les travaux visant à mieux comprendre l'organisation nucléaire des TC. Des observations antérieures ont décrit un territoire X-inactif de type sphérique compacté par opposition à un territoire X-actif plat et étendu<sup>49,50,51,52</sup>. En utilisant les cellules souches comme système modèle *in vitro* d'adipogenèse, Szczerbal et al. (2009) ont découvert que les TC étaient plus décondensés et environ deux fois plus grands dans les cellules souches que dans les cellules différenciées<sup>53</sup>. D'autres expériences sont nécessaires pour évaluer si une modification de l'expression génique est corrélée avec la compaction des TC1 et TC17 dans le noyau des cellules de villosités choriales T21.

Notre analyse de FISH 3D de 12 paires de territoires chromosomiques dans le noyau de cellules de villosités choriales morphologiquement préservé montre que, bien qu'un chromosome 21 supplémentaire n'ait pas d'impact sur l'organisation globale des TC dans le noyau en interphase, il pourrait entraîner la compaction de TC et le déplacement de TC de leur position nucléaire habituelle. Cette réorganisation génomique 3D dans les cellules T21 justifie des recherches plus poussées non seulement chez l'homme mais aussi dans les cellules de modèles murins afin d'établir un lien avec la pathogénèse du syndrome de Down.

## 4.3.2.2 Impacts *in vitro* d'une Matrice extracellulaire de type trisomie 21 sur le comportement de cellules tumorales mammaires

### 4.3.2.2.1 Contexte

#### a) Profil tumoral atypique des patients porteurs d'un syndrome de Down

De multiples études menées dans différentes populations ethno-géographiques ont montré que l'incidence de la plupart des tumeurs est nettement inférieure chez les personnes avec un syndrome de Down par rapport aux individus de la population générale (euploïdes sur le plan génétique) du même âge, à l'exception de la leucémie infantile et des cancers des cellules germinales, qui sont plus fréquents chez les personnes avec une trisomie 21. Le paradoxe frappant de ces observations épidémiologiques est que — sur la base de notre compréhension de la tumorigenèse — la situation devrait être tout à fait inverse, c'est-à-dire que le syndrome de Down devrait être une maladie avec un risque élevé de développer un cancer.

En effet, les cellules des individus avec un syndrome de Down présentent des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des dommages accrus à l'ADN et des mécanismes de réparation de l'ADN hypofonctionnels, une instabilité chromosomique accrue, des mitochondries dysfonctionnelles, une surdose constitutionnelle de plusieurs oncogènes connus et une atténuation de suppresseurs de tumeurs connus. Enfin, les personnes avec un syndrome de Down ont un système immunitaire fragilisé et sont sensibles aux infections (pour une revue se référer à Nižetić et al.<sup>54</sup>). Comme la plupart de ces caractéristiques sont prônes au développement d'un cancer, comprendre les mécanismes faisant obstacle à l'apparition et progression du cancer dans ces conditions pourrait potentiellement aider à identifier des pistes de prévention et thérapeutiques.

Le syndrome d'Edward (ou Trisomie 18), le syndrome de Klinefelter (47, XXY) et le syndrome de Turner (45,XO) sont tous associés à une plus grande susceptibilité à développer un cancer solide. La seule exception est le cancer du sein dans le syndrome de Turner, mais cela pourrait être dû au sous-développement de l'axe gonadique et de la stimulation œstrogénique. Par ailleurs, contrairement au syndrome de Down, les individus avec un syndrome d'Edward ont une incidence plus élevée de tumeurs de Wilms<sup>55</sup>, les individus avec un syndrome de Turner développent davantage de neuroblastomes, de tumeurs du système nerveux central chez l'enfant, de mélanomes et de cancers de la peau, de la vessie, de l'urètre et de l'utérus<sup>56</sup>, et les individus atteints du syndrome de Klinefelter développent plus de cancers du poumon et de cancers du sein que dans la population de personnes à caryotype euploïde<sup>57</sup>.

Le cancer du sein n'est pas moins fréquent dans le groupe global des femmes ayant une déficience intellectuelle que dans la population générale<sup>58</sup> pourtant elles partagent les mêmes facteurs de risque que les femmes avec syndrome de Down, à savoir le surpoids et l'obésité, le manque d'activité physique, l'absence de grossesse et d'allaitement.

#### a-1) Certains cancers ont une incidence élevée dans la trisomie 21

Les enfants avec un syndrome de Down ont une incidence globale de leucémies environ 10 à 50 fois plus élevée que les enfants de la population générale, y compris la plupart des types de leucémie myéloïde aiguë et de leucémie lymphoïde aiguë<sup>59-61</sup>. Ce risque accru ne s'étend pas aux leucémies ou autres hémopathies malignes apparaissant généralement à l'âge adulte<sup>59,62</sup>. La leucémie mégacaryoblastique aiguë, qui est précédée d'un trouble myéloprolifératif transitoire, a une incidence 500 fois plus élevée que celle des enfants de la population générale<sup>63</sup>.

Les tumeurs des cellules germinales ont également une incidence augmentée chez les personnes avec un syndrome de Down. Bien que rares dans la population générale, plusieurs cas de tumeurs de l'ovaire, en particulier des dysgerminomes, ont été rapportés chez des femmes avec un syndrome de Down<sup>64</sup>. Plusieurs cas de tumeurs germinales extragonadiques, principalement intra-crâniennes, ont également été rapportés<sup>65</sup>. Les tumeurs des cellules germinales testiculaires ont une incidence et une mortalité considérablement accrues, allant de 2 à 12 fois, par rapport aux hommes de la population générale du même âge<sup>59,62,66-74</sup>. Bien que la cryptorchidie soit plus fréquente dans le syndrome de Down, elle ne peut à elle seule expliquer le risque accru des tumeurs des cellules germinales testiculaires, puisque seulement 17 % des tumeurs testiculaires dans le syndrome de Down sont associées à une cryptorchidie<sup>72</sup>. De façon intéressante, 63 à 90 % des cancers des testicules dans la population générale présentent un gain du chromosome 21<sup>69</sup>, suggérant que le chromosome 21 surnuméraire pourrait être impliqué dans le risque accru de cancers testiculaires observé dans le syndrome de Down.

#### a-2) La plupart des tumeurs solides ont une incidence faible dans la trisomie 21

Certains cancers pédiatriques apparaissent avec une fréquence beaucoup plus faible que celle qui est observée dans la population générale du même âge comme les neuroblastomes, les tumeurs du système nerveux central et la tumeur de Wilms<sup>67,75</sup>.

Parmi les tumeurs solides ayant une très faible incidence chez les personnes avec un syndrome de Down, certaines comme le médulloblastome, le cancer de la prostate et le cancer du sein ne sont observées qu'exceptionnellement<sup>59,74,76,77</sup>. Par exemple, aucun cas de cancer de la prostate n'a été

trouvé dans deux études épidémiologiques incluant respectivement 1 928<sup>74</sup> et 1 888<sup>70</sup> hommes avec un syndrome de Down et le rapport de probabilité de mourir par cancer du sein chez les femmes avec un syndrome de Down a été estimé à 0,04<sup>62</sup>.

De nombreuses études épidémiologiques soulignent le fait que la plupart des types de tumeur solide ont une incidence<sup>59,67,70,78</sup> et une mortalité<sup>62,80</sup> réduites chez les personnes avec un syndrome de Down, à l'exception du cancer des testicules. Les données sont contradictoires concernant l'incidence relative d'autres cancers génitaux masculins (principalement du pénis) et des cancers de l'estomac.

### a-3) Faible risque de cancer du sein chez les femmes avec un syndrome de Down

Le cancer du sein, qui est au premier rang des cancers féminins par son incidence et la mortalité qu'il entraîne, est étonnamment rare dans la trisomie 21. Dès 1975, Oster et al. (1975) notaient la rareté des cancers mammaires chez ces patientes<sup>81</sup>. Scholl et al. (1976), en analysant les causes de décès dans la trisomie 21 pour l'année 1976 aux États-Unis, ne recensaient qu'un seul décès par tumeur mammaire alors que 11,65 étaient attendus<sup>80</sup>.

Dans une étude danoise portant sur l'incidence du cancer dans la trisomie 21, Hasle et al. (2000) n'avaient pas recensé de cancer du sein alors que 7,32 cas étaient attendus<sup>59</sup>. Une autre étude d'incidence du cancer a été réalisée chez les personnes atteintes du syndrome de Down en Israël au cours de la période 1948-1995. Dans cette étude, le cancer du sein chez les femmes avec syndrome de Down a été observé à un taux inférieur aux prévisions (1 cas contre 2,60 attendus, rapport d'incidence standardisé (SIR) = 0,38, IC 95 % 0,01-2,10)<sup>78</sup>. Le même type d'étude réalisée en Suède et au Danemark a montré un SIR pour le cancer du sein de 0,5 (IC 95 % 0,1-1,4)<sup>69</sup>.

Une cohorte finlandaise de 3 581 personnes atteintes d'un syndrome de Down a été identifiée à partir d'un registre national de personnes atteintes de déficience intellectuelle et suivies pour l'incidence des cancers (jusqu'en 2002). Le SIR pour le cancer du sein était significativement faible (SIR 0,4, IC 95 % 0,1-0,8)<sup>70</sup>.

En France, une enquête portant sur le risque de décès par cancer du sein chez les femmes avec un syndrome Down a été réalisée en utilisant les fichiers de décès par cancer de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) sur l'ensemble de la population française féminine vivant en métropole pour une période de 24 années consécutives (1971 à 1994). Au cours de cette période, 90 231 décès par cancer du sein ont été enregistrés dans la population féminine âgée de moins de 65 ans, résidant en France métropolitaine. Dans l'hypothèse de l'égalité des risques, 68,98 décès par cancer du sein étaient attendus dans le groupe des femmes avec trisomie 21 (test de Fisher ;  $p < 0,001$ ). L'enregistrement observé pour cette période était de 5 décès par cancer mammaire pour les patientes avec trisomie 21. Ainsi sur cette période, le risque de décéder par cancer du sein pour une femme avec

trisomie 21 était environ 14 fois plus faible que pour une femme de la population générale. Cette enquête avait trouvé un total de 137 décès par cancers, tumeurs solides et leucémies confondues, avant l'âge de 65 ans pour les femmes avec une trisomie 21. Les tumeurs mammaires ne représentaient que 3,6 % des décès par cancer pour les femmes avec trisomie 21 alors qu'elles représentaient 19 % des décès par cancer dans la population générale française sur cette période<sup>82</sup>. Cette étude de mortalité retrouvait l'excès classique de leucémies observé dans la trisomie 21, suggérant que la rareté des décès par cancer du sein dans cette étude n'était pas liée à une sous-représentation de l'ensemble des cancers mais concernait de façon plus spécifique les glandes mammaires. Un type d'étude similaire mené aux États-Unis a abouti à des résultats comparables, avec un seul décès par cancer du sein enregistré alors que 11,65 étaient attendus<sup>80</sup>.

Plus récemment, Chicoine et al. (2015) ont examiné les rapports de mammographie de femmes atteintes du syndrome de Down et suivies dans le plus grand établissement médical dédié spécifiquement aux adultes atteints de ce syndrome aux États-Unis. L'examen des dossiers de 684 femmes et des résultats de 993 mammographies, dont 902 mammographies de dépistage et 93 mammographies de diagnostic, a montré que seules 2 femmes (0,7 %) avaient reçu un diagnostic de cancer du sein ; il s'agissait d'un phyllode mammaire pour l'une et d'un adénocarcinome canalaire *in situ* pour la seconde<sup>83</sup>.

Cet ensemble de données permet de conclure que les femmes porteuses d'une trisomie 21 ont un risque très nettement abaissé, au moins dix fois moindre, de développer et de décéder d'un cancer mammaire, et ceci pour une raison actuellement inconnue.

Quelques rares cas de cancer du sein chez une femme atteinte d'un syndrome de Down ont quand même été rapportés dans la littérature.

Dans une communication tenue lors du congrès international « World Down Syndrome » de 2012, le Pr Satgé a rapporté que parmi cinq femmes avec un syndrome de Down et un cancer du sein, trois d'entre elles présentaient une histoire familiale de cancer du sein ou un facteur génétique de prédisposition (neurofibromatose de type I)<sup>84</sup>. Il en serait de même (histoire familiale de cancer du sein) pour la patiente décrite dans le papier de Bernardino et al. (1997)<sup>86</sup>.

En 2023, une nouvelle publication rapporte le cas d'une femme atteinte d'un syndrome de Down avec un diagnostic pathologique final de carcinome canalaire invasif (T2, pN1, M0, stade IIB), positif pour les récepteurs des œstrogènes, négatif pour les récepteurs de la progestérone et négatif pour les récepteurs HER2. De façon intéressante, cette patiente était également porteuse d'un variant pathogène dans le gène *BRCA2*<sup>87</sup>. Ces quelques données pourraient suggérer qu'en présence d'un facteur génétique de prédisposition, l'effet protecteur conféré par la présence d'un chromosome 21 surnuméraire pourrait ne plus avoir lieu mais cette conclusion est purement spéculative devant le très faible nombre de cas rapportés. Un seul et unique cas de cancer du sein triple négatif chez une patiente

de 25 ans atteinte du syndrome de Down a été publié à ce jour<sup>88</sup>, et un des derniers cas publiés rapporte une jeune femme Africaine atteinte du syndrome de Down, âgée de 26 ans, présentant un carcinome canalaire infiltrant de grade 2 et de sous-type moléculaire luminal B (HER2-positif)<sup>89</sup>.

La faible incidence du cancer du sein dans la population de patientes atteintes d'un syndrome de Down pourrait être attribuée en partie, d'une part, à une espérance de vie plus faible de ces patientes et d'autre part, à une sous-utilisation des offres de dépistage. L'espérance de vie des personnes atteintes de syndrome de Down est passée de seulement 12 ans dans les années 1940<sup>90</sup> à une moyenne d'environ 60 ans dans les populations actuelles des pays développés, avec certains patients pouvant vivre jusqu'à 80 ans<sup>91-94</sup>. Aujourd'hui, l'âge médian au moment du diagnostic d'un cancer du sein est de 64 ans dans la population générale, ce qui fait que ce facteur ne peut à lui seul expliquer la faible incidence de ce cancer dans la population de personnes atteintes d'un syndrome de Down. Si des études concluent effectivement à des disparités dans les taux de dépistage du cancer du sein entre les adultes avec et sans déficience intellectuelle<sup>95,96</sup>, il n'y a pas de données objectives dans la littérature montrant que la population de patientes avec trisomie 21 a un recours moindre aux programmes de dépistage du cancer du sein.

## b) Trisomie 21 et cancer du sein : facteurs de risque et facteurs protecteurs

### b-1) Les facteurs de risque exogènes

Les personnes avec un syndrome Down devraient théoriquement présenter un risque accru de développer un cancer secondairement à la présence d'une forte instabilité chromosomique, d'une augmentation des dommages à l'ADN, d'un système de réparation de l'ADN défectueux, de niveaux cellulaires élevés de radicaux libres, d'un dysfonctionnement mitochondrial, d'un excès constitutionnel de certains oncogènes et d'une altération du système immunitaire<sup>54</sup>.

L'ingestion calorique globale non excessive, mais non compensée par une dépense énergétique suffisante du fait d'un métabolisme de repos à un niveau bas et d'une activité physique réduite chez les personnes avec un syndrome de Down<sup>97</sup>, pourrait favoriser la carcinogenèse mammaire<sup>98</sup>. La consommation réduite de fruits et légumes, constatée chez les personnes avec un syndrome de Down<sup>99</sup> pourrait également être prise en compte dans les facteurs de risque exogènes au cancer du sein de cette population de patients<sup>100</sup>. Par ailleurs, l'excès de radiographies thoraciques auxquelles sont exposés les enfants et adolescentes avec trisomie 21 parce qu'elles ont une sensibilité particulière aux infections respiratoires<sup>101</sup> est un autre facteur de risque de cancers mammaires<sup>102</sup>.

## b-2) Les facteurs exogènes protecteurs

La très faible consommation de tabac et d'alcool des patients atteints d'un syndrome de Down, ainsi qu'une exposition réduite aux œstrogènes des femmes avec une trisomie 21 tout au long de leur vie pourraient en revanche constituer des facteurs protecteurs vis-à-vis du développement d'un cancer du sein.

Au cours des dernières décennies, la relation entre cancer du sein et l'environnement intra-utérin a fait l'objet de nombreuses recherches, formant l'hypothèse selon laquelle le cancer du sein pourrait, dans une certaine mesure, prendre naissance *in utero*<sup>103,104,105</sup>. En effet, il a été observé que l'exposition à des niveaux élevés d'œstrogènes endogènes *in utero* était associée à un risque accru de cancer du sein<sup>106-109</sup>. Néanmoins, devant la difficulté d'obtenir les mesures d'œstrogènes maternels pendant la grossesse pour les femmes qui ont déjà développé un cancer du sein à l'âge adulte, certains indicateurs d'une exposition élevée aux œstrogènes, comme le poids de naissance qui est positivement corrélé aux concentrations d'œstrogènes pendant la grossesse, ont fait l'objet d'études intensives dans la littérature. Ainsi, une corrélation positive entre le poids à la naissance des femmes et le risque de cancer du sein a été mise en évidence dans de nombreuses cohortes<sup>110-114</sup>. Cette association serait néanmoins non linéaire et les femmes nées avec un poids faible (< 2,5kg) ou élevé (> 4kg) courraient un risque plus élevé de développer un cancer du sein à l'âge adulte<sup>115</sup>. Dans ce contexte, on peut noter que les nouveau-nés avec un syndrome de Down présentent généralement un petit poids de naissance<sup>116-119</sup> et que le taux sérique maternel en œstriol non conjugué (uE3) est généralement abaissé lors des gestations de fœtus trisomiques 21<sup>120</sup>. L'exposition réduite aux œstrogènes se poursuit également au cours de la vie de la femme atteinte d'un syndrome de Down avec un recours très réduit aux contraceptifs oraux<sup>121</sup> et aux traitements hormonaux féminins substitutifs. Lors du cycle menstruel, les taux sériques d'œstradiol sont également abaissés à toutes les phases<sup>122</sup>. Enfin, les femmes atteintes d'un syndrome de Down présentent généralement une ménopause anormalement précoce, réduisant encore leur exposition aux hormones ovariennes<sup>123</sup>. Ainsi, dès la vie utérine et tout au long de leur vie, les personnes du sexe féminin avec trisomie 21 sont exposées à des taux d'œstrogènes nettement inférieurs à ceux de la population générale.

## c) Chromosome 21 surnuméraire : hypothèses d'un effet protecteur vis-à-vis des cancers solides

Le chromosome 21, le plus petit chromosome en taille du génome humain, renferme 738 gènes, dont 233 gènes codants et 182 pseudogènes<sup>124</sup>.

Comme déjà mentionné dans ce mémoire, la présence d'un chromosome 21 surnuméraire produit une surexpression de nombreux gènes portés par ce chromosome mais aussi de gènes présents sur

des chromosomes disomiques. Parmi les gènes surexprimés dans les cellules trisomiques, certains pourraient avoir un effet positif, négatif ou neutre sur le développement tumoral. L'identification des mécanismes qui, en raison de cette situation spécifique de déséquilibre génique, protègent les personnes atteintes d'un syndrome de Down vis-à-vis du développement, non pas de toutes, mais d'un certain nombre de tumeurs solides pourrait s'avérer fondamentale pour mieux comprendre la physiopathologie tumorale et, potentiellement, identifier des gènes clés de la tumorigenèse. Cela pourrait permettre de progresser dans le développement de thérapies efficaces tant pour les personnes atteintes d'un syndrome de Down que pour celles de la population générale touchées par le cancer.

A l'issue d'une revue de la littérature, Mme Wiem Ayed, étudiante en Master 2, et moi avons publié en 2012 dans *Morphologie* des pistes de mécanismes pouvant favoriser, ou au contraire protéger, ces personnes vis-à-vis de la tumorigenèse (Ayed W et al., **Trisomie 21 et cancers [Trisomy 21 and cancers]. Morphologie. 2012 Oct;96(314-315):57-66. PMID: 23141635, cf Annexes**). Plus récemment, dix pistes de mécanismes à effet protecteur, ont été proposées<sup>125</sup> parmi lesquelles un rôle du développement neural, des gènes suppresseurs de tumeur du chromosome 21, des perturbations du métabolisme mitochondrial et du stress oxydatif, d'une apoptose accrue et d'un système de réparation à l'ADN défectueux, d'une diminution de l'angiogenèse, d'une réponse perturbée du système immunitaire, d'altérations épigénétiques, de miRNAs, du stroma et de facteurs exogènes (Fig. 13).

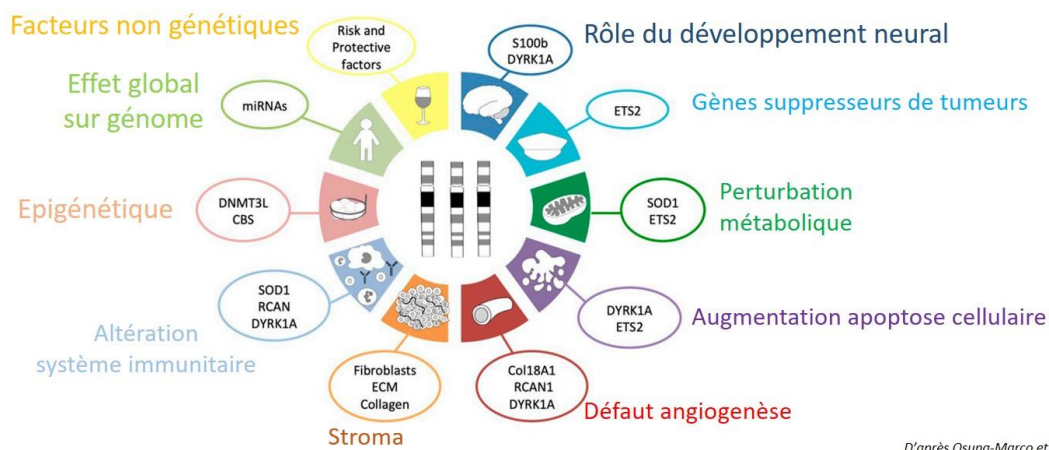


Figure 13 : Diagramme des dix pistes de mécanismes proposés, avec leurs gènes candidats quand il y en a, dans l'effet protecteur d'un chromosome 21 surnuméraire vis-à-vis des cancers solides (d'après Osuna-Marco et al. (2021)<sup>125</sup>).

Pour des raisons de concision, les différentes pistes ne sont pas toutes détaillées. J'exposerai plus particulièrement la piste que j'ai choisie d'explorer et qui est celle d'un rôle suppressif du stroma trisomique 21, plus particulièrement de la matrice extra-cellulaire, dans le cadre du cancer du sein.

Les raisons qui m'ont poussée à considérer le stroma T21 comme un facteur potentiel de protection, plus particulièrement sa composante non cellulaire, sont les suivantes :

- La tumeur maligne la plus fréquente chez les enfants et les adultes atteints du syndrome de Down est la leucémie qui est dépourvue de stroma. Les tumeurs germinales, les lymphomes, les sarcomes et les rétinoblastomes qui sont des tumeurs avec un stroma très peu développé, sont également plus fréquentes chez les sujets atteints de syndrome de Down<sup>59,80</sup>. A l'inverse, les cancers du sein, du tube digestif, de la tête et du cou, des bronches et de la peau, qui sont très rares chez les adultes avec un syndrome de Down sont des tumeurs soutenues par un stroma bien développé.<sup>59,62,126</sup>

- La matrice extracellulaire (MEC) mammaire contribue à la tumorigenèse mammaire et a des effets pléiotropes sur les programmes cellulaires, notamment l'adhérence, la polarité, la prolifération, la survie, l'invasion et la différenciation<sup>127-129</sup>. Un composant important de la MEC mammaire est le collagène fibrillaire. Une densité élevée de collagène fibrillaire est corrélée à une densité mammographique accrue chez les femmes, associée à une augmentation du risque de cancer du sein d'environ 4 à 6 fois<sup>130</sup>. En plus de l'abondance du collagène, l'organisation et la rigidité de la MEC apparaissent comme des médiateurs clés de la croissance et de l'invasion des cellules tumorales mammaires.<sup>131,132</sup>

- Des travaux expérimentaux ont montré que les glandes mammaires de souris et de rats pares étaient moins sensibles à la formation de tumeurs chimiquement induites par rapport à celles de rongeurs nullipares<sup>133</sup>. Chez l'Homme, il existe une relation inverse entre la première grossesse à terme à un âge précoce et le risque de développer un cancer du sein au cours de la vie d'une femme<sup>134</sup> qui a donné lieu à l'idée d'un « un protecteur de la grossesse ». Comme la composition protéique de la MEC mammaire change avec la grossesse<sup>135</sup>, la MEC a été suggérée comme un médiateur potentiel de la protection induite par la grossesse. Maller et al. (2013) ont étudié la fonction, la composition et l'organisation spatiale de la MEC mammaire chez les rongeurs pares. Sur le plan fonctionnel, la matrice extracellulaire des rongeurs pares a diminué la croissance tumorale *in vivo*, favorisé la formation de jonctions adhérentes et une morphologie cellulaire arrondie *in vitro*, qui sont des phénotypes compatibles avec la suppression tumorale. Les résultats de protéomique de cette étude ont montré que la teneur en collagène fibrillaire était augmentée dans les glandes mammaires des rats pares, mais que l'organisation du collagène fibrillaire, et non sa densité, était un déterminant principal de la suppression, ou de l'activation, par la MEC mammaire des programmes cellulaires associés à l'invasion des cellules tumorales<sup>136</sup>.

- Bénard et al. (2005) ont évalué l'effet d'une MEC issue de fibroblastes T21 sur la croissance d'une lignée d'adénocarcinome mammaire. Ni la co-culture *in vitro* de la lignée tumorale mammaire MDA-MB 431 avec des fibroblastes T21, ni la co-injection de cette lignée tumorale avec des fibroblastes T21 à des souris immunodéficientes n'ont abouti à l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses du sein<sup>137</sup>. En revanche, lorsque les cellules MDA-MB 431 étaient cultivées sur une MEC sécrétée par des fibroblastes trisomiques 21, la lignée cellulaire a présenté une inhibition de croissance significative de 30 % par rapport à sa croissance sur une MEC sécrétée par des fibroblastes euploïdes<sup>137</sup> (Fig. 14). Les auteurs ont également exploré l'effet de la MEC-T21 sur deux lignées cellulaires de neuroblastome (SK-N-SH et SK-N-AS), un autre cancer avec une incidence remarquablement faible dans le syndrome de Down. La densité cellulaire mesurée dès 3 jours après l'ensemencement était également réduite de 30 % pour les deux lignées cellulaires<sup>138</sup>. Ces résultats suggèrent qu'une MEC issue de fibroblastes T21 pourrait exercer un effet inhibiteur de croissance sur des cellules humaines malignes indépendamment des cellules du stroma trisomique 21.

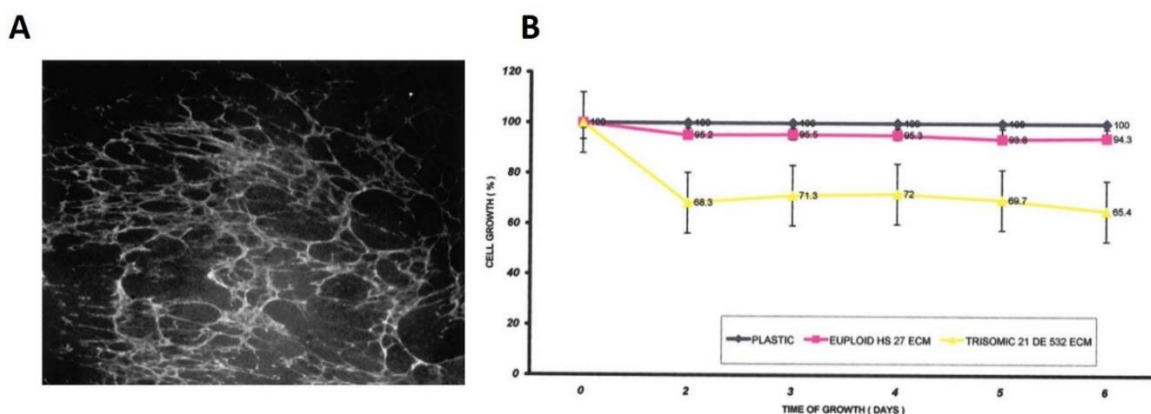


Figure 14 : Croissance de la lignée d'adénocarcinome mammaire MDA-MB 431 sur une MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes trisomique 21. **A** : Immunofluorescence anti-vimentine appliquée à une MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes T21. **B** : Inhibition de croissance de la lignée MDA-MB 431 sur une MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes T21 (Bénard et al. (2005)<sup>137</sup>)

- Le stroma conjonctif et les fibroblastes de personnes avec une trisomie 21 présentent des particularités par rapport à ce qui est observé dans les tissus ou cellules de personnes à caryotype euploïde. Une revue de la littérature est présentée dans le chapitre suivant.

d) Des constituants matriciels présentent une distribution et une abondance différentes dans les tissus trisomiques 21

Le syndrome de Down s'accompagne en période anté-natale par une hyperclarté nucale observable à l'échographie du premier trimestre de grossesse. Par ailleurs, 50% des patients présentent une malformation cardiaque de type communication auriculo-ventriculaire. Dans le but de mieux comprendre le rôle de la MEC dans la physiopathologie de ces affections, de nombreux auteurs ont étudié des constituants de la MEC par des approches d'immunohistochimie au sein de tissus comme la peau nucale, le cordon ombilical et le tissu cardiaque de fœtus T21, entre autres.

#### d-1) Les collagènes

##### - Le collagène de type I

Dans la peau nucale de fœtus témoins, les fibres de collagène de type I formaient un réseau dense et épais qui s'étendait depuis la membrane basale épidermique jusqu'à l'hypoderme. Dans le derme de la peau nucale trisomique 21, le réseau de fibres collagéniques de type I n'était pas aussi dense que celui de la peau des fœtus normaux ; les fibres paraissaient plus espacées<sup>139</sup>. Dans une seconde étude, la coloration du collagène de type I, d'aspect ponctué, était plus forte dans la partie supérieure du derme de la peau nucale des fœtus trisomiques 21.<sup>140</sup>

##### - Le collagène de type III

Sur les images d'immunohistochimie de Brand-Sabari et al., (1994), le marquage du collagène de type III était limité au derme dans la peau nucale trisomique 21 avec une distribution et une intensité similaires à celles observées dans la peau des fœtus normaux<sup>139</sup>. Sur les images d'immunohistochimie de Von Kaisenberg et al., (1998), le marquage du collagène de type III de la peau nucale de fœtus T21 montrait un marquage restreint au derme, avec une plus forte intensité dans le derme supérieur. Dans la peau des fœtus euploïdes, le derme et l'hypoderme étaient marqués pour le collagène III mais les fibres semblaient plus fines que celles du derme nucal des fœtus T21<sup>140</sup>.

##### - Le collagène de type IV

Le collagène IV (COLIV) est un constituant majeur de la membrane basale et est fortement exprimé dans les fibroblastes cutanés. Il se compose de deux chaînes alpha1(IV) (codées par *COL4A1*) qui se combinent avec une chaîne alpha2(IV) (codée par *COL4A2*) pour former la molécule en triple hélice du collagène IV.

Le collagène de type IV a été mis en évidence dans la membrane basale de l'épiderme, des vaisseaux

sanguins et des phanères de la peau nucale aussi bien chez les fœtus T21 que les fœtus contrôles. Comme attendu, seules les membranes basales étaient les plus intensément marquées. Il ne semblait pas y avoir de différence détectable dans l'intensité de coloration entre les coupes histologiques de fœtus T21 et des fœtus contrôles<sup>140</sup>.

Dans une méta-analyse regroupant 45 ensembles de données hétérogènes d'expression génique, c'est-à-dire sélectionnées à partir de plates-formes techniques différentes, de différents systèmes modèles - lignées cellulaires humaines T21 et de tissus humains T21 de nature variée (mais avec un enrichissement neuronal), modèles de souris du syndrome de Down (Ts65Dn, Ts1Cje, Tc1 et Ts + HSA21) – et de différents stades de développement, Vilardell et al. (2011) ont montré que les gènes *COL4A1* et *COL4A2* étaient systématiquement surexprimés. Cette surexpression n'avait pas été observée dans une étude transcriptomique réalisée à partir de tissu cardiaque fœtal T21<sup>24</sup>.

Mollo et al. (2022) ont évalué par analyse Western blot le niveau d'expression de COLIV dans les lysats cellulaires et les milieux de culture de fibroblastes fœtaux T21 et contrôles. Les auteurs ont détecté une quantité significativement plus élevée de protéines COLIV dans les lysats cellulaires et les milieux de culture issus des cultures trisomiques 21<sup>141</sup>.

#### - Le collagène de type V

Les images d'immunohistochimie de Brand-Sabari et al. (1994) montrent que le collagène de type V apparaît sous forme de fibres courtes formant des faisceaux dans le derme de peau nucale de fœtus contrôles tandis que celui-ci semble restreint à la partie supérieure du derme, organisé en faisceaux de fibres isolés, dans la peau de fœtus trisomiques 21<sup>139</sup>.

L'étude histologique de Von Kaisenberg et al. (1998) sur de la peau nucale de fœtus T21 et contrôles semble montrer une distribution différente de celle observée sur les coupes de Brand-Sabari et al. (1994). Dans la peau de fœtus contrôles, le collagène de type V a été détecté dans une région limitée à la partie supérieure du derme adjacente à la membrane basale tandis que dans la peau de fœtus T21, ce type de collagène était détecté dans le derme et l'hypoderme<sup>140</sup>.

#### - Le collagène de type VI

Le collagène VI (COLVI) est un composant microfibrillaire de la MEC omniprésent dans les tissus conjonctifs. COLVI est un hétérotrimère composé de trois chaînes polypeptidiques génétiquement distinctes :  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$  et  $\alpha 3(VI)$ . Les gènes *COL6A1* et *COL6A2* sont situés sur le chromosome 21, tandis que *COL6A3* est situé sur le chromosome 2<sup>142</sup>. Chaque chaîne contient une courte région triple hélicoïdale et des extensions globulaires aux extrémités N-terminale et C-terminale. Les molécules COLVI s'associent latéralement de manière antiparallèle en dimères stabilisés par des ponts disulfures<sup>143</sup>. Les dimères s'agrègent ensuite en tétramères qui sont sécrétés dans la MEC où ils se

rejoignent bout à bout pour former des microfibrilles<sup>144</sup>.

Les premières études à avoir mis en évidence l'abondance de collagène VI dans les tissus de patients T21 sont les études histologiques de Brand-Sabari et al., (1994) et Von Kaisenberg et al., (1998).

Dans la peau nucale de fœtus contrôles, la plupart du marquage anti-collagène VI était associé à la paroi vasculaire, aux follicules pileux et aux fibres nerveuses, tandis qu'un marquage plus faible mettait en évidence quelques faisceaux organisés en réseau parallèle dans le derme. Dans la peau nucale de fœtus T21, les fibres de collagène VI formaient un réseau dense, intensément coloré mais orienté de manière aléatoire, et s'étendant de la membrane basale épidermique jusqu'à l'hypoderme. De façon intéressante, une distribution similaire des fibres de collagène VI avait été observée dans la peau prélevée en haut de jambe chez les fœtus T21<sup>139</sup>.

Von Kaisenberg et al. (1998) ont décrit une abondance du marquage anti-collagène VI dans la couche supérieure du derme adjacente à la membrane basale de l'épiderme dans la peau nucale des fœtus contrôles mais également trisomiques 21. Dans la trisomie 21, cette zone s'étendait jusque vers l'hypoderme et des fibres longues et ondulées, fortement colorées, étaient abondantes dans tout le derme<sup>140</sup>. Ces auteurs ont également réalisé une étude d'hybridation *in situ* à l'aide de ribosondes dirigées contre les gènes *COL6A1* (chromosome 21) et *COL6A3* (chromosome 2) et *COL1A1* (chromosome 17, contrôle) afin d'évaluer si un effet de dosage du gène *COL6A1* présent sur le chromosome en triple exemplaire pouvait être responsable des résultats immunohistochimiques. Dans la peau nucale des fœtus T21 et contrôles, *COL6A1* et *COL6A3* étaient exprimés dans l'épiderme, les vaisseaux sanguins, les nerfs et les annexes cutanées. L'expression de *COL6A1* dans le derme des fœtus T21 était beaucoup plus étendue et plus dense que dans le derme des fœtus contrôles. La comparaison de l'expression de *COL6A3* dans la peau nucale de fœtus T21 et contrôle ne révélait pas de différences frappantes si ce n'est une expression légèrement plus étendue dans le derme des fœtus T21 pouvant être expliquée par une suspicion de réactivité croisée de la ribosonde *COL6A3* avec le gène *COL6A1* selon les auteurs. Ces données suggèrent qu'une plus grande population de fibroblastes dermiques exprimerait la chaîne  $\alpha 1$  de COLVI dans la peau nucale de fœtus T21 que dans celle de fœtus contrôles. La même équipe avait montré une expression deux fois plus élevée de *COL6A1* dans la peau nucale de fœtus T21 que dans celle des fœtus témoins par Northern blot<sup>140</sup>.

Une autre étude a également mis en évidence une surexpression du gène *COL6A1* à partir de fibroblastes cutanés issus de biopsie de peau nucale de fœtus T21 (13-15 et 19-20 semaines de gestation), et de manière intéressante, une surexpression du gène *COL6A2*, également présent sur le chromosome 21 en 21q22.3, a également été identifiée<sup>145</sup>, suggérant que la surexpression de ces deux gènes, portés par un chromosome en trois exemplaires, est toujours présente dans le tissu fœtal à un âge gestationnel plus tardif où l'hyperclarté de nuque a régressé.

De même, la surexpression des gènes *COL6A1* et *COL6A2* a également été mise en évidence dans des fibroblastes de peau de patients T21 adultes.<sup>146</sup>

De façon intéressante, la surabondance en collagène VI a également été mise en évidence dans d'autres types tissulaires T21. C'est le cas, par exemple, pour les coussinets endocardiques auriculo-ventriculaires, qui participent au cloisonnement auriculo-ventriculaire au cours du développement cardiaque, dans lesquels le collagène VI est plus abondant chez les embryons (5 semaines de gestation) et les fœtus trisomiques 21 (18 semaines de gestation). Le rôle joué par des molécules spécifiques de la matrice extracellulaire dans la différenciation normale du coussinet endocardique en valvules et septa reste à établir mais à cet égard, le collagène de type VI présente un intérêt particulier puisque les malformations cardiaques impliquant une différenciation des coussinets endocardiques du canal auriculo-ventriculaire sont les plus fréquentes dans la trisomie 21.<sup>147</sup>

Des études cliniques ont montré que le cordon ombilical de fœtus T21 avait une forme différente de celle des fœtus euploïdes<sup>148</sup>. Ces données cliniques semblent bien corrélées avec une composition biochimique altérée de la matrice extracellulaire du cordon ombilical, appelée « gelée de Wharton », qui présente une teneur plus élevée en acide hyaluronique (HA) chez les fœtus T21<sup>149</sup> (cf § glycoamynoglycane). Il a pu être montré que la gelée de Wharton et la paroi des vaisseaux artériels des cordons ombilicaux de fœtus T21 présentaient un marquage anti-COLVI plus intense que ceux de fœtus contrôles, aussi bien à un âge gestationnel précoce qu'à terme. Par une étude des transcrits *COL6A2* et *COL6A3*, les auteurs montraient que, dans les cordons ombilicaux T21, l'expression de *COL6A2* était multipliée par six et par deux à un âge gestationnel précoce et à terme, respectivement.<sup>146</sup>

#### d-2) Les glycoprotéines

##### - La fibronectine

Dans la peau nucale des fœtus trisomiques 21, la fibronectine était distribuée principalement dans le derme mais pas dans l'hypoderme contrairement à une distribution homogène de celle-ci dans ces deux couches cutanées de fœtus contrôles<sup>139</sup>. La fibronectine, en plus d'être un constituant mineur des membranes basales, a été trouvée dans le derme de la peau nucale, sous forme de filaments fins d'orientation variable, de tous les fœtus indépendamment de leur statut génétique.<sup>140</sup>

##### - La Laminine

La laminine a été détectée dans la membrane basale de l'épiderme ainsi que dans celle des annexes cutanées et des vaisseaux cutanés des fœtus euploïdes et trisomiques 21. Aucune différence d'épaisseur de la membrane basale n'a été constatée.<sup>140</sup>

### d-3) Les glycoaminoglycanes

L'acide hyaluronique (HA) a été détecté en abondance chez les fœtus trisomiques 21, dans la peau de la nuque mais aussi celle des jambes, alors qu'il était à peine présent dans la peau nucale des fœtus contrôles<sup>139</sup>.

La matrice extracellulaire du cordon ombilical est un tissu ayant l'une des teneurs les plus élevées en acide hyaluronique. Raio et al. (2005) ont observé, grâce à des analyses biochimiques et par immunohistochimie, une plus grande quantité d'acide hyaluronique dans la gelée de Wharton des cordons ombilicaux de fœtus T21 que dans celle de fœtus euploïdes. En revanche, l'intensité du marquage HA observée dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux du cordon ombilical était beaucoup moins intense dans les cordons ombilicaux T21 que les cordons euploïdes. Ces profils de distribution restaient inchangés quel que soit l'âge gestationnel auquel avaient été obtenus les échantillons de cordons (précoces ou tardifs). Par ailleurs, une expression plus élevée de *HAS2*, une des acide hyaluronique synthases impliquée dans la synthèse des chaînes d'acide hyaluronique, et une expression plus faible de *HYAL2*, une hyaluronidase qui clive les chaînes longues du polysaccharide, ont été trouvées dans la gelée de Wharton des fœtus T21 par rapport à celle des fœtus euploïdes à 14 semaines de gestation<sup>149</sup>. Ces données suggèrent que la matrice extracellulaire du cordon ombilical du syndrome de Down est affectée par une altération complexe du métabolisme de l'acide hyaluronique, impliquant non seulement sa quantité, sa distribution, mais également la régulation de son homéostasie.

Une autre étude a conforté ces résultats dans des cordons ombilicaux de fœtus T21 obtenus à 14 semaines de gestation ou à la naissance<sup>146</sup>. De plus, ces travaux ont montré un niveau accru d'HA aussi bien dans des fibroblastes cutanés T21 *in vitro* que dans le milieu de culture. Ces auteurs ont également observé une augmentation de l'expression de *HAS2* dans les fibroblastes T21 cutanés mais pas de *HYAL2*. L'inactivation de *COL6A1* et *COL6A2* dans les cellules T21 par siRNA a entraîné une régulation négative de *HAS2*, avec une diminution de l'HA sécrété lorsque le gène *COL6A2* est mis sous silence. Ces données suggèrent que la surexpression de *COL6A2* dans les tissus et les cellules T21 pourrait être étroitement liée à l'expression accrue de l'HA par une expression plus importante de *HAS2*, même si le mécanisme sous-tendant cette relation n'est pas établi.

e) De nombreux gènes en lien avec la matrice extracellulaire et les interactions cellules-matrice extracellulaire sont dérégulés positivement dans les cellules et tissus trisomiques 21

Dans le tissu cardiaque de fœtus T21 (18-22 semaines de gestation), Conti et al. (2007) ont identifié 473 gènes différentiellement exprimés de façon significative, soit négativement (278 gènes), soit positivement (195 gènes) par rapport au tissu cardiaque de fœtus non trisomiques<sup>24</sup>. L'analyse de

l'enrichissement des termes Gene Ontology (GO) issus de ces analyses d'expression montre que les catégories de termes GO (fonction moléculaire, procédé biologique, composant cellulaire) les plus enrichies étaient liées aux mitochondries pour le groupe de gènes régulés négativement, et à la matrice extracellulaire pour le groupe de gènes régulés positivement. Ce dernier groupe comprend des gènes du chromosome 21 impliqués dans le remodelage matriciel, la composition de la MEC, les jonctions cellulaires ou les interactions cellules-MEC tels que *ADAMTS1*, *ADAMTS5*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL18A1*, *JAM2*, *DDR1* et *DDR2*, ainsi que des gènes qui ne sont pas cartographiés sur le chromosome 21, tels que ceux codant la fibronectine, la fibuline, le collagène de type I, type III, type V, type XV, des métalloprotéases (MMP) et plusieurs gènes de molécules d'adhérence. La surexpression de cette famille de gènes est susceptible d'affecter les propriétés d'adhérence cellulaire, entraînant éventuellement une augmentation de l'adhésivité cellulaire, mécanisme physiopathologique supposé être à l'origine du défaut de développement des coussins endocardiques du canal auriculo-ventriculaire primitif et contribuer ainsi aux malformations cardiaques de type communication auriculo-ventriculaire, les plus fréquentes chez les patients T21<sup>150</sup>.

Donopoulos et al. (2021) ont réalisé des analyses de séquençage de l'ARN (RNA-seq) sur des échantillons de poumons fœtaux T21 et non T21<sup>151</sup>. En plus d'observer une régulation positive significative de plusieurs gènes présents sur le chromosome 21 (*COL6A1*), les poumons T21 présentaient également une dérégulation de nombreux gènes situés ailleurs dans le génome. L'analyse ontologique a montré que les gènes de la voie « MEC » étaient régulés négativement alors que ceux de la voie « interféron » étaient régulés positivement. Cette dérégulation pourrait impacter le bon développement pulmonaire et être impliquée, entre autres, dans l'hypoplasie pulmonaire (diminution de 25 % du nombre de générations de branches des voies respiratoires dans les poumons post-mortem d'individus T21) observée dans la trisomie 21<sup>152</sup>.

Sobol et al. (2019) ont établi un modèle de cellules neurales progénitrices ou différenciées, en utilisant des cellules souches pluripotentes induites (iPS), avec des profils de transcriptome comparables à ceux du développement normal du cerveau fœtal. A partir de cellules iPS T21, les cellules neuronales à ces deux stades de différenciation ont montré des signatures du transcriptome et du protéome ayant une forte dynamique temporelle, avec des voies dérégulées appartenant à 11 groupes fonctionnels majeurs. Avec la différenciation, la matrice extracellulaire est apparue comme l'un des groupes de gènes fortement perturbés. Les gènes codant des collagènes, des protéines de l'adhérence cellule-cellule et de l'interaction cellules-MEC figuraient parmi les clusters de gènes ayant montré une forte augmentation de leur expression dans les cellules neuronales T21<sup>153</sup>.

Une méta-analyse sur 45 ensembles de données transcriptomiques T21, hétérogènes en termes de provenance (humain, murin), d'origine tissulaire et de plateforme d'analyse transcriptionnelle, a montré que sur 324 gènes systématiquement régulés positivement dans les échantillons T21, 37

d'entre eux appartenait à la catégorie des termes GO « composants cellulaires liés à la MEC »<sup>154</sup>. Un enrichissement de gènes dérégulés, impliqués dans les interactions MEC-récepteurs, l'adhésion focale, les interactions MEC-intégrines, a également été rapporté dans une méta-analyse s'intéressant au tissu cardiaque T21<sup>154,155</sup>.

Guo et al. (2023) ont réalisé le séquençage de l'ARNm d'amniocytes T21 dans le but d'évaluer la relation entre les gènes dérégulés et les troubles du développement présents dans le syndrome de Down<sup>156</sup>. Les gènes différentiellement exprimés comprenaient 1 794 gènes régulés positivement et 1 411 gènes régulés négativement, principalement impliqués dans l'adhérence cellulaire, l'inflammation et la prolifération cellulaire. Une analyse sur les interactions protéine-protéine issues des gènes dérégulés positivement montrait que sept des gènes dérégulés du chromosome 21 participaient aux termes GO de l'adhérence cellulaire et du remodelage de la matrice extracellulaire (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL18A1*, *ADAMTS5*, *JAM2* et *POFUT2*)<sup>156</sup>.

En recherchant le ou les gènes du chromosome 21 susceptibles de contribuer à la (dé)régulation des gènes de la MEC observée dans les tissus T21, *RUNX1* a été identifié comme un candidat possible<sup>141</sup>. *RUNX1* appartient à la famille des gènes *RUNX* qui codent les sous-unités  $\alpha$  d'une famille de facteurs de transcription. Ces derniers entrent en jeu pour orchestrer la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire dans plusieurs lignées. *RUNX1* pourrait représenter un bon candidat selon les éléments suivants :

(i) Les expériences dans lesquelles l'expression de *RUNX1* a été modulée montrent, qu'en conséquence, les gènes de la MEC représentent l'une des catégories de gènes dont l'expression est la plus impactée<sup>157</sup>.

(ii) *RUNX1* et plusieurs gènes de la MEC, situés ou non sur le chromosome 21, sont régulés positivement dans le tissu cardiaque et des fibroblastes fœtaux humains T21<sup>24</sup> ; La plupart d'entre eux présentent des séquences consensus pour *RUNX1* dans leurs promoteurs.

(iii) l'atténuation de *RUNX1* par siARN a diminué l'expression de 11 des 14 gènes de la MEC surexprimés dans les fibroblastes fœtaux T21 (*ADAMTS5*, *APP*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL18A1*, *COL5A1*, *ECM2*, *FN1*, *FBLN1*, *MMP2* et *VCAN*) et a augmenté la capacité migratoire des fibroblastes trisomiques 21, caractérisés initialement par un défaut de migration par rapport aux fibroblastes euploïdes<sup>141</sup>.

f) Les cellules trisomiques 21 présentent des particularités de comportement *in vitro*

Outre la modification de la composition et de l'architecture de la matrice extracellulaire dans les tissus T21, il semblerait que la présence d'un chromosome 21 surnuméraire altère certaines propriétés des cellules. Dans la littérature, les cellules T21 ayant fait l'objet d'expérimentations *in vitro* sont des

fibroblastes issus de la peau<sup>158,159</sup>, du tissu cardiaque (bourrelets endocardiques) ou pulmonaire de fœtus T21<sup>160</sup> après interruption médicale de grossesse. Il s'agit également de modèles cellulaires comme des cardiomyocytes dérivés de cellules souches iPS T21<sup>161</sup> ou des cellules murines transchromosomiques<sup>162</sup>, c'est-à-dire porteuses d'un chromosome 21 surnuméraire d'origine humaine.

Des fibroblastes T21 explantés de structures dérivées de bourgeons endocardiques cardiaques et de poumons de fœtus T21 montraient *in vitro* une plus grande adhérence cellule-cellule que ceux provenant de fœtus témoins, ce qui ne semblait pas être le cas des fibroblastes T21 cutanés<sup>160</sup>. Les processus de prolifération, adhérence et migration cellulaires ont également été étudiés en l'absence ou en présence de protéines matricielles purifiées, comme la fibronectine (FN) et le collagène VI, le type de collagène identifié comme étant le plus en abondance dans les tissus T21.

### Prolifération

Dans leur étude, Kimura et al. (2005) observaient que des fibroblastes cutanés T21 en culture avaient un taux de prolifération significativement plus lent que celui de cellules témoins<sup>159</sup>. Cette prolifération réduite a également été observée pour les cellules murines transchromosomiques T21 et les cardiomyocytes T21 dérivés de cellules iPS mises en culture sur du COLVI. Les cellules murines transchromosomiques T21 (WA17) présentaient un taux de prolifération significativement réduit, par rapport aux cellules normales, sur les protéines matricielles FN et COLVI. Il est intéressant de noter que la présence de COLVI entraînait néanmoins une augmentation statistiquement significative (environ 10 %) du taux de prolifération des cellules WA17 par rapport à celles sur support FN, phénotype non partagé par les cellules contrôles. Cette observation suggère que la présence d'un chromosome T21 surnuméraire pourrait moduler la réponse proliférative des cellules en lien avec les voies de signalisation « intérieur-extérieur » activées par l'adhérence des cellules sur tel ou tel type de protéines matricielles. Dans une étude récente, des cellules souches pluripotentes induites provenant d'individus atteints d'un syndrome de Down et de témoins, de même âge et sexe, ont été différenciées en cardiomyocytes (iPS-CM T21) puis mis en culture sur différentes concentrations de COLVI. Reeser et al. (2024) ont constaté que les concentrations les plus élevées de COLVI entraînaient une diminution de la prolifération des cardiomyocytes iPS-CM T21, mais pas de celle des cellules iPS-CM contrôles<sup>161</sup>.

### Adhérence

Jongewaard et al. (2002) ont comparé les propriétés adhésives, médiées par les intégrines, de fibroblastes cutanés trisomiques 21 et contrôles sur de la FN et du collagène de type I et VI (COLI, COLVI). Alors que les cellules présentaient des résultats d'adhérence comparables sur FN et COLI, tous les fibroblastes T21 présentaient une capacité d'adhérence accrue sur COLVI par rapport aux

fibroblastes témoins<sup>158</sup>. Ces auteurs ont montré que l'adhérence cellulaire des fibroblastes T21 au COLVI était dépendante des récepteurs intégrines de la famille bêta(1). L'intégrine alpha(3)beta(1) a été identifiée comme l'intégrine prédominante dans le processus d'adhérence des fibroblastes T21 et contrôles sur COLVI. L'expression des différentes sous-unités analysées ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\beta 1$ ) étant comparable entre les différentes lignées cellulaires, il a été proposé qu'un état d'activation modifié de l'intégrine bêta(1) puisse être un mécanisme responsable de l'adhérence accrue des cellules T21 sur COLVI<sup>158</sup>.

Concernant le modèle cellulaire murin transchromosomique T21 (WA17), Delom et al. (2009) ont montré que la capacité d'adhérence des cellules WA17 sur le plastique des supports de culture était comparable à celle des cellules contrôles. En revanche, la proportion de cellules WA17 adhérant au COLVI était significativement augmentée par rapport à celles adhérant à la FN tandis que cette différence n'était pas observée pour les cellules contrôles, reproduisant les résultats d'adhérence obtenus avec des fibroblastes cutanés T21<sup>162</sup>. Par ailleurs, une analyse en spectrométrie de masse SELDI-TOF a été réalisée pour évaluer l'impact de l'adhérence sur le profil protéomique des cellules en fonction du support. Ainsi, le profil de pics SELDI-TOF des cellules normales montrait une différence de 30 % lorsqu'elles étaient cultivées sur COLVI par rapport à leur culture sur FN. Les données comparatives entre COLVI et FN concernant les cellules WA17 montraient un bouleversement plus important du protéome (près de 50%) lorsque ces cellules étaient mises à adhérer sur COLVI<sup>162</sup>. Ces données impliquent que la réponse protéomique, spécifique aux changements dans la composition de la MEC, est fortement affectée par la surdose des gènes du chromosome 21. Ceci suggère que la fonction d'une ou plusieurs protéines, codées par des gènes du chromosome 21, peut être liée aux propriétés d'adhérence, et à la réponse cellulaire en générale, en réponse aux stimuli de la MEC. Il s'agit d'une donnée potentiellement importante car, dans le cadre du cancer, la réponse cellulaire aux modifications de la matrice extracellulaire peut être une transformation épithélio-mésenchymateuse<sup>163</sup> (TEM), le processus de transdifférenciation cellulaire impliqué dans les premières étapes de l'invasion des cellules tumorales. Ces résultats suggèrent également que la signalisation cellulaire « de l'extérieur vers l'intérieur » (*outside-inside*) est au moins aussi importante que la signalisation « de l'intérieur vers l'extérieur » (*inside-outside*) pour expliquer la réponse aberrante des cellules T21 à la composition de la MEC.

### Migration

Delom et al. (2009) ont également évalué la capacité de migration des cellules murines transchromosomiques T21 (WA17) sur le plastique de leurs supports de culture. Ils ont observé une capacité de migration moins importante des cellules WA17 par rapport aux cellules contrôles<sup>162</sup>. Combinées aux résultats de leur test d'adhérence cellulaire (adhérence non altérée sur plastique), ces

données suggèrent que la diminution de la migration des cellules WA17 semble être un phénotype cellulaire autonome, indépendant de la capacité d'adhérence de ces cellules à ce support. La capacité de migration de ces cellules sur FN et COLVI n'a pas été évaluée dans cette étude.

Pour les cardiomyocytes iPS-CM T21, Reeser et al. (2024) ont constaté que des concentrations élevées de COLVI entraînaient une diminution de leur migration contrairement aux cellules iPS-CM contrôles. Les auteurs n'ayant pas testé l'adhérence de ces cellules sur du COLVI, il serait intéressant d'évaluer si la migration ralentie de ces cellules est en lien, ou non, avec une altération de leur adhérence en présence d'une concentration élevée de COLVI<sup>161</sup>.

#### g) Objectifs

Mon projet de recherche a été initié dans l'objectif d'évaluer si l'effet protecteur d'un chromosome 21 surnuméraire vis-à-vis du développement des cancers mammaires pouvait être lié à un effet de la matrice extracellulaire. Pour ce faire, j'ai développé un modèle de matrice extracellulaire de type trisomie 21 *in vitro* sécrétée par des fibroblastes. J'ai entrepris de caractériser ce modèle et d'étudier les impacts *in vitro* de cette matrice sur le comportement biologique de lignées cellulaires mammaires, comportements importants pour la croissance (prolifération, adhérence) et la progression tumorale (transition épithélio-mésenchymateuse, migration).

#### 4.3.2.2 Méthodes et résultats

##### a) Matériels biologiques

Du fait de la rareté du cancer du sein dans la population de patientes atteintes d'un syndrome de Down, nous n'avons pas eu accès à des fibroblastes mammaires de type trisomie 21 pour modéliser *in vitro* la matrice extracellulaire pouvant être rencontrée dans le stroma mammaire chez ces patientes. Pour pallier à ce défaut de matériel biologique, nous avons travaillé à partir de fibroblastes cutanés. Pour l'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire, une lignée de fibroblastes de peau issus d'une jeune femme âgée de 16 ans, d'origines caucasienne et japonaise, et sans problème de santé particulier a été utilisée pour sécréter *in vitro* de la matrice-extracellulaire saine « euploïde » (MEC-EUP) (GM07532, Coriell Institute, Grande-Bretagne), une lignée de fibroblastes de peau issus d'une jeune femme âgée de 14 ans, d'origine caucasienne, et atteinte du syndrome de Down (caryotype 47,XX,+21) a été utilisée pour sécréter *in vitro* de la matrice extracellulaire «de type trisomie 21 » (MEC-T21) (GM02767, Coriell Institute, Grande-Bretagne). Néanmoins, dans le but de vérifier si la MEC issue de fibroblastes de peau représentait un modèle pertinent pour modéliser une MEC mammaire, des travaux récents ont été initiés avec une lignée de fibroblastes mammaires primaires humains isolés à

partir d'un tissu sain (CellBiologics, Chicago, USA).

Pour étudier le comportement de cellules tumorales mammaires au contact d'une MEC sécrétée *in vitro*, la plupart des essais ont été réalisés avec la lignée MDA-MB-468 (ATCC® No.HTB-132™, Etats-Unis). Ces cellules, de type basal, sont des cellules triples négatives (absence des récepteurs HER2, à l'estrogène (RE) et à la progestérone(PR)), dérivées d'un site métastatique (épanchement pleural), aneuploïdes et provenant d'une femme de 51 ans originaire d'Afrique. Elles avaient été choisies pour représenter le cancer du sein triple-négatif (TNBC), un cancer du sein très invasif : le rôle du remodelage de la MEC dans la progression tumorale, et plus particulièrement du caractère invasif des cellules, n'étant plus à démontrer, nous avons notamment cherché à évaluer l'impact potentiel d'une MEC de type trisomie 21 sur des caractéristiques cellulaires liées à la progression tumorale comme la transition épithélio-mésenchymateuse (morphologie, expression marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, migration), mais aussi liées à la croissance comme la prolifération et l'adhérence cellulaires. Nous avons récemment (Master 2, 2023-2024) entrepris certaines de ces études sur d'autres lignées de cellules tumorales mammaires dont les données sont toujours en cours d'exploitation. Il s'agit des lignées MCF7, lignée d'adénocarcinome mammaire métastatique négative au récepteur HER2, positive pour les RE et PR (Luminal A), BT-474 une lignée d'adénocarcinome mammaire invasive positive pour les trois récepteurs (Luminal B) et MDA-MB-231, une autre lignée d'adénocarcinome mammaire triple négatif.

b) Sécrétion *in vitro* de matrice extracellulaire par des fibroblastes : mise au point d'un modèle de culture

La MEC du tissu mammaire fournit un soutien mécanique aux cellules, régule l'homéostasie du tissu, constitue un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines et fournit une résistance à la traction aux tissus<sup>164</sup>. Mais au-delà d'être un simple cadre structurel et mécanique, c'est un puissant modulateur de fonctions cellulaires clés<sup>165</sup> en plus d'une barrière physique affectant l'efficacité thérapeutique. Bien qu'il n'existe pas de preuves que des changements dans la MEC puisse être une cause du cancer du sein, il a été observé néanmoins que des changements pouvaient amplifier et favoriser la croissance et la progression du cancer du sein<sup>166</sup>.

La MEC du tissu cancéreux est dérégulée et désorganisée par les interactions des cellules cancéreuses et du stroma tumoral, établissant un « nouvel » équilibre homéostatique similaire à la fibrose appelée desmoplasie<sup>167</sup>. Ainsi, l'hétérogénéité tumorale et les changements générés dans la MEC marquent des événements significatifs dans la progression tumorale et augmentent la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Cependant, en raison d'interactions complexes, il est difficile d'établir les rôles mécanistes de la MEC, et les défis soulevés par ces questions nécessitent le développement de

modèles *in vitro* biomimétiques des microenvironnements cancéreux qui tiennent compte de la présence d'une matrice extracellulaire.

Pour comprendre les rôles de la MEC dans le cancer, les chercheurs se sont concentrés sur une ou plusieurs molécules de MEC et ont examiné les effets de ces molécules sur le comportement cellulaire en utilisant des cellules ou des animaux génétiquement modifiés<sup>168,169</sup>. Cependant, la MEC correspond à un assemblage de nombreuses molécules, et les molécules de matrice extracellulaire assemblées activent de multiples voies de signalisation intracellulaire qui confèrent des comportements cellulaires spécifiques<sup>170,171</sup>. Il est donc nécessaire d'étudier de manière exhaustive les rôles de la MEC dans l'initiation et la progression du cancer en tenant compte du contexte d'hétérogénéité et d'assemblage des molécules de matrice extracellulaire.

Afin d'accéder à des systèmes de culture cellulaire monocouche plus physiologiques sur ces deux aspects, des méthodes de production de MEC appelées « matrice décellularisée » ont vu le jour<sup>172</sup>. Ces matrices décellularisées peuvent être obtenues à partir de tissu frais ou de cellules en culture. Si la première méthode a l'avantage de générer une MEC tissu- et patient-spécifique, elle se heurte à la faible disponibilité de pièces opératoires pour réaliser des expérimentations à grande échelle. La seconde méthode, reposant sur la simple culture en monocouche de fibroblastes offre des possibilités plus larges de production. Les applications utilisant de la MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes murins ont principalement été développées dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. En effet, des études ont montré que de la MEC sécrétée *in vitro* par ces cellules offrait un microenvironnement favorable pour la différenciation de cellules souches mésenchymateuses<sup>173</sup>. Les matrices décellularisées dérivées de la culture de cellules peuvent également fournir une plateforme appropriée pour un examen complet de la matrice extracellulaire en biologie du cancer. Par exemple, Serebriiskii et al. (2008) ont évalué la capacité de la matrice dérivée de fibroblastes murins normaux à réguler la croissance d'un panel de 11 lignées cellulaires épithéliales de tumeurs humaines et ont montré que la réponse proliférative et morphologique aux signaux matriciels étaient type cellulaire-dépendants<sup>174</sup>. Dans une autre étude, cette équipe a produit une matrice dérivée de fibroblastes murins normaux et dérivée de fibroblastes murins associés au cancer (isolés de carcinomes épidermoïdes murins avancés induits par un carcinogène chimique), modélisant respectivement une MEC « précoce » et « tardive » au cours de l'initiation et de la progression du cancer. Après avoir ensemencé des cellules épithéliales mammaires de caractéristiques variées : MCF10A (non tumorigène), MCF7 (tumorigène, non invasif) et MDA-MB-231 (tumorigène, invasif), ils ont observé que les différentes lignées épithéliales du sein réagissaient différemment aux matrices : MCF10A et MCF7 formaient sur matrices des agrégats morphologiquement distincts de ceux générés sur substrat plastique, tandis que les MDA-MB-231 présentaient une morphologie fusiforme et des mouvements directionnels accrus sur matrices. De plus, les MDA-MB-231 avaient acquis une organisation orientée parallèle sur les matrices associées à

la tumeur, mais pas sur les matrices témoins<sup>175</sup>.

La méthode décrite pour obtenir la production de MEC sécrétée *in vitro* repose sur deux étapes principales :

- Dépôt de la MEC par les fibroblastes en maintenant une culture prolongée des cellules à partir de leur confluence, généralement entre 6 et 10 jours (certains auteurs prolongent les cultures à plusieurs semaines).
- Décellularisation de la MEC consistant en une lyse ménagée des fibroblastes.

L'aspect le plus important de la préparation d'une MEC sécrétée *in vitro* est la décellularisation, car les méthodes de décellularisation peuvent influencer la composition et la microstructure de la MEC<sup>176</sup>. De nombreuses méthodes, classées en trois types, sont rapportées : chimique, physique et enzymatique. Les détergents, tels que le désoxysulfate de sodium (SDS), le Triton X-100 et le désoxycholate de sodium, sont généralement utilisés pour les méthodes chimiques. Ces détergents solubilisent les membranes lipidiques et les protéines cytoplasmique et nucléaire pour une décellularisation efficace, mais ils peuvent perturber la microstructure de la MEC et entraîner dans une certaine mesure la perte de composants de la MEC. En plus de ces détergents, des composants alcalins et/ou acides sont également utilisés pour les méthodes de décellularisation chimique car ils solubilisent les composants cytoplasmiques et perturbent les acides nucléiques (éliminent généralement les débris nucléaires). Cependant, ces réactifs peuvent également altérer les glycoaminoglycane. Pour la décellularisation physique, des cycles de congélation-décongélation sont utilisés pour perturber la membrane cellulaire, mais cette méthode peut également perturber ou fracturer la structure de la MEC. La trypsine et d'autres protéinases sont parfois utilisées pour la décellularisation enzymatique, mais une exposition prolongée aux protéinases entraîne la dégradation des protéines et perturbe ainsi la structure de la matrice extracellulaire. Pour l'élimination finale des acides nucléiques libérés, des nucléases de type DNase sont souvent utilisées. Ces méthodes présentent toutes des avantages et des inconvénients les uns par rapport aux autres et des degrés d'efficacité de lyse cellulaire variables.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 2 de Wiem Ayed, Master 2 de Nooshin Omar et de Master 2 d'Alberto Delgado Monterroso que j'ai encadrés.

#### Production de MEC *in vitro* par des fibroblastes : comparaison de deux protocoles de décellularisation

La première étape de production d'une MEC *in vitro* est la sécrétion par les cellules en culture dont le temps doit être déterminé empiriquement en fonction du type cellulaire. Il est recommandé d'ensemencer les cellules à une densité sous-confluente de telle sorte que les cellules atteignent la

confluence en 24h-48h maximum puis de maintenir la culture à confluence, avec changements réguliers du milieu, jusqu'à 7 à 8 jours voire plusieurs semaines après la confluence<sup>177,178</sup>.

La sécrétion de MEC à partir de fibroblastes cutanés a été vérifiée par immunofluorescence indirecte anti-COLVIA1 pour un ensemencement initial de 25000 cellules/cm<sup>2</sup> et des durées de confluence de 4, 5, 6 et 7 jours, c'est à dire 6, 7, 8 et 9 jours de culture post-ensemencement, la confluence étant atteinte en 48h avec cette densité d'ensemencement. Les fibroblastes ont été décellularisés par la méthode de Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH. Nous avons commencé à observer un début de sécrétion de MEC grâce au marquage anti-COLVIA1 après 4 jours de confluence des fibroblastes (6 jours de culture), mais ce marquage était relativement peu intense et éparse sur la lamelle. A partir de 5 jours de confluence (soit 7 jours de culture post-ensemencement), nous avons observé un meilleur marquage du COLVIA1 avec un aspect en réseau (Fig. 15).

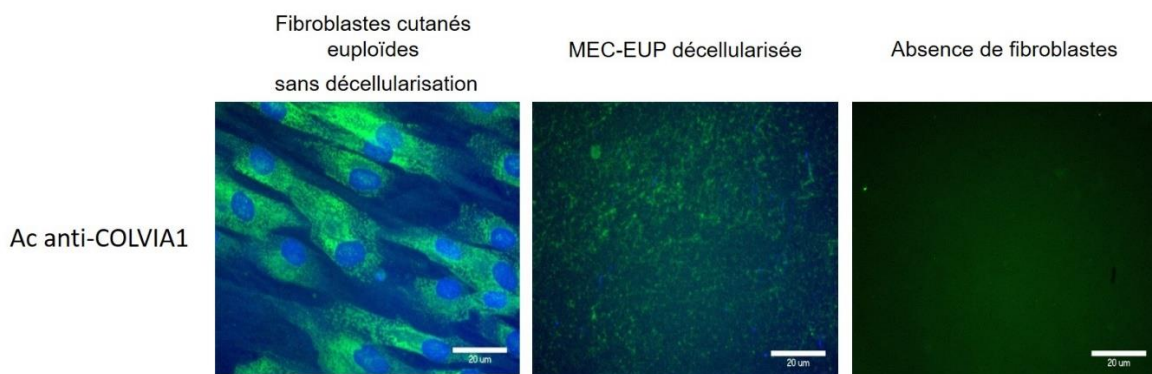


Figure 15 : Production de MEC par des fibroblastes cutanés euploïdes au bout de 7 jours de confluence (9 jours de culture). Immunofluorescence indirecte anti-COLVIA1, microscopie à épifluorescence (Olympus BX51).

