

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2017

THESE N°: 47

TRISOMIE 21 :
REVUE DE LITTÉRATURE, APPORT DE L'HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. Asma ASSIAD
Née le 27 Octobre 1989
Médecin Interne du CHU Ibn Sina de Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Médecine

MOTS CLES : Trisomie 21 – Diagnostic prénatal – Diagnostic post natal –
L'hybridation in situ fluorescente.

JURY

Mr. M. ZOUHDI

Professeur de Microbiologie

Mr. O. CHOKAIRI

Professeur d'Histologie Embryologie

Mme. F. JABOUIRIK

Professeur de Pédiatrie

Mr. A. DAMI

Professeur de Biochimie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

"سبحانك لا علم لنا
إلا ما علمتنا
إنك أنت العزيز الحكيم"

سورة البقرة: الآية: 31

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS
ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne – Clinique Royale
Anesthésie -Réanimation
pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes

Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUY Mohamed

Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADN AOUI Mohamed
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OU AZZANI Taïbi Mohamed Réda

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOU DA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OU AZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL BARDOUNI Ahmed

Médecine Interne – *Doyen de la FMPR*
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – *Doyen de la FMPO*
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – *Dir. du Centre National PV*
Chimie thérapeutique *V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC*

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie



Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques *Doyen de la FMPA*
Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie

Pr. EL HASSANI My Rachid
 Pr. ERROUGANI Abdelkader
 Pr. ESSAKALI Malika
 Pr. ETTAYEBI Fouad
 Pr. HADRI Larbi*
 Pr. HASSAM Badredine
 Pr. IFRINE Lahssan
 Pr. JELTHI Ahmed
 Pr. MAHFOUD Mustapha
 Pr. RHRAB Brahim
 Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
 Pr. ABDELHAK M'barek
 Pr. BELAIDI Halima
 Pr. BENTAHILA Abdelali
 Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
 Pr. BERRADA Mohamed Saleh
 Pr. CHAMI Ilham
 Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
 Pr. JALIL Abdelouahed
 Pr. LAKHDAR Amina
 Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
 Pr. AMRAOUI Mohamed
 Pr. BAIDADA Abdelaziz
 Pr. BARGACH Samir
 Pr. CHAARI Jilali*
 Pr. DIMOU M'barek*
 Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
 Pr. EL MESNAOUI Abbes
 Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
 Pr. HDA Abdelhamid*
 Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
 Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
 Pr. SEFIANI Abdelaziz
 Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
 Pr. BELKACEM Rachid
 Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
 Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
 Pr. GAOUZI Ahmed
 Pr. MAHFOUDI M'barek*
 Pr. OUADGHIRI Mohamed
 Pr. OUZEDDOUN Naima
 Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan

Radiologie
 Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
 Immunologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Médecine Interne
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique
 Traumatologie – Orthopédie
 Gynécologie –Obstétrique
 Dermatologie

Urologie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Neurologie
 Pédiatrie
 Gynécologie – Obstétrique
 Traumatologie – Orthopédie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie

Réanimation Médicale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Gynécologie Obstétrique
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Cardiologie - **Directeur HMI Med V**
 Urologie
 Ophtalmologie
 Génétique
 Réanimation Médicale

Radiologie
 Chirurgie Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Radiologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Néphrologie
 Cardiologie



Gynécologie-Obstétrique

Pr. BEN SLIMANE Lounis
 Pr. BIROUK Nazha
 Pr. ERREIMI Naima
 Pr. FELLAT Nadia
 Pr. HAIMEUR Charki*
 Pr. KADDOURI Nouredine
 Pr. KOUTANI Abdellatif
 Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
 Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
 Pr. TAOUFIQ Jallal
 Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
 Pr. BENOMAR ALI
 Pr. BOUGTAB Abdesslam
 Pr. ER RIHANI Hassan
 Pr. BENKIRANE Majid*
 Pr. KHATOURI ALI*

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
 Pr. AIT OUMAR Hassan
 Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
 Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
 Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
 Pr. ECHARRAB El Mahjoub
 Pr. EL FTOUH Mustapha
 Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
 Pr. ISMAILI Hassane*
 Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
 Pr. TACHINANTE Rajae
 Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
 Pr. AJANA Fatima Zohra
 Pr. BENAMR Said
 Pr. CHERTI Mohammed
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
 Pr. EL HASSANI Amine
 Pr. EL KHADER Khalid
 Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
 Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
 Pr. MAHASSINI Najat
 Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
 Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Urologie
 Neurologie
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie
 Neurologie – *Doyen de la FMP Abulcassis*
 Chirurgie Générale
 Oncologie Médicale
 Hématologie
 Cardiologie

Pneumophtisiologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phtisiologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Pneumo-phtisiologie
 Neurochirurgie
 Traumatologie Orthopédie- *Dir. Hop. Av. Marr.*
 Anesthésie-Réanimation *Inspecteur du SSM*
 Anesthésie-Réanimation
 Médecine Interne



Neurologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Générale
 Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Pédiatrie *Directeur Hop. Chekikh Zaied*
 Urologie
 Rhumatologie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Anatomie Pathologique
 Pédiatrie
 Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJILIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUECHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSE Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie



Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie

Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Nouredine*
 Pr. BAHIRI Rachid

Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie



Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 Pr. EL HAMZAoui Sakina*
 Pr. HAJJI Leila
 Pr. HESSISSEN Leila
 Pr. JIDAL Mohamed*
 Pr. LAAROUSSI Mohamed
 Pr. LYAGoubi Mohammed
 Pr. NIAMANE Radouane*
 Pr. RAGALA Abdelhak
 Pr. SBIHI Souad
 Pr. ZERAIDI Najia

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 Pr. AKJOUJ Said*
 Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 Pr. BENCHEIKH Razika
 Pr. BIYI Abdelhamid*
 Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 Pr. DOGHMI Nawal
 Pr. FELLAT Ibtissam
 Pr. FAROUDY Mamoun
 Pr. HARMOUCHE Hicham
 Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
 Pr. JROUNDI Laila
 Pr. KARMOUNI Tariq
 Pr. KILI Amina
 Pr. KISRA Hassan
 Pr. KISRA Mounir
 Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 Pr. MANSOURI Hamid*
 Pr. OUANASS Abderrazzak
 Pr. SAFI Soumaya*
 Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 Pr. SOUALHI Mouna
 Pr. TELLAL Saida*
 Pr. ZAHRAoui Rachida

Pédiatrie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie (mise en disponibilité)
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie
 Radiologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie



Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GHARIB Nouredine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhoussain*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MRABET Mustapha*
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Moncef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologique
Médecine préventive santé publique et hygiène
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Ophtalmologie

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZHAR Ali*
Pr. AGDR Aomar*
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AKHADDAR Ali*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMINE Bouchra
Pr. ARKHA Yassir
Pr. BELYAMANI Lahcen*
Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae*
Pr. BOUI Mohammed*
Pr. BOUNAIM Ahmed*
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
Pr. CHAKOUR Mohammed *
Pr. CHTATA Hassan Toufik*
Pr. DOGHMI Kamal*
Pr. EL MALKI Hadj Omar
Pr. EL OUENNASS Mostapha*
Pr. ENNIBI Khalid*
Pr. FATHI Khalid
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. KABBAJ Nawal
Pr. KABIRI Meryem
Pr. KARBOUBI Lamya
Pr. L'KASSIMI Hachemi*
Pr. LAMSAOURI Jamal*
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. MESKINI Toufik
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale

Médecine interne
Pédiatre
Chirurgie Générale
Neurologie
Neuro-chirurgie
Radiologie
Rhumatologie
Neuro-chirurgie
Anesthésie Réanimation
Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie orthopédique
Hématologie biologique
Chirurgie vasculaire périphérique
Hématologie clinique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Médecine interne
Gynécologie obstétrique
Rhumatologie
Gastro-entérologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Microbiologie *Directeur Hôpital My Ismail*
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Pédiatrie
Hématologie biologique
Chirurgie Générale
Radiologie
Cardiologie
Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique

Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie
 Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
 Pr. ABOUELALAA Khalil*
 Pr. BELAIZI Mohamed*
 Pr. BENCHEBBA Driss*
 Pr. DRISSI Mohamed*
 Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
 Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
 Pr. EL OUAZZANI Hanane*
 Pr. ER-RAJI Mounir
 Pr. JAHID Ahmed
 Pr. MEHSSANI Jamal*
 Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Traumatologie Orthopédique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumophtisiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie pathologique
 Psychiatrie
 Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
 Pr. AIT EL CADI Mina
 Pr. AMRANI HANCHI Laila
 Pr. AMOUR Mourad
 Pr. AWAB Almahdi
 Pr. BELAYACHI Jihane
 Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
 Pr. BENCHEKROUN Laila
 Pr. BENKIRANE Souad
 Pr. BENNANA Ahmed*
 0.
 Pr. BENSGHIR Mustapha*
 Pr. BENYAHIA Mohammed*
 Pr. BOUATIA Mustapha
 Pr. BOUABID Ahmed Salim*
 Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
 Pr. CHAIB Ali*
 Pr. DENDANE Tarek
 Pr. DINI Nouzha*
 Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali

Pharmacologie – Chimie
 Toxicologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Réanimation Médicale
 Anesthésie Réanimation
 Biochimie-Chimie
 Hématologie
 Informatique Pharmaceutique
 Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chimie Analytique
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie
 Cardiologie
 Réanimation Médicale
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation

Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
 Pr. ELFATEMI Nizare
 Pr. EL GUERROUJ Hasnae
 Pr. EL HARTI Jaouad
 Pr. EL JOUDI Rachid*
 Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLOUFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane*
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryim
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed*
 Pr. LATIB Rachida
 Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUI Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houda
 Pr. OUKABLI Mohamed*
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim*
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua*
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan*
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali*

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Radiologie
 Neuro-Chirurgie
 Médecine Nucléaire
 Chimie Thérapeutique
 Toxicologie
 Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

***Enseignants Militaires**



MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISI SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique

***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISI ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISI KARIM

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

***Enseignants Militaires**



AOUT 2015

Meziane meryem
Tahri latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie – chimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie – chimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biologie moléculaire
Biologie
Chimie Organique
Chimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines*





Dédicaces



A Allah

Tout puissant Qui m'a inspiré

Qui m'a guidé dans le bon chemin

Je vous dois ce que je suis devenue

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde



A MON PÈRE

*Le grand militant, qui a toujours été un exemple
pour ses enfants, qui m'a toujours poussé à me surpasser
dans tout ce que j'entreprends, qui m'a transmis cette
rage de vaincre et la faim de savoir.*

*Celui qui a été ma source de motivation, le moteur
de mes ambitions, qui m'a appris que le savoir
est une richesse que nul ne peut voler.*

*Je te serai cher père reconnaissant toute ma vie,
pour tout le mal que tu t'es donné pour moi à chaque
étape de ma vie, pour ta patience et ton amour.*

*J'espère être la fille que tu as voulu que je sois, et je
m'efforcerai d'être digne de ce que tu aurais souhaité que je sois.*

*Ce titre de Docteur en Médecine je le porterai fièrement
et je te le dédie tout particulièrement.*





A MA TENDRE MÈRE

*Le symbole du dévouement et du sacrifice, pour son amour
son écoute permanente et son soutien inconditionnel.*

*Ma mère qui a toujours été là dans les moments les plus
difficiles de ma vie, qui m'a soutenu et protéger. Je te dédie cette
thèse maman pour t'exprimer toute ma gratitude et je te dis tout
simplement : je t'aime maman, Merci.*





A ma princesse , ma petite sœur Marwa

*En témoignage de l'attachement,
de l'amour et de l'affection que je porte pour toi.*

*Je te dédie ce travail avec
Tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*





A tous les membres de ma famille,

Petits et grands

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de
mon affection la plus sincère.*





A tous mes très chers amis (es)

*Il me serait difficile de vous citer tous,
vous êtes dans mon cœur, affectueusement.*

*En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de
tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie
ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de
bonheur.*

A tous mes amis de L'AMIR

En souvenir des bons moments passés ensemble

A mes amis de promotion ;

Avec mon souhait de bonheur et de réussite





Remerciements



*A notre maître et Présidente de thèse
Madame le Professeur ZOUHDI Mimoum
Professeur de Microbiologie*

*Vous avez aimablement accepté de présider
le jury de cette thèse, nous en sommes touchés.*

*Lors de nos années d'études universitaires, nous avons
eu la chance de compter parmi vos étudiants ; nous avons ainsi
pu apprécier la clarté et la précision de l'enseignement que vous
nous avez dispensé. Avec tout le respect que nous vous devons,
veuillez trouvez ici, l'expression de notre profond respect
et nos vifs remerciements.*





*A notre maître et Rapporteur de thèse
Monsieur le professeur CHOKAIRI Omar
Professeur D'histologie embryologie*

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche
d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation.*

*Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil,
malgré vos obligations professionnelles.*

*Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre
gentillesse méritent toute admiration.*

*Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre
profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.*





*A notre maître et juge de thèse
Madame le professeur JABOUIRIK Fatima
Professeur de pédiatrie*

*Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites en
acceptant de siéger parmi les membres de jury.*

*Je vous dédie ce travail qui reflète ce qu'on a appris
de votre rigueur, ingéniosité et votre grand
sens de responsabilité.*

*On espère marcher sur vos pas et atteindre
cette quintessence scientifique que vous partagez
généreusement avec vos étudiants et qui s'est déteinte
sur notre travail au quotidien avec vous.*





A notre maître et juge de thèse

Monsieur le professeur Abdellah DAMI

Professeur de Biochimie

*Vous nous faites l'honneur d'accepter avec une très grande
amabilité de siéger parmi notre jury de thèse.*

*Veuillez accepter ce travail maître, en gage de notre grand
respect et notre profonde reconnaissance*





Sommaire

INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	4
EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE	8
A. L'âge maternel	9
B. AUTRES FACTEURS DE RISQUE	11
PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TRISOMIE 21 :	13
1. MECANISME DE SURVENUE DE L'ANOMALIE GENETIQUE :.....	14
2. MECANISMES POUVANT EXPLIQUER LES ANOMALIES BIOLOGIQUES ET LA SYMPTOMATOLOGIE clinique:	22
1. L'amplification du gène codant pour le récepteur des interférons:.....	23
2. L'augmentation de l'expression du gène codant pour la chaîne β	24
3. Le gène codant pour la $\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ su peroxyde dismutase.....	25
4. Deux protooncogènes ont été localisés sur le chromosome 21	25
5. Rôle du gène codant pour un polypeptide de l'amylose cérébrale.	25
6. Autres arguments.	26
3) LES DESEQUILIBRES BIOCHIMIQUES DANS LA TRISOMIE 21 ENTRAINANT UNE DEBILITE MENTALE :.....	27
1. Le dysfonctionnement thyroïdien :.....	27
2. Métabolisme intermédiaire des purines / équilibre méthionine- homocystéine- adénosine:	28
3. Métabolisme des folates et de la biophtérine :	29
4. L'équilibre entre différents acides aminés:.....	30

DIAGNOSTIC POST NATAL:	31
1) CIRCONSTANCES DIAGNOSTIC:.....	32
2) ASPECTS CLINIQUES:	32
a) Syndrome dysmorphique :	32
(a)L'aspect de la tête et du visage est évocateur:.....	32
(b)La main est particulièrement caractéristique:.....	33
b) Le retard psychomoteur:	34
c) Les malformations:	35
(a)Les malformations cardiaques:	35
(b)Les malformations digestives :	35
3) MOYENS DIAGNOSTIC :	36
a) Bilan biologique :.....	36
b) Bilan radiologique:	37
c) Cytogénétique :.....	37
(a)Techniques:	37
1) Le caryotype :.....	37
2) Autres techniques:	39
(b) Résultats:.....	40
1) Caryotype normal	40
2) Caryotype trisomique:.....	42
c) Le conseil génétique:	44

DEPISTAGE ANTENATAL DE LA TRISOMIE 21	45
A. MORPHOLOGIE ANTENATALE : L'ECHOGRAPHIE OBSTETRICALE	46
1. La clarté nucale	47
2. Les autres signes :	50
B. LES MARQUEURS BIOLOGIQUES: MARQUEURS SERIQUES MATERNELS	52
1. Alfafoetoprotéine (AFP)	52
2. Human Chorionic Gonadotrophin et Beta Human Chorionic Gonadotrophin (HCG et B-HCG).....	53
3. Œstriol non conjuguée (uE3).....	54
4. Protéine Plasmatique Placentaire A (PAPP-A).....	54
5. Les autres marqueurs.....	54
C. STRATEGIES DE DEPISTAGE.....	56
1. Dépistage du premier trimestre.....	56
2. Dépistage du deuxième trimestre.....	57
3. Dépistage séquentiel intégré.....	57
4. Calcul et interprétation du risque.....	58
HYBRIDATION EN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)	62
I GENERALITES ET HISTORIQUE :	63
II PRINCIPE ET ETAPES DE L'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE :.....	65
III. PARAMETRES INFLUENÇANT L'HYBRIDATION IN SITU :	68

III.1.Accessibilite de la sonde génomique :	68
III.1.1 Dénaturation:	68
III-1-2- Elimination des protéines cytoplasmiques résiduelles:	69
III-1-3- Le pH des solutions:	69
III.2 Paramètre influençant la formation et la stabilité de L'hybride.....	69
III.2.1 Théorie de la stabilité des hybrides :	69
III-2-2- Composition de la solution d'hybridation:	70
III.3 La spécificité de l'hybridation	71
III ·3·1- La taille et la nature de la sonde:	71
III ·3·2· Concentration de la sonde dans le milieu d'hybridation:	72
III -3·3· Lavages post hybridation :	72
IV- PREPARATION DE LA SONDE	73
IV.1 Définition:	73
IV. 2. TYPE DE SONDES	74
IV-2-1- ADN cloné dans un vecteur:	74
a. Méthodes d'obtention de l'ADN:	74
b. Le clonage moléculaire: les différents vecteurs de clonage.	75
IV-2-2- ADN synthétisé in vitro:	77
a. Oligonudéotides synthétiques:	77
b- Produit de PCR :	77

IV.3. Les sondes disponibles	77
IV-3-1- Les sondes de peinture chromosomique:	77
IV-3-2-les sondes alpha satellites:.....	79
IV-3-3- Les sondes locus spécifiques:.....	79
IV-3-4- Les sondes télomériques et subtélomériques :	80
IV.4. Marquage des ADN à l'usage des sondes :.....	81
IV.4 1- Marquage radioactif:.....	81
VI-4-2- Marquage non radioactif:	81
a- Marquage indirect de l'ADN:	81
b- Marquage direct de l'ADN:.....	82
C- Les techniques de marquage de l'ADN:.....	83
C.1. Procédés enzymatiques.....	83
C.2. Procédés chimiques :	88
d. vérification de marquage :.....	88
e· Purification de la sonde:.....	89
V. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE :	90
V.1 Culture Cellulaire	90
V-1-1- Lymphocytes:.....	90
V-1-2- Fibroblaste:.....	91
V-1-3- lignées cellulaires:	92
V-1-4- Les prélèvements pour diagnostic prénatal:	92

a- Amniocytes :	92
b. Villosités choriales :	94
c. Le sang fœtal:	94
d. Les cellules cœlomiques :	94
V -1-5- Prélèvement de patients leucémiques:	95
a- Moelle osseuse:	95
b- Sang:	96
c. Tissus lymphoïdes:	96
d- Tumeurs solides:	97
e- Cellules germinales:	97
V.2. Réalisation des préparations chromosomiques	98
V-2-1- Synchronisation des cultures cellulaires:	98
a. Les agents chimiques:	98
b- Les agents physiques:	99
V-2-2-les préparations chromosomiques:	99
a. Les chromosomes prométaphasiques et métaphasiques:	99
a.1 blocage des cultures en mitose:	99
a-2- Traitement hypotonique:	99
a.3 fixation:	100
a-4- Etalement:	101
b- fibres d'ADN nu:	101

VI- OBSERVATION DES HYBRIDES :	102
6.1. Matériaux d'observations	102
VI-1-1- le microscope à lumière transmise:	102
VI-1-2- le microscope à épifluorescence :	102
VI-1-3- Le microscope confocal à balayage laser:	105
VI-2-Détection des sondes :	105
VI-2-1- Détection colorimétrique :	105
VI-2-2- Détection fluorescente:	106
VI. 3 La détection	107
VI-3-1- La détection immédiate:	107
VI-3-2- Détection après amplification du signal:	108
a. L'immunodétection :	108
b. Utilisation du système avidine biotine	111
VI.4 La coloration des chromosomes et leur marquage :	113
VI.4.1.La coloration :	113
a- Les colorants non fluorescents:	113
b. Les colorants fluorescents:	113
VI-4-2- Le marquage:	114
a- Détection calorimétrique:	114
b- Détection fluorescente :	114

VII- L'HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE ET NOMENCLATURE INTERNATIONALE :	116
VIII. APPLICATIONS DE L'HYBRIDATION IN SITU :	116
VIII. 1 Apport de la FISH en diagnostic anténatal:	117
a. Sondes utilisées en anténatale:	117
b- Recherche d'aneuploïdies par hybridation in situ fluorescente sur cellule non cultivées:	118
c· Recherche microdélétionnelle :	120
d· détermination du sexe du fœtus :	120
VIII.2 Apport de l'hybridation in situ en diagnostic préimplantatoire :	120
VIII.3 Apport de la FISH en diagnostic préconceptionnel :	122
VIII.4 Contribution de la FISH dans la compréhension de la pathologie de la reproduction:	125
VIII.5 Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes	127
CONCLUSION	128
RESUMES	130
BIBLIOGRAPHIE	134



Introduction

La trisomie 21 se définit par la présence d'un chromosome 21 surnuméraire dans la garniture chromosomique d'un individu, ce chromosome 21 surnuméraire se trouve dans une partie ou la totalité des cellules.

Cette pathologie se rencontre avec une incidence relativement élevée de l'ordre de 1 cas pour 700 naissances. Le signe majeur qui caractérise cette affection est représenté par le retard mental. La dysmorphie faciale est caractéristique, elle facilite la reconnaissance de cette affection et lui a donné le surnom de «mongolisme». Les malformations viscérales et les complications nombreuses que connaît l'état de santé de ces patients déterminent à la fois leur pronostic vital et fonctionnel.

Le caryotype est un examen indispensable pour confirmer ou infirmer une trisomie 21. Il donne aussi le type de trisomie, qui peut être une trisomie libre et homogène, une forme mosaïque réputée pour avoir un bon pronostic, une forme avec translocation qui nécessite une enquête familiale ou d'autres formes plus complexes.

La prise en charge de la trisomie 21 est très complexe, et doit obéir à un certain nombre de recommandations:

- Un diagnostic précoce qui déterminera l'état de santé réel de ces enfants,
- Une prise en charge multidisciplinaire,
- Un suivi régulier et programmé,

- Une admission dans des institutions spécialisées pour une insertion socioprofessionnelle à l'âge adulte,
- L'adhésion parentale à des associations qui peuvent fournir une aide morale et parfois matérielle qui permettront une meilleure prise en charge de ces enfants.

Le diagnostic prénatal représente le moyen préventif le plus accessible sur le plan pratique, et s'adresse aux femmes enceintes d'âge avancé. En effet, il a été démontré sur le plan épidémiologique que celles-ci ont un risque plus élevé de donner naissance à des enfants trisomiques 21, la seule alternative possible étant l'avortement. Une telle attitude est difficilement acceptée sur le plan moral et éthique.

Dans notre travail, nous présentons une étude sur la trisomie 21 comportant deux parties:

- Une revue de la littérature qui traite tous les aspects épidémiologiques, cliniques, cytogénétiques et préventifs de cette affection.
- Dans la deuxième partie, nous présentons l'apport de l'hybridation in situ en fluorescence pour le dépistage de la trisomie 21 et ses différentes applications.



Historique

La curieuse maladie mentale qui plus tard allait être nommée improprement «mongolisme» est remarquée pour la première fois par ESQUIROL en 1838. Cet aliéniste décrit dans son traité intitulé « Pour servir l'histoire de l'idiotie », que ces sujets ont la taille petite, la tête peu volumineuse, la commissure palpébrale externe plus élevée que l'interne, le nez déprimé à sa racine.

En 1864 Edouard.SEGUIN (1812-1880) a ajouté à cette description le nez tronqué, la langue épaisse et fissurée, la sensibilité des poumons et des téguments aux infections. En 1866, il parle de « la diathèse furfuracée» de ces enfants qui peuvent apprendre à parler et à acquérir quelques connaissances.

En 1866 John Langdon-Down (1828-1896), médecin britannique, a fait la description en insistant sur la physionomie et le comportement stéréotype de ces malades « cela est tellement marqué que, placés côte à côte, il est difficile de croire que les spécimens ainsi comparés ne sont pas les enfants des mêmes parents ». Mais emporté par son désir de classer les idioties en fonction d'apparence ethniques, il qualifie cette arriération « d'idiotie mongolienne» et la place à la suite de « l'idiotie négroïde» et de « l'idiotie malaise ».

Cette dénomination inappropriée survécut seule à la faillite prévisible d'une telle classification. En effet, cette individualisation par le faciès pseudo-mongol, qui reste l'un des éléments majeurs du diagnostic, a fait la fortune du terme mongolisme, en dépit de la confusion très regrettable qu'il entraîne.