Dans un souci de réduire le temps total de culture des fibroblastes, nous avons optimisé la densité d'ensemencement des fibroblastes à 100 000 cellules/cm<sup>2</sup> pour un temps de culture de 7 jours. Un essai d'immunofluorescence anti-COLVI a été réalisé pour s'assurer de la présence d'une MEC avec ces nouvelles conditions (données non montrées).

Pour la mise au point de notre modèle de production de MEC à partir de fibroblastes cutanés humains, nous avons également comparé les méthodes de décellularisation chimique par triton X-100/ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) et de décellularisation physique par cycles de congélation/décongélation.

Des fibroblastes ensemencés dans une plaque 24 puits ont été cultivés 24 heures ou 7 jours. Pour la méthode de décellularisation physique : après avoir été rincées au PBS, les cellules ont été recouvertes

de PBS. Un protocole de trois cycles de congélation/décongélation a été appliqué, un cycle de congélation/décongélation consistant à placer la plaque de culture à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes puis à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Pour la méthode de décellularisation chimique, les fibroblastes ont été traités par du Triton X-100 à 2% pendant 30 minutes après 3 lavages PBS, suivi de 3 lavages PBS, puis par un bain d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) à 0,05 N pendant 20 minutes, et enfin la MEC décellularisée a été rincée 3 fois par du PBS. Les matrices décellularisées sont visibles par microscopie de phase après le protocole de décellularisation (Fig. 16).

Le principal critère de réussite de la décellularisation est l'absence de matière nucléaire résiduelle car la présence d'un trop grand nombre de débris nucléaires ou d'une quantité trop importante d'ADN relargué au sein de la MEC pourrait nuire aux expériences de réensemencement cellulaire sur ces MEC ou engendrer des réactions immunitaires dans le cas où les MEC sont réutilisées pour implantation *in vivo*<sup>179</sup>. Ce critère peut être évalué par une coloration au DAPI, ou de manière plus rigoureuse, par un dosage d'ADN.

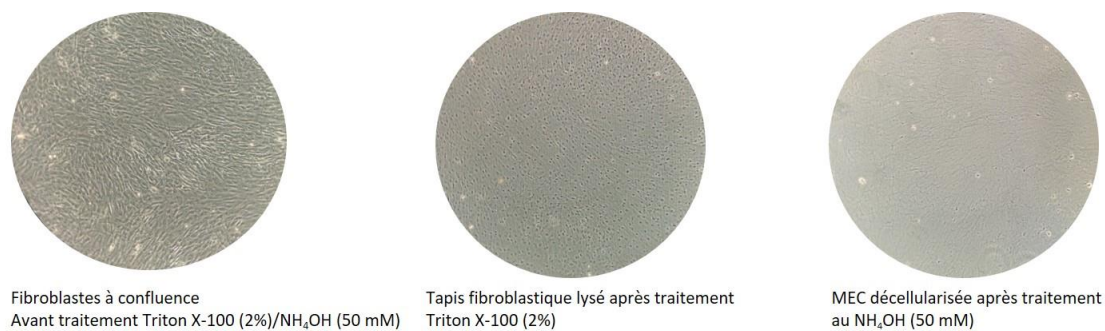


Figure 16 : Décellularisation de matrice extracellulaire sécrétée *in vitro* par des fibroblastes. Observation par microscopie en phase du tapis fibroblastique à confluence avant décellularisation par Triton X-100 (2%)/ $\text{NH}_4\text{OH}$  (50 mM) (x10), du tapis fibroblastique après traitement Triton X-100 (2%) (x10), et de la matrice extra-cellulaire après traitement au  $\text{NH}_4\text{OH}$  (50 mM) (x10)

Pour les deux méthodes de décellularisation testées, les matrices décellularisées ont été traitées ou non avec de la DNase I (25 U/ml) (Roche Diagnostics GmbH) à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Les matrices décellularisées ont été trypsinées et centrifugées. L'efficacité de la lyse pour les deux protocoles a été évaluée par dosage de l'ADN génomique résiduel au NanoDrop et par l'évaluation de la mort cellulaire (iodure de propidium/cytométrie en flux (CMF)). Pour le dosage de l'ADN génomique résiduel, les matrices décellularisées ont été resuspendues dans du PBS et l'ADN a été extrait en utilisant le Kit Maxwell LEV Blood DNA (Promega) selon les recommandations du fournisseur, puis l'ADN extrait a été dosé avec le Nanodrop 2000C (Thermo Scientific). Pour évaluer la mortalité cellulaire au sein des matrices décellularisées, ces dernières ont été resuspendues dans 100  $\mu\text{l}$  PBS et à nouveau

centrifugées. Les culots ont été repris dans 900  $\mu$ l PBS et 100  $\mu$ l d'Iodure de Propidium à 0,4 mg/ml (Sigma-Aldrich) puis directement analysés en CMF (BD LSRII, logiciel BD FACSDiva 8.0.2, Plateforme Centre d'Imagerie Cellulaire Santé, Université Clermont Auvergne).

## RESULTAT :

### Dosage de l'ADN génomique résiduel :

Nous avons observé une diminution significative de la quantité d'ADN dans les matrices décellularisées à la suite de trois cycles de congélation/décongélation en comparaison des matrices non décellularisées ( $14,4 \pm 1,9$  ng/ $\mu$ l vs  $60,4 \pm 12,0$  ng/ $\mu$ l, respectivement, pour les cultures de 24h ;  $17,5 \pm 2,7$  ng/ $\mu$ l vs  $101,5 \pm 23,1$  ng/ $\mu$ l, respectivement, pour les cultures de 7 jours). Le traitement par DNase I à la fin des cycles de congélation/décongélation n'a pas induit une diminution supplémentaire significative de la quantité d'ADN dans les matrices décellularisées par rapport aux matrices décellularisées non traitées par DNase I ( $13,05 \pm 2,3$  ng/ $\mu$ l vs  $14,4 \pm 12,0$  ng/ $\mu$ l, respectivement, pour les cultures de 24h ;  $14,7 \pm 4,8$  ng/ $\mu$ l vs  $17,5 \pm 2,7$  ng/ $\mu$ l, respectivement, pour les cultures de 7 jours) (Fig.17.A). Des résultats similaires ont été obtenus après traitement des fibroblastes par Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH (Fig. 17.B).

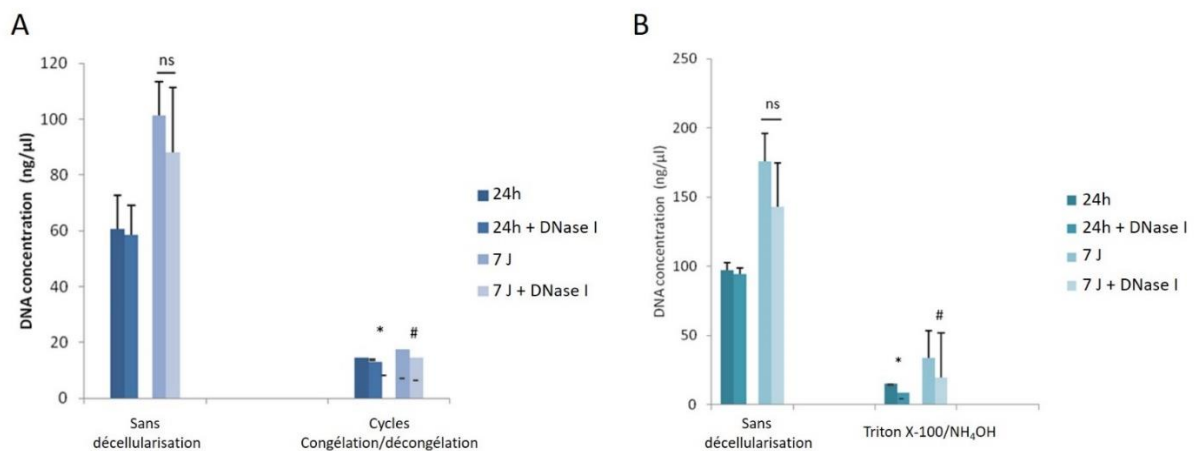


Figure 17 : Evaluation de l'efficacité de la décellularisation fibroblastique par la présence d'ADN résiduel. **A** : Fibroblastes ayant subi 3 cycles successifs de congélation/décongélation. **B** : Fibroblastes traités par Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH. Dans les deux méthodes, les matrices décellularisées ont été traitées ou non avec de la DNase I puis ont été trypsinées. L'efficacité de la lyse a été évaluée après extraction de l'ADN génomique et dosage au NanoDrop2000. Les moyennes et les écarts-types sont présentés pour deux expériences indépendantes (N = 2). \* : p <0,001 par rapport aux cultures de 24h. # : p <0,001 par rapport aux cultures de 7 jours. ns : non significatif.

### Evaluation de la mortalité cellulaire :

Nous avons également évalué le pourcentage de cellules mortes au sein des matrices décellularisées issues des cultures fibroblastiques de 7 jours. Pour ce faire, une analyse en cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium (IP) a été réalisée sur les matrices décellularisées après l'application de chacun des protocoles de décellularisation. Le pourcentage de cellules positives pour l'IP suite à l'application de trois cycles successifs de congélation/décongélation était plus élevé que celui observé pour les matrices non décellularisées, reflétant un nombre de fibroblastes morts plus important après application du protocole, que ce soit avec ou sans traitement par la DNase I (45,8% vs 7,7% et 36,8% vs 8,1%, respectivement). Pour une raison technique, nous n'avons pas été en mesure d'exploiter la valeur obtenue pour les matrices après traitement par Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH et DNase I. Des résultats similaires ont été observés après traitement des fibroblastes par Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH sans DNase I (Fig. 18). Le pourcentage de cellules mortes obtenues par cette méthode était nettement plus élevé que celui obtenu par congélation/décongélation (77,8% vs. 36,8%, respectivement).

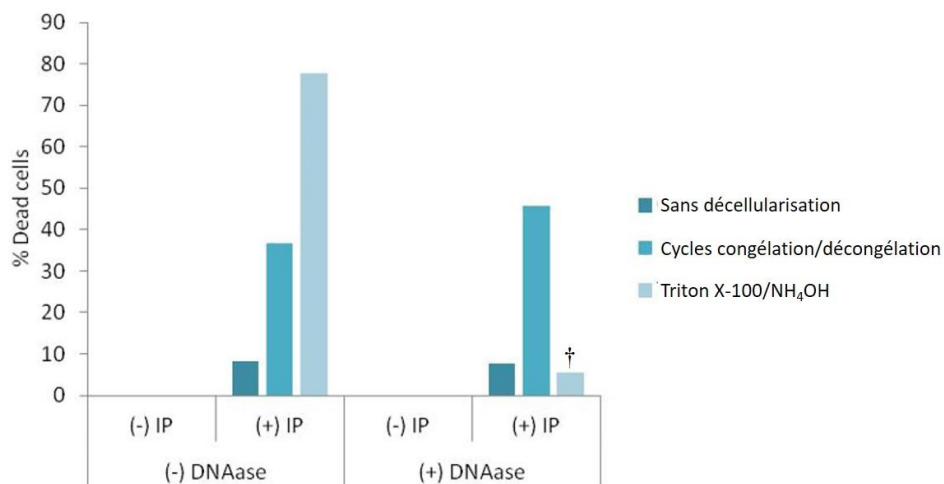


Figure 18 : Evaluation de l'efficacité de la décellularisation fibroblastique par le pourcentage de cellules mortes. Les fibroblastes ont subi 3 cycles successifs de congélation/décongélation ou ont été traités par Triton X-100 et NH<sub>4</sub>OH. Pour les deux méthodes, les matrices décellularisées ont été traitées ou non avec de la DNase I puis ont été trypsinées. L'efficacité de la lyse a été évaluée par la mortalité cellulaire avec de l'iodure de propidium (IP) en CMF. † : Valeur non exploitable pour des raisons techniques. Tests statistiques non disponibles.

Lors d'un protocole de production de MEC *in vitro*, la décellularisation est l'élimination physique ou chimique de tout composant cellulaire ou matériel génomique dans la MEC préalablement sécrétée tout en essayant de préserver au mieux l'intégrité de la composition et de la microarchitecture de la MEC native, créant ainsi une MEC acellulaire qui peut ensuite être utilisée à des fins diverses. Pour la

méthode de congélation/décongélation, nous avons constaté une diminution de 77,3% et de 82,7% du matériel génomique après la lyse des fibroblastes ayant 24h et 7 jours de culture, respectivement. D'une manière similaire, pour les fibroblastes traités par Triton X-100/ammoniaque, nous avons trouvé une diminution de 84,4% et 80,9% du matériel génomique pour les cultures de 24h et 7 jours, respectivement. Le pourcentage de cellules mortes obtenu par la méthode chimique était plus élevé que celui obtenu par congélation/décongélation (77,8% vs 36,8%, respectivement). Le traitement par DNase I n'avait pas montré son efficacité à éliminer davantage d'ADN résiduel.

Pris ensemble, ces résultats montrent que la méthode chimique semble présenter une meilleure efficacité de décellularisation que celle de la méthode physique pour se débarrasser d'un maximum de fibroblastes et de matériel génomique sur une MEC sécrétée pendant 7 jours par des fibroblastes cutanés. Nos observations s'accordent avec celles de Qi et al. (2015). En effet, dans cette étude menée sur des fibroblastes, il a été montré que la décellularisation par SDS avait été plus efficace que la décellularisation par congélation/décongélation<sup>178</sup>. La méthode de décellularisation doit être adaptée en fonction du type cellulaire. Fernández-Pérez et al. (2019) ont observé par exemple que pour la décellularisation de cellules stromales cornéennes humaines (cellules de 24h et 5 jours de culture) des cycles de congélation/décongélation avaient été plus efficaces qu'un traitement Triton X-100 seul, même si l'absence de traitement par de l'ammoniaque aurait pu affaiblir l'efficacité du traitement chimique dans cette étude<sup>180</sup>.

Ainsi, pour la mise au point de notre modèle de culture cellulaire sur MEC sécrétée *in vitro*, nous avons opté pour une culture des fibroblastes cutanés de 7 jours à partir de 100000 cellules/cm<sup>2</sup> pour la sécrétion de MEC, et la méthode de décellularisation Triton X-100 (2%)/NH<sub>4</sub>OH (50 mM) adaptée de Cukierman et al.<sup>181</sup>

Ce protocole de production de MEC *in vitro* est celui qui a été utilisé pour les expériences réalisées sur les cellules MDA-MB-468 concernant la morphologie cellulaire, l'expression génique, et la migration cellulaire décrites dans le paragraphe « c-1. Impacts fonctionnels d'une MEC de type trisomie 21 sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules MDA-MB 468 » et pour les expériences d'adhérence et de prolifération cellulaires décrites dans les paragraphes « c-2. Impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sur l'adhérence des cellules MDA-MB 468 » et « c-3. Impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sur la prolifération des cellules MDA-MB 468 ».

Récemment (Master 2, 2023-2024), nous avons appliqué ce protocole de production de MEC à partir de fibroblastes mammaires. La MEC produite par ce type de fibroblastes s'étant avérée plus fragile et donc sujette aux décollements lors des nombreux mouvements de liquide inhérents au protocole de décellularisation utilisé, nous avons été amenés à optimiser le protocole de production de MEC pour les fibroblastes cutanés et les fibroblastes mammaires afin de pouvoir comparer les effets de ces

différentes MEC sur les cellules tumorales mammaires. Cette optimisation a conduit à augmenter jusqu'à 14 jours le temps de sécrétion de MEC d'une part, et d'autre part, à réduire à 0,5% la concentration de Triton X-100, à combiner en un seul bain ce détergent avec le NH<sub>4</sub>OH, et à réduire le nombre de lavages PBS pré- et post-traitement, limitant ainsi le nombre total de mouvements de liquide sur les MEC en cours de décellularisation (12 pour le premier protocole vs 3 pour le nouveau protocole).

#### Observation histochimique de la MEC sécrétée *in vitro*

Afin de vérifier la qualité de la MEC produite au fond des puits de culture, nous avons réalisé un marquage histochimique de la MEC au bleu d'aniline, pour apprécier l'aspect du réseau de fibres de collagène, en chambre « Nunc™Lab-Tek™Chamber Slide system ». Après une étape de fixation dans des bains successifs d'éthanol de degré croissant (70%, 95% et 100%), de 2 minutes chacun, les lames ont été incubées pendant 30 min dans le bleu d'aniline à une concentration de 5 g/L (Art.1275, MERCK). Après deux rinçages avec de l'éthanol 100 %, les lames ont ensuite été mises à sécher à l'air libre pendant la nuit. L'observation et les images ont été réalisées le lendemain au microscope (Axioscope 5, ZEISS) équipé d'une caméra Axioscam 202 et du logiciel ZEN Blue.

#### RESULTATS :

La MEC sécrétée par les fibroblastes cutanés euploïdes (MEC-EUP) semble présenter une architecture fibrillaire dense avec un maillage compact et homogène et des fibres fines, qu'elle soit obtenue après 7 jours ou 14 jours de culture. La MEC sécrétée par les fibroblastes cutanés T21 (MEC-T21) de 7 jours présente un maillage poreux avec des faisceaux de fibres épais, quant à la MEC-T21 issue d'une culture de 14 jours, elle semble présenter un maillage fibrillaire plus compact. La MEC sécrétée par les fibroblastes mammaires euploïdes (MEC-M-EU) présente un maillage poreux lorsqu'elle a été sécrétée pendant 7 jours, et celui-ci, même si d'aspect plus compact, reste poreux lorsqu'elle a été produite pendant 14 jours (Fig. 19).

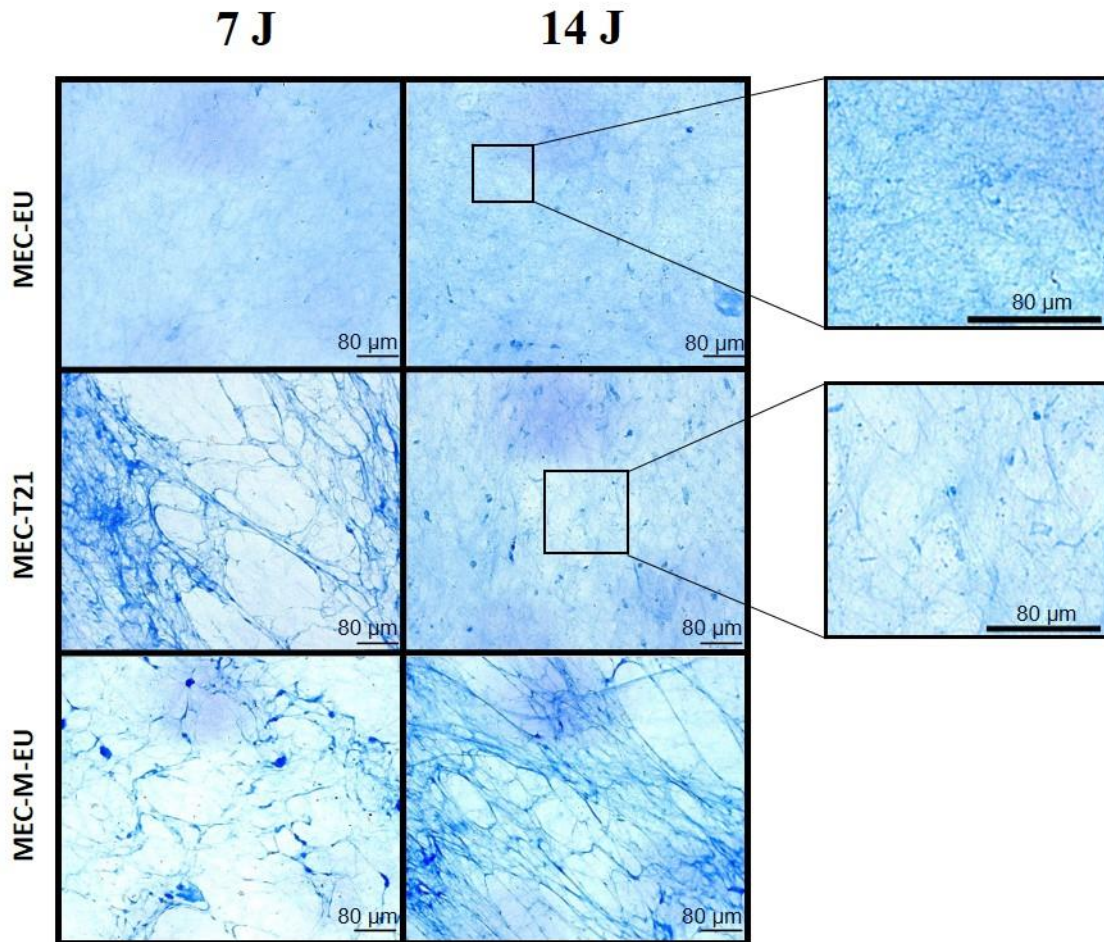


Figure 19 : Caractérisation histochimique de la matrice extracellulaire par mise en évidence des fibres de collagène de la matrice extracellulaire décellularisée sécrétée, pendant 7 jours ou 14 jours, par des fibroblastes cutanés euploïdes (MEC-EU), T21 (MEC-T21) et mammaires euploïdes (MEC-M-EU). Coloration bleu d'aniline sur Nunc™Lab-Tek™Chamber Slide System et observation au microscope optique (X20).

#### Quantification des protéines matricielles totales

Les fibroblastes cutanés euploïdes (pour MEC-EUP) et T21 (pour MEC-T21) ainsi que les fibroblastes mammaires (pour MEC-M-EU) ont été ensemencés en plaques 96 puits à une concentration de 100000 cellules/cm<sup>2</sup> et cultivés pendant 7 ou 14 jours avec changement du milieu de culture tous les 3 jours.

La quantité de protéines matricielles a été évaluée avec le kit « NanoOrange® Protein quantitation » (invitrogen#N10271) selon le protocole du fournisseur. La solution tampon a été préparée en diluant la solution de tampon du kit « NanoOrange® protein quantitation » 10 fois avec de l'eau distillée. Le tampon a ensuite été utilisé pour diluer le NanoOrange® protein quantitation reagent 500 fois et ainsi préparer la solution de réaction. Cent μL de la solution tampon sont déposés dans les puits à analyser suivis par 100 μL de la solution de réaction préparée précédemment. La plaque est incubée pendant

10 minutes à 95°C dans une étuve (EU 100, Jouan), puis mise à refroidir 20 minutes à température ambiante. La mesure de fluorescence a été réalisée par un lecteur de plaque à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm après une agitation mécanique de 30s (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems). Une seule expérience technique a été réalisée avec 8 puits par condition.

#### RESULTATS :

Il n'y a pas de différence significative entre la concentration de protéines matricielles pour MEC-EUP et MEC-T21 que ce soit pour un temps de culture de 7 jours ou de 14 jours. Cependant, la concentration de protéines de la MEC-M-EU était très inférieure à celle des matrices cutanées (35 µg/ml) pour un temps de culture de 7 jours. Après 14 jours de culture, la concentration de protéine de la MEC-M-EU était équivalente à celles des 2 autres MEC (Fig. 20).

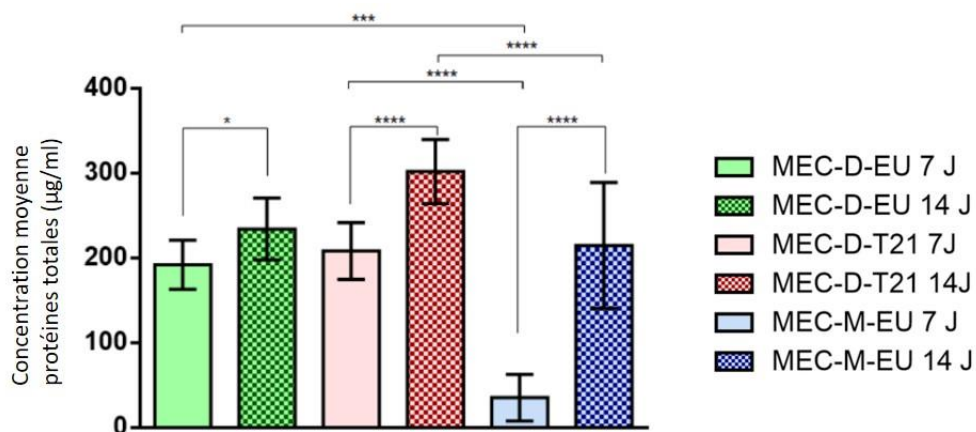


Figure 20 : Quantification des protéines matricielles totales sécrétées par des fibroblastes dermiques euploïdes (MEC-EUP), T21 (MEC-T21) et des fibroblastes mammaires euploïdes (MEC-M-EU) avec le kit NanoOrange Protein quantification®. \* P ≤ 0.05 \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001 \*\*\*\* P ≤ 0.0001.

#### Elimination de l'ADN résiduel des MEC décellularisées : mise au point du protocole de traitement à la DNase I

Nos précédents essais visant à réduire la quantité d'ADN présent dans les MEC par un traitement à la DNase I n'ayant pas été concluants (avec 25 U/ml d'enzyme, incubation 10 min à 37°C), nous avons entrepris de mettre au point ce protocole de traitement.

Les fibroblastes cutanés euploïdes et T21 ainsi que les fibroblastes mammaires ont été ensemencés en plaques 96 puits à une concentration de 100000 cellules/cm<sup>2</sup> et cultivés pendant 7 ou 14 jours avec changement du milieu de culture tous les 3 jours.

Un traitement avec de la DNase I (Roche Diagnostics GmbH, # 04716728001) à 0, 25 ou 50 U/ml a été réalisé pendant 1h à 37°C, suivi par un nouveau rinçage PBS.

La quantité d'acides nucléiques présents dans les MEC décellularisées a été déterminée en utilisant le kit « ADNdb Quant-iT™ PicoGreen™ » (invitrogen#P7589). Le tampon Tris-EDTA (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7) a été dilué 20 fois dans de l'eau distillée, puis cette solution a été utilisée pour diluer 200 fois le « Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent » selon les recommandations du fournisseur. Cent µL de la solution tampon ont été déposés dans les puits à analyser suivis par 100 µL de la solution de réaction préparée précédemment. La plaque a été incubée pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après agitation mécanique de 30s, la mesure de fluorescence a été réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems). Une seule expérience technique a été réalisée avec 8 puits par condition.

#### RESULTATS :

Pour éviter des artefacts liés à la présence d'ADN résiduel au sein de la MEC, une étape à la DNase I a été ajoutée. A l'issue du protocole de décellularisation, une mise au point de la concentration de DNase I nécessaire à un traitement de la MEC a été réalisée. Le dosage de l'ADN a été effectué avec le kit PicoGreen™ (Fig. 21). Sans traitement, les MEC-EUP et -T21 de 7 J présentaient des quantités d'ADN comparables, cependant produite avec 14 J de culture, la MEC-T21 présentait plus d'ADN que la MEC-EUP, finalement les deux MEC présentaient une quantité d'ADN plus importante que la MEC-M-EU. On observe que les MEC-EUP et MEC-T21 de 7 J présentaient une quantité d'ADN réduite avec de la DNase I à 25 U/ml (400 ng/ml vs 200 ng/ml) mais aussi à 50 U/ml sans différence d'effet entre les deux concentrations.

D'autre part, on observe que pour les MEC-EUP et MEC-T21 de 14 J, la quantité d'ADN n'était pas réduite par la DNase I à 25 U/ml mais elle était diminuée très légèrement par la DNase I à 50 U/ml. Pour une MEC-M-EU de 7 J, il n'y avait pas d'effet significatif du traitement par la DNase I que ce soit à 25 ou 50 U/ml, tandis que pour une MEC-M-EU de 14 J, la quantité d'ADN diminuait en présence de 25 et 50 U/ml de DNAase I sans que la significativité statistique ne soit atteinte.

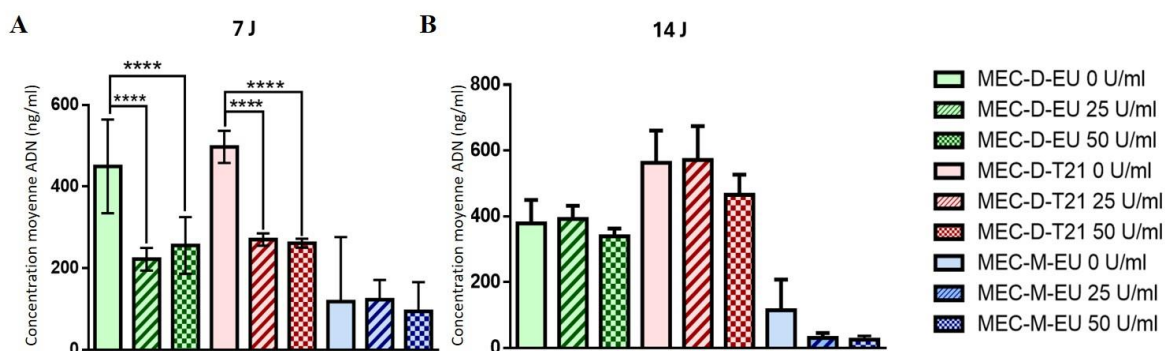


Figure 21 : Concentration d'ADN résiduel au sein des matrices extracellulaires sécrétées *in vitro* après décellularisation et traitement avec différentes concentrations de DNase I. **A** : Quantification de l'ADN au sein des MEC produites en 7 jours selon le type de fibroblastes (fibroblastes dermiques euploïdes en vert, dermiques T21 en rouge et mammaires euploïdes en bleu). **B** : Quantification de l'ADN au sein des MEC produites en 14 jours selon le type de fibroblastes (fibroblastes dermiques euploïdes en vert, dermiques T21 en rouge et mammaires euploïdes en bleu)

Grâce à la coloration de la MEC décellularisée par du bleu d'aniline, nous avons observé une différence dans l'architecture du réseau fibrillaire collagénique des différentes matrices. Les MEC-EUP et MEC-T21 produites en 7 jours semblent former un maillage différent, avec un maillage plus lâche et des faisceaux de fibres plus épais pour la MEC-T21. Lorsqu'elles sont produites en 14 jours, ces différences semblent s'estomper légèrement mais le maillage de la MEC-T21 semble quand même plus lâche et moins régulier que celui de la MEC-EUP. En ce qui concerne la MEC issue de fibroblastes mammaires, le maillage fibrillaire apparaît plus lâche et plus poreux, qu'elle ait été sécrétée pendant 7 ou 14 jours, que celui des MEC cutanées. Ces premières observations suggèrent que l'architecture collagénique obtenue *in vitro* différencierait selon l'origine tissulaire des fibroblastes d'une part, et que d'autre part, les différences d'organisation architecturale de la MEC observées *in vivo* dans les tissus de patients atteints d'une trisomie 21<sup>139,140</sup> pourraient être présentes *in vitro*. Ces données d'observation morphologique de la MEC peuvent également être mises en relation avec les données quantitatives de protéines matricielles obtenues. La MEC mammaire de 7 jours a présenté une quantité de protéines beaucoup plus faible que celle de 14 jours et que les MEC cutanées. Les MEC-EUP et MEC-T21 sont similaires en terme de quantité de protéines, qu'elles aient été produites en 7 ou 14 jours, ce qui suggère que le dépôt de protéines matricielles devrait être comparable sur le plan quantitatif, mais qu'il pourrait varier sur le plan qualitatif en terme d'organisation architecturale.

Par ailleurs, malgré l'optimisation du protocole de décellularisation limitant le nombre de fois où un liquide doit être déposé sur les fibroblastes en cours de lyse ou sur le tapis matriciel, la MEC mammaire, qu'elle ait été produite en 7 ou 14 jours, se décollait et se repliait sur elle-même partiellement ou en totalité, voire se détachait complètement à l'issue du protocole de décellularisation. Ceci n'a pas été

observé pour les MEC d'origine cutanée suggérant que le maillage d'aspect plus lâche de la MEC mammaire produite *in vitro* a réduit considérablement sa résistance mécanique aux flux liquidiens ou son adhérence au support de culture. La fragilité d'une MEC issue de cellules en culture est une variable qui doit être contrôlée car elle peut affecter les résultats ultérieurs. Lors du protocole, il est important d'ajouter lentement les solutions et d'être très doux lors de l'aspiration du liquide dans les puits afin de réduire les risques de décollement de la MEC. Pour limiter le nombre de sites où la matrice extracellulaire pourrait être perturbée, le liquide doit être ajouté et retiré au même endroit sur le bord du puits à chaque fois. Pour aider à augmenter l'adhérence de la MEC mammaire produite *in vitro*, il pourrait être envisagé de revêtir la surface du support de culture avec de la gélatine avant l'ensemencement des fibroblastes<sup>177</sup>.

En conclusion, à ce stade, nous n'avons pas pu établir un protocole de sécrétion de MEC mammaire *in vitro* adéquat pour assurer une bonne qualité de celle-ci et réaliser des approches expérimentales avec les cellules tumorales mammaires.

Concernant la mise au point du traitement par la DNase I, nous avons observé qu'un traitement par 25 et 50 U/ml d'enzyme pendant 1h permettait de réduire de moitié la concentration d'ADN dans les MEC-EUP et MEC-T21 de 7 jours, mais que cet effet n'était pas clairement observé pour les MEC de 14 jours. Cette absence d'effet pourrait être dû soit à un problème au moment de la manipulation (une seule expérience réalisée), soit à une densité plus importante des MEC de 14 jours qui pourrait avoir tendance à retenir davantage l'ADN qui a été relargué, le rendant plus difficile à dégrader. Néanmoins, une réduction légère de la concentration d'ADN obtenue après traitement avec 50 U/ml de DNase I, même si non significative, suggère que cette concentration enzymatique pourrait être appropriée et qu'un temps d'incubation à 37°C plus long pourrait être testé. Le protocole de réduction de l'ADN résiduel sur MEC de 7 jours reste à optimiser pour tenter de réduire davantage la quantité d'ADN résiduel tandis que celui sur MEC de 14 jours n'est pas encore défini.

c) Impacts fonctionnels d'une MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes trisomiques 21 sur le comportement de cellules mammaires

Comme mentionné précédemment, la plupart des essais réalisés pour évaluer l'impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sécrétée *in vitro* ont été faits à partir d'une MEC ayant eu 7 jours de sécrétion par des fibroblastes cutanés (trisomiques 21 et euploïdes pour les contrôles) sur les cellules MDA-MB-468. Ces essais concernent l'étude de la morphologie cellulaire, de l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, de la migration cellulaire, de l'adhérence et de la prolifération cellulaires. Pour ces cellules, des essais d'attachement cellulaire (adhérence) et de prolifération ont également pu être réalisés sur des MEC de 14 jours mais les données sont encore en

cours d'exploitation. Des essais d'attachement et de prolifération cellulaires sur MEC de 14 jours ont également été réalisés avec les cellules MCF7, BT474 et MDA-MB-231 et sont également en cours d'analyses.

Le tableau ci-dessous résume le type de cellules tumorales mammaires, le temps de sécrétion matricielle, le type de fibroblastes utilisés pour la sécrétion de MEC et le protocole de décellularisation qui ont été utilisés pour chaque essai :

	Morphologie cellulaire, Expression marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, migration	Adhésion (test d'attachement cellulaire)			Prolifération cellulaire	
		MDA-MB-468	MDA-MB-468	MDA-MB-468, MCF7, BT474, MDA-MB-231	MDA-MB-468	MDA-MB-468, MCF7, BT474, MDA-MB-231
Type de cellules tumorales mammaires	MDA-MB-468	MDA-MB-468	MDA-MB-468, MCF7, BT474, MDA-MB-231	MDA-MB-468	MDA-MB-468, MCF7, BT474, MDA-MB-231	
Temps de sécrétion matricielle	7 jours	7 jours	14 jours	7 jours	14 jours	
Type de fibroblastes	Fibroblastes cutanés T21 et EUP	Fibroblastes cutanés T21 et EUP	Fibroblastes cutanés T21 et EUP	Fibroblastes cutanés T21 et EUP	Fibroblastes cutanés T21 et EUP	
Protocole de décellularisation	Protocole 1	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 1	Protocole 2	
Traitement à la DNase I	Non	Non	Non	Non	Non	
Résultats présentés dans mémoire HDR	Oui	Oui	Non	Oui	Non	

Tableau 2 : Résumé des expérimentations *in vitro* réalisées au cours du projet en fonction du type de cellules tumorales mammaires et du temps de sécrétion de la MEC par les fibroblastes.

Pour rappel, le protocole 1 de décellularisation est celui au Triton X-100 2%/NH<sub>4</sub>OH 50 mM en deux bains séparés (et nombreux lavages PBS), et le protocole 2 est celui au Triton X-100 0,5%/NH<sub>4</sub>OH 50 mM en un seul bain et réduction du nombre de lavages PBS.

### c-1) Impacts fonctionnels d'une MEC de type trisomie 21 sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules MDA-MB 468

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est définie comme un changement multiforme et souvent réversible du phénotype cellulaire. Les événements survenant au cours de la TEM comprennent notamment une modification de la morphologie cellulaire avec passage d'une forme polyédrique initiale à une forme fibroblastoïde en « aiguille », la perte des jonctions adhérentes, la régulation négative des cytokératines et de l'E-cadhérine (marqueurs spécifiques épithéliaux), et la régulation positive des marqueurs mésenchymateux, tels que la fibronectine, la N-cadhérine et la vimentine, l'obtention d'un phénotype migratoire et invasif, ainsi que la résistance à l'anoïkisis/apoptose<sup>182</sup>. Bien que les caractéristiques des cellules entièrement épithéliales soient relativement clairement définies, les connaissances actuelles ne permettent pas de définir l'état mésenchymateux avec des caractéristiques cellulaires spécifiques ou des marqueurs moléculaires qui soient universels de tous les programmes de TEM<sup>183</sup>. De nouvelles données soulignent la complexité du processus et mettent en évidence des aspects qui n'ont pas été entièrement explorés<sup>184</sup>. En effet, un niveau élevé de plasticité entre les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux a récemment été proposé : les cellules seraient dans des états « hybrides » transitoires<sup>184</sup>.

Il est important de noter que la TEM contribuerait de manière significative à l'initiation et à la croissance précoce des cancers épithéliaux primaires<sup>185</sup>. Le concept est que les cellules cancéreuses peuvent réactiver des programmes de développement, latents dans les cellules adultes, et cette réactivation contribue à la tumorigénèse en induisant une prolifération cellulaire accrue et une résistance à l'apoptose<sup>182</sup>. De plus, la TEM a été suggérée comme une étape critique de la progression du cancer et des métastases malignes, car les cellules cancéreuses subissant cet événement sont capables d'envahir localement le tissu interstitiel et de migrer vers des sites distants<sup>186</sup>.

#### c-1.1) Une MEC-T21 impacte la morphologie des cellules MDA-MB 468

##### c-1.1.1) La présence d'une MEC en tant que support de culture favorise l'aspect fusiforme des cellules MDA-MB 468

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 1 d'Alexia Mouttet et d'expérimentations que j'ai réalisées.

Pour cet essai, 100000 fibroblastes/cm<sup>2</sup> ont étéensemencés dans des puits de plaques de 24 ou 96 puits selon les essais. Les fibroblastes ont été mis en culture pendant 7 jours, avec changement régulier du milieu de culture, puis décellularisés avec le protocole initial (protocole 1). Des cellules MDA-MB-468 ont étéensemencées à une densité de 30000 cellules/cm<sup>2</sup> sur MEC-EUP, MEC-T21 ou dans des puits plastiques (P) dans lesquels le protocole de lyse a été réalisé.

L'analyse de la morphologie des MDA-MB-468 a été réalisée avec l'instrument d'imagerie cellulaire en temps réel IncuCyte® Live-Cell Analysis (Sartorius). Cet instrument est placé dans un incubateur à CO<sub>2</sub> et à 37°C en atmosphère humide. Piloté par un logiciel, l'IncuCyte® permet l'acquisition d'images en contraste de phase à intervalles de temps réguliers et pendant une durée déterminée. Ici, 3 à 5 images par puits ont été acquises toutes les 4h pendant 48h à un grossissement x10. La morphologie cellulaire a été approchée, d'une part, par la mesure de l'excentricité (analyse IncuCyte®), et d'autre part, en évaluant la proportion de cellules fusiformes sur les images, à 24h post-ensemencement avec le logiciel Fiji 3.

Pour l'étude du paramètre d'excentricité des cellules MDA-MB-468, les images acquises à 24h post-ensemencement ont été analysées avec le logiciel d'analyse de l'incucyte® afin d'obtenir une mesure moyenne de l'excentricité des objets (cellules MDA-MB-468) sur l'ensemble des images acquises dans chaque puits. Lors de l'analyse, la surface minimale des objets devant être considérés comme des cellules a été paramétrée à 350 µm<sup>2</sup> afin de ne pas prendre en compte les débris cellulaires potentiels. Pour rappel, l'excentricité est le rapport de la distance entre les foyers d'une ellipse et la longueur de

son grand axe<sup>187</sup>. Les valeurs de cet attribut varient entre 0 et 1. Une ellipse dont l'excentricité est de 0 est en fait un cercle, tandis qu'une ellipse dont l'excentricité est de 1 est un segment de droite (Fig. 22). L'analyse de l'excentricité a été réalisée à partir de 3 expériences indépendantes totalisant 39 puits avec des cellules sur plastique (P), 39 puits avec des cellules sur MEC-EUP et 37 puits avec des cellules sur MEC-T21.

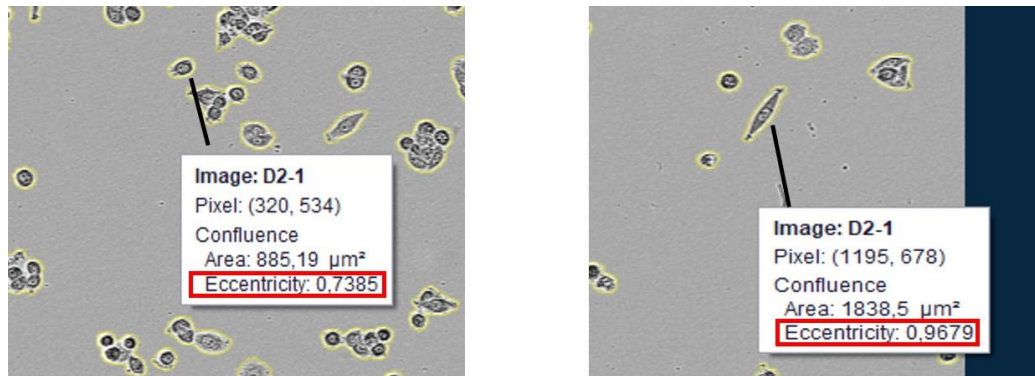


Figure 22 : Morphologie de cellules MDA-MB-468 évaluée par le paramètre d'excentricité avec le logiciel d'analyse Incucyte® Live-Cell Analysis (Sartorius). A gauche une cellule MDA-MB-468 arrondie et une excentricité de 0,73, à droite une cellule MDA-MB-468 fusiforme avec une excentricité de 0,96 (x10).

#### RESULTATS :

A 24h post-ensemencement, nous avons observé que l'excentricité moyenne des cellules MDA-MB-468 était significativement plus élevée pour les cellules sur MEC-EUP ( $0,699 \pm 0,009$ ) et sur MEC-T21 ( $0,694 \pm 0,015$ ) que pour celles sur P ( $0,647 \pm 0,014$ ) ( $p < 0,05$ ), suggérant que plus de cellules MDA-MB-468 adoptent une forme fusiforme en présence d'une MEC décellularisée. L'excentricité moyenne était comparable entre les MEC euploïdes et T21 (Fig. 23).

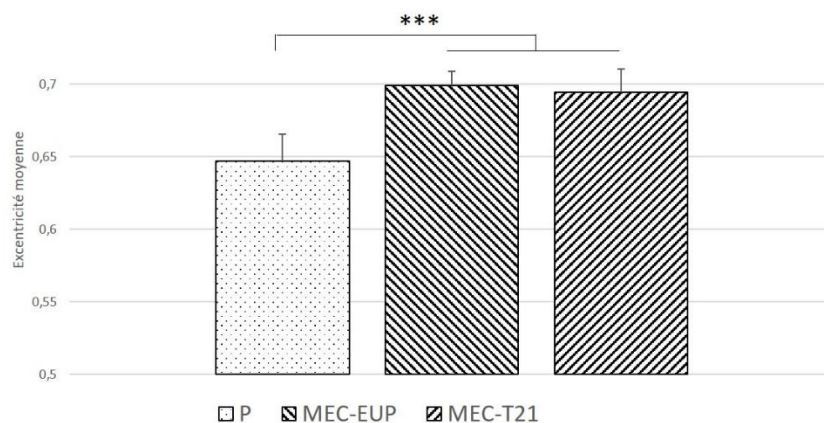


Figure 23 : Excentricité moyenne des cellules MDA-MB-468 à 24h post-ensemencement en fonction du support de culture, MEC euploïde (MEC-EUP), MEC de type trisomie 21 (MEC-T21) ou plastique (P), mesurée avec le logiciel d'analyse Incucyte® Live-Cell Analysis (Sartorius). \*\*\* p = 0,001 (ANOVA non paramétrique, test post-hoc de Dunn)

Pour l'analyse de la proportion de cellules fusiformes, les images de phase acquises à 24h post-ensemencement ont été traitées avec Fiji 3. Le nombre total de cellules présentes sur l'image a été déterminé de la façon suivante : les images ont été transformées en niveau de gris 8-bits, binarisées puis les traitements « find edge », « Fill Hole » et « watershed » ont été appliqués. L'analyse « Analyse particules » a été réalisée pour une taille d'objet de « 60-Infinity » et une circularité des objets de « 0.00 à 1.00 ». Le nombre total de cellules obtenues a été réévalué manuellement pour chaque image en soustrayant des objets non cellulaires pris en compte (débris, matrice..) et en ajoutant des cellules non prises en compte car présentes en amas et non séparées par le traitement d'image. Les cellules ont été considérées comme fusiformes lorsqu'elles étaient allongées et présentaient deux extrémités pointues. Elles ont été comptées manuellement avec l'outil Cell counter de Fiji.

A ce jour, l'analyse de la proportion de cellules fusiformes a été réalisée à partir de 2 expériences indépendantes pour 6 puits de cellules sur plastique (7 images), pour 7 puits de cellules sur MEC euploïde (7 images), pour 8 puits de cellules sur MEC de type trisomie 21 (8 images).

#### RESULTATS :

La proportion de cellules MDA-MB-468 fusiformes était significativement plus importante sur les deux types de matrice extracellulaire (4,9 % ± 0,8 % sur MEC-T21, 6,9 % ± 2,9 % sur MEC-EUP) que sur P (3,4 % ± 0,6 %). Il n'y avait pas de différence significative dans la proportion moyenne de cellules MDA-MB-468 fusiformes entre la MEC-T21 et la MEC-EUP malgré une tendance à une plus faible proportion sur MEC-T21 (Fig. 24). Ces résultats concernant la proportion de cellules fusiformes sont par ailleurs en cohérence avec les données d'excentricité.

## 24h post-ensemencement

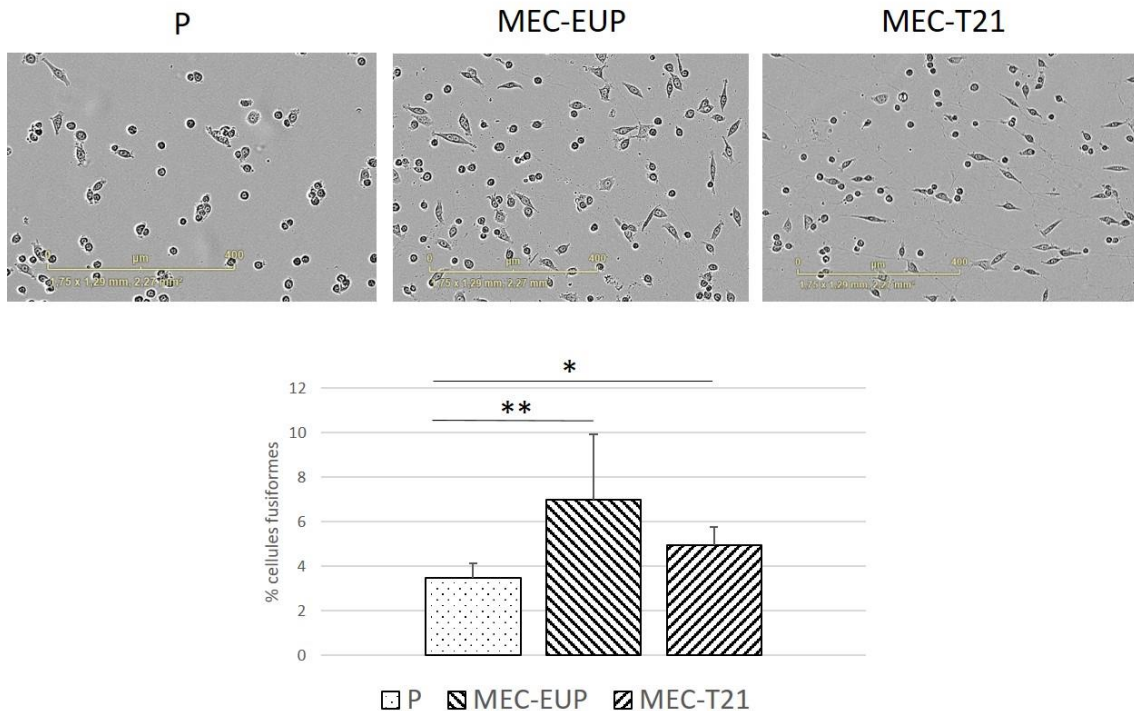


Figure 24 : Proportion moyenne de cellules MDA-MB-468 d'aspect fusiforme par image, à 24h post-ensemencement en fonction du support de culture, MEC euploïde (MEC-EUP), MEC de type trisomie 21 (MEC-T21) ou plastique (P), déterminée par analyse d'image avec Fiji 3. \*  $p$  entre 0.05 et 0.01, \*\*  $p$  entre 0.01 et 0.001 (ANOVA non paramétrique, test post-hoc de Dunn).

c-1.1.2) La présence d'une MEC-T21 réduit la population de cellules MDA-MB 468 fusiformes induite par  $TGF\alpha$

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 2 de Wiem Ayed.

La transition épithélio-mésenchymateuse des cellules MDA-MB 468 peut être stimulée *in vitro* par le  $TGF\alpha$ <sup>188</sup>. Pour cet essai, 25000 fibroblastes/cm<sup>2</sup> ont été ensemencés dans des puits d'une plaque de 24 puits contenant une lamelle de microscopie au fond du puits. La culture a été réalisée pendant 7 jours avec changement régulier du milieu de culture (confluence atteinte en 48h et 5 jours de production de MEC). Les fibroblastes ont été lysés avec la méthode Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH. Puis 25000 cellules MDA-MB-468/cm<sup>2</sup> ont été ensemencées sur la MEC sécrétée *in vitro* (MEC-T21 et MEC-EUP) ou sur le support en plastique (P). Quarante-huit heures après leur ensemencement, les cellules MDA-MB 468 ont été privées de SVF pendant 24 heures. A 72 heures après leur ensemencement, les cellules ont été traitées avec du milieu DMEM High glucose, 0,5% SVF, 1% Glutamine contenant du  $TGF\alpha$  (Recombinant

Human TGF $\alpha$ , BioVision) à 50 ng/ml. Le traitement au TGF $\alpha$  a été réalisé pendant 24h, 48h et 72h.

L'aspect morphologique des cellules a été déterminé après immunofluorescence indirecte anti-vimentine à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) équipé d'une caméra noir et blanc CoolSNAPES (Roperscientif) (Centre d'Imagerie Cellulaire Santé (CICS), Université Clermont Auvergne). Le pourcentage de cellules MDA-MB-468 d'aspect fusiforme a été évalué en rapportant le nombre de cellules d'aspect fusiforme sur le nombre total de cellules dénombrées à partir de deux lamelles (2 puits) de culture par condition, et dans trois champs microscopiques par lamelle à l'aide du logiciel d'analyse d'images MetaMorph v6.2 (Roperscientific).

L'expérience a été réalisée une fois, le nombre d'images ayant pu être exploitées est résumé dans le tableau ci-dessous :

	24h			48h			72h		
	P	MEC-EUP	MEC-T21	P	MEC-EUP	MEC-T21	P	MEC-EUP	MEC-T21
- TGF $\alpha$	6	5	5	6	6	6	6	5	6
+ TGF $\alpha$	6	4	5	5	3	6	6	6	6

Tableau 3 : Nombre d'images exploitées pour déterminer la proportion de cellules fusiformes dans les conditions de traitement (24h, 48h, 72h) ou de non traitement des cellules par du TGF $\alpha$ .

## RESULTATS :

Avec 24h de traitement au TGF $\alpha$ , nous avons observé une proportion significativement plus importante de cellules fusiformes avec le traitement que sans le traitement pour les cellules sur plastique. Cette tendance était observée pour les cellules sur MEC-EUP et MEC-T21 sans atteindre la significativité (forte variabilité sur MEC-EUP notamment). Nous avons également observé cette proportion significativement plus importante de cellules fusiformes avec 72h de traitement au TGF $\alpha$  sur les trois types de support. Ce fut également le cas avec 48h de traitement pour les cellules sur plastique, mais de façon surprenante, il y avait autant de cellules fusiformes sur les MEC-EUP et MEC-T21 quand les cellules étaient traitées ou non traitées. Ce phénomène pourrait potentiellement être expliqué par un aléa expérimental, l'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois. Ces observations confirment le rôle de ce facteur de croissance dans l'induction de la TEM pour ces cellules<sup>188</sup>.

Que ce soit sans traitement ou après 24h de traitement par le TGF $\alpha$ , nous n'avons pas observé de différence significative dans la proportion de cellules MDA-MB-468 fusiformes sur MEC-T21 et MEC-EUP (forte variabilité sur MEC-EUP ?).

Au temps correspondant à 48h de traitement, il y avait significativement moins de cellules fusiformes sur MEC-T21 que sur MEC-EUP en absence de traitement ( $p=0,04$ ). Cette différence n'était pas observée avec un traitement de 48h au TGF $\alpha$ .

Au temps correspondant à 72h de traitement, il y avait significativement moins de cellules fusiformes

sur MEC-T21 que sur MEC-EUP en présence de  $TGF\alpha$  ( $p=0,004$ ).

A noter que pour ces temps de culture, correspondant à 96h, 120h et 144h post-ensemencement, nous n'avons pas observé une proportion plus importante de cellules fusiformes sur les MEC par rapport au support plastique dans les conditions de culture habituelles, à savoir sans  $TGF\alpha$ , comme cela a pu être observé à 24h post-ensemencement dans l'autre essai (Fig. 25).

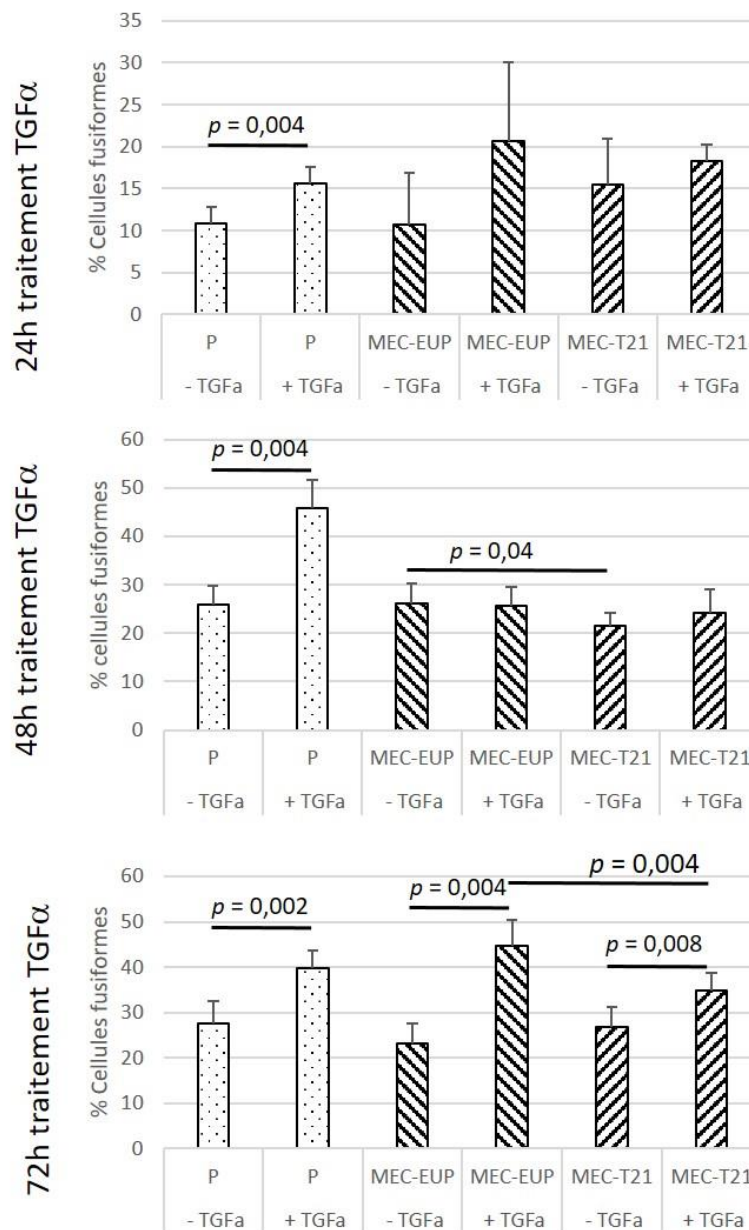


Figure 25 : Proportion moyenne de cellules MDA-MB-468 d'aspect fusiforme par image, après 24h, 48h et 72h de traitement par  $TGF\alpha$  (50 ng/ml) en fonction du support de culture, MEC euploïde (MEC-EUP), MEC de type trisomie 21 (MEC-T21) ou plastique (P), après immunomarquage anti-VIM des cellules et déterminée par analyse d'image avec MetaMorph v6.2. (Mann-Whitney,  $\alpha = 0,05$ , 95% intervalle de confiance)

Au total, nous avons réalisé deux essais différents en vue d'évaluer l'impact d'une MEC-T21 sur la morphologie des cellules MDA-MB-468.

L'un a consisté à évaluer la proportion de cellules MDA-MB 468 fusiformes à 24h post-ensemencement à partir d'images en contraste de phase, obtenues de différentes expériences. De ces expériences, une analyse du paramètre d'excentricité des cellules d'une part, et d'autre part, la détermination de la proportion de cellules fusiformes ont été utilisées pour approcher cet impact. L'autre a consisté à évaluer la proportion de cellules fusiformes à partir d'images en fluorescence après immunomarquage des cellules avec un anticorps anti-vimentine. Dans cet essai, réalisé une seule fois, les cellules ont été traitées par du  $TGF\alpha$  pendant 24h (correspond à 96h post-ensemencement sur le plan expérimental), 48h (correspond à 120h post-ensemencement sur le plan expérimental) et 72h (correspond à 144h post-ensemencement sur le plan expérimental). Des cellules non traitées ont servi de contrôle.

Le premier essai montre que dans des conditions de culture classiques, une proportion plus importante de cellules se trouve sous un aspect fusiforme quand elles sont cultivées sur une MEC sécrétée *in vitro* par rapport à un support plastique à 24h post-ensemencement, sans qu'il n'y ait de différence entre une MEC-T21 et une MEC-EUP. Cette observation n'était pas faite à 96h, 120h et 144h dans des conditions semblables de culture (essai 2). Il est probable que ce phénomène soit expliqué par la confluence des cellules, plus importante à partir de 96h de culture qu'à 24h pour des conditions de densité d'ensemencement comparables (30000 cellules/cm<sup>2</sup> vs 25000 cellules/cm<sup>2</sup>). Pour vérifier l'effet d'une MEC sur la morphologie de ces cellules dès les premières heures de culture, il pourrait être envisagé de réduire encore la densité d'ensemencement des cellules MDA-MB-468 et de réévaluer le paramètre d'excentricité et le pourcentage de cellules fusiformes à 24h et 48h, de sorte à avoir une confluence restreinte et faciliter le travail de comptage sur les images.

Le second essai montre que le  $TGF\alpha$ , un facteur de croissance pour lequel les cellules MDA-MB 468 possèdent le récepteur et qui induit la transition épithélio-mésenchymateuse de ces cellules *in vitro*<sup>188</sup>, entraîne une augmentation substantielle de la population de cellules fusiformes sur support plastique dès 24h de traitement, et suite à un traitement de 72h sur les deux types de MEC sécrétées *in vitro*. De manière intéressante, dans cet essai, nous avons observé moins de cellules fusiformes sur une MEC-T21 que sur une MEC-EUP après 72h de traitement  $TGF\alpha$ .

En culture, les cellules MDA-MB-468 présentent trois aspects morphologiques possibles : on peut observer des cellules circulaires, des cellules cuboïdes (polygonales) et des cellules allongées ou fusiformes (Fig. 26).

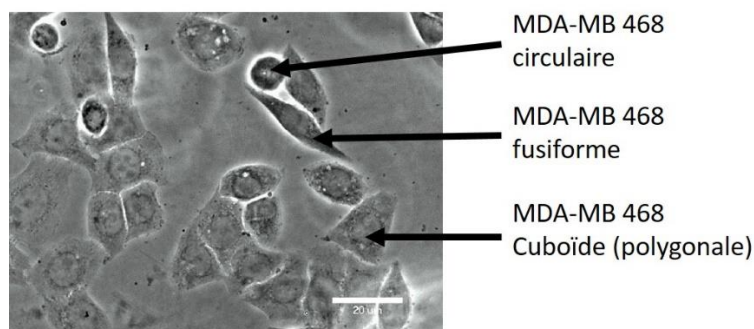


Figure 26 : Cellules MDA-MB 468 en microscopie à contraste de phase (X40) (photo personnelle)

Dans un modèle d'étude *in vitro* de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules MDA-MB-468 induite par l'EGF, Vimalathithan Devaraj et al. (2019) ont montré que les états cellulaires circulaires et fusiformes présentaient un phénotype intrinsèquement migratoire tandis que l'état de cellules cuboïdes correspondait à un phénotype non migratoire. Les auteurs ont utilisé un modèle mathématique pour estimer les trajectoires de changement d'état morphologique à partir des données d'imagerie. Pour les cellules traitées avec de l'EGF, une augmentation de la population de cellules fusiformes a été observée à 36h et le modèle de changement d'état morphologique montrait que cette augmentation était due majoritairement à la transition de cellules circulaires vers l'état fusiforme dans l'intervalle de 24h à 36h de traitement<sup>189</sup>. Dans les cellules MDA-MB-468, l'EGF a induit un changement transitoire dans la phosphorylation de l'EGFR, avec une augmentation très rapide de la forme phosphorylée suivie de sa diminution progressive. La signalisation EGF favorisant l'invasion cellulaire et les métastases par déphosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK), une molécule clé impliquée dans l'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire<sup>190</sup>, les auteurs ont montré que la dynamique temporelle de la phospho-FAK était corrélée avec la dynamique temporelle du phospho-EGFR et la dynamique de changement d'état morphologique des cellules<sup>189</sup>. Il est donc tout à fait envisageable qu'en présence d'une MEC comme support de culture, l'adhérence cellule-matrice, par l'intermédiaire de molécules clés, module des voies de signalisation impliquées dans les changements phénotypiques de type migratoire et invasif et rende compte de la présence d'une population de cellules fusiformes plus importante que sur plastique seul. Par ailleurs, il a été montré que la présence de composants matriciels pouvait induire ou moduler la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules tumorales. Des expériences *in vitro* sur des cellules de carcinome colorectal humain ont montré une induction de la TEM lorsque ces cellules ont été cultivées sur un substrat de collagène<sup>191</sup>. Dans des cellules épithéliales mammaires, le collagène de type I régulerait à la hausse l'expression de la N-cadhérine, établie pour faciliter la croissance tumorale<sup>192</sup>. Dans des cellules cancéreuses épithéliales pulmonaires et mammaires, la TEM est partiellement médiée par une expression accrue de FN<sup>193</sup>. L'observation d'une population moins importante de cellules fusiformes sur MEC-T21 que sur

une MEC contrôle pourrait également suggérer que la composition et/ou l'architecture de la MEC-T21 sécrétée *in vitro* pourrait interférer avec cette régulation phénotypique dépendante de l'ancrage. Cette observation suggère alors que les cellules se développant sur MEC-T21 pourrait également avoir des propriétés de croissance et de migration altérées.

c-1.2) Une MEC-T21 impacte l'expression génique de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules MDA-MB 468

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 2 de Gaëlle Salaun.

Nous nous sommes intéressés à l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules MDA-MB-468 au contact d'une MEC-T21. Nous avons également évalué l'impact d'une MEC-T21 sur l'expression de ces marqueurs lorsque les cellules MDA-MB 468 sont stimulées par du TGF $\alpha$ . Ainsi, nous avons étudié l'expression transcriptomique de gènes codant pour :

- 3 marqueurs épithéliaux : la E-Cadhérine (*CDH1*), l'Occludine (*OCLN1*) et la Claudine-1 (*CLDN1*)
- 3 marqueurs mésenchymateux : la N-Cadhérine (*CDH2*), la Vimentine (*VIM*) et la Fibronectine (*FN1*)

Pour cet essai, 100000 fibroblastes/cm<sup>2</sup> ont étéensemencés dans des puits d'une plaque de 24 puits et la culture a été réalisée pendant 7 jours avec changements réguliers du milieu de culture. Les fibroblastes ont été lysés avec 2% Triton X-100, pendant 30 min, puis avec du NH<sub>4</sub>OH à 0,05 N pendant 20 min. Puis, 100000 cellules MDA-MB 468/cm<sup>2</sup> ont étéensemencées sur la MEC sécrétée *in vitro* (MEC-T21 et MEC-EUP) ou sur le support plastique (P). Quarante-huit heures après leur ensemencement, les cellules MDA-MB 468 ont été privées de SVF pendant 24 heures. A 72 heures après leur ensemencement, les cellules ont été traitées avec du milieu complet contenant du TGF $\alpha$  (Recombinant Human TGF $\alpha$ , BioVision) à 50 ng/ml. Après une période de traitement 24h (J4), 48h (J5), 72h (J6) ou 96h (J7), les cellules MDA-MB 468 ont été trypsinées et culotées pour une conservation à -80°C jusqu'à extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux ont été extraits avec le réactif TRIzol™ (Invitrogen). Brièvement, après lyse des cellules par le TRIzol, du chloroforme est ajouté pour permettre de séparer la phase aqueuse, superficielle, contenant les ARN, de l'interphase (ADN) et de la phase organique (protéines). La phase aqueuse est ensuite mélangée à volume égal à de l'isopropanol pour permettre la précipitation des acides nucléiques. Après centrifugation, le culot d'acide nucléique est lavé avec de l'éthanol 70°. Les ARN totaux sont ensuite repris dans 20  $\mu$ L d'eau et dosés par spectrophotométrie. La synthèse de l'ADNc a été réalisée à partir de 1  $\mu$ g d'ARN total (Kits reverse transcription Superscript™, Invitrogen, et RNeasy™ pour purification ARN sur colonnes, Qiagen).

Les amorces amplifiant les ADNc d'intérêt ont été choisies à partir de publications et grâce au logiciel Primer 3-Blast. Le gène de référence choisi était le gène *GAPDH* qui est un gène classiquement utilisé pour la normalisation de l'expression de gènes dans le cadre de travaux portant sur la TEM. Toutes les réactions de qPCR ont été réalisées sur un LightCycler 480® (Roche) en plaques 96 puits. Pour chaque réaction, le volume final de la PCR était de 10 µl comprenant 5µl de SybrGreen I master® (Roche), 2 µl d'ADNc dilué, 1 µl du mélange d'amorces sens et anti-sens (2,5 µM) et 2 µl d'eau stérile. Pour chaque gène testé, chaque condition (cellules sur MEC-EUP, MEC-T21, « P », avec ou sans stimulation TGFα) a été mesurée en duplicate, à une dilution d'ADNc de 1/10. Une seule expérience a été réalisée.

L'étude de l'expression des gènes s'est faite par quantification relative (réalisée par la méthode de  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ ). Les résultats ont été exprimés par un rapport gène cible/gène de référence (*GAPDH*) de chaque échantillon normalisé par le rapport gène cible/gène de référence d'un échantillon appelé calibrateur permettant la comparaison des gènes entre eux. Dans ce travail, le calibrateur utilisé a été fonction de la nature du gène étudié. En effet, pour les gènes épithéliaux un ADNc issu de cellules tumorales MDA-MB 468 ont été utilisées, et pour les gènes mésenchymateux, un ADNc issu de fibroblastes. Un contrôle négatif (eau) était également inclu pour chaque gène.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata (version 13, StataCorp, College Station, Texas) en collaboration avec le Dr Bruno Pereira (PhD Biostatistique, Délégation Recherche Clinique & Innovations, CHU de Clermont-Ferrand). Les variables quantitatives sont décrites en termes d'effectifs, moyenne et écart-type associé ou médiane et intervalle inter-quartile, au regard de la distribution statistique (test de normalité de Shapiro-Wilk). Afin de prendre en compte le possible effet lié aux différentes plaques de culture, les analyses statistiques ont considérés des modèles mixtes permettant ainsi de modéliser la variabilité inter et intra plaque de culture. Les analyses, n'ayant pas à considérer ce possible effet, ont mis en œuvre les tests statistiques usuels de comparaison, à savoir anova (pour comparaison des différentes conditions (P, MEC-EUP, MEC-T21) ou test t de Student pour comparaison avec/sans stimulation par le TGFα) ou test non paramétrique de Kruskal-Wallis (respectivement test de Mann-Whitney) si les conditions de l'anova ne sont pas respectées (normalité et homoscedasticité étudiée par le test de Bartlett). Si approprié (p-value omnibus associée au test décrit précédemment <5%), un test post-hoc pour comparaisons multiples a été réalisé : test de Tukey-Kramer post anova ou test de Dunn post test de Kruskal-Wallis. Tous les tests statistiques ont été effectués au risque d'erreur de première espèce  $\alpha = 5\%$ .

## RESULTATS :

Concernant les gènes mésenchymateux, il s'est avéré que le gène *CDH2* codant la N-cadhérine n'a pas pu être amplifié et que le gène de la fibronectine (*FN1*) avait un niveau d'expression très faible rendant difficile l'interprétation des variations observées.

c-1.2.1) Une MEC-T21 modifie la régulation de l'expression génique de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux

Sur support P, l'expression des gènes épithéliaux *CLDN1*, *OCLN1*, *CDH1* a varié de façon similaire, à savoir avec une augmentation significative à partir de J6, suivie par une diminution de leur expression entre J6 et J7.

Sur une MEC-EUP, nous n'avons pas observé cette augmentation d'expression à partir de J6, l'expression de *CLDN1* est plutôt restée stable de J4 à J7. L'expression de *OCLN1* et *CDH1* est restée également stable entre J4 et J6 mais a chuté entre J6 et J7 ( $p=0,05$  pour *OCLN1* et  $p=0,05$  pour *CDH1*).

Pour les cellules ayant poussé sur MEC-T21, le niveau d'expression de *CLDN1* et *OCLN1* a été maximal à J6 (*CLDN1*  $p < 0,001$  ; *OCLN1*  $p < 0,001$ ) et une diminution significative de leur niveau d'expression a été observée entre J6 et J7 ( $p= 0,0002$  pour *CLDN1* et  $p < 0,001$  pour *OCLN1*). Ainsi, comme en l'absence de MEC (P), l'expression des gènes *OCLN1* et *CLDN1* a augmenté entre J4 et J6 puis a diminué entre J6 et J7 sur une MEC-T21. Le gène *CDH1* a présenté une expression stable entre J4 et J6 qui a eu tendance à diminué entre J6 et J7 sans atteindre la significativité statistique ( $p=0,07$ ) (Fig. 27.A)

Concernant le gène *VIM*, pour les cellules ayant poussé sur P, son expression a augmenté significativement de J4 à J5 ( $p < 0,01$ ) puis est restée stable entre J5 et J6 ( $p= 0,32$ ), et entre J6 et J7. Pour les cellules ayant poussé sur MEC-EUP, il y a eu également une augmentation significative de l'expression de *VIM* mais uniquement à partir de J4. Pour les cellules ayant poussé sur MEC-T21, l'augmentation du niveau d'expression de *VIM* a été significative à partir de J5 ( $p=0,01$ ) comme sur P (Fig. 27.B).

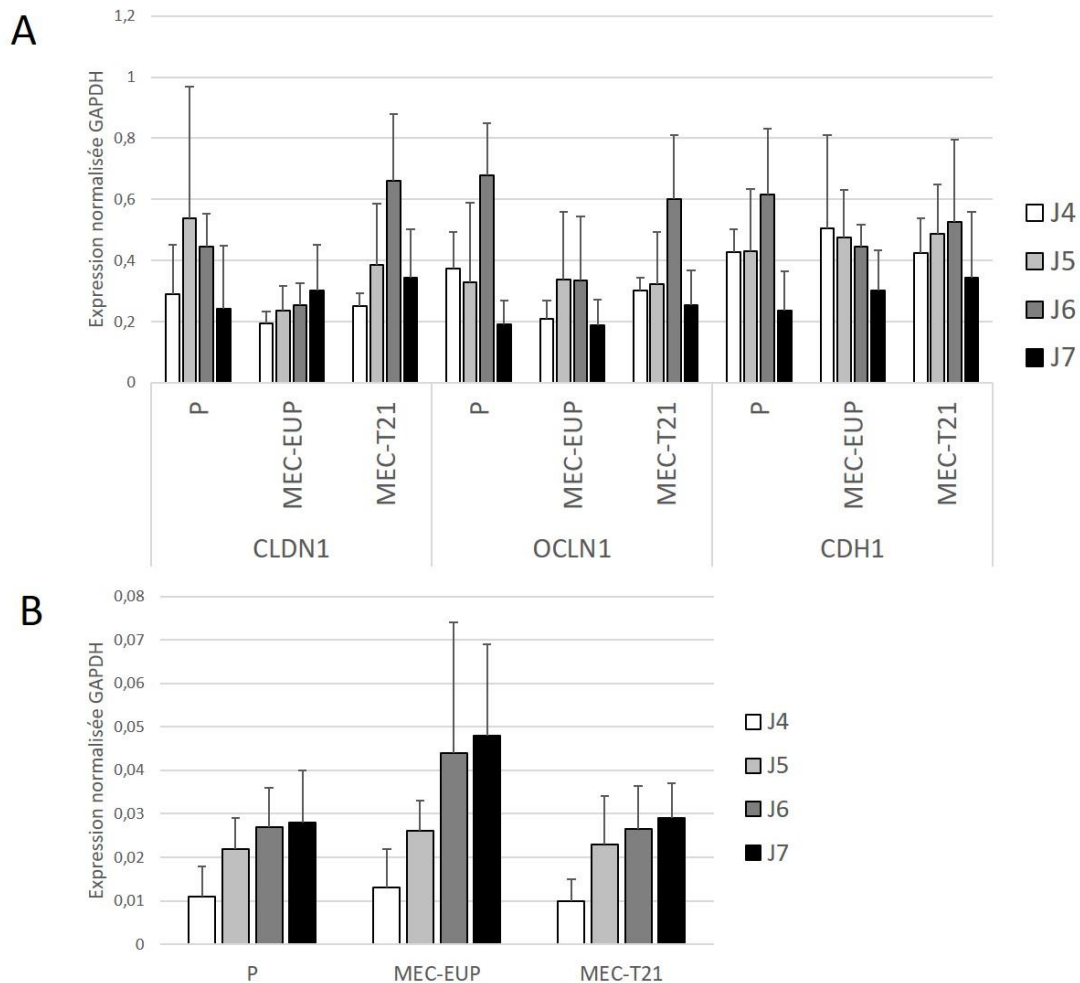


Figure 27 : Expression des gènes codant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux en fonction du support de culture. **A** : Expression normalisée des gènes *CLDN1*, *OCLN1* et *CDH1* sur P, MEC-EUP et MEC-T21 ; **B** : Expression normalisée du gène *VIM* sur P, MEC-EUP et MEC-T21.

D'après ces résultats, l'expression des gènes *OCLN/CDLN1* et *VIM* serait régulée, durant cette fenêtre de temps de culture, de manière différente selon le support de culture ; Sur P et MEC-T21, les gènes *OCLN/CDLN1* seraient *up*-régulés puis *down*-régulés tandis qu'en présence d'une MEC-EUP, cette *up*-régulation n'aurait pas lieu. Pour le gène *VIM*, la *up*-régulation observée à partir de J5 sur P et MEC-T21 se produirait un peu plus tardivement et de façon plus importante sur une MEC-EUP.

Ainsi les gènes *OCLN1*, *CLDN1* et *VIM* présentent un profil d'expression au cours du temps qui diffère sur P/MEC-T21 et MEC-EUP, suggérant un rôle des composants de la MEC dans la régulation de l'expression de ces gènes. Néanmoins, la régulation de ces gènes dans le temps semble être globalement identique sur P et MEC-T21 pouvant évoquer un effet potentiellement « nul » de la matrice T21 sur celle-ci. Ces données suggèrent que la régulation de l'expression de ces gènes serait « modifiée » lorsque les cellules sont au contact de la MEC-T21.

Les cellules interagissent avec les composants de la MEC par l'intermédiaire, entre autres, des sous-unités  $\beta$ 1-intégrines activant des voies de signalisation intracellulaire qui conduisent à l'expression ou à la répression de gènes. En présence d'une MEC de nature trisomique 21, il est difficile de dire si les interactions ligands/récepteurs sont modifiées ou si d'autres voies de signalisation entrent en conflit avec celles activées lorsque les cellules sont en contact d'une MEC euploïde.

#### c-1.2.2) Une MEC-T21 modifie la régulation EGFR-dépendante de l'expression du gène *VIM*

Pour les cellules stimulées par du  $TGF\alpha$  et ayant poussé sur P, le gène *CLDN1* a présenté une augmentation progressive de son niveau d'expression jusqu'à 72h de traitement ( $p=0,002$ ) puis une diminution au-delà ( $p= 0,0032$ ). Sur une MEC-EUP, le niveau d'expression de *CLDN1* a augmenté progressivement de 24h à 96h de traitement ( $p= 0,05$ ) sans diminution comme observé sur P. Sur MEC-T21, l'expression de *CLDN1* a augmenté de 24h à 72h de traitement ( $p= 0,05$ ) puis a diminué au delà sans que cette différence n'atteigne la significativité ( $p= 0,09$ ). Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour les quatre temps de traitement (24h, 48h, 72h, 96h), le niveau d'expression du gène *CLDN1* dépendant de l'activation des récepteurs EGFR était significativement plus faible sur une MEC, indépendamment du type, qu'en l'absence de MEC (P), et qu'il n'y avait pas de différence du niveau d'expression entre les deux types de MEC (Fig. 28).

Concernant le gène *OCLN1* sur plastique, celui-ci a présenté une expression stable entre 24h et 72h de traitement, qui a diminué au bout de 96h sans atteindre la significativité ( $p= 0,07$ ). Pour les cellules ayant poussé sur MEC-EUP, son expression a augmenté avec des traitements allant de 24h à 72h ( $p= 0,023$ ) avant de significativement diminuer avec 96h de traitement ( $p= 0,004$ ). Pour les cellules ayant poussé sur MEC-T21, son expression a augmenté sans atteindre la significativité statistique jusqu'à 72h de traitement, puis a diminué au-delà à nouveau sans atteindre la significativité statistique ( $p= 0,07$ ). Comme pour le gène *CLDN1*, il est intéressant de noter qu'avec 24h, 48h et 96h de traitement, le niveau d'expression du gène *OCLN1* dépendant de l'activation des récepteurs EGFR était significativement plus faible sur une MEC, qu'elle soit de type euploïde ou trisomie 21, et qu'il n'y avait pas de différence du niveau d'expression entre les deux types de MEC. Avec 72h de traitement, il n'y avait pas de différence significative de l'expression d'*OCLN1* entre les trois types de support mais nous avons rencontré une forte variabilité dans les données qui peut expliquer cette non significativité (Fig. 28).

Concernant le gène *CDH1* dans les cellules stimulées par le  $TGF\alpha$  sur P, son expression est restée stable quel que soit le temps de traitement. Pour les cellules ayant poussé sur une MEC-EUP,

l'expression est restée stable avec des traitements allant de 24h à 72h puis a diminué significativement au delà ( $p= 0,02$ ). Pour les cellules ayant poussé sur MEC-T21, l'expression de *CDH1* a augmenté avec le temps de traitement jusqu'à 72h de manière significative ( $p= 0,035$ ) puis a diminué significativement avec un traitement de 96h ( $p= 0,0003$ ).

Il n'y avait pas de différence significative du niveau d'expression de *CDH1* entre les trois types de support avec 24h de traitement  $TGF\alpha$ . Avec 48h de traitement, le niveau d'expression était moins important en présence de MEC mais la forte variabilité des données enregistrées pour l'expression de *CDH1* sur P ne permet pas d'affirmer ceci de façon définitive, la seule différence significative obtenue étant entre P et MEC-T21 ( $p= 0,039$ ). Avec 72h de traitement, aucune différence significative n'était retrouvée pour *CDH1* entre les trois types de support. Enfin, avec 96h de traitement, nous avons observé un niveau d'expression plus faible du gène quand les cellules sont au contact d'une MEC (MEC-EUP vs P,  $p= 0,006$  et MEC-T21 vs P,  $p= 0,001$ ) (Fig. 28).

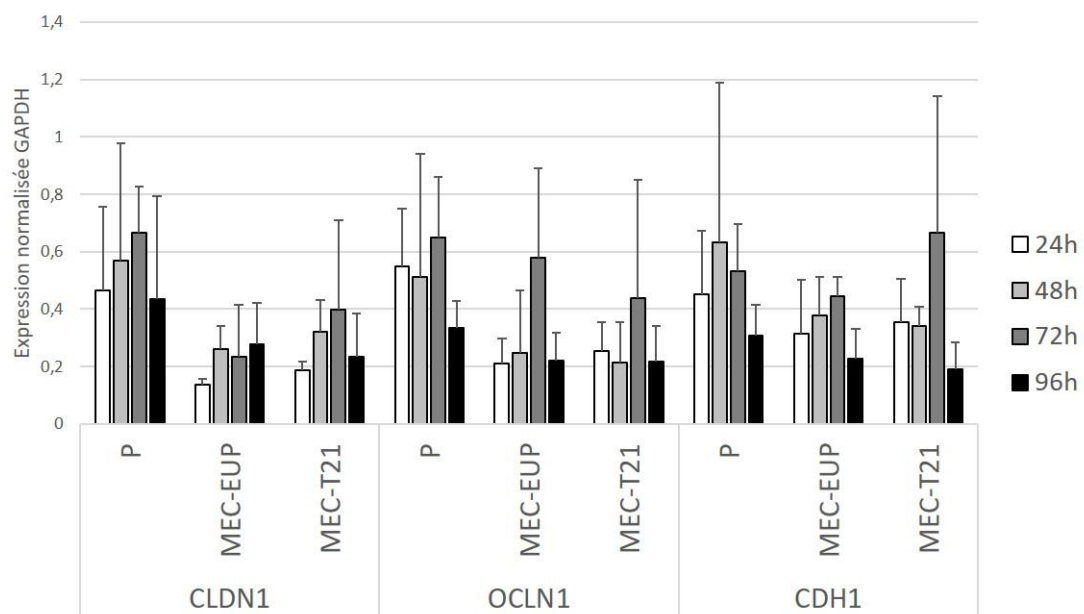


Figure 28 : Expression des gènes codant des marqueurs épithéliaux après 24h, 48h, 72h et 96h de traitement des cellules MDA-MB-468 par du  $TGF\alpha$ .

Au total, le gène *CLDN1* a présenté des niveaux d'expression plus faible quand les cellules étaient sur une MEC, qu'elle soit euploïde ou de type trisomie 21, avec des profils d'expression dans le temps comparables entre P et MEC-T21 et un profil différent sur MEC-EUP. Le gène *OCLN1* a présenté également des niveaux d'expression globalement plus faible sur les deux types de MEC, avec des profils d'expression dans le temps comparables entre MEC-EUP et MEC-T21. Pour le gène *CDH1*, la seule différence significative dans son niveau d'expression a été observé tardivement avec une expression plus faible sur les deux types de MEC qu'en leur absence. Par ailleurs, les profils d'expression dans le

temps étaient différents sur les 3 types de support.

Ainsi, pour les gènes *CLDN1/OCLN1*, les interactions cellules-MEC pourraient modifier la régulation dépendante de l'activation d'EGFR de ces gènes. Pour *CDH1*, cet effet serait aussi observé mais plus tardivement, au bout de 96h de traitement TGF $\alpha$ . Il ne semble pas y avoir un impact différent d'une MEC-T21 sur la régulation EGFR-dépendante de ces 3 gènes épithéliaux par rapport à une MEC-EUP.

Concernant l'expression du gène *VIM* dans les cellules ayant poussé sur plastique, celle-ci a augmenté à partir de 72h de traitement ( $p= 0,012$ ) pour retrouver le niveau d'expression observé avec un traitement de 24h, suggérant une diminution temporaire de l'expression du gène n'ayant pas été mise en évidence statistiquement. Cependant les données d'expression avec 24h de traitement présentaient une grande variabilité. Pour les cellules ayant poussé sur MEC-EUP, son expression a augmenté à partir de 48h de traitement ( $p= 0,04$ ) pour ensuite rester stable entre les traitements de 48h et 72h ( $p= 0,8$ ), avant de ré-augmenter en présence d'un traitement de 96h ( $p= 0,01$ ). Pour les cellules ayant poussé sur MEC-T21, l'augmentation de son expression a été significative à partir de 72h de traitement ( $p= 0,01$ ) puis au-delà l'expression est restée stable ( $p= 0,54$ ). Ainsi avec 72h de traitement, le niveau d'expression de *VIM* était significativement plus élevé sur MEC-T21 que sur MEC-EUP ( $p = 0,02$ ) et comparable à ce qui était observé sur P (Fig. 29).

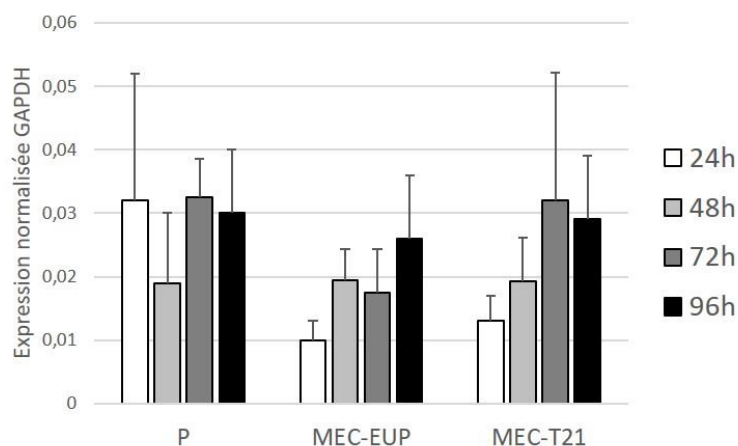


Figure 29 : Expression du gène *VIM* après 24h, 48h, 72h et 96h de traitement des cellules MDA-MB-468 par du TGF $\alpha$ .

Les cellules MDA-MB 468 réalisent *in vitro* une TEM par une stimulation de TGF $\alpha$  ou d'EGF, le TGF $\alpha$  étant un ligand du récepteur de l'EGF. Si une proportion importante de cellules réalise en même temps la TEM, nous aurions dû observer une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux associée à une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux en présence de TGF $\alpha$  par rapport aux cellules qui n'ont pas été stimulées. La sous-expression du gène *CDH1* codant l'E-Cadhérine et la sur-expression concomittante du gène *VIM* codant la vimentine sont des caractéristiques de la

transdifférenciation épithéliale des cellules tumorales qui réalisent la TEM *in vitro*. En comparant, pour chaque support de culture, et pour chacun des gènes, leur niveau d'expression sans et avec stimulation par du TGF $\alpha$  à chacun des temps de traitement, nous n'avons pas observé cette conjoncture dans l'expression des deux types de marqueurs (épithéliaux et mésenchymateux) lors de notre expérimentation (données non montrées). A la vue de nos données de morphologie cellulaire lorsque les cellules sont stimulées par du TGF $\alpha$ , nous aurions pu nous attendre à observer cette conjoncture d'expression entre les marqueurs épithéliaux et les marqueurs mésenchymateux avec 48h de traitement par TGF $\alpha$  dans les puits sur P puisque, dans ces conditions, la stimulation au TGF $\alpha$  avait entraîné le double de la population de cellules fusiformes. Il semble donc difficile de conclure que nos conditions expérimentales de stimulation par le TGF $\alpha$  aient permis d'induire une véritable TEM des cellules MDA-MB 468. Néanmoins la TEM est un phénomène dynamique et transitoire à l'origine de phénotypes intermédiaires. Ainsi, Dumont et al. (2013) ont étudié la TEM de cellules pré malignes vHMEC-ras0,5 lorsque celles-ci sont mises au contact d'une MEC sécrétée *in vitro* par des CAFs (*cancer-associated fibroblasts*). Ils ont montré que sur cette matrice, les cellules surexprimaient la N-cadhérine et la fibronectine tandis que l'expression de l'E-cadhérine n'était pas modifiée. Ils ont conclu que le changement de morphologie observé vers un aspect en « aiguille » (fusiforme) des cellules pré malignes ne constituait pas une réelle transition épithélio-mésenchymateuse en soi mais s'apparentait à un « phénotype mésenchymateux » induit par le contact des cellules avec la MEC sécrétée par les CAFs<sup>194</sup>. Par ailleurs, l'absence de dérégulation de l'E-Cadhérine au cours du processus de transdifférenciation épithéliale a également été observée *in vitro* pour d'autres types cellulaires soulignant la plasticité de ce processus et l'existence de phénotypes « TEM-like »<sup>195</sup>.

Cependant, nos résultats montrent pour le gène *VIM* un profil d'expression dans le temps différent sur MEC-EUP et MEC-T21. L'expression a augmenté dès 48h de traitement sur MEC-EUP, pour rester stable avant de réaugmenter à 96h de traitement. Le profil d'expression sur MEC-T21 semblait comparable à celui observé en l'absence de MEC (P), avec une augmentation à partir de 72h de traitement. Ces résultats suggèrent alors que les interactions cellules-MEC-T21 pourraient modifier la régulation EGFR-dépendante de *VIM* d'une façon différente des interactions cellules-MEC-EUP.

Il a été montré que la voie de signalisation JAK/STAT et les kinases de la famille Src (SFK) étaient impliquées dans la régulation de l'expression de *VIM* par l'EGF<sup>196</sup>. La fibronectine, une molécule adhésive de la MEC, peut par ailleurs directement activer le récepteur EGF<sup>197</sup>, mais également activer STAT3 indépendamment de la voie EGFR. STAT3 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreux gènes intervenant dans la prolifération, la survie cellulaire et la mobilité cellulaire et dont l'activation a été associée à la promotion du programme de la TEM<sup>198,199</sup>.

Il existe donc un lien entre la composition de la MEC, les liaisons cellule-MEC et l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse et l'ensemble de nos résultats, que ce soit sans stimulation par TGF $\alpha$  ou avec stimulation, sont en faveur d'une modification de ce lien en présence d'une MEC de type trisomique 21.

#### c-1.3) Une MEC-T21 n'impacte pas la migration cellulaire des cellules MDA-MB 468

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 1 de Victorine Passet et de thèse de Gaëlle Salaun.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact d'une MEC-T21 sécrétée *in vitro* sur la migration des cellules MDA-MB 468.

Pour cet essai, 100000 fibroblastes/cm<sup>2</sup> ont étéensemencés dans des puits d'une plaque de 24 puits. Les fibroblastes ont été mis en culture pendant 7 jours, avec changements réguliers du milieu de culture, puis décellularisés avec le protocole initial (protocole 1). 100000 cellules MDA-MB 468/cm<sup>2</sup> ont étéensemencées sur MEC-EUP, MEC-T21 ou dans des puits plastiques (P). Le test de blessure a été réalisé dans les puits après 6 jours de contact des cellules MDA-MB-468 sur les MEC. L'analyse de la migration a été réalisée à partir de 4 expériences indépendantes, 2 puits par support de culture (P, MEC-EUP, MEC-T21) et 3 blessures par puits. La mesure de l'air des blessures (en pixels) a été réalisée avec ImageJ à 0h, 2h, 4h et 6h après la blessure avec un cône stérile. Les résultats présentés sont les moyennes ( $\pm$  écart-type) des valeurs des aires normalisées sur l'aire à 0h.

#### RESULTATS :

Les résultats ont montré que lorsque les cellules MDA-MB-468 ont eu six jours de contact sur les supports de culture, il n'y avait pas de différence significative de la migration des cellules entre les différents supports (Fig. 30). Une tendance (non significative) à une migration plus lente des cellules lorsqu'elles sont sur une MEC sécrétée *in vitro* (EUP et T21) a été observée. La capacité migratoire de ces cellules est apparue identique sur MEC-T21 et MEC-EUP.

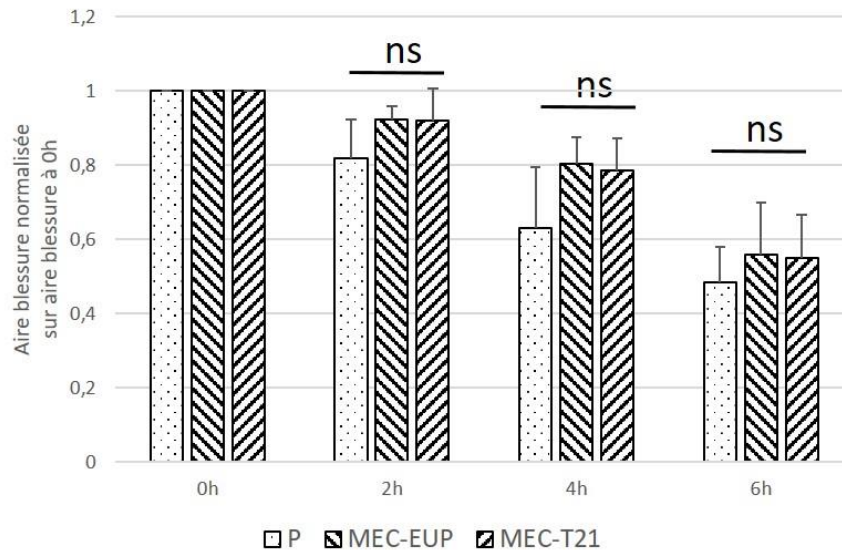


Figure 30 : Migration des cellules MDA-MB 468 en fonction du support de culture, MEC euploïde (MEC-EUP), MEC de type trisomie 21 (MEC-T21) ou plastique (P), déterminée par un test de blessure et analyse d'images (ImageJ). (ANOVA non paramétrique, test post-hoc de Dunn, ns : non significatif).

Ces résultats paraissent surprenants car dans les processus de migration cellulaire, la MEC agit comme un échafaudage, fournissant un support structural aux cellules ainsi que des points d'attache pour l'adhérence des cellules. En effet, les déterminants cellulaires de la migration comprennent l'adhérence au substrat, la restructuration du cytosquelette d'actine pour générer du mouvement et, dans le cadre de l'invasion des tissus, la sécrétion d'enzymes pour remodeler l'espace interstitiel afin de permettre le mouvement vers l'avant de la cellule migrante. De nombreuses études ont montré que des cellules cancéreuses migraient plus rapidement en présence de protéines matricielles purifiées comme celles présentes dans les membranes basales (collagène de type IV, fibronectine, laminine, vitronectine)<sup>200</sup> mais la littérature concernant la migration de cellules, cancéreuses ou non, sur des matrices produites par des fibroblastes *in vitro* n'est pas très fournie. Il a été montré que des kératinocytes migraient plus rapidement sur une MEC produite *in vitro* par des fibroblastes cutanés que sur un revêtement de collagène<sup>201</sup>. Des cellules tumorales mammaires migraient plus rapidement et de manière plus directionnelle sur une matrice fibreuse dérivée de cellules (fibroblastiques ?) que leurs homologues sur plastique. Ces changements de migration étaient corrélés à une diminution de la croissance cellulaire et à une augmentation de l'élongation des cellules<sup>202</sup>. La directionnalité de cellules cancéreuses a également été améliorée sur une MEC sécrétée par des CAFs (*cancer associated fibroblasts*) en comparaison aux cellules sur MEC produite par des fibroblastes de tissu sain tandis qu'il n'y avait pas de différence dans la vitesse de migration entre les deux types de MEC<sup>203</sup>.

Au cours du développement et de la progression du cancer, l'invasion et les métastases se produisent lorsque les cellules tumorales se disséminent à partir de la tumeur primaire, se propagent dans les systèmes circulatoire et lymphatique, envahissent les membranes basales et les parois endothéliales de ces vaisseaux et finalement colonisent des organes distants. La migration, l'invasion et l'adhérence cellulaires sont des étapes cruciales de ce processus. Les cellules cancéreuses utilisent différentes stratégies de déplacement : elles peuvent migrer individuellement ou collectivement. Les essais de migration par test de blessure, comme celui utilisé dans notre approche, permettent d'évaluer les capacités migratoires en mode collectif des cellules. Les données issues de ces tests permettent de déterminer la capacité de migration de masses cellulaires entières fondée généralement sur la vitesse de la fermeture de la zone de plaie. Cette approche n'est pas dédiée à l'observation du déplacement individuel des cellules qui peut se faire selon un mode amiboïde (cellules morphologiquement arrondies) ou mésenchymateux (cellules morphologiquement fibroblastoïdes) qui, même s'ils diffèrent dans leurs mécanismes moléculaires, sont beaucoup plus dépendants des interactions cellule-matrice que le mode collectif de migration des cellules<sup>204</sup>. Les approches expérimentales permettant l'évaluation des déplacements cellulaires à l'échelle de la cellule unique impliquent généralement de la microscopie sur cellules vivantes à intervalles de temps (time-lapse) et l'analyse de paramètres cellulaires individuels tels que la trajectoire (directionnalité) et la vitesse de déplacement.

#### c-2) Impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sur l'adhérence des cellules MDA-MB 468

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus d'expérimentations que j'ai réalisées. Des résultats en cours d'exploitation sont issus du Master 2 d'Alberto Delgado Monterroso.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact d'une MEC-T21 sur l'adhérence de la lignée d'adénocarcinome mammaire triple négatif MDA-MB 468.

Pour cet essai, 100000 fibroblastes/cm<sup>2</sup> ont étéensemencés dans des puits de plaques 96 puits. Les fibroblastes ont été mis en culture pendant 7 jours, avec changements réguliers du milieu de culture, puis décellularisés avec le protocole initial (protocole 1). 2x10<sup>4</sup> cellules MDA-MB 468 ont été mises à sédimenter sur une MEC-T21, MEC-EUP ou sur plastique (P) pendant 2h ou 4h avant la réalisation de deux lavages PBS. La confluence cellulaire a été déterminée avant et après les lavages grâce au système d'imagerie sur cellules vivantes Incucyte® (Sartorius). Dans chaque puits, cinq images de microscopie en phase ont été acquises à un grossissement x10 avant et après les lavages PBS. La capacité d'adhérence cellulaire a été évaluée en déterminant le différentiel de cellules adhérees avant et après les lavages PBS (en %). Les données ont été analysées par ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivie du test de Dunn. Une analyse par groupe a été effectuée par un test de Mann-Whitney.

L'expérience a été répétée quatre fois avec six puits par type de support de culture.

## RESULTATS :

Après 2h de sédimentation, les cellules MDA-MB-468 ont montré un attachement plus important sur une MEC sécrétée *in vitro* que sur support plastique sans atteindre néanmoins la significativité statistique (P vs MEC-EUP, moy ± SD : - 10,1% ± 1,0 vs - 6,8% ± 2,6, respectivement,  $p = 0,057$  et P vs MEC-T21, - 10,1% ± 1,0 vs - 6,8% ± 2,6, respectivement,  $p = 0,057$ ), tandis qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'adhérence des cellules entre une MEC-T21 et une MEC-EUP. Des résultats similaires ont été observés après quatre heures de sédimentation des cellules sur leur support de culture (ANOVA  $p=0,059$ ) (Fig. 31).

Ces résultats semblent montrer une meilleure adhérence des cellules en présence d'un support matriciel, cependant la composition et/ou l'architecture d'une MEC-T21 ne semblerait pas affecter la capacité d'adhérence de cette lignée tumorale mammaire *in vitro*.

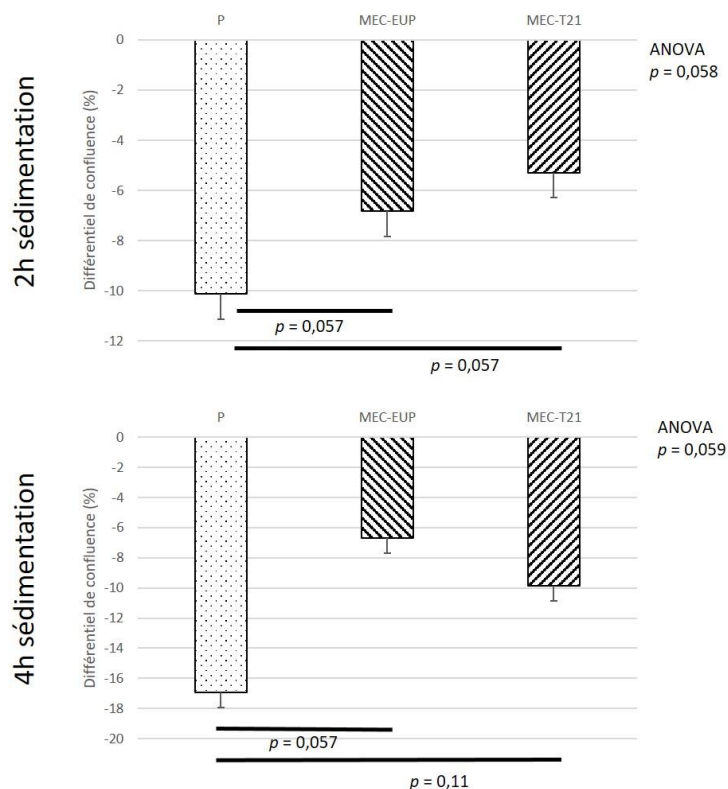


Figure 31 : Adhérence des cellules MDA-MB-468 en fonction du support de culture MEC euploïde (MEC-EUP), MEC de type trisomie 21 (MEC-T21) ou plastique (P), déterminée par un test d'attachement cellulaire et analyse Incucyte®. **A** : Différentiel (en %) de cellules adhérentes entre les lavages PBS après 2 heures de sédimentation des cellules. **B** : Différentiel (en %) de cellules adhérentes entre les lavages PBS après 4 heures de sédimentation des cellules.

Les interactions cellule-matrice fournissent non seulement un support physique à l'adhérence cellulaire, mais peuvent également agir comme des centres de signalisation « de l'extérieur vers l'intérieur » qui initient ou modulent une large gamme de cascades de signalisation intracellulaire. La liaison à la matrice environnante est souvent initiée par les intégrines, un groupe de protéines transmembranaires hétérodimériques constituées de 18 sous-unités  $\alpha$  et de 8 sous-unités  $\beta$ , dont les différentes combinaisons dictent leur spécificité à la MEC<sup>205</sup>. Bien que plusieurs paires de sous-unités d'intégrine  $\alpha$  et  $\beta$  puissent favoriser l'adhérence au même type de molécule de matrice extracellulaire, la force de leur association peut varier considérablement. Par exemple,  $\alpha\beta3$  et  $\alpha5\beta1$  peuvent se lier à la fibronectine, un des composants principaux des MEC sécrétées *in vitro* par des cellules, mais la force d'adhérence liée aux sous-unités  $\alpha5\beta1$  peut être six fois plus élevée<sup>206</sup>. Nos résultats, même si limités d'un point de vue statistique, confirment la meilleure adhérence des cellules lorsque celles-ci rencontrent des protéines matricielles comme substrat plutôt que le plastique de culture. Cependant, ils ne mettent pas en évidence une modification des forces d'adhérence, mesurées ici à l'échelle collective des cellules, par une MEC-T21.

Ce test d'attachement cellulaire a également été réalisé sur les lignées MCF7, BT-474 et MDA-MB-231 à partir d'une MEC sécrétée en 7 jours et d'une MEC sécrétée en 14 jours pour lesquelles les données sont en cours d'exploitation.

### c-3) Impact fonctionnel d'une MEC de type trisomie 21 sur la prolifération des cellules MDA-MB 468

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 1 de Justine Coste, Master 1 d'Alexia Mouttet et d'expérimentations réalisées par moi-même. Des résultats en cours d'exploitation sont issus du Master 2 d'Alberto Delgado Monterroso.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact d'une MEC-T21 sécrétée *in vitro* sur la prolifération des cellules MDA-MB- 468.

Pour cet essai, 100000 fibroblastes/cm<sup>2</sup> ont étéensemencés dans des puits de plaques 24 ou 96 puits. Les fibroblastes ont été mis en culture pendant 7 jours, avec changements réguliers du milieu de culture, puis décellularisés avec le protocole initial (protocole 1). Les cellules MDA-MB 468 ont étéensemencées à une densité de 30000 cellules/cm<sup>2</sup> (soit 60000 cellules/puits dans une plaque 24 puits et 9600 cellules/puits dans plaque 96 puits) et les plaques de cultures ont été placées dans l'Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius Göttingen, Germany). La culture a été poursuivie pendant quatre jours (96h) sans changement de milieu. Cinq images indépendantes de microscopie en phase ont été acquises systématiquement dans chaque puits, à un grossissement x10 toutes les 4 heures. La

prolifération cellulaire a été évaluée par le temps de doublement des cellules et le taux de confluence des cellules sur chacun des supports de culture.

Le temps de doublement des cellules a été déterminé à partir du pourcentage de confluence moyenné obtenu à 24h, 48h, 72h et 96h de culture. La valeur K (coefficient directeur de la droite) de la courbe de tendance exponentielle a été déterminée avec Excel, puis le temps de doublement a été calculé à partir de la formule  $=\ln(2) / K$  et comparé entre les cellules sur P et sur MEC (test Mann-Whitney,  $\alpha = 0,05$ , 95 % interval de confiance) et entre les trois supports (ANOVA non paramétrique,  $\alpha = 0,05$ , 95 % interval de confiance). Le taux de confluence a été déterminé en divisant la confluence obtenue à 48h, 72h et 96h sur la confluence obtenue à 24h.

Les données de confluence utilisées pour déterminer le temps de doublement et le taux de confluence sont issus de 6 expérimentations indépendantes, avec dans chacune des expérimentations au moins 3 puits par support de culture.

#### RESULTATS :

Lorsque les cellules sont au contact d'une MEC sécrétée *in vitro*, quel que soit son type, nous avons observé une augmentation du temps de doublement de la population cellulaire ( $p = 0,03$ ) (Fig. 32.A). En effet, le taux de confluence des cellules MDA-MB 468 à 48h, 72h et 96h de culture était significativement plus faible lorsque les cellules sont en prolifération sur une matrice sécrétée *in vitro* (Fig. 33.A). L'analyse de variance à un facteur n'a pas montré de différence significative dans le temps de doublement entre les trois groupes de support de culture malgré une tendance à un temps de doublement plus élevé quand les cellules sont sur une MEC-T21 (Fig. 32.B). Lorsque l'on regarde le taux de confluence des cellules à 48h et 72h de culture, le taux de confluence des cellules était significativement plus faible sur une MEC-T21 que sur P (test post-hoc de Dunn,  $p < 0,05$  pour les deux temps), il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre MEC-T21 et MEC-EUP malgré une tendance à un taux de confluence plus faible sur une MEC-T21 que sur une MEC-EUP (Fig 33.B).

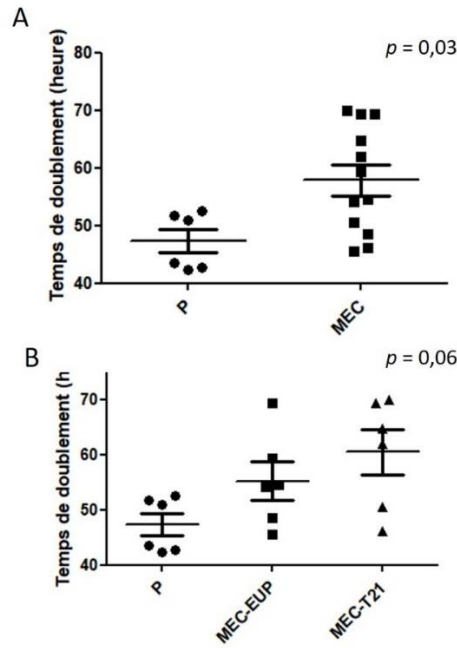


Figure 32 : Temps de doublement moyen des cellules MDA-MB 468 en fonction du support de culture MEC euploïde (MEC-EUP), MEC de type trisomie 21 (MEC-T21) ou plastique (P), déterminé par la confluence des cellules avec le système d'imagerie Incucyte®. **A** : Comparaison du temps de doublement moyen des cellules sur P ou une MEC sécrétée *in vitro* (test Mann-Whitney). **B** : Comparaison du temps de doublement moyen des cellules entre les trois types de support de culture (test Kruskal-Wallis).

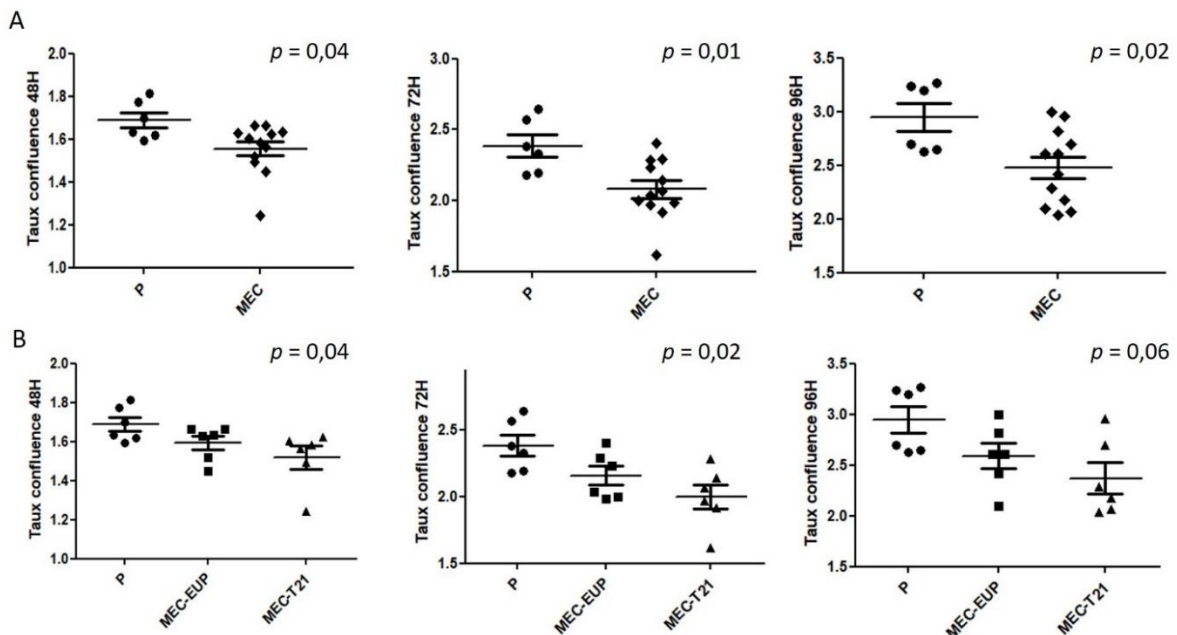


Figure 33 : Taux de confluence moyen des cellules MDA-MB 468 en fonction du support de culture. **A** : Comparaison du taux de confluence moyen des cellules sur P ou une MEC sécrétée *in vitro* (test Mann-Whitney). **B** : Comparaison du taux de confluence moyen des cellules entre les trois types de support de culture (test Kruskal-Wallis). Le taux de confluence correspond à la confluence obtenue à 48h, 72h et 96h rapportée sur la confluence obtenue à 24h de culture.

Observer une diminution de la croissance d'une population de cellules tumorales sur un support matriciel pourrait être contre-intuitif car des études ont montré, à l'inverse, que des cellules tumorales mammaires proliféraient davantage lorsque le support de culture était revêtu par une protéine fibreuse comme du collagène I ou de la fibronectine<sup>206</sup>. Néanmoins s'agissant ici de matrices plus complexes car issues de la sécrétion de fibroblastes, le comportement prolifératif des cellules peut être différent. Ainsi, la MEC dérivée de fibroblastes humains pulmonaires et cutanés a inhibé la croissance de lignées cellulaires de cancer du poumon<sup>207</sup> et la MEC dérivée de fibroblastes murins (NIH3T3) a impacté la croissance cellulaire de façon type-cellulaire dépendante : sur un panel de onze lignées cellulaires épithéliales de tumeurs humaines, une seule lignée avait vu sa croissance augmentée sur une MEC par rapport au support plastique de culture, les autres, dont trois lignées de cellules tumorales mammaires, avaient montré un ralentissement de leur croissance sur une MEC sécrétée *in vitro*<sup>174</sup>.

Nos données sont en faveur d'un ralentissement de la croissance des cellules MDA-MB 468 sur une MEC-T21 par rapport à une MEC-EUP même si celles-ci n'ont pas permis de dégager une différence significative au risque d'erreur  $\alpha=0,05$ . Elles sont néanmoins en cohérence avec les résultats de Bénard et al. (2005) qui avait montré une inhibition de la prolifération de la lignée tumorale mammaire MDA-MB 431 sur une MEC-T21 par rapport à une MEC-EUP sécrétées *in vitro* par des fibroblastes humains<sup>137</sup>. Il n'y avait pas d'inhibition de la croissance lorsque cette lignée cancéreuse mammaire était co-cultivée *in vitro* avec des fibroblastes T21 ou dans des xénogreffes chez des souris nudes<sup>137</sup>. De même, une diminution de la densité de cellules de neuroblastome non hyper-agressives (SK-N-SH et SK-N-As) avait été observée sur une MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes T21 mais pas pour la lignée IGR-N-91, cellules avec une forte amplification du gène MYC<sup>138</sup>. Nos données et celles précédemment publiées suggèrent que la MEC des individus avec un syndrome de Down n'est pas propice à la promotion de la prolifération de cellules tumorales.

Ce test de prolifération a également été réalisé sur les lignées MCF7, BT-474 et MDA-MB-231 à partir d'une MEC sécrétée en 14 jours pour lesquelles les données sont en cours d'exploitation.

#### d) Vers un modèle 3D sphéroïde

Les résultats présentés dans ce chapitre sont issus des travaux de Master 2 de My-Anne Wong. Ils ont été réalisés en collaboration avec le Groupe « Résistance » du Pr Mahchid Bamdad, de l'équipe ROBUST de l'UMR1240 IMoST.

Au cours de mes travaux, je me suis également intéressée au modèle de culture sphéroïde. J'ai essayé de développer un modèle de culture cellulaire 3D à partir de la lignée d'adénocarcinome mammaire triple négative MDA-MB 468, pour pouvoir étudier l'impact d'une MEC-T21 sur les cellules tumorales mammaires dans un contexte d'interactions cellules-MEC plus proche de l'*in vivo* que ce qui peut être reproduit en culture monocouche 2D.

L'émergence des modèles de culture 3D *in vitro* (modèles d'explant de tissu tumoral, modèles basés sur l'échafaudage, modèles microfluidiques, modèle tumoral multicellulaire 3D) a permis de remplacer les cultures cellulaires 2D et de se rapprocher au plus près des caractéristiques des tumeurs humaines. Parmi eux, le modèle tumoral multicellulaire 3D, plus communément appelé sphéroïde, est largement appliqué comme modèle en recherche cancéreuse du fait de sa capacité à mimer remarquablement l'organisation structurale des tumeurs solides. En effet, la désignation de sphéroïde provient de sa forme géométrique en sphère composée de cellules cancéreuses agrégées entre elles et formant trois couches distinctes : une zone proliférative en périphérie recouvrant une zone de quiescence qui elle-même recouvre un cœur nécrotique. Cette architecture en 3D a pour conséquence la création de gradients en nutriment, en gaz (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>), et en pH semblables à ceux retrouvés dans les tumeurs solides *in vivo*. Différentes méthodes existent pour générer des sphéroïdes de manière rapide et reproductible, dont la méthode de Liquid Overlay Technique (LOT). La LOT est une méthode simple et peu coûteuse qui consiste à ensemercer des cellules sur une surface non adhérente. Les cellules y établissent des interactions cellule-cellule plus importantes que les interactions cellule-surface, favorisant par conséquent l'agrégation des cellules en sphéroïde individualisé dans un puits de culture<sup>208</sup>. Froehlich K. et al. (2016) ont étudié la formation de sphéroïdes à partir de différentes lignées cellulaires cancéreuses mammaires, dont la lignée MDA-MB-231 qui est une lignée triple-négative se rapprochant le plus des cellules MDA-MB-468, suivant différentes méthodes et conditions<sup>209</sup>. Avec cette lignée, seule l'approche expérimentale de la LOT dans une microplaque Cellstar® Cell-Repellent Surface de 96 puits en forme de U additionnée de 3,5% de Matrigel permettait d'obtenir des sphéroïdes.

L'approche expérimentale de LOT, appliquée à la culture cellulaire 3D en sphéroïde de la lignée MDA-MB 231 avait également été utilisée dans le groupe « Résistance » dirigé par le Pr Mahchid Bamdad dans mon unité de Recherche IMoST<sup>210</sup>. Ce fut alors l'occasion d'initier une collaboration scientifique

avec ce groupe pour la mise au point du protocole de culture 3D de la lignée MDA-MB 468 pour mon modèle d'étude.

La mise au point du protocole de culture 3D de la lignée MDA-MB 468 a nécessité de déterminer la concentration finale en Geltrex® (en %) et la concentration de cellules MDA-MB 468 optimales pour la formation de sphéroïdes évolutifs.

Afin de déterminer la concentration finale (en %) de Geltrex® la plus optimale pour obtenir une structure cellulaire 3D de type sphéroïde, 1000 cellules MDA-MB 468 par puits ont étéensemencées dans une microplaque P96 « Ultra-Low-Attachment » (Corning® Costar®) au jour 0 (J0). Quatre heures après ensemencement, différentes concentrations en Geltrex® ont été testées (0,5% à 3%) et comparées avec la culture cellulaire 3D contrôle sans Geltrex® (0% Geltrex®). La morphologie et le diamètre des structures cellulaires ont été évalués de J1 à J14 par microscopie optique (CFM-BDS-200 Realux Cofemo) et un appareil doté d'un système de caméra connecté à un ordinateur (Cytation3MV™ avec le logiciel Gen5™). A J1, la lignée MDA-MB-468 n'était pas capable de former spontanément un sphéroïde sans Geltrex® ; Les cellules s'agrégeaient en une sphère de type « perte d'agrégat » sans avoir un contact cellule-cellule fort qui puisse permettre une compaction (Fig. 34.A). En présence de 0,5% à 2% de Geltrex®, les structures cellulaires 3D prenaient une forme sphérique d'aspect plus compact et agrégé (forme d'« agrégat compacté ») sans que la compaction ne soit totalement complète (contour irrégulier) (Fig. 34.B), tandis qu'en présence de 2,5% et 3% de Geltrex®, des structures cellulaires de type sphéroïde, bien compactes à bordure lisse, ont pu être obtenues (Fig. 34.C).

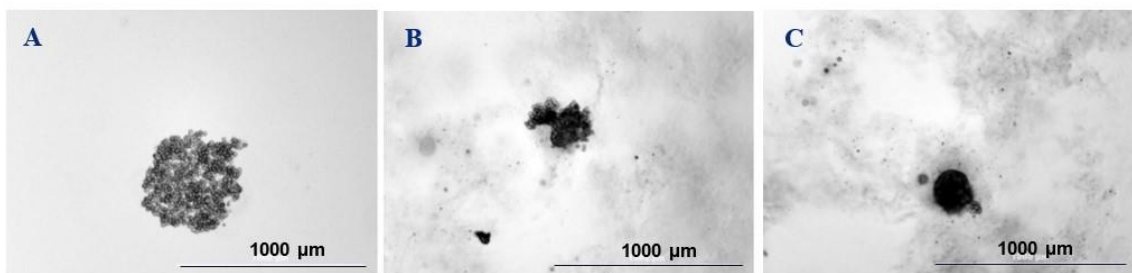


Figure 34 : Profils morphologiques de la formation des structures cellulaires 3D MDA-MB-468 observés au Cytation3MV™ à J1. Structures cellulaires 3D produites à partir de 1000 cellules ensemencées dans un puits (microplaque « Ultra-Low-Attachment »). **A** : Condition à 0% Geltrex® avec un profil de type “perte d'agrégat”, **B** : Condition à 1,5% Geltrex® avec un profil de type “agrégat compacté” à bord irrégulier, **C** : Condition à 2,5% Geltrex® avec un profil de type “sphéroïde” considéré comme une masse cellulaire compactée à bord lisse.

La culture a été poursuivie jusqu'à J14 pour suivre l'évolution en taille des structures cellulaires 3D (croissance) et évaluer la compaction de la structure 3D. A partir de J4, les agrégats compactés et les sphéroïdes obtenus ont commencé à se désagréger sur leur pourtour empêchant une mesure fiable de leur diamètre. Les structures cellulaires 3D n'ont d'ailleurs pas pu être maintenues jusqu'à J14. En raison de l'imprécision de la mesure de leur diamètre dès J4, les résultats présentés sont ceux obtenus entre J1 et J3 (Fig. 35). Avec 2,5% et 3% de Geltrex®, le diamètre des structures cellulaires 3D MDA-MB-468 était significativement plus petit que lorsque les cellules sont en présence d'une concentration plus faible en Geltrex® à J2 et J3 :  $240 \pm 26 \mu\text{m}$  pour 2,5% Geltrex® à J2 ( $p=0,004$ ) et  $289 \pm 26 \mu\text{m}$  à J3 ( $p=0,01$ ) ;  $236 \pm 56 \mu\text{m}$  pour 3% Geltrex® à J2 ( $p=0,003$ ) et  $294 \pm 51 \mu\text{m}$  à J3 ( $p=0,02$ ). Ces résultats suggèrent une meilleure compaction des structures cellulaires 3D avec 2,5% ou 3% de Geltrex®. Le choix de la concentration en Geltrex® pour le développement de sphéroïdes MDA-MB-468 s'est donc porté sur 2,5% ou 3% de Geltrex®.

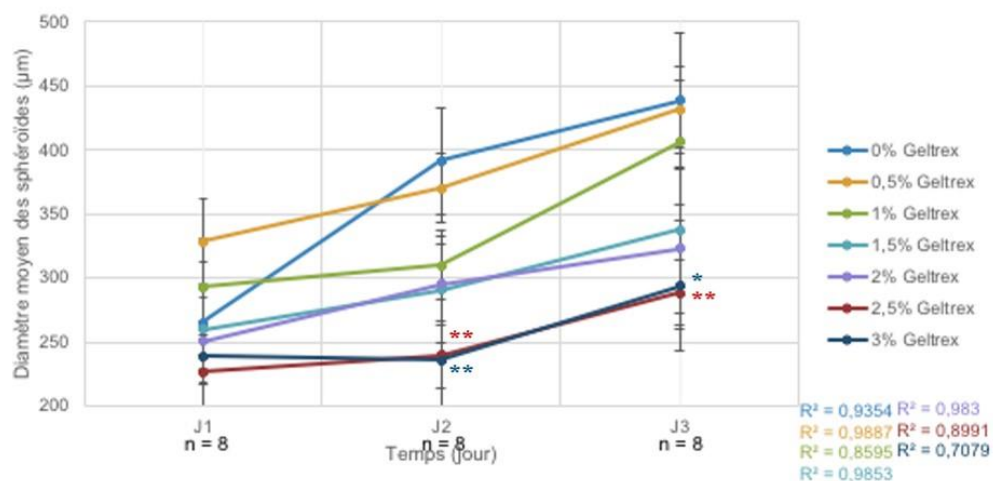


Figure 35 : Suivi du diamètre moyen des structures cellulaires 3D MDA-MB 468, entre J1 et J3, à partir de 1000 cellulesensemencées en présence de différentes concentrations en Geltrex®. n= nombre de structures cellulaires 3D. \*  $p=0,02$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

Pour déterminer la quantité initiale de cellules MDA-MB 468 la plus optimale pour obtenir une structure cellulaire sphéroïde, 200 à 10 000 cellules MDA-MB 468 ont étéensemencées par puits et cultivées avec 2% de Geltrex. Le diamètre des structures cellulaires 3D a été mesuré tous les jours de J1 à J14 au Cytation3MV™. En raison de la non fiabilité des mesures après J4, les résultats obtenus uniquement entre J1 et J3 sont présentés (Fig. 36).

A J1, c'est-à-dire 24h aprèsensemencement des cellules, une tendance linéaire se dégageait entre le diamètre et le nombre de cellulesensemencées :  $210 \mu\text{m}$  pour 200 cellules,  $270 \pm 35 \mu\text{m}$  pour 1000

cellules,  $352 \pm 25 \mu\text{m}$  pour 2000 cellules et  $470 \pm 40 \mu\text{m}$  pour 5000 cellules et  $660 \pm 101 \mu\text{m}$  pour 10 000 cellules. Après J1, le diamètre des structures cellulaires 3D a continué à augmenter significativement pour 2000 cellules et 5000 cellules. L'analyse en sous-groupe (nombre de cellules initiales) montrait une différence significative du diamètre moyen à J2 et J3 vs J1 pour 2000 cellules ( $388 \pm 35 \mu\text{m}$  pour 2000 cellules à J2 ( $p=0,009$ ) et  $451 \pm 53 \mu\text{m}$  à J3 ( $p<0,001$ )) et à J3 vs J1 pour 5000 cellules ( $572 \pm 61 \mu\text{m}$  pour 5000 cellules à J3 ( $p=0,001$ )). L'augmentation de taille dans le temps, obtenue avec 2000 et 5000 cellules initiales, suggère un état prolifératif de ces structures cellulaires 3D. Le choix du nombre initial de cellules à ensemercer par puits pour le développement de sphéroïdes MDA-MB-468 ayant poussé sur une MEC produite *in vitro* (MEC-EUP/MEC-T21) s'est donc porté sur 2000 et 5000 cellules.

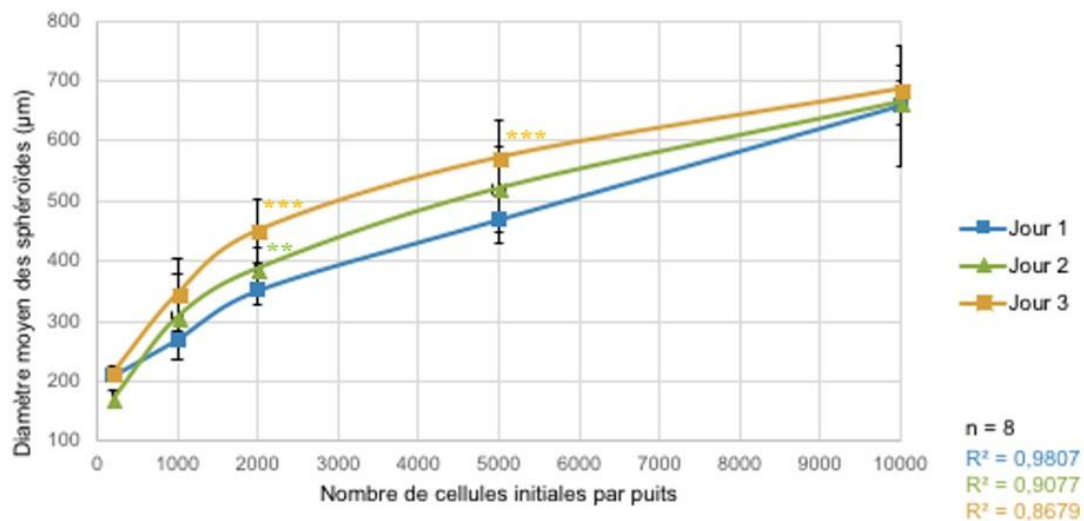


Figure 36 : Suivi de la croissance des sphéroïdes MDA-MB-468 au cours du temps dans un milieu avec 2% Geltrex®. \*\* $p \leq 0,01$ . \*\*\* $p \leq 0,001$

Nous avons également réalisé un test de viabilité cellulaire sur les structures cellulaires formées à J7 et J14 avec le kit Live/Dead® (Viability/Cytotoxicity kit, Molecular Probes™) qui utilise la calcéine-AM et l'éthidium homodimère-1 (ethD-1), les acquisitions d'images ont été réalisées au Cytation3MV™ et le logiciel Gen5™ (canaux GFP et PI). Les résultats ont montré que, quelle que soit la quantité initiale de cellules ensemençées testée, les structures cellulaires 3D n'étaient pas assez compactes en terme de densité, la zone nécrotique attendue au centre du sphéroïde n'étant pas observée. En effet, la présence d'une zone « noire » observée au centre des structures suggèrerait une absence de cellules. Par ailleurs, le marquage vert des cellules vivantes en périphérie permet d'observer des cellules qui se détachent plus ou moins par amas (Fig. 37).

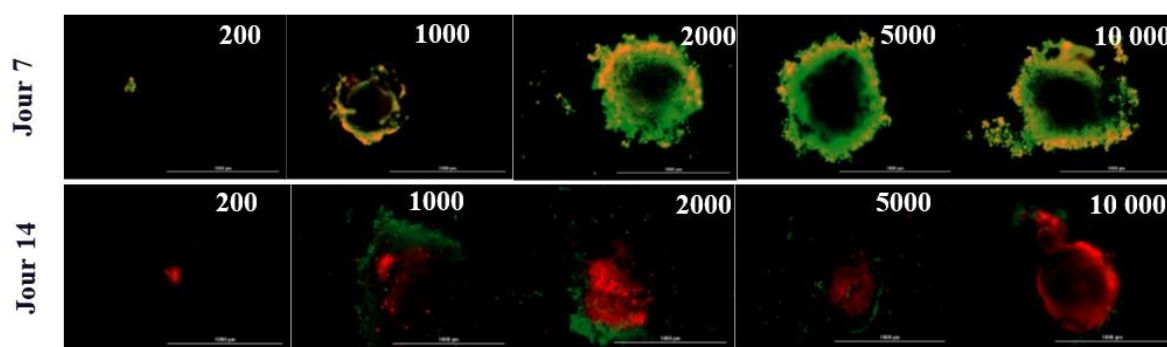


Figure 37 : Test de viabilité cellulaire des structures cellulaires 3D générées à partir de différentes quantités initiales de cellules MDA-MB-468. Le marquage vert indique les cellules viables (pénétration de la calcéine-AM) et le marquage rouge les cellules mortes (pénétration de l'ethD-1).

Pour le développement de structures cellulaires 3D MDA-MB 468, nous avons utilisé des cellules MDA-MB 468 qui ont été mises au contact avec la MEC sécrétée *in vitro* pendant 48h.

Les MDA-MB 468 qui ont poussée sur MEC-T21, MEC-EUP ou sur P ont étéensemencées à raison de 2000 cellules ou 5000 cellules par puits et avec 0%, 2,5% et 3% de Geltrex®. Le diamètre des structures cellulaires 3D a été mesuré tous les jours de J1 à J14 au Cytation3MV™ mais les résultats sont présentés uniquement jusqu'à J3.

Avec 2000 cellulesensemencées, nous avons observé une diminution significative du diamètre moyen des structures cellulaires 3D obtenus à partir des MDA-MB-468 ayant été au contact des MEC-T21 et MEC-EUP par rapport au diamètre des structures obtenues à partir de cellules sur plastique (condition de référence), ceci quel que soit le temps d'observation, et en présence de 2,5% et 3% Geltrex®:  $223 \pm 10 \mu\text{m}$  pour MEC-T21,  $211 \pm 31 \mu\text{m}$  pour MEC-EUP et  $395 \pm 9 \mu\text{m}$  sur P à J1 en présence de 2,5% Geltrex® ( $p=0,005$ ) ;  $211 \pm 14 \mu\text{m}$  pour MEC-T21,  $203 \pm 15 \mu\text{m}$  pour MEC- EUP et  $358 \pm 25 \mu\text{m}$  sur P à J2 en présence de 2,5% Geltrex® ( $p=0,003$ ) ;  $229 \pm 37 \mu\text{m}$  pour MEC-T21,  $275 \pm 81 \mu\text{m}$  pour MEC-EUP et  $412 \pm 19 \mu\text{m}$  sur P à J3 en présence de 2,5% Geltrex® ( $p=0,006$ ) (Fig. 38);  $212 \pm 10 \mu\text{m}$  pour MEC-T21,  $236 \pm 15 \mu\text{m}$  pour MEC-EUP et  $386 \pm 17 \mu\text{m}$  sur P à J1 en présence de 3% Geltrex® ( $p=0,002$ );  $232 \pm 27 \mu\text{m}$  pour MEC-T21,  $228 \pm 24 \mu\text{m}$  pour MEC-EUP et  $332 \pm 18 \mu\text{m}$  sur P à J2 en présence de 3% Geltrex®( $p=0,004$ );  $258 \pm 29 \mu\text{m}$  pour MEC-T21,  $244 \pm 43 \mu\text{m}$  pour MEC-EUP et  $372 \pm 22 \mu\text{m}$  sur P à J3 en présence de 3% Geltrex® ( $p=0,004$ ).

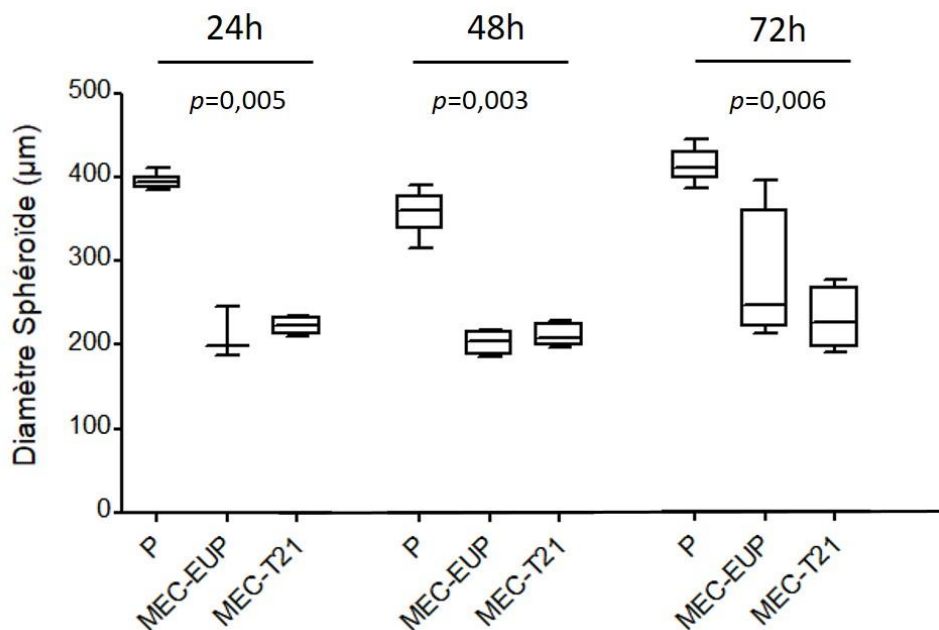


Figure 38 : Diamètre moyen des structures cellulaires 3D à partir de MDA-MB-468 ayant poussée (ou non) sur une MEC (EUP/T21) produite *in vitro* avec 2,5% de Geltrex® et 2000 cellulesensemencées. \*\* $p \leq 0,01$ .

D'un point de vue morphologique, que ce soit avec 2,5% ou 3% de Geltrex®, les structures cellulaires 3D issues des MDA-MB-468 contrôles (i.e ayant poussé sur plastique) sont bien rondes, compactes et à bord lisse. Les structures cellulaires 3D issues des MDA-MB-468 ayant été mises au contact d'une MEC, qu'elle soit de type EUP ou T21, sont compactées mais leur bord semble plus irrégulier (Fig. 39).

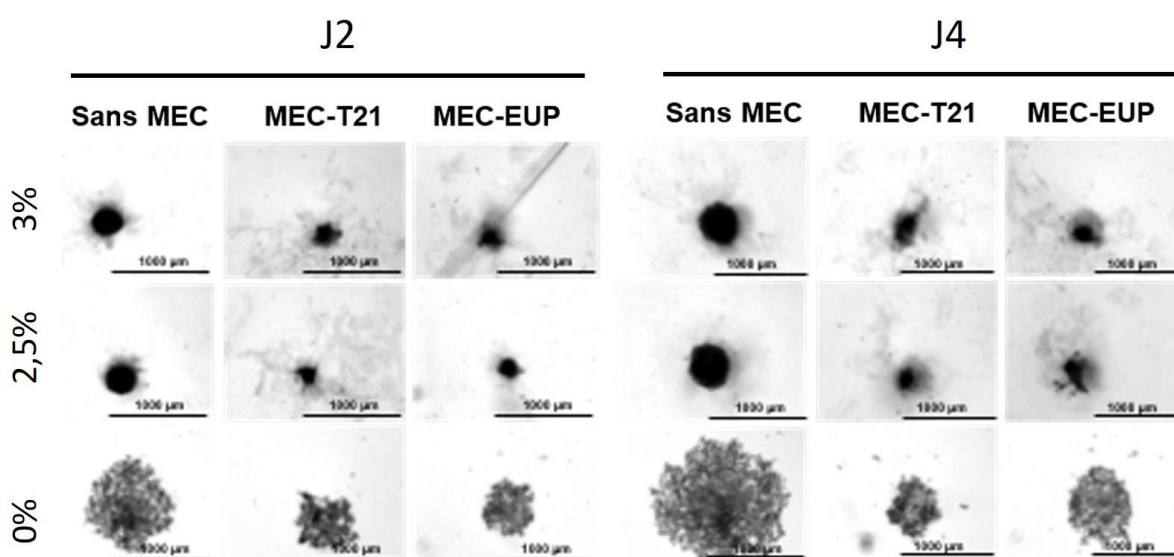


Figure 39 : Profil morphologique des structures cellulaires 3D issues de MDA-MB-468 ayant été mises au contact d'une MEC-EUP ou T21 observé au Cytation3MV™ à J2 et J4 (2000 cellulesensemencées,

0%, 2,5% ou 3% Geltrex®).

Avec 5000 cellules, des résultats similaires ont été observés, à savoir une diminution significative du diamètre moyen des structures cellulaires 3D issues des MDA-MB 468 qui ont poussé sur MEC-T21 et MEC-EUP par rapport à la condition contrôle, et ceci quel que soit le temps d'observation en présence de 2,5% et 3% de Geltrex®. Les données de morphologie des structures cellulaires 3D obtenues avec 5000 cellules étaient également similaires à ce qui a été observé avec 2000 cellules (données non montrées).

D'après nos résultats, les sphéroïdes de cellules MDA-MB 468 formés en présence de Geltrex® présentent une perte de compaction au-delà de 72h de culture avec un détachement important des cellules périphériques.