Ce bref rappel des conditions de la découverte de l'entité clinique doit rendre particulièrement circonspect dans l'utilisation d'une dénomination nouvelle, en remplacement du terme impropre de mongolisme ainsi qu'il a été proposé par ALLEN et Coll. en 1961.

Le terme de syndrome de DOWN, rejeté par certains (SPALDING, 1961) ne peut guère être proposé puisqu'il consacrerait une double erreur, historique et étiologique: Historique puisque SEGUIN fût le premier à décrire l'affection, étiologique puisque la maladie n'a absolument aucun rapport avec l'hypothèse raciale de Langdon Down.

En 1961, un groupe de scientifiques dont le petit-fils de Docteur John Langdon Dawn propose que le terme de « mongolisme » soit remplacé par celui de « Syndrome de Down ».

En 1965, ce terme est accepté par l'organisation mondiale de la santé.

Les termes utilisés actuellement sont ceux de trisomie 21 et de Syndrome de Down.

L'origine de cette affection est restée mystérieuse jusqu'en 1959. La découverte par Jérôme LEJEUNE, Marthe GAUTIER et Raymond TURPIN d'un chromosome 21 supplémentaire dans le caryotype des patients a permis de proposer de désigner la maladie sous le nom, plus conforme à l'étiologie de trisomie 21.

La trisomie 21 demeure la plus fréquente des anomalies autosomiques. Elle sert de modèle pour de nombreuses études, étiologiques, épidémiologiques, biochimiques.

On peut penser qu'elle sera aussi l'une des premières à faire l'objet d'une thérapeutique fondée sur la connaissance du déséquilibre biochimique.

Le déséquilibre dans le développement de l'organisme, provoqué par l'anomalie chromosomique caractéristique de cette affection, se manifeste dans des altérations, qui apparaissent en divers organes et systèmes. De manière constante apparaissent des altérations d'importance variable, dans le développement du système nerveux central: c'est la cause du déficit mental qui accompagne toujours la trisomie 21. Les anomalies peuvent également apparaître dans d'autres organes. Certaines se voient dès la naissance, d'autres apparaissent ou s'aggravent tout au long de la vie et peuvent être à l'origine de nombreuses complications.

*Epidémiologie
et facteurs de risque*

La trisomie 21 est la plus fréquente des aberrations chromosomiques numériques.

Sa fréquence globale est de l'ordre 1/700 naissances (soit 1,42/1000). Avec un sex-ratio qui donne une prévalence masculine de l'ordre de 3G/2F.

Cette fréquence est constante sans véritable variation géographique, interethnique, saisonnière ou socio-économique.

Actuellement, avec l'élévation de l'âge" moyen des femmes enceintes, la fréquence devrait avoir tendance à l'augmentation. Mais, dans les pays développés notamment, le dépistage prénatal permet de stabiliser cette fréquence, avec même une tendance à la baisse des cas de trisomie 21.

Au cours des dernières décennies, les origines de Trisomie 21 ont fait l'objet de nombreuses études.

Quelques facteurs de risques ont ainsi pu être suspectés:

A. L'âge maternel

C'est le facteur universel, dont la démonstration a été faite. La relation entre l'âge maternel et la Trisomie 21 a été décrite par Pen rose avant même que son origine ne soit élucidée.

Il a été remarqué que la fréquence des nouveau-nés trisomiques 21 augmente de façon exponentielle avec l'âge maternel, surtout **à partir de 35 ans**; l'âge paternel n'étant pas impliqué.

Cela serait lié à des anomalies de la méiose acquises avec l'âge, la diminution du pool ovocytaire, la réduction de la sélection des ovocytes aneuploïdes, le changement avec l'âge du microenvironnement folliculaire. Cependant, jusqu'à présent, aucune certitude quant aux bases biologiques de cette recrudescence d'aneuploïdie avec l'âge n'est encore formellement identifiée.

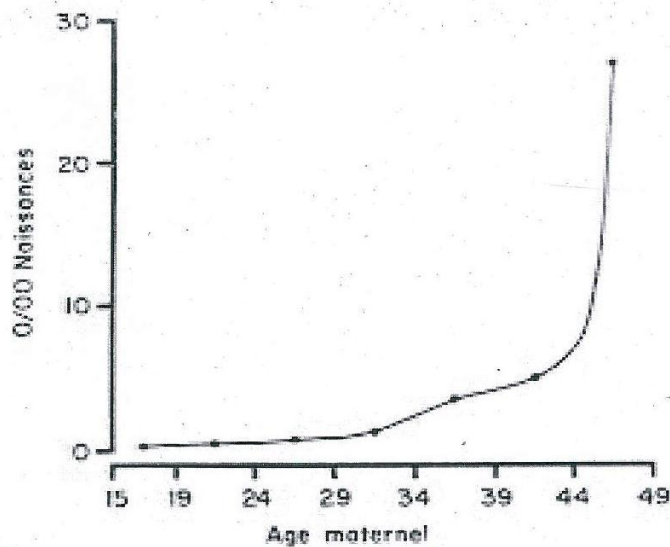


Figure 1 : incidence de la trisomie 21 selon l'âge maternel

B. AUTRES FACTEURS DE RISQUE

Aucun de ces facteurs n'a été retenu de façon formelle comme étant un risque de trisomie 21. Mais certaines études ont menées vers une forte suspicion. Ce sont notamment:

Les irradiations parentales: connues pour êtres pourvoyeuses d'anomalies congénitales ou génétiques. Mais elles n'ont cependant pas de spécificité par rapport à la Trisomie 21.

Les contraceptifs oraux: quelques études ont tenté de mettre en évidence un lien entre la survenue d'une trisomie 21 et la prise prolongée de contraceptifs oraux.

Certains polymorphismes génétiques ou chromosomiques.

Néanmoins, aucune n'a été démontrée de manière convaincante. Même s'il y a des facteurs qui méritent une plus grande attention.

C'est ainsi que Warbuton montre en 1985 que la fréquence de la trisomie 21 est plus élevée chez les femmes ayant eu un enfant trisomique avant l'âge de 30 ans. Il a été évoqué pour expliquer cela la présence de mosaïques cryptées ou de gènes de prédisposition.

On parle aussi d'anomalies dans *le métabolisme de l'acide folique*. Des troubles enzymatiques dans la méthylation seraient alors à l'origine de la non-disjonction chromosomique au cours de la méiose et augmenteraient ainsi le risque de trisomie 21. Mais, les résultats d'autres études se basant sur cette

théorie en y associant les mécanismes de formation d'un organisme trisomique 21 tendent à infirmer cette hypothèse.

En dehors de ces facteurs de risque, il convient de citer les facteurs étiologiques démontrés que sont les translocations parentales impliquant le chromosome 21 et bien sûr la trisomie 21 présentée par l'un des parents.

*Physiopathologie
de la trisomie 21 :*

1. MECANISME DE SURVENUE DE L'ANOMALIE GENETIQUE :

Dans sa forme la plus courante, la trisomie 21 se caractérise donc par la présence de trois chromosomes 21. En général, l'origine de cette La trisomie 21 est une fécondation entre un gamète possédant un chromosome 21, et un gamète possédant deux chromosomes 21.

Normalement, un gamète possède un seul chromosome 21. Dans le cas d'une présence de deux chromosomes 21, on peut expliquer ce défaut par une non-disjonction des chromosomes homologues (lors de la première division de méiose), ou des chromatides sœurs (lors de la deuxième division de méiose).

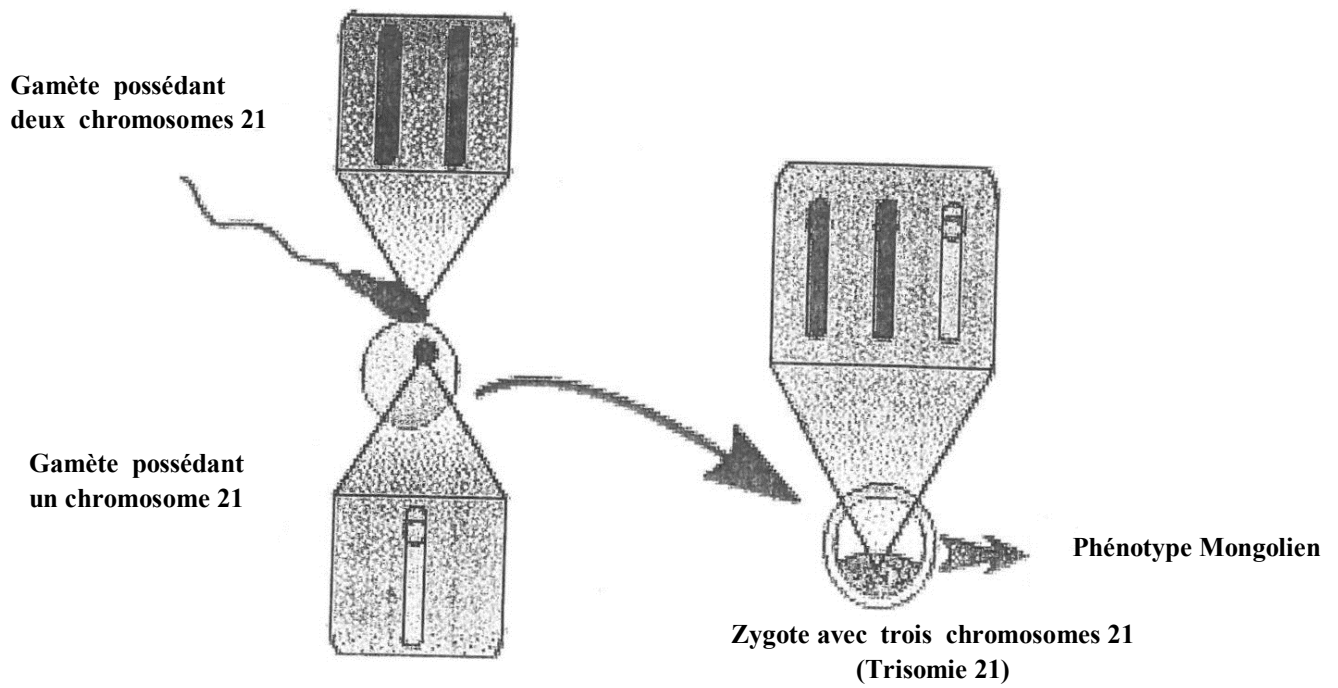


Figure 2 : Fécondation et trisomie 21.

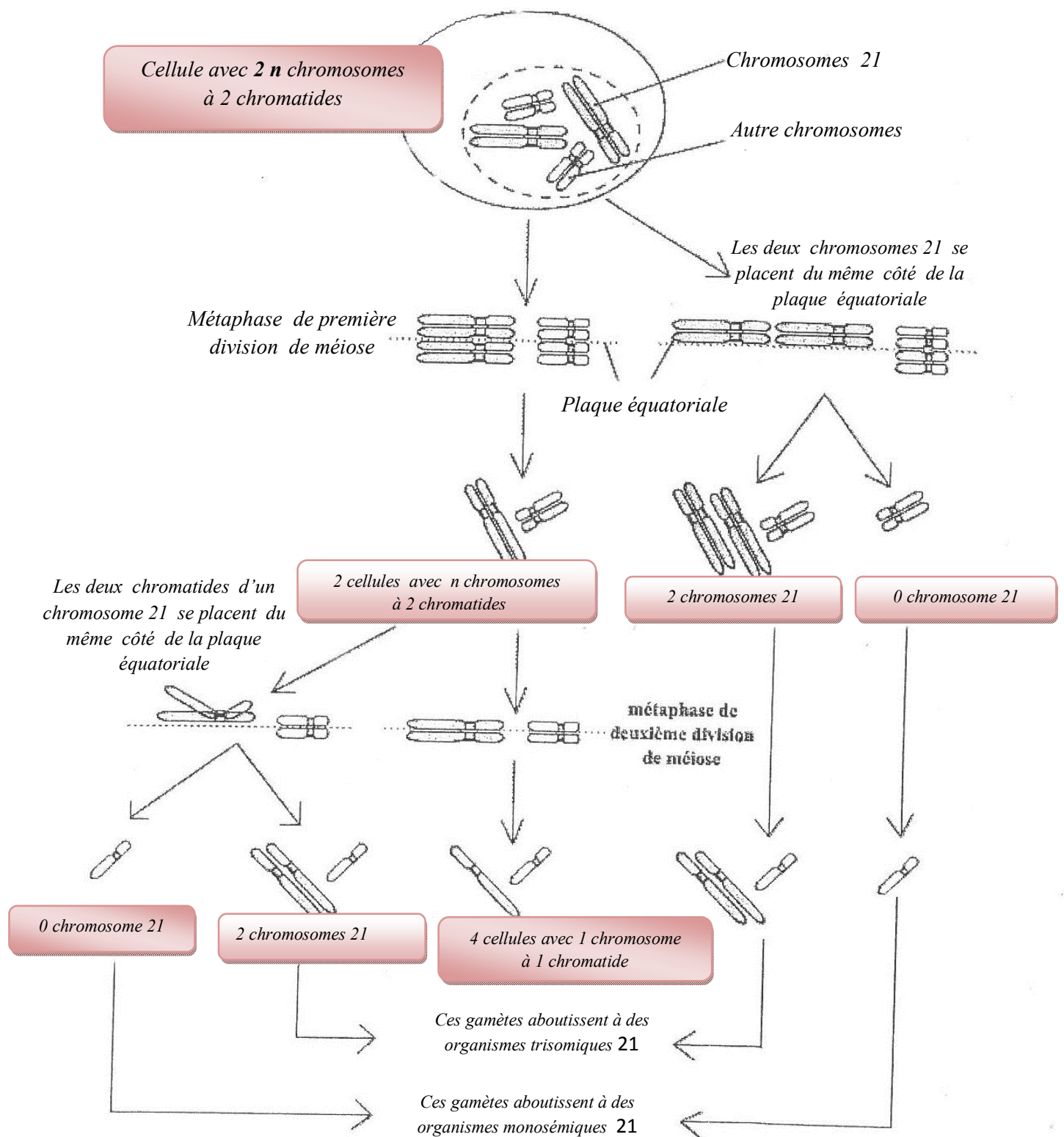


Figure 3: Erreurs de méiose et trisomie 21

Le déroulement très schématique d'une méiose normale est présenté au centre, avec de part et d'autres les conséquences de mauvais positionnements des chromosomes.

Au moment de la fécondation, le deuxième gamète apporte un chromosome 21 à une chromatide. Si le gamète formé possède déjà deux chromosomes 21, le zygote en possède alors 3 : l'individu est trisomique. On peut noter que des individus monosomiques (un seul chromosome 21) peuvent être obtenus de la même façon: ces individus ne sont pas viables, et donc pas observés à la naissance.

Toutefois, la trisomie 21 peut avoir deux autres causes, semblables:

- Il est possible que la mère soit déjà trisomique 21 : elle transmet alors un ou deux chromosomes 21 à ses enfants. (Les hommes trisomiques 21 sont, eux, stériles)
- Il est possible que la non-disjonction de chromosomes ait lieu lors d'une division de mitose:
 - chez la mère (non trisomique), lors de la division d'une cellule précurseur des ovocytes,
 - OU chez le malade, au tout début de son développement embryonnaire. Dans ce dernier cas, il est aussi possible d'assister à une trisomie 21 mosaïque, seule une partie des cellules de l'individu étant trisomiques ...

Le phénotype trisomique 21 s'explique par la présence en triple de certains gènes, portés par le bras long du chromosome 21.

D'autres anomalies chromosomiques peuvent donc conduire à un phénotype trisomique : il suffit pour cela que le bras long du chromosome 21 soit présent en triple exemplaire. C'est ce qui arrive lors de translocations (réciproques ou non) de ce bras chromosomique.

Ces translocations peuvent être de nova, c'est à dire apparues lors de la méiose, des premières mitoses de l'embryon, etc. ou bien être héritées d'un des deux parents.

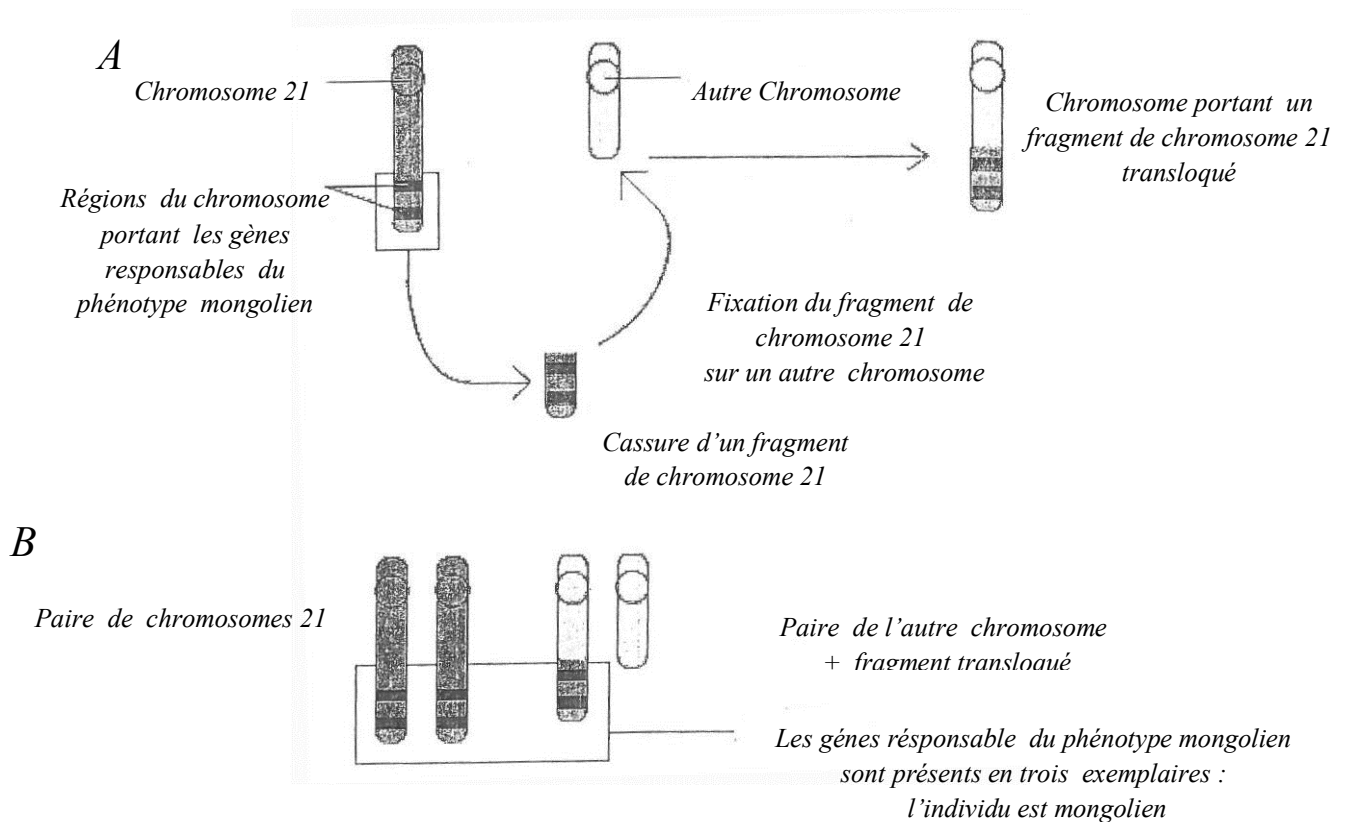


Figure 4 : Translocations chromosomiques conduisant à un phénotype mongolien

A. Représentation très schématique d'une translocation d'un fragment de chromosome 21 vers un autre chromosome.

B. conséquence de la présence dans une même cellule d'un chromosome portant un fragment de chromosome 21 et d'une paire de chromosomes 21.

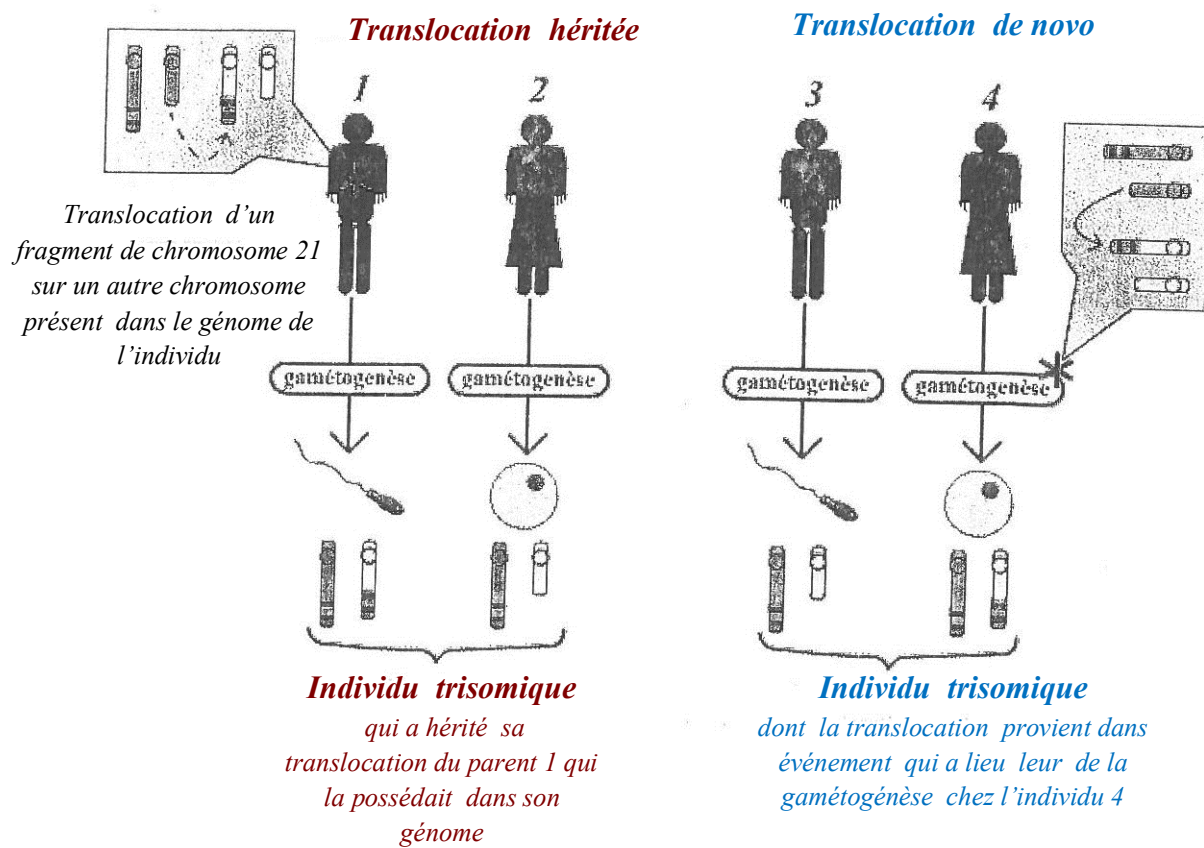
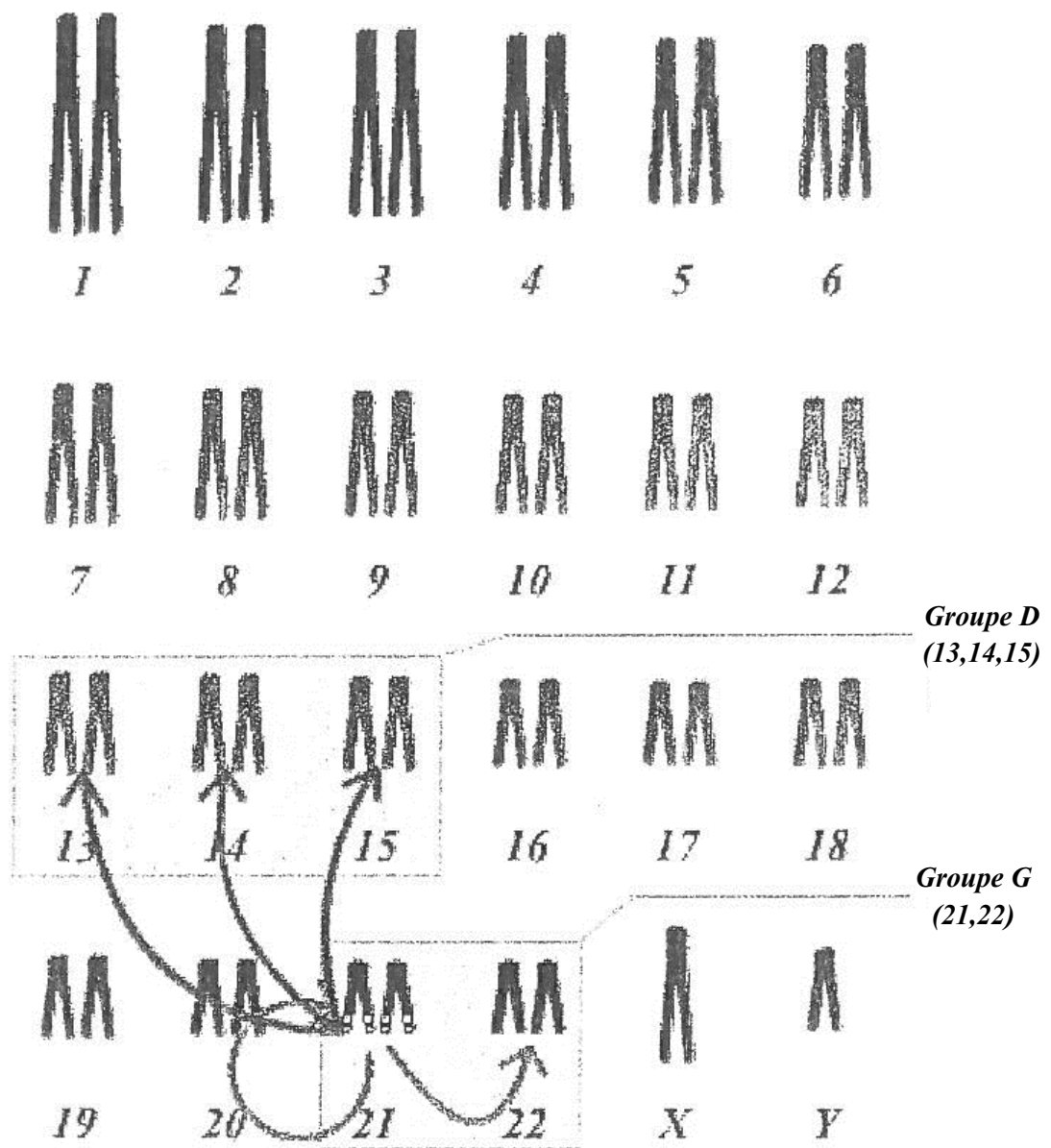


Figure 5 : Translocations de novo et translocations héritées.