Ivascu et al. (2007) ont généré des sphéroïdes MDA-MB-468 avec 5000 cellulesensemencées en présence de 2,5% de Matrigel™ (rBM, matrice commerciale) après 24h de culture. Dans cette étude, la morphologie des sphéroïdes n'a été étudiée que sur une période de culture de 72h uniquement. Les auteurs ont montré que les cellules MDA-MB 468 avaient un profil d'adhérence cellulaire particulièrement complexe contrairement à d'autres lignées tumorales mammaires. Pour identifier quelles protéines d'adhérence cellulaire étaient impliquées dans la formation de sphéroïdes spontanées et de sphéroïdes induits par le Matrigel™, l'expression de la E-cadhérine, N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine a été inhibée par des anticorps et siRNA et la morphologie des sphéroïdes a été étudiée après 3h, 24h, 48h et 72h de culture. Les résultats ont montré que les cellules MDA-MB-468, en absence de Matrigel™, prenaient une forme d'agrégats non compactés et n'étaient pas capables de former spontanément des sphéroïdes du fait qu'elles avaient un niveau d'expression faible en E-cadhérine, tandis que les cellules qui expriment fortement la E-cadhérine à leur surface étaient capables de générer des sphéroïdes de façon spontanée. Cependant, lorsque les cellules MDA-MB 468 (5000 cellules) étaient mises en culture avec 2,5% de Matrigel™, celles-ci adoptaient une morphologie de sphéroïde 24h après ensemencement. Les auteurs expliquent que les cellules MDA-MB 468 nécessitent l'intervention à la fois de la E-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine et l'interaction des protéines de la matrice pour former des sphéroïdes. Ils suggèrent également que pour cette lignée, les interactions récepteur/protéine de la MEC activeraient des voies de signalisations liées aux  $\beta$ 1-intégrines, qui à leur tour pourraient stimuler l'adhérence intercellulaire médiée par la E-cadhérine<sup>211</sup>.

En conclusion, notre modèle sphéroïde avec la lignée MDA-MB 468 ayant été au contact d'une MEC sécrétée *in vitro* n'est pas complètement achevé. Nos résultats montrent que les cellules tumorales MDA-MB 468, préalablement mises au contact d'une MEC-T21 ou MEC-EUP pendant 48h, ont généré, en présence de Geltrex®, des agrégats cellulaires compacts de petite taille avec un contour d'aspect

irrégulier de J1 à J3 après ensemencement. Cette morphologie pourrait être causée par un comportement d'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice différent en présence de composants matriciels issus de fibroblastes en plus de ceux de type membrane basale apportés par le Geltrex®. Cette piste reste à explorer.

## 4.4 Bilan et perspectives de recherche

### 4.4.1 Projet de recherche fondamentale

Mon projet de recherche fondamental à court terme est de finaliser les travaux initiés sur les impacts d'une MEC de type trisomie 21 afin de pouvoir les publier.

Mes résultats actuels montrent qu'une MEC-T21 d'origine cutanée (fibroblastes dermiques) altère *in vitro* la prolifération des cellules d'adénocarcinome mammaire triple-négatif (MDA-MB 468), mais n'aurait pas d'impact sur la migration collective et l'adhérence de ces cellules. Lorsque l'on stimule la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules par du TGF $\alpha$ , nous avons observé moins de cellules fusiformes sur une MEC-T21 (avec 72h de traitement) sans que ce changement morphologique puisse être associé à plus d'expression de marqueurs épithéliaux et moins d'expression de marqueurs mésenchymateux sur le plan transcriptomique. Nos résultats d'expression génique de ces marqueurs sont néanmoins en faveur d'une régulation différentielle de ces gènes sur une MEC-T21.

#### 4.4.1.1 Caractérisation du modèle de MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes dermiques

##### 4.4.1.1.1 Matrice extracellulaire sécrétée *in vitro* : origine dermique versus mammaire

Le modèle de MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes dermiques peut-il refléter ce qui se produit *in vivo* dans les tissus mammaires de femmes avec un syndrome de Down, pour lesquelles il a été montré un risque réduit du cancer du sein ? Vraisemblablement pas, puisqu'il n'est pas attendu que la composition et l'organisation architecturale de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif mammaire soient comparables à celles d'une matrice extracellulaire dermique. Il est cependant très difficile de disposer de fibroblastes mammaires trisomiques 21 d'origine humaine lié au fait que les fibroblastes mammaires sont généralement isolés de tissus mammaires sains à distance d'un site tumoral lors d'un acte de chirurgie mammaire conservatrice. Dans l'objectif de s'assurer que le modèle de MEC dermique peut convenir pour étudier le comportement de cellules tumorales mammaires, nous souhaitons vérifier que les comportements cellulaires sont comparables sur une MEC dermique euploïde et une MEC mammaire euploïde. Nous avons d'ores et déjà identifié une différence dans l'aspect du réseau collagénique et la résistance mécanique d'une MEC mammaire par rapport aux MEC dermiques sécrétées *in vitro*. Nos conditions actuelles de sécrétion et de décellularisation ne permettent pas de garantir l'intégrité de la MEC mammaire malgré l'augmentation du temps de sécrétion de MEC par une culture de 14 jours des fibroblastes et une optimisation du protocole de

décellularisation limitant notamment le nombre de mouvements liquidiens. Nous allons donc poursuivre l'optimisation de ce protocole en testant par exemple d'autres méthodes de décellularisation (ex chélation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ) et une méthode permettant de faire adhérer la MEC au support plastique (ex : gélatine).

#### 4.4.1.1.2 Caractérisation de la MEC sécrétée *in vitro* par des fibroblastes 21

Un autre point important de ce projet est de pouvoir lier les caractéristiques de la MEC-T21 aux perturbations cellulaires mises en évidence, en l'occurrence ici de la prolifération des cellules MDA-MB 468. En effet, de façon générale, l'abondance relative et l'organisation spatiale des constituants d'une matrice extracellulaire lui confèrent des propriétés physiques et biochimiques uniques. Ces propriétés, par exemple la rigidité ou sa porosité, affectent le comportement cellulaire et contribuent activement à l'homéostasie tissulaire<sup>212</sup>. Dans les tissus humains, il est clairement démontré que ceux de personnes atteintes d'un syndrome de Down présente une matrice extracellulaire différente dans sa composition et son organisation architecturale.

Nous avons déjà observé qu'une MEC-T21 issue de 7 jours de culture des fibroblastes présente un maillage plus lâche et des faisceaux de fibres collagéniques plus épais en comparaison à un maillage plus compact et des faisceaux plus fins pour une MEC euploïde. Avec 14 jours de sécrétion, l'aspect des deux MEC devenait comparable avec néanmoins un réseau qui paraissait plus lâche et moins régulier pour la MEC-T21. La MEC-T21 présente la même concentration en protéines totales que la MEC-EUP qu'elles aient été sécrétées en 7 jours ou 14 jours, suggérant un dépôt de protéines matricielles comparable sur le plan quantitatif, mais dont l'abondance relative pourrait varier selon le composant. D'après la littérature, nous pouvons nous attendre au minimum à une augmentation de la sécrétion de collagène VI et d'acide hyaluronique. Pour les autres types de composants, fibronectine et autres types de collagènes, une organisation architecturale différente pourrait être rencontrée dans une MEC-T21 sécrétée *in vitro*.

Nous ferons appel à des méthodes immuno-chimiques (Immunofluorescence, western blot) pour évaluer l'abondance du collagène VI et de la fibronectine. Nous allons réaliser de l'imagerie cellulaire confocale par immunofluorescence pour notamment observer l'aspect de réticulation de ces deux composants. Les images permettront d'évaluer l'aspect fibrillaire de ces protéines matricielles au sein de la MEC sécrétée *in vitro*. Les données de microscopie seront confortées par du western-blot pour vérifier leur abondance.

Nous réaliserons également une quantification globale du contenu en collagène, élastine, glycoaminoglycanes (GAG) sulfatés et acide hyaluronique à l'aide des kits commerciaux Hydroxyproline assay (Sigma) pour la quantification du contenu collagénique, Fasting Elastin Assay (Biocolor Ltd.) pour

le contenu en élastine et Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay Kit (Biocolor Ltd.) pour le contenu en GAG sulfatés et les protéoglycanes et Purple-Jelley Hyaluronic Acid assay (Biocolor Ltd.) pour l'acide hyaluronique.

Enfin, pour mettre en évidence des différences sans *a priori* des constituants de la MEC, nous envisageons de réaliser une approche protéomique du matrisome et des protéines associées au matrisome de la MEC-T21 sécrétée *in vitro*. Il s'agit de mettre en évidence non seulement les protéines constitutives (protéines de structure, protéines d'adhérence, polysaccharides), mais aussi les macromolécules associées à ces protéines tels que des facteurs solubles séquestrés (facteurs de croissance..) ou des enzymes de remodelage (MMPs). Cette approche sera réalisée par LC-MS (liquid chromatography – mass spectrometry), qui combine la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse pour l'identification de protéines au sein d'un mélange complexe de protéines et en faible concentration (mise en place d'une collaboration à envisager).

Par ailleurs, outre sa composition, il est également important d'explorer la MEC-T21 sous l'angle de sa microstructure et de ses propriétés biophysiques. Ces dernières années, l'importance de la mécanique des substrats a été de plus en plus reconnue. Il a été démontré que les propriétés mécaniques des échafaudages matriciels influençaient de manière significative les fonctions cellulaires telles que la morphogénèse, la prolifération et la différenciation<sup>213,214,215</sup>. Ces études de mécanique des substrats font appel à des approches de rhéologie, de test de compression ou d'étirement ou de microscopie spécialisée telle que la microscopie à force atomique pour caractériser les propriétés microélastiques et de rigidité de matrices produites par des cellules *in vitro*. Le site de recherche clermontois ne dispose pas d'une telle infrastructure en terme d'équipements et d'expertises, c'est pourquoi j'envisage la mise en place d'une collaboration avec une équipe de recherche française reconnue pour son expertise en mécanobiologie comme par exemple l'équipe MEC-Up (Dr M. Boissiere) de l'unité de recherche EA 1391 ERRMECe - Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule (Cergy Paris Université).

#### 4.4.1.2 Impacts fonctionnels d'une MEC-T21 sécrétée *in vitro*

##### 4.4.1.2.1 Validation de l'impact d'une MEC-T21 sur la prolifération cellulaire

Le résultat le plus intéressant dans ce travail est la croissance réduite de la lignée MDA-MB 468 sur une MEC-21. Afin de valider cet effet biologique de la MEC-T21, nous allons étudier la prolifération des autres lignées de cellules tumorales mammaires sur des MEC produites à partir de 7 jours et de 14 jours de culture des fibroblastes (travaux initiés et en cours d'analyses). Par ailleurs, nous envisageons de nous procurer d'autres fibroblastes trisomiques 21 d'origine dermique (fibroblastes commerciaux

ou biobanque BioJel de la Fondation Jérôme Lejeune) pour vérifier la pertinence de notre observation. En effet, dans ce travail, des fibroblastes provenant d'une seule personne atteinte de trisomie 21 ont été utilisés et si la MEC-T21, de par sa composition ou ses propriétés biomécaniques, a un réel impact biologique sur la régulation de la prolifération de cellules tumorales mammaires, celui-ci devrait être observé avec les fibroblastes d'autres individus atteints d'un syndrome de Down.

Pour explorer la cause de cette différence de croissance, nous prévoyons de vérifier si celle-ci est en lien avec une régulation différente du cycle cellulaire et/ou une augmentation de la mort cellulaire sur MEC-T21. Des expérimentations pour évaluer la mort cellulaire, à l'aide du système d'imagerie sur cellules vivantes Incucyte® (Sartorius) avec de l'iodure de propidium, ont été initiées mais se sont heurtées à la présence de l'ADN résiduel au sein des matrices qui entraîne un marquage non spécifique pouvant être pris en compte par le système d'analyse d'image de l'appareil. L'optimisation du protocole de dégradation de l'ADN par de la DNase I sera importante pour cette approche expérimentale. L'étude du cycle cellulaire pourra être envisagé par cytométrie en flux si la présence de MEC n'est pas problématique. Autrement, l'étude du cycle cellulaire pourrait être plus adapté par l'utilisation d'un réactif développé pour le système d'imagerie Incucyte® (Sartorius) car le suivi et l'analyse des cellules devenues fluorescentes, selon la phase du cycle, se fait en temps réelle directement sur le support de culture.

#### 4.4.1.4.2 Etudes approfondies sur l'impact d'une MEC-T21 sur la transition épithélio-mésenchymateuse

Dans ce travail, un de nos objectifs était d'évaluer si la présence d'une MEC-T21 impactait *in vitro* la TEM des cellules MDA-MB 468. A ce jour, nous n'avons pas pu conclure sur ce point. En revanche, nos données suggèrent qu'une MEC-T21 entraîne une régulation différente de celle d'une MEC-EUP de l'expression des gènes *OCLN1/CDLN1/VIM* en l'absence de  $TGF\alpha$  d'une part, et du gène *VIM* en présence de  $TGF\alpha$  d'autre part. Néanmoins, ces données sont issues d'une expérimentation qui n'a pas été reproduite au moins trois fois de façon indépendante. Il ne peut s'agir que de données préliminaires qu'il convient de conforter. Pour être publiables, ces travaux sur la TEM sont donc à reprendre non seulement sur la lignée triple-négative MDA-MB 468 mais j'envisage également de les étendre à d'autres modèles tumoraux mammaires comme les cellules MCF7 qui représentent un modèle moins métastatique que les cellules MDA-MB 468, et les cellules MDA-MB 231 un autre type de cellules triple-négatives hautement métastatiques et qui bénéficie d'une large littérature concernant sa TEM *in vitro*. Pour aboutir à une conclusion définitive de l'impact d'une MEC-T21 sur la TEM des cellules tumorales mammaires, nous devons également corrélérer les changements d'expression génique avec l'expression protéique des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux

étudiés. La TEM est déclenchée par plusieurs facteurs de croissance extracellulaires tels que l'EGF ou le TGF $\beta$ , selon les cellules, et sa progression est associée à l'expression accrue de facteurs de transcription tels que Twist, Snail, Slug, ou de la famille ZEB. En effet, les facteurs de transcription en doigt de zinc Snail et Slug ont été décrits comme des répresseurs directs du gène de l'E-cadhérine *in vitro* et *in vivo* et comme des facteurs impliqués dans l'acquisition de la résistance à l'apoptose<sup>216</sup>. Twist a également été décrit comme répresseur de l'E-cadhérine et comme facteur essentiel induisant la TEM en réponse à l'augmentation de la rigidité de la MEC<sup>217</sup>. Nous nous intéresserons alors à l'expression de ces gènes dans le contexte de la TEM induite sur une MEC-T21.

Une autre caractéristique des cellules qui réalisent une TEM est l'acquisition d'un phénotype migratoire. Nos essais de migration par test de blessure ne sont pas en faveur d'une différence de capacité migratoire des cellules MDA-MB 468 sur une MEC-T21. Néanmoins l'approche que nous avons utilisée n'évalue que la migration collective des cellules et ne permet pas de discriminer une altération de la migration individuelle qui dépendrait plus étroitement des interactions cellules-matrice extracellulaire comme la migration individuelle dite « mésenchymateuse ». Nous projetons donc d'approfondir l'étude de la capacité migratoire individuelle des cellules MDA-MB 468 sur une MEC-T21 par une approche de microscopie en mode time-lapse et d'analyser les trajectoires des cellules avec des plugins compatibles avec ImageJ (Manual Tracking ou TrackMate). Il pourrait également être intéressant de réaliser cette étude en stimulant les cellules MDA-MB 468 par du TGF $\alpha$  puisqu'une MEC-T21 diminue la proportion de cellules MDA-MB 468 fusiformes au bout de 72h de traitement, cellules à phénotype migratoire.

#### 4.4.2 Projet de recherche clinique

Les malformations congénitales sont des défauts de structure ou de fonction d'un organe, ou d'une région du corps, résultant d'une anomalie du processus normal du développement de l'embryon ou du fœtus. Les anomalies congénitales sont par définition présentes à la naissance, cependant, elles peuvent n'être diagnostiquées que plus tard au cours de la vie. Elles peuvent être primaires, c'est-à-dire d'origine génétique ou secondaires à une altération du développement normal par un agent tératogène, une infection.

Les anomalies congénitales multiples (ACM) forment un groupe hétérogène de troubles génétiques qui provoquent des anomalies du développement dans deux ou plusieurs systèmes telles que des anomalies squelettiques, des malformations cardiaques, des anomalies uro-génitales ou nerveuses, associées ou non à une déficience intellectuelle (DI). Selon le registre européen pour la surveillance épidémiologique des anomalies congénitales, entre 2000 et 2009, la prévalence des anomalies congénitales d'origine génétique (anomalie chromosomique, variant pathogène dans un gène unique)

était de 4 sur 1000<sup>218</sup>. Malgré leur faible prévalence, ces maladies rares posent un problème majeur de santé publique en raison de leur morbidité et mortalité élevées. Un diagnostic précis est donc essentiel pour une meilleure prise en charge des patients (prévention, prise en charge, chirurgie réparatrice), évaluation pronostique et la mise en œuvre de thérapies potentielles. Un diagnostic génétique est également indispensable au conseil génétique pour le patient et ses proches (aide à la reproduction, risque de récurrence, possibilité d'accès au diagnostic prénatal...).

L'Analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) est actuellement la méthode d'analyse pangénomique chromosomique de référence dans le diagnostic chromosomique des anomalies du développement, en particulier dans le cadre des ACM, où des variations du nombre de copies (CNV) de petite taille sont fréquemment impliquées<sup>219</sup>. L'Agence de la Biomédecine fait état d'un rendement diagnostique de ~5-10% pour le caryotype et de ~15-20% pour l'ACPA dans les anomalies du développement (DI/ACM).

Le développement de la médecine génomique (Séquençage de l'exome (WES), séquençage du génome (WGS)) a permis d'accroître le nombre de diagnostics posés à environ 60% des patients mais cela laisse encore nombre d'entre eux en situation d'impasse diagnostique. Les anomalies habituellement identifiées portent sur les régions codantes du génome ou au niveau des sites consensus d'épissage, cependant environ 30% des variants délétères identifiés sont situés dans des régions non codantes et les variants affectant potentiellement l'épissage restent difficiles à prédire et à confirmer ce qui les fait classer comme des variants de signification incertaine (VSI).<sup>220,221</sup> Des algorithmes de *deep learning* de prédiction de sites d'épissage comme SpliceAI ont été développés pour prédire l'impact potentiel de variations nucléotidiques sur l'épissage des transcrits<sup>222</sup>. Néanmoins, ces outils présentent encore certaines limites comme l'incapacité de prédire les conséquences d'une délétion par exemple. Il peut également s'agir de variants génomiques altérant le promoteur d'un gène et pouvant retentir sur son niveau d'expression. Dans des cas plus complexes, ces variants génomiques peuvent être situés à distance du gène et altérer des séquences régulatrices de la transcription comme des séquences enhancers<sup>223</sup>, ou altérer une barrière entre deux structures chromatinienne adjacentes appelées *topologically associated domain (TAD)*<sup>224</sup>. Pour ces mécanismes moins connus en clinique, seul un test permettant d'évaluer le niveau d'expression des gènes apporterait la preuve de la possible implication du variant dans la pathologie du patient.

Les analyses de RNA-seq (ou séquençage du transcriptome) ont montré leur potentiel dans l'identification de gènes impliqués dans des maladies mendéliennes<sup>225</sup>.

La technique RNA-Seq permet l'identification systématique d'évènements anormaux au niveau des transcrits, tels que des niveaux anormaux de transcription, des épissages aberrants ou la présence d'une expression monoallélique d'un gène. La détection de tels évènements permet la validation de VSI comme étant pathogènes ou l'identification de variants non repérés en WES ou en WGS. Ainsi près

de 30% de variants VSI susceptibles d'affecter l'épissage pourraient être reclassés soit en variant bénin soit en variant pathogène grâce au RNA-Seq.<sup>226</sup> Plus récemment, Riquin et al. (2023) ont montré l'intérêt du RNA-Seq en complément du WGS dans les troubles du neurodéveloppement pour mieux classer des variants VSI ou identifier des variants y compris des variants structuraux<sup>227</sup>. Ainsi l'utilisation du RNA-Seq pourrait augmenter le taux diagnostique de 8 à 32% selon les indications soit en fournissant des preuves fonctionnelles de l'effet de variants préalablement identifiés, soit en identifiant des variants non détectés par d'autres techniques (WES, WGS) réalisées précédemment chez le patient<sup>228,229,230</sup>. Le RNA-Seq sur ARN totaux a permis d'identifier des variants altérant des ARN non codants dont les gènes font partie désormais de la liste des gènes étant en cause dans la déficience intellectuelle et les troubles du neurodéveloppement<sup>231</sup>.

En mars 2024, j'ai déposé un projet portant sur l'apport du RNA-seq dans le diagnostic des maladies rares auprès de l'appel à projet Innovation de la Direction de la Recherche Clinique et Innovation du CHU de Clermont-Ferrand. Ce projet a reçu l'approbation du CHU et a été financé pour 32.000,0 Euros. Il sera mené en collaboration avec l'équipe de l'UF de Génétique moléculaire (Pr I. Creveaux, Service de Biochimie et Génétique moléculaire) pour inclure et analyser 24 patients atteints de malformations congénitales multiples (Cytogénétique) et 24 patients atteints d'une déficience intellectuelle syndromique (Génétique moléculaire). Ces patients auront bénéficié au préalable d'un séquençage de l'exome et/ou de leur génome pour lequel l'analyse sera non conclusive (identification de VSI, absence de diagnostic). L'objectif est d'évaluer le RNA-seq pour sa pertinence à identifier des variants pathogènes non détectés par WES ou WGS ou confirmer la pathogénicité de variants VSI pour permettre aux patients de sortir de l'impasse diagnostique et améliorer leur prise en charge (conseil génétique, prise en charge plus adaptée du patient avec possibilité d'inclusion dans des protocoles thérapeutiques...).

## 4.5 Encadrements

### Doctorat de Sciences

**Dr Gaëlle Salaun (2018 – 2021, non soutenue) :** Directeur Thèse : P. Vago – **Taux d'encadrement 60%** (Ecole doctorale SVSAE).

« Etude de la Transition épithélio-mésenchymateuse d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple négative dans le contexte d'une matrice extra-cellulaire trisomique 21 ».

Mlle Salaun a réalisé ses travaux de thèse sous la direction du Pr P. Vago, j'en ai assuré 60% de l'encadrement scientifique et technique. L'objectif était d'évaluer l'impact de l'interaction de cellules tumorales mammaires triples-négatives en culture monocouche sur une matrice extra-cellulaire (MEC) sécrétée *in vitro* par des fibroblastes trisomiques 21 sur différents processus cellulaires participant à la progression tumorale comme la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), la migration et l'invasion cellulaire. Pour des raisons personnelles, l'étudiante n'a pas souhaité poursuivre ses travaux et, après accord avec son directeur de thèse et moi-même, n'a pas renouvelé son inscription doctorale.

**Dr Stéphan Kémény (2012 – 2017) :** Directeur Thèse : P. Vago – **Taux d'encadrement 50%** (Ecole doctorale SVSAE).

« Organisation spatiale du noyau interphasique dans la trisomie 21 ». Mr Kémény a réalisé ses travaux de thèse sous la direction du Pr P. Vago, j'en ai assurée 50% de l'encadrement scientifique et technique. L'objectif était d'étudier l'impact d'un chromosome 21 surnuméraire sur l'organisation spatiale des territoires chromosomiques dans le noyau interphasique. Nous avons ainsi comparé la morphologie et les paramètres morphométriques de noyaux de fibroblastes T21 et contrôles, ainsi que le volume nucléaire, le volume et la position radiale de 12 territoires chromosomiques dans des cellules de villosités chorales contrôles et T21. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication : Kemeny S, Tatout C, Salaun G, Pebrel-Richard C, Goumy C, Ollier N, Maurin E, Pereira B, Vago P, Gouas L. Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. *Chromosoma*. 2018 Jun;127(2):247-259.

### Thèse de Médecine

**7/10/2016 - Gaëlle Salaun : Taux d'encadrement 100%**

« La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple-négative dans le contexte de la Trisomie 21 » - L'objectif était d'évaluer l'expression de gènes codant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans des cellules tumorales mammaires triples-négatives au contact d'une MEC T21 pour évaluer l'impact *in vitro* de cette MEC sur la TEM de ces cellules.

### Encadrement Master 2

**2024 : Alberto Delgado Monterroso : Taux d'encadrement 50%**, M2 Microenvironnement Cellulaire et Pathologies. UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims. « Impact *in vitro* d'une matrice extracellulaire de type Trisomie 21 sur le comportement de cellules tumorales mammaires ». L'objectif était l'optimisation du protocole de sécrétion d'une MEC *in vitro* à partir de fibroblastes dermiques et mammaires et l'étude de la prolifération et de l'adhérence de lignées d'adénocarcinome mammaires.

**2021 : Nooshin Omar: Taux d'encadrement 100%**, M2 Biologie Santé, Génétique, Physiologie, Pathologies (EDSVSAE).

« Production *in vitro* de matrice extracellulaire à partir de fibroblastes: Mise au point d'un protocole d'activation de fibroblastes et comparaison de protocoles de décellularisation fibroblastique ». L'objectif était de mettre au point un protocole d'activation de fibroblastes *in vitro* et de comparer deux protocoles de décellularisation fibroblastique.

**2018 – My-Anne Hong : Taux d’encadrement 100%**, M2 Ingénierie de la santé, parcours Diagnostic Biomédical (DiaMed).

« Développement d’un modèle de culture cellulaire 3D d’une lignée d’adénocarcinome mammaire Triple-négative en vue de l’étude de la Transition Epithélio-mésenchymateuse dans le contexte d’une matrice extra-cellulaire Trisomique 21 ». L’objectif était le développement d’un modèle de culture cellulaire 3D (sphéroïde) à partir de la lignée MDA-MB-468, intégrant une MEC T21 sécrétée *in vitro*, en vue de l’étude de la TEM dans un microenvironnement matriciel de trisomie 21.

**2016 – Gaëlle Salaun : Taux d’encadrement 100%**, M2 Ingénierie de la santé, parcours Diagnostic Biomédical (DiaMed).

« La transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) de cellules cancéreuses mammaires dans le contexte de la trisomie 21 ». L’objectif était d’évaluer l’expression de gènes codant des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans des cellules tumorales mammaires triples-négatives au contact d’une MEC-T21 pour évaluer l’impact de cette dernière sur la transition épithélio-mésenchymateuse de ces cellules *in vitro*.

**2012 – Wiem Ayed : Taux d’encadrement 100%.** « Etude de la Transition Epithélio-mésenchymateuse (TEM) au cours de la trisomie 21 : étude d’une lignée de carcinome mammaire » (Master II recherche Génétique et Physiologie, Université d’Auvergne)- L’objectif était la mise au point d’un protocole de sécrétion de MEC *in vitro* par des fibroblastes dermiques et l’évaluation de l’impact d’une MEC-T21 sur la morphologie des cellules stimulées pour la transition épithélio-mésenchymateuse.

**2005 - Barbara Alain :** « Recherche d’un nouveau locus responsable du syndrome de Brugada » (Master II Biologie Moléculaire et Cellulaire, Paris 6)- **Taux d’encadrement 50%**

### **Encadrement Master 1**

**2022 – Alexia Mouttet : Taux d’encadrement 100%**, M1 Sciences, Technologies, Santé, mention Génétique et Physiologie.

« Mise au point d’un essai pour évaluer la prolifération de cellules tumorales mammaires sur une matrice extracellulaire sécrétée *in vitro* »

**2020 – Justine Coste : Taux d’encadrement 50%**, M1 Sciences, Technologies, Santé, mention Génétique et Physiologie.

« Effet *in vitro* d’une matrice cellulaire de type trisomie 21 sur la prolifération cellulaire d’une lignée d’adénocarcinome mammaire triple négatif »

**2019 – Victorine Passet : Taux d’encadrement 100%**, M1 Ingénierie de la santé, parcours Diagnostic Biomédical (DiaMed).

« Mise au point de protocoles pour l’étude de l’invasion, de la migration et de la transition épithélio-mésenchymateuse d’une lignée d’adénocarcinome mammaire triple négative MDA-MB-468 sur une matrice extracellulaire trisomique 21 »

**2017 – Chloe Chabredier : Taux d’encadrement 100%**, M1 Sciences, Technologies, Santé, mention Génétique et Physiologie.

« Mise au point d’un protocole de Western Blot pour l’étude de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux d’une lignée d’adénocarcinome mammaire triple négative dans un environnement extracellulaire de trisomie 21.

**2015 – Jeffroy Cluzel : Taux d’encadrement 100%**, M1 Sciences, Technologies, Santé, mention Génétique et Physiologie.

« Etude d’une lignée de carcinome mammaire et de sa transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

sur une matrice extra-cellulaire trisomique 21.

**2014 : Gaëlle Salaun : Taux d'encadrement 100%**, M1 Sciences, Technologies, Santé, mention Génétique et Physiologie,

« Seuil de détection des déséquilibres génomiques par Prénatal Bobs et analyse chromosomique sur puce à ADN »

**2013 : Camille Lemattre : Taux d'encadrement 50%**, Master 1 Sciences, Technologies, Santé, mention Génétique et Physiologie, « Contamat: Evaluation de la contamination maternelle dans les prélèvements fœtaux à visée de diagnostic prénatal chromosomique ».

**2012 – Inès Montel : Taux d'encadrement 100%**, M1 Physio-pharmacologie de la douleur, Clermont-Ferrand, « Etude d'une levée de l'empreinte parentale du gène MEST et de l'expression de trois autres gènes soumis à empreinte de la région 7q32 (MESTIT1, COPG2IT1, et CPA4) dans les villosités chorales de fœtus trisomiques 21 ».

**2011 - Wiem Ayed - Taux d'encadrement 100%**, M1 Science, Technologie et Santé, Mention Génétique et Physiologie, Clermont-Ferrand,

« Etude de l'expression des isoformes 1 et 2 du gène MEST et de trois autres gènes soumis à empreinte de la région 7q32 (MESTIT1, COPG2IT1 et CPA4) dans les villosités chorales de fœtus trisomiques 21 ».

**2010 - Anissa Montel - Taux d'encadrement 100%**, M1 Sciences de la vie et de la terre, Mention Génétique et Physiologie, Clermont-Ferrand,

« Etude de l'expression du gène MEST (7q32) dans des cellules de villosités chorales trisomiques 21 par qRT-PCR ».

**2009 - Hayet Bensalah - Taux d'encadrement 100%**, M1 Sciences de la vie et de la terre, Mention Génétique et Physiologie, Clermont-Ferrand,

« Mise au point de l'analyse multiplexe de l'expression de gènes avec le système Gexp : cas de la trisomie 21 ».

**2008 - Vincent Negroni - Taux d'encadrement 100%**, M1 Sciences de la vie et de la terre, Mention Génétique et Physiologie, Clermont-Ferrand,

« Mise au point de la technique de MLPA pour l'exploration de patients présentant un retard mental syndromique ».

**2007 - Bérangère Riguet - Taux d'encadrement 100%**, M1 Sciences de la vie et de la terre, Mention Génétique et Physiologie, Clermont-Ferrand,

« Recherche de microremaniements subtélomériques par MLPA chez des fœtus avec une hyperclarté nucale ; Mise au point de la qPCR appliquée à la quantification génomique ».

**2005 - Damien Coulomb - Taux d'encadrement 80%**, M1 Biologie Moléculaire et Cellulaire, Paris 6, « Identification d'un nouveau gène responsable du syndrome de Brugada ».

## **Autres**

**2019 (15 jours) - Victorine Passet : Taux d'encadrement 100%**, Projet Tuteuré de M1 Ingénierie de la santé, parcours Diagnostic Biomédical (DiaMed).

« TGNI : Test Génétique Non Invasif »

**2017 (6 semaines) - Edith Terrenoir : Taux d'encadrement 100%**, DU Européen de Cytogénétique Moléculaire.

« Implementation of non-invasive prenatal screening for trisomy 21: a review and optimisation on a new sequencing platform »

**2016 (3 mois) - Charlène Vantalon : Taux d'encadrement 50%**, 3ème année de Pharmacie.

« Le test génétique non invasif (TGNI) par le système Clarigo® »

#### 4.6 Demandes de financement

##### **Demandes de financement pour le développement de projets :**

2007 : PHRC Local « Physiopathologie de l'hyperclarté nucale chez le fœtus à 10-13 semaines d'aménorrhée : aspects génomiques et transcriptomiques » - **Investigateur Principal**

2008 : PHRC Inter-régional : « Recherche de Remaniements Chromosomiques Cryptiques par MLPA et CGH sur Puces à ADN haute Résolution chez des Fœtus Présentant une Hyperclarté nucale au Premier trimestre de Gestation et un Caryotype Standard Normal » - **Investigateur Principal**

2008 : Agence de la biomédecine : « Evaluation de la fréquence de microremaniements chromosomiques subtélomériques déséquilibrés dans les anomalies de la clarté nucale »

2009 : Agence de la biomédecine : « Evaluation d'une stratégie de criblage génomique des anomalies de la clarté nucale et des hernies diaphragmatiques détectées en prénatal »

2009 : PHRC local : « Pathologies de la clarté nucale : Evaluation de la fréquence et de la nature des déséquilibres chromosomiques associés par MLPA » - **Financé (13.000,0 Euros)**

2010 : PHRC local : « Etude de la fréquence du microremaniement 16p11.2 dans les troubles du développement et l'obésité commune isolée »

2010 : Agence de la biomédecine : « Analyse prédictive de l'expression de 31 gènes dans des cellules amniotiques sur le risque de cardiopathie chez des fœtus trisomiques 21 »

2011 : PHRC Interrégional : « Etude épidémiologique du microremaniement chromosomique 16p11.2 dans les troubles du développement et de l'obésité ».

2011 : Fondation Lejeune « Impact de la présence d'un chromosome 21 surnuméraire sur la régulation de la transcription de gènes disomiques et leur rôle dans le phénotype de la trisomie 21 : étude des gènes MEST et STC1 » - **Investigateur Principal**

2012 : PHRC Interrégional : « Etude du microremaniement 16p11.2 dans les troubles du développement et l'obésité : corrélations génotype-phénotype »

2013 : Agence de la biomédecine : « Evaluation de la contamination maternelle dans les prélèvements fœtaux à visée de diagnostic prénatal chromosomique »

2014 : Agence de la biomédecine « CONTAMAT : sensibilité de détection de déséquilibres génomiques par les examens de BAC-on-Beads (Bobs) et d'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) en cas de contamination maternelle des prélèvements fœtaux »

2017 : Ligue Régionale contre le Cancer : « Projet ELTEM 21 : Etude de La Transition Epithélio-Mésenchymateuse de cellules tumorales mammaires sur une Matrice extra-cellulaire de Trisomie 21 sur des modèles de culture cellulaire en deux et trois dimensions. » - **Investigateur Principal,**

collaboration avec le Pr Mahchid Bamdad.

2017 : Association pour la Recherche contre le Cancer : « MTEM21 : Modélisation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse de cellules tumorales triple négatives sur une Matrice extra-cellulaire de Trisomie 21 » - **Investigateur Principal**, collaboration avec le Pr Mahchid Bamdad.

2020 : Ligue Régionale contre le Cancer : « Matrice extra-cellulaire sécrétée *in vitro* : production et caractérisation pour application sur modèle cellulaire en 3D » - **Investigateur Principal**

2023 : Ligue Régionale contre le Cancer : « Impacts *in vitro* des fibroblastes et de la matrice extra-cellulaire de type trisomie 21 sur des cellules tumorales mammaires : croissance et progression tumorale » - **Investigateur Principal**

2023 : Fondation Jérôme Lejeune « In Vitro Impacts Of Trisomy 21 Fibroblasts And Extracellular Matrix On Mammary Tumor Cells : Growth And Tumor Progression » - **Investigateur Principal**

2023 : Agence de la Biomédecine : « Apport de la cartographie optique du génome et du séquençage de l'ARN dans le diagnostic des malformations congénitales multiples sans anomalie génétique détectée au séquençage du génome entier »

2024 : Appel à Projet Innovation CHU Clermont-Ferrand : « Apport du RNA-Seq dans le diagnostic des maladies rares » - **Co-investigateur principal (Financé 32000,0 Euros)**

#### **Demandes de financement pour étudiants :**

2011 : Association pour la Recherche contre le Cancer : demande de financement M2 Recherche Wiem Ayed

2012 : Association Soroptimistes : demande de financement M2 Recherche Wiem Ayed

2012 : Associations Kiwanies : demande de financement M2 Recherche Wiem Ayed

2012 : Ligue contre la Recherche : demande financement Thèse de sciences Wiem Ayed

2014 : Année Recherche ARS Gaëlle Salaun

2015 : Année Recherche ARS Gaëlle Salaun

2015 : Année Recherche Fondation Recherche Médicale Gaëlle Salaun

#### 4.7 Missions d'intérêt général

#### **Organisation de colloque**

Membre du comité d'organisation des 25<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens (CHEC) 2020

#### **Responsabilité administrative**

2017 – 2021 : Membre élue du Conseil de Laboratoire de l'Unité de Recherche UMR1240 IMoST

#### **Missions d'évaluation**

2021 – de nos jours – Membre du CNU pour la sous-section 42-02 – Recrutements et Avancements de Grade

2018 - Membre du Comité de sélection pour le recrutement d'un MCF – Université Clermont Auvergne

2018 – Membre du Comité de sélection pour le recrutement d'un MCF – Paris VII

#### 4.8 Liste des publications scientifiques

Les articles avec un « \* » correspondent à des publications avec un étudiant co-encadré.

\*\* : Auteur correspondant

1-Goumy C, Guy Ouedraogo Z, Soler G, Eymard-Pierre E, Laurichesse H, Delabaere A, Gallot D, Bouchet P, Perthus I, Pebrel-Richard C, Gouas L, Salaun G, Salse J, Véronèse L, Tchirkov A. Optical genome mapping for prenatal diagnosis: A prospective study. *Clin Chim Acta*. 2023 Nov 1;551:117594. doi: 10.1016/j.cca.2023.117594. Epub 2023 Oct 12. PMID: 37832906 (IF 2023 : 3,2)

2-Goumy C, Ouedraogo ZG, Bellemonte E, Eymard-Pierre E, Soler G, Perthus I, Pebrel-Richard C, Gouas L, Salaun G, Véronèse L, Laurichesse H, Darcha C, Tchirkov A. Feasibility of Optical Genome Mapping from Placental and Umbilical Cord Sampled after Spontaneous or Therapeutic Pregnancy Termination. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Nov 30;13(23):3576. doi: 10.3390/diagnostics13233576. PMID: 38066817 (IF 2023 : 3,0)

3 - Goumy C, Veronese L, Stamm R, Domas Q, Hadjab K, Gallot D, Laurichesse H, Delabaere A, Gouas L, Salaun G, Perbel-Richard C, Vago P, Tchirkov A. Reduced telomere length in amniocytes: an early biomarker of abnormal fetal development? *Hum Mol Genet*. 2022 Aug 23;31(16):2669-2677. doi: 10.1093/hmg/ddac054. PMID: 35244708 (IF : 6,15) - hal-03737680

4 - Cherik F, Lepage M, Remerand G, Francannet C, Delabaere A, Salaun G, Pebrel-Richard C, Gouas L, Vago P, Tchirkov A, Goumy C. Further refining the critical region of 10q26 microdeletion syndrome: A possible involvement of *INSYN2* and *NPS* in the cognitive phenotype. *Eur J Med Genet*. 2021 Sep;64(9):104287. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104287. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34252586 (IF : 2,70) - hal-03345219

5 - Mourgues C, Eymard-Pierre E, Laurichesse-Delmas H, Gerbaud L, Gouas L, Pébrel-Richard C, Vago P, Debost-Légrand A, Goumy C. Analysis of the cost effectiveness of different strategies for the antenatal diagnosis of chromosomal aberrations in cases of ultrasound-identified fetal abnormalities. (Paris). 2020 Oct 1;78(5):483-491. doi: 10.1684/abc.2020.1580. PMID: 32933889 (IF : 0,45) - hal-02992753

6 - Juven A, Nambot S, Piton A, Jean-Marçais N, Masurel A, Callier P, Marle N, Mosca-Boidron AL, Kuentz P, Philippe C, Chevarin M, Duffourd Y, Gautier E, Munnich A, Rio M, Rondeau S, El Chehadeh S, Schaefer É, Gérard B, Bouquillon S, Delorme CV, Francannet C, Laffargue F, Gouas L, Isidor B, Vincent M, Blesson S, Giuliano F, Pichon O, Le Caignec C, Journal H, Perrin-Sabourin L, Fabre-Teste J, Martin D, Vieville G, Dieterich K, Lacombe D, Denommé-Pichon AS, Thauvin-Robinet C, Faivre L. Primrose syndrome: a phenotypic comparison of patients with a *ZBTB20* missense variant versus a 3q13.31 microdeletion including *ZBTB20*. *Eur J Hum Genet*. 2020 Feb 18;10.1038/s41431-020-0582-3. (IF : 3.65) - hal-02883449

7 - Tabet AC, Rolland T, Ducloy M, Lévy J, Buratti J, Mathieu A, Haye D, Perrin L, Dupont C, Passemard S, Capri Y, Verloes A, Drunat S, Keren B, Mignot C, Marey I, Jacqueline A, Whalen S, Pipiras E, Benzacken B, Chantot-Bastaraud S, Afenjar A, Héron D, Le Caignec C, Beneteau C, Pichon O, Isidor B, David A, El Khattabi L, Kemeny S, Gouas L, Vago P, Mosca-Boidron AL, Faivre L, Missirian C, Philip N, Sanlaville D, Edery P, Satre V, Coutton C, Devillard F, Dieterich K, Vuillaume ML, Rooryck C, Lacombe D, Pinson L, Gatinois V, Puechberty J, Chiesa J, Lespinasse J, Dubourg C, Quelin C, Fradin M, Journal H, Toutain A, Martin D, Benmansour A, Leblond CS, Toro R, Amsellem F, Delorme R, Bourgeron T. Erratum: Author Correction: A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. NPJ Genom Med. 2019 Jul 1;4:16. (IF : 4.42) - hal-02347889

Erratum for: NPJ Genom Med. 2017 Oct 23;2:32. PMID: 31285849; PMCID: PMC6602945.

8 - Salaun G, Tchirkov A, Francannet C, Pons H, Brugnion F, Pebrel-Richard C, Gouas L, Eymard-Pierre E, Vago P, Goumy C. Sperm meiotic segregation of a balanced interchromosomal reciprocal insertion resulting in recurrent spontaneous miscarriage. Reprod Biomed Online. 2018 Jul;37(1):100-106. (IF : 2.93) - hal-03419135

9 - Tabet AC, Rolland T, Ducloy M, Lévy J, Buratti J, Mathieu A, Haye D, Perrin L, Dupont C, Passemard S, Capri Y, Verloes A, Drunat S, Keren B, Mignot C, Marey I, Jacqueline A, Whalen S, Pipiras E, Benzacken B, Chantot-Bastaraud S, Afenjar A, Héron D, Le Caignec C, Beneteau C, Pichon O, Isidor B, David A, El Khattabi L, Kemeny S, Gouas L, Vago P, Mosca-Boidron AL, Faivre L, Missirian C, Philip N, Sanlaville D, Edery P, Satre V, Coutton C, Devillard F, Dieterich K, Vuillaume ML, Rooryck C, Lacombe D, Pinson L, Gatinois V, Puechberty J, Chiesa J, Lespinasse J, Dubourg C, Quelin C, Fradin M, Journal H, Toutain A, Martin D, Benmansour A, Leblond CS, Toro R, Amsellem F, Delorme R, Bourgeron T. A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. NPJ Genom Med. 2017 Oct 23;2:32. (IF : 4.42) - hal-01738521

10 - \*Kemeny S, Tatout C, Salaun G, Pebrel-Richard C, Goumy C, Ollier N, Maurin E, Pereira B, Vago P, Gouas L\*\*. Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. Chromosoma. 2017 Dec 14. (IF 4.41) - hal-01926526

11 - Goumy C, Gay-Bellile M, Salaun G, Kemeny S, Eymard-Pierre E, Biard M, Pebrel-Richard C, Vanlieferinghen P, Francannet C, Tchirkov A, Laurichesse H, Rouzade C, Gouas L, Vago P. A novel 2q14.1q14.3 deletion involving GLI2 and RNU4ATAC genes associated with partial corpus callosum agenesis and severe intrauterine growth retardation. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2016 Sep;106(9):793-7. (IF : 1.76)

12 - Gouas L, Kémény S, Beaufrère AM, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Tchirkov A, Lemery D, Laurichesse-Delmas H, Vago P, Goumy C. Prenatal Screening of 21 Microdeletion/Microduplication Syndromes and Subtelomeric Imbalances by MLPA in Fetuses with Increased Nuchal Translucency and Normal Karyotype. Cytogenet Genome Res. 2015;146(1):28-32. (IF : 1.35)

13 - \*Mellali S, Haoud K, Gouas L, Khaled MB, Vago P, Moulessehou S. Prenatal BoBs™ in the cytogenetic analysis of products of spontaneous miscarriage. S Afr Med J. 2015 Sep 19;105(10):870-3.

- 14 - Francesca Romana Grati, Denise Molina Gomes, Jose Carlos Pinto B. Ferreira, Celine Dupont, Viola Alesi, Laetitia Gouas, Nina Horelli-Kuitunen, Kwong Wai Choy, Jose Antonio Martinez-Conejero, Alberto Gonzales, Krzysztof Piotrowski, Rita Genesisio, Gloria Queipo, Barbara Malvestiti, Berenice Herve, Brigitte Benzacken, Antonio Novelli, Philippe Vago, Kirsi Piippo, Tak Yeung Leung, Francesca Malvestiti, Thibault Quibel, Anne Claude Tabet, Giuseppe Simoni, Francois Vialard. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletion and microduplication in over 9.500 pregnancies. *Prenat Diagn.* 2015 Aug;35(8):801-9. (IF : 2.52)
- 15 - Goumy C, Laffargue F, Eymard-Pierre E, Kemeny S, Gay-Bellile M, Gouas L, Gallot D, Francannet C, Tchirkov A, Pebrel-Richard C, Vago P. Congenital diaphragmatic hernia may be associated with 17q12 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2015 Jan;167A(1):250-3. (IF : 2.25)
- 16 - Pebrel-Richard C, Rouzade C, Kemeny S, Eymard-Pierre E, Gay-Bellile M, Gouas L, Tchirkov A, Goumy C, Vago P. Refinement of the critical region in a new 7p22.1 microduplication syndrome including craniofacial dysmorphism and speech delay. *Am J Med Genet A.* 2014 Nov;164A(11):2964-7. (IF : 2.25)
- 17 - Kemeny S, Pebrel-Richard C, Eymard-Pierre E, Gay-Bellile M, Gouas L, Goumy C, Tchirkov A, Francannet C, Vago P. Clinical and molecular description of a 17q21.33 microduplication in a girl with severe kyphoscoliosis and developmental delay. *Eur J Med Genet.* 2014 Oct;57(10):552-7. (IF : 2.13)
- 18 - Goumy C, Gay-Bellile M, Eymard-Pierre E, Kemeny S, Gouas L, Déchelotte P, Gallot D, Véronèse L, Tchirkov A, Pebrel-Richard C, Vago P. De novo 2q36.1q36.3 interstitial deletion involving the PAX3 and EPHA4 genes in a fetus with spina bifida and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014 Jun;100(6):507-11. (IF : 1.76)
- 19 - Haoud K, Mellali S, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Moulessehoul S. Prevalence of aneuploidies in products of spontaneous abortion: interest of FISH and MLPA. *Morphologie.* 2014 Mar;98(320):40-6.
- 20 - Kemeny S, Pebrel-Richard C, Gouas L, Veronese L, Lemery D, Tchirkov A, Goumy C, Vago P. Prenatal ultrasound diagnosis of a 48,XXYY syndrome. *Morphologie.* 2013 Jun;97(317):65-7.
- 21 - Pebrel-Richard C, Debost-Legrand A, Eymard-Pierre E, Greze V, Kemeny S, Gay-Bellile M, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Goumy C, Francannet C. An unusual clinical severity of 16p11.2 deletion syndrome caused by unmasked recessive mutation of CLN3. *Eur J Hum Genet.* 2013 Jul 17. (IF : 4.28)
- 22 - Debost-Legrand A, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Gouas L, Goumy C, Giollant M, Ayed W, Tchirkov A, Francannet C, Vago P. A new case of 8q22.1 microdeletion restricts the critical region for Nablus mask-like facial syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013 Jan;161(1):162-5. (IF 2.25)
- 23 - \*Ayed W, Gouas L, Penault-Llorca F, Amouri A, Tchirkov A, Vago P. Trisomy 21 and cancers. *Morphologie.* 2012 Oct;96(314-315):57-66.

- 24 - Véronèse L, Tournilhac O, Callanan M, Prie N, Kwiatkowski F, Combes P, Chauvet M, Davi F, Gouas L, Verrelle P, Guièze R, Vago P, Bay JO, Tchirkov A. Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012 Jul 13. (IF : 11,70)
- 25 - Pebrel-Richard C, Kemeny S, Gouas L, Eymard-Pierre E, Blanc N, Francannet C, Tchirkov A, Goumy C, Vago P. An atypical 0.8 Mb inherited duplication of 22q11.2 associated with psychomotor impairment. *Eur J Med Genet*. 2012 Nov;55(11):650-5. (IF 2.13)
- 26 - Goumy C, Kemeny S, Eymard-Pierre E, Richard C, Gouas L, Combes P, Gay-Bellile M, Gallot D, Tchirkov A, Vago P. Prenatal diagnosis of a rare de novo centromeric chromosome 6 variant. *Gene*. 2011; 15-7. *Gene*. 2011 Dec 15;490(1-2):15-7. (IF 2,41)
- 27 - Debost-Légrand A, Capri Y, Gouas L, Pebrel-Richard C, Veronese L, Tchirkov A, Haoud K, Boespflug-Tanguy O, Goumy C, Vago P. De novo unbalanced translocation 2;4 characterized by metaphase CGH and array CGH in a child with mental retardation and dysmorphic features. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Dec 8. (I.F. 0,953)
- 28 - Goumy C, Gouas L, Marceau G, Coste K, Veronese L, Gallot D, Sapin V, Vago P, Tchirkov A. Retinoid pathway and congenital diaphragmatic hernia: hypothesis from the analysis of chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther*. 2010;28(3):129-39. (I.F. 0,844)
- 29 - Goumy C et Gouas L, Pebrel-Richard C, Véronèse L, Eymard-Pierre E, Debost-Légrand A, Haoud K, Tchirkov A, Vago P. Prenatal detection of cryptic rearrangements by multiplex ligation probe amplification in fetuses with ultrasound abnormalities. *Genet Med*. 2010 Jun;12(6):376-80. (I.F. 3,318)
- 30 - Goumy C, Coste K, Marceau G, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Gallot D, Sapin V. Fetal skin fibroblasts: a cell model for studying the retinoid pathway in congenital diaphragmatic hernia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010 Mar;88(3):195-200. (I.F. 1,908)
- 31 - Probst V, Wilde AA, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Kyndt F, Le Caignec C, Guicheney P, Gouas L, Albuissou J, Meregalli PG, Le Marec H, Tan HL, Schott JJ. SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 Dec;2(6):552-7. Epub 2009 Sep 29.
- 32 - Véronèse L, Tchirkov A, Richard-Pebrel C, Ledoux-Pilon A, Fleury J, Chaletex C, Goumy C, Gouas L, Berger MG, Vago P, Bay JO, Tournilhac O. A thrombocytosis occurring in Philadelphia positive CML in molecular response to imatinib can reveal an underlying JAK2(V617F) myeloproliferative neoplasm. *Leuk Res*. 2010 Apr;34(4):e94-6. Epub 2009 Oct 14. PubMed PMID: 19833389. (I.F. 2,560)

- 33 - Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, Davi F, Dighiero G, Chautard E, Veyrat-Masson R, Kwiatkowski F, Goumy C, Gouas L, Bay JO, Vago P, Tchirkov A. Strong correlation between VEGF and MCL-1 mRNA expression levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2009 Dec;33(12):1623-6. Epub 2009 May 31. (I.F. 2,560)
- 34 - Goumy C, Gouas L, Tchirkov A, Roucaute T, Giollant M, Veronèse L, Francannet C, Vago P. Familial deletion 11q14.3-q22.1 without apparent phenotypic consequences: a haplosufficient 8.5 Mb region. *Am J Med Genet A.* 2008 Oct 15;146A(20):2668-72. (I.F. 2,47)
- 35 - Véronèse L, Tchirkov A, Gouas L, Périssel B, Goumy C, Vago P. [Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: focus on recent biomarkers]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2008 Jul-Aug;66(4):371-7. Review. French. (I.F. 0,350)
- 36 - Gouas L, Goumy C, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Sep;56(6):345-53. Epub 2008 Jun 2. Review. (I.F. 0, 953)
- 37 - Blanc P, Gouas L, Francannet C, Giollant M, Vago P, Goumy C. Trisomy 20q caused by interstitial duplication 20q13.2: clinical report and literature review. *Am J Med Genet A.* 2008 May 15;146A(10):1307-11. Review. (I.F. 2,44)
- 38 - Goumy C, Beaufrère AM, Tchirkov A, Gouas L, Gaspard F, Giollant M, Roucaute T, Veronèse L, Lemery D, Vago P. Larsen-like phenotype associated with partial trisomy 3p and monosomy 5p. *Prenat Diagn.* 2008 Feb;28(2):131-4. (I.F 1,88)
- 39 - Six I, Hermida JS, Huang H, Gouas L, Fressart V, Benammar N, Hainque B, Denjoy I, Chahine M, Guicheney P. The occurrence of Brugada syndrome and isolated cardiac conductive disease in the same family could be due to a single SCN5A mutation or to the accidental association of both diseases. *Europace.* 2008 Jan;10(1):79-85. Epub 2007 Dec 21. (I.F. :1,46).
- 40 - Gouas L, Nicaud V, Chaouch S, Berthet M, Forhan A, Tichet J, Tiret L, Balkau B, Guicheney P. Confirmation of associations between ion channel gene SNPs and QTc interval duration in healthy subjects. *Eur J Hum Genet.* 2007 Sep;15(9):974-9. Epub 2007 May 30. (I.F.: 3.251)
- 41 - Keller DI, Barrane FZ, Gouas L, Martin J, Pilote S, Suarez V, Osswald S, Brink M, Guicheney P, Schwick N, Chahine M. A novel nonsense mutation in the SCN5A gene leads to Brugada syndrome and a silent gene mutation carrier state. *Can J Cardiol.* 2005 Sep;21(11):925-31. (I.F: 1.36)
- 42 - Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, Guicheney P; D.E.S.I.R. Study Group. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum*

Genet. 2005 Nov;13(11):1213-22. (I.F: 3.251)

43 - Gouas L, Bellocq C, Berthet M, Potet F, Demolombe S, Forhan A, Lescasse R, Simon F, Balkau B, Denjoy I, Hainque B, Baró I, Guicheney P; D.E.S.I.R. Study Group. New KCNQ1 mutations leading to haploinsufficiency in a general population; Defective trafficking of a KvLQT1 mutant. Cardiovasc Res. 2004 Jul 1;63(1):60-8. (I.F: 5.283)

#### 4.9 Liste des communications affichées

\* : Communication sélectionnée pour une présentation orale

**\* Matrice extra-cellulaire décellularisée de type trisomie 21 : impacts sur la prolifération et la morphologie cellulaire d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple négatif.** Gouas Laetitia, Salaün Gaëlle, Eymard-Pierre Eléonore, Pebrel-Richard Céline, Delphine Voisin, Goumy Carole, Moreau Emmanuel, Tchirkov Andrei. 27<sup>ème</sup> Journée du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens, Lille, 9 – 11 mars 2023.

**\* Comparaison de deux méthodes de décellularisation pour l'obtention d'une matrice extracellulaire sécrétée *in vitro*.** Laetitia Gouas, Nooshin Omar, Gaëlle Salaun, Sophie Besse, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Philippe Vago. 26<sup>ème</sup> Journée du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens, Annecy, 10 – 12 mars 2022

**Faisabilité de la cartographie optique en prénatal et en fœtopathologie : évaluation de l'extraction d'ADN de haut poids moléculaire pour différents types de matrices.** Carole Goumy, Claude Darcha, Hélène Laurichesse, Michaela West, Charles Poncet, Jérôme Salse, Delphine Voisin, Gaëlle Salaun, Laetitia Gouas, Céline Pebrel-Richard, Lauren Véronèse, Andrei Tchirkov, Gwendoline Soler, Philippe Vago. 26<sup>ème</sup> Journée du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens, Annecy, 10 – 12 mars 2022

**Syndrome XLAG et duplication Xq26.3.** Gaëlle Salaun, Eloïse Rodde, Fanny Laffargue, Eléonore Pierre, Carole Goumy, Laetitia Gouas, Christine Francannet, Philippe Vago, Céline Pebrel-Richard. 26<sup>ème</sup> Journée du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens, Annecy, 10 – 12 mars 2022.

**Télomères significativement plus courts en période prénatale en cas de malformation congénitale et d'hypotrophie fœtale.** Carole Goumy, Lauren Véronèse, Laetitia Gouas, Gaëlle Salaun, Philippe Vago, Andrei Tchirkov. 26<sup>ème</sup> Journée du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens, Annecy, 10 – 12 mars 2022.

**Obtention d'une matrice extracellulaire décellularisée *in vitro* : comparaison de deux méthodes de décellularisation.** Nooshin Omar, Gaëlle Salaun, Sophie Besse, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Philippe Vago, Laetitia Gouas. 11<sup>ème</sup> Assises de Génétique Humaine et Médicale, Rennes, 1-4 février 2022.

**Raccourcissement significatif de la longueur des télomères en période prénatale en cas de malformation congénitale et d'hypotrophie fœtale.** Carole Goumy, Lauren Véronèse, Rodrigue Stamm, Kamil Hadjab, Farida

Godeau, Delphine Voisin, [Laetitia Gouas](#), Gaëlle Salaun, Céline Pebrel-Richard, Philippe Vago, Andrei Tchirkov. 11<sup>ème</sup> Assises de Génétique Humaine et Médicale, Rennes, 1-4 février 2022.

**Faisabilité de la cartographie optique du génome en prénatal et en fœtopathologie : évaluation de l'extraction d'ADN long read pour chaque type de matrice.** Carole Goumy, Lauren Véronèse, Michaela West, Charles Poncet, Delphine Voisin, Gaëlle Salaun, [Laetitia Gouas](#), Céline Pebrel-Richard, Andrei Tchirkov, Gwendoline Soler, Philippe Vago. 11<sup>ème</sup> Assises de Génétique Humaine et Médicale, Rennes, 1-4 février 2022.

**Syndrome microdélétionnel 10q26 : nouvelle région minimale critique et possible implication des gènes INSYN2 et NPS dans le phénotype cognitive.** Carole Goumy, Florian Cherik, Mathis Lepage, Ganaelle Remerand, Christine Francannet, Amélie Delabaere, Gaëlle Salaun, Céline Pebrel-Richard, [Laetitia Gouas](#), Eleonore Eymard-Pierre, Philippe Vago, Andrei Tchirkov. 25<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Grenoble, 30 juin - 01 juillet 2020 (reporté en webinaire en 2021, eposter).

**Etude de la migration d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple-négatif sur une matrice extra-cellulaire de type trisomie 21 sécrétée *in vitro*.** Gaëlle Salaun, Eléonore Eymard-Pierre, Delphine Voisin, Céline Pebrel-Richard, Combes Patricia, Carole Goumy, Philippe Vago, [Laetitia Gouas](#). 25<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Grenoble, 30 juin - 01 juillet 2020 (reporté en webinaire en 2021, eposter).

**Non-invasive prenatal test for Twins with Clarigo.** [Laetitia Gouas](#), Gaëlle Salaun, Pascal Chambon, Nora Chelloug, Virginie Roze-Guillaumey, Valentine Marquet, Philippe Vago. Congrès CoGEN, Paris, 07-09 Novembre 2019

**Identification d'un double isodicentrique du bras court du chromosome Y chez un nouveau-né.** Gaëlle Salaun, Eléonore Eymard-Pierre, [Laetitia Gouas](#), Combes Patricia, Soler Gwendoline, Veronese Lauren, Andréï Tchirkov, Carole Goumy, Philippe Vago, Céline Pebrel-Richard. 24<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Rennes, 14 - 15 mars 2019

**Une matrice extra-cellulaire de type trisomie 21 altère *in vitro* l'expression de gènes épithéliaux et mésenchymateux d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple-négatif.** Gaëlle Salaun, Eleonore Aymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Patricia Combes, Carole Goumy, Philippe Vago, [Laetitia Gouas](#). 24<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Rennes, 14 - 15 mars 2019

**Insertion réciproque 14;22 à l'origine de fausses couches à répétition.** Gaëlle SALAUN, Celine PEBREL-RICHARD, Christine FRANCANNET, Baptiste TROUDE, Florence BRUGNON, Hanae PONS, [Laetitia GOUAS](#), Eleonore EYMARD-PIERRE, Andrei TCHIRKOV, Philippe VAGO, Carole GOUMY. 9<sup>èmes</sup> Assises de Génétique. Nantes, Février 2018

**Identification d'une triplification 2p24.3, incluant le gène MYCN, chez un enfant présentant une tumeur rénale et une agénésie rénale unilatérale.** Gaëlle SALAUN, Eric DORE, Eleonore EYMARD-PIERRE, Anca MAFTEI, [Laetitia GOUAS](#), Florentina ISFAN, Fanny LAFFARGUE, Carole GOUMY, Christine FRANCANNET, Philippe VAGO, Celine PEBREL-RICHARD. 9<sup>èmes</sup> Assises de Génétique. Nantes, Février 2018

**Evolution de la sensibilité et de l'impact du dépistage prénatal de la trisomie 21 en Auvergne entre 2000 et**

**2016. Evaluation coût-efficacité de l'apport du Test Génétique Non Invasif (TGNI) depuis 2016.** Rémi VERGARA, Emilie DUBOTS, Eleonore Eymard-Pierre, Christine Francannet, Florence Gaumet, Laurent GERBAUD, Laetitia GOUAS, Carole Goumy, Hélène Laurichesse, Philippe Vago, Isabelle Perthus. 9èmes Assises de Génétique. Nantes, Février 2018

**\*« Test ADNlc T21 » ou test génétique non invasif de dépistage de la trisomie 21 fœtale : bilan d'activité 2017 du Service de Cytogénétique Médicale du CHU Estaing de Clermont-Ferrand.** Philippe Vago, Gaëlle Salaun, Céline Pebrel-Richard, Eléonore Eymard-Pierre, Hélène Laurichesse, Carole Goumy, Laetitia Gouas. 23ème Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Caen, 22-24 mars 2018

**\*« Test ADNlc T21 » ou test génétique non invasif de dépistage de la trisomie 21 fœtale : à propos d'un consortium d'utilisateurs.** Laetitia Gouas, Patrick Callier, Nora Chelloug, Henri Copin, Cédric Le Caignec, Martine Doco-Fenzy, Paul Kuentz, Bertrand Macé, Vincent Gatinois, François Vialard, Valentine Marquet, Philippe Vago. 23ème Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Caen, 22-24 mars 2018

**Insertion réciproque 14;22 à l'origine de fausses couches à répétition.** Gaëlle Salaün, Céline Pebrel-Richard, Christine Francannet, Baptiste Troude, Florence Brugnon, Hanae Pons, Laetitia Gouas, Eléonore Eymard-Pierre, Andréï Tchirkov, Philippe Vago, Carole Goumy, 23ème Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, Caen, 22-24 mars 2018

**Test Génétique Non Invasif de dépistage de la trisomie 21 fœtale (TGNI T21) : retour d'expérience après une année de pratique au CHU de Clermont-Ferrand.** Laetitia Gouas, Eléonore Eymard-Pierre, Gaëlle Salaun, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Philippe Vago. 22ème Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticien, 9 – 11 mars, Reims, 2017

**Transition épithélio-mésenchymateuse in vitro d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple négative dans un environnement extracellulaire de type trisomie 21.** Gaëlle Salaün, Stéphan Kemeny, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Philippe Vago, Laetitia Gouas. 9 – 11 mars, Reims, 2017 (communication affichée)

**Un nouveau cas d'acro-ostéolyse induit par une duplication du gène PTHLH.** Céline Pebrel-Richard, Fanny Laffargue, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Stéphane Echaubard, Eléonore Pierre, Laetitia Gouas, Gaëlle Salaün, Geneviève Baujat, Philippe Vago, Christine Francannet. 8èmes Assises de Génétique. Lyon , février 2016

**Obésité sévère et retard moteur associés à une duplication 6q25.2-q26S.** Kemeny, C. Pebrel-Richard, E. Eymard-Pierre, C. Cothenet, G. Salaun, L. Gouas, C. Goumy, C. Francannet, F. Laffargue, P. Vago.. 8èmes Assises de Génétique. Lyon, février 2016

**Nouvelle délétion en 2q14.1q14.3 emportant les gènes GLI2 et RNU4ATAC associée à une agénésie partielle du corps calleux et un retard de croissance intra-utérin.** G.Salaun, M. Gay-Bellile, S.Kemeny, E. Eymard-Pierre1, L.Gouas, H.Laurichesse, M.Briard, C. Pebrel-Richard, P.Vanlieferingen, A.Tchirkov, P.Vago, C.Rouzade, C.Goum.. 8èmes Assises de Génétique. Lyon, février 2016

**Transition épithélio-mésenchymateuse d'une lignée de carcinome mammaire triple-négatif sur matrice extra-**

**cellulaire trisomique 21 in vitro.** Gaëlle Salaun, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Philippe Vago, Laetitia Gouas

**Syndrome de Goldenhar et microduplication 14q23.1.** Gaëlle Salaun, Fanny Laffargue, Eléonore Pierre, Carole Goumy, Laetitia Gouas, Corinne Suarez-Douarre, Christine Francannet, Philippe Vago, Céline Pebrel-Richard. XXIII<sup>e</sup> colloque de l'ACLF, Montpellier, septembre 2016

**Transition Epithélio-mésenchymateuse (TEM) d'une lignée d'adénocarcinome mammaire triple-négatif dans le contexte de la trisomie 21.** Gaëlle Salaun, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Philippe Vago, Laetitia Gouas. XXIII<sup>e</sup> colloque de l'ACLF, Montpellier, septembre 2016

**Mise en place d'un Test Génétique Non Invasif (TNGNI) de dépistage prénatal de la trisomie 21 par séquençage d'amplicons.** Laetitia Gouas, Eleonore Pierre, Gaëlle Salaun, Stephan Kemeny, Céline Pébrel-Richard, Carole Goumy, Philippe Vago. XXIII<sup>e</sup> colloque de l'ACLF, Montpellier, septembre 2016

**Etude de l'organisation spatiale du génome dans le noyau interphasique de cellules trisomiques 21.** Stephan Kemeny, Natasha Ollier, Gaëlle Salaun, Carole Goumy, Céline Richard, Laetitia Gouas, Philippe Vago. XX<sup>e</sup>me Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénétiens, Amiens, 12-14 mars 2015.

**Exploration cytogénétique des produits de fausse couche spontanée par « Prénatal BoBs™.** S. Mellali<sup>1</sup>, L. Gouas, S. Kémény, C. Goumy, K. Haoud, G. Salaun, C. Pebrel-Richard, E. Pierre, S. Moulessehou, P. Vago. XX<sup>e</sup>me Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénétiens, Amiens, 12-14 mars 2015.

**Microdélétion 17q12 et hernie diaphragmatique.** Salaun G, Kemeny S, Pebrel-Richard C, Eymard- Pierre E, Gouas L, Laffargue F, Laurichesse H, Vago P, Goumy C. XX<sup>e</sup>me Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénétiens, Amiens, 12-14 mars 2015.

**Prenatal BoBs™ : effet d'une contamination maternelle sur la détection de déséquilibres chromosomiques.** Laetitia Gouas, Stéphan Kémény, Camille Lemattre, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Michel Giollant, Nathalie Bonnet, Aurélie Monnier, Hélène Laurichesse, Philippe Vago. 7<sup>ème</sup> Assises de Génétique humaine, Bordeaux, 29-31 Janvier 2014.

**Impact de la contamination maternelle sur la détection de déséquilibres chromosomiques par le Prenatal BoBs™.** Laetitia Gouas, Stéphan Kémény, Camille Lemattre, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Michel Giollant, Nathalie Bonnet, Aurélie Monnier, Hélène Laurichesse, Philippe Vago. XIX<sup>e</sup>me Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénétiens, Amiens, 20-22 mars 2014.

**Laetitia Gouas et Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Mathilde Gay-Bellile, Laurène Véronèse, Andrei Tchirkov, Philippe Vago.** Identification de microduplications impliquant des gènes du chromosome X. XVIII<sup>e</sup>me Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénétiens, Marseille, 14-16 mars 2013.

**M. Gay-Bellile, E. Eymard-Pierre, C. Pebrel-Richard, S. Kemeny, L. Gouas, C. Sarret, O. Boespflug-Tanguy, C. Goumy and P. Vago** Analyse Chromosomique sur Puces à ADN (ACPA) et Leucodystrophie d'origine indéterminée. XVIII<sup>e</sup>me Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénétiens, Marseille, 14-16

mars 2013.

**S. Kemeny, C. Pebrel-Richard, E. Eymard-Pierre, M. Gay-Bellile, L. Gouas, C. Goumy, A. Tchirkov, C. Francannet and P. Vago** Microduplication en 17q21.33 : un deuxième cas identifié par ACPA XVIIIème Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénéticiens, Marseille, 14-16 mars 2013.