Dans le cas d'une translocation héritée, celle-ci est présente dans le génome d'un des deux parents (ici le parent 1). Dans le cas d'une translocation de novo, elle n'est pas présente dans l'ensemble des cellules des parents, mais seulement dans quelques cellules : Ceci correspond à un événement de translocation qui se produit peu avant la formation du gamète, par exemple pendant la gamétogenèse.

Les translocations équilibrées observées se produisent entre le chromosome 21 et un chromosome du groupe D (chromosomes 13, 14 et 15) ou du groupe G (chromosomes 21 et 22).



**Figure 6 : les translocations héritées impliquant
q21 (bras long du chromosome 21)**

2. MECANISMES POUVANT EXPLIQUER LES ANOMALIES BIOLOGIQUES ET LA SYMPTOMATOLOGIE clinique:

La fréquence des infections respiratoires, décrites des l'origine et la description depuis 20 ans d'un ensemble d'anomalies immunologiques, font de la trisomie 21 le plus fréquent des déficits immunitaires après les déficits en IgA. Ces derniers affectent un individu sur 350 mais sont très souvent asymptomatiques alors que la trisomie 21 est observée à raison de un cas sur 700 à 1000 naissances. L'étude des déficits immunitaires chez le trisomique est rendue difficile par la multitude et l'interdépendance des paramètres immunologiques susceptibles d'être mesurés et à leur variabilité dans une population normale. Par ailleurs la mode de vie familiale ou en collectivité avec son risque infectieux, l'état nutritionnel protéique, vitaminique et oligo-éléments, le suivi médical, l'âge, l'existence de stress sont autant de facteurs qui interviennent dans le statut immunitaire et dont le rôle est parfois difficile à séparer de celui crée par l'anomalie chromosomique.

Plusieurs gènes situés sur le chromosome 21 sont des candidats potentiels pour expliquer certaines anomalies immunologiques de la trisomie 21 : le gène du récepteur des interférons α ou β le gène de la chaîne β des molécules LF A 1, Mac-1 OKM, le gène de la superoxyde dismutase 1, plusieurs prooncogènes et le gène d'un polypeptide de l'amylose cérébrale.

1. L'amplification du gène codant pour le récepteur des interférons:

L'amplification du gène codant pour le récepteur des interférons (IFN) α ou β s'accompagne d'une augmentation de 50% des sites récepteurs de l'IFN sur les cellules de trisomiques. Par ailleurs ces cellules sont plus sensibles à l'IFN α ou β qui induit une activité 2'-5' polyA synthétase accrue et une plus forte synthèse de polypeptides induits. Parmi ces derniers, il faut signaler les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de la classe α et la β_2 microglobuline. Le mécanisme de cette amplification n'est pas clair, d'autant que l'IFN γ (type 2), produit par les cellules T activées, a un effet très amplifié sur les cellules trisomiques alors qu'il agit par liaison à un récepteur codé par un gène du chromosome 6 et non du chromosome 21.

L'une des hypothèses avancées est celle d'une anomalie plus globale des systèmes de signalisation membranaire.

Quelque soit le mécanisme en cause, l'augmentation de la sensibilité à l'interféron, même si elle s'accompagne d'une diminution compensatrice de la synthèse d'interféron, pourrait expliquer l'absence de susceptibilité anormale vis-à-vis de la part des infections virales chez le trisomique, à la différence de l'immunité cellulaire. Cette augmentation de la sensibilité à l'IFN entraîne une augmentation de l'effet antiviral (x6.3), de l'inhibition de la croissance cellulaire (x 6.7) et des différents effets immunologiques de l'IFN.

2. L'augmentation de l'expression du gène codant pour la chaîne β

L'augmentation de l'expression du gène codant pour la chaîne β de 95KD commun aux molécules LFA-1 (lymphocyte functional antigen), Mac-1/OKM1 et p150,95 a été cherché sur des cellules issues de sujets trisomiques. Ces 3 protéines appartiennent à la famille des intégrines et sont impliquées dans des réactions d'adhésion intercellulaire. La chaîne β commune à ces 3 molécules dimériques est reconnue par les anticorps monoclonaux CD18.

Lors des déficits héréditaires du gène codant pour la chaîne β , il existe une susceptibilité importante aux infections bactériennes avec défaut de migration des cellules phagocytaires. Dans la trisomie 21, l'expression de la chaîne β de LFA-1 est augmentée sur des cellules lymphoblastoïdes en phase G1 transformées par le virus d'Epstein-Barr par rapport à des cellules normales; il existe aussi une augmentation moindre mais nette de l'expression de la chaîne α de la molécule LFA-1 reconnue par un anticorps monoclonal (CD11 a) alors que le gène codant pour cette molécule se trouve sur le chromosome 16.

Cette augmentation de l'expression des chaînes β et à un degrés moindre que la chaîne α , s'accompagne d'une agrégation accrue des lymphocytes de trisomiques 21 en réponse à une stimulation par les esters de phorbol.

Aucune relation n'a cependant encore été démontrée entre l'augmentation d'expression de la chaîne β et le déficit immunitaire constaté dans la trisomie 21.

3. Le gène codant pour la $\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ su peroxyde dismutase.

Ce gène se localise sur le bras court du chromosome 21. Cette enzyme intervient dans le métabolisme oxydatif des phagocytes en transformant l'ion superoxyde O_2^- en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

L'activité enzymatique est augmentée dans les phagocytes de trisomiques 21. Ceci peut expliquer l'abaissement du taux de superoxyde dans les phagocytes des sujets trisomiques sans anomalie de la chimiluminescence de ces cellules (sans modification de leur aspect au microscope à fluorescence).

4. Deux protooncogènes ont été localisés sur le chromosome 21

Deux protooncogènes ont été localisés sur le chromosome 21. Il s'agit des protooncogènes *Huets -2* et d'un gène inductible par les œstrogènes exprimés dans certaines lignées néoplasiques issues de cancers du sein. Le rôle du protooncogène *Huets -2* est suspecté dans un sous type spécifique de leucémie aigue myéloblastique qui présente une translocation $t(8;21)(q22,q22)$.

Le gène inductible par les œstrogènes est activé dans certains cancers du sein.

5. Rôle du gène codant pour un polypeptide de l'amylose cérébrale.

Celui-ci est aussi exprimé dans les thymocytes. Ce gène pourrait jouer un rôle dans l'involution thymique et dans les anomalies du système immunitaire dans la trisomie 21.

6. Autres arguments.

On ignore encore la nature de l'anomalie génétique du défaut de réparation de l'ADN dont l'existence est suggérée par des arguments indirects dans la trisomie 21 : sensibilité anormalement élevée des lymphocytes à l'irradiation X ou γ , ainsi que la plus grande susceptibilité hématopoïétique vis-à-vis de la chimiothérapie antileucémique .

3) LES DESEQUILIBRES BIOCHIMIQUES DANS LA TRISOMIE 21 ENTRAINANT UNE DEBILITE MENTALE :

La découverte de plusieurs gènes se trouvant sur le chromosome 21 ainsi que des expériences in vitro ont permis de mieux comprendre la débilité mentale dont souffrent les trisomiques 21. Les recherches ont mis en évidence plusieurs déséquilibres portant sur:

- La fonction thyroïdienne.
- Le métabolisme intermédiaire des purines.
- L'équilibre méthionine, homocystéine, adénosine.
- Le métabolisme du folate et de la biotérine.
- L'équilibre entre différents acides aminés.

1. Le dysfonctionnement thyroïdien :

Il est bien connu que les trisomiques 21 ont une fréquence trop grande d'hypothyroïdie surtout, d'hyperthyroïdie ainsi que d'un dysfonctionnement thyroïdien par une élévation discrète de la TSH s'accompagnant de taux normaux de T4 et de T3. Cette anomalie s'accompagne d'une diminution du taux de rT3 (l'hormone reverse dite inactive)

Le rapport rT3/TSH hautement corrélé à T3 chez les normaux ne montre aucune corrélation avec T3 chez les trisomiques 21, comme si le système de réglage se trouvait modifié.

Il est bien connu que l'hormone thyroïdienne est essentielle pour la croissance, la maturation des systèmes nerveux central et osseux, qu'elle favorise l'éruption dentaire. Les hormones thyroïdiennes jouent un grand rôle dans la mise en place des neurotubules et régulent directement le métabolisme des monocarbones dont l'importance est connue non seulement pour le fonctionnement du système nerveux central, mais aussi pour toutes les réactions du méthylation.

L'existence en particulier d'une hypothyroïdie est un facteur de mauvais pronostic. Celle-ci est à l'origine du retard dans l'acquisition des capacités psychomotrices et de l'aggravation de la débilité mentale.

C'est dire combien il est primordial d'en faire le diagnostic très tôt, et d'agir en conséquence. Tous les auteurs sont d'accord sur l'intérêt de codifier les moyens de diagnostic de l'hypothyroïdie à la naissance des trisomiques de manière systématique pour parer à ses conséquences fâcheuses.

2. Métabolisme intermédiaire des purines / équilibre méthionine-homocystéine- adénosine:

Trois gènes intervenant dans la synthèse des purines sont maintenant localisés sur le chromosome 21.

Ce sont la 5 phosphoribosyl-glycinamide synthétase, la formyl- transférase et l'amino-imidazole synthétase.

Ces synthèses accroissent la demande en monocarbone, par ailleurs un déséquilibre entre adénosine et guanosine aurait des conséquences neurologiques manifestes.

D'autre part un excès d'adénosine pourrait aussi entraîner une déficience de la jonction neuro-musculaire, un déficit de sécrétion d'hormone de croissance, une inhibition partielle de la lipolyse, une instabilité de la glycémie, une hypersensibilité de l'iris à l'atropine, une réduction de la musculature vasculaire (Livedo). Toutes ces anomalies se trouvent dans la trisomie 21.

La voie métabolique de la guanosine a un rôle particulièrement important dans le fonctionnement du système nerveux central.

Les nucléotides dérivés de la guanosine jouent un rôle dans la modulation de la neurotransmission, ils pourraient même être des neurotransmetteurs. Ces dérivés interviennent dans la synthèse de la tubuline constituant des neurotubules (câblage informatique internes des neurones). Des anomalies des dérivés de la guanosine ont été décrites dans quelques maladies neurologiques associées à un retard mental.

3. Métabolisme des folates et de la bioptérine :

La bioptérine est indispensable aux hydroxylations aromatiques, elle est anormalement régulée chez les trisomiques 21, et elle est synthétisée à la demande. L'acide folique, lui est, fourni par l'alimentation. Ces deux substances peuvent se suppléer l'une à l'autre dans certaines réactions, et sont toutes les deux éliminées par oxydation sous forme d'isoxanthoptérine.

Il a été démontré que les enfants trisomiques 21 qui éliminent une grande quantité d'isoxanthoptérine, manifestent peu de temps après une hypothyroïdie sévère. Pour certains auteurs la thyroïde règle l'élimination de la bioptérine et des folates sous forme d'isoxanthoptérine, par l'intermédiaire de rT3.

4. L'équilibre entre différents acides aminés:

Un déficit en sérine et un excès de cystéine et de lysine a été mis en évidence chez les trisomiques 21. De même un excès de cystéine, de méthionine, de thyrosine et méthyl-histidine a été retrouvé dans les urines. On ne connaît pas le rôle joué par ces déséquilibres dans la pathologie de la trisomie 21. Un essai de compensation alimentaire en sérine ne semble pas être indispensable ou bénéfique.



Diagnostic post natal

1) CIRCONSTANCES DIAGNOSTIC:

A la naissance le syndrome malformatif, lié à la trisomie 21, est le plus souvent si marqué, que le diagnostic clinique n'offre pas de difficulté. L'expression de la trisomie 21 au niveau du phénotype est cependant variable avec des tableaux cliniques différents et des anomalies morphologiques inégales.

Le dépistage de la trisomie 21 à la naissance se fera sur l'aspect morphologique externe particulier des trisomiques 21, sur des anomalies de l'auscultation cardiaque, sur l'apparition de complications liées au syndrome malformatif et/ou sur un retard mental de révélation plus tardive.

2) ASPECTS CLINIQUES:

a) Syndrome dysmorphique :

(a) L'aspect de la tête et du visage est évocateur:

- la tête est petite, arrondie, la nuque aplatie, le faciès rond avec un profil plat.
- les fentes palpébrales sont obliques, en haut et en dehors.
- Il existe un épicanthus, donnant un aspect d'écartement exagéré des yeux (hypertélorisme)
- le nez est court, peu saillant, avec une racine effacée.
- les oreilles sont souvent bas implantées, petites, rondes, mal ourlées.

- la bouche est petite, la langue est souvent plicaturée, et surtout protruse , la voûte palatine ogivale.
- la première dentition est tardive; et les dents apparaissent dans un ordre irrégulier.
- à la périphérie de l'iris, quand il est bien bleu, on voit souvent de petites taches dites de Brushfield ; le strabisme est fréquent.

(b) La main est particulièrement caractéristique:

- Les doigts sont courts et larges.
- Au 5^{ème} doigt, il existe une brachymésophalangie avec clinodactylie ; la phalange moyenne du cinquième doigt est anormalement petite, faisant penser qu'il n'existe que deux phalanges à l'auriculaire et d'ailleurs, ce doigt ne présente souvent qu'un seul pli de flexion.
- Les dermatoglyphes sont très particuliers: dans un grand nombre de cas les deux plis de la paume sont remplacés par un pli palmaire unique transverse (mais ce caractère n'est pas constant; il se retrouve dans d'autres aberrations chromosomiques et aussi chez 1 % des sujets normaux).

Les enfants ont souvent un retard statural, mais non pondéral. Il existe souvent une hernie ombilicale et même un diastasis des grands droits. Les deux premiers orteils sont trop espacés .

b) Le retard psychomoteur:

La trisomie 21 représente la cause la plus fréquente de retard mental chez l'enfant puisqu'elle est, en effet responsable de 25 % des handicaps mentaux sévères chez les enfants scolarisés .

L'encéphalopathie se traduit à la naissance par une hypotonie contrastant avec l'hypertonie physiologique du nouveau-né normal. Elle est constante et est un argument diagnostique lorsque la dysmorphie est douteuse.

L'encéphalopathie devient plus évidente avec la croissance. Le retard du développement psychomoteur est constant dès la première enfance: il est exceptionnel qu'ils aient acquis la marche à un âge normal (avant 18 mois) ; toutefois l'arriération mentale devient souvent plus évidente plus tard devant une acquisition très tardive du langage. Au total un faible pourcentage aura l'apprentissage de la lecture et moins encore celui de l'écriture.

La compréhension est souvent meilleure que l'expression permettant à l'enfant d'accéder à une éducation et de compenser en partie ses difficultés par une intelligence pratique. Ce sont surtout les facultés de raisonnement abstrait qui sont les plus touchées.

La qualité de l'éducation et de l'environnement familial et social a un rôle déterminant, il existe cependant, dans la majorité des cas, une lenteur des acquisitions et une limitation des capacités mentales.

L'affectivité et la sociabilité sont très développées, la plupart des enfants trisomiques 21 ont un caractère doux, affectueux et attachant mais immature. Ils aiment jouer, mimer, ranger tous les objets, enfants minutieux.

c) Les malformations:

(a) Les malformations cardiaques:

Elles sont présentes dans près de 50 % des cas. Il s'agit le plus souvent d'un canal atrio-ventriculaire (cardiopathie non cyanogène avec souffle, gros cœur à la radiographie, axe hyper droit à l'E.C.G.). Dans sa forme complète, comportant CIA + CIV + fentes mitrale et tricuspidiennne, cette cardiopathie est très sévère, le plus souvent mortelle dans la première année de vie. Le traitement chirurgical reste grevé d'une lourde mortalité.

(b) Les malformations digestives :

- Atrésie duodénale et surtout
- Sténose duodénale incomplète qui entraîne des vomissements.

Les malformations cardiaques et digestives sont donc à rechercher systématiquement en période néonatale chez le trisomique 21. Elles peuvent être à l'origine de diagnostic anténatal.

3) MOYENS DIAGNOSTIC :

A côté de tous les examens biologiques et radiologiques, la cytogénétique est l'examen clé pour le diagnostic de la trisomie 21. Tout examen biologique ou radiologique peut être indiqué surtout pour le suivi des trisomiques depuis la naissance à l'âge adulte.

Plusieurs programmes de médecine préventive ont été proposés par divers équipes, nous avons retenu le programme établi par A. RASORE-QUARINO et Coll, car il paraît le plus complet et le plus rigoureux quand à toutes les anomalies et dysfonctionnements que peut présenter le sujet trisomique 21.

Ce programme donne une idée sur les différents examens médicaux et paramédicaux dont devrait bénéficier le trisomique 21 de la naissance à l'âge adulte, tenant compte des problèmes les plus fréquents, responsable des complications les plus graves pendant toute la vie du trisomique.

a) Bilan biologique :

Plusieurs examens biologiques peuvent être réalisés:

- A la naissance, il faut évaluer la fonction thyroïdienne par un dosage de la TSH : pour dépister l'apparition d'une hypothyroïdie. Dosage de la Vitamine A doit aussi être réalisé avec une numération de la formule sanguine pour le dépistage d'une anémie.
- Tests hépatiques et le dépistage d'un diabète dès la puberté.

b) Bilan radiologique:

- A la naissance, il faut réaliser un électrocardiogramme, une radiographie du thorax et une échocardiographie.
- A quatre ans, réaliser une radiographie de l'atlas-axis face et profil en flexion et en extension. Cet examen est à refaire en cas d'apparition de signes de compression tels qu'une fatigue, céphalées, incontinence urinaire et fécale, débilité progressive, changement dans la marche, hyperréflexie tendineuse ou encore une spasticité des extrémités. Si une instabilité atlas-axis est mise en évidence, il faudra alors proscrire toute activité sportive ou mouvement entraînant une surpression au niveau de la tête et du cou.

c) Cytogénétique :

Parmi les techniques de cytogénétique, le caryotype reste un examen fiable et simple.

(a)Techniques:

1) Le caryotype :

Le caryotype est l'ensemble des chromosomes d'une cellule. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard: par paire et classés par taille (le terme caryogramme est parfois employé comme synonyme de caryotype).

On réalise des caryotypes dans le but de détecter des aberrations chromosomiques (comme la trisomie 21) ou d'identifier certains aspects du

génomique de l'individu, comme le sexe (XX ou XY).

Après un prélèvement sur l'individu, ses cellules (souvent des lymphocytes obtenus par un prélèvement sanguin) sont mises en culture in-vitro.

La culture est alors mise en présence de colchicine qui perturbe les fuseaux mitotiques et bloque les cellules en métaphase de la mitose.

Les cellules en mitose sont alors récoltées, on les fait gonfler par une incubation dans un milieu hypotonique; on les met ensuite en présence d'un fixateur, et l'on étale la suspension cellulaire fixée sur une lame de verre, en vue de l'observation en microscope, c'est ce que l'on appelle un étalement chromosomique.

Cette préparation est ensuite colorée. La coloration la plus classique est la coloration au Giemsa qui entraîne, après l'application d'un traitement approprié, l'apparition de bandes sombres et claires alternées sur les chromosomes: le $\leq$ G-banding $\geq$.

La topographie des bandes est caractéristique d'un chromosome et permet de l'identifier (remarque: les deux chromosomes d'une même paire ont la même topographie de bandes).

Il existe également d'autres méthodes de coloration qui font apparaître d'autres types de bandes (Q-Banding, R-Banding, etc.). Certaines de ces méthodes font appel à des colorants fluorescents.

Ne pas confondre avec la technique FISH qui utilise des sondes spécifiques de certaines séquences de nucléotides et non pas des colorants qui se fixent sur tous les chromosomes.

2) Autres techniques:

Ces techniques sont complément aux, études cytogénétiques, il s'agit de techniques performantes permettant d'éliminer une mosaïque si les anomalies retrouvées sont caractéristiques d'un syndrome connu, dans notre cas la trisomie 21,

❖ Hybridation in-situ avec des sondes fluorescentes (FISH,' Fluorescent In Situ Hybridation)

Des séquences d'ADN complémentaires de la séquence d'un gène ou d'une partie du génome sont préparées in vitro et couplés à des fluorochromes,

Cette sonde ainsi que les chromosomes sont chauffés, ce qui a pour effet de dissocier les brins complémentaires, Ils sont alors mis en présence et on les laisse refroidir,

De cette manière, la sonde (fluorescente) peut s'apparier avec sa séquence homologue sur le chromosome.

On obtient donc un ADN hybride. Ceci permet de repérer à l'aide d'un microscope à fluorescence, la position d'un gène ou d'une séquence génomique sur le caryotype et donc de mettre en évidence, par exemple, une position anormale due à une recombinaison chromosomique.

Dans cette nouvelle technique, différentes sondes, spécifiques chacune d'un seul chromosome entier, et marquées avec des proportions variables de trois fluorochromes différents sont hybridées avec les chromosomes.

Ceci donne une signature spectrale caractéristique à chaque paire de chromosome (c'est-à-dire des couleurs différentes en raison des proportions variables de fluorochrome sur chaque chromosome). Les chromosomes peuvent alors être automatiquement identifiés en microscopie de fluorescence couplée avec un interféromètre (imagerie spectrale). Il est ainsi possible d'identifier très aisément des recombinaisons chromosomiques.

b) Résultats:

1) Caryotype normal

En 1960, un groupe de chercheurs a mis au point une classification numérale, qui demeure toujours utilisée à l'heure actuelle et qui représente un code de référence .

Cette convention est fondée sur deux principes:

- Les chromosomes sont classés par ordre de grandeur décroissant, le plus grand portant le numéro 1 et le plus petit le numéro 22 ; la reconnaissance de chacun d'eux est basée sur la longueur relative ($L = \frac{\text{longueur de l'élément étudié}}{\text{longueur totale}}$: 22 A+X) d'une part et sur la position du centromère d'autre part ($I_c = \frac{\text{longueur du bras court}}{\text{longueur totale de l'élément}}$).

- A l'intérieur de chaque groupe, les chromosomes sont rangés par ordre de taille décroissante.

Les deux chromosomes sexuels conservent leur appellation littérale classique; X et Y.

Le document de Denver définit 7 groupes de chromosomes:

- **Le groupe A ou groupe (1-3) :**
 - Grands chromosomes à centromère presque médian, les trois chromosomes se distinguent facilement par leur taille et par la position du centromère.
- **Le groupe B ou groupe (4-5) :**
 - Grands chromosomes à centromère distal, ces deux chromosomes sont faciles à distinguer mais le chromosome 4 est légèrement plus grand.
- **Le groupe C ou groupe (6-12):**
 - Chromosomes de taille moyenne à centromère sub-médian. Le chromosome X ressemble aux plus longs chromosomes de ce groupe, spécialement le chromosome 6 dont il se distingue difficilement.
- **Le groupe D ou groupe (13-15) :**
 - Chromosomes de taille moyenne à centromère presque terminal (chromosomes acrocentriques).

- Le chromosome 13 a des satellites proéminents sur le bas court. Le chromosome 14 a de petits satellites. Le chromosome 15 n'en a presque pas.
- **Le groupe E ou groupe (16-18) :**
 - Chromosomes petits à centromère presque médian ou sub-médian .
- **Le groupe F ou groupe (19-20) :**
 - Petits chromosomes à centromère quasi-médian.
- **Le groupe G ou groupe (21-22) :**
 - Très petits chromosomes acrocentriques. Le chromosome 21 possède un satellite sur le bras court. Le chromosome Y ressemble à ces chromosomes.

2) Caryotype trisomique:

La trisomie est la présence de 3 chromosomes homologues, pour une paire donnée, au lieu des 2 habituels. La très grande majorité des trisomies sont létales, souvent très tôt au cours du développement embryonnaire : elles se traduisent alors par des fausses couches spontanées. Toutefois, certaines de ces trisomies peuvent être observées chez des enfants (et par la suite chez des adultes) : Il s'agit en particulier de la trisomie 21.