**M. Gay-Bellile, S.Kemeny, E. Eymard-Pierre, C. Pebrel-Richard, L.Gouas, W. Ayed, D. Gallot, P.Vago and C.Goumy.** Délétion interstitielle 2q36.1q36.3 impliquant les gènes PAX3 et EPHA4 chez un fœtus présentant un spina bifida et une fente palatine – XXI Colloque ACLF et XXI Colloque ATC, 12-14 septembre, 2012

**S.Kemeny, C.Pebrel, Richard, E.Eymard, Pierre, M.Gay-Bellile, L.Gouas, C.Goumy, A.Tchirkov, C.Francannet et P.Vago** Microduplication en 17q21.33: un deuxième cas identifié par ACPA - XXI Colloque ACLF et XXI Colloque ATC, 12-14 septembre, 2012

**A.Debost-Legrand, E.Eymard-Pierre, C.Pebrel-Richard, L.Gouas, C.Goumy, M.Giollant, W.Ayed, A.Tchirkov, C.Francannet and P.Vago** Un nouveau cas de microdélétion 8q21.3q22.1 permettant de restreindre à 0,5 Mb la région critique du syndrome de Nablus. XXI Colloque ACLF et XXI Colloque ATC, 12-14 septembre, 2012

**C.Pebrel-Richard, E.Eymard-Pierre, C.Sarret, S.Kemeny, M.Gay-Bellile, L.Gouas, M.Giollant, C.Goumy, P.Vago** Identification d'une délétion homozygote en 15q23 par analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) dans un contexte de rétinite pigmentaire syndromique XXI Colloque ACLF et XXI Colloque ATC, 12-14 septembre, 2012

**\*Wiem Ayed, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Patricia Combes, Céline Pebrel-Richard, Aurélie Monnier, Andrei Tchirkov, Ahlem Amouri, Philippe Vago, Laetitia Gouas.** Expression du gène MEST dans les villosités chorales de fœtus trisomiques 21 – Congrès des Morphologistes Clermont-Ferrand, 15-17 mars 2012.

**Laetitia Gouas, Carole Goumy, Stéphan Kémény, Hélène Laurichesse, Anne-Marie Beaufrère, Eleonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Patricia Combes, Lauren Véronèse, Andrei Tchirkov, Philippe Vago.** Intérêt de l'exploration ciblée par MLPA des régions subtélomériques et de 21 régions chromosomiques concernées par des microremaniements récurrents chez des fœtus présentant une anomalie de la clarté nucale et un caryotype normal. XVIIème Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénéticiens, Clermont-Ferrand, 15-17 mars 2012.

**Carole Goumy, Stéphan Kémény, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Laetitia Gouas, Patricia Combes, Mathilde Gay-Bellile, Lauren Véronèse, Denis Gallot, Andrei Tchirkov, Philippe Vago** Variant centromérique d'un chromosome 6 de découverte prénatale – 6<sup>ème</sup> Assises de Génétique humaine, Marseille, 2-4 février 2012

**Pebrel-Richard C., Eymard-Pierre E., Kemeny S., Gay-Bellile M., Gouas L., Francannet C., Goumy C., Vago P.** Duplication du gène TUSC3 associée au retard mental à transmission autosomique récessive - 6<sup>ème</sup> Assises de Génétique humaine, Marseille, 2-4 février 2012

**Laetitia Gouas, Carole Goumy, Stéphan Kémény, Hélène Laurichesse, Anne-Marie Beaufrère, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Patricia Combes, Lauren Véronèse, Andrei Tchirkov, Philippe Vago** Intérêt de

l'exploration ciblée des régions subtélomériques et de 21 régions chromosomiques impliquées dans des syndromes microdélétionnels chez des fœtus présentant une anomalie de la clarté nucale et un caryotype normal. 6<sup>ème</sup> Assises de Génétique humaine, Marseille, 2-4 février 2012

**Kemeny S, Goumy C, Richard C, Gouas L, Veronese L, Lemery D, Tchirkov A, Vago P** Diagnostic échographique anténatal d'un syndrome 48,XXYY : à propos d'un cas 6<sup>ème</sup> Assises de Génétique humaine, Marseille, 2-4 février 2012

**Wiem Ayed, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Patricia Combes, Céline Pebrel-Richard, Aurélie Monnier, Andrei Tchirkov, Philippe Vago, Laetitia Gouas** Etude de l'expression du gène MEST dans les cellules de villosités chorales de fœtus trisomiques 21 6<sup>ème</sup> Assises de Génétique humaine, Marseille, 2-4 février 2012

**L. Gouas, C. Goumy, A. Montel, E. Aymard-Pierre, C. Pebrel-Richard, A. Monnier, L. Véronèse, A. Tchirkov, P. Vago.** Expression du gène *MEST* (7q32) dans les cellules de villosités chorales en culture de fœtus trisomiques 21, XVI<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénéticiens, Rouen, 10-12 mars 2011.

**L. Véronèse, O. Tournilhac, N. Prie, F. Kwiatkowski, P. Combes, L. Gouas, P. Verrelle, R. Guièze, P. Vago, J.O. Bay, A. Tchirkov,** Télomères et instabilité chromosomique dans la leucémie lymphoïde chronique, Journée Scientifique de Cancérologie d'Auvergne, Clermont-Ferrand, 20 Janvier 2011.

**L. Gouas, C. Goumy, A. Montel, E. Aymard-Pierre, C. Pebrel-Richard, A. Monnier, L. Véronèse, A. Tchirkov, P. Vago.** Etude de l'expression du gène *MEST* (7q32) dans les cellules de villosités chorales de fœtus trisomiques 21, VI<sup>ème</sup> Journée de la Recherche, IFR79 Santé Auvergne, 25 novembre 2010

**Véronèse L, Combes P, Bay JO, Gouas L, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Goumy C, Vago P, Tournilhac O et Tchirkov A.** Mise en évidence des anomalies cytogénétiques de la Leucémie Lymphoïde Chronique : intérêt de la technique de MLPA. 14<sup>èmes</sup> Journées du Collège Universitaire et Hospitalier des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens, Montpellier, France, 11-13 mars 2010

**Goumy C, Gouas L, Eymard-Pierre E, Richard-Pebrel C, Haoud K, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Intérêt de la MLPA en prénatal pour la recherche de déséquilibres génomiques cryptiques. 5<sup>èmes</sup> Assises de Génétique Humaine et Médicale, Strasbourg, France, 28-30 janvier 2010

**Veronese L, Combes P, Bay Jo, Gouas L, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Goumy C, Vago P, Tournihac O, Tchirkov A.** Mise en évidence des anomalies cytogénétique de la leucémie lymphoïde chronique: apport de la MLPA. 5<sup>èmes</sup> Assises de Génétique Humaine et Médicale, Strasbourg, France, 28-30 janvier 2010.

**Pebrel-Richard C, Gouas L, Eymard Pierre E, Combes P, Giollant M, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A., Vago P.** Array comparative genomic hybridization (Array-CGH) benefits in medical cytogenetic: about a 8p23.1 deletion. 5<sup>èmes</sup> Assises de Génétique Humaine et Médicale, Strasbourg, France, 28-30 janvier 2010.

**Goumy C., Eymard-Pierre E., Gouas L., Veronese L., Tchirkov A., Vago P.** Intérêts et indications de la MLPA en cytogénétique constitutionnelle. 13<sup>èmes</sup> journées du Collège Universitaire et Hospitalier des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens, Versailles, France, 19-21 mars 2009

**Eymard-Pierre E & Gouas L, Goumy C, Veronese L, Combes P, Pebrel-Richard C, Tchirkov A, Vago P.** Intérêts et limites de l'hybridation génomique sur puce à ADN (CGH array) en cytogénétique constitutionnelle. 91ème Congrès de l'Association des Morphologistes, Bruxelles, Belgique, 21-23 mai 2009

**Goumy C, Gouas L, Eymard-Pierre E, Combes P, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Hernie diaphragmatique congénitale : mise en évidence de gènes candidats par une approche chromosomique. 91ème Congrès de l'Association des Morphologistes, Bruxelles, Belgique, 21-23 mai 2009

**Gouas L, Eymard-Pierre E, Goumy C, Combes P, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Apports et limites de la PCR multiplexe en cytogénétique médicale. 91ème Congrès de l'Association des Morphologistes, Bruxelles, Belgique, 21-23 mai 2009

**Pebrel-Richard C, Gouas L, Jaffray JY, Eymard-Pierre E, Combes P, Goumy C, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH): benefits and limits in medical cytogenetic. Joint Meeting AFC/ESCCA, Saint-Etienne, France, 10-12 septembre 2009

**Goumy C et Gouas L, Legrand A, Pebrel-Richard C, Eymard-Pierre E, Combes P, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH): benefits and limits in medical cytogenetic. Joint Meeting AFC/ESCCA, Saint-Etienne, France, 10-12 septembre 2009

**Veronese L, Combes P, Bay Jo, Gouas L, Eymard-Pierre E, Pebrel-Richard C, Goumy C, Vago P, Tournilhac O, Tchirkov A.** Intérêt de la MLPA pour la mise en évidence des anomalies cytogénétiques de la leucémie lymphoïde chronique. Journée de la Recherche, IFR79, Clermont-Ferrand, France, 29 novembre 2009

**\*Goumy C. et Gouas L., Eymard-Pierre E., Véronèse L., Tchirkov A., Vago P.** Intérêts de la MLPA en cytogénétique constitutionnelle pré- et postnatale. Association des Cytogénéticiens de Langue Française, Nantes, 2008

**Vago P, Gouas L, Goumy C, Giollant M, Véronèse L, Tchirkov A, Eymard-Pierre E, Francannet C, Jaffray J.Y.** Mise en évidence par MLPA d'une duplication 15q11q12 familiale. Association des Cytogénéticiens de Langue Française, Nantes, 2008

**Véronèse L, Tchirkov A, Gouas L, Goumy C, Perissel B, Veyrat-Masson R, Hermet E, Tournilhac O, Bay J.O, Vago P** Impact clinique des anomalies chromosomiques additionnelles observées au diagnostic de leucémie aiguë myéloïde à cytogénétique favorable : à propos de 2 cas. Association des Cytogénéticiens de Langue Française, Nantes, 2008

**\* Vago P., Gouas L, Véronèse L, Goumy C, Tchirkov A.** 1958-2008, cinquante ans de cytogénétique médicale : de la morphologie aux techniques moléculaires pour la quantification génique. 90ème congrès de l'Association des Morphologistes, Bordeaux, 2008.

**Véronèse V, Tournilhac O., Vago P., Davi F., Dighiero G., Chautard E., Veyrat-Masson R., Kwiatkowski F., Goumy C., Gouas L., Bay J-O., Tchirkov A.** Forte corrélation entre les niveaux d'expression des gènes VEGF et MCL-1 dans la Leucémie Lymphoïde Chronique B. Volume des résumés, Journée de la Recherche, IFR79, Clermont-Ferrand, 27 novembre 2008

**Eymard-Pierre E, Gouas L, Goumy C, Véronèse L, Tchirkov A, Francannet C, Boespflug-Tanguy O, Vago P.** Utilisation de la technique de CGH Array dans la recherche de microremaniements chez des patients atteints de leucodystrophies et dysmorphies. Volume des résumés, Journée de la Recherche, IFR79, Clermont-Ferrand, 27 novembre 2008

**\*Capri Y., Gouas L, Goumy C., Roucaute T., Giollant M., Jaffray JY., Francannet F., Vago P.** Identification d'une duplication 15q11q13 responsable d'un autisme familial par MLPA. 90ème congrès de l'Association des Morphologistes, Bordeaux, 2008

**\*Roucaute T, Gouas L, Goumy C, Giollant M, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P.** Haplo-suffisance de la région 11q(q14.3q22.1) : à propos d'une délétion transmise sur 3 génération dans une famille. Volume des résumés, 4èmes Assises de Génétique, 17-19 janvier 2008, Lille.

**Gouas L, Roucaute T, Goumy C, Laurichesse H, Beaufrère A.M, Riguet B, Grenet C, Buvat A, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Identification d'un microremaniement subtélomérique cryptique déséquilibré par MLPA chez un fœtus présentant une hyperclarté nucale au premier trimestre de gestation. Volume des résumés, 4èmes Assises de Génétique, 17-19 janvier 2008, Lille.

**Gouas L, Nicaud V, Chaouch S, Berthet M, Forhan A, Pfeufer A, Tired L, Balkau B, Guicheney P et le groupe d'Etude D.E.S.I.R** Association génétique entre des polymorphismes de canaux ioniques cardiaques et la longueur de l'intervalle QTc chez des sujets sains. Volume des résumés, 4èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale, 17-19 janvier 2008, Lille, Médecine sciences 2008, Hors série N°1, 24 : 155-156 (abstract)

**Goumy C, Gouas L, Beaufrère AM, Véronèse L, Roucaute T, Gaspard F, Tchirkov A, Lemery D, Déchelotte P, Vago P.** Trisomie 3p et monosomie 5p chez un fœtus à phénotype évoquant un syndrome de Larsen. Volume des résumés, 4èmes Assises de Génétique, 17-19 janvier 2008, Lille.

**\* Roucaute T, Gouas L, Giollant M, Goumy C, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P.** Diagnostic prénatal d'une délétion interstitielle héritée [del(11)(q14.3q22.1)mat] visible au caryotype standard et sans conséquence sur le phénotype. 12<sup>ème</sup> Congrès annuel AFC Cytométrie, 10-12 octobre 2007, Clermont-Ferrand.

**\* T. Roucaute T, Benier C, Cordebois C, Giollant M, Gouas L, Goumy C, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P..** Identification par cytogénétique moléculaire de chromosomes marqueurs surnuméraires en prénatal. 12<sup>ème</sup> Congrès annuel AFC Cytométrie, 10-12 octobre 2007, Clermont-Ferrand.

**Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Tired L, Balkau B, Guicheney P and the D.E.S.I.R study group.** Association studies between *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2* and *SCN5A* polymorphisms and QTc interval length in a healthy population. XXII<sup>ème</sup> congrès du Groupe de Réflexion et de Recherche sur les maladies Cardiovasculaires (GRRC), Strasbourg, France, 20-22 avril 2005, Arch Mal Coeur Vaiss., 98 : 422

**Berthet M, Gouas L, Simon F, Fressard V, Guicheney P.** The recessive D85N variant in the beta-subunit of cardiac  $I_{Ks}$  channel encoding *KCNE1* gene is associated with QTc prolongation and cardiac arrhythmias without deafness in two LQTS families. XXI<sup>ème</sup> congrès du Groupe de Réflexion et de Recherche sur les maladies Cardiovasculaires, La Baule, France, 22-23 avril 2004, Arch. Mal. Cœur Vaiss., 97:447

**Jeannet P-Y, Maugendre S, Gouas L, Fardeau M, Romero N, Guicheney P:** Five families with centronuclear myopathy (CNM) unlinked to the canine CNM locus. 8<sup>th</sup> International World Muscle Society Congress, Szeged, Hongrie, 3-6 Septembre, 2003.

**T.T. Cung, I. Denjoy, L. Gouas, M. Berthet, H. Chenglin, F. Raczka, P. Guicheney, J.M. Davy.** ECG and symptoms correlation in a large family of Brugada Syndrome related to a *SCN5A* mutation. *European Heart Journal* 2003, volume 24, suppl: 383

**Gouas L, Berthet M, Bellocq C, Demolombe S, Balkau B, Hainque B, Baró I, Guicheney P** Unexpected identification of two new *KCNQ1* mutations in the general population. *European Heart Journal* 2003; volume 24, suppl: 233

**Gouas L, Berthet M, Nicaud V, Forhan A, Tired L, Balkau B, Guicheney P and the D.E.S.I.R study group.** *KCNQ1* and *KCNE1* polymorphisms and QTc interval in healthy subjects. XX<sup>ème</sup> congrès du Groupe de Réflexion et de Recherche sur les maladies Cardiovasculaires, Grenoble, France, 15 - 16 Avril 2003, *Arch Mal Coeur Vaiss.*, 96 : 359-450

**Gouas L, Berthet M, Bellocq C, Baro I, Simon F, Forhan A, Balkau B, Hainque B, Guicheney P and the D.E.S.I.R. Study Group.** Identification of two new mutations with mild effect in *KCNQ1* in asymptomatic individuals with borderline QTc prolongation. XIVth World Congress of Cardiology, Sydney, Australie, 5-9 mai 2002.

**Gouas L, Berthet M, Bellocq C, Baro I, Simon F, Forhan A, Balkau B, Hainque B, Guicheney P and the D.E.S.I.R. Study Group.** Identification of two new mutations with mild effect in *KCNQ1* in asymptomatic individuals with borderline QTc prolongation. XIXe congrès du Groupe de Réflexion et de Recherche sur les maladies Cardiovasculaires (GRRC), Orléans, France, 25-26 avril 2002, *Arch Mal Coeur Vaiss.*, 98 : 422

### **Communications orales lors de congrès et colloques**

**Laetitia Gouas, Nooshin Omar, Gaëlle Salaun, Sophie Besse, Eléonore Eymard-Pierre, Céline Pebrel-Richard, Carole Goumy, Philippe Vago.** Comparaison de deux méthodes de décellularisation pour l'obtention d'une matrice extracellulaire sécrétée in vitro. 26<sup>ème</sup> Journée du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens, Annecy, 10 – 12 mars 2022

**Laetitia Gouas, Wiem Ayed, Stéphan Kémény, Carole Goumy, Eléonore Eymard-Pierre, Patricia Combes, Céline Pebrel-Richard, Aurélie Monnier, Andrei Tchirkov, Ahlem Amouri, Philippe Vago** Trisomie 21 : Etude de la dérégulation transcriptionnelle de gènes disomiques XVII<sup>ème</sup> Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes, Cytogénéticiens, Clermont-Ferrand, 15-17 mars 2012.

**Gouas L & Goumy C, Eymard-Pierre E, Véronèse L, Tchirkov A, Vago P.** Recherche de déséquilibres génomiques cryptiques en prénatal par MLPA. 14<sup>èmes</sup> Journées du Collège Universitaire et Hospitalier des Histologistes, Embryologistes, Cytologistes et Cytogénéticiens, Montpellier, France, 11-13 mars 2010

**Gouas L, Goumy C, Roucaute T, Laurichesse H, Beaufrère A.M, Riguet B, Grenet-Benier C, Buvat A, Veronese L, Tchirkov A, Vago P.** Recherche de microremaniements chromosomiques subtélomériques déséquilibrés par MLPA chez des fœtus présentant une hyperclarté nucale au premier trimestre de gestation. Journée de la

Recherche, IFR79, 22 novembre 2007, Clermont-Ferrand.

**Gouas L, Berthet M, Nicaud V, Forhan A, Tiret L, Balkau B, Guicheney P and the D.E.S.I.R study group** *KCNQ1* and *KCNE1* polymorphisms and QTc interval in healthy subjects. Scientific Sessions of the American Heart Association, Chicago, Etats-Unis, 17-20 novembre 2002 *Circulation* 2002,106 (19), Suppl II, II-4

#### 4.10 Bibliographie

1. Taipale P, Hiilesmaa V, Salonen R, Ylöstalo P. Increased nuchal translucency as a marker for fetal chromosomal defects. *N Engl J Med* 337:1654-1658 (1997)
2. Schou KV, Kirchhoff M, Nygaard U, Jørgensen C, Sundberg K. Increased nuchal translucency with normal karyotype: a follow-up study of 100 cases supplemented with CGH and MLPA analyses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 34:618-622 (2009)
3. Lejeune J, Gauthier M, Turpin R. Les chromosomes humains en culture de tissus [Human chromosomes in tissue cultures]. *C R Hebd Seances Acad Sci. Jan* 26;248(4):602-3 (1959)
4. Lyle R et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet* 17, 454–466 (2009)
5. Mikkelsen M, Stene J. The effect of maternal age on the incidence of Down's syndrome. *Humangenetik*. 16:141-6 (1972)
6. Vicari S. Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome. *Behav Genet*. 36 : 355-64 (2006)
7. Freeman SB et al. Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 80, 213–217 (1998)
8. Aflalo-Rattenbac R, Créau N. Developmental defects in trisomy 21 and mouse models. *ScientificWorldJournal* 6 : 1945-64 (2006)
9. Ugazio AG, Maccario R, Notarangelo LD, Burgio GR. Immunology of Down syndrome: a review. *Am J Med Genet Suppl*. 7 : 204-12 (1990)
10. Jackson JF, North ER 3rd, Thomas JG. Clinical diagnosis of Down's syndrome. *Clin Genet*. 9(5):483-7. (1976)
11. Gardiner K, Herault Y, Lott IT, Antonarakis SE, Reeves RH, Dierssen M. Down syndrome: from understanding the neurobiology to therapy. *J Neurosci*. 30(45):14943-5 (2010)
12. FitzPatrick DR, Ramsay J, McGill NI, Shade M, Carothers AD, Hastie ND. Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet*. 11(26):3249–56 (2002)
13. Mao R, Zielke CL, Ronald Zielke H, Pevsner J. Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing down syndrome brain. *Genomics*. 81(5):457–67 (2003)
14. Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland AJ, Bahn S. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics*. 90(6):647–60 (2007)
15. Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, et al. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature*. 508(7496):345-50 (2014)
16. Do LH, Mobley WC & Singhal N. Questioned validity of gene expression dysregulated domains in Down's syndrome. *F1000Res*. 4, 269 (2015)
17. Ahlfors H et al. Gene expression dysregulation domains are not a specific feature of Down syndrome. *Nat. Commun* 10, 2489 (2019)
18. Rowley, M. J. & Corces, V. G. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet*. 19, 789–800 (2018)
19. Potier M-C, Rivals I, Mercier G, Ettwiller L, Moldrich RX, Laffaire J, et al. Transcriptional disruptions in Down syndrome: a case study in the Ts1Cje mouse cerebellum during post-natal development. *J Neurochem*. 97:104–9 (2006)

20. Altug-Teber O, Bonin M, Walter M, Mau-Holzmann UA, Dufke A, Stappert H, Tekesin I, Heilbronner H, Nieselt K, Riess O. Specific transcriptional changes in human fetuses with autosomal trisomies. *Cytogenet Genome Res* 119(3-4):171–184 (2007)
21. Chou CY, Liu LY, Chen CY, Tsai CH, Hwa HL, Chang LY, Lin YS, Hsieh FJ. Gene expression variation increase in trisomy 21 tissues. *Mamm Genome* 19(6):398–405 (2008)
22. Rozovski U, Jonish-Grossman A, Bar-Shira A, Ochshorn Y, Goldstein M, Yaron Y. Genome-wide expression analysis of cultured trophoblast with trisomy 21 karyotype. *Hum Reprod* 22(9):2538–2545 (2007)
23. Li C-M, Guo M, Salas M, Schupf N, Silverman W, Zigman WB, Husain S, Warburton D, Thaker H, Tycko B. Cell type-specific overexpression of chromosome 21 genes in fibroblasts and fetal hearts with trisomy 21. *BMC Med Genet*. Mar 15;7:24 (2006)
24. Conti A, Fabbrini F, D'Agostino P et al. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics* 8(1):268–268 (2007)
25. Sommer CA, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM, Henrique-Silva F. Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome. *Genome* 51(1):19–29 (2007)
26. Costa V, Sommese L, Casamassimi A, Colicchio R, Angelini C, Marchesano V, et al. Impairment of circulating endothelial progenitors in Down syndrome. *BMC Med Genomics*. 3(1):40 (2010)
27. Finn EH, Misteli T. Molecular basis and biological function of variability in spatial genome organization. *Science*. 365(6457):eaaw9498 (2019)
28. Ibrahim DM, Mundlos S. Three-dimensional chromatin in disease: what holds us together and what drives us apart? *Curr Opin Cell Biol*. 64:1-9 (2020)
29. Cremer T, Cremer M. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(3):a003889–a003889 (2010)
30. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol.*;145(6):1119–1131 (1999)
31. Sun HB, Shen J, Yokota H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J*. 79(1):184–190 (2000)
32. Heride C, Ricoul M, Kiêu K, von Hase J, Guillemot V, Cremer C, et al. Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *J Cell Sci*. 123(23):4063–75 (2010)
33. Parada LA, Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol*. 12(9):425–432 (2002)
34. Gerlich D, Ellenberg J. Dynamics of chromosome positioning during the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*. 15(6):664–71 (2003)
35. Bolzer A, Kreth G, Solovei I et al. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.*;3(5):e157 (2005)
36. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2(4):292–301 (2001)
37. Verschure PJ, van der Kraan I, Manders EM, van Driel R. Spatial Relationship between Transcription Sites and Chromosome Territories. *J Cell Biol*. 147(1):13–24 (1999)
38. Mahy NL, Perry PE, Gilchrist S, Baldock RA, Bickmore WA. Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol*. May 13;157(4):579–89

(2002)

39. Dietzel S, Schiebel K, Little G, Edelmann P, Rappold GA, Eils R, et al. The 3D Positioning of ANT2 and ANT3 Genes within Female X Chromosome Territories Correlates with Gene Activity. *Exp Cell Res*. 252(2):363–75 (1999)
40. Harewood L, Schutz F, Boyle S, Perry P, Delorenzi M, Bickmore WA, Reymond A (2010) The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res* 20(5):554–564. <https://doi.org/10.1101/gr.103622.109>
41. Hervé B, Coussement A, Gilbert T, Dumont F, et al. Aneuploidy: the impact of chromosome imbalance on nuclear organization and overall genome expression: impact of chromosome imbalance. *Clin Genet* 90(1):35–48 (2016)
42. Poulet A, Arganda-Carreras I, Legland D, Probst AV, Andrey P, Tatout C. NucleusJ: an ImageJ plugin for quantifying 3D images of interphase nuclei. *Bioinformatics*. Apr 1;31(7):1144–6 (2015)
43. Edens LJ, White KH, Jevtic P, Li X, Levy DL. Nuclear size regulation: from single cells to development and disease. *Trends Cell Biol*. 23(4):151–159 (2013)
44. Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*. 10(3): 211–219 (2001)
45. Paz N, Zabala A, Royo F, García-Orad Á, Zugaza JL, Parada LA. Combined fluorescent-chromogenic in situ hybridization for identification and laser microdissection of interphase chromosomes. *PLoS One* 8(4):e60238 (2013)
46. Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T. Inheritance of gene density–related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162(5):809–820 (2003)
47. Paz N, Felipe-Blanco I, Royo F, Zabala A, Guerra-Merino I, García-Orad Á, Zugaza JL, Parada LA. Expression of the DYRK1A gene correlates with its 3D positioning in the interphase nucleus of Down syndrome cells. *Chromosom Res* 23(2):285–298 (2015)
48. Göndör A, Ohlsson R. Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* 461(7261):212–217 (2009)
49. Rinke B, Bischoff A, Meffert M-C et al. Volume ratios of painted chromosome territories 5, 7 and X in female human cell nuclei studied with confocal laser microscopy and the Cavalieri estimator. *Bioimaging* 3:1–11 (1995)
50. Eils R, Dietzel S, Bertin E et al. Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 135(6):1427–1440 (1996)
51. Clemson CM, Hall LL, Byron M, McNeil J, Lawrence JB. The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences. *Proc Natl Acad Sci* 103(20):7688–7693 (2006)
52. Teller K, Illner D, Thamm S, Casas-Delucchi CS, Versteeg R, Indemans M, Cremer T, Cremer M. A top-down analysis of X<sub>a</sub>- and X<sub>i</sub>- territories reveals differences of higher order structure at ≥ 20 Mb genomic length scales. *Nucleus* 2(5):465–477 (2011)
53. Szczerbal I, Foster HA, Bridger JM. The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system. *Chromosoma* 118(5):647–663 (2009)

54. Nižetić D, Groet J. Tumorigenesis in Down's syndrome: big lessons from a small chromosome. *Nat Rev Cancer*. 12(10):721-32 (2012)
55. Ganmore I, Smootha G. & Izraeli S. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition. *Hum. Mol. Genet*. 18, R84–R93 (2009)
56. Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Higgins CD, Wright AF & Jacobs PA. Cancer incidence in women with Turner syndrome in Great Britain: a national cohort study. *Lancet Oncol*. 9, 239–246 (2008)
57. Swerdlow AJ et al. Mortality and cancer incidence in persons with numerical sex chromosome abnormalities: a cohort study. *Ann. Hum. Genet*. 65, 177–188 (2001)
58. Trétarre B, Bourgarel S, Stoebner-Delbarre A, Jacot W, Bessaoud F, Satge D. Breast cancer and screening in persons with an intellectual disability living in institutions in France. *J Intellect Disabil Res*. 61(3):266-278 (2017)
59. Hasle, H., Clemmensen, I. H. & Mikkelsen, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 355, 165–169 (2000)
60. Krivit W & Good RA. Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia; report of a nationwide survey. *AMA J. Dis. Child* 94, 289–293 (1957)
61. Zipursky, A., Poon, A. & Doyle, J. Leukemia in Down syndrome: a review. *Pediatr. Hematol. Oncol*. 9, 139–149 (1992)
62. Yang Q, Rasmussen SA & Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* 359, 1019–1025 (2002)
63. Al-Kasim F, Doyle JJ, Massey GV, Weinstein HJ & Zipursky A. Incidence and treatment of potentially lethal diseases in transient leukemia of Down syndrome: Pediatric Oncology Group Study. *J. Pediatr. Hematol. Oncol*. 24, 9–13 (2002)
64. Satgé D, Honoré L, Sasco AJ, Vekemans M, Chompret A, Réthoré MO. An ovarian dysgerminoma in Down syndrome. Hypothesis about the association. *Int J Gynecol Cancer*. 16 Suppl 1:375-9 (2006)
65. Tanabe M, Mizushima M, Anno Y, Kondou S, Dejima S, Hirao DJ, Kamitani H, Watanabe T, Hori T. Intracranial germinoma with Down's syndrome: a case report and review of the literature. *Surg Neurol*. 47(1):28-31 (1997)
66. Goldacre MJ, Wotton CJ, Seagroatt V & Yeates D. Cancers and immune related diseases associated with Down's syndrome: a record linkage study. *Arch. Dis. Child* 89, 1014–1017 (2004)
67. Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol*. Jul;2(7):429-36 (2001)
68. Hermon C, Alberman E, Beral V. & Swerdlow AJ. Mortality and cancer incidence in persons with Down's syndrome, their parents and siblings. *Ann. Hum. Genet*. 65, 167–176 (2001)
69. Hill DA et al. Mortality and cancer incidence among individuals with Down syndrome. *Arch. Intern. Med*. 163, 705–711 (2003)
70. Patja K, Pukkala E, Sund R, Livanainen M & Kaski M. Cancer incidence of persons with Down syndrome in Finland: a population-based study. *Int. J. Cancer* 118, 1769–1772 (2006)
71. Gilbert D, Rapley E & Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nature Rev. Cancer* 11, 278–288 (2011)
72. Miki M, Ohtake N, Hasumi M, Ohi M & Moriyama S. Seminoma associated with bilateral cryptorchidism in Down's syndrome: a case report. *Int. J. Urol*. 6, 377–380 (1999)
73. Cools M et al. Maturation delay of germ cells in fetuses with trisomy 21 results in increased

- risk for the development of testicular germ cell tumors. *Hum. Pathol.* 37, 101–111 (2006)
74. Hasle H, Friedman JM, Olsen JH, Rasmussen SA. Low risk of solid tumors in persons with Down syndrome. *Genet Med.* 18(11):1151-1157 (2016)
  75. Satgé D, Sasco AJ, Lacour B. Are solid tumours different in children with Down's syndrome? *Int J Cancer.* 106(2):297-8 (2003)
  76. Satgé D, Sasco AJ, Carlsen NL, Stiller CA, Rubie H, Hero B, et al. A Lack of Neuroblastoma in Down Syndrome: A Study from 11 European Countries. *Cancer Res.* 58 (3), 448–452 (1998).
  77. Satgé D, Stiller CA, Rutkowski S, et al. A very rare cancer in Down syndrome: medulloblastoma. Epidemiological data from 13 countries. *J Neurooncol.* Mar;112(1):107-14 (2013)
  78. Boker LK, Blumstein T, Sadetzki S, Luxenburg O, Litvak I, Akstein E, Modan B. Incidence of leukemia and other cancers in Down syndrome subjects in Israel. *Int J Cancer.* 93(5):741-4 (2001)
  79. Nishi M, Miyake H, Takeda T & Hatae Y. Congenital malformations and childhood cancer. *Med. Pediatr. Oncol.* 34, 250–254 (2000)
  80. Scholl T, Stein Z & Hansen H. Leukemia and other cancers, anomalies and infections as causes of death in Down's syndrome in the United States during 1976. *Dev. Med. Child Neurol.* 24, 817–829 (1982)
  81. Oster J, Mikkelsen M, Nielsen A. Mortality and life-table in Down's syndrome. *Acta Paediatr Scand.* 64(2):322-6 (1975)
  82. Hill C, Doyon F, Sancho-Garnier H. *Epidemiologie des cancers.* Flammarion. (1997)
  83. Chicoine B, Roth M, Chicoine L, Sulo S. Breast cancer screening for women with Down syndrome: lessons learned. *Intellect Dev Disabil.* 53(2):91-9 (2015)
  84. Satgé D, Mircher C, Tretarre B. & Rethore MO. Additional data for breast cancer surveillance in women with Down syndrome. World Down Syndrome Congress. Cape Town. South Africa. August 14–17 (2012)
  85. Satgé D, Sasco AJ, Goldgar D, Vekemans M, Réthoré MO. A 23-year-old woman with Down syndrome, type 1 neurofibromatosis, and breast carcinoma. *Am J Med Genet A.* 125A(1):94-6 (2004)
  86. Bernardino J, Gerbault-Seureau M, Sastre X, Dutrillaux B. Unusual clonal chromosomal evolution in a breast carcinoma and its lymph node metastasis in a patient with Down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 Jul;19(3):195-9
  87. Shinohara T, Asoda T, Nakano Y, Yamada H, Fujimori Y. Germline BRCA2 Pathogenic Variant in Primary Breast Cancer of a Down Syndrome Individual. *Am J Case Rep.* Dec 29;24:e942208 (2023)
  88. Dey N, Krie A, Klein J, Williams K, McMillan A, Elsey R, Sun Y, Williams C, De P, Leyland-Jones B. Syndrome de Down et cancer du sein triple négatif : une occurrence rare de relation clinique distinctive. *Revue internationale des sciences moléculaires.* 18(6):1218 (2017)
  89. Mthembu JG and Bhuiyan MMZU. Advanced breast cancer in a case of Down syndrome: presentation of a rare event to the Breast Oncology Clinic at Mankweng Hospital, Limpopo Province, South Africa. *South African Medical Journal,* 111(11b), 1155 (2021)
  90. Penrose LS. The incidence of Mongolism in the general population, *J Ment Sci,* vol. 95 (pg. 685-8) (1949)
  91. Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, et al. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling, *Clin Genet,* vol. 62 (pg. 390-3) (2002)
  92. Bittles AH, Glasson EJ. Clinical, social and ethical implications of changing life expectancy in Down syndrome, *Dev Med Child Neurol,* vol. 46 (pg. 282-6) (2004)

93. Lulita MF, Garzón Chavez D, Klitgaard Christensen M, et al. Association of Alzheimer Disease With Life Expectancy in People With Down Syndrome. *JAMA Netw Open*. 5(5):e2212910 (2022)
94. Englund A, Jonsson B, Zander CS, et al. Changes in mortality and causes of death in the Swedish Down syndrome population. *Am J Med Genet A*. 161A(4):642-649 (2013)
95. Sullivan SG, Glasson EJ, Hussain R, Petterson BA, Slack-Smith LM, Montgomery PD, Bittles AH. Breast cancer and the uptake of mammography screening services by women with intellectual disabilities. *Prev Med*. 37(5):507-12 (2003)
96. Khan MMM, Waqar U, Munir MM, Woldesenbet S, Mavani P, Endo Y, Katayama E, Rawicz-Pruszyński K, Agnese DM, Obeng-Gyasi S, Pawlik TM. Disparities in Breast Cancer Screening Rates Among Adults With and Without Intellectual and Developmental Disabilities. *Ann Surg Oncol*. 31(2):911-919 (2024)
97. Mazurek D, Wyka J. Down syndrome--genetic and nutritional aspects of accompanying disorders. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 66(3):189-94 (2015)
98. Key TJ, Allen NE, Spencer EA & Travis RC. The effect of diet on risk of cancer. *The Lancet*, 360(9336), 861-868 (2002)
99. Luke A, Sutton M, Schoeller DA, Roizen NJ. Nutrient intake and obesity in prepubescent children with Down syndrome. *J Am Diet Assoc*. 96(12):1262-7 (1996)
100. Dehnavi MK, Ebrahimpour-Koujan S, Lotfi K, Azadbakht L. The Association between Circulating Carotenoids and Risk of Breast Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Adv Nutr*. Jan;15(1):100135 (2024)
101. Huggard D, Doherty DG, Molloy EJ. Immune Dysregulation in Children With Down Syndrome. *Front Pediatr*. 8:73 (2020)
102. Ron E. Cancer risks from medical radiation. *Health Phys*. Jul;85(1):47-59 (2003)
103. Adami HO, Persson I, Ekblom A, Wolk A, Pontén J, Trichopoulos D. The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutat Res*. 333(1-2):29-35 (1995)
104. Anbazhagan R, Gusterson BA. Prenatal factors may influence predisposition to breast cancer. *Eur J Cancer*. 30A(1):1-3 (1994)
105. Sanderson M, Williams MA, Malone KE, Stanford JL, Emanuel I, White E, Daling JR. Perinatal factors and risk of breast cancer. *Epidemiology*. 7(1):34-7 (1996)
106. Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Lippman ME. Perinatal factors increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 31(2-3):273-84 (1994)
107. Adami HO, Persson I, Ekblom A, Wolk A, Pontén J, Trichopoulos D. The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutat Res*. 333(1-2):29-35 (1995)
108. Anbazhagan R, Gusterson BA. Prenatal factors may influence predisposition to breast cancer. *Eur J Cancer*. 30A(1):1-3 (1994)
109. Kaijser M, Lichtenstein P, Granath F, Erlandsson G, Cnattingius S, Ekblom A. In utero exposures and breast cancer: a study of opposite-sexed twins. *J Natl Cancer Inst*. 93(1):60-2 (2001)
110. Xu X, Dailey AB, Peoples-Sheps M, Talbott EO, Li N, Roth J. Birth weight as a risk factor for breast cancer: a meta-analysis of 18 epidemiological studies. *J Womens Health (Larchmt)*. 18(8):1169-78 (2009)
111. Zhou W, Chen X, Huang H, Liu S, Xie A, Lan L. Birth Weight and Incidence of Breast Cancer: Dose-Response Meta-analysis of Prospective Studies. *Clin Breast Cancer*. 20(5):e555-e568 (2020)
112. Mellekjaer L, Olsen ML, Sørensen HT, Thulstrup AM, Olsen J, Olsen JH. Birth weight and risk

- of early-onset breast cancer (Denmark). *Cancer Causes Control*. 14(1):61-4 (2003)
113. Ahlgren M, Sørensen T, Wohlfahrt J, Haflidadóttir A, Holst C, Melbye M. Birth weight and risk of breast cancer in a cohort of 106,504 women. *Int J Cancer*. 107(6):997-1000 (2003)
114. Barber LE, Bertrand KA, Rosenberg L, Battaglia TA, Palmer JR. Pre- and perinatal factors and incidence of breast cancer in the Black Women's Health Study. *Cancer Causes Control*. Jan;30(1):87-95 (2019)
115. Zhang M, Qiao J, Zeng P, Liu Z. Investigating the Relationship between Birthweight and Breast Cancer from A Non-Linear and Mediation Perspective. *Iran J Public Health*. 53(1):187-197 (2024)
116. Zemel BS, Pipan M, Stallings VA, Hall W, Schadt K, Freedman DS, Thorpe P. Growth Charts for Children With Down Syndrome in the United States. *Pediatrics*. 136(5):e1204-11 (2015)
117. Flores Arizmendi KA, García De La Puente S, González Navarro M, Bonillo Suarez L, De León Becerra AG, Valderrama Hernández A, Santos Ríos R, Altamirano Bustamante N. Growth charts for Mexican children with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 188(4):1170-1183 (2022)
118. Yao R, Contag SA, Goetzinger KR, Crimmins SD, Kopelman JN, Turan S, Turan OM. The role of fetal growth restriction in the association between Down syndrome and perinatal mortality. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 33(6):952-960 (2020)
119. Mircher C, Briceño LG, Toulas J, Conte M, Tanguy ML, Cieuta-Walti C, Rethore MO, Ravel A. Growth curves for French people with Down syndrome from birth to 20 years of age. *Am J Med Genet A*. 176(12):2685-2694 (2018)
120. Newby D, Aitken DA, Howatson AG, Connor JM. Placental synthesis of oestriol in Down's syndrome pregnancies. *Placenta*. 21(2-3):263-7 (2000)
121. Shepperdson B. The control of sexuality in young people with Down's syndrome. *Child Care Health Dev*. 21(5):333-49 (1995)
122. Cento RM, Ragusa L, Proto C, Alberti A, Romano C, Boemi G, Colabucci F, Lanzone A. Basal body temperature curves and endocrine pattern of menstrual cycles in Down syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 10(2):133-7 (1996)
123. Schupf N, Zigman W, Kapell D, Lee JH, Kline J, Levin B. Early menopause in women with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 41(Pt 3):264-7 (1997)
124. Vega (2021). Genome Browser Ensemble. Available at: [http://vega.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/Chromosome?r21](http://vega.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r21) (Accessed February 27, 2021).
125. Osuna-Marco MP, López-Barahona M, López-Ibor B, Tejera ÁM. Ten Reasons Why People With Down Syndrome are Protected From the Development of Most Solid Tumors -A Review. *Front Genet*. 12:749480 (2021)
126. Satgé D, Sommelet D, Geneix A, Nishi M, Malet P, Vekemans M. A tumor profile in Down syndrome. *Am J Med Genet*. 78(3):207-16 (1998)
127. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol*. 196, 395–406 (2012)
128. Schedin P, Keely PJ. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 3, a003228 (2011).
129. Maller O, Martinson H, Schedin P. Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 301–318 (2010)
130. Reinier KS, Vacek PM, Geller BM. Risk factors for breast carcinoma in situ versus invasive

breast cancer in a prospective study of pre- and post-menopausal women. *Breast Cancer Res. Treat.* 103, 343–348 (2007)

131. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906 (2009).

132. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, White JG, Keely PJ. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* 6, 11 (2008).

133. Medina D, Smith GH. Chemical carcinogen-induced tumorigenesis in parous, involuted mouse mammary glands. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 967–969 (1999)

134. Schonfeld SJ, Pfeiffer RM, Lacey JV et al. Hormone-related risk factors and postmenopausal breast cancer among nulliparous versus parous women: An aggregated study. *Am. J. Epidemiol.* 173, 509–517 (2011)

135. Schedin P, Mitrenga T, McDaniel S, Kaeck M. Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. *Mol. Carcinog.* 41, 207–220 (2004)

136. Maller O, Hansen KC, Lyons TR, Acerbi I, Weaver VM, Prekeris R, Tan AC, Schedin P. Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. *J Cell Sci.* 126(Pt 18):4108-10 (2013)

137. Bénard J, Béron-Gaillard N, Satgé D. Down's syndrome protects against breast cancer: is a constitutional cell microenvironment the key? *Int J Cancer.* 113(1):168-70 (2005)

138. Satgé D, Créau N, et al. Down syndrome's protection against neuroblastoma: The stromal and neural overmaturation tracks. *Neuroblastoma Research Trends.* p57-100

139. Brand-Saberi B, Epperlein HH, Romanos GE, Christ B. Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell Tissue Res.* 277(3):465-75 (1994)

140. Von Kaisenberg CS, Krenn V, Ludwig M, Nicolaidis KH, Brand-Saberi B. Morphological classification of nuchal skin in human fetuses with trisomy 21, 18, and 13 at 12-18 weeks and in a trisomy 16 mouse. *Anat Embryol (Berl).* 197(2):105-24 (1998)

141. Mollo N, Aurilia M, Scognamiglio R, Zerillo L, Cicatiello R, Bonfiglio F, Pagano P, Paladino S, Conti A, Nitsch L, Izzo A. Overexpression of the Hsa21 Transcription Factor RUNX1 Modulates the Extracellular Matrix in Trisomy 21 Cells. *Front Genet.* 13:824922 (2022)

142. Weil D, Mattei MG, Passage E, N'Guyen VC, Pribula-Conway D, Mann K, Deutzmann R, Timpl R & Chu ML. Cloning and chromosomal localization of human genes encoding the three chains of type VI collagen. *Am J Hum Genet* 42, 435–445 (1988)

143. Ball S, Bella J, Kielty C & Shuttleworth. A Structural basis of type VI collagen dimer formation. *J Biol Chem* 278, 15326–15332 (2003)

144. Colombatti A, Mucignat MT & Bonaldo P. Secretion and matrix assembly of recombinant type VI collagen. *J Biol Chem* 270, 13105–13111 (1995)

145. Quarello E, Guimiot F, Moalic JM, Simoneau M, Ville Y, Delezoide AL. Quantitative evaluation of collagen type VI and SOD gene expression in the nuchal skin of human fetuses with trisomy 21. *Prenat Diagn.* 27(10):926-31 (2007)

146. Karousou E, Stachteia X, Moretto P, Viola M, Vigetti D, D'Angelo ML, Raio L, Ghezzi F, Pallotti F, De Luca G, Karamanos NK, Passi A. New insights into the pathobiology of Down syndrome--hyaluronan synthase-2 overexpression is regulated by collagen VI  $\alpha$ 2 chain. *FEBS J.* 280(10):2418-30 (2013)

147. Korenberg JR, Bradley C, Disteche CM. Down syndrome: molecular mapping of the congenital

- heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet.* 50(2):294-302 (1992)
148. Raio L, Ghezzi F, Cromi A, Cereda E & Passi A. Sonographic morphology and hyaluronan content of umbilical cords of healthy and Down syndrome fetuses in early gestation. *Early Hum Dev* 77, 1–12 (2004)
149. Raio L, Cromi A, Ghezzi F, Passi A, Karousou E, Viola M, Vigetti D, De Luca G & Bolis P. Hyaluronan content of Wharton's jelly in healthy and Down syndrome fetuses. *Matrix Biol* 24, 166–174 (2005)
150. Gittenberger-De Groot, A. C., U. Bartram, P. W. Oosthoek, et al. Collagen Type VI expression during cardiac development and in human fetuses with trisomy 21. *Anatom. Rec. Part A.* 275:1109–1116 (2003)
151. Danopoulos S, Bhattacharya S, Deutsch G, Nih LR, Slaunwhite C, Mariani TJ, Al Alam D. Prenatal histological, cellular, and molecular anomalies in trisomy 21 lung. *J Pathol.* 255(1):41-51 (2021)
152. Schloo BL, Vawter GF, Reid LM. Down syndrome: patterns of disturbed lung growth. *Hum Pathol.* Sep;22(9):919-23 (1991)
153. Sobol M, Klar J, Laan L, Shahsavani M, Schuster J, Annerén G, Konzer A, Mi J, Bergquist J, Nordlund J, Hoeber J, Huss M, Falk A, Dahl N. Transcriptome and Proteome Profiling of Neural Induced Pluripotent Stem Cells from Individuals with Down Syndrome Disclose Dynamic Dysregulations of Key Pathways and Cellular Functions. *Mol Neurobiol.* 56(10):7113-7127 (2019)
154. Vilardell M, Rasche A, Thormann A, Maschke-Dutz E, Pérez-Jurado LA, Lehrach H, Herwig R. Meta-analysis of heterogeneous Down Syndrome data reveals consistent genome-wide dosage effects related to neurological processes. *BMC Genomics.* 12:229 (2011)
155. Vilardell M, Civit S, Herwig R. An integrative computational analysis provides evidence for FBN1-associated network deregulation in trisomy 21. *Biol Open.* Jun 20;2(8):771-8 (2013)
156. Guo Z, Xiao H, Yang W, Li T, Hao B, Liao S. Transcriptome research of human amniocytes identifies hub genes associated with developmental dysplasia in down syndrome. *Aging (Albany NY).* 15(23):14086-14108(2023)
157. De Cegli R, Romito A, Iacobacci S, Mao L, Lauria M, Fedele AO, Klose J, Borel C, Descombes P, Antonarakis SE, di Bernardo D, Banfi S, Ballabio A, Cobellis G. A mouse embryonic stem cell bank for inducible overexpression of human chromosome 21 genes. *Genome Biol.* 11(6):R64. (2010)
158. Jongewaard IN, Lauer RM, Behrendt DA, Patil S, Klewer SE. Beta 1 integrin activation mediates adhesive differences between trisomy 21 and non-trisomic fibroblasts on type VI collagen. *Am J Med Genet.* May 15;109(4):298-305 (2002)
159. Kimura M, Cao X, Skurnick J, Cody M, Soteropoulos P, Aviv A. Proliferation dynamics in cultured skin fibroblasts from Down syndrome subjects. *Free Radic Biol Med.* Aug 1;39(3):374-80 (2005)
160. Wright TC, Orkin RW, Destrempe M, Kurnit DM. Increased adhesiveness of Down syndrome fetal fibroblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr;81(8):2426-30 (1984)
161. Reeser RS, Salazar AK, Prutton KM, Roede JR, VeDepo MC, Jacot JG. Trisomy 21 Alters Cell Proliferation and Migration of iPSC-Derived Cardiomyocytes on Type VI Collagen. *Cell Mol Bioeng.* Jan 3;17(1):25-34 (2024)
162. Delom F, Burt E, Hoischen A, Veltman J, Groet J, Cotter FE, Nizetic D. Transchromosomal cell model of Down syndrome shows aberrant migration, adhesion and proteome response to extracellular matrix. *Proteome Sci.* 7:31 (2009)
163. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2(6):442-

54 (2002)

164. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 15(12):1243-53 (2014)
165. Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* 33(4):230-6 (2015)
166. Kaushik S, Pickup MW, Weaver VM. From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 35(4):655-667 (2016)
167. Alexander J, Cukierman E. Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions. *Curr Opin Cell Biol.* Oct;42:80-93 (2016)
168. Chia J., Kusuma N., Anderson R., Parker B., Bidwell B., Zamurs L., Nice E., Pouliot N. Evidence for a Role of Tumor-Derived Laminin-511 in the Metastatic Progression of Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 170:2135–2148 (2007)
169. Uhm J.H., Dooley N.P., Kyritsis A.P., Rao J.S., Gladson C.L. Vitronectin, a Glioma-derived Extracellular Matrix Protein, Protects Tumor Cells from Apoptotic Death. *Clin. Cancer Res.*;5:1587–1594 (1999)
170. Hynes R.O., Naba A. Overview of the Matrisome-An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a004903 (2012)
171. Rathinam R., Alahari S.K. Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 29:223–237 (2010)
172. Hoshiba T. Decellularized Extracellular Matrix for Cancer Research. *Materials (Basel).* 12(8):1311 (2019)
173. Kim IG, Hwang MP, Du P, Ko J, Ha CW, Do SH, Park K. Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing. *Biomaterials.* 50:75-86 (2015)
174. Serebriiskii I, Castelló-Cros R, Lamb A, Golemis EA, Cukierman E. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix Biol.* 27(6):573-585 (2008)
175. Castelló-Cros R, Khan DR, Simons J, Valianou M, Cukierman E. Staged stromal extracellular 3D matrices differentially regulate breast cancer cell responses through PI3K and beta1-integrins. *BMC Cancer.* 9:94 (2009)
176. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 84:25-34. (2015)
177. Harris GM, Raitman I, Schwarzbauer JE. Cell-derived decellularized extracellular matrices. *Methods Cell Biol.* 2018;143:97-114
178. Xing Q, Yates K, Tahtinen M, Shearier E, Qian Z, Zhao F. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. *Tissue Eng Part C Methods.* 21(1):77-87 (2015)
179. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell.* 140(5):619–630 (2010)
180. Fernández-Pérez J, Ahearne M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Sci Rep.* 9(1):14933. (2019)
181. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 294(5547):1708-12 (2001)
182. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels

between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15(2):117-34 (2010)

183. Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (6):341-352 (2020)

184. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 166(1):21-4. (2016)

185. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-74 (2011)

186. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol* 11: 675–686 (2015)

187. Jelen L, Fevens T, Krzyzak A. Classification of breast cancer malignancy using cytological images of fine needle aspiration biopsies. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*, 18(1), 75 (2008)

188. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res*. Oct 1;67(19):9066-76 (2007)

189. Devaraj V, Bose B. Morphological State Transition Dynamics in EGF-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition. *J Clin Med*. 8(7):911. (2019)

190. Matsumoto K, Ziober BL, Yao CC, Kramer RH. Growth factor regulation of integrin-mediated cell motility. *Cancer Metastasis Rev*. 14(3):205-17. (1995)

191. Kirkland SC. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 101: 320–326 (2009)

192. Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1: 95–104 (2008)

193. Park J, Schwarzbauer JE. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 13: 1649–1657 (2014)

194. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia*. 15(3):249-62. (2013)

195. Grände M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J Cell Sci*. 115(Pt 22):4227-36. (2002)

196. Stewart TA, Azimi I, Brooks AJ, Thompson EW, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR. Janus kinases and Src family kinases in the regulation of EGF-induced vimentin expression in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 76:64-74 (2016)

197. Balanis, N., Yoshigi, M., Wendt, M. K., Schiemann, W. P. & Carlin, C. R.  $\beta$ 3 integrin-EGF receptor cross-talk activates p190RhoGAP in mouse mammary gland epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 22, 4288–4301 (2011)

198. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 28(33):2940-7 (2009)

199. Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T. N. & Kumar, P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway.

Mol. Cancer Res. 1658–1667 (2011)

200. Ryschich E, Khamidjanov A, Kerkadze V, Büchler MW, Zöller M, Schmidt J. Promotion of tumor cell migration by extracellular matrix proteins in human pancreatic cancer. *Pancreas*. 38(7):804-10 (2009)
201. Wong CW, LeGrand CF, Kinnear BF et al. In Vitro Expansion of Keratinocytes on Human Dermal Fibroblast-Derived Matrix Retains Their Stem-Like Characteristics. *Sci Rep*. 9(1):18561 (2019)
202. Shimpi AA, Williams ED, Ling L, Tamir T, White FM, Fischbach C. Phosphoproteomic Changes Induced by Cell-Derived Matrix and Their Effect on Tumor Cell Migration and Cytoskeleton Remodeling. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023 Dec 11;9(12):6835-6848
203. Erdogan B, Ao M, White LM, Means AL, Brewer BM, Yang L, Washington MK, Shi C, Franco OE, Weaver AM, Hayward SW, Li D, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol*. 216(11):3799-3816 (2017)
204. Crossley RM, Johnson S, Tsingos E, Bell Z, Berardi M, Botticelli M, Braat QJS, Metzcar J, Ruscone M, Yin Y, Shuttleworth R. Modeling the extracellular matrix in cell migration and morphogenesis: a guide for the curious biologist. *Front Cell Dev Biol*. Mar 1;12:1354132 (2024).
205. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 339(1):269-80 (2010)
206. Roca-Cusachs P, Gauthier NC, Del Rio A, Sheetz MP. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(38):16245-50. (2009)
207. Scherzer MT, Waigel S, Donniger H, Arumugam V, Zacharias W, Clark G, Siskind LJ, Soucy P, Beverly L. Fibroblast-Derived Extracellular Matrices: An Alternative Cell Culture System That Increases Metastatic Cellular Properties. *PLoS One*. 10(9):e0138065 (2015)
208. Costa EC, de Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnol J*. 13(1) (2018)
209. Froehlich K, Haeger JD, Heger J, Pastuschek J, Photini SM, Yan Y, Lupp A, Pfarrer C, Mrowka R, Schleußner E, Markert UR, Schmidt A. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 21(3-4):89-98 (2016)
210. Dubois C, Dufour R, Daumar P, Aubel C, Szczepaniak C, Blavignac C, Mounetou E, Penault-Llorca F, Bamdad M. Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget*. Aug 24;8(56):95316-95331 (2017)
211. Ivascu A, Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol*. 31(6):1403-13. (2007)
212. Yamada KM, Collins JW, Cruz Walma DA, Doyle AD, Morales SG, Lu J, Matsumoto K, Nazari SS, Sekiguchi R, Shinsato Y, Wang S. Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *Int J Exp Pathol*. 100(3):144-152. (2019)
213. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*.;310:1139–43 (2005)
214. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126:677–89 (2006)
215. Georges PC, Janmey PA. Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Appl Physiol*. 2005;98:1547–53 ; Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of

the substrate. *Biol Bull.* 194:348–9 (1998)

216. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 116(Pt 3):499-511 (2003)
217. Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, Chen AC, Sah RL, Taylor SS, Engler AJ, Yang J. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol.* 17(5):678-88. (2015)
218. Moorthie S, Blencowe H, Darlison MW et al. Estimating the birth prevalence and pregnancy outcomes of congenital malformations worldwide. *J Community Genet.* 9(4):387-396 (2018)
219. Miller, D. T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 86, 749–764 (2010)
220. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 136(6):665–77 (2017).
221. Ma M, Ru Y, Chuang L-S, Hsu N-Y, Shi L-S, Hakenberg J, et al. Disease associated variants in different categories of disease located in distinct regulatory elements. *BMC Genomics.* 16(Suppl 8):S3 (2015)
222. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.*176:535-548.e24 (2019)
223. Pfeifer D, Kist R, Dewar K, et al. Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9 : evidence for an extended control region. *Am J Hum Genet.* 65 : 111–24 (1999)
224. Lupiáñez DG, Spielmann M, Mundlos S. Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. *Trends Genet.* 32(4):225-237 (2016)
225. Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun.* 8(1):15824 (2017)
226. Truty R, Ouyang K, Rojahn S, Garcia S, Colavin A, Hamlington B, et al. Spectrum of splicing variants in disease genes and the ability of RNA analysis to reduce uncertainty in clinical interpretation. *Am J Hum Genet.* 108(4):696–708 (2021)
227. Riquin K, Isidor B, Mercier S, et al. Integrating RNA-Seq into genome sequencing workflow enhances the analysis of structural variants causing neurodevelopmental disorders. *J Med Genet.* Dec 21;61(1):47-56 (2023)
228. Byron, S. A., Van Keuren-Jensen, K. R., Engelthaler, D. M., Carpten, J. D. & Craig, D. W. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet* 17, 257–271 (2016).
229. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med.* 9(386):eaal5209 (2017)
230. Murdock DR, Dai H, Burrage LC, Rosenfeld JA, Ketkar S, Müller MF, et al. Transcriptome-directed analysis for Mendelian disease diagnosis overcomes limitations of conventional genomic testing. *J Clin Invest.* 131(1):e141500 (2021)
231. Liaci C.; Prandi L.; Pavinato L, Brusco A et al. The Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs in

## **Annexes :**

### **Sélection de publications**

ARTICLE

# Association of *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2* and *SCN5A* polymorphisms with QTc interval length in a healthy population

Laetitia Gouas<sup>1</sup>, Viviane Nicaud<sup>2</sup>, Myriam Berthet<sup>1</sup>, Anne Forhan<sup>3</sup>, Laurence Tiret<sup>2</sup>, Beverley Balkau<sup>3</sup>, Pascale Guicheney\*<sup>1</sup> and the D.E.S.I.R. Study Group

<sup>1</sup>INSERM U582, Institut de Myologie, IFR 14, UPMC, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>2</sup>INSERM U525, IFR 14, UPMC, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>3</sup>INSERM U258, IFR 69, Villejuif, France

The QT interval (QT) reflects cardiac ventricular repolarization and varies according to various known factors such as heart rate, gender and age. Nevertheless, a high intrasubject stability of the QT-RR pattern also suggests that a genetic component contributes to individual QT length. To determine whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding cardiac ion channels were associated with the heart-rate corrected QT (QTc) length, we analyzed two groups of 200 subjects presenting the shortest and the longest QTc from a cohort of 2008 healthy subjects. A total of 17 polymorphisms were genotyped; they were all in the Hardy–Weinberg equilibrium in both groups. Neither allele nor haplotype frequencies of the 10 *KCNQ1* SNPs showed a significant difference between the two groups. In contrast, *KCNH2* 2690 C (K897T) and *SCN5A* 5457 T (D1819D) minor alleles were significantly more frequent in the group with the shortest QTc interval, whereas *KCNE1* 253 A (D85N), *SCN5A* 1673 G (H558R) and 1141-3 A minor alleles were significantly more frequent in the group with the longest QTc interval. Interestingly, an interaction was also found between the *KCNH2* 2690 A > C SNP and the *KCNQ1* 2031 + 932 A > G SNP suggesting that the effect of the *KCNH2* 2690 C allele on QTc length may occur within a particular genetic background. This suggests that genetic determinants located in *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2* and *SCN5A* influence QTc length in healthy individuals and may represent risk factors for arrhythmias or cardiac sudden death in patients with cardiovascular diseases.

*European Journal of Human Genetics* (2005) 13, 1213–1222. doi:10.1038/sj.ejhg.5201489;  
published online 31 August 2005

**Keywords:** gene polymorphisms; ion channels; QT interval

## Introduction

The QT interval (QT), measured on the electrocardiogram (ECG), reflects cardiac ventricular repolarization. In healthy populations, its length varies widely and several

factors such as heart rate, gender and age exert an influence on the QT length.<sup>1,2</sup> Indeed, women present relative QT prolongation compared with men<sup>3,4</sup> and QT shortens in men after puberty.<sup>2</sup> Whereas there exists a substantial interindividual variability of the QT-RR relationship, which represents the relationship between QT duration and heart rate, a high intraindividual stability of the QT-RR pattern has been shown, suggesting that a genetic component might partly determine individual QT length.<sup>5,6</sup> Indeed, Busjahn *et al*<sup>7</sup> have shown a significant linkage in dizygotic twins between heart rate-corrected QT interval (QTc) and

\*Correspondence: Dr P. Guicheney, INSERM U582, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France.  
Tel: +33 1 42 16 57 50; Fax: +33 1 42 16 57 00;  
E-mail: p.guicheney@myologie.chups.jussieu.fr  
Received 22 February 2005; revised 9 May 2005; accepted 13 July 2005;  
published online 31 August 2005

two loci harboring genes known to cause the long QT syndrome (LQTS).

Ventricular action potential (AP) is under the joint control of the depolarizing  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) and the repolarizing slow ( $I_{\text{Ks}}$ ) and rapid ( $I_{\text{Kr}}$ )  $\text{K}^+$ -delayed rectifier currents. The activity and expression levels of each of these current-underlying channels establish a subtle equilibrium between depolarizing and repolarizing currents determining the AP duration in each individual. Thus, it would not be surprising that polymorphisms in the genes coding for these channels may influence this equilibrium even by weak effects on activity and/or expression level of channels subunits.

The cardiac  $I_{\text{Na}}$  current is underlined by the  $\alpha$   $\text{Na}_v1.5$  subunit channel encoded by the *SCN5A* gene. As for the  $\text{K}^+$ -delayed rectifier current, the  $I_{\text{Ks}}$  current is elicited by the  $\alpha$  KvLQT1 and  $\beta$  minK subunits encoded by the *KCNQ1* and *KCNE1* genes, respectively, and the  $I_{\text{Kr}}$  current by the  $\alpha$  HERG and  $\beta$  Mirp1 subunits encoded, respectively, by the *KCNH2* and *KCNE2* genes.<sup>8–11</sup>

Mutations in these ion channel subunits are responsible for the LQTS, where a decrease in outward  $\text{K}^+$  current or an increase in inward  $\text{Na}^+$  current results in a prolongation of the AP. This prolongation, leading to a prolonged QT interval on baseline ECG, renders patients at high risk of developing *torsades de pointes* or ventricular fibrillation leading to syncope or sudden death. However, more recently, mutations in *KCNH2* and *KCNQ1*, leading to an increase in outward  $\text{K}^+$  current, have also been linked to the short QT syndrome (SQTS). In SQTS, a drastic decrease of the QTc interval is also linked to life-threatening arrhythmias and sudden death.<sup>12,13</sup>

It is now widely recognized that penetrance of these monogenic arrhythmias is highly variable. In other words, among individuals carrying the same causative mutation within a specific affected kindred, some express a clinical phenotype whereas others do not manifest a phenotype.<sup>14</sup> Variability elsewhere in the genome, such as polymorphisms in the same disease-causing gene or in other genes, might contribute to this variable penetrance as well as to the appearance of a clinical phenotype. For example, the *SCN5A* H558R variant which is a common polymorphism in the American population,<sup>15</sup> was shown to mitigate the *in vitro* effects of a nearby mutation on the  $\text{Na}^+$  channel function<sup>16</sup> whereas coinheritance of the *SCN5A* D1275N variant with a rare haplotype in the *Cx40* gene was associated with an atrial standstill phenotype in a kindred.<sup>17</sup>

It has also been shown that not only rare mutations<sup>11,15,18</sup> but also polymorphisms in *KCNE1*, *KCNE2* and *SCN5A* could represent risk factors for drug-induced arrhythmias.<sup>18–20</sup>

Some polymorphisms have already been reported to be associated with the QTc length. The K897T amino-acid variant of *KCNH2* was associated with the length of QT interval in Finnish LQT1 patients.<sup>21</sup> Bezzina *et al*<sup>22</sup> reported in healthy women, that homozygote carriers for the T897

allele had shorter QTc than homozygote for the K897 allele. Very recently, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in other ion channel subunits were also associated with the QTc length in healthy individuals.<sup>23</sup>

Given the major role of cardiac sodium and potassium channels in ventricular repolarization, we investigated the potential association of 10 *KCNQ1*, two *KCNE1*, four *SCN5A* polymorphisms and the *KCNH2* K897T variant with the QTc length in a healthy French population. We also tested whether these SNPs might interact to influence on the QTc duration.

## Material and methods

### Study population

Participants of the Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome (D.E.S.I.R.) cohort gave informed consent to the clinical and genetic study, which was approved by an ethics committee. The investigations conform to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

### The D.E.S.I.R. study

The study subjects were selected from the D.E.S.I.R. cohort, which included French men and women aged 30–64 years. Participants were volunteers who agreed to be followed for 9 years and to have a clinical examination every 3 years. This study involved 10 health examination centers in France.<sup>24,25</sup>

The first examination took place in 1994 (D0) and the second in 1997 (D3). Blood pressure was measured after at least 5 min rest and venous blood samples were collected to determine glucose, triglyceride and HDL-cholesterol concentrations. Disease history (diabetes, hypertension, cardiovascular disease, etc), medical treatment, physical activity, alcohol and tobacco consumption were collected for each subject.

Subjects underwent a 12-lead resting ECG. QT intervals were measured in lead II (ms) by Cardionics<sup>®</sup> software and corrected for heart rate by use of the Fridericia formula (QTc).<sup>26</sup> Subjects with an ECG recording at D0 and D3 ( $n = 3478$ ) form the basis of the study. We excluded the subjects ( $n = 1399$ ) with known or detected cardiac pathology, diabetes (defined by use of treatment or a fasting plasma glucose level ( $\geq 7.0$  mmol/l)), treated or untreated high blood pressure as well as the subjects taking medication known to prolong the QT interval such as neuroleptics, antiarrhythmics or antihistaminics, at D0 and D3. Subjects with a difference  $\geq 30$  ms in QTc between the two examinations were also excluded ( $n = 71$ ).

The distribution of the mean QTc values (averaged on measures at D0 and D3) of the remaining healthy subjects ( $n = 2008$ ) is shown in the Supplementary Figure 1. Mean QTc values were adjusted for age, separately in men and women, and the residuals were used to select the 100 men

and 100 women with the shortest QTc, and 100 men and 100 women with the longest QTc.

In a preliminary study, the *KCNQ1* exons had been sequenced in the 50 men and 50 women with the longest QTc, and two new *KCNQ1* mutations had been identified (Y148X,  $\Delta$ S276).<sup>27</sup> The two carriers of these mutations whose QTc interval prolongation was assumed to be due to these mutations were excluded from the study.

### Genetic analysis

**Genomic DNA amplification** Genomic DNA was prepared from peripheral blood lymphocytes by standard procedures. Previously designed primers were used to amplify the *KCNQ1* exons by PCR.<sup>28</sup> Primers used to amplify *KCNQ1* 3'UTR region, *KCNE1*, *SCN5A* and *KCNH2* DNA sequences are given on the European Journal of Human Genetics website.

**Sequence analysis** DNA sequences containing the *KCNQ1* 2031+479 G>A, 2031+875 A>G and 2031+932 A>G, the *KCNE1* 112 G>A and 253 G>A, and the *SCN5A* -92 C>A polymorphisms were amplified by PCR using a GeneAmp ThermoCycler 9700 (Applied Biosystems). The PCR products were cleaned up using Bio-Gel<sup>®</sup> P-100 Gel (Bio-Rad) spin columns in a MultiScreen<sup>™</sup> 96-well filter plate (Milipore). The sequencing reactions were performed by the dideoxynucleotide chain termination method with fluorescent dideoxynucleotides according to the dGTP Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.0 protocol, then cleaned up using Sephadex<sup>™</sup> G50 Superfine (Amersham Biosciences) spin columns in a MultiScreen<sup>™</sup> 96-well filter plate. The reactions were run on an ABI 377 (Applied Biosystems).

**Fluorescent-SSCP (F-SSCP)** DNA sequences containing the *KCNQ1* 477+80 insGG, 1514+46 A>G, 1590+14 T>C, 1638 G>A, 1732+43 T>C and 1794+32 G>T were amplified by PCR using ThermoCycler<sup>™</sup> 9700 (Applied Biosystem). PCR was carried out using fluorescent-dye-labeled sense and antisense primers specific for the DNA region of interest (6FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>). In all, 0.5–2  $\mu$ l of PCR amplicons were mixed to a denaturing buffer (50% formamide, 25  $\mu$ g dextran blue (50 mg/ml), 2.5 mM EDTA (25 mM)) and to a DNA molecular weight standard (GENESCAN-500 Rox, Applied Biosystem). Samples were then denatured 5 min at 94°C and quenched on ice. In all, 1  $\mu$ l of samples was applied to a nondenaturing gel (MDE 0.5X, MGDA) and electrophoresed on the ABI 377 system. The mobility of F-SSCP fragments was measured relative to ROX size standard by use of Genescan 3.1.2 software (Applied Biosystems).

**Fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves** The *KCNQ1* 1986 C>T and 2031+875 A>G ( $n = 400$  and 200, respectively), the *KCNH2* 2690 A>C and

the *SCN5A* 1673 A>G, 5457 C>T and 1141–3 C>A polymorphisms were analyzed by Fluorescence Resonance Energy Transfer within a LightCycler (Roche Diagnostics). In all, 40 ng of sample DNA was used to perform a 25  $\mu$ l PCR reaction containing the detection probe and the anchor probe for the *KCNQ1* 1986 C>T, *KCNH2* 2690 C>A, *SCN5A* 1673 A>G, 5457 C>T and 1141-3 C>A polymorphisms in a GeneAmp ThermoCycler 9700 system (Perkin Elmer). PCR amplicons were then loaded into glass capillary cuvettes (Roche Diagnostics). After an initial denaturation step at 95°C for 30 s, a melting curve was recorded by cooling the reaction mixture to 40°C at 20°C/s, holding it at 40°C for 120 s, and then slowly heating it to 85°C at 0.1°C/s. Fluorescence was measured continuously during the slow temperature ramp to monitor the dissociation of the fluorescein-labeled detection probe. For the *KCNQ1* 2031+875 A>G, 40 ng of sample DNA was used to do PCR reactions in the LightCycler in a reaction volume of 20  $\mu$ l with 0.4  $\mu$ mol/l of each primer, 0.06  $\mu$ mol/l anchor and detection probes, 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub> and 2  $\mu$ l of the Master Mix Hybridization Probes (Roche Diagnostics). After an initial denaturation step at 95°C for 30 s, amplification was performed using 40 cycles of denaturation (95°C for 3 s), annealing (55°C for 10 s) and extension (72°C for 15 s). The temperature transition rates were programmed at 20°C/s from denaturation to annealing, 5°C/s from annealing to extension, and 20°C/s from extension to denaturation. After amplification was complete, a final melting curve was recorded as described above.

### Statistical analysis

The difference between the mean QTc value between the two groups for men and women was assessed by a Mann–Whitney Rank Sum test (SygmaStat). Deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium was tested by  $\chi^2$  analysis with 1 degree of freedom in the shortest and longest QTc groups separately. Pairwise linkage disequilibrium (LD) coefficients between polymorphisms were estimated by log-linear model analysis<sup>29</sup> and the extent of disequilibrium was expressed in terms of  $D' = D/D_{\max}$  or  $-D/D_{\min}$ . Allele frequencies were estimated from genotype frequencies by gene counting. The study was analyzed as a case/control study comparing the longest and the shortest QTc groups. Genotype and allele frequencies were compared between the two groups by  $\chi^2$  test. Homogeneity of the association according to gender was systematically tested and since there was no heterogeneity for any of the polymorphisms, men and women were pooled for analysis. The odds ratio (OR) [95% CI] for longest QTc associated with genotype was estimated from logistic regression analysis adjusted for age and sex. A  $P$ -value <0.05 was considered statistically significant. All computations were carried out with the SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

To analyze simultaneously all polymorphisms of a gene, haplotype analyses were performed by use of a maximum likelihood model<sup>30</sup> implemented in the THESIAS program (<http://www.genecanvas.org>). In these analyses, the haplotype combining the most frequent alleles at each locus was used as the reference.

We applied the *detection of informative combined effect* (DICE) method<sup>31</sup> to investigate high-order interactions between polymorphisms of the different genes on the phenotype. Briefly, the DICE algorithm explores in an automated way all combinations of polymorphisms acting either in an additive or in an interactive way (three-order interaction at maximum). Models of increasing complexity are successively fitted to data and the difference  $\Delta_s$  of the Akaike's information criterion between models indicates whether the fit is substantially improved, that is, when  $\Delta_s$  exceeds a predetermined threshold. The algorithm stops when no model leads to a  $\Delta_s$  higher than the fixed

threshold. Given the large number of polymorphisms investigated, a rather stringent threshold was chosen ( $\Delta_s > 6$ ). In this analysis, a dominant coding scheme for polymorphisms was adopted (frequent homozygotes opposed to carriers of the minor allele).

## Results

Baseline characteristics of the two groups are presented in Table 1.

### KCNQ1 polymorphisms

In a preliminary study, the *KCNQ1* exons had been sequenced in the 100 subjects with the longest QTc intervals and 18 SNPs were found. In Table 2 we report the SNP position, the SNP Identity (ID) from public databases, when available, and their allele frequencies. According to arrhythmia literature, the National Center for

**Table 1** Mean ( $\pm$ SD) ages, heart rates and QTc intervals in men and women of the shortest and longest QTc groups

	Shortest QTc group		Longest QTc group	
	Men N = 100	Women N = 100	Men N = 99	Women N = 99
Age	45 $\pm$ 10	46 $\pm$ 10	44 $\pm$ 9	46 $\pm$ 10
Heart rate (beats/min)	66 $\pm$ 10	69 $\pm$ 11	61 $\pm$ 10	67 $\pm$ 10
QTc interval (ms)	353 $\pm$ 6	357 $\pm$ 6	406 $\pm$ 9	410 $\pm$ 7
QTc range	333–363	336–365	394–433	400–432

Mean QTc interval values are statistically different between the groups with the shortest and the longest QTc intervals for men and women ( $P < 0.001$ ).

**Table 2** *KCNQ1* variants identified in the D.E.S.I.R. population

Nucleotide change	Region	Coding polymorphism	Frequency of minor allele	Number of chromosomes examined	Previous reports	SNP ID
459 G>T	Exon 1	T153T	0.00375	800		
477+20 A>G	Intron 1		0.00125	800		
477+80 insGG <sup>a</sup>	Intron 1		0.31	800		
780+77 A>G	Intron 4		0.27	200		rs12786951
811 C>T	Exon 5	L271L	0.005	200	Jongbloed <i>et al</i> (2002)	
918+13 C>T	Intron 5		0.005	200		
984 C>T	Exon 6	I328I	0.005	200		
1514+7 G>T	Intron 10		0.005	200		
1514+14 G>T	Intron 10		0.005	200		
1514+46 A>G <sup>a</sup>	Intron 10		0.42	800	Aydin <i>et al</i> (2004)	rs760419
1590+14 T>C <sup>a</sup>	Intron 11		0.08	800	Jongbloed <i>et al</i> (2002)	rs11024034
1638 G>A <sup>a</sup>	Exon 12	S546S	0.21	800	Lee <i>et al</i> (1997); Iwasa <i>et al</i> (2000); Jongbloed <i>et al</i> (2002)	rs1057128
1732+43 T>C <sup>a</sup>	Intron 13		0.26	800	Iwasa <i>et al</i> (2000); Jongbloed <i>et al</i> (2002)	rs81204
1794+32 G>T <sup>a</sup>	Intron 14		0.05	800	Jongbloed <i>et al</i> (2002)	
1986 C>T <sup>a</sup>	Exon 15	Y662Y	0.25	800	Jongbloed <i>et al</i> (2002)	rs11601907
2031+479 G>A <sup>a</sup>	3'UTR		0.06	800		
2031+875 A>G <sup>a</sup>	3'UTR		0.30	800		rs2519184
2031+932 A>G <sup>a</sup>	3'UTR		0.32	800		rs10798

Nucleotide numbering starts from the ATG start codon (Genbank accession AF000571).

<sup>a</sup>Polymorphisms analyzed in this study.

Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the inherited arrhythmias databases (<http://pc4.fsm.it:81/cardmoc/>), eight of the 18 SNPs were unknown. Six SNPs were rare (<0.01) and consisted in a synonymous G-to-T substitution at position 459 in exon 1 (T153T), a A-to-G substitution at position 477+21 in intron 1, a C-to-T substitution at position 918+13 in intron 5, a synonymous C-to-T substitution at position 984 in exon 6 (I328I), a G-to-T substitution at position 1514+7 and 1514+14 in intron 10. Two polymorphisms were more frequent (>0.01) and consisted in a GG insertion/deletion at position 477+80 of intron 1 and a G-to-A substitution at position 2031+479 in the 3'UTR part.

After exclusion of rare polymorphisms, two synonymous polymorphisms in the coding region of *KCNQ1*, S546S and Y662Y (1638 G>A and 1986 C>T, respectively), five SNPs in intronic sequences (477+80 insGG in intron 1, 1514+46 A>G in intron 10, 1590+14 T>C in intron 11, 1732+43 T>C in intron 13, 1794+32 G>T in intron 14) and three SNPs in the 3'UTR part (2031+479 G>A, 2031+875 A>G and 2031+932 A>G) of the *KCNQ1* gene were studied.

There was no deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium for any of the polymorphisms considered. The frequency of the minor allele ranged from 0.05 to 0.42 (Table 2). The three polymorphisms in the 3' end of the gene and the polymorphism 1986 C>T in exon 15 were in strong LD with each other (absolute pairwise LD coefficients ranging from 0.68 to 0.90). Moreover, the 2031+875 A>G and 2031+932 A>G SNPs were in nearly complete association (only 9.8% of the subjects were recombinants). Conversely, the polymorphisms located upstream from exon 15 exhibited very weak LD. The detailed LD coefficients can be found in the web supplement (Table A, web supplement).

None of the *KCNQ1* polymorphisms exhibited significant difference of genotype or allele frequencies between the groups with the shortest and the longest QTc intervals (data not shown). Given the strong LD between polymorphisms located in exon 15 and 3'UTR, a haplotype analysis of these four polymorphisms was performed. They generated six common haplotypes, which were similarly distributed between the two groups.

### **KCNE1 polymorphisms**

The known SNPs, 112 G>A and 253 G>A, leading to the amino-acid changes G38S and D85N, respectively, were analyzed. Genotype frequencies did not deviate from the Hardy–Weinberg equilibrium in either group. The two polymorphisms were in weak LD ( $D' = -0.46$ ) (Table B, web supplement).

Allele and genotype frequencies of the 112 G>A SNP (G38S) did not differ significantly between the two groups (Table 3). By contrast, the A allele of the 253 G>A SNP (D85N) was significantly more frequent in the longest than

**Table 3** Frequency of *KCNE1* gene polymorphisms in the shortest and longest QTc groups and odds ratio (95% CI) for longest QTc associated with genotype

Polymorphism	QTc	
	Shortest, N = 200	Longest, N = 198
<b>112 G&gt;A (G38S)</b>		
GG	81 (40.5%)	74 (37.4%)
GA	93 (46.5%)	97 (49.0%)
AA	26 (13.0%)	27 (13.6%)
Allele frequencies	0.637/0.363	0.619/0.381
OR [95% CI] <sup>a</sup>	1.15 [0.77–1.72], $P = 0.50$	
<b>253 G&gt;A (D85N)</b>		
GG	197 (98.5%)	186 (93.9%)
GA	3 (1.5%)	12 (6.1%)
AA	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Allele frequencies	0.992/0.008	0.970/0.030***
OR [95% CI] <sup>a</sup>	4.21 [1.17–15.16], $P = 0.028$	

Nucleotide numbering starts from the ATG start codon (Genbank accession M26685).

<sup>a</sup>Carriers of the minor allele opposed to homozygotes for the frequent allele; \*\*\* $P = 0.016$ .

in the shortest QTc group (0.008 in the shortest QTc vs 0.030 in the longest QTc group,  $P = 0.016$ ). No homozygote 253 A/A was identified in this study population. The OR [95% CI] for longest QTc associated with carriage of minor A allele was 4.21 [1.17–15.16],  $P = 0.028$  (Table 3). Frequencies of the four possible haplotypes were not estimated owing to the low frequency of the 253 A allele.

### **KCNH2 2690 A>C polymorphism**

The *KCNH2* 2690 A>C SNP, leading to the K897T amino-acid change, had previously been reported in Finnish (frequency of 0.16<sup>21,32</sup>), German ( $\approx 0.24$ <sup>22</sup>), American (0.14<sup>15</sup>) and Japanese (0.02<sup>33</sup>) populations. The minor allele frequency *KCNH2* 2690 C in the French population was 0.27, close to that of the German population.

Genotype frequencies were in the Hardy–Weinberg equilibrium in the two groups.

The minor allele 2690 C was significantly more frequent in the group with the shortest QTc interval (0.31 in the shortest QTc vs 0.22 in the longest QTc group,  $P = 0.0065$ ) and was associated with a lower risk of QTc interval prolongation (OR = 0.64 [0.46–0.88],  $P = 0.0055$ ) (Table 4). This effect was seen in males as well as females (OR = 0.70 [0.45–1.08]) for males, OR = 0.57 [0.36–0.91] for females,  $P = 0.50$ .

### **SCN5A polymorphisms**

In this study, four *SCN5A* SNPs were analyzed: 1141-3 C>A in intron 9, 1673 A>G in exon 12, leading to the amino-acid change H558R, 5457 C>T in exon 28 leading to the

**Table 4** Frequency of *KCNH2* gene polymorphism in the shortest and longest QTc groups and odds ratio (95% CI) for longest QTc associated with genotype

Polymorphism	QTc	
	Shortest N=200	Longest N=198
2690 A>C (K897T)		
AA	99 (49.5%)	119 (60.1%)
AC	77 (38.5%)	71 (35.9%)
CC	24 (12.0%)	8 (4.0%)
Allele frequencies	0.687/0.313	0.780/0.220***
OR [95% CI] <sup>a</sup>	0.64 [0.46–0.88], <i>P</i> =0.0055	

Nucleotide numbering starts from the ATG start codon (Genbank accession U04270).

<sup>a</sup>Carriers of the minor allele opposed to homozygotes for the frequent allele; \*\*\**P*=0.0065.

synonymous polymorphism D1819D, and –92 C>A in the core promoter of the gene.

The minor allele frequencies were 0.20 for 1141-3 A, 0.24 for 1673 G, 0.31 for 5457 T, and 0.003 (two out of 780 alleles) for –92 A. This latest SNP was less represented in our population than in the previous sample of 71 subjects of mixed ethnicity (*N*=71, 4.2%).<sup>34</sup> Owing to its low frequency, it was not studied further.

The three frequent SNPs were in the Hardy–Weinberg equilibrium in the two groups.

The 1141-3 C>A and 1673 A>G SNPs were in strong association, with only 8.3% of recombinant subjects. These two polymorphisms were in weak LD with the 5457 C>T polymorphism (Table C, web supplement). The minor alleles 1141-3 A and 1673 G were more frequent in the group with the longest QTc interval, with an OR [95% CI] of 1.66 [1.18–2.35], *P*=0.0039 associated with carriage of allele 1141-3 A and 1.5 [1.1–2.1], *P*=0.01 associated with carriage of allele 1673 G (Table 5). Conversely, the minor allele 5457 T was more frequent in the group with the shortest QTc interval and associated with a lower risk of QTc interval prolongation (OR=0.65 [0.48–0.89], *P*=0.0063) (Table 5).

A haplotype analysis combining the 1141-3 C>A SNP and the 5457 C>T polymorphisms was performed. The 1673 A>G polymorphism was not included in the haplotype analysis because of its high concordance with the 1141-3 C>A. There was a globally significant difference in haplotype distribution between the two groups (*P*=0.002) (Table 6). We examined whether the effect of each polymorphism had an independent effect on risk by testing the interaction between the two alleles, but this did not reach significance (*P*=0.65), indicating that the two polymorphisms acted independently from each other.

#### Interaction between polymorphisms among the four genes

Potential interactions between polymorphisms of the different genes were explored in a systematic way. An

**Table 5** Frequency of *SCN5A* gene polymorphisms in the shortest and longest QTc groups and odds ratio (95% CI) for longest QTc associated with genotype

Polymorphism	QTc	
	Shortest N=200	Longest N=198
1141-3 C>A		
CC	139 (69.5%)	117 (59.1%)
CA	57 (28.5%)	64 (32.3%)
AA	4 (2.0%)	17 (8.6%)
Allele frequencies	0.837/0.163	0.753/0.247*
OR [95% CI] <sup>a</sup>	1.66 [1.18–2.35], <i>P</i> =0.0039	
1673 A>G (H558R)		
AA	126 (63.0%)	106 (53.5%)
AG	66 (33.0%)	71 (35.9%)
GG	8 (4.0%)	21 (10.6%)
Allele frequencies	0.795/0.205	0.715/0.285**
OR [95% CI] <sup>a</sup>	1.52 [1.11–2.10], <i>P</i> =0.010	
5457 C>T (D1819D)		
CC	77 (38.5%)	109 (55.0%)
CT	103 (51.5%)	71 (35.9%)
TT	20 (10.0%)	18 (9.1%)
Allele frequencies	0.642/0.358	0.730/0.270***
OR [95% CI] <sup>a</sup>	0.65 [0.48–0.89], <i>P</i> =0.0063	

Nucleotide numbering starts from the ATG start codon (Genbank accession NM000335).

<sup>a</sup>Carriers of the minor allele opposed to homozygotes for the frequent allele; \**P*=0.0057, \*\**P*=0.0210, \*\*\**P*=0.0032.

**Table 6** Comparison of the main haplotype frequencies of the *SCN5A* gene in the shortest and longest QTc groups

Haplotypes		Frequency		<i>P</i> -value
1141-3 C>A	5457 C>T	Shortest	Longest	
C	C	0.515	0.528	Reference
C	T	0.323	0.224	0.020
A	C	0.128	0.202	0.087
A	T	0.034	0.046	0.580

Global difference in haplotype frequencies between the shortest and longest QTc groups: *P*=0.002.

interaction was detected between the *KCNH2* 2690 A>C SNP and the *KCNQ1* 2031+932 A>G polymorphism. Actually, the effect of the *KCNH2* 2690 C allele previously observed appeared to be confined to homozygotes for the major *KCNQ1* 2031+932 A allele (OR=0.33 [0.18–0.60], *P*=0.0003), whereas the effect was not significant in carriers of the *KCNQ1* 2031+932 G allele (OR=1.18 [0.67–2.05]) (test of homogeneity of ORs, *P*=0.004).

## Discussion

While gender and age influence QT duration, a genetic determination of the QT length has been suggested.<sup>7</sup> Several studies have focused on SNPs located in genes responsible for the LQTS as potential determinants of cardiac repolarization duration. Indeed, the cardiac AP is orchestrated by potassium and sodium ion channel subunits encoded by the *KCNQ1* (LQT1), *KCNE1* (LQT5), *KCNH2* (LQT2), *KCNE2* (LQT6) and *SCN5A* (LQT3) genes, in which rare mutations lead to QTc prolongation associated with ventricular arrhythmias. The first SNPs found associated with the QTc length in healthy subjects were 2690 A>C (K897T) of *KCNH2*<sup>21,22,32</sup> and, more recently, SNPs in *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNE2* and *SCN5A*.<sup>23,35</sup>

While these studies determined the impact of SNPs on QT length as a quantitative trait, we adopted an original approach by opposing two contrasted groups of healthy untreated subjects: 200 subjects presenting the shortest and 198 subjects presenting the longest QTc interval length, selected from a cohort of 2008 healthy subjects. We then compared the allele, genotype and haplotype frequencies of 10 *KCNQ1*, two *KCNE1*, four *SCN5A* and one *KCNH2* SNPs between the two groups and searched for potential interactions between them.

### *KCNQ1* and *KCNE1* polymorphisms

We screened the entire coding sequence, exon/intron boundaries and the 3'UTR region of the *KCNQ1* gene and identified six new rare SNPs (<0.10) (459 G>T (T153T), 477+20 A>G, 918+13 C>T, 984 C>T (I328I), 1514+7 G>T and 1514+14 G>T), and two more frequent ones (>0.10) (477+80 insGG, 2031+479 G>A).

Busjahn *et al*<sup>7</sup> initially suggested that the LQT1 locus, containing *KCNQ1*, may represent a quantitative trait locus (QTL) for the QTc phenotype in the normal population. However, in our study, no *KCNQ1* SNPs, alone or in combination, demonstrated an association with the QTc length. In a recent study, Aydin and *al*<sup>23</sup> also failed to identify *KCNQ1* SNPs associated with QTc length in the normal monozygotic and dizygotic twins previously studied by Busjahn. The discrepancy between results from linkage and association studies suggests that a different gene in the vicinity of *KCNQ1* might be at the origin of the linkage previously detected in the region. Another explanation might be that there exists in *KCNQ1* an undetected functional SNP not in complete LD with the SNPs genotyped in the present study as well as in Aydin's report.<sup>23</sup> Besides, in a recent report analyzing 81 SNPs spreading over the entire *KCNQ1* gene, several haplotype blocks were identified in weak LD one with each other, and a rare G allele (rs757092 A>G) in a high LD haplotype block in intron 1 was associated with a QTc prolongation in the study population.<sup>35</sup> The 477+80 insGG polymorphism is located 50 kb downstream from the rs757092 A>G SNP in the genomic sequence of *KCNQ1*. They may be in weak

LD in our population and would explain why we failed to detect any *KCNQ1* SNP effect on the QTc length.

We also hypothesized that allelic variants in the regulatory subunit of the  $I_{Ks}$  channel, minK encoded by *KCNE1*, could influence the channel function, and as a consequence, the length of the QTc interval. We studied two known nonsynonymous polymorphisms, G38S<sup>23,36</sup> and D85N.<sup>19,23,37</sup> Although the G38 allele was shown to be associated with atrial fibrillation,<sup>36</sup> none of the G38S alleles was associated with the QTc length in our French population of healthy subjects. In contrast, the rare N85 allele was four times more frequent in the group with the longest QTc interval than in the group with the shortest QTc.

Wei *et al*<sup>19</sup> described the N85 allele as a risk factor of drug-induced LQT syndrome. In this study, no variation in  $I_{Ks}$  current amplitude was observed when N85-minK was coexpressed with wild-type (WT) KvLQT1 in CHO cells, the channels activated more slowly and deactivated to a greater extent after a long diastolic pause, a latent defect that may be unmasked by drug block and render individuals susceptible to acquired LQTS.

Recently, the N85 variant was reported in some LQTS patients presenting longer QTc intervals and a higher incidence of cardiac arrhythmia compared to family members carrying only a LQT syndrome mutation. In this study, a marked reduction of  $I_{Ks}$  current was observed when the N85-minK variant was coexpressed with the WT KvLQT1 channel in *Xenopus* oocytes.<sup>38</sup>

Whatever the discrepancy about the KvLQT1/N85-minK channel properties expressed in heterologous expression systems, there is evidence that the *KCNE1* N85 allele modifies the  $I_{Ks}$  channel function leading to a prolongation of the QTc interval length, which means that D85N would be a 'functional' polymorphism. Our association study is in accordance with these studies since 6% (12/198) of healthy subjects with a QTc interval in the upper limit (394–433 ms) were carriers of the N85 allele compared to 1.5% (3/200) of healthy subjects with shorter QTc interval (<365 ms).

Recent association studies reported the rare allele IVS2-128 A and rs727957 T associated with the prolongation of the QTc length in healthy Caucasian subjects.<sup>23,35</sup> The former is located in intron 2 and the latter in a haplotype block ending 20 kb upstream of the *KCNE1* gene. The functional nature of these SNPs is undetermined but these data indicate that the *KCNE1* gene may act as a QTL for the cardiac ventricular repolarization in healthy subjects. Thus, these SNPs represent good candidates to explore the penetrance variability in LQT syndrome patients.

### The *KCNH2* K897T polymorphism

We found that the 2690 C allele, leading to a threonine residue at position 897 of the HERG protein, was more prevalent in the group with the shortest QTc interval. This

result is in accordance with previous association studies.<sup>22,35</sup> Bezzina *et al*<sup>22</sup> showed that female 2690 C/C homozygotes had shorter QTc intervals in comparison to female heterozygotes and 2690 A/A homozygotes. Moreover, they showed by *in vitro* studies that HERG-T897 channels hastened cardiac repolarization compared to HERG-K897 channels. By contrast, an earlier association study in a Finnish population showed opposite results: female heterozygotes or 2690 C/C homozygotes had longer QTc intervals than females 2690 A/A homozygotes.<sup>32</sup> This discrepancy may reflect either the occurrence of additional population-specific functional polymorphisms, influencing the effect of the K897T polymorphism, or the limitations of association studies.

Our results not only confirmed a hastened cardiac repolarization in both male and female carriers of the 2690 C allele but also suggested that this effect may be dependent on a *KCNQ1* polymorphism located in the 3'UTR part of the gene (2031+932 A>G).

Interestingly,  $I_{Kr}$ , underlined by the HERG channels, and  $I_{Ks}$ , underlined by KvLQT1/minK channels, were shown to interact both at a functional and a physical level. Indeed, when  $I_{Kr}$  is reduced, the Ap is prolonged, causing  $I_{Ks}$  activation to increase so as to prevent excessive repolarization delays,<sup>39,40</sup> and KvLQT1 was found to associate physically with HERG in both CHO cells and native cardiomyocytes, and to increase membrane localization of HERG in CHO cells.<sup>41</sup>

The only *KCNQ1* allele in interaction with the HERG-T897 allele is located in the 3'UTR part of the gene. This *KCNQ1* 2031+932 A allele, or a yet unidentified polymorphism LD with it, may lead to more stable transcripts, or to a better subcellular targeting as previously shown for other genes.<sup>42-44</sup> Even if a direct effect on QTc length was not detectable, the *KCNQ1* 2031+932 A may potentiate the  $I_{Kr}$  current displayed by the HERG-T897 channels.<sup>22</sup>

### SCN5A polymorphisms

We studied four *SCN5A* SNPs which have been previously reported: -92 C>A,<sup>34</sup> 1141-3 C>A,<sup>23</sup> 1673 A>G (H558R),<sup>15,33</sup> 5457 C>T (D1819D).<sup>33</sup> Almost completely concordant, the 1141-3 A and 1673 G minor alleles were more frequent in the group with the longest QTc interval, whereas the 5457 T minor allele was more frequent in the group with the shortest QTc length. The effects of the 1141-3 C>A (or the 1673 A>G) and the 5457 C>T SNPs were independent, as shown by the haplotype analysis.

The association of the 1673 A>G SNP, or H558R, with QT length confirms the result recently published by Aydin *et al*.<sup>23</sup> This polymorphism is located in the Na<sup>+</sup> channel I-II interdomain cytoplasmic linker, and two studies have suggested that it could modulate the effect of arrhythmia-causing *SCN5A* mutations.<sup>16,45</sup> However, no difference in Na<sup>+</sup> channel activation and inactivation has been observed between the hH1-H558 and the hH1-R558 clones.<sup>16</sup>

It is not possible from our results to disentangle the effect of the H558R polymorphism from that of the 1141-3 C>A SNP because of their tight LD. This latter SNP is located in the acceptor splice site in intron 9 and might affect the splicing. The observed effect may also be due to another unknown polymorphism in LD with these two SNPs.

The minor allele of the 5457 C>T SNP, located in the last exon of the gene (exon 28) and leading to the synonymous D1819D polymorphism, was associated with the shortest QTc length. Interestingly, Aydin *et al*<sup>23</sup> described a SNP located in intron 24 of *SCN5A* (IVS24+116 G>A) with the minor allele associated with a shorter QTc. The functional nature of these variants on the sodium channel activity or expression remains elusive at this point. Indeed, gain of function mutations in *SCN5A* were associated with a QTc prolongation in LQTS patients, while loss of function mutations did not produce a QTc shortening in Brugada patients.

One potential limitation of our study was that it was restricted to healthy untreated subjects. We excluded patients taking medications susceptible to prolong the QT interval (antiarrhythmics, neuroleptics, antihistaminics, antihypertensive treatments), as well as subjects with cardiovascular diseases or diabetes. For this reason, extrapolation of our results to the general population might be questionable. Replication of the present results in an independent population would greatly strengthen our findings.

The findings of our study are important for a better understanding of the risk of arrhythmias and sudden death in healthy subjects as well as in patients with cardiovascular diseases. Indeed, a prolonged baseline QT interval was shown to predispose patients with coronary artery disease to sudden death<sup>46</sup> or myocardial infarction<sup>47,48</sup> whereas a short baseline QT interval was associated with reduced mortality in dofetilide-treated patients with moderate to severe heart failure and reduced left ventricular systolic function.<sup>49</sup> Although rare, the SQTS where patients present a drastic decrease of the QTc interval is also linked to life-threatening arrhythmias and sudden death.<sup>12</sup> So *KCNH2* 2690A>C (K897T) and *SCN5A* 5457 C>T SNPs would be expected to be protective factors, while *KCNE1* 253 G>A (D85N), *SCN5A* 1141-3 C>A and 1673 A>G (H558R) would be risk factors for QT prolongation and onset of arrhythmias in patients with LQT syndrome or with other cardiovascular diseases; the contrary would be expected in patients with a SQTS.

In conclusion, our results suggest that genetic polymorphisms located in the *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2* and *SCN5A* genes might, independently or in interaction, influence the QTc length in healthy Caucasian subjects. These variants might also modulate the effects of ion channel mutations leading to arrhythmias such as LQT and Brugada syndromes and contribute to the phenotypic variability observed in these disorders.

## Acknowledgements

This work was supported by the Inserm, Fondation de France, and Fondation Leducq. We thank Dr Bernard Hainque and Dr Véronique Fressart for their continuous collaboration and their critical review of the manuscript, Dr Fabrice Extramania and Dr Pierre Maison-Blanche for critical discussion about population selection and QTc interval evaluation, and Françoise Simon for her technical help in identifying polymorphisms. The design of hybridization probes for the Fluorescence Resonance Energy Transfer assays was from Olfert Landt, TIB MOLBIOL.

## References

- Merri M, Benhorin J, Alberti M, Locati E, Moss AJ: Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation* 1989; **80**: 1301–1308.
- Rautaharju PM, Zhou SH, Wong S *et al*: Sex differences in the evolution of electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 1992; **8**: 690–695.
- Bazett H: An analysis of the time relations of electrocardiograms. *Heart* 1920; **7**: 353–367.
- Burke JH, Goldberger JJ, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Kadish AH: Gender differences in heart rate before and after autonomic blockade: evidence against an intrinsic gender effect. *Am J Med* 1996; **100**: 537–543.
- Batchvarov VN, Ghuran A, Smetana P *et al*: QT-RR relationship in healthy subjects exhibits substantial intersubject variability and high intrasubject stability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282**: H2356–H2363.
- Hanson B, Tuna N, Bouchard T *et al*: Genetic factors in the electrocardiogram and heart rate of twins reared apart and together. *Am J Cardiol* 1989; **63**: 606–609.
- Busjahn A, Knoblauch H, Faulhaber H-D *et al*: QT interval is linked to 2 long-QT syndrome loci in normal subjects. *Circulation* 1999; **99**: 3161–3164.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G: KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I<sub>ks</sub> cardiac potassium current. *Nature* 1996; **384**: 78–80.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A *et al*: Coassembly of KVLQT1 and minK(IsK) proteins to form cardiac I<sub>Ks</sub> potassium channel. *Nature* 1996; **384**: 80–83.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT: A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* 1995; **81**: 299–307.
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I *et al*: MIRP1 forms I<sub>Kr</sub> potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; **97**: 175–187.
- Brugada R, Hong K, Dumaine R *et al*: Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004; **109**: 30–35.
- Belloq C, van Ginneken AC, Bezzina CR *et al*: Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004; **109**: 2394–2397.
- Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ: Low penetrance in the long-QT syndrome Clinical impact. *Circulation* 1999; **99**: 529–533.
- Yang P, Kanki H, Drolet B *et al*: Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation* 2002; **105**: 1943–1948.
- Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR: A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest* 2003; **111**: 341–346.
- Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR *et al*: A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* 2003; **92**: 14–22.
- Sesti F, Abbott GW, Wei J *et al*: A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 10613–10618.
- Wei J, C-H YI, R TA *et al*: KCNE1 polymorphism confers risk of drug-induced long QT syndrome by altering kinetic properties of I<sub>ks</sub> potassium channels. *Circulation* 1999; (Suppl 1): I-495 (Abstract).
- Splawski I, Timothy KW, Tatemura M *et al*: Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* 2002; **297**: 1333–1336.
- Laitinen P, Fodstad H, Piippo K *et al*: Survey of the coding region of the HERG gene in long QT syndrome reveals six novel mutations and an amino acid polymorphism with possible phenotypic effects. *Hum Mutat* 2000; **15**: 580–581.
- Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A *et al*: A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 2003; **59**: 27–36.
- Aydin A, Bähring S, Dahm S *et al*: Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *J Mol Med* 2005; **83**: 159–165.
- Balkau B, Eschwege E, Tichet J, Marre M, group DESIR: Proposed criteria for the diagnosis of diabetes: evidence from a French epidemiological study (D.E.S.I.R.). *Diabet Metab* 1997; **23**: 428–434.
- Gallois Y, Vol S, Caces E, Balkau B: Distribution of fasting serum insulin measured by enzyme immunoassay in an unselected population of 4032 individuals. Reference values according to age and sex. D.E.S.I.R. Study Group. Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Resistance. *Diabet Metab* 1996; **22**: 427–431.
- Puddu PE, Jouve R, Mariotti S *et al*: Evaluation of 10 QT prediction formulas in 881 middle-aged men from the seven countries study: emphasis on the cubic root Fridericia's equation. *J Electrocardiol* 1988; **21**: 219–229.
- Gouas L, Belloq C, Berthet M *et al*: New KCNQ1 mutations leading to haploinsufficiency in a general population; defective trafficking of a KvLQT1 mutant. *Cardiovasc Res* 2004; **63**: 60–68.
- Neyroud N, Richard P, Vignier N *et al*: Genomic organization of the KCNQ1 potassium channel gene and identification of C-terminal mutations in the long QT syndrome. *Circ Res* 1999; **84**: 290–297.
- Tiret L, Amouyel P, Rakotovo R, Cambien F, Ducimetiere P: Testing for association between disease and linked marker loci: a log-linear-model analysis. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 926–934.
- Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL: A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet* 2004; **68**: 165–177.
- Tahri-Daizadeh N, Tregouet DA, Nicaud V, Manuel N, Cambien F, Tiret L: Automated detection of informative combined effects in genetic association studies of complex traits. *Genome Res* 2003; **13**: 1952–1960.
- Pietila E, Fodstad H, Niskasaari E *et al*: Association between HERG K897T polymorphism and QT interval in middle-aged Finnish women. *J Am Coll Cardiol* 2002; **40**: 511–514.
- Iwasa H, Itoh T, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T: Twenty single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their allelic frequencies in four genes that are responsible for familial long QT syndrome in the Japanese population. *J Hum Genet* 2000; **45**: 182–183.
- Yang P, Kupersmidt S, Roden DM: Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res* 2004; **61**: 56–65.
- Pfeufer A, Jalilzadeh S, Perz S *et al*: Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population: results from the KORA study. *Circ Res* 2005; **96**: 693–701.
- Lai LP, Su MJ, Yeh HM *et al*: Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2002; **144**: 485–490.
- Tesson F, Donger C, Denjoy I *et al*: Exclusion of KCNE1 (IsK) as a candidate gene for Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**: 2051–2055.
- Westenskow P, Splawski I, Timothy KW, Keating MT, Sanguinetti MC: Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation* 2004; **109**: 1834–1841.

- 39 Varro A, Balati B, Iost N *et al*: The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol* 2000; **523** (Part 1): 67–81.
- 40 Biliczki P, Virag L, Iost N, Papp JG, Varro A: Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br J Pharmacol* 2002; **137**: 361–368.
- 41 Ehrlich JR, Pourrier M, Weerapura M *et al*: KvLQT1 modulates the distribution and biophysical properties of HERG. A novel alpha-subunit interaction between delayed rectifier currents. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1233–1241.
- 42 Subramaniam K, Chen K, Joseph K, Raymond JR, Tholanikunnel BG: The 3'-untranslated region of the beta2-adrenergic receptor mRNA regulates receptor synthesis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 27108–27115.
- 43 Pontrelli L, Sidiropoulos KG, Adeli K: Translational control of apolipoprotein B mRNA: regulation via *cis* elements in the 5' and 3' untranslated regions. *Biochemistry* 2004; **43**: 6734–6744.
- 44 Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P: The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; **64**: 1005–1010.
- 45 Ye B, Valdivia CR, Ackerman MJ, Makielski JC: A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics* 2003; **12**: 187–193.
- 46 Puddu PE, Bourassa MG: Prediction of sudden death from QTc interval prolongation in patients with chronic ischemic heart disease. *J Electrocardiol* 1986; **19**: 203–211.
- 47 Schwartz PJ, Wolf S: QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1978; **57**: 1074–1077.
- 48 Ahnve S: QT interval prolongation in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1985; **6** (Suppl D): 85–95.
- 49 Brendorp B, Elming H, Jun L *et al*: Qtc interval as a guide to select those patients with congestive heart failure and reduced left ventricular systolic function who will benefit from antiarrhythmic treatment with dofetilide. *Circulation* 2001; **103**: 1422–1427.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

# Prenatal Screening of 21 Microdeletion/ Microduplication Syndromes and Subtelomeric Imbalances by MLPA in Fetuses with Increased Nuchal Translucency and Normal Karyotype

Laetitia Gouas<sup>a,d</sup> Stéphan Kémény<sup>a,d</sup> Anne-Marie Beaufrère<sup>b</sup>  
Eléonore Eymard-Pierre<sup>a,d</sup> Céline Pebrel-Richard<sup>a,d</sup> Andrei Tchirkov<sup>a,d</sup>  
Didier Lemery<sup>c,e</sup> Hélène Laurichesse-Delmas<sup>c,e</sup> Philippe Vago<sup>a,d</sup>  
Carole Goumy<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Service de Cytogénétique Médicale, <sup>b</sup>Service d'Anatomie pathologique, and <sup>c</sup>Service de Gynécologie Obstétrique, Unité de Médecine Foétale, CHU Clermont-Ferrand, <sup>d</sup>ERTICA EA 4677, Université d'Auvergne, Centre Jean Perrin, and <sup>e</sup>EA 4681 PEPRAD, Université d'Auvergne, UFR Médecine, Clermont-Ferrand, France

## Key Words

Chromosomal aberration · Multiplex ligation probe amplification · Nuchal translucency · Prenatal diagnosis

## Abstract

Fetuses with increased nuchal translucency thickness (NT) are at increased risk for chromosomal abnormalities. In case of a normal karyotype, a minority of them may present with structural abnormalities or genetic syndromes, which may be related to submicroscopic chromosomal imbalances. The objective of this study was to evaluate whether MLPA screening of 21 syndromic and subtelomeric regions could improve the detection rate of small chromosomal aberrations in fetuses with increased NT and a normal karyotype. A total of 106 prenatal samples from fetuses with NT  $\geq$ 99th centile and normal R- and G-banding were analyzed by MLPA for subtelomeric imbalances (SALSA P036 and P070) and 21 syndromic regions (SALSA P245). One sample showed a benign CNV (dup(8)pter, *FBXO25* gene), and 1 patient was found to have a loss of 18qter and a gain of 5pter as a result of an un-

balanced translocation. The incidence of cryptic pathogenic variants was <1% or 2.7% when only fetuses with other ultrasound abnormalities were taken into account. Submicroscopic imbalances in fetuses with increased NT may be individually rare, and genome-wide screening seems more likely to improve the diagnostic yield in these fetuses.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Fetuses with increased nuchal translucency thickness (NT), which is defined by a NT measurement >95th centile at the ultrasound sonography between 11th and 14th weeks of gestation [Nicolaidis, 2004], are at increased risk for chromosomal aneuploidies, especially trisomy 21 [Taipale et al., 1997].

In case of a normal karyotype, while the majority of fetuses will have a good outcome, increased NT is still associated with an increased risk of fetal malformations, the major being cardiac defects, certain genetic syndromes (Noonan, Smith-Lemli-Opitz), and fetal or perinatal death. These adverse results may be related to small chro-

mosomal aberrations misdiagnosed by karyotyping, and the prevalence of clinically significant submicroscopic chromosomal imbalances in fetuses with increased NT is still unknown.

In France, array-CGH, a pangenomic exploration of submicroscopic imbalances, has been introduced in prenatal screening of fetuses with structural abnormalities, and national guidelines recommend limiting the identification of variants with unknown clinical significance (VOUS). In this light, targeted arrays have been designed to minimize the likelihood of identifying VOUS.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), a locus-specific relative quantification method, enables the simultaneous analysis of 40–50 regions in a single reaction and can be an efficient tool for screening of large cohorts of patients with suspected deletions and duplications involving specific loci. Thus, MLPA has been shown as a reliable and rapid testing method to detect common aneuploidies in pregnancies with an elevated risk for an abnormal fetal karyotype [Boormans et al., 2008] as well as cryptic rearrangements in fetuses with ultrasound abnormalities [Goumy et al., 2010]. As a targeted approach, MLPA may also overcome the identification of VOUS in prenatal diagnosis by focusing on a panel of chromosomal regions involved in submicroscopic rearrangements in pathogenic cases or microdeletion/microduplication syndromes.

The objective of this study was to evaluate whether supplementary chromosomal analysis using MLPA for 21 interstitial regions responsible for known syndromes and subtelomeric regions could improve the detection rate of small chromosomal aberrations in fetuses with increased NT and a normal karyotype in a routine prenatal setting. Our results suggest that the use of MLPA for screening of subtelomeric and 21 syndrome regions does not improve the chromosomal diagnostic yield in cases of increased NT, particularly when the increased NT is isolated.

## Material and Methods

Between January 2008 and December 2011, 221 prenatal and products of conception samples from fetuses with increased NT provided by the Obstetrics Department of the University Hospital of Clermont-Ferrand and by district hospitals in the Auvergne region were addressed to our laboratory with written informed consent for prenatal screening. Increased NT was defined as NT at or above the 99th centile for the gestational age between 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation according to the Fetal Medicine Foundation guidelines.

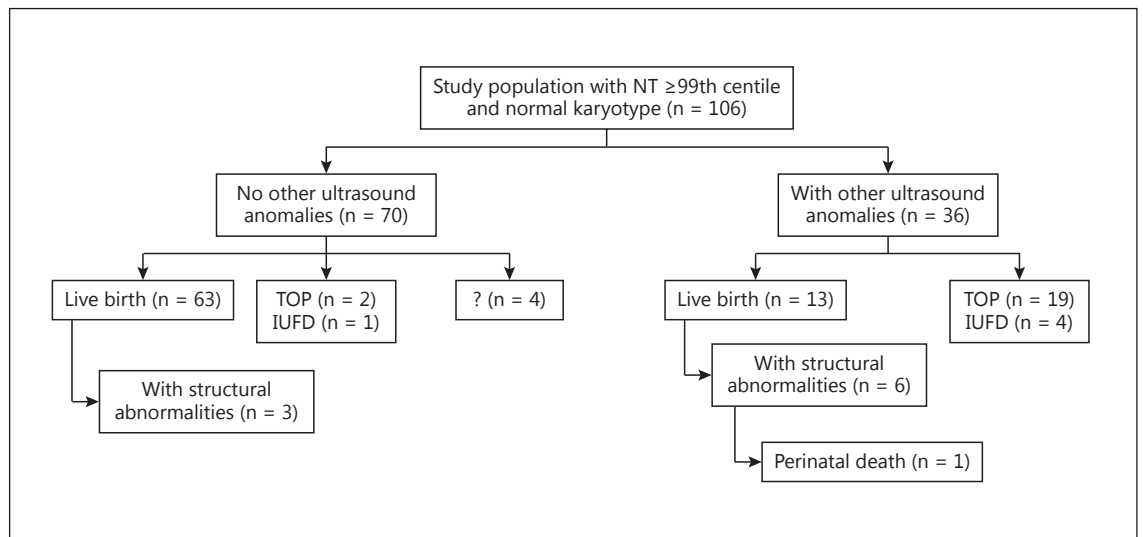
The rapid aneuploidy testing (chromosomes 13, 18, 21, X, Y) by the AneuVysion™ FISH testing and R- and G-banded karyo-

**Table 1.** Microdeletion/microduplication syndromes detected with the SALSA MLPA Kit P245

Syndrome	Chromosomal position
1p36 deletion	1p36.33
2p16.1 microdeletion	2p16.1
3q29 microdeletion	3q29
Wolf-Hirschhorn	4p16.3
Cri-du-chat	5p15
Sotos	5q35.3
Williams	7q11.23
Langer-Giedon	8q24.12
9q22.3 microdeletion	9q22.33
DiGeorge type 2	10p15.1
WAGR	11p13
Prader-Willi/Angelman	15q12
15q24 deletion	15q24.1
Rubinstein-Taybi	16p13.3
Miller-Dieker	17p13.3
Smith-Magenis	17p11.2
NF1 microdeletion	17q11.2
17q21.31 microdeletion	17q21.31
DiGeorge type 1	22q11.21
Phelan-McDermid	22q13
RETT	Xq28

types showed a chromosomal aberration in 94 of these samples (44 cases of trisomy 21, 18 cases of monosomy X, 11 cases of trisomy 13, 10 cases of trisomy 18, 5 cases of triploidy, 1 case of 47,XXX, and 5 cases with structural aberrations: 46,XY,der(20)t(6;20)(q14;p13), 47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11), 46,XY,del(9)(q22.3q32), 46,XX,der(8)t(8;11)(q24.3q24), 45,XY,der(13;14)(q10;q10), whereas the karyotype was normal in the 127 remaining samples. A total of 106 out of the 127 samples from fetuses with NT  $\geq$  99th centile and a normal karyotype were analyzed by MLPA for subtelomeric imbalances and microdeletion/microduplication syndromes as requested by the referring doctor. Ninety-two samples were chorionic villus (CV) cells, 11 samples were amniotic cells, and 3 samples were products of conception (2 in utero fetal deaths and 1 obtained after medical interruption of the pregnancy). The samples were derived from 105 women, including 104 singleton pregnancies and 1 dichorionic twin pregnancy. The obstetric outcomes and prenatal examinations were retrieved from hospital records, and outcomes of fetal losses, including termination, were obtained through fetal autopsy.

For MLPA analyses, DNA was extracted from cultured CV cells, amniocytes, or skin fibroblasts using the NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Since January 2010, CV samples with female DNA were evaluated for the presence of maternal cell contamination (AmpFI STR Identifier Plus™, Applied Biosystems). Then, the MLPA analyses were performed using the SALSA MLPA kits P036 + P070 (MRC-Holland) containing each a human subtelomeric probe set for all chromosomes and the SALSA MLPA kit P245 targeting 21 syndromic regions (table 1). A volume of 500 ng of DNA was used in the MLPA protocol according to the manufacturer's instructions. Re-



**Fig. 1.** Summary of pregnancy outcomes of the 106 fetuses with NT  $\geq$ 99th centile and an apparently normal karyotype explored by MLPA. TOP = Termination of pregnancy; IUFD = intrauterine fetal death; ? = lost for follow-up.

actions were performed on a TProfessional thermocycler (Biometra), 1  $\mu$ l of PCR products was analyzed by capillary electrophoresis in a GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter), and quantitative data were extracted using the GenomeLab GeXP software 10.0 (Beckman Coulter). MLPA data analysis was performed using Microsoft Excel. Abnormal results were defined by a ratio  $>1.3$  for gain and  $<0.7$  for loss of genetic material and were validated by FISH on metaphase chromosomes according to standard procedures using probes located in the suspected regions (Cytocell Technology or Vysis). Peripheral blood lymphocytes from the parents were analyzed by FISH when a tested fetus was positive for rearrangements.

## Results

The median age of women with fetuses having NT  $\geq$ 99th centile and a normal karyotype was 30 years (18–41 years). The median gestational age at the time of CV and amniotic fluid sampling was 13 and 18 weeks, respectively. Fetuses had a median NT measurement of 3.7 mm (range: 2.8–13 mm). Of these cases, 36 had other structural abnormalities identified at the first or second trimester of gestation ultrasound examination. A median NT was 3.5 mm (range: 2.8–12.3 mm) in cases with isolated increased NT, whereas it was 5.15 mm (range: 2.9–13 mm) in fetuses with increased NT and congenital structural abnormalities. Of 70 cases of pregnancies with an isolated NT  $\geq$ 99th centile, 63 were live born; among them, 8 were born prematurely, 3 cases gave rise to live

born with congenital structural abnormalities, in 2 cases the pregnancy was terminated, 1 ended in fetal death, and 4 cases were lost for follow-up. Among the 76 live-born children (71.7%), 9 presented congenital structural anomalies (3 had isolated NT, 6 had NT associated with other prenatal ultrasound findings; among them 1 died during the first days of life). The rate of adverse outcome overall was 13.2%, including live-born children with abnormalities (8.5%) and fetal losses (4.7%). Pregnancy outcomes are summarized in figure 1.

MLPA results were not obtained in 4 samples due to poor DNA quality. In addition, none of 20 tested CV samples showed a maternal cell contamination. A benign CNV was identified in 1 case (dup(8)pter, *FBXO25* gene), and only 1 sample showed pathogenic chromosomal abnormalities. Subtelomeric MLPA analysis revealed a loss of 18qter and a gain of 5pter, which were confirmed by FISH as the result of an unbalanced translocation. The clinical history of this case has been described in detail in Goumy et al. [2010]. Briefly, NT was measured at 5.3 mm for a crown-rump length of 47.5 mm at 11 weeks and 4 days of gestation. Ultrasound performed at 17 weeks of gestation revealed a complex cardiac defect with aortic valve agenesis and left ventricular dysfunction associated with a poor prognosis. The cytogenetic investigation of the parents showed that the structural imbalance was a de novo event, and after referred cardiac examination and genetic counseling, the pregnancy was terminated at 20 weeks of gestation in accordance with French legislation.

## Discussion

In our study, 106 DNA samples were screened for 21 microdeletion/microduplication syndromes and subtelomeric imbalances by MLPA. Only one pathogenic rearrangement, misdiagnosed by conventional karyotyping, was identified, leading to an incidence of cryptic pathogenic variants <1% (1/106). When only fetuses with increased NT and other ultrasound abnormalities were taken into account, the incidence increased to 2.7% (1/36).

At the same time, 3 studies showed that the screening of cryptic imbalances in subtelomeric regions or in 15 regions of specific syndromes in fetuses with increased NT and normal karyotype did not receive higher detection rates of genetic diseases. Roselló et al. [2010] investigated the presence of cryptic rearrangements in subtelomeric or microdeletion syndrome regions by MLPA in fetuses with ultrasound abnormalities between the 11th and 13th week of gestation or positive screening in the first trimester and with a normal karyotype, but no chromosomal imbalances were detected in 24 fetuses with increased NT. Schou et al. [2009] screened 100 fetuses with NT at or above the 99th percentile, with 10 of them having other sonographic abnormalities, by HR-CGH and subtelomeric and syndrome-specific MLPA. Using this combination, no chromosomal abnormalities were detected. Kjaergaard et al. [2010] concluded that while additional MLPA analyses for selected microdeletions and subtelomeric imbalances were valuable in routine prenatal diagnostics if a malformation and/or other abnormalities are present at ultrasound scanning, MLPA gave no diagnostic yield in case of increased NT.

MLPA has also been shown as a reliable method in the chromosomal analysis of aborted samples overcoming the drawbacks of conventional cytogenetic analyses associated with cell culture since MLPA can be performed on extracted DNA without culturing cells [Haoud et al., 2014; Kim et al., 2015].

Although more expensive and time-consuming than MLPA, array-CGH is currently used in prenatal diagnosis of fetuses with ultrasound abnormalities, with varying platforms according to the laboratory. CGH and SNP arrays may be used, although they detect different types of genetic variation. SNP arrays, in addition to copy number variation (CNV), can detect homo- or heterozygous regions underlying consanguinity or uniparental disomy. In prenatal diagnosis, array-CGH may be pangenomic, but the analysis resolution needs to be decreased to minimize the detection of VOUS or it may be targeted to focus on CNVs of known pathogenicity.

Recent studies using array-CGH showed that pathogenic submicroscopic chromosomal imbalances may be present in fetuses with NT >99th centile. Using a 44K oligonucleotide array specifically designed for prenatal screening, Leung et al. [2011] studied a series of 48 prenatal samples and found 4 likely pathological CNVs (8.3%) of 1.2–7.9 Mb in size. Two of them were identified among 10 fetuses that showed other sonographic anomalies, leading to a rate of pathogenic variants of 20%, and the 2 others were detected among 38 cases with isolated increased NT (5.3%). Lee et al. [2012] reported a pathological 0.85-Mb microdeletion at 6p25.3 among 17 fetuses (6.7%) with increased NT. In a series of 162 fetuses with sonographic anomalies, using whole-genome oligonucleotide microarray platforms, 3 pathological CNVs (2.5–22 Mb), and 2 VOUS (0.41–0.49 Mb) were identified in fetuses with increased NT, and 3 pathological CNVs (12.5–22.1 Mb) and 1 VOUS (0.37 Mb) were reported in fetuses with cystic hygroma [Yatsenko et al., 2013]. In the largest series of fetuses with increased NT measurement screened by array-CGH (90 fetuses), only 1 pathogenic CNV was detected (1 Mb) with a targeted version of the Agilent ISCA 8x60k design [Scott et al., 2013]. Obviously, submicroscopic imbalances in fetuses with increased NT may be individually rare, and genome-wide screening seems to be more prone to give a comprehensive overview of the causative genomic imbalances and to improve the diagnostic yield than targeted approaches.

There is growing evidence of the relevance of using array-CGH for the detection of cryptic imbalances in a routine prenatal setting for fetuses with structural malformations or other abnormalities at ultrasound scanning, and further studies are needed to determine whether cryptic imbalances are an important part of the etiology of increased NT.

In conclusion, our study suggests that MLPA analysis of subtelomeric and 21 microdeletional/microduplication regions gave no additional diagnostic yield in case of increased NT  $\geq$ 99th centile.

## Acknowledgement

This work was supported by the University Hospital of Clermont-Ferrand.

## References

- Boormans E, Birnie E, Wildschut H, Schuring-Blom H, Oepkes D, et al: Multiplex ligation-probe amplification versus karyotyping in prenatal diagnosis: the M.A.K.E study. *BMC Pregnancy Childbirth* 8:18 (2008).
- Goumy C, Gouas L, Pebrel-Richard C, Véronèse L, Eymard-Pierre, et al: Prenatal detection of cryptic rearrangements by multiplex ligation probe amplification in fetuses with ultrasound abnormalities. *Genet Med* 12:376–380 (2010).
- Haoud K, Mellali S, Gouas L, Tchirkov A, Vago P, Moulessehoul S: Prevalence of aneuploidies in products of spontaneous abortion: interest of FISH and MLPA. *Morphologie* 98:40–46 (2014).
- Kim JW, Lyu SW, Sung SR, Park JE, Cha DH, et al: Molecular analysis of miscarriage products using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): alternative to conventional karyotype analysis. *Arch Gynecol Obstet* 291:347–354 (2015).
- Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, et al: Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn* 30:995–999 (2010).
- Lee CN, Lin SY, Lin CH, Shih JC, Lin TH, Su YN: Clinical utility of array comparative genomic hybridisation for prenatal diagnosis: a cohort study of 3171 pregnancies. *BJOG* 119:614–625 (2012).
- Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, et al: Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* 38:314–319 (2011).
- Nicolaides KH: Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 191:45–67 (2004).
- Roselló M, Ferrer-Bolufer I, Monfort S, Oltra S, Quiroga R, et al: Prenatal study of common submicroscopic 'genomic disorders' using MLPA with subtelomeric/microdeletion syndrome probe mixes, among gestations with ultrasound abnormalities in the first trimester. *Eur J Med Genet* 53:76–79 (2010).
- Schou KV, Kirchhoff M, Nygaard U, Jørgensen C, Sundberg K: Increased nuchal translucency with normal karyotype: a follow-up study of 100 cases supplemented with CGH and MLPA analyses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 34:618–622 (2009).
- Scott F, Murphy K, Carey L, Greville W, Mansfield N, et al: Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: results from over 1000 consecutive cases. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41:500–507 (2013).
- Taipale P, Hiilesmaa V, Salonen R, Ylöstalo P: Increased nuchal translucency as a marker for fetal chromosomal defects. *N Engl J Med* 337:1654–1658 (1997).
- Yatsenko SA, Davis S, Hendrix NW, Surti U, Emery S, et al: Application of chromosomal microarray in the evaluation of abnormal prenatal findings. *Clin Genet* 84:47–54 (2013).

## Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities

### Méthodes de dosage génique comme outils diagnostic pour l'identification d'anomalies chromosomiques

L. Gouas<sup>\*</sup>, C. Goumy, L. Véronèse, A. Tchirkov, P. Vago

*Service de cytogénétique médicale, UFR médecine, histologie embryologie cytogénétique, CHU Clermont-Ferrand, faculté de médecine, université Clermont-1, B.P. 38, 63001 Clermont-Ferrand, France*

Received 4 March 2008; accepted 14 March 2008

Available online 2 June 2008

---

#### Abstract

Cytogenetics is the part of genetics that deals with chromosomes, particularly with numerical and structural chromosome abnormalities, and their implications in congenital or acquired genetic disorders. Standard karyotyping, successfully used for the last 50 years in investigating the chromosome etiology in patients with infertility, fetal abnormalities and congenital disorders, is constrained by the limits of microscopic resolution and is not suited for the detection of subtle chromosome abnormalities. The ability to detect submicroscopic chromosomal rearrangements that lead to copy-number changes has escalated progressively in recent years with the advent of molecular cytogenetic techniques. Here, we review various gene dosage methods such as FISH, PCR-based approaches (MLPA, QF-PCR, QMPSF and real time PCR), CGH and array-CGH, that can be used for the identification and delineation of copy-number changes for diagnostic purposes. Besides comparing their relative strength and weakness, we will discuss the impact that these detection methods have on our understanding of copy number variations in the human genome and their implications in genetic counseling.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

#### Résumé

La cytogénétique est la branche de la génétique qui a pour objet l'étude des chromosomes et vise à identifier des anomalies chromosomiques, de nombre ou de structure, impliquées dans des pathologies acquises ou congénitales. Depuis 50 ans, l'étude du caryotype standard connaît un vif succès notamment en cas d'infertilité, de handicap congénital ou de malformations fœtales. Mais l'observation microscopique des chromosomes offre une faible résolution de détection des anomalies, ce qui rend le caryotype standard inadapté à la mise en évidence de remaniements chromosomiques de petite taille. La possibilité de détecter des microremaniements à l'origine d'un déséquilibre génomique est récemment apparue avec l'avènement des techniques moléculaires de la cytogénétique. Dans cette revue sont présentées les diverses approches de quantification génique pouvant être appliquées en diagnostic pour l'identification et la caractérisation d'un déséquilibre génomique, telles que la FISH, les techniques reposant sur une PCR (MLPA, QF-PCR, QMPSF, PCR en temps réel), et la CGH sur métaphases ou sur puces à ADN. En plus de souligner leurs avantages et inconvénients respectifs, nous discutons de l'impact que ces méthodes ont sur notre compréhension des variations du nombre de copies de séquences génomiques dans le génome humain et des implications lors du conseil génétique.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** FISH; PCR-based approaches; CGH; CGH array; Copy-number variations

**Mots clés :** FISH ; Approches par PCR ; CGH ; CGH sur puces ; Variations du nombre de copies de séquences

---

\* Corresponding author.

*E-mail address:* [lgouas@chu-clermontferrand.fr](mailto:lgouas@chu-clermontferrand.fr) (L. Gouas).

## 1. Introduction

Since the first description of a chromosomal abnormality in humans by Lejeune et al. in 1959 [1], chromosome analysis remains one of the genetic tests most commonly realised for diagnostic purposes in a wide variety of indications in obstetrics and gynecology, pediatrics and oncology. Since the last 50 years, standard karyotyping has successfully identified numerical (aneuploidies) and structural (deletions, duplications, translocations) chromosome aberrations in reproductive failure [2], fetal development abnormalities [3], mental retardation and/or congenital malformations [4]. Highly reliable for identifying entire chromosome aneuploidy as well as large chromosomal rearrangements, microscopic karyotype banding analysis is, however, limited to 5–10 Mb of resolution, depending on the quality of chromosome preparations.

A further and important limitation of this technique is the need for cell culture for around three days for blood samples and 1–2 weeks for fetal samples to obtain an adequate number of dividing cells for metaphase analysis. The time interval around 14 days between the collection of a prenatal sample and the reporting of karyotype results represents a time of great anxiety for parents, particularly during a high-risk pregnancy.

These two major limitations lead to the development of more rapid and resolute techniques. Recently, molecular cytogenetic techniques have allowed the identification of gene dosage alterations involving chromosome segments smaller than 5 Mb. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with locus-specific probes has been used to detect imbalances involved in microdeletion syndromes [5] or subtelomeric genomic rearrangements in patients with idiopathic mental retardation [6]. Furthermore, genome wide screening techniques such as comparative genomic hybridization (CGH) on metaphase chromosomes and more recently, array-based CGH, as well as several PCR-based approaches as quantitative multiplex PCR of short fragments (QMPSF), quantitative fluorescent PCR (QF-PCR), multiplex ligation probe amplification (MLPA), and real-time quantitative PCR (real-time qPCR) have been developed to detect gene dosage alterations in a variety of prenatal and postnatal disorders.

In this review, the principle of each technique will be described and their relative strength and weakness will be discussed. Then, the impact that these detection methods have on our understanding of copy number variations in the human genome and their implications in genetic counseling will be discussed.

## 2. Fish

FISH is a molecular cytogenetic technique in which fluorescently labeled DNA probes are hybridized to metaphase spreads or interphase nuclei. A variety of probe types is available and enables for the detection of aneuploidy and chromosome rearrangements. Particularly, locus-specific probes can be used to detect gene copy-number changes that are not generally detectable by classical cytogenetics in individuals diagnosed with a microdeletion syndrome. Indeed, FISH

allowed the identification of microdeletions and microduplications in submicroscopic chromosomal regions in individuals with developmental delay and mental retardation [7]. FISH was also widely useful for acquired chromosomal abnormalities detection: gene amplification (such as *HER2* in breast cancer) or deletion (such as *p53* or *ATM* in chronic lymphocytic leukemia) are prognosis markers and response to treatment indicators [8,9].

A locus-specific probe set has been developed to simultaneously explore the entire subtelomeric chromosomal regions in humans [10–12]. These subtelomere region-specific FISH probes have further led to the identification of terminal chromosomal abnormalities in 5% of the patients with idiopathic mental retardation [6,13].

FISH is extremely useful in identifying suspected chromosomal abnormalities, since these regions can be analysed with a high specificity.

However, FISH testing has several limitations. Locus-specific probes are expensive, the procedure is significantly time-consuming when using the set of subtelomere probes, and tandem microduplications may be undetected as a result of the limited resolution on metaphase spreads. Mainly, the identification of an abnormality depends on the DNA probe used, specifically on its size and hybridization localization. Indeed, small rearrangements may be missed by relatively large BAC- or PAC-probes, and some patients with atypical microdeletion/microduplication may yield normal FISH findings due to the mapping of the abnormality outside the area covered by the FISH probe. Consequence is that some patients with very small or atypical deletions/duplications will be undiagnosed by FISH testing. As example, the currently accepted clinical laboratory assay for 22q11 DiGeorge uses the TUPLE1 FISH probe, which is located within a typically deleted region of approximately 3 Mb. This assay can detect the majority of affected patients (85–90%), however, many patients with phenotypic features of 22q11 syndrome have no deletion detectable by FISH testing, and deletions that map outside the area covered by the TUPLE1 probe have been described [14,15].

Another limitation of FISH is the restrained number of chromosomal loci that can be screened in a single reaction and the requirement of high quality metaphase spreads. Thus, FISH can be efficiently used to screen for a specific rearrangement but is not suitable for high through-put diagnostic screening.

## 3. PCR based approaches

### 3.1. QF-PCR

QF-PCR methods consist of an amplification of genomic DNA sequences by PCR using fluorescent primers. The PCR products can then be visualized and quantified as peak height or area using an automated DNA sequencer and appropriate softwares. Peak heights or areas generated from the DNA of patients are generally compared to those obtained from a normal DNA. Two main QF-PCR approaches have been developed:

- the amplification of chromosome-specific, repeated DNA sequences known as short tandem repeats (STRs);
- the amplification of short exonic sequences (QMPSF).

### 3.1.1. QF-PCR of STRs

Short tandem repeats are stable and polymorphic, i.e., they vary in length between subjects, depending on the number of times the tri-, tetra- or penta-nucleotides are repeated. The less frequent tetranucleotide repeats have been used to investigate specific chromosomes disorders in view of their polymorphism and stability during the life of an individual [16].

On the assumption that, within the early exponential phase of PCR amplification, the amount of specific STR produced is proportional to the quantity of the initial target sequence, PCR should be performed with a limited number of cycles [17]. The optimal number of cycles must be evaluated in order to obtain, in heterozygous normal subjects, two peaks of equal fluorescent activity corresponding to the presence of two different alleles at one locus. If the STR marker is highly polymorphic, few normal subjects should be homozygous and show one peak. DNA amplified from subjects who are trisomic will exhibit either two peaks (being diallelic), one of them being twice as large or high as the other, or an extra peak (being triallelic). Samples that are diallelic, containing two peaks with area/height ratios of the shorter and the longer allele within the range 0.8–1.4, are considered to be normal. In contrast, diallelic samples with ratios  $< 0.65$  or  $> 1.8$ , are considered to be trisomic.

Initial studies analyzed one marker at a time, but several reports described the development of multiplex assays in which 4–12 markers were co-amplified [18]. Quantitative fluorescence PCR of STRs is mainly used for rapid and simple diagnosis of aneuploidy, including trisomy 21, 13 and 18 and sex chromosome abnormalities. The first QF-PCR of STRs application involved X chromosome aneuploidy [19]. A number of reports on large series have shown the high reliability and reproducibility of the QF-PCR assay [20–22]. However, some difficulties may come from the X chromosome testing. When STRs specific for chromosome X are used, some sample from normal XX females may show homozygous patterns, indistinguishable from those produced by sample with a single X, as in Turner syndrome. Analyzing additional X-chromosome markers would reduce the likelihood of homozygosity. Furthermore, potential sources of errors must be taken into consideration when interpreting the QF-PCR results. For example, a single nucleotide polymorphism (SNP) located within the sequence covered by the primers may produce a null allele, leading to the false interpretation of a monosomy.

One advantage of QF-PCR over FISH is the possibility to detect maternal cell contamination of fetal samples. A characteristic pattern with extra alleles or skewed ratios between peaks for the target chromosomes would be seen. QF-PCR is capable of identifying autosomal mosaicism, where the trisomy is present in more than 10% of in vitro cultured cells [23,24]. Furthermore, the QF-PCR test allows the determination of the maternal or paternal origin of chromosome aneuploidies, and whether they occurred at meiosis I or II.

### 3.1.2. QMPSF

QMPSF is a semi-quantitative method based on a multiplex PCR of short exonic sequences. The assay consists of a simultaneous amplification by PCR, in a limited number of cycles, of short exonic fragments ( $< 300$  pb) in a single tube, using dye-labelled primers. As for QF-PCR of STRs, the PCR is performed with a limited number of cycles so that DNA yield generated in the exponential step may be comparable between different samples, and short DNA fragments are amplified to reduce the difference in efficiency between each amplification of the assay. Moreover patented “tags” may be added at the 5' end of sense and antisense primers, so that it makes homogeneous the difference in melting temperatures ( $T_m$ ) between the various hybridization segments used in multiplex (Patent WO/2004/009846). An additional fragment, corresponding to the exon of another gene not involved in the critical regions, is coamplified as a control. After PCR, amplicons are size differentiated by capillary electrophoresis. Electrophoregrams from patients are superimposed to those generated from a normal control DNA by adjusting to the same level the peaks obtained for the control amplicon. Then, the heights of the peaks corresponding to the regions to be explored are compared between the patient samples and the control DNA, and quantitative changes are simply detected by an increase or decrease of the corresponding fluorescent peaks.

QMPSF was developed in 2000 by Charbonnier et al. for the detection of deletions and duplications of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome, and has been used to screen for genomic dosage variations in genes like CFTR [25]. More recently, comparison of a QMPSF method with FISH for the assessment of the four aneuploidies commonly evaluated in chronic lymphocytic leukemia patients (namely deletions of the 11q22, 13q14, 17q13 regions and trisomy 12) demonstrated that QMPSF was a cost-effective method perfectly adapted to the detection of primary defect [26]. Saugier-Verber et al. validated the application of QMPSF to explore simultaneously 12 candidate loci known to be the target of genomic rearrangements and involved in mental retardation [27]. Thus, QMPSF has been shown to be a sensitive method for the detection of both deletions and duplications and was recently used to validate copy-number change variations (CNVs) detected in the human genome by array CGH [28].

QMPSF is a rapid and relatively cheap method to detect genomic rearrangements. Furthermore, QMPSF is a one step assay, i.e., PCR amplification before capillary electrophoresis. This feature has the advantage to minimize the risk of sample crosscontamination and should facilitate full automation of the assay. Furthermore, the flexibility of the QMPSF method will allow the gradual integration of new candidate loci recognised as deleted or duplicated in pathologies. This flexibility also considerably facilitates, in each patient harbouring a rearrangement, the delineation of the boundaries.

Conversely, a single QMPSF reaction contains no more than 15–20 targets, and it is unclear whether this number might be increased without affecting the sensitivity of the assay. As for QF-PCR, potential misinterpretation of QMPSF may result

from the presence of a SNP or a single point mutation in sequences covered by the primers.

Because this method is based on the comparison of electrophoregrams and is not quantitative, the critical point is the quality of the DNA, which is demonstrated by the fact that sometimes electrophoregrams generated from DNA extracted according different methods could not be superimposed.

### 3.2. MLPA

MLPA was first described in 2002 by Shouten et al. and was designed to detect gene dosage abnormalities in a wide range of conditions by the relative quantification of up to 45 different DNA sequences in one reaction [29].

In contrast to QF-PCR of STRs and QMPSF, it is not genomic sequences but the probes added to the samples that are amplified and quantified. Each MLPA probe consists of two oligonucleotide hemiprobes, one synthetic and one derived from the single-stranded bacteriophage M13. These oligonucleotides hybridize to adjacent sites of the target sequence. Each hemiprobe has a universal primer sequence on one end and one has a stuffer sequence that leads to PCR products with different and unique length. Once hybridized, the two hemiprobes are joined by a ligase, and the probe can then be amplified by PCR. The ligation products are PCR amplified using a single universal dye-labelled primer pair and PCR products of unique size (130–480 bp) can be then separated by capillary electrophoresis. The relative quantity of each of the PCR products is proportional to the number of copies of target sequence. Results are given as allele copy numbers as compared to normal controls: a ratio of about 1 is obtained if both alleles are present, a ratio of about 0.5 if one allele is absent and a ratio of about 1.5 if one allele is duplicated.