On a pu identifier différents types de trisomie 21 comprenant les trisomies 21 libres, les trisomies 21 par translocation et les trisomies 21 mosaïques.

Tableau 1 : répartition selon les grandes origines de la trisomie 21

trisomie 21 libres et homogènes (trois chromosomes-2-1 dans toutes les cellules de l'organisme)	92,5%
Trisomie 21 mosaïque (seule certaines cellules présentent trois chromosome 21, les autres cellules en ont deux)	2.6%
Translocations (présence de trois bras longs ou fragments de bras 1 longs du chromosome 21)	4%
Autres cas	1%

c) Le conseil génétique:

Un point intéressant est que le risque de récurrence, c'est à dire la probabilité d'avoir un enfant de phénotype mongolien est différent selon les translocations (on parle de récurrence, car ces analyses chromosomiques sont réalisées en général suite à la naissance d'un premier enfant trisomique).

Tableau 2 : risque pour un individu possédant une translocation équilibrée d'avoir un enfant atteint de trisomie 21, selon le type de translocation 1

	Père	Mère
T(Dq ;21q)	5%	15%
T(22q ;21q)	5%	15%
T(21q ;21q)	100%	100%

Comment lire ces translocations: 1

t(a :b) = translocation équilibrée entre le chromosome "a" et le "b" 1

Spécification des chromosomes:

D= chromosome 13, 14 ou 15 1

q = bras long du chromosome

On constate donc qu'un parent porteur d'une translocation du chromosome 21 sur lui même (translocation dite Robertsonienne) est assuré d'avoir un enfant malade ... Pourquoi? Pour une raison simple: Les deux bras longs des chromosomes 21 sont désormais portés par un même "chromosome". Ses gamètes sont donc assurés d'être soit porteurs de ce "chromosome", soit sans chromosome 21 du tout. Après fécondation, on obtient donc un embryon qui est soit trisomique 21 (trois bras longs 21), soit monosomique 21. Or la monosomie 21 est létale. Seuls les trisomiques 21 survivent. ..

*Dépistage anténatal
de la trisomie 21*

Dans les pays développés, tous les moyens sont mis en œuvre pour le bien être sanitaire des populations. C'est dans ce cadre que s'inscrit le dépistage anténatal en général, celui de la trisomie 21 en particulier. En France, au Royaume Uni, aux Etats-Unis, au Canada, pour ne citer que ceux-là, une législation est même mise en place pour s'assurer de l'application correcte des méthodes de dépistage. Tout praticien est dans l'obligation de proposer ce dépistage à chacune de ses patientes, afin de déterminer le groupe le plus à risque à l'attention duquel le diagnostic anténatal sera proposé, car celui-ci n'est pas exempt de tout risque.

C'est ainsi que sont combinés des ensembles de signes, morphologiques et biologiques, pour aboutir à des stratégies qui optimisent les résultats tout en amoindrissant les risques.

A. MORPHOLOGIE ANTENATALE : L'ECHOGRAPHIE OBSTETRICALE

L'échographie lors de la grossesse est un examen anodin mais très performant. Elle est cependant opérateur-dépendante et à ce titre nécessite des opérateurs ayant reçu une formation théorique et pratique allant dans le sens du dépistage. L'arrivée d'appareils de plus en plus pointus rend cet examen incontournable à toutes les étapes prénatales.

Du premier au dernier trimestre, l'échographie anténatale tient une place prépondérante dans le dépistage des signes de trisomie 21.

1. La clarté nucale

Il s'agit de l'espace liquidien normal entre la peau et les tissus mous recouvrant la nuque fœtale lors du premier trimestre de grossesse. l'épaisseur de cette clarté est augmentée chez 75% des fœtus porteurs de trisomie 21, mais aussi dans le cas d'autres aneuploïdies, de cardiopathies congénitales, ce qui explique l'importance de sa place dans le dépistage anténatal.

La mesure se fait entre 11SA et 13SA + 6jours, lorsque la longueur crânio-caudale du fœtus est comprise entre 45 et 84mm. Elle peut se faire par voie abdominale ou endovaginale.

La qualité de la technique est évaluée par le score de Herman. Il associe une position en sagittal stricte du fœtus, la bonne disposition des calipers sur l'image, la bonne visibilité de la peau de la nuque. La nuque doit en position neutre car l'hyper extension ou l'hyper flexion du cou entraînent des valeurs majorées ou minorées, avec la membrane amniotique distincte, sur une image fœtale occupant au moins 80% de l'écran. Un Doppler du cordon doit être effectué afin de s'assurer que celui-ci n'est pas autour du cou. Trois mesures sont recommandées, et seule la plus grande valeur sera prise en compte.



Figure 7 : Echographie obstétricale du 1^{er} trimestre montrant une mesure de la clarté nucale.

On obtiendra des valeurs qui seront corrélées à la longueur crânio-caudale et à l'âge gestationnel. La normale doit être inférieure à 95^e percentile sur les courbes de références.

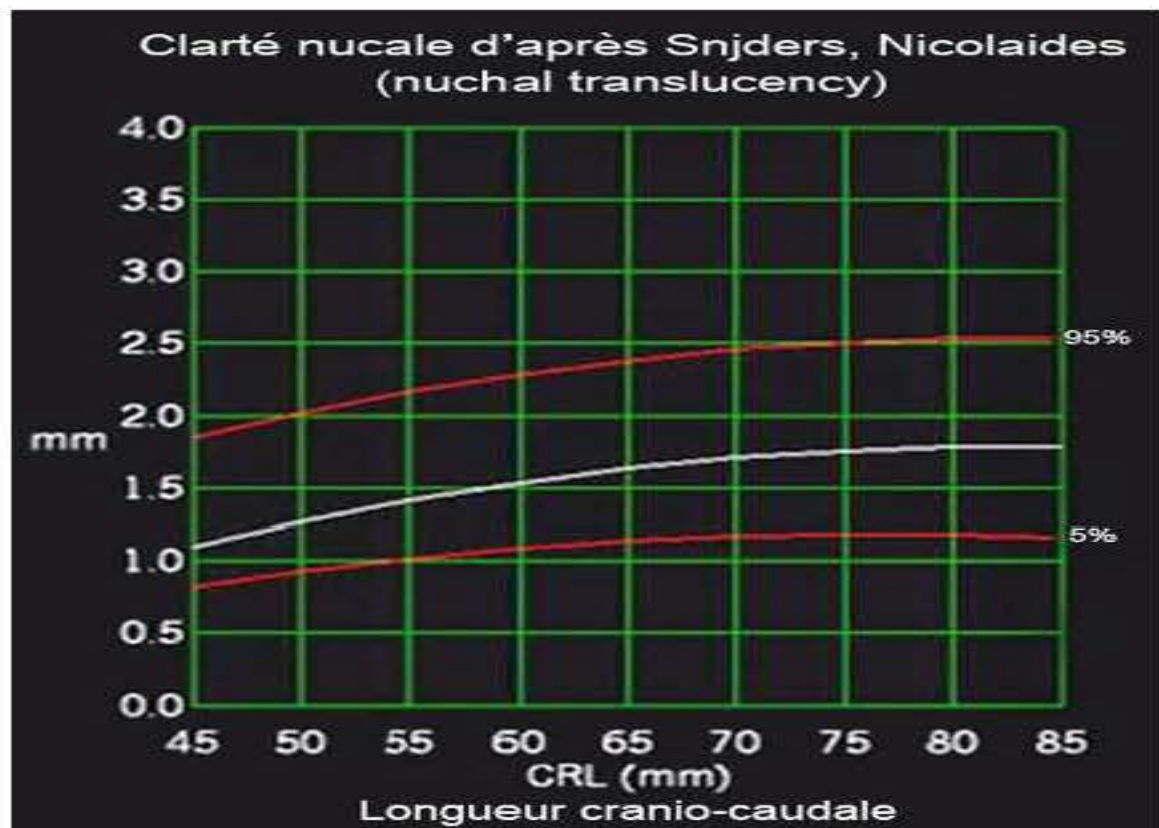


Figure 8 : Courbe de la clarté nucale en fonction de la longueur crânio-caudale en millimètres et en percentile : au-delà de 95%, les risques d'anomalies chromosomiques sont élevés.

En plus de la clarté nucale, d'autres signes échographiques peuvent aider à la suspicion de trisomie 21.

2. Les autres signes :

Ce sont des signes recherchés au cours du deuxième trimestre de grossesse, lors de l'échographie morphologique. Ils sont encore moins significatifs que la clarté nucale mais leur association est fortement évocatrice, surtout lorsque l'âge maternel est avancé. Il s'agit de:

Signes majeurs, malformatifs. Avant la vulgarisation de l'évaluation de la clarté nucale et du dépistage combiné, ils constituaient à eux seuls un motif pour la réalisation d'un caryotype:

→ Les cardiopathies malformatives avec le canal atrio-ventriculaire en premier rang.

→ L'atrésie duodénale par l'image de la double bulle est suffisamment fréquente en population trisomique 21 pour nécessiter un bilan plus complet.

Signes mineurs; il ne s'agit pas de malformations. Ce sont plutôt des signes que l'on rencontre plus souvent chez les trisomiques. Au moins un signe mineur est retrouvé chez 50 à 70% des fœtus trisomiques. De façon non exhaustive, on retrouvera:

→ l'hyperéchogénicité intestinale; la masse intestinale est hétérogène et mal limitée dans 5% des cas de trisomie 21 en échographie du 2^e trimestre.

→ La pyelectasie liée à l'hypotonie pyelocalicielle; sa sensibilité est faible lorsqu'elle est isolée, mais associée à un ou plusieurs autres signes mineurs, la prévalence de trisomie 21 augmente sensiblement.

→La dysmorphie faciale; elle est assez difficile à mettre en évidence. Néanmoins, l'aplasie et l'hypoplasie des os propres du nez sont fréquemment retrouvées.

→Les anomalies morphologiques du squelette sont de recherche échographique et d'interprétation délicate. Le fémur de longueur inférieure à la normale, le signe de la sandale et la brachymésophalangie représentent l'essentiel.

→Les anomalies cardiaques à types de spots hyperéchogènes intracardiaques sont intéressantes lorsqu'elles sont nombreuses.

D'autres signes non spécifiques tels que l'hydramnios et le retard de croissance intra-utérin sont pratiquement constants.

Ces signes revêtent une importance capitale pour les grossesses qui sont passées à travers les mailles du dépistage intégré du premier trimestre qui met à profit les marqueurs biologiques sanguins.

B. LES MARQUEURS BIOLOGIQUES: MARQUEURS SERIQUES MATERNELS

L'unité fœtoplacentaire est responsable de la sécrétion de plusieurs hormones détectables dans le sang maternel lors de la grossesse. En cas de trisomie 21, cette sécrétion est perturbée et ces substances en quantité anormales circulent dans le sang maternel. L'étude de ces substances a connue de très grands progrès: ils constituent les marqueurs sériques de la trisomie 21. Ils sont dosés à différentes périodes de la grossesse et sont intégrés dans une stratégie de dépistage anténatal, la valeur de chaque paramètre biochimique est exprimée en multiple de la médiane ou MoM (par comparaison avec les médianes établies sur une population de référence pour chaque âge gestationnel).

1. Alfafœtoprotéine (AFP)

L'alphafœtoprotéine est une glycoprotéine synthétisée d'abord par le sac vitellin puis par le foie fœtal. Son lien avec la trisomie 21 a été découvert par hasard, en 1984, lors d'études concernant les variations du taux aux cours des défauts de fermeture du tube neural.

Au cours d'une grossesse normale, l'AFP augmente régulièrement jusqu'à 30 SA, avant de décroître progressivement. Son rôle est encore peu connu, on suppose qu'elle participe au maintien immunologique de la grossesse. Les valeurs varient dans différentes situations physiologiques ou pathologiques telles que le poids maternel, les grossesses multiples, la présence de malformations fœtales ou lors de gestes invasifs. Des pathologies maternelles, tumorales surtout, peuvent aussi rendre compte d'anomalies du taux.

En cas de trisomie 21, l'AFP présente des taux inférieurs à la normale, d'environ 30%, ce qui correspond à 0.70MoM. Le dosage se fait après 14SA, début du deuxième trimestre. Tout âge confondu, le dosage de l'AFP seule ne permet de détecter que 7% des trisomies 21, soit moins que l'âge maternel. Son dosage doit donc être associé à d'autres paramètres du dépistage.

2. Human Chorionic Gonadotrophin et Beta Human Chorionic Gonadotrophin (HCG et B-HCG)

En 1987, Bogart montre que le taux de HCG est plus élevé lors de grossesses trisomiques par rapport à la normale. Cette glycoprotéine sécrétée par le tissu trophoblastique augmente fortement jusqu'à 10SA puis diminue jusqu'à 20SA lors de la grossesse pour se stabiliser avant de s'effondrer au terme de la grossesse. Elle est indispensable au maintien de la grossesse, à la différenciation sexuelle de l'embryon entre autres. L'HCG est formée de deux sous-unités Alpha et Beta.