Many studies have shown that subtelomeric aberrations are a significant cause of idiopathic moderate to severe mental retardation, and subtelomeric FISH probes are the most commonly used technique in detecting such abnormalities [12]. However, the use of a complete set of subtelomeric FISH probes is laborious, time-consuming and costly. Several laboratories have therefore developed the MLPA strategy to explore subtelomeric regions in patients with mental retardation [30]. Recent studies have also assessed the use of MLPA with subtelomeric probe mixtures in spontaneous miscarriages and have confirmed the use of this approach to detect aneuploidy and unbalanced terminal chromosomal rearrangements in miscarriages [31,32]. Prenatal detection of aneuploidy involving chromosome 13, 18, 21, X and Y by MLPA with the appropriate probe mixture has also been reported. It was concluded that aneuploidy screening in uncultured amniocytes by MLPA was feasible in a clinical diagnostic setting [33–35].

Many other commercial kits for MLPA assays are available from MRC Holland and have a variety of applications including detection of mutations [36] and single nucleotide polymorphisms [37], analysis of DNA methylation [38], relative mRNA quantification [39], chromosomal characterisation of cell lines and tissue samples [40], detection of duplications and deletions in human cancer predisposition genes such as *BRCA1*, *BRCA2*,

*hMLH1* and *hMSH2* [41]. A comparison of MLPA and FISH combined with automated spot counting in detection of *HER2* amplification in breast carcinomas revealed that the overall concordance of detection of *HER2* gene amplification was 98%: MLPA is then a reliable and reproducible technique and can be used as an either alternative or additional test to determine *HER2* status in breast carcinomas [42].

MLPA has rapidly gained acceptance in genetic diagnostic laboratories due to its simplicity and high sensitivity compared to other methods, relatively low cost, capacity for reasonably high throughput and its robustness. For example, MLPA allows the relative quantification of up to 46 different DNA targets in a single reaction with results typically available after 2–3 days, and is particularly less labour-intensive than subtelomeric FISH.

However, MLPA encompasses some limitations. One of these is its inability to detect maternal cell contamination and ploidy changes. Another one is that MLPA reactions are more sensitive to contamination and PCR inhibitors such as small remnants of phenol and could explain the failure of some assays. Furthermore, point mutations or SNP which lie close to the ligation site of a MLPA probe may affect the efficient ligation of the probe, leading to an apparent reduced relative peak height and a potential misinterpretation.

The presence of CNVs throughout the genome has been widely demonstrated [28,43,44]. When analysing subtelomeric regions with two different dedicated MLPA probe mixtures, positive results, obtained with only one of the two probes, are more likely to be considered as CNVs. Thus, the existence of subtelomeric copy number polymorphisms renders testing samples with two probe mixtures indispensable (P036D, P070). Nevertheless, in addition to comparing the results with those of the parents, techniques such as FISH, QF-PCR, QMPSF, or quantitative real-time PCR should be employed in order to confirm MLPA results.

### 3.3. Real-time qPCR

Real-time qPCR-genotyping relies on the fact that the fractional cycle number (Ct), at which the amount of an amplified target (amplicon) reaches a fixed threshold, is directly related to the amount of starting target [45,46]. A higher or lower starting copy number of the genomic DNA target will result in a significant earlier or later increase in fluorescence, respectively, and thus, in a decreased or increased Ct. The accumulation of PCR product can be monitored by staining using different detection systems, either based on hybridization probes such as TaqMan [46–48], Scorpions [49], FRET probes [50], or on intercalation by fluorescent dyes, such as the ds-DNA binding dye SYBR Green I (Roche Diagnostics) [51–53]. Real-time qPCR experiments are performed in a thermal cycler that incorporates an optical system for excitation of fluorochromes and monitoring of emitted wavelengths of light.

Use of intercalating dyes, while economical, poses the risk that fluorescence signals could be due to non-specific double-stranded product. Fluorescent probes reduce that risk and offer the prospect of multiplexing through the use of more than one

fluorochrome. Nevertheless, given that the synthesis of fluorescence-labelled probes is still a major cost factor, the use of a general detection method is of great benefit. The SYBR Green I-based quantification is a method of choice to combine the sensitivity, accuracy, and reproducibility of real-time qPCR, with the low cost, simplicity, and flexibility of the SYBR Green I detection [54].

Some investigations using real-time qPCR for the detection of chromosomal deletions and duplications have been reported. Weksberg et al. presented a real-time qPCR approach for the detection of chromosomal microdeletions and microduplications at cytoband 22q11 in patients with Velocardiofacial Syndrome [55], and some reports have shown the sensitivity of real-time qPCR in detecting subtelomere chromosomal rearrangements [56,57]. Real-time qPCR was also proven to be a valuable method for the analysis of single copy genes [58–60]. Furthermore, real-time qPCR may also be helpful in malignancies to identify amplification, such as *IL-6* gene which is amplified and overexpressed in human glioblastomas [61].

Real-time qPCR offers a number of potential advantages over other systems. Real-time qPCR provides a mean for continuous detection of products throughout the amplification process, and as such can dispense with a gel separation stage, thus saving substantial technical time, and operate in a closed system, eliminating the danger of PCR contamination and sample crosscontamination. The use of SYBR Green I dye for the detection of PCR-products allows the use of conventional and low-cost oligonucleotides for the amplicon design and the primer-set can easily be extended without any technical restriction to perform gene dosage measurement of a specific chromosomal region or detailed molecular characterization of deletion/translocation breakpoints. However, the existence of repetitive and genome-wide amplified elements may be problematic in narrowing down the resolution of deletions/translocation breakpoint-mapping.

However, real-time qPCR presents disadvantages too. Using hybridization probes, the number of loci that can be analysed in a single tube is currently restricted by fluorescence profiles and by optical properties of hardware to four or less. Thus, in applications where multiple loci have to be examined, this could be done only in multiple reactions. The cost of probes could also become prohibitive in some applications. While highly sensitive to demonstrate 3:2 dosage differences, the real-time qPCR sensitivity is limited in mosaic cases, where it will probably failed to detect low-grade mosaicism.

#### 4. CGH

CGH is a molecular cytogenetic technique in which differentially fluorescently labelled patient and reference whole-genomic DNA are hybridized on control metaphase chromosome slides. For each chromosome, a ratio value of the fluorescence intensity is generated from five to 20 metaphase spreads. Thus, differential hybridization signals allow the detection of unbalanced gains and losses of chromosomal material across the whole genome [62–64]. CGH has been useful for the analysis of chromosomal imbalances in solid

tumours. Recurrent patterns of gains and losses have been observed in the malignant tissue from numerous human cancers [65–68]. Although the size resolution of CGH is lowest near the telomeres, the technique has allowed detecting unbalanced translocations not detectable on standard karyotype in patients with idiopathic mental retardation and dysmorphic feature [69,70]. Thus, CGH may be realised in routine for patients with a variety of conditions for whom no chromosomal aberrations have been previously detected by karyotype and/or specific FISH probes. Nevertheless, CGH is limited by a resolution of 3–10 Mb and aberrations with smaller size will not be detected.

#### 5. Array-based CGH

A new molecular cytogenetic technique, array CGH analysis, has recently been developed. Although based on the same principle as conventional CGH, array CGH differs in that genomic clones from selected regions of the genome replace the normal control metaphases as the target DNA [71,72]. Since genomic clones are used as the target DNA, the resolution of the technique is theoretically increased and depends on the size and the density of target DNA. Therefore, rearrangements that are not visible by conventional CGH can be detected.

Targets for array CGH can be large insert clones (cosmid, P1, PAC, BAC) [71] or oligonucleotides [73]. Lower-density array with BAC clones were first used since targeted clones were currently implicated in cytogenetics diagnosis. This was the first generation array CGH which only contains 287 clones unevenly distributed on the genome. This array was able to screen all human subtelomere regions, microdeletion syndromes, oncogenes and tumor suppressor genes [74]. Array CGH covering a whole chromosome [75], a chromosome segment [76], all subtelomeric regions [77], or the entire genome at a 1 Mb [78] and at a 10–100 Kb resolution level [79] were also developed. Array with overlapping clones, named tiling path arrays, have also been constructed.

Array CGH has been successfully utilized to identify amplifications and deletions in numerous malignancies [80] and in constitutional disorders [77,81–83].

One of the first applications of array CGH was to screen for subtelomeric rearrangements in patients with developmental disorders [77,84]. Then, several studies validated array CGH to detect cryptic chromosome imbalances by using positive controls with well-known and characterized anomalies [85–87]. Array CGH is also useful to map and delineate precisely the size and breakpoints of chromosomal aberrations. Using this approach, cryptic deletions or duplications were identified in patients with de novo apparently balanced chromosome rearrangements. Array CGH results also permit to describe a 5 Mb critical region on chromosome 18q22.3-q23 in congenital aural atresia [88]. Furthermore, by identifying a recurrent deleted region in patients with CHARGE syndrome, array CGH has made possible to identify the *CHD7* gene as causal after loss of function mutations were described in this gene [89].

Development of array CGH in routine for screening in haematological disorders is increasing: for example, a targeted DNA microarray for clinical evaluation of recurrent abnormalities in chronic lymphocytic leukemia (CLL) has been recently validated. The author's results suggest that a subset of potentially significant genomic alterations in this pathology is being missed by FISH. Furthermore, this pilot study clearly showed the robustness, high sensitivity, and high specificity for the targeted CLL microarray analysis [90].

The main advantage of array CGH is the ability to explore hundreds or thousands of discrete loci in a single assay and to detect any DNA dosage imbalance including aneuploidies, deletions and duplications with a resolution much higher than karyotype and conventional CGH.

However, array CGH could not characterize the structural configuration of the abnormal chromosomes, particularly, the order and orientation of the rearranged segments. Furthermore, array CGH is unable to detect polyploidies, and low-level mosaicism may be difficult to detect. But the major limitation of array CGH is interpretation difficulties. Most of the false negative results may be due to technical problems resulting from poor hybridization or imperfect coverage of the genomic region of interest [91]. Due to the risk of false positive results, CNVs detected by array CGH should be validated with another technique such as FISH, QMPSF or real-time qPCR. A replicate dye-swap experiment where fluorochromes are inverted between patient and control has been proposed to decrease the number of false positive results [91,92]. Interpretation difficulties result also from the presence of CNVs with unclear clinical significance in the human genome. Depending on the resolution and representation of the genome of the microarray, CNVs may be frequently found. For example, in a report of 100 children with mental retardation using a high-density oligonucleotide array, 11 were found to have de novo copy-number changes that were considered to be clinically relevant. But, on average, 30 CNVs were detected in every child of the study [93]. A better knowledge of these polymorphisms would be required before applying array CGH in a diagnostic setting. In this view, several databases have been initiated, like the DECIPHER database (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>) and database of genomic variants (<http://projects.tcga.ca/variation/>), in order to list and map genomic polymorphic segments.

## 6. Discussion

The considerable gap in resolution between traditional cytogenetic techniques (megabase pairs) and molecular biology techniques (base pairs) has been closed to a large extent by molecular cytogenetic techniques. Indeed, a wide range of methods are now available for gene dosage measurement in cytogenetic purposes, such as FISH, QF-PCR, QMPSF, MLPA, CGH and more recently array CGH. Except for FISH, these methods were proven to be more rapid, resolute and less labour-intensive than conventional karyotyping.

While FISH, QF-PCR, QMPSF, MLPA and CGH have been validated with large series of patients and are currently implemented in diagnostic laboratories due to their low-cost and simplicity, high-resolution array CGH need further evaluation before its transfer in a routine clinical setting. In particular, the major difficulty will be in prenatal diagnosis because in the absence of a perfect knowledge of the phenotype to which the copy number alteration could be correlated, the array results would be less informative and would provoke anxiety to the parents.

The development of these molecular cytogenetic technologies has increased the ways to detect chromosomal abnormalities in pre- and postnatal disorders. These technologies have improved the detection rate of genomic imbalances as a causative factor in different disorders, such as in moderate to severe mental retardation with or without dysmorphism [70,94], and the description of new chromosomal disorders.

However, the high-resolution of some of these techniques raises the issues of interpretation difficulties, particularly when discriminating between pathologic and benign copy-number alterations. Clinical significance of an aberration may depend on different criteria:

- the previous identification of the abnormality in an individual with the same phenotype;
- the de novo origin;
- the size of the aberration, larger imbalances are more likely to be pathogenic.

However some examples showed the complexity of the relationship between chromosomal imbalances and the phenotype. Cytogenetically visible imbalances (> 5 Mb) were detected in phenotypically normal parents of probands [95,96] and de novo detected aberrations may represent de novo occurrence of a CNV, even if the frequency of de novo CNVs is unknown. Furthermore, one has to consider that a chromosomal abnormality may also be of clinical significance even though it has been inherited from a healthy parent because more complex mechanisms such as phenotypic variation, incomplete penetrance, effect of imprinted genes, position effect or a point mutation in a recessive gene may be involved.

Our understanding of benign and pathogenic genomic variation is still in its infancy, and publicly available databases, such as DECIPHER and database of genomic variants will be helpful in assessing the potential involvement of CNVs in identified alterations. Moreover, a careful phenotypic assessment and literature search would help to evaluate the clinical relevance of chromosomal abnormalities detected by these techniques. Further research into the discovery and characterization of human CNVs is needed to develop more comprehensive human genetic variation maps and to facilitate more accurate interpretations of the clinical impact of genomic imbalances. This will help clinicians in the genetic counseling and to implement the use of high-resolution, genome-wide array CGH assays not only for diagnosing genetic disorders in individuals with dysmorphism and developmental delay but also for prenatal genetic diagnosis.

## References


- [1] Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Étude des chromosomes somatiques de neufs enfants mongoliens. *C R Acad Sci* 1959;248:1721–2.
- [2] Abeliovich D, Potashnik G, Dar H, Lugasi N, Rave D. Chromosomal rearrangements in three infertile men. *Andrologia* 1986;18(2):147–51.
- [3] Autti-Ramo I, Makela M. Screening for fetal abnormalities: from a health technology assessment report to a national statute. *Int J Technol Assess Health Care* 2007;23(4):436–42.
- [4] Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17(3):182–92.
- [5] Malcolm S. Microdeletion and microduplication syndromes. *Prenat Diagn* 1996;16(13):1213–9.
- [6] Flint J, Knight S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(3):310–6.
- [7] Ligon AH, Beaudet AL, Shaffer LG. Simultaneous, multilocus FISH analysis for detection of microdeletions in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. *Am J Hum Genet* 1997; 61(1):51–9.
- [8] Tubbs RR, Hicks DG, Cook J, Downs-Kelly E, Pettay J, Hartke MB, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of *HER2* status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience. *Diagn Mol Pathol* 2007;16(4):207–10.
- [9] Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006;108(9):3152–60.
- [10] A complete set of human telomeric probes and their clinical application. National Institutes of Health and Institute of Molecular Medicine Collaboration. *Nat Genet*. 1996, 14(1): 86–9.
- [11] De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij C. Arts Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003;40(6): 385–98.
- [12] Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, et al. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 2000;67(2):320–32.
- [13] Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999;354(9191):1676–81.
- [14] Kurahashi H, Tsuda E, Kohama R, Nakayama T, Masuno M, Imaizumi K, et al. Another critical region for deletion of 22q11: a study of 100 patients. *Am J Med Genet* 1997;72(2):180–5.
- [15] Amati F, Conti E, Novelli A, Bengala M, Diglio MC, Marino B, et al. Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet* 1999;7(8): 903–9.
- [16] 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.
- [17] Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl* 1992;2(1):1–9.
- [18] Voglino G, Marongiu A, Massobrio M, Campogrande M, Todros T. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies. *Lancet* 2002;359(9304):442.
- [19] Lubin MB, Elashoff JD, Wang SJ, Rotter JI, Toyoda H. Precise gene dosage determination by polymerase chain reaction: theory, methodology, and statistical approach. *Mol Cell Probes* 1991;5(4):307–17.
- [20] Adinolfi M, Sherlock J, Pertl B. Rapid detection of selected aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Bioessays* 1995;17(7):661–4.
- [21] Chen CP, Chern SR, Wang W. Rapid determination of zygosity and common aneuploidies from amniotic fluid cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction following genetic amniocentesis in multiple pregnancies. *Hum Reprod* 2000;15(4):929–34.
- [22] Bili C, Divane A, Apessos A, Konstantinos T, Apostolos A, Ioannis B, et al. Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 2002;22(5):360–5.
- [23] Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 2001;358(9287):1057–61.
- [24] Cirigliano V, Sherlock J, Conway G, Quilter C, Rodeck C, Adinolfi M. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 1999;19(12):1099–103.
- [25] Ferec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek Jr M, Bienvenu T, Holubova A, et al. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet* 2006;14(5):567–76.
- [26] Bastard C, Raux G, Fruchart C, Parmentier F, Vaur D, Penther D, et al. Comparison of a quantitative PCR method with FISH for the assessment of the four aneuploidies commonly evaluated in CLL patients. *Leukemia* 2007;21(7):1460–3.
- [27] Saugier-Verber P, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, de La Rochebrochard C, Layet V, Drouot N, et al. Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2006;14(9):1009–17.
- [28] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;444(7118):444–54.
- [29] 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.
- [30] Lam AC, Lam ST, Lai KK, Tong TM, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem* 2006;39(3):196–202.
- [31] Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A* 2006;140(24):2786–93.
- [32] Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, et al. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn* 2007;27(8):765–71.
- [33] Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet* 2003;40(12):907–12.
- [34] Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Larsen GV, Schwartz M, Lundsteen C. Computer-assisted prenatal aneuploidy screening for chromosome 13, 18, 21, X and Y based on multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Eur J Hum Genet* 2005;13(2):171–5.
- [35] Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, Vossebeld-Hoff I, Jansen R, van der Luijt RB, et al. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn* 2005;25(11):1032–9.
- [36] Scala E, Longo I, Ottimo F, Speciale C, Sampieri K, Katzaki E, et al. MECP2 deletions and genotype-phenotype correlation in Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 2007;143(23):2775–84.
- [37] Volikos E, Robinson J, Aittomaki K, Mecklin JP, Jarvinen H, Westerman AM, et al. LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 2006;43(5):e18.
- [38] Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* 2006;52(7):1276–83.
- [39] Wehner M, Mangold E, Sengteller M, Friedrichs N, Aretz S, Friedl W, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in *MSH2* and *MLH1* genes. *Eur J Hum Genet* 2005;13(8): 983–6.
- [40] Wilting SM, Snijders PJ, Meijer GA, Ylstra B, van den Ijssel PR, Snijders AM, et al. Increased gene copy numbers at chromosome 20q are frequent in both squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *J Pathol* 2006;209(2):220–30.

- [41] Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 2004;91(6):1155–9.
- [42] Moerland E, van Hezik RL, van der Aa TC, van Beek MW, van den Brule AJ. Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) combined with automated spot counting. *Cell Oncol* 2006;28(4):151–9.
- [43] Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005;77(1):78–88.
- [44] de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005;77(4):606–16.
- [45] Poropat RA, Nicholson GA. Determination of gene dosage at the PMP22 and androgen receptor loci by quantitative PCR. *Clin Chem* 1998;44(4):724–30.
- [46] Wilke K, Duman B, Horst J. Diagnosis of haploidy and triploidy based on measurement of gene copy number by real-time PCR. *Hum Mutat* 2000;16(5):431–6.
- [47] Shadrina MI, Semenova EV, Slominsky PA, Bagyeva GH, Illarioshkin SN, Ivanova II S, et al. Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (*PARK2*) exon 1–12 dosage. *BMC Med Genet* 2007;8(6).
- [48] Tsujie T, Takemura M, Kimura T, Shimoya K, Tsutsui T, Ogita K, et al. Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Obstet Gynaecol Res* 2006;32(4):368–72.
- [49] Solinas A, Brown LJ, McKeen C, Mellor JM, Nicol J, Thelwell N, et al. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res* 2001;29(20):E96.
- [50] Shengqi W, Xiaohong W, Suhong C, Wei G. A new fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique. *Anal Biochem* 2002;309(2):206–11.
- [51] Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 2000;6:178–83.
- [52] Hiratsuka M, Kishikawa Y, Narahara K, Inoue T, Hamdy SI, Agatsuma Y, et al. Detection of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphisms using real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis with SYBR Green I on a GeneAmp 5700. *Anal Biochem* 2001;289(2):300–3.
- [53] Karsai A, Muller S, Platz S, Hauser MT. Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques* 2002;32(4):790–2. 4–6.
- [54] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(9):1026–30.
- [55] Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 2005;6(180).
- [56] Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat* 2004;23(4):368–78.
- [57] Sauter SM, Bohm D, Bartels I, Burfeind P, Laccone FA, Neesen J, et al. Partial trisomy of distal 19q detected by quantitative real-time PCR and FISH in a girl with mild facial dysmorphism, hypotonia and developmental delay. *Am J Med Genet A* 2007;143(10):1091–9.
- [58] Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time light-Cycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70(2):358–68.
- [59] Anhof D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K. Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat* 2003;22(1):74–8.
- [60] Laccone F, Junemann I, Whatley S, Morgan R, Butler R, Huppke P, et al. Large deletions of the *MECP2* gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome. *Hum Mutat* 2004;23(3):234–44.
- [61] Tchirkov A, Rolhion C, Bertrand S, Dore JF, Dubost JJ, Verrelle P. *IL-6* gene amplification and expression in human glioblastomas. *Br J Cancer* 2001;85(4):518–22.
- [62] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258(5083):818–21.
- [63] Kirchoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001;38(11):740–4.
- [64] Giollant M, Bertrand S, Verrelle P, Tchirkov A, du Manoir S, Ried T, et al. Characterization of double minute chromosomes' DNA content in a human high grade astrocytoma cell line by using comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1996;98(3):265–70.
- [65] Ried T, Liyanage M, du Manoir S, Heselmeyer K, Auer G, Macville M, et al. Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* 1997;75(11–12):801–14.
- [66] Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997;13(10):405–9.
- [67] Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, et al. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 1999;155(3):683–94.
- [68] Zitzelsberger H, Lehmann L, Werner M, Bauchinger M. Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* 1997;108(4–5):403–17.
- [69] Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL, Crow YJ, Trainer AH, Connor JM. A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 1998;35(3):225–33.
- [70] Schoumans J, Anderlid BM, Blennow E, Teh BT, Nordenskjold M. The performance of CGH array for the detection of cryptic constitutional chromosome imbalances. *J Med Genet* 2004;41(3):198–202.
- [71] Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20(2):207–11.
- [72] Snijders AM, Nowak N, Seagraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001;29(3):263–4.
- [73] Jobanputra V, Sebat J, Troge J, Chung W, Anyane-Yeboah K, Wigler M, et al. Application of ROMA (representational oligonucleotide microarray analysis) to patients with cytogenetic rearrangements. *Genet Med* 2005;7(2):111–8.
- [74] Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, et al. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 2005;42(2):121–8.
- [75] Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies *CYP24* as a candidate oncogene. *Nat Genet* 2000;25(2):144–6.
- [76] Van Buggenhout G, Melotte C, Dutta B, Froyen G, Van Hummelen P, Marynen P, et al. Mild Wolf-Hirschhorn syndrome: micro-array CGH analysis of atypical 4p16.3 deletions enables refinement of the genotype-phenotype map. *J Med Genet* 2004;41(9):691–8.
- [77] Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merks G, van Cleef B, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002;70(5):1269–76.
- [78] Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36(4):361–74.
- [79] Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, et al. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 2003;13(10):2291–305.

- [80] Paris PL, Albertson DG, Alers JC, Andaya A, Carroll P, Fridlyand J, et al. High-resolution analysis of paraffin-embedded and formalin-fixed prostate tumors using comparative genomic hybridization to genomic microarrays. *Am J Pathol* 2003;162(3):763–70.
- [81] Gunn SR, Mohammed M, Reveles XT, Viskochil DH, Palumbos JC, Johnson-Pais TL, et al. Molecular characterization of a patient with central nervous system dysmyelination and cryptic unbalanced translocation between chromosomes 4q and 18q. *Am J Med Genet A* 2003;120(1):127–35.
- [82] Ki A, Rauén KA, Black LD, Kostiner DR, Sandberg PL, Pinkel D, et al. Ring 21 chromosome and a satellited 1p in the same patient: novel origin for an ectopic NOR. *Am J Med Genet A* 2003;120(3):365–9.
- [83] Albertson, D.G., D. Pinkel Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet*, 2003, 12 Spec No 2(R145–52).
- [84] Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, et al. Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 2004;41(2):130–6.
- [85] Shen Y, Miller DT, Cheung SW, Lip V, Sheng X, Tomaszewicz K, et al. Development of a Focused Oligonucleotide-Array Comparative Genomic Hybridization Chip for Clinical Diagnosis of Genomic Imbalance. *Clin Chem* 2007.
- [86] Miura S, Miura K, Masuzaki H, Miyake N, Yoshiura K, Sosonkina N, et al. Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J Hum Genet* 2006;51(5):412–7.
- [87] Ballif BC, Hornor SA, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Rorem EA, et al. Development of a high-density pericentromeric region BAC clone set for the detection and characterization of small supernumerary marker chromosomes by array CGH. *Genet Med* 2007;9(3):150–62.
- [88] Veltman JA, Jonkers Y, Nuijten I, Janssen I, van der Vliet W, Huys E, et al. Definition of a critical region on chromosome 18 for congenital aural atresia by arrayCGH. *Am J Hum Genet* 2003;72(6):1578–84.
- [89] Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004;36(9):955–7.
- [90] Patel A, Kang SH, Lennon PA, Li YF, Rao PN, Abruzzo L, et al. Validation of a targeted DNA microarray for clinical evaluation of recurrent abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007.
- [91] Lapierre JM, Sanlaville D, Kang J, Ozilou C, Le Lorc'h M, Waill MC, et al. A preliminary study to assess the value of the DNA chips SpectralChip to detect subtle constitutional chromosome imbalances. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004;62(2):203–12.
- [92] Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003;73(6):1261–70.
- [93] Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006;79(3):500–13.
- [94] Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandecompele J, Melotte C, et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 2006;43(8):625–33.
- [95] Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M, et al. Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat* 2007;28(10):958–67.
- [96] Hansson K, Szuhai K, Knijnenburg J, van Haeringen A, de Pater J. Interstitial deletion of 6q without phenotypic effect. *Am J Med Genet A* 2007;143(12):1354–7.



# Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells

Stephan Kemeny<sup>1,2</sup> · Christophe Tatout<sup>3</sup> · Gaele Salaun<sup>1,2</sup> · Céline Pebrel-Richard<sup>1,2</sup> · Carole Goumy<sup>1,2</sup> · Natasha Ollier<sup>1,2</sup> · Eugenie Maurin<sup>1,2</sup> · Bruno Pereira<sup>4</sup> · Philippe Vago<sup>1,2</sup> · Laetitia Gouas<sup>1,2</sup> 

Received: 30 May 2017 / Revised: 24 November 2017 / Accepted: 28 November 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

## Abstract

In the interphase cell nucleus, chromosomes adopt a conserved and non-random arrangement in subnuclear domains called chromosome territories (CTs). Whereas chromosome translocation can affect CT organization in tumor cell nuclei, little is known about how aneuploidies can impact CT organization. Here, we performed 3D-FISH on control and trisomic 21 nuclei to track the patterning of chromosome territories, focusing on the radial distribution of trisomic HSA21 as well as 11 disomic chromosomes. We have established an experimental design based on cultured chorionic villus cells which keep their original mesenchymal features including a characteristic ellipsoid nuclear morphology and a radial CT distribution that correlates with chromosome size. Our study suggests that in trisomy 21 nuclei, the extra HSA21 induces a shift of HSA1 and HSA3 CTs out toward a more peripheral position in nuclear space and a higher compaction of HSA1 and HSA17 CTs. We posit that the presence of a supernumerary chromosome 21 alters chromosome compaction and results in displacement of other chromosome territories from their usual nuclear position.

**Keywords** Chromosome territory · Nuclear architecture · Radial arrangement · Trisomy 21 · 3D-FISH

## Introduction

Recent technical advances have brought huge strides in our knowledge and understanding of chromosome organization within the interphase nucleus of eukaryotic cells. Primary structure of the human genome is now well known, while higher-order chromatin structure and its connection to nuclear processes such as DNA replication, DNA repair, RNA processing, and gene regulation is still under intensive investigation (Tashiro and Lanctôt 2015). Three-dimensional

fluorescence in situ hybridization (3D-FISH) has become a major tool for studying genome organization. Using chromosome-specific painting probes, 3D-FISH revealed that chromosomes organize themselves into discrete subdomains called chromosome territories (CTs) (Cremer et al. 2001; Cremer and Cremer 2001; Dunder and Misteli 2001; Parada and Misteli 2002; Gilbert et al. 2004; Khalil et al. 2007). CTs are not randomly organized in the nuclear space (Kozubek et al. 2002; Croft et al. 1999; Cremer and Cremer 2001; Parada and Misteli 2002) and a cell- and tissue-type specific radial positioning has been reported in a number of different eukaryotic cells (Habermann et al. 2001; Croft et al. 1999; Bridger et al. 2000; Boyle et al. 2001; Parada et al. 2004; Tanabe et al. 2005; Mora et al. 2006). The non-randomness of CT organization within an interphase nucleus appeared to be evolutionarily conserved from flies to humans (Tanabe et al. 2002; Foster and Bridger 2005), with some chromosomes preferentially located within the center of the nucleus and others closer to the nuclear periphery. Hence, in spherical nuclei, gene-poor chromosomes are distributed close to the periphery while gene-rich chromosomes are found in more internal positions (Cremer et al. 2003; Murmann et al. 2005; Federico et al. 2006; Küpper et al. 2007), whereas in non-

✉ Laetitia Gouas  
lgouas@chu-clermontferrand.fr

<sup>1</sup> ERTICA EA 4677, Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France  
<sup>2</sup> Service de Cytogénétique Médicale, CHU Estaing, Cytogénétique Médicale, 63003 Clermont-Ferrand, France  
<sup>3</sup> Université Clermont Auvergne, UMR CNRS 6293, INSERM U 1103, Laboratoire de Génétique Reproduction et Développement, 63001 Clermont-Ferrand, France  
<sup>4</sup> CHU Clermont-Ferrand, Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation, 63003 Clermont-Ferrand, France

spherical nuclei, the radial position of CT was more correlated to chromosome size, with large chromosomes located at the periphery and small chromosomes close to the center of the nucleus (Cremer and Cremer 2001; Mayer et al. 2005; Bolzer et al. 2005; Mora et al. 2006). Regulations operating at the higher order of chromatin organization, such as those of CT, are only now being discovered. Interestingly, chromosome rearrangements such as translocations affect CT organization and the transcription of genes near the breakpoint, but also at more distant locations (Harewood et al. 2010). Aneuploidy is another chromosome abnormality that may help strengthen the role of CT organization, but only few reports using this model system have been published so far (Letourneau et al. 2014; Hervé et al. 2016).

Trisomy 21, 18, and 13 are the most frequent aneuploidies in humans and are mainly detected during prenatal screening. Trisomy 21 (T21) or Down syndrome (DS) (MIM 190685) is the leading cause of intellectual deficiency and occurs in one per 800 babies born each year (Roizen and Patterson 2003). It is caused by complete or partial triplication of human chromosome 21 (HSA21). DS patients share characteristic phenotypes, such as cognitive impairment, muscle hypotonia at birth, and dysmorphic features, plus a number of non-specific manifestations for which incidence and severity vary widely from patient to patient, such as congenital heart disease, gastrointestinal defects, and acute lymphoblastic leukemia (Jackson et al. 1976; Kahlem 2006; Gardiner et al. 2010). As DS phenotype was thought to be the result of gene-dosage imbalance, several studies have explored the transcriptome differences between trisomic and disomic cells. In addition to a deregulation of genes located on HSA21, a global misregulation is clearly observed in different cell types in both human and mouse models of DS (FitzPatrick et al. 2002; Li et al. 2006; Potier et al. 2006; Altug-Teber et al. 2007; Conti et al. 2007; Rozovski et al. 2007; Lockstone et al. 2007; Sommer et al. 2007; Chou et al. 2008). Letourneau et al. (2014) recently highlighted the existence of gene expression dysregulation domains (GEDDs) along all chromosomes between trisomic and normal fibroblasts from a pair of monozygotic twins discordant for trisomy 21 (Letourneau et al. 2014). GEDDs are large chromosome domains composed of neighboring genes sharing differential expression profiles and, for most chromosomes, GEDDs of upregulated genes alternate with GEDDs of downregulated genes. The authors proposed that GEDDs could be the result of overexpression of HSA21 genes or the presence of the additional HSA21 in the interphase nucleus. Aberrant nuclear positioning of CT due to chromosomal rearrangements has mainly been investigated in tumor cell lines (Taslerová et al. 2003, 2006; Cremer et al. 2003; Fournier et al. 2010; Harewood et al. 2010), but little is known about the extent to which aneuploidies modify nuclear chromatin higher-order organization. To gain insight on this issue, we investigated whether a supernumerary chromosome

21 impacts 3D organization of trisomic nuclei. The investigation used 3D-FISH analysis, confocal laser scanning microscopy, and 3D distance measurements on morphologically preserved nuclei of disomic and T21 chorionic villus cells. Using this model system, we evaluate the radial distribution of HSA21 as well as 11 disomic chromosomes. To be representative of the whole human genome, the 12 CTs analyzed, which represent up to 51% of the genome, were selected to range from the largest (CT1) to the smallest (CT21) in size and from the highest (CT19) to lowest (CT18) in gene density. Here, we show that cultured chorionic villus cells keep fibroblastic features including global radial distribution of CTs that correlate with chromosome size. We also provide evidences that the size-correlated arrangement of chromosomes is not altered in T21 cells while HSA1 and HSA3 CTs are shifted toward more peripheral positions and HSA1 and HSA17 are more compacted in T21 nuclei.

## Material and methods

### Samples

Cell types used in this study were chorionic villus (disomic and trisomic 21), lymphocytes, and fibroblasts. Lymphocytes were cultured according to standard procedures as part of a cytogenetic diagnosis. Fibroblasts (GM07532) were purchased from the Coriell Institute for Medical Research. Chorionic villus samples were obtained from pregnant women who gave informed consent to use their excess material for research purposes. Samples were collected between 13 and 15 weeks of gestation and were obtained from disomic ( $n=3$ ) and T21 ( $n=6$ ) singleton pregnancies. Samples were chosen in respect with chromosomal sex (two XY and one XX samples for normal pregnancies and three XY and three XX samples for T21 pregnancies). In-sample mesenchymal cells of the villus core were released by mechanical and enzymatic (collagenase/trypsin-EDTA) methods. Potential maternal-cell contamination of female fetus samples was verified by short tandem repeat (STR) analysis (Genome Lab STR Primer Set, Beckman Coulter, Brea, CA). Samples were cultured on Chang Medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and subjected to standard cytogenetic analysis by R-banding and G-banding. The T21 and disomic cells were stored at -80 °C before 3D-FISH.

### Thawing cryopreserved cells

Samples were removed from the liquid nitrogen tank and thawed in a 37 °C water bath until only a small ice pellet remained. Cells were transferred into a sterile centrifuge

tube with 15 mL of RPMI-1640 medium supplemented by 1 mL of fetal calf serum at 37 °C and centrifuged at 500g for 5 min (min) at room temperature. The cell pellets were then quickly resuspended with 5 mL of Complete Cell Culture Media (100 mL AMNIOMAX C100/75 mL AMNIOMAX supplement, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and transferred into T25 culture cell flasks placed in an appropriate incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Only cultures showing normal chorionic villus cell morphology and over 70% confluence were used.

### Transmission electron microscopy

Immediately after culture, chorionic villus cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 h at room temperature, then washed several times in 0.1 M cacodylate buffer. After fixation, the samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) for 1 h. Dehydration, embedding in Epon 812 resin, and polymerization were performed on an Automatic Microwave Tissue Processor for Electron Microscopy (EM AMW, Leica). Ultrathin sections (0.10 µm) were cut by a Leica EM UC6 microtome equipped with a diamond knife, mounted on size-300-mesh copper grids, and stained with 0.5% aqueous uranyl acetate and lead citrate. The grids were then air-dried and examined under a Hitachi H-7650 Transmission Electron Microscope at 120 kV.

### 3D fluorescence in situ hybridization

For in situ hybridization, cells were grown on SuperFrost® glass slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Preparations preserving the 3D structure of the cells were performed as described by Cremer et al. (2008): cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature and fixed with 4% buffered paraformaldehyde (12 min). Permeabilization to facilitate probe penetration was achieved by incubation with 0.01% Triton X-100 for 1 min then with 0.5% TritonX-100 for 15 min, and finally, after equilibration in 20% glycerol/PBS by freezing them four times in liquid nitrogen. After washing again in PBS, cells were incubated for 5 min in 0.1 N HCl, briefly rinsed in 2× SSC, and stored in 50% formamide/2× SSC. Whole chromosome paint (WCP) probes (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands) were applied to slides carrying the cells under a glass coverslip sealed with rubber cement. WCP probes were associated in pairs (WCP18/19, WCP1/17; WCP4/21, WCP3/22, WCP6/8, WCP7/10) according to size of chromosomes and gene density based on the latest information available (NCBI data, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) (Table 1). Probe DNA and interphase DNA were denatured simultaneously on a hot block at 75 °C for 5 min. Hybridization was carried out in a humid atmosphere at 37 °C for 24 h. Post-hybridization washings included 0.4 SSC for 2 min at 72 °C and 2× SSC for 30 s at 37 °C. Nuclei were counterstained with the intercalating agent 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Abbott Molecular, Abbott Park, IL).

nlm.nih.gov/genome/guide/human/) (Table 1). Probe DNA and interphase DNA were denatured simultaneously on a hot block at 75 °C for 5 min. Hybridization was carried out in a humid atmosphere at 37 °C for 24 h. Post-hybridization washings included 0.4 SSC for 2 min at 72 °C and 2× SSC for 30 s at 37 °C. Nuclei were counterstained with the intercalating agent 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Abbott Molecular, Abbott Park, IL).

### Confocal microscopy

Nuclei were scanned using a three-channel laser scanning confocal microscope (Leica TCS SPE; Leica Microsystems, Mannheim, Germany). For each optical section, images were recorded sequentially for three fluorochromes (FITC, TRITC, and Aqua). Images (1024 × 1024 pixels) were sampled using a ×63 oil objective at a resolution of xy=0.2 µm and z=0.3 µm. The image stacks were processed with the dedicated analysis software (LAS-AF Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Twenty to 30 nuclei were scanned per patient for each pair of probes. The total number of nuclei for which CT radial positions and CT volumes were collected is given in Table 2. For each nucleus, two values of CT radial position and CT volume were measured for each chromosome, except for chromosome 21 in trisomic 21 nuclei for which three values were collected.

**Table 1** Classification of chromosomes according to size and gene density

Chromosomes	Size (Mbp)	Density (gene/Mbp)
1	248.9	8.3
3	198.2	5.4
4	190.2	3.9
6	170.8	6.1
7	159.3	6.1
8	145.1	4.6
10	133.7	5.5
17	83.2	14.3
18	80.3	3.4
19	58.6	24.9
21	46.7	5.0
22	50.8	9.6

Chromosomes were selected to have a homogeneous distribution of the entire genome with large versus small chromosomes and gene-rich versus gene-poor chromosomes

**Table 2** Number of nuclei studied for CT volume and CT radial position

Chromosomes	Disomic	Trisomic 21
1	83	115
3	85	113
4	71	110
6	72	126
7	44	100
8	78	125
10	64	100
17	81	112
18	126	92
19	90	86
21	75	112
22	84	111

### Morphometric analysis of nuclei

To characterize chorionic villus cells, 3D nuclear parameters were quantified by an ImageJ plugin called NucleusJ (Poulet et al. 2015) using trisomic 21 ( $n = 50$ ) and disomic ( $n = 50$ ) chorionic villus cells, lymphocytes ( $n = 50$ ), and fibroblasts ( $n = 50$ ). Three nuclear shape parameters were computed from 3D confocal images: sphericity =  $36 \pi \text{ volume}^2 / \text{surface area}^3$ , flatness = length of intermediate axis/length of shortest axis, elongation = length of longest axis/length of intermediate axis.

### 3D reconstruction of nuclei and chromosome territory

The 3D structures of nuclei and CTs were reconstructed using IMARIS software (Bitplane) and dedicated image analysis developments designed under MatLab 7.11 (Mathworks, Natick, MA) using the geom3D library (Legland, 2009 <https://fr.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24484-geom3d>). Disomic ( $n = 533$ ) and trisomic ( $n = 674$ ) cells were analyzed for nuclear volumes. Volumes of nuclei and CTs were determined using standard IMARIS procedure. For each CT, radial distances were computed first by defining distance from the center of nucleus to its boundary ( $r_0$ ) and distance from the center of nucleus to the center of each CT ( $r_1$ ). The ratio ( $r$ ) between the two distances was then computed to assess the relative CT position inside the nucleus.

In trisomic cells, the relative position of the three CT21s was assessed for 107 nuclei. The absolute distance between the mass centers of the three CT21 was determined and classified as  $d_1$ ,  $d_2$ , and  $d_3$ , where  $d_1$  is the smallest distance,  $d_2$  the intermediate, and  $d_3$  the largest distance.

### Statistical analyses

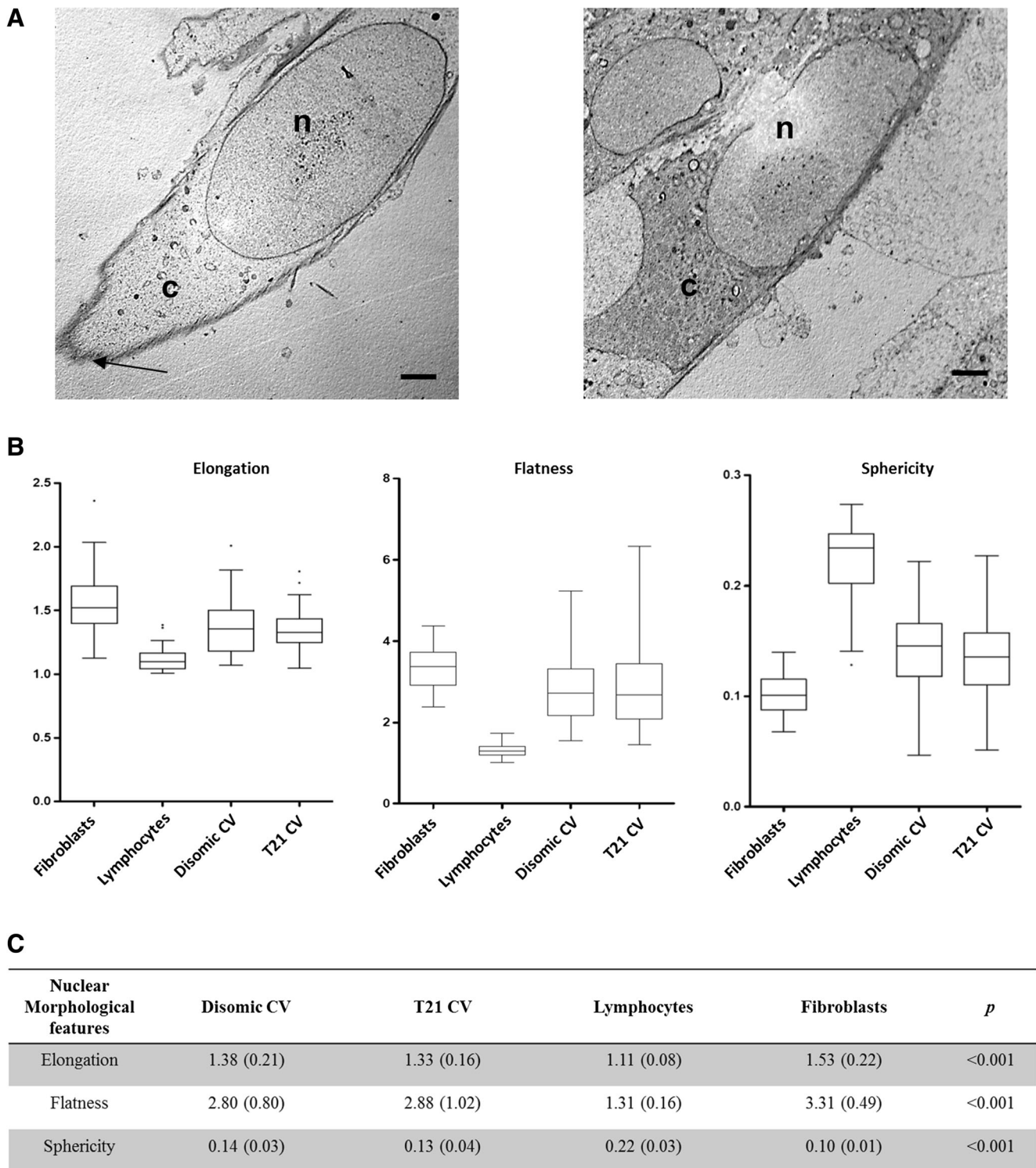
Statistical analysis was performed using Stata 13 software (StataCorp, College Station, TX). The tests were two-sided, with a type I error set at  $\alpha = 0.05$ . Quantitative data were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range according to normality of the statistical distribution checked by a Shapiro-Wilk test. Relationships between quantitative variables were studied using correlation coefficients (Pearson or Spearman according to statistical distribution). For comparisons of CT volumes between trisomic 21 and disomic nuclei, quantitative data (for example normalized volumes of CTs) were compared between groups using random-effects models, as it was particularly useful to study fixed effects as group (T21 vs. disomic) taking into account variabilities between and within subjects and territories (as random-effects). Concerning comparisons on non-repeated data, usual statistical tests were performed: ANOVA or Kruskal-Wallis followed by post hoc test for multiple comparisons: Tukey-Kramer post ANOVA or Dunn after Kruskal-Wallis.

### Results

#### Morphology of chorionic villus cell nuclei is not altered by an extra copy of chromosome 21

Chorionic villus cells were cultured from samples collected from women who underwent chorionic villus sampling for prenatal diagnosis at Estaing University Hospital—Clermont-Ferrand (France). To demonstrate that an extra copy of chromosome 21 does not alter cell characteristics, we evaluated the morphology and ultrastructure of cultured disomic and T21 chorionic villus cells. Morphology is an important large-scale manifestation of the global organizational and physiological state of the cells (Zink et al. 2004). Transmission electron microscopy was used to evaluate the cell and nucleus ultrastructure. Cultured chorionic villus cells keep the characteristics of mesenchymal fibroblasts with an abundant cytoplasm, broad membrane ruffling, and large nuclei with no differences between disomic and T21 cells (Fig. 1a).

Radial arrangement of CT and its correlation with chromosome size have been well described in fibroblasts (Parada et al. 2004), but this arrangement can be modified in other cell types and was shown to correlate with nuclear shape (Bolzer et al. 2005; Federico et al. 2006). To better describe the nuclear shape of chorionic villus cells from disomic and T21 nuclei, we compared their nuclear morphology to fibroblasts and lymphocytes by 3D imaging using an ImageJ plugin called NucleusJ (Poulet et al. 2015). Nuclear shape was investigated by computing elongation, flatness, and sphericity indexes



**Fig. 1** Morphology and morphometry analyses of chorionic villus cell nuclei. **a** Transmission electron microscopy of disomic (left panel) and trisomic 21 (T21 CV) (right panel) chorionic villus cells. Cells are relatively undifferentiated with a large ellipsoid nucleus (n), an undifferentiated cytoplasm (c), and broad membrane ruffling (arrow). Scale bar = 2 nm. **b** Morphology analysis of fibroblasts, lymphocytes, disomic CV, and T21 CV nuclei using NucleusJ. Elongation, flatness, and sphericity morphometric parameters are presented as Tukey

boxplots with interquartile range (25–75%), median (horizontal line), and whiskers indicating the minimum and maximum values, except for outliers.  $n = 50$  for each nuclear type. **c** Statistical analysis of morphometric analysis. Mean values and standard deviations in brackets are given, as well as *p* values, estimated with ANOVA or Kruskal-Wallis followed by post hoc test for multiple comparisons: Tukey-Kramer post ANOVA or Dunn after Kruskal-Wallis

(“Material and methods”) to characterize the 3D morphology of the nuclei (Fig. 1b). As expected, elongation and flatness were significantly higher for fibroblast nuclei than lymphocyte nuclei whereas sphericity was significantly lower (Fig. 1c). Disomic and T21 chorionic villus cell nuclei had lower elongation and flatness values but higher sphericity compared to fibroblast nuclei (Fig. 1c). Although the nuclear shape parameters were statistically different, they were closer to fibroblast nucleus shape parameters than lymphocyte parameters. Furthermore, these shape parameters did not tend to differ between disomic and T21 chorionic villus cell nuclei (Fig. 1c). The morphometric analysis showed that the shape of chorionic villus cell nuclei is more consistent with the nuclear shape of fibroblasts than lymphocytes. No major change in nuclear morphology was observed in T21 compared to disomic chorionic villus cell nuclei.

### Chromosome territories change their radial positioning in trisomic 21 nuclei of chorionic villus cells

In the interphase nucleus, chromosomes are organized in distinct CTs that can be delimited as nuclear subvolumes by 3D-FISH. Here, we tested whether a supplementary chromosome 21 alters the spatial organization of the remaining disomic chromosomes and can modify their radial positions. Relative radial position of CT was computed using a set of 12 CTs chosen to adequately represent a wide range of linear sizes and gene densities in human chromosomes (Table 1). Radial positions were then investigated by 3D-FISH in disomic and T21 chorionic villus cells. Radial position of CT1 ( $r = 0.65 \pm 0.11$  in 83 disomic vs  $0.68 \pm 0.14$  in 115 T21 nuclei,  $p = 0.007$ ) and CT3 ( $r = 0.66 \pm 0.14$  in 85 disomic vs  $r = 0.71 \pm 0.11$  in 113 T21 nuclei,  $p < 0.001$ ) was modified and adopted a more peripheral position in T21 nuclei whereas HSA21 CTs showed no position changes in T21 nuclei ( $r = 0.54 \pm 0.15$  in 75 disomic vs  $r = 0.54 \pm 0.18$  in 112 T21 nuclei,  $p = 0.8$ ) (Fig. 2d).

To analyze the relative positioning of chromosome 21, we measured the distances and defined d1, d2, and d3 as the smallest, intermediate, and largest distances between the mass centers of the three chromosome 21 territories (Fig. 3). We found that 10.5% of trisomic nuclei had three equidistant CT and that 36.5% of nuclei had one CT equidistant from the two others. Mean lowest (d1) and largest (d3) distance between two CT21s was  $4.34 \pm 1.37$  and  $8.01 \pm 2.34$   $\mu\text{m}$ , respectively. Finally, we observed that in 55.8% of the T21 nuclei, one of the CT21 was significantly more distant from the two others CT21s ( $p < 0.001$ ,  $n = 107$  nuclei) suggesting that CT21s adopt a specific organization in trisomic cell nuclei.

### Correlation between chromosome size, gene density, and radial arrangements of chromosomes is not affected in trisomic 21 chorionic villus cell nuclei

CTs were first described almost 20 years ago (Lichter et al. 1988), yet the mechanisms driving their respective positioning remain elusive. Several factors are proposed to participate in the organization of the nuclear space, including chromosome size, gene density, nuclear shape, and interaction at the nuclear periphery (Heride et al. 2010). Here, we studied how radial position correlates with chromosome size and gene density to investigate whether these factors may influence the radial distribution of CTs in chorionic villus cell nuclei.

When the relative radial positions are plotted against the mean length of each chromosome (Fig. 4a), a strong positive correlation emerges ( $R^2 = 0.8914$ ), indicating that small chromosomes preferentially localize at positions closer to the center of the nucleus whereas large chromosomes are more often located next to the periphery. These results are in good agreement with previous studies performed on fibroblasts and strengthened our confidence that cultured chorionic villus cells are a relevant model system. This correlation was conserved between disomic ( $R^2 = 0.8627$ ) and trisomic nuclei ( $R^2 = 0.7738$ ), suggesting that the extra copy of chromosome 21 did not alter the correlation (Fig. 4b, c).

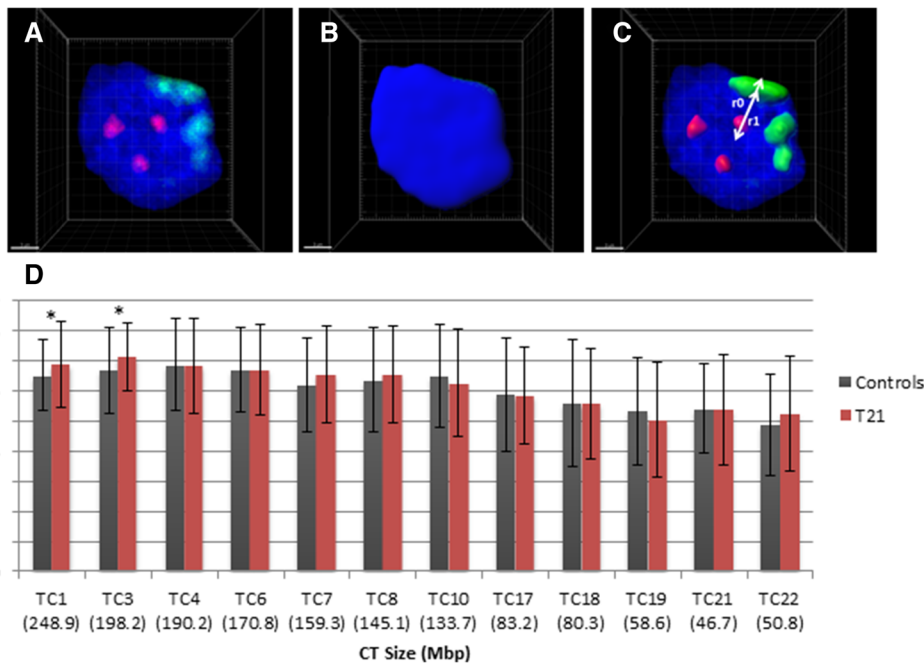
Linear regression (Fig. 4d) shows that there is a weak negative correlation between gene density and nuclear position of the selected chromosomes ( $R^2 = 0.2887$ ). These results indicate that gene-rich chromosomes preferentially locate in the nuclear interior while gene-poor chromosomes are found at the periphery of chorionic villus cell nuclei. When comparing disomic and trisomic 21 nuclei, the relationship between gene density and nuclear position of chromosomes was conserved ( $R^2 = 0.257$  in disomic and  $R^2 = 0.2076$  in trisomic 21 nuclei) (Fig. 4e, f).

Taken together, our 3D-FISH findings indicate that correlations between chromosome size or gene density and radial position of CTs are not altered by an extra chromosome 21.

### Chromosome territory volume is altered by an extra copy of chromosome 21 in chorionic villus cell nuclei

We evaluated nuclear volume for trisomic and disomic cells to assess whether nuclear size can be affected by the presence of a supernumerary chromosome 21. Nuclear volumes in T21 ( $710.5 \pm 304.1$   $\mu\text{m}^3$ ,  $n = 674$ ) and disomic cells ( $734.8 \pm 282.3$   $\mu\text{m}^3$ ,  $n = 533$ ) are not significantly different between the two types of nuclei ( $p = 0.90$ ). Thus, using our experimental procedure, the extra chromosome 21, which accounts for about 1% of the whole human genome, does not significantly affect the nuclear volume of T21 cells.

To take into account variations in nuclear volume within a given cell population, the volume of each CT was normalized over the volume of the corresponding nucleus before



**Fig. 2** 3D reconstruction of nuclei and relative radial distribution of CT. 3D reconstruction of nuclei and CT using IMARIS software (Bitplane). 3D-FISH was performed using HSA21 (red) and HSA4 (green) probes on disomic (three independent samples;  $n = 533$ ) and trisomic (six independent samples;  $n = 674$ ) nuclei. DAPI-counterstained nuclei. Scale bar:  $3 \mu\text{m}$ . **a** Raw image of a T21 nucleus after 3D-FISH. **b** Nuclear volume gained from DAPI after 3D segmentation. **c** Reconstructed CTs and radial position of HSA21 and HSA4 CT.  $r_0$ :

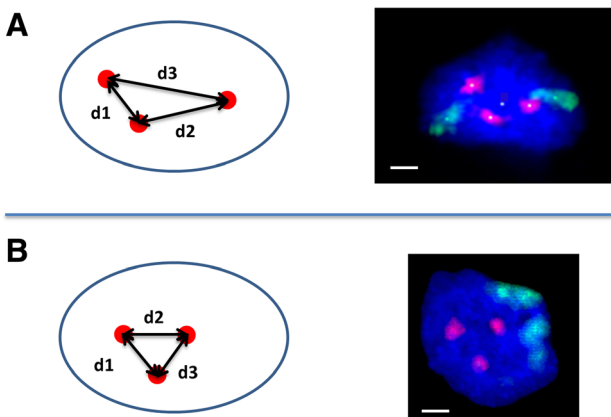
distance between the limit of DAPI staining and the geometrical center of the nucleus.  $r_1$ : distance between CT center and the geometrical center of the nucleus. **d** Mean values  $\pm$  standard deviation of the relative radial distributions ( $r_1/r_0$ ) of 12 CTs for disomic (dark gray) and T21 (light gray) nuclei. Significant CT alterations observed for TC1 ( $p < 0.007$ ) and TC3 ( $p < 0.001$ ) are indicated (\*). Estimations were performed using random-effect model

investigating relationships between CT volumes and chromosome length and gene density.

CT1 and CT17 were found significantly smaller in T21 nuclei (Fig. 5). CT1 relative volume was  $3.4 \pm 1.2 \mu\text{m}^3$  in T21 nuclei ( $n = 115$ ) and  $4.7 \mu\text{m}^3 \pm 1.9 \mu\text{m}^3$  in disomic nuclei ( $n = 83$ ) ( $p = 0.002$ ). CT17 relative volume was  $2.9 \pm 1.2 \mu\text{m}^3$

in T21 nuclei ( $n = 112$ ) and  $2.0 \pm 0.9 \mu\text{m}^3$  in disomic nuclei ( $n = 81$ ) ( $p = 0.04$ ).

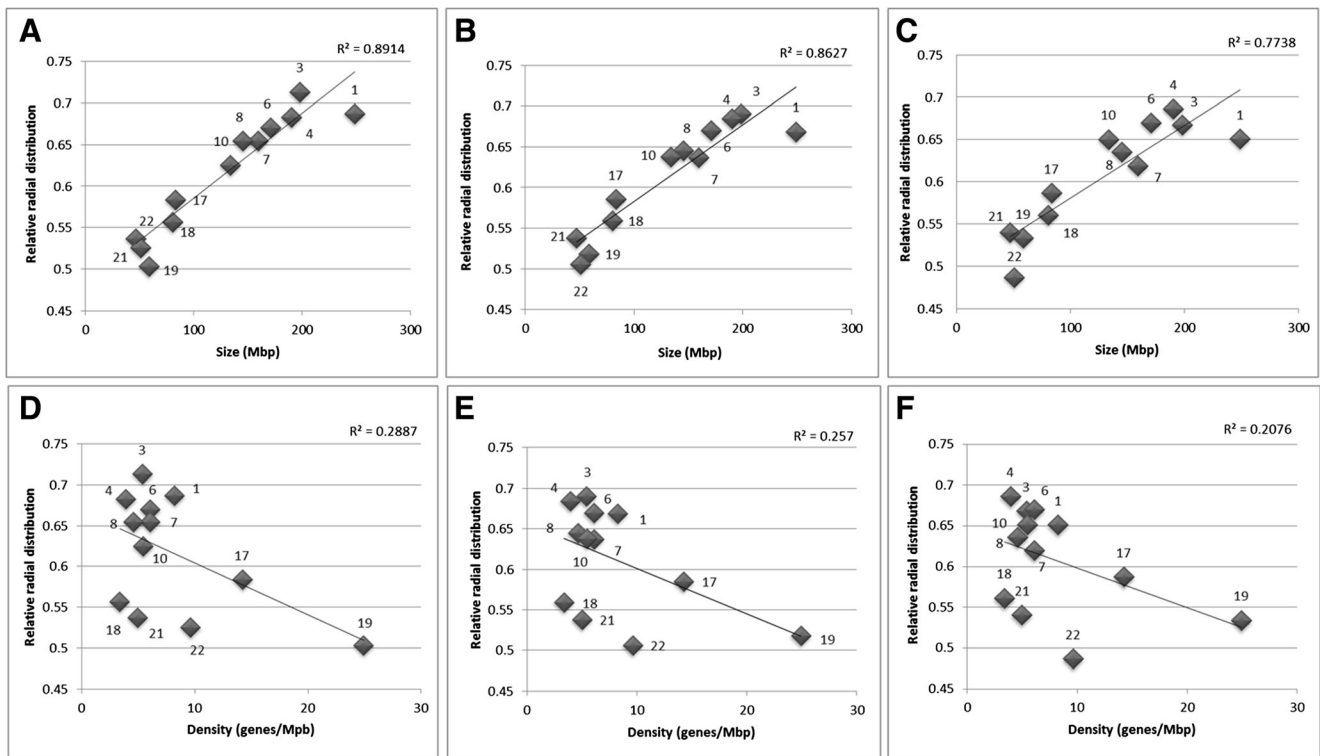
We found strong positive correlation between chromosome length and mean CT volume ( $R^2 = 0.871$ ) with very similar coefficient of determination in both types of nuclei ( $R^2 = 0.7995$  in disomic and  $R^2 = 0.8292$  in T21 nuclei) (Fig. 6a). In contrast, we found no correlation between mean CT volumes and gene density ( $R^2 = 0.04$ ), whether the nuclei are disomic or trisomic (Fig. 6b).



**Fig. 3** Positioning of HSA21 territories in trisomy 21 cells. Absolute distances,  $d_1$ ,  $d_2$ , and  $d_3$  between the mass centers of the three HSA21 territories (red) in T21 nuclei ( $n = 107$ ). Scale bar  $3 \mu\text{m}$ . **a** Example of two chromosomes 21 localized in close proximity to each other and distant from the remaining one. **b** Example of three chromosomes localized at an equivalent distance relative to each other

## Discussion

In eukaryotic cells, chromosomes occupy discrete subnuclear volumes in the interphase nucleus (Cremer et al. 1993). A better understanding of the functional importance of chromosome territorial organization has become a major challenge in the field of nuclear organization study. Many studies have assessed the organization and positioning of whole CTs in the cell nucleus, but very few have addressed this issue in aneuploid cells which represent a natural and simple model of chromosome content imbalance. Here, we used cultured cells derived from chorionic villus tissue of early-gestation placenta from trisomic 21 pregnancies to investigate the effect of a supernumerary chromosome on CT organization. Cell cultures gave us the opportunity to investigate CT organization using a large number of nuclei.

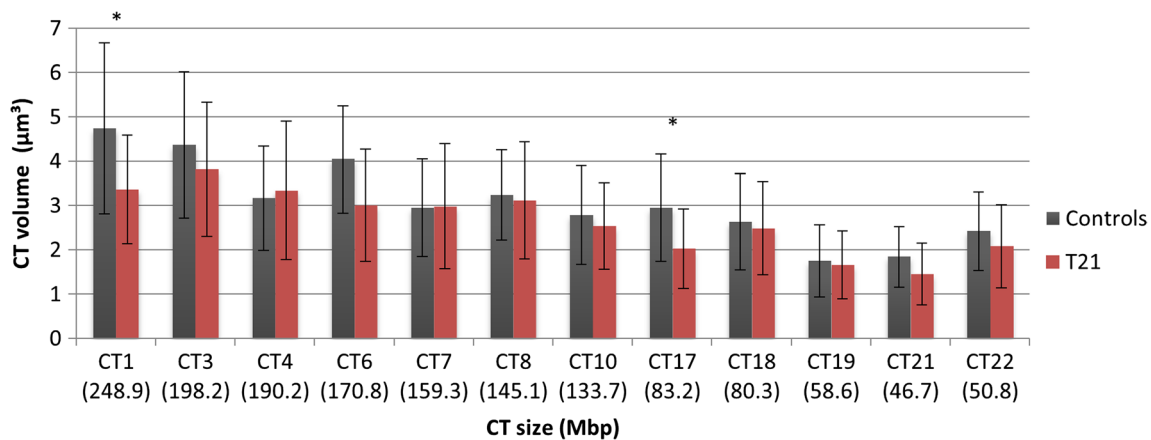


**Fig. 4** Radial position of CTs according to chromosome size and gene density. Relative radial position of each CT is represented according to chromosome size expressed in Mbp for **a** all nuclei, **b** disomic chorionic villus nuclei, and **c** T21 chorionic villus nuclei. Relative radial distribution according to gene density expressed in genes/Mbp for **d** all

nuclei, **e** disomic chorionic villus cell nuclei, and **f** T21 chorionic villus cell nuclei. Nuclei numbers are identical as for best-fit linear regression, and  $R^2$  correlation coefficients are given for each graph. Relationships between quantitative variables were studied using correlation coefficients (Pearson or Spearman according to statistical distribution)

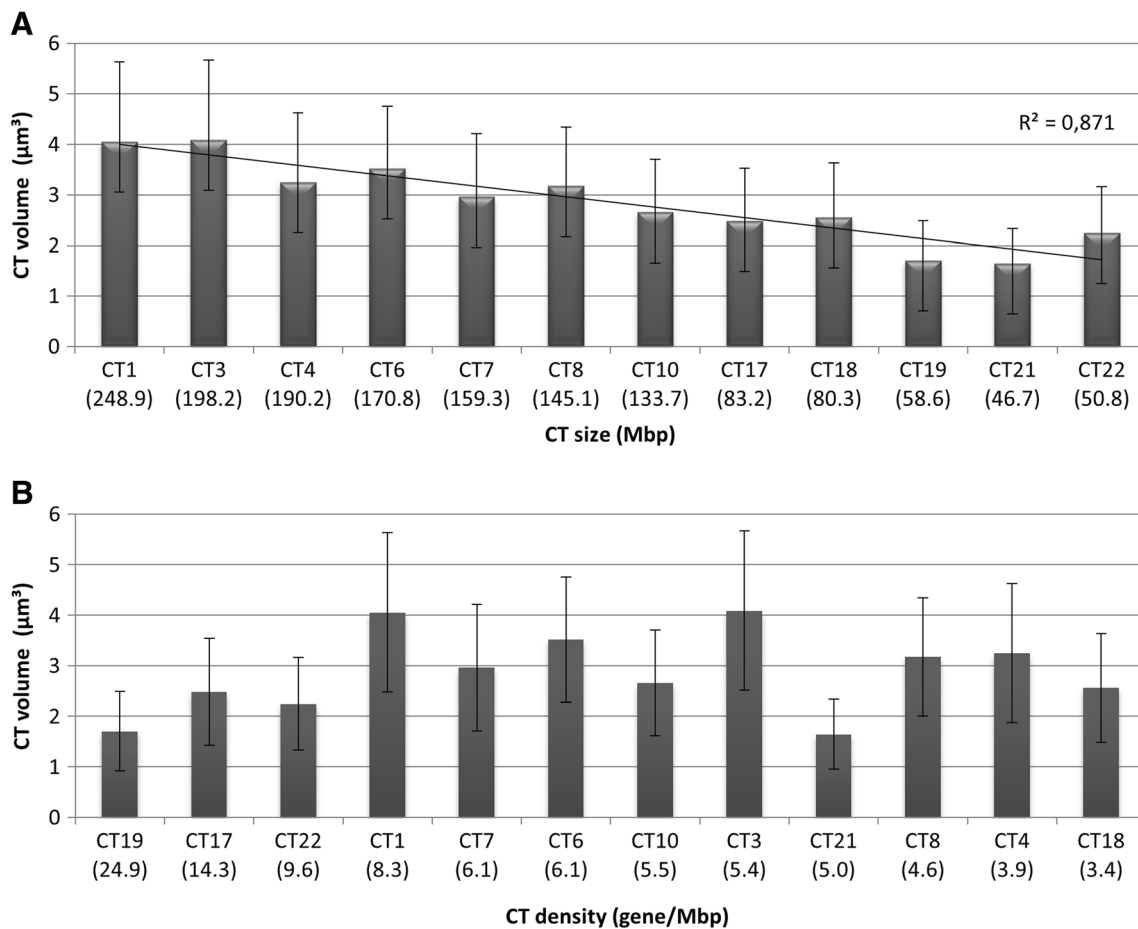
The cells of the villus core provide an excellent material for this type of study. They are released from the chorionic villus by mechanical and enzymatic methods and are usually expanded in long-term culture for chromosome analysis in order to detect embryonic chromosome abnormalities. Cells cultured from the chorionic villus core originate from the extraembryonic mesenchyme and in vitro exhibit fibroblast-like appearance, abundant

cytoplasm, and large nucleus. Transmission electronic microscopy confirmed the presence of an extended and branched cytoplasm surrounding a large and elongated nucleus and also observed broad membrane ruffling, a feature of the locomotion process in fibroblasts and fibroblast-like cells. Morphometric analyses of cultured chorionic villus cell nuclei were carried out for comparison against cultured lymphocyte and fibroblast nuclei



**Fig. 5** CT volume comparison between controls and T21 chorionic villus cell nuclei. Chromosomes were classified from left to right according to their size expressed in Mbp (in brackets) from largest (left) to smallest (right) CT. Bar graphs represent the normalized volume of each CT both in controls (dark gray) and in T21 (light gray) chorionic villus cells. CT1

( $n = 83$  and  $n = 115$  nuclei in disomic and trisomic cells respectively,  $p = 0.002$ ), and CT17 ( $n = 81$  and  $n = 112$  nuclei in disomic and trisomic cells respectively,  $p = 0.04$ ) are significantly smaller for T21. Estimations were performed using random-effect model



**Fig. 6** CT volume according to size and gene density of chromosomes. **a** Chromosomes were classified from left to right according to their size expressed in Mbp (in brackets) from largest (left) to smallest (right) CT. **b** Chromosomes were classified from left to right according to their gene density (gene/Mbp) from highest/most gene-rich to lowest/most gene-poor chromosome. Bar graphs represent the normalized volume of each

TC (disomic and T21 chorionic villus cell nuclei). Error bars represent standard derivation.  $R^2$ : correlation coefficient between chromosome size and CT volume. Relationships between quantitative variables were studied using correlation coefficients (Pearson or Spearman according to statistical distribution)

which have served for most CT distribution studies to date. Sphericity, elongation, and flatness parameters were determined for diploid and trisomic 21 nuclei and for lymphocyte and fibroblast nuclei. Unsurprisingly, the three nuclear shape parameters for lymphocyte nuclei were noticeably different from those for fibroblast and chorionic villus cell nuclei, with lymphocytes showing the most spherical and least flat and elongated nuclei. Sphericity, elongation, and flatness of chorionic villus cell nuclei were practically the same as for fibroblast nuclei, suggesting that chorionic villus cells have much the same flat-ellipsoidal nuclei as found with microscopy observations. Note that the presence of a supernumerary HSA21 had no repercussions on the nuclear volume and shape nor on the ultrastructure as observed by transmission electron microscopy. Our results are in agreement with the recent report of Hervé et al. showing similar nuclear volume between trisomic 18 or trisomic 21 and disomic cells (Hervé et al. 2016). Differences in volume and shape of the nucleus have been observed in cancer cells (Jevtić and Levy 2014). The cause and effect relationships between cellular transformation and nuclear

size changes remain unclear and did not strictly correlate with ploidy (Wang et al. 1992; Cremer et al. 2003). Although genome size scales with nuclear size across a wide range of species (Bytyutskyy et al. 2014), DNA content tends to be a less important contributor to nuclear size regulation (Webster et al. 2009; Levy and Heald 2012; Edens et al. 2013), while nucleocytoplasmic transport, nuclear structural components, chromatin structure, and modification can affect nuclear morphology (Jevtić et al. 2014). The absence of nuclear volume change for trisomy 21 cells is consistent with the low contribution of DNA content to nuclear size regulation, although in that specific case the extra copy of chromosome 21 only accounts for 1% of the whole genome size.

Optical microscopy studies have shown that low-gene-density chromosomes tend to locate toward the nuclear periphery while high-gene-density chromosomes occupy a more central position in spherical nuclei (Croft et al. 1999; Boyle et al. 2001). In human flat-ellipsoid nuclei, the CTs seem to arrange according to the chromosome size and DNA content rather than their gene density

(Bolzer et al. 2005). Our 3D-FISH study showed that nuclear CT positioning in cultured chorionic villus cell nuclei correlates with chromosome size rather than gene density. Our results are in full agreement with the findings of Bolzer et al. (2005) showing that non-random CT radial position correlates with chromosome size in fibroblasts, confirming the relevance of our cultured cell system and the accuracy of our analytical procedures. Nevertheless, our results also substantiate the hypothesis that both size- and gene-density-correlated features of CT arrangements coexist in flat-ellipsoidal nuclei of human chorionic villus cells. The strong positive correlation between CT position and size chromosome and the weak negative correlation between CT position and gene density we observed might reflect the co-existence of cycling and quiescent cells in the primary cell cultures used for 3D-FISH (70% confluence). Indeed, a gene-density-correlated radial CT arrangement has been reported in human cycling fibroblasts (Croft et al. 1999) whereas chromosome-size-correlated radial arrangements have been observed in quiescent fibroblasts (Sun et al. 2000; Bolzer et al. 2005). Furthermore, the strong correlation between CT radial position and chromosome size and weak correlation between CT radial position and gene density were not altered in trisomy 21 nuclei, suggesting that the overall features that govern higher-order chromatin arrangements are not disturbed in presence of an additional HSA21.

We also investigated the radial distribution of the 12 CTs in the trisomy 21 nuclei. To our knowledge, this is the first analysis of CT positioning for 12 chromosomes, representative of up to 51% of the genome, in cultured trisomy 21 chorionic villus cells. Trisomy 21 nuclei showed a significantly more peripheral position for HSA1 and HSA3 CTs but no change in the position of HSA21 CTs. Hervé et al. (2016) did not find any change in orbital arrangement of HSA21 CTs in cultured amniocytes and chorionic villus cells (Hervé et al. 2016). HSA21 belongs to the family of acrocentric chromosomes that cooperate together to form nucleoli. It has been demonstrated that the orbital arrangement of HSA21 CTs deviates from a random arrangement forced by the constraint of nucleoli to maintain a middle position (Heride et al. 2010). It is tempting to speculate that association of chromosomes harboring nucleolar organizer regions (NORs) to nucleoli may represent a functional or physical constraint that explains the absence of whole-NOR-bearing chromosome CT relocation within the nuclear space. Despite the absence of significant relocation of HSA21 CTs, we observed that two CT21 frequently localize proximally to one another and distant from the third one. Our results corroborate the findings of Paz et al. (2013), but the mechanisms driving a particular distribution pattern remain to be elucidated (Paz et al. 2013). Sengupta et al. (2007) analyzed CT radial positioning in an artificial model of aneuploidy (Sengupta et al. 2007) and found that the microcell-mediated transferred chromosomes 7, 18, and 19 maintained the position of their endogenous homologs in the parental diploid colon cancer cell line whereas some diploid CTs displayed significant shifts (in more internal or peripheral position).

Furthermore, relocation of diploid chromosome CTs has been observed in tumor cell lines with altered karyotype including chromosomal translocations regardless of whether the relocated chromosome was involved in the translocation event (Cremer et al. 2003; Harewood et al. 2010). For example, HSA17 has been shown to significantly shift to a more peripheral position in nuclei of balanced t(11;22) lymphoblastoid cells (Harewood et al. 2010). Interestingly, CT relocation has also been observed in a cancer cell line with nearly normal karyotype (Cremer et al. 2003). Our study highlights that an extra CT21 has the potential to alter other CT positions, but the mechanisms that determine which territories will shift and toward which direction need to be addressed using a large number of trisomy 21 cell types (or aneuploid cells in general).

In DS patients, global deregulation has been observed during the postnatal period in lymphocytes (Sommer et al. 2007) and cerebral tissue (Lockstone et al. 2007; Chou et al. 2008) and during the fetal period in amniocytes (FitzPatrick et al. 2002; Altug-Teber et al. 2007; Chou et al. 2008), chorionic villus cells (Altug-Teber et al. 2007; Rozovski et al. 2007), fibroblasts (Li et al. 2006), cardiac tissue (Li et al. 2006; Conti et al. 2007; Chou et al. 2008), and cerebral tissue (Chou et al. 2008). We speculate that the supernumerary HSA21 might be associated to the global transcriptome deregulation by relocation of CTs and gene relocation within CTs which do not change their apparent radial position. Paz et al. (2015) found a difference in the relative 3D position of *DYRK1A* and *SOD1*, two HSA21 genes, with respect to each other among the three CT21 homologs within the same nucleus, and that this distinct distribution was associated with differences in expression levels (Paz et al. 2015). In the interphase nucleus, the genome forms extensive short- or long-range interactions of chromatin loops within and between chromosomes (Göndör and Ohlsson 2009). As chromosomal interactions can affect the distribution of nuclear bodies and transcription factories within the nucleus (Iborra et al. 1996; Osborne et al. 2004), they can contribute to the activation and silencing of genes within the 3D nuclear architecture. Chromosome or gene relocation within the nuclei of cells from trisomy 21 carriers might disrupt as well as create new *cis* and *trans* interactions between co-regulated genes or genes that were initially regulated independently, respectively. However, whether nuclear spatial architecture dictates or depends on genome function remains an entirely open question.

In addition to relocated CTs, we observed increased compaction of two CTs (HSA1 and HAS 17) in trisomy 21 nuclei. To date, CT volumes have not been carefully investigated in studies deciphering the nuclear organization of CTs. Previous observations have described a compacted sphere-like X-inactive territory in contrast to a flat and extended X-active territory (Rinke et al. 1995; Eils et al. 1996; Clemson et al. 2006; Teller et al. 2011). Using stem cells as an in vitro model system of adipogenesis, Szczerbal et al. (2009) found that CTs were more decondensed and approximately twofold bigger in stem cells than non-

differentiated cells (Szczerbal et al. 2009). Therefore, a high level of compaction of chromosomes in the interphase nucleus should be correlated to a decrease in their genetic activity, as suggested by many authors, demonstrating that CT architecture alterations are induced by transcription (Croft et al. 1999; Chubb and Bickmore 2003). Further experiments are needed to evaluate whether a modification of gene expression is correlated with the compaction of CT1 and CT17 in the nuclei of trisomy 21 chorionic villus cells and could contribute to the global gene deregulation observed in trisomy 21 cells.

Here, our 3D-FISH analysis of 12 chromosome territories on morphologically preserved chorionic villus cell nuclei shows that although an extra chromosome 21 does not impact the overall organization of CTs in interphase nucleus, it does have a knock-on effect that results in CT compaction and displacement of other CTs from their usual nuclear position. This 3D genome reorganization in trisomy 21 cells warrants further investigations not only in humans but also in cells of DS mouse models in order to establish a link with the pathogenesis of DS.

**Acknowledgements** The authors thank C. Vachias and P. Pouchin of the Imagerie Confocale de Clermont-Ferrand platform (ICCF) for their technical help in confocal analysis. We also thank A.T.T (Auvergne Traduction Technique) for proofreading the manuscript. This research did not receive any specific grants from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All biological samples came from a collection declared with the French Ministry of Research and Higher Education (#CODECOH: DC2008-558). Analysis of human samples was performed in accordance with French Bioethics Law (#2011-814). This study is compliant with the principles of the Declaration of Helsinki. This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## References

- Altug-Teber O, Bonin M, Walter M, Mau-Holzmann UA, Dufke A, Stappert H, Tekesin I, Heilbronner H, Nieselt K, Riess O (2007) Specific transcriptional changes in human fetuses with autosomal trisomies. *Cytogenet Genome Res* 119(3-4):171–184. <https://doi.org/10.1159/000112058>
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3(5):e157. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>
- Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 10(3): 211–219. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.3.211>

- Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA (2000) Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol* 10(3):149–152. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00312-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00312-2)
- Bytutsky D, Kholodnyy V, Flajšhans M (2014) 3-D structure, volume, and DNA content of erythrocyte nuclei of polyploid fish: 3-D structure, volume, and DNA content of erythrocyte nuclei of polyploid fish. *Cell Biol Int* 38(6):708–715. <https://doi.org/10.1002/cbin.10247>
- Chou CY, Liu LY, Chen CY, Tsai CH, Hwa HL, Chang LY, Lin YS, Hsieh FJ (2008) Gene expression variation increase in trisomy 21 tissues. *Mamm Genome* 19(6):398–405. <https://doi.org/10.1007/s00335-008-9121-1>
- Chubb JR, Bickmore WA (2003) Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell* 112(4):403–406. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00078-3)
- Clemson CM, Hall LL, Byron M, McNeil J, Lawrence JB (2006) The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences. *Proc Natl Acad Sci* 103(20):7688–7693. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601069103>
- Conti A, Fabbri F, D'Agostino P et al (2007) Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics* 8(1):268–268. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-268>
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2(4):292–301. <https://doi.org/10.1038/35066075>
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schrock E, Speicher MR, Mathieu U, Jauch A, Emmerich P, Scherthan H, Ried T, Cremer C, Lichter P (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58(0):777–792. <https://doi.org/10.1101/SQB.1993.058.01.085>
- Cremer M, von Hase J, Volm T et al (2001) Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosom Res* 9(7):541–567. <https://doi.org/10.1023/A:1012495201697>
- Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T (2003) Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162(5):809–820. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304096>
- Cremer M, Grasser F, Lanctôt C, et al (2008) Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes *Nucl Vol 1 Nucl Subnucl Compon* 205–239
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145(6):1119–1131. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.6.1119>
- Dundr M, Misteli T (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356(2):297–310. <https://doi.org/10.1042/bj3560297>
- Edens LJ, White KH, Jevtic P, Li X, Levy DL (2013) Nuclear size regulation: from single cells to development and disease. *Trends Cell Biol* 23(4):151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.11.004>
- Eils R, Dietzel S, Bertin E et al (1996) Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. *J Cell Biol* 135(6):1427–1440. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1427>
- Federico C, Scavo C, Cantarella CD, Motta S, Saccone S, Bernardi G (2006) Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates. *Chromosoma* 115(2):123–128. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0039-z>
- FitzPatrick DR, Ramsay J, McGill NI, Shade M, Carothers AD, Hastie ND (2002) Transcriptome analysis of human autosomal trisomy.

- Hum Mol Genet 11(26):3249–3256. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.26.3249>
- Foster HA, Bridger JM (2005) The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. *Chromosoma* 114(4):212–229. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0016-6>
- Fournier A, McLeer-Florin A, Lefebvre C, Duley S, Barki L, Ribeyron J, Alboukadel K, Hamaidia S, Granjon A, Gressin R, Lajmanovich A, Bonnefoix T, Chauvelier S, Debernardi A, Rousseaux S, de Fraipont F, Figeac M, Kerckaert JP, de Vos J, Usson Y, Delaval K, Grichine A, Vourc'h C, Khochbin S, Feil R, Leroux D, Callanan MB (2010) 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med* 2(5):159–171. <https://doi.org/10.1002/emmm.20100067>
- Gardiner K, Herault Y, Lott IT, Antonarakis SE, Reeves RH, Dierssen M (2010) Down syndrome: from understanding the neurobiology to therapy. *J Neurosci* 30(45):14943–14945. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3728-10.2010>
- Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA (2004) Chromatin organization in the mammalian nucleus. In: International review of cytology. Academic Press, pp 283–336
- Göndör A, Ohlsson R (2009) Chromosome crosstalk in three dimensions. *Nature* 461(7261):212–217. <https://doi.org/10.1038/nature08453>
- Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, von Hase J, Bauer K, Wienberg J, Cremer C, Cremer T, Solovei I (2001) Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosom Res* 9(7):569–584. <https://doi.org/10.1023/A:1012447318535>
- Harewood L, Schutz F, Boyle S, Perry P, Delorenzi M, Bickmore WA, Reymond A (2010) The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res* 20(5):554–564. <https://doi.org/10.1101/gr.103622.109>
- Heride C, Ricoul M, Kiéu K, von Hase J, Guillemot V, Cremer C, Dubrana K, Sabatier L (2010) Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *J Cell Sci* 123(23):4063–4075. <https://doi.org/10.1242/jcs.066498>
- Hervé B, Coussement A, Gilbert T, Dumont F, Jacques S, Cuisset L, Chicard M, Hizem S, Bourdoncle P, Letourneur F, Dupont C, Vialard F, Choiset A, Dupont JM (2016) Aneuploidy: the impact of chromosome imbalance on nuclear organization and overall genome expression: impact of chromosome imbalance. *Clin Genet* 90(1):35–48. <https://doi.org/10.1111/cge.12731>
- Iborra FJ, Pombo A, Jackson DA, Cook PR (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription “factories” in human nuclei. *J Cell Sci* 109:1427–1436
- Jackson JF, North ER III, Thomas JG (1976) Clinical diagnosis of Down’s syndrome. *Clin Genet* 9(5):483–487. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1976.tb01601.x>
- Jevtić P, Levy DL (2014) Mechanisms of nuclear size regulation in model systems and cancer. In: Schirmer CE, de las Heras IJ (eds) *Cancer biology and the nuclear envelope: recent advances may elucidate past paradoxes*. Springer, New York, pp 537–569. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_25)
- Jevtić P, Edens LJ, Vuković LD, Levy DL (2014) Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance. *Curr Opin Cell Biol* 28:16–27. <https://doi.org/10.1016/jceb.2014.01.003>
- Kahlem P (2006) Gene-dosage effect on chromosome 21 transcriptome in trisomy 21: implication in down syndrome cognitive disorders. *Behav Genet* 36(3):416–428. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9053-z>
- Khalil A, Grant JL, Caddle LB, Atzema E, Mills KD, Arneodo A (2007) Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosom Res* 15(7):899–916. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1172-8>
- Kozubek S, Lukášová E, Jirsová P, Koutná I, Kozubek M, Ganová A, Bártošová E, Falk M, Paseková R (2002) 3D structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma* 111(5):321–331. <https://doi.org/10.1007/s00412-002-0210-8>
- Küpper K, Kölbl A, Biener D, Dittrich S, von Hase J, Thormeyer T, Fiegler H, Carter NP, Speicher MR, Cremer T, Cremer M (2007) Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116(3):285–306. <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0098-4>
- Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J, Chevalier C, Thurman R, Sandstrom RS, Hibaoui Y, Garieri M, Popadin K, Falconnet E, Gagnebin M, Gehrig C, Vannier A, Guipponi M, Farinelli L, Robyr D, Migliavacca E, Borel C, Deutsch S, Feki A, Stamatoyannopoulos JA, Herault Y, van Steensel B, Guigo R, Antonarakis SE (2014) Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down’s syndrome. *Nature* 508(7496):345–350. <https://doi.org/10.1038/nature13200>
- Levy DL, Heald R (2012) Mechanisms of intracellular scaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28(1):113–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154158>
- Li C-M, Guo M, Salas M, Schupf N, Silverman W, Zigman WB, Husain S, Warburton D, Thaker H, Tycko B (2006) Cell type-specific overexpression of chromosome 21 genes in fibroblasts and fetal hearts with trisomy 21. *BMC Med Genet* 7(1):24. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-7-24>
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80(3):224–34
- Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland AJ, Bahn S (2007) Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics* 90(6):647–660. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.08.005>
- Mayer R, Brero A, von Hase J, Schroeder T, Cremer T, Dietzel S (2005) Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol* 6(1):44–44. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-44>
- Mora L, Sánchez I, García M, Ponsà M (2006) Chromosome territory positioning of conserved homologous chromosomes in different primate species. *Chromosoma* 115(5):367–375. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0064-6>
- Murmann AE, Gao J, Encinosa M, Gautier M, Peter ME, Eils R, Lichter P, Rowley JD (2005) Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus. *Exp Cell Res* 311(1):14–26. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.020>
- Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 36(10):1065–1071. <https://doi.org/10.1038/ng1423>
- Parada LA, Misteli T (2002) Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* 12(9):425–432. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02351-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02351-6)
- Parada LA, McQueen PG, Misteli T (2004) Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* 5(7):R44. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-7-r44>
- Paz N, Zabala A, Royo F, García-Orad Á, Zugaza JL, Parada LA (2013) Combined fluorescent-chromogenic in situ hybridization for identification and laser microdissection of interphase chromosomes. *PLoS One* 8(4):e60238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060238>
- Paz N, Felipe-Blanco I, Royo F, Zabala A, Guerra-Merino I, García-Orad Á, Zugaza JL, Parada LA (2015) Expression of the DYRK1A gene correlates with its 3D positioning in the interphase nucleus of Down syndrome cells. *Chromosom Res* 23(2):285–298. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9467-7>
- Potier M-C, Rivals I, Mercier G, Ettwiller L, Moldrich RX, Laffaire J, Personnaz L, Rossier J, Dauphinot L (2006) Transcriptional disruptions in down syndrome: a case study in the Ts1Cje mouse

- cerebellum during post-natal development. *J Neurochem* 97:104–109. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03624.x>
- Poulet A, Arganda-Carreras I, Legland D, Probst AV, Andrey P, Tatout C (2015) NucleusJ: an ImageJ plugin for quantifying 3D images of interphase nuclei. *Bioinformatics* 31(7):1144–1146. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu774>
- Rinke B, Bischoff A, Meffert M-C et al (1995) Volume ratios of painted chromosome territories 5, 7 and X in female human cell nuclei studied with confocal laser microscopy and the Cavalieri estimator. *Bioimaging* 3:1–11
- Roizen NJ, Patterson D (2003) Down's syndrome. *Lancet* 361(9365):1281–1289. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12987-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12987-X)
- Rozovski U, Jonish-Grossman A, Bar-Shira A, Ochshorn Y, Goldstein M, Yaron Y (2007) Genome-wide expression analysis of cultured trophoblast with trisomy 21 karyotype. *Hum Reprod* 22(9):2538–2545. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem214>
- Sengupta K, Upender MB, Barenboim-Stapleton L, Nguyen QT, Wincovitch SM, Garfield SH, Difilippantonio MJ, Ried T (2007) Artificially introduced aneuploid chromosomes assume a conserved position in colon cancer cells. *PLoS One* 2(2):e199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000199>
- Sommer CA, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM, Henrique-Silva F (2007) Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome. *Genome* 51(1):19–29. <https://doi.org/10.1139/G07-100>
- Sun HB, Shen J, Yokota H (2000) Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys J* 79(1):184–190. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76282-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76282-5)
- Szczerbal I, Foster HA, Bridger JM (2009) The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system. *Chromosoma* 118(5):647–663. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0225-5>
- Tanabe H, Müller S, Neusser M et al (2002) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4424–4429. <https://doi.org/10.1073/pnas.072618599>
- Tanabe H, Küpper K, Ishida T et al (2005) Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res* 108(1–3):255–261. <https://doi.org/10.1159/000080824>
- Tashiro S, Lanctôt C (2015) The international nucleome consortium. *Nucleus* 6(2):89–92. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1022703>
- Taslerová R, Kozubek S, Lukášová E, Jirsová P, Bártová E, Kozubek M (2003) Arrangement of chromosome 11 and 22 territories, EWSR1 and FLI1 genes, and other genetic elements of these chromosomes in human lymphocytes and Ewing sarcoma cells. *Hum Genet* 112(2):143–155. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0847-7>
- Taslerová R, Kozubek S, Bártová E, Gajdušková P, Kodet R, Kozubek M (2006) Localization of genetic elements of intact and derivative chromosome 11 and 22 territories in nuclei of Ewing sarcoma cells. *J Struct Biol* 155(3):493–504. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.005>
- Teller K, Illner D, Thamm S, Casas-Delucchi CS, Versteeg R, Indemans M, Cremer T, Cremer M (2011) A top-down analysis of Xa- and Xi-territories reveals differences of higher order structure at  $\geq 20$  Mb genomic length scales. *Nucleus* 2(5):465–477. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17862>
- Wang N, Stenkvist BG, Tribukait B (1992) Morphometry of nuclei of the normal and malignant prostate in relation to DNA ploidy. *Anal Quant Cytol Histol Int Acad Cytol Am Soc Cytol* 14:210–216
- Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O (2009) Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci* 122(10):1477–1486. <https://doi.org/10.1242/jcs.037333>
- Zink D, Amaral MD, Englmann A, Lang S, Clarke LA, Rudolph C, Alt F, Luther K, Braz C, Sadoni N, Rosenecker J, Schindelhauer D (2004) Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol* 166(6):815–825. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404107>



Disponible en ligne sur  
**SciVerse ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALE

# Trisomie 21 et cancers

## Trisomy 21 and cancers

W. Ayed<sup>a,b,c,e</sup>, L. Gouas<sup>a,b,c</sup>, F. Penault-Llorca<sup>c,d</sup>, A. Amouri<sup>e</sup>,  
A. Tchirkov<sup>a,b,c</sup>, P. Vago<sup>a,b,\*,c</sup>

<sup>a</sup> Université Clermont 1, UFR médecine, cytologie histologie embryologie cytogénétique, 63001 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Cytogénétique médicale, CHU d'Estaing, 1, place Lucie-Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand cedex 1, France

<sup>c</sup> Université Clermont 1, ERTICA EA4677, UFR médecine, 63003 Clermont-Ferrand, France

<sup>d</sup> Centre Jean-Perrin, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France

<sup>e</sup> Laboratoire d'histologie et de cytogénétique médicale, institut Pasteur de Tunis, faculté de médecine de Tunis, université de Tunis El Manar, 1002 Tunis, Tunisie

Disponible sur Internet le 7 novembre 2012

### MOTS CLÉS

Trisomie 21,  
Leucémies, Cancers  
solides, Facteurs de  
risque, Facteurs  
protecteurs

**Résumé** Les patients atteints de trisomie 21, encore appelée syndrome de Down, présentent un profil tumoral particulier par rapport à la population générale avec une prédominance de leucémies en bas âge et un risque faible de cancer solide chez l'adulte. Les enfants T21 présentent en effet un risque 50 fois plus élevé de développer une leucémie par rapport aux enfants, de même âge, de la population générale et la grande majorité développe un trouble myélodysplasique caractéristique appelé trouble myéloprolifératif transitoire. Malgré la faible incidence des tumeurs solides, certaines sont très rares comme le cancer du sein, le néphroblastome, le neuroblastome et le médulloblastome, tandis que d'autres restent plus fréquentes comme le rétinoblastome, les lymphomes et les tumeurs germinales gonadiques et extragonadiques. Dans cette revue, nous présentons des mécanismes possibles pouvant favoriser ou, au contraire, réprimer la formation et la progression tumorale chez les patients trisomiques 21, et liés au dosage de gènes, oncogènes ou suppresseurs de tumeurs, localisés sur le chromosome 21, à l'angiogenèse tumorale, l'apoptose cellulaire et aux interactions cellules épithéliales-stroma. © 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### KEYWORDS

Trisomy 21;  
Leukaemias;  
Solid cancers;  
Risk factors;  
Protecting factors

**Summary** Patients with trisomy 21, still called Down's syndrome (DS), present a particular tumoral profile compared to the general population with an increased incidence of leukaemia in the childhood and a low risk of solid cancer in the adulthood. DS children indeed present a 50-fold risk of developing a leukaemia compared to age-matched non-trisomic children and most of them develop a specific myelodysplastic disorder called transient myeloproliferative disorder. In spite of the low incidence of solid tumors, some are very rare as breast cancer, nephroblastoma, neuroblastoma and medulloblastoma, whereas the others remain more frequent as retinoblastoma, lymphoma and gonadal and extragonadal germ cell tumours. In this review,

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [pvago@chu-clermontferrand.fr](mailto:pvago@chu-clermontferrand.fr) (P. Vago).

we present possible mechanisms which can favour, or on the contrary repress the formation and progression of tumours in DS patients, which are related to gene effect dosage of oncogenes or tumour repressors on chromosome 21, tumour angiogenesis, apoptosis and epithelial cell-stroma interactions.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

La trisomie 21 (T21) fut individualisée comme étant une aberration chromosomique par Lejeune et al. en 1959 [43]. Elle est la plus fréquente des anomalies chromosomiques autosomiques et l'une des principales causes de déficience intellectuelle [47].

Cette anomalie chromosomique est responsable du syndrome de Down (SD) qui a été décrit pour la première fois par le Dr John Langdon Down en 1866. La fréquence de ce syndrome est de l'ordre de une naissance sur 700. La trisomie 21 peut être libre ou par translocation englobant une région critique (DSCR) située en 21q22.3 contenant des gènes triplo-sensibles [37] et homogène ou en mosaïque.

Cliniquement, le syndrome de Down se manifeste par une hypotonie à la naissance, un retard psychomoteur, une dysmorphie crânio-faciale évocatrice et des anomalies des extrémités. Des malformations viscérales cardiaques, digestives ou génito-urinaires de gravité variable peuvent être décrites. Une survenue précoce de la maladie d'Alzheimer et une prédisposition aux cancers ont été aussi notées [37,38].

## Profil tumoral

L'amélioration de la qualité de vie et de la prise en charge médicale des patients [25,96] a permis une nette augmentation de leur espérance de vie ces dernières années et a rendu possible la réalisation d'études épidémiologiques s'intéressant à l'incidence des cancers chez ces patients. Il apparaît ainsi qu'ils présentent une distribution particulière des tumeurs par rapport à la population générale avec une prédominance des leucémies en bas âge et un risque faible de cancer solide à toutes les tranches d'âge. Les mécanismes expliquant ce profil tumoral ne sont pas encore bien élucidés.

## Les cancers hématologiques

La trisomie 21 est un des facteurs de risque au développement de certains types de cancers, notamment les leucémies. Les enfants trisomiques 21 présentent en effet un risque 50 fois et 20 fois plus élevé de développer, respectivement, une leucémie aiguë myéloïde (LAM) et une leucémie aiguë lymphoïde (LAL) par rapport aux enfants de même âge issus de la population générale [29,39].

Pendant leur première enfance, ces enfants présentent un trouble myélodysplasique caractéristique appelé trouble myéloprolifératif transitoire (TMD). Ce dernier peut régresser spontanément mais dans 20% des cas, il évolue vers une leucémie aiguë à mégacaryoblastes (LAMK) [64]. Cette

forme particulière de leucémie, rare chez les enfants non trisomiques, touche environ 85% des enfants T21 atteints de leucémie myéloïde. Le risque est donc 500 fois plus élevé pour un enfant trisomique 21 de présenter ce type de leucémie par rapport à un enfant de la population générale.

La LAM du SD (LAM-SD) se caractérise par sa survenue précoce chez les enfants, une leucopénie et la rareté des anomalies cytogénétiques classiques telles que la translocation t(8;21) et l'inversion inv(16) [100]. De plus, la LAM-SD se distingue par un pronostic favorable grâce à la sensibilité augmentée des blastes à la chimiothérapie associant la cytarabine et l'anthracycline [83,84,99]. Cette sensibilité augmentée est notamment expliquée par la présence d'une mutation dans le gène *GATA1* qui entraîne une diminution de l'expression du gène codant la *cytidine deaminase*, une enzyme qui normalement inactive la cytarabine [49].

La LAL associée à la T21 ne se présente pas comme une entité clinique à l'instar du TMD ou de la LAMK, mais elle présente des particularités immuno-phénotypiques et cytogénétiques. En effet, les LAL T et LAL B matures sont rarement décrites dans le SD [31]. Les aberrations chromosomiques récurrentes dans la LAL telles que l'hyperploïdie, les translocations t(9;22), t(4;11), t(1;19)(*E2A-PBX1*) et t(12;21)(*TEL-AML1*) et les réarrangements touchant le gène *MLL* sont moins rapportés chez les patients trisomiques 21 [15,63]. Contrairement à la LAM-SD, la sensibilité des blastes des personnes trisomiques 21 avec une LAL et des personnes non trisomiques est similaire sur le plan pharmacologique [22,99].

## Les cancers solides

Le profil tumoral des patients trisomiques 21 se caractérise par la faible fréquence des cancers solides. Dans une étude épidémiologique comportant 2814 individus atteints du SD, seulement 24 cas de tumeurs solides ont été répertoriés, montrant un rapport standardisé d'incidence (SIR) d'environ 0,50 pour toutes les tranches d'âge [29]. Cette faible incidence a été aussi retrouvée dans l'étude de Patja et al. en 2006 (SIR=0,57) [56] et Sullivan et al. en 2007 (SIR=0,44) [80]. En France, uniquement 21 cas de cancers solides associés à une trisomie 21 ont été décrits dans le registre de la Société française d'oncologie pédiatrique entre les années 1980 et 2001 [72]. Malgré leur faible incidence, on peut néanmoins observer que certains cancers sont très rares voire absents tels que le cancer du sein, le néphroblastome, le neuroblastome et le médulloblastome [29,55], tandis que d'autres restent plus fréquents comme le rétinoblastome, les lymphomes et les tumeurs germinales gonadiques et extragonadiques [76,77].

Le cancer du sein est la tumeur la plus fréquente chez la femme (23% des cancers) et la première cause de décès

(14% de décès) [32]. Son incidence augmente avec l'âge (45% de ces femmes sont âgées de plus de 65 ans) [86] et certains facteurs de risques aggravent son pronostic (âge < 30 ans, ER– [récepteurs aux estrogènes], PR– [récepteurs à la progestérone], grade III) [36]. Contrairement à la population générale, le cancer du sein est rare chez les femmes T21 puisque seulement neuf cas ont été répertoriés dans la littérature et cinq cas de décès par cancers de sein chez des femmes trisomiques 21 ont été notés au cours d'une période de 24 années en France selon une enquête menée par l'Inserm [75]. Aucun cas de cancers du sein chez des femmes trisomiques 21 n'a été détecté dans l'étude de Hasle et al. en 2000, ni dans l'étude de Patja et al. en 2001 [29,55].

Le médulloblastome et le neuroblastome sont généralement moins fréquents chez les enfants T21. Dans la population générale, l'incidence des tumeurs malignes du système nerveux est de 0,6 sur 100,000 enfants alors qu'elle n'a jamais été décrite chez des fœtus, ni chez des enfants et adultes T21. De plus, aucun patient T21 n'a été répertorié dans une cohorte de patients présentant un médulloblastome, ni parmi 6000 enfants européens porteurs d'un neuroblastome [73,74].

En revanche, certaines tumeurs solides sont fréquemment rapportées dans le SD comme les tumeurs germinales, pouvant être localisées au niveau des gonades ou à l'extérieur du tissu gonadique (épiploon, rétropéritoine, région sacro-coccygienne) [76] et le rétinoblastome. Dans la littérature, 16 cas de rétinoblastome ont été décrits chez des enfants atteints de SD en plus des nombreux cas retrouvés dans de larges études épidémiologiques [11,29].

En plus de ce profil tumoral particulier, la trisomie 21 se caractérise par la présence constante d'une déficience intellectuelle. La distribution des tumeurs chez les personnes déficientes intellectuelles est différente aussi bien de celle de la population générale que de celle des patients T21. Ils ont moins de tumeurs de la sphère ORL, respiratoires mais plus de tumeurs digestives et de cancers du sein diagnostiqués à un stade avancé [55,81]. Le profil tumoral de la trisomie 21 se distingue aussi de celui des autres trisomies. En effet, la trisomie 18 est associée surtout aux tumeurs rénales et hématologiques et aux tumeurs touchant le foie, le cœur et les gonades [89], tandis que la trisomie 13 expose aux tumeurs des reins et des glandes surrénales avec prédominance des carcinomes et aux neuroblastomes [89].

## Facteurs de risque au développement des leucémies

Les anomalies du chromosome 21 jouent un rôle important dans le développement tumoral en particulier dans les leucémies. En effet, 23% des anomalies chromosomiques rencontrées dans la LAL implique le chromosome 21 (trisomie, tétrasomie) (Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1981). De même, une trisomie 21, seule ou associée à d'autres anomalies chromosomiques, est retrouvée dans 1% et 5% des LAM, respectivement [33]. L'importance du rôle du chromosome 21 a été également évoquée devant l'observation que de nombreuses cellules leucémiques sont trisomiques 21 chez des enfants dont la T21 constitutionnelle est en mosaïque [28].

**Tableau 1** Mécanismes possibles impliqués dans le risque de survenue de tumeurs hématologiques dans le syndrome de Down.

*Possible mechanisms involved in the risk of haematological tumours in the Down syndrome.*

Mécanismes possibles	Tumeurs hématologiques du SD
Effet dose gènes (Chr 21) impliqués dans l'hématopoïèse <i>RUNX1</i> <i>BACH1</i> <i>SON</i> <i>ERG</i>	LAL/LAM
Effet dose miRNA (Chr21) <i>miR-155</i> <i>Let-7c</i> <i>miR-125b</i>	LAL/LAM
Mutations <i>GATA1</i>	TMD/LAMK
Mutations <i>JAK2/</i> Surexpression <i>CRLF2</i>	LAL

SD : syndrome de Down ; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; TMD : trouble myéloprolifératif transitoire ; LAMK : leucémie aiguë à mégacaryoblastes.

Devant ces constatations, plusieurs études ont été réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels un chromosome 21 surnuméraire pourrait participer à la survenue des leucémies. La leucémogénèse dans la trisomie 21 pourrait ainsi être liée à plusieurs mécanismes (Tableau 1).

## L'implication de gènes localisés sur le chromosome 21 et ayant un rôle dans l'hématopoïèse fœtale, en particulier dans l'expansion des lignées érythroblastique et mégacaryoblastique

Parmi ces gènes, on note *RUNX1* (aussi nommé *AML1* ou *CBFA2*) qui est situé en 21q22 et code une des deux sous-unités formant le *core binding factor*. Il s'agit d'un facteur clé de l'hématopoïèse qui active plusieurs gènes comme ceux codant le *granulocyte-macrophage stimulating factor* (GM-CSF), la myéloperoxydase (MPO), l'interleukine 3 (IL3) et le *T-cell receptor B* (TCR). Il a été impliqué dans 25% des LAL et 15% des LAM de l'enfant [52]. Le gène *RUNX1* peut être remanié au cours de translocations entre le chromosome 21 et d'autres chromosomes engendrant la formation de néogènes de pronostic variable. Les *t(12;21)(p13;q22)(ETV6-RUNX1)* et *t(8;21)(q22;q22)(RUNX1-RUNX1T1)* ou *AML1-ETO* sont associées à un pronostic favorable au cours de la LAL et la LAM, respectivement, alors que la translocation *t(3;21)(q26;q22)* entraînant l'arrangement de *RUNX1* avec *EVII*, *EAP* ou *MDS* est de mauvais pronostic et est détectée chez les patients atteints d'un syndrome myélodysplasique (SMD) évoluant vers une LAM ou porteurs de LMC en phase d'acutisation [21]. Outre ces translocations, des mutations ponctuelles bi-alléliques du

domaine Runt ont également été identifiées, en particulier, dans la LAM de type M0 et chez les patients trisomiques 21, inactivant ainsi chez ces derniers deux allèles sur les trois présents et conduisant à l'haplo-insuffisance du gène [60].

D'autres gènes du chromosome 21 ont été en revanche retrouvés surexprimés dans des myéloblastes de patients trisomiques 21 tels que *BACH1* et *SON* [100]. Le premier code un répresseur transcriptionnel inhibiteur de la différenciation mégacaryocytaire et le second code une protéine régulatrice fixant l'ADN et ayant une séquence similaire de l'oncogène *MYC*.

Le chromosome 21 porte un autre gène, le gène *ERG*, qui code un facteur de transcription de la famille ETS participant au développement normal des plaquettes et des cellules souches. Il est exprimé dans des lignées cellulaires de LAMK et dans les cellules leucémiques de patients T21 présentant une LAMK et un TMD [66]. Son rôle dans le développement de ces désordres hématologiques a été évoqué devant la constatation que :

- la surexpression de *ERG* induit in vitro la différenciation mégacaryocytaire des lignées cellulaires humaines et des progéniteurs hépatiques murins [45,70] ;
- la présence en trois exemplaires de *Erg* dans un modèle murin de la trisomie 21 entraîne l'expansion des progéniteurs de la lignée myéloïde et des mégacaryoblastes tandis que la présence d'une seule copie entraîne une diminution de leur prolifération [51].

#### **L'occurrence du TMD et de la LAMK dans le SD est associée à la coexistence de mutations acquises du gène *GATA1*, localisé en Xp11.23 et de la trisomie 21**

Ce gène code un facteur de transcription régulant la prolifération normale des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. Différents types de mutations somatiques *GATA1* (insertion/délétion, duplication, substitution) ont été identifiés spécifiquement dans les blastes de patients T21 avec TMD et LAMK [90] entraînant la formation d'une protéine tronquée «GATAs» et inhibant la différenciation de ces lignées [88]. La trisomie 21 contribuerait à la survenue de ces mutations par le biais de l'effet du dosage génique de gènes situés sur le chromosome 21 notamment les gènes cyctathionine- $\beta$ -synthase (*CBS*) et zinc-copper superoxide dismutase (*SOD1*) qui jouent un rôle dans le métabolisme des folates, l'accumulation de l'uracile et l'augmentation du stress oxydatif engendrant des dommages de l'ADN et un défaut de réparation de l'ADN (*Base Excision Repair*) [13].

#### **Des études récentes ont montré que des mutations gain de fonction du résidu R683 du gène Janus Kinase 2 (*JAK2*), localisé en 9p24, étaient retrouvées chez environ 20% des LAL du SD [7,30,35]**

Par ailleurs, chez plus de 50% des patients trisomiques 21, la surexpression du gène *Cytokine receptor-like factor2* (*CRLF2*), situé en Xp22.33, consécutive à une translocation

avec le locus IGH ou à une délétion interstitielle aboutissant à un transcrite chimérique *P2RY8-CRLF2*, a été observée [30]. Dans cette étude, tous les patients porteurs de la mutation R683 présentaient un niveau d'expression élevé du gène *CRLF2* [30]. *CRLF2* forme un hétérodimère avec ILR7RA pour former un récepteur au *thymic stromal-derived lymphopoietin* (TSLP), une cytokine stimulant la croissance des cellules myéloïdes. L'association fréquente entre la surexpression de *CRLF2* et la mutation *JAK2* suggère qu'il existerait une coopération entre les deux événements mutationnels. En effet, l'expression concomitante de la mutation *JAK2* et de *CRLF2* est à l'origine d'une prolifération de cellules précurseurs de lymphocytes B en l'absence de stimulation par un facteur de croissance via une activation constitutive de la voie JAK-STAT [30].

#### **Sur le chromosome 21, il a été identifié cinq micro-RNA (miRNA), tous surexprimés dans des tissus provenant du cerveau et du cœur de personnes trisomiques 21 [40]**

Ces miRNA pourraient réguler la fonction d'autres gènes et auraient un rôle important dans l'hématopoïèse. Trois miRNA parmi les cinq sont potentiellement impliqués dans la leucémogénèse [14]. Le miR-155 joue un rôle dans l'érythropoïèse, la mégacaryopoïèse et la lymphopoïèse. Son expression soutenue dans les cellules souches hématopoïétiques entraînerait des troubles myéloprolifératifs [14]. miR-155 se comporterait ainsi comme un oncogène au cours de la leucémie aiguë [14]. En revanche, let-7c, un équivalent de suppresseur de tumeur est retrouvé réprimé dans les LAM à *core binding factor* [14]. Enfin, miR-125b a été trouvé surexprimé dans la LAM, le SMD et la LAL avec fusion *ETV6-RUNX1* [14].

#### **Facteurs de protection au développement des cancers solides**

La distribution des tumeurs chez les patients trisomiques 21 se caractérise par la faible fréquence des cancers solides comme les tumeurs embryonnaires et les cancers du sein. Diverses hypothèses ont été émises sur l'effet «protecteur» de la trisomie 21 vis-à-vis de certains types de cancers (Fig. 1).

#### **Effet dose de gènes suppresseurs de tumeurs sur le chromosome 21**

La faible prédisposition aux tumeurs épithéliales des patients T21 pourrait être due à l'effet de dosage génique de gènes «suppresseurs de tumeurs» portés sur le chromosome 21. Le gène *SIM2*, localisé en 21q22, appartient à la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS, impliqués dans le maintien des rythmes circadiens et la sensibilité à l'hypoxie [27], et code un facteur de transcription répresseur [48]. Il est retrouvé surexprimé dans le tissu normal et les tumeurs mammaires non invasives tandis que la forme courte de la protéine, codée par le variant *SIM2s*, est retrouvée sous-exprimée dans la majorité des tumeurs mammaires



**Figure 1** Mécanismes possibles de la protection de la trisomie 21 vis-à-vis du développement des cancers solides.  
Possible mechanisms of solid cancer protection in trisomy 21.

humaines [41]. La restauration de cette dernière dans une lignée tumorale mammaire très agressive (MDA-MB 435) réduit significativement la prolifération et le pouvoir invasif de celle-ci via la diminution de l'expression de MMP3, un des facteurs clés de la formation des métastases dans le cancer du sein. Ainsi, le variant *SIM2s* pourrait agir comme un suppresseur de tumeur dans le cancer du sein [41]. Un second gène potentiellement suppresseur de tumeur est le gène *BTG3* localisé en 21q21.1. Il est l'un des rares gènes du chromosome 21 qui soit significativement surexprimés dans les lymphoblastes et les fibroblastes T21 par rapport aux cellules euploïdes [1,59]. En cas de lésion de l'ADN, il constitue l'une des cibles du gène *p53* et participe à l'arrêt du cycle cellulaire notamment en inhibant l'activité du facteur de transcription E2F1 impliqué dans la progression G1/S du cycle cellulaire [53]. Il a également été montré que *BTG3* était capable de s'associer à la Src-tyrosine kinase, une protéine impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la différenciation et la prolifération cellulaire, et de diminuer ainsi son activité [65]. *BTG3* a été retrouvé sous-exprimé dans des cellules cancéreuses mammaires suite à l'hyperméthylation de son promoteur [97], et sa présence en trois exemplaires dans les cellules T21 pourrait contribuer à l'effet protecteur de la T21 contre le cancer du sein.

Un triple exemplaire du gène *ETS2*, localisé en 21q22.3, pourrait également expliquer la faible incidence de certains cancers solides. *ETS-2* code un facteur de transcription de la famille des facteurs ETS qui régule l'expression de plus de 200 gènes [79]. Une surexpression de ce gène a été rapportée dans les cellules de patients T21 [57,61]. Dans la trisomie 21, le rôle suppresseur de tumeur d'*Ets-2* a été montré grâce à des croisements entre les modèles murins Ts65Dn et Ts1Rhr de la trisomie 21 humaine et le modèle murin *Apc<sup>Min</sup>* du cancer intestinal [82]. En effet, l'incidence des tumeurs intestinales était plus faible chez les descendants de ces croisements pour lesquels le gène *Ets-2* est présent en trois exemplaires [82].

### Suppression de l'angiogenèse tumorale

L'incidence de maladies en lien avec l'angiogenèse, telles que la rétinopathie diabétique [23] et l'athérosclérose [50] est également faible chez les sujets trisomiques 21, suggérant que la protection de ces personnes vis-à-vis de certains cancers solides pourrait être liée, en partie, à un effet anti-angiogénique. L'angiogenèse tumorale correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur. L'induction de la vascularisation tumorale est appelée « switch angiogénique » et résulte d'une balance entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques, secrétées par les cellules stromales et endothéliales. À un moment de la croissance tumorale, le déséquilibre de ce rapport aboutit à la prolifération des cellules vasculaires, leur migration puis leur agencement en vaisseaux fonctionnels [67].

Des gènes du chromosome 21 pourraient jouer un rôle important dans la protection vis-à-vis de la cancérogenèse au cours du SD, en particulier en inhibant l'angiogenèse tumorale.

Parmi ces gènes, il y a le gène *Col18A1* qui code une endostatine. Il s'agit d'un puissant inhibiteur de l'angiogenèse qui a été observé à des taux élevés dans le sang de patients T21 [98]. Dans un modèle murin, la thérapie génique combinant le gène de l'endostatine avec d'autres gènes ou une molécule médicamenteuse diminue considérablement la croissance et la survie des cancers du sein et du poumon [5,44].

L'action anti-angiogénique d'autres gènes situés sur le chromosome 21 a été validée dans des modèles murins de la trisomie 21.

Ainsi, chez la souris Ts65Dn, il a été montré une réduction de la croissance de tumeurs (mélanome et carcinome pulmonaire) corrélée à une diminution significative de la densité vasculaire de celles-ci [4]. Ce résultat a été également observé pour des tératomes dérivés de cellules

souches pluripotentes induites de patients trisomiques 21 inoculées dans des souris immuno-déficientes [4]. Les résultats de Beak et al. montrent que la surexpression des gènes *Dscr1* (*Rcan1*) et *Dyrk1*, présents en trois exemplaires aussi bien chez la souris Ts65Dn que chez les patients trisomiques 21, dans les cellules endothéliales rendent celles-ci moins sensibles au VEGF via la voie de signalisation VEGF-calcineurin-NFAT et participe ainsi à la suppression de l'angiogenèse tumorale [4]. Chez la souris Tc1, dans laquelle *Dscr1* n'est pas tripliqué, il a également été observé une réduction de la croissance de ces mêmes tumeurs liée à une diminution de l'angiogenèse tumorale [68]. L'effet anti-angiogénique serait de même médié par une diminution de la sensibilité des cellules endothéliales au facteur de croissance vasculaire VEGF mais cette fois du fait d'un défaut d'internalisation cellulaire du récepteur VEGFR2 [68]. Cet effet anti-angiogénique, spécifique de l'angiogenèse tumorale, a été attribué à la présence en trois exemplaires d'*ADAMTS1*, déjà connu pour son rôle anti-angiogénique [42], et des gènes *ERG*, *JAM-B* et *PTTG1IP* [68].

### Rôle protecteur du stroma

Les carcinomes mammaires, rares chez les patientes trisomiques 21, sont des tumeurs riches en stroma (90% de leur masse) tandis que les tumeurs fréquentes telles que les lymphomes, les sarcomes, et les rétinoblastomes sont pauvres en stroma. Le microenvironnement stromal pourrait ainsi jouer un rôle inhibiteur sur la formation de tumeurs mammaires dans le contexte de la trisomie 21. Ainsi, il a été observé une baisse de la prolifération cellulaire d'une lignée de carcinome mammaire mise en contact avec une MEC sécrétée par des fibroblastes T21 *in vitro*, par rapport à celle des cellules en contact avec une MEC sécrétée par de fibroblastes euploïdes [6].

Le tissu cancéreux est constitué de cellules cancéreuses baignant dans le stroma, un tissu nourricier et de soutien non tumoral. Le stroma d'une tumeur est composé de différents types cellulaires tels que des fibroblastes, des cellules immunitaires et inflammatoires, de néovaisseaux sanguins et d'une matrice extracellulaire au sein de laquelle diffusent de nombreux composants solubles (facteurs de croissance, cytokines). Les fibroblastes, en particulier, jouent un rôle déterminant dans l'induction et la progression tumorale ainsi que dans l'acquisition des potentialités métastatiques. Ils sont sources de facteurs de croissance et de protéases capables de dégrader la MEC ou de libérer de la surface cellulaire des facteurs de croissance, médiateurs importants dans les interactions stroma-tumeurs capables de moduler des activités biologiques diverses comme l'inflammation, l'angiogenèse et l'apoptose (*fibroblast growth factor* [FGF]), (*transforming growth factor* [TGF $\beta$ ]), (*epidermal growth factor* [EGF]) [8,26].

La composition et l'organisation tridimensionnelle (3D) de la MEC peuvent également avoir un effet suppresseur ou promoteur de tumeurs. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire (dimères d'une sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ ) dont la liaison à des constituants de la MEC aboutit à l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la différenciation, la

prolifération et la migration cellulaire. Ce sont donc d'importants régulateurs du phénotype épithélial mammaire (polarisation cellulaire, sécrétion lactée ...) mais elles jouent également un rôle dans la formation et la progression tumorale notamment à travers la voie de signalisation Rac et de la PI3 kinase (contrôle du cycle cellulaire et migration cellulaire, respectivement). L'activation de telle ou telle voie de transduction intracellulaire dépend de l'interaction entre les intégrines et leurs ligands. Par exemple, la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 est plus réduite lorsque les cellules sont mises en culture sur de la laminine par rapport à du collagène I et cette différence de prolifération serait due à l'activation de la voie de signalisation Rac/JNK/c-Jun (prolifération) lorsque les cellules croissent sur le collagène I [94].

La composition et l'organisation 3D de la MEC affectent sa rigidité, notamment lorsqu'il y a accumulation de l'un de ses constituants tel que le collagène [54]. Dans le sein, les aires de forte densité mammographique sont associées à une accumulation de collagène fibrillaire et à un risque élevé de carcinomes mammaires [2,9]. Chez un modèle murin présentant une densité mammaire liée à une accumulation de collagène I, il a été montré une augmentation significative du nombre de tumeurs et une propension plus importante de ces tumeurs à réaliser des métastases vers les poumons [62]. La présence d'une MEC altérée, rendue fibrotique par une augmentation de collagène V, favorise également la progression tumorale [91]. Par ailleurs, autour de la tumeur, les fibres de collagène se réorganisent en faisceaux de fibres parallèles, perpendiculaires à la tumeur, une organisation qui semble favoriser l'invasion des cellules tumorales [95]. Cette organisation orientée particulière de la MEC de carcinomes mammaires serait le fait de fibroblastes exprimant le syndecan-1, un protéoglycane membranaire dont l'apparition dans le stroma réactif constitue un facteur de mauvais pronostic [46].

Il n'a pas encore été montré si la rigidité de la MEC participait davantage à l'initiation ou à la progression tumorale mais une hypothèse a été avancée. En poussant sur une MEC rigide, les cellules épithéliales mammaires déclencheraient un phénotype contractile dépendant de la voie de signalisation Rho. *In vitro*, les modèles cellulaires montrent que sur une matrice rigide, la contractilité cellulaire est insuffisante pour mobiliser la MEC comme cela est possible sur une matrice peu dense [93]. À l'intérieur de la cellule se développerait alors une tension isométrique ayant pour conséquence une augmentation du nombre de points focaux d'adhésion à la membrane cellulaire. La plus forte densité en adhésions focales entraînerait l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire incluant celle de FAK, Src, des petites GTPases, de ERK et de la PI3 kinase, voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire.

Dans la trisomie 21, la MEC et les fibroblastes présentent un phénotype particulier. Le derme de fœtus T21 présente en effet un enrichissement en collagène VI, particulièrement en COLVIA1 dont le gène est situé sur le chromosome 21, mais également en collagène de type III et V [87]. Une proportion accrue de collagène VI a également été détectée dans les coussins endocardiques de cœurs T21 au cours du développement embryonnaire et fœtal [24]. Dans le tissu ventriculaire de fœtus T21, il a été observé une

surexpression d'une quarantaine de gènes codant des protéines d'adhésion et de la MEC parmi lesquels des gènes de la famille des ADAMTS, du collagène de type I, III, V, VI, et XV, de la fibronectine et de la fibuline, ainsi que des métalloprotéases [16]. L'organisation de constituants de la MEC dans le derme de fœtus T21 montre que les fibres de collagènes VI sont arrangées de façon plus denses mais également plus irrégulières que dans le derme de fœtus contrôles tandis que les fibres de collagène de type I sont plus largement espacées [10]. In vitro, des fibroblastes cutanés T21 montrent les mêmes capacités d'adhésion sur la fibronectine et le collagène de type I que des fibroblastes euploïdes. En revanche, les fibroblastes T21 montrent une capacité supérieure d'adhésion sur une matrice de collagène VI [34]. Cette capacité accrue d'adhésion mais aussi de prolifération des fibroblastes T21 cutanés explantés sur une matrice de collagène VI in vitro est reproduite par un modèle cellulaire murin fibroblastique dit transchromosomique, car porteur d'un chromosome 21 humain, pour lequel la migration cellulaire se trouve également réduite [19].

À ce jour, nous ne savons pas si les cellules épithéliales T21 présentent comme les fibroblastes T21 des propriétés d'adhésion et de migration modifiées sur une MEC T21 et il pourrait être possible que l'organisation et la composition particulière de la MEC T21 ne produisent pas un environnement stromal propice, c'est-à-dire une matrice suffisamment rigidifiée pour favoriser la prolifération et la survie des cellules tumorales.

## Apoptose cellulaire

Les superoxyde dismutases forment une famille de métalloprotéines importantes du système de défense de l'organisme contre les radicaux libres en catalysant la dismutation du radical superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Une des voies de développement de traitements antitumoraux est d'entraîner la mort des cellules tumorales en les rendant plus sensibles au stress oxydatif. Ainsi, il a été montré qu'en augmentant la quantité de superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) ou cytosolique (CuZnSOD) par thérapie génique dans des lignées de carcinomes mammaires, il en résultait une diminution de la croissance cellulaire in vitro, théoriquement par une accumulation de peroxyde d'hydrogène dans la cellule et une augmentation de ses effets toxiques [92]. La forme cytosolique CuZnSOD (*copper-zinc superoxyde dismutase*) est codée par le gène *SOD-1* localisé en 21q22.1. Chez les patients trisomiques 21, l'activité de cette enzyme a été observée augmentée de 50 % dans les érythrocytes [85] et un déséquilibre entre l'activité de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase (GPX) a été rapporté à la production de radicaux libres dans les cellules T21 [18]. Une élévation de peroxyde d'hydrogène endogène dans les cellules T21 pourrait aboutir à une induction précoce de l'apoptose cellulaire comme cela a pu être observé par exemple dans les cultures primaires de cellules neuronales T21 [12] ou pour les thymocytes et les neurones de souris Ts65Dn [58]. Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène induit l'expression du gène *Ets-2* chez la souris [71], qui comme nous l'avons vu, pourrait jouer un rôle suppresseur de tumeur dans la trisomie 21.

## Discussion

Le profil tumoral chez les patients trisomiques 21 est tout à fait unique, avec un risque très élevé de leucémies durant l'enfance mais un risque faible global de cancers solides à tous les âges, avec néanmoins une fréquence un peu plus élevée de certains cancers comme les tumeurs germinales et le rétinoblastome. Le syndrome de Down représente alors un modèle d'étude in vivo unique pour mieux comprendre les mécanismes de la leucémogénèse mais aussi ceux pouvant conférer un effet protecteur vis-à-vis du développement de tumeurs solides. La compréhension des mécanismes exacts de protection mis en jeu dans la trisomie 21 permettra d'ouvrir la voie à la recherche et au développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour les tumeurs des personnes non trisomiques 21. Ces pistes sont sans doute à rechercher à travers les cascades de signalisation impliquées dans l'apoptose, la suppression de l'angiogénèse tumorale et dans les interactions cellules-stroma, plus particulièrement dans les voies de transduction intracellulaire des signaux provenant de l'interaction des cellules avec les constituants de la MEC et leur organisation tridimensionnelle. Indubitablement, un effet de dosage de gènes à effet suppresseur de tumeurs sur le chromosome 21 surnuméraire participe à ce phénomène. Cependant, l'observation d'une dérégulation transcriptionnelle globale et secondaire à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire dans différents types cellulaires T21 [3,17,20,69] suggère que des gènes, situés sur d'autres chromosomes, peuvent participer d'une manière ou d'une autre à ce phénomène de protection. L'enjeu réside maintenant dans l'identification de ces gènes et leurs implications dans l'oncogénèse ou l'effet suppresseur pour certaines tumeurs. Il n'en reste pas moins que d'autres facteurs peuvent également intervenir comme la faible exposition des patients T21 aux agents cancérigènes tels que les UV, l'alcool et le tabac. Le profil hormonal particulier des patientes trisomiques 21, qui sont souvent nullipares mais dont la ménopause est précoce, pourrait également contribuer à la protection contre le cancer du sein [78].

## Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## Remerciements

Nous remercions le Club Kiwanis de Chamalières (Puy-de-Dôme, France) et le Club Sorooptimist d'Issoire (Puy-de-Dôme, France) ainsi que l'Association des morphologistes pour leur soutien financier des travaux de Master II « Génétique et Physiologie » (Université d'Auvergne) de Mlle Wiem Ayed.

## Références

- [1] Ait Yahya-Graison E, et al. Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down

- syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):475–91.
- [2] Alowami S, et al. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Res* 2003;5(5):R129–35.
  - [3] Altug-Teber O, et al. Specific transcriptional changes in human fetuses with autosomal trisomies. *Cytogenet Genome Res* 2007;119(3–4):171–84.
  - [4] Baek KH, et al. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 2009;459(7250):1126–30.
  - [5] Bai RZ, et al. Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:31.
  - [6] Benard J, Beron-Gaillard N, Satge D. Down's syndrome protects against breast cancer: is a constitutional cell microenvironment the key? *Int J Cancer* 2005;113(1):168–70.
  - [7] Bercovich D, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* 2008;372(9648):1484–92.
  - [8] Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(7):506–20.
  - [9] Boyd NF, et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(12):886–94.
  - [10] Brand-Saberi B, et al. Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell Tissue Res* 1994;277(3):465–75.
  - [11] Brichard B, et al. Down syndrome: possible predisposition to retinoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2003;41(1):73–4.
  - [12] Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995;378(6559):776–9.
  - [13] Cabelof DC, et al. Mutational spectrum at GATA1 provides insights into mutagenesis and leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 2009;114(13):2753–63.
  - [14] Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010;10(1):23–36.
  - [15] Chessells JM, et al. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Arch Dis Child* 2001;85(4):321–5.
  - [16] Conti A, et al. Altered expression of mitochondrial and extracellular matrix genes in the heart of human fetuses with chromosome 21 trisomy. *BMC Genomics* 2007;8:268.
  - [17] Costa V, et al. Massive-scale RNA-Seq analysis of non ribosomal transcriptome in human trisomy 21. *PLoS One* 2011;6(4):e18493.
  - [18] de Haan JB, et al. An altered antioxidant balance occurs in Down syndrome fetal organs: implications for the 'gene-dosage effect' hypothesis. *J Neural Transm Suppl* 2003;67:67–83.
  - [19] Delom F, et al. Transchromosomal cell model of Down syndrome shows aberrant migration, adhesion and proteome response to extracellular matrix. *Proteome Sci* 2009;7:31.
  - [20] FitzPatrick DR, et al. Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet* 2002;11(26):3249–56.
  - [21] Fonatsch C. The role of chromosome 21 in hematology and oncology. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49(6):497–508.
  - [22] Frost BM, et al. Cellular cytotoxic drug sensitivity in children with acute leukemia and Down's syndrome: an explanation to differences in clinical outcome? *Leukemia* 2000;14(5):943–4.
  - [23] Fulcher T, et al. Diabetic retinopathy in Down's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1998;82(4):407–9.
  - [24] Gittenberger-de Groot AC, et al. Collagen type VI expression during cardiac development and in human fetuses with trisomy 21. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;275(2):1109–16.
  - [25] Glasson EJ, et al. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet* 2002;62(5):390–3.
  - [26] Grose R, Dickson. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):179–86.
  - [27] Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:519–61.
  - [28] Hasle H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol* 2001;2(7):429–36.
  - [29] Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 2000;355(9199):165–9.
  - [30] Hertzberg L, et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood* 2010;115(5):1006–17.
  - [31] James R, et al. Acute leukemia in children with Down's syndrome: the importance of population-based study. *Haematologica* 2008;93(8):1262–3.
  - [32] Jemal A, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69–90.
  - [33] Johansson B, Harrison CJ. Acute myeloid leukemia. In: Heim S, Mitelman F, editors. *Cancer Cytogenetics*. 3rd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2009. p. 45–139.
  - [34] Jongewaard IN, et al. Beta 1 integrin activation mediates adhesive differences between trisomy 21 and non-trisomic fibroblasts on type VI collagen. *Am J Med Genet* 2002;109(4):298–305.
  - [35] Kearney L, et al. Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009;113(3):646–8.
  - [36] Kim IK, et al. Clinical significance of age at the time of diagnosis among young breast cancer patients. *J Breast Cancer* 2011;14(4):314–21.
  - [37] Korenberg JR. Molecular mapping of the Down syndrome phenotype. *Prog Clin Biol Res* 1990;360:105–15.
  - [38] Korenberg JR, et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(11):4997–5001.
  - [39] Krivit W, Good RA. Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia; report of a nationwide survey. *AMA J Dis Child* 1957;94(3):289–93.
  - [40] Kuhn DE, et al. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370(3):473–7.
  - [41] Kwak HI, et al. Inhibition of breast cancer growth and invasion by single-minded 2s. *Carcinogenesis* 2007;28(2):259–66.
  - [42] Lee NV, et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J* 2006;25(22):5270–83.
  - [43] Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med* 1959;143(11–12):256–65.
  - [44] Liu LL, et al. Combined IFN-gamma-endostatin gene therapy and radiotherapy attenuates primary breast tumor growth and lung metastases via enhanced CTL and NK cell activation and attenuated tumor angiogenesis in a murine model. *Ann Surg Oncol* 2009;16(5):1403–11.
  - [45] Loughran SJ, et al. The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2008;9(7):810–9.
  - [46] Loussouarn D, et al. Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas. *Br J Cancer* 2008;98(12):1993–8.
  - [47] Merrick J. Incidence and mortality of Down syndrome. *Isr Med Assoc J* 2000;2(1):25–6.

- [48] Moffett P, Reece M, Pelletier J. The murine Sim-2 gene product inhibits transcription by active repression and functional interference. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):4933–47.
- [49] Muntean AG, et al. Transcription factor GATA-1 and Down syndrome leukemogenesis. *Leuk Lymphoma* 2006;47(6):986–97.
- [50] Murdoch JC, et al. Down's syndrome: an atheroma-free model? *Br Med J* 1977;2(6081):226–8.
- [51] Ng AP, et al. Trisomy of Erg is required for myeloproliferation in a mouse model of Down syndrome. *Blood* 2010;115(19):3966–9.
- [52] Okuda T, et al. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 1998;91(9):3134–43.
- [53] Ou YH, et al. The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1. *EMBO J* 2007;26(17):3968–80.
- [54] Paszek MJ, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 2005;8(3):241–54.
- [55] Patja K, Eero P, Iivanainen M. Cancer incidence among people with intellectual disability. *J Intellect Disabil Res* 2001;45(Pt 4):300–7.
- [56] Patja K, et al. Cancer incidence of persons with Down syndrome in Finland: a population-based study. *Int J Cancer* 2006;118(7):1769–72.
- [57] Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum Genet* 2009;126(1):195–214.
- [58] Paz-Miguel JE, et al. Reactive oxygen intermediates during programmed cell death induced in the thymus of the Ts(1716)65Dn mouse, a murine model for human Down's syndrome. *J Immunol* 1999;163(10):5399–410.
- [59] Prandini P, et al. Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet* 2007;81(2):252–63.
- [60] Preudhomme C, et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 2000;96(8):2862–9.
- [61] Pritchard M, et al. Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. Washington D. C. September 28–October 1, 2007. *Cytogenet Genome Res* 2008;121(1):67–77.
- [62] Provenzano PP, et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* 2008;6:11.
- [63] Pui CH, et al. Immunophenotypes and karyotypes of leukemic cells in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1993;11(7):1361–7.
- [64] Rabin KR, Whitlock JA. Malignancy in children with trisomy 21. *Oncologist* 2009;14(2):164–73.
- [65] Rahmani Z. APRO4 negatively regulates Src-tyrosine kinase activity in PC12 cells. *J Cell Sci* 2006;119(Pt. 4):646–58.
- [66] Rainis L, et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res* 2005;65(17):7596–602.
- [67] Ravaud A. The mechanism of tumor angiogenesis. *Prog Urol* 2007;17(1 Suppl. 1):144–7.
- [68] Reynolds LE, et al. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature* 2010;465(7299):813–7.
- [69] Rozovski U, et al. Genome-wide expression analysis of cultured trophoblast with trisomy 21 karyotype. *Hum Reprod* 2007;22(9):2538–45.
- [70] Salek-Ardakani S, et al. ERG is a megakaryocytic oncogene. *Cancer Res* 2009;69(11):4665–73.
- [71] Sanij E, et al. Ets-2 is induced by oxidative stress and sensitizes cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis: implications for Down's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287(4):1003–8.
- [72] Satge D, Benard J. Carcinogenesis in Down syndrome: what can be learned from trisomy 21? *Semin Cancer Biol* 2008;18(5):365–71.
- [73] Satge D, Rickert CH. A medical enigma: persons with Down syndrome do not develop medulloblastoma. *Neuroepidemiology* 2009;32(2):164.
- [74] Satge D, et al. A lack of neuroblastoma in Down syndrome: a study from 11 European countries. *Cancer Res* 1998;58(3):448–52.
- [75] Satge D, et al. Breast cancer in women with trisomy 21. *Bull Acad Natl Med* 2001;185(7):1239–52, discussion 1252–4.
- [76] Satge D, et al. A tumor profile in Down syndrome. *Am J Med Genet* 1998;78(3):207–16.
- [77] Satge D, Vekemans M. Down syndrome patients are less likely to develop some (but not all) malignant solid tumours. *Clin Genet* 2011;79(3):289–90 [author reply 291–2].
- [78] Schupf N, et al. Early menopause in women with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 1997;41(Pt. 3):264–7.
- [79] Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(16):2462–78.
- [80] Sullivan SG, et al. The profile and incidence of cancer in Down syndrome. *J Intellect Disabil Res* 2007;51(Pt. 3):228–31.
- [81] Sullivan SG, et al. The incidence of cancer in people with intellectual disabilities. *Cancer Causes Control* 2004;15(10):1021–5.
- [82] Sussan TE, et al. Trisomy represses Apc(Min)-mediated tumours in mouse models of Down's syndrome. *Nature* 2008;451(7174):73–5.
- [83] Tandonnet J, et al. Myeloid leukaemia in children with Down syndrome: report of the registry-based French experience between 1990 and 2003. *Pediatr Blood Cancer* 2003;54(7):927–33.
- [84] Taub JW, et al. Expression of chromosome 21-localized genes in acute myeloid leukemia: differences between Down syndrome and non-Down syndrome blast cells and relationship to in vitro sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. *Blood* 1999;94(4):1393–400.
- [85] Torsdottir G, et al. Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in patients with Down's syndrome. *Pharmacol Toxicol* 2001;89(6):320–5.
- [86] van de Water W, et al. Association between age at diagnosis and disease-specific mortality among postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. *JAMA* 2012;307(6):590–7.
- [87] von Kaisenberg CS, et al. Morphological classification of nuchal skin in human fetuses with trisomy 21, 18, and 13 at 12–18 weeks and in a trisomy 16 mouse. *Anat Embryol (Berl)* 1998;197(2):105–24.
- [88] Vyas P, Crispino JD. Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2007;19(1):9–14.
- [89] Warkany J. Trisomy 13-15 DL and Turner syndrome, in congenital malformations. St. Louis, MO: Year Book Med Publ; 1975. p. 296–303, 1123–36.
- [90] Wechsler J, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 2002;32(1):148–52.
- [91] Wenstrup RJ, et al. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 2004;279(51):53331–7.
- [92] Weydert CJ, et al. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radic Biol Med* 2006;41(2):226–37.
- [93] Wozniak MA, et al. ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the

- physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J Cell Biol* 2003;163(3):583–95.
- [94] Xie JW, Haslam SZ. Extracellular matrix, Rac1 signaling, and estrogen-induced proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008;110(2):257–68.
- [95] Yang N, et al. Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility. *Am J Pathol* 2011;178(1):325–35.
- [96] Yang Q, Rasmussen SA, Friedman JM. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* 2002;359(9311):1019–25.
- [97] Yu J, et al. Methylation-mediated downregulation of the B-cell translocation gene 3 (BTG3) in breast cancer cells. *Gene Expr* 2008;14(3):173–82.
- [98] Zorick TS, et al. High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours. *Eur J Hum Genet* 2001;9(11):811–4.
- [99] Zwaan CM, et al. Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome. *Blood* 2002;99(1):245–51.
- [100] Zwaan MC, et al. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Pediatr Clin North Am* 2008;55(1):53–70, x.