La sous-unité Beta, la B-HCG, est plus significativement élevée lors de trisomies 21. C'est la fraction libre et elle est celle utilisée dans le dépistage. Les valeurs significatives sont celles supérieures à 2.5MoM, ce dosage est utilisé pendant le premier trimestre et peut aussi l'être lors du dépistage du deuxième trimestre.

3. Œstriol non conjuguée (uE3)

C'est un stéroïde strictement d'origine foetoplacentaire, provenant de la DHEA des surrénales fœtales.

Son dosage dans le cadre du dépistage se fait à 14SA, au deuxième trimestre, car il y a une augmentation régulière dans le sang maternel à partir de 14SA. Un taux inférieur à 0,7 MoM est évocateur de trisomie 21 surtout s'il est combiné à d'autres anomalies sériques. Néanmoins, vu la complexité des voies de synthèse, une anomalie isolée doit faire rechercher d'autres pathologies fœtales.

4. Protéine Plasmatique Placentaire A (PAPP-A)

Glycoprotéine macromoléculaire synthétisée par le trophoblaste. Elle augmente régulièrement au cours des deux premiers trimestres de la grossesse. Ce marqueur est utilisé pour le dépistage de la T21 au 1er trimestre de grossesse en association avec la fraction libre de l'HCG.

En cas de T21, la PAPP-A est anormalement diminuée par rapport aux grossesses témoins.

5. Les autres marqueurs

Ils sont au stade d'étude, n'étant pas encore intégrés dans le calcul du risque. Ils restent cependant des marqueurs prometteurs. Ce sont:

L'inhibine A : neuropeptide dont la cinétique va en augmentant de 11 à 145A et qui est augmenté en cas de trisomie 21. Son dosage est délicat.

La Pregnancy Spécifie Bi Glycoprotein (SPi) : glycoprotéine dont le taux est diminué lors de la trisomie 21.

L'A Desintegrin and Metalloprotease 12 (ADAM 12): glycoprotéine sécrétée uniquement durant la grossesse, dont les taux diminuent au premier trimestre de grossesses trisomiques 21.

C. STRATEGIES DE DEPISTAGE

Vu la variété des signes échographiques et celle des marqueurs sériques maternels, il a fallu intégrer certaines données et hiérarchiser la démarche de dépistage. Le dépistage de la trisomie 21 est actuellement généralisé, alors qu'il était réservé aux patientes âgées de plus de 38 ans et le dépistage combine désormais les marqueurs sériques et les données morphologiques.

Ce dépistage n'est pas obligatoire, mais tout praticien doit le proposer aux parturientes qu'il reçoit. L'échographie sera faite par des praticiens certifiés et les dosages par un nombre réduit de laboratoires. Il dégage des populations dont le risque de trisomie 21 est supérieur à 1/250, auxquelles il sera proposé un test diagnostic.

La cinétique des différents marqueurs sériques varie selon que l'on est au premier ou au deuxième trimestre de grossesse. Cela explique sans doute pourquoi le dépistage peut se situer au premier ou au deuxième trimestre de grossesse.

1. Dépistage du premier trimestre

Au cours du premier trimestre, la B-HCG et la PAPP-A sont les marqueurs utilisés. Ils sont combinés, lors du calcul du risque à la mesure de la clarté nucale corrélée à la longueur crânio-caudale et à l'âge maternel. Les dosages sériques et l'échographie se font entre 11SA + 0 jours et 13SA + 6 jours.

Avec cette méthode, les taux de détection, varient entre 73% et 100%, avec un taux de faux positif de 2.1% à 7.8% environ pour un seuil de détection de 1/250.

2. Dépistage du deuxième trimestre

Lorsque, pour des raisons quelconques, les dosages des marqueurs sériques n'ont pu être réalisés au premier trimestre, le dépistage portera sur la mesure de la clarté nucale associée à celle des marqueurs significatifs au deuxième trimestre.

Les prélèvements sanguins se feront entre 14SA et 17SA + 6jours. La B-HCG sera toujours de mise. Elle sera associée soit à l'AFP soit à l'uE3, double test, ou aux deux marqueurs, triple test.

Les taux de détection, varient dans ce cas de 79.8% à 80.6%, pour des faux positifs de 5 à 5.3%.

En sus des deux cas de figures vus, il y a la possibilité d'effectuer le dépistage de la Trisomie 21 lorsque la patiente est vue à 14 SA révolues. En effet, à cette date, les marqueurs sériques du premier trimestre ne sont plus valables et la mesure de la clarté nucale n'a plus de valeur.

Il sera proposé à ces patientes un dosage des marqueurs sériques uniquement.

3. Dépistage séquentiel intégré

Il s'agit ici d'associer les dosages du premier et du deuxième trimestre afin d'optimiser les résultats et minimiser au maximum les gestes invasifs nécessaires au diagnostic positif.

Les résultats de différentes études donnent des taux de détection de 94% à 95% pour des faux positifs de 5%.

La mesure de ces différents paramètres ne permet pas en fait de poser le diagnostic de Trisomie 21. Elle dégage plutôt un groupe de patientes pour lesquelles le risque d'avoir un enfant trisomique est élevé. C'est à ce niveau qu'intervient le calcul du risque.

4. Calcul et interprétation du risque

Le risque de trisomie 21 en fonction de l'âge maternel est connu. Selon le taux de chacun des marqueurs sériques, il est également connu, ainsi qu'en fonction de la clarté nucale.

Pris individuellement, chacune des données aura une valeur prédictive positive qui sera fonction de sa sensibilité et de sa spécificité, mais associées, elles seront encore plus performantes.

Bien entendu, il faudra effectuer les calculs en tenant compte de situations cliniques qui peuvent fausser l'association, telles que le poids maternel, le tabagisme actif, la gémellité. De plus, l'antécédent de trisomie 21 libre au cours d'une grossesse entraînant un risque de récurrence de 0.34, il est directement proposé une amniocentèse aux patientes concernées.

Le calcul du risque de trisomie 21 implique la définition d'un seuil auquel un test diagnostique est posé. Ce seuil est de 1/250 pour la plupart des études.

Le calcul se fera grâce à des logiciels informatiques qui intégreront certaines données:

- **L'âge maternel**
- **La clarté nucale en fonction de la longueur crânio-caudale**
- **Les valeurs des marqueurs sériques au premier et deuxième trimestre de grossesse.**

A ces données, certains logiciels intègrent le poids maternel.

Plusieurs utilitaires de calcul sont sur le marché, utilisés par les professionnels ou simplement à la disposition de toute personne voulant calculer son risque sur internet :

Le Casl-T21 : intègre l'âge maternel, la clarté nucale corrélée à la longueur crâniocaudale, le triple test sérique.

Palm OS Simulator - [NTFull_EFIGS.com]

Résultats

Risque à 37 ans	1/239
T3Test(Age+Sérum)	1/368
LCC	47 mm
- Âge gestationnel	11.0 sa
- Nuque Idéale	1.28 m...
Mesure de la nuque	1.9 mm
- Rapport de Vrais.	0.3802
Risque Age+Nuque	1/628
Risque Triplo+Nuque	1/968

Retour

APPLICATIONS MENU

abcde 12345

CALCULATOR FIND

Figure 9 : Pour un âge maternel de 37 ans, une clarté nucale à 1.9 (LCC de 47mm), le risque calculé de T21 est de 1/628.

Pour une clarté nucale à 1.9 (LCC de 47mm) et les résultats du test sériques, le risque calculé de T21 est de 1/628

Le logiciel risque intégré T21 de Brideron: calcule le risque lié à l'âge maternel, aux marqueurs sériques, à l'épaisseur de la nuque, le risque intégré:

Risque Intègre de Trisomie 21 (Brideron)

Date de naissance (JJ/MM/AA)	04/12/1956	Age maternel	47 ans 11 m	Résultats	à 15-18 SA	à Terme
Antécédents de T21	☐ Non ☐ Oui	Terme de l'échographie	12 SA 0 j	Age Mat.Seul	7	10
Date Echographie (JJ/MM/AA)	8/11/2004	Risque relatif de T21	1.429	Nuque Seule	11	15
LCC (45 à 84 mm)	56 mm	Médiane de la clarté nucale	1.5 mm	Sérotest Seul	150	191
Clarté nucale (mm)	2 mm	Multiple de la Médiane	1.333	Risque Intégré	1/ 229	1/ 291
Risque Séro	1/ 150	Rapport de vraisemblance	0.654	Nom		
Calcul de risque				Tout effacer	Envoyer	Imprimer

Figure 10 : interface du logiciel de calcul de risque intégré T21 de Brideron

Le dépistage anténatal de la trisomie 21 répond donc au tableau récapitulatif ci-dessous:

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de la stratégie de dépistage

	Dépistage au premier trimestre	Dépistage au deuxième trimestre	Dépistage séquentiel intégré
Semaines d'aménorrhée (SA)	De 11 SA + 0 jours à 13SA + 6jours	De 14SA à 17SA + 6jours	Echo : 11-13 SA +6 j Marqueurs: 14-17 SA
Marqueurs sériques maternels	. B-HCG . PAPP-A	. B HCG et . AFP et/ou uE3	.B-HCG . PAPP-A . AFP et/ou uE3
Echographie du premier trimestre	. CN et . LCC	. CN et . LCC :si réalisés	CN et LCC

*Hybridation en situ
en fluorescence (FISH)*

I GENERALITES ET HISTORIQUE :

La première hybridation in situ a été réalisée en 1969 sur des chromosomes d'Amphibiens par Gall et Pardue. Quatre ans plus tard, Jones et al ont appliqué cette technique sur les chromosomes humains pour localiser les séquences d'ADN hautement répétées. Les sondes à cette époque étaient marquées par des radio-isotopes.

Les premiers marquages non radioactifs, ont été réalisés en 1975 par MANNING et al .

Il s'agissait d'un marquage chimique d'un acide nucléique, à l'aide d'un cytochrome C biotinylé.

Puis dans les années 1980, ont été développés les marquages enzymatiques des sondes, ils consistaient à introduire dans la sonde par voie enzymatique, un nucléotide modifié par un haptène non isotopique. Les principaux utilisés étant actuellement la biotine et la digoxigénine.

Ce marquage présente des avantages considérables sur le marquage radioactif, puisqu'il permet, des installations moins lourdes et une manifestation plus facile, une obtention plus rapide des résultats: en 24 heures, alors qu'il fallait plusieurs semaines d'exposition pour obtenir un auto radiogramme, une meilleure stabilité des sondes, celles-ci se conservent plusieurs années à 20°C, et une meilleure sensibilité des techniques: peu de bruit de fond et détection d'une cible de taille inférieure à 1 kilobase (Kb).

Si les premières sondes utilisées détectaient des séquences répétées dans l'ADN du chromosome, GERHARD et al, ainsi que HARPER et al ont rendu possible en 1981, la mise en évidence d'une séquence unique sur chromosome.

Actuellement, grâce aux différentes méthodes de clonage et d'amplification, par le développement des techniques de PCR et de micro dissection de chromosomes humains introduites à partir de 1986 par KAISER et al, n'importe quel ADN peut servir de sonde à condition qu'il soit de taille suffisante pour être détecté.

Dans une troisième étape, l'introduction du marquage des sondes par des fluorochromes a permis l'apparition de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH).

L'utilisation combinée des différents fluorochromes, et le développement des microscopes à double puis triple bandes ont permis, l'apparition de la FISH multicolore. Celle-ci permet la détection simultanée de plusieurs cibles différentes sur une même métaphase.

Dans les années 1990, des variantes de la FISH sont apparues:

- KOCH a développé en 1989, la technique PRINS (Primed in situ Labelling) permettant de détecter des séquences hautement répétées dans l'ADN ou l'ARN. Cette technique consiste en l'hybridation spécifique d'une séquence d'ADN non marquée sur des chromosomes fixés, suivie d'une réaction de polymérisation in situ en présence de nucléotides modifiés.
- En 1992, KALLIONIEMI a introduit l'hybridation génomique comparative (CGH). Cette technique, permet détecter les changements du nombre de copies des séquences d'ADN et de localiser ces régions sur les chromosomes normaux.

II PRINCIPE ET ETAPES DE L'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE :

Il s'agit de la rencontre aléatoire, in vitro, de l'acide nucléique de la sonde avec sa séquence complémentaire de l'ADN du chromosome, ou cible, pour former un hybride, ce qui permet l'analyse d'aberrations chromosomiques de nombre et de structure. Cette stricte complémentarité des séquences nucléotidiques, assure la spécificité de l'association de la sonde avec sa cible (figure 10).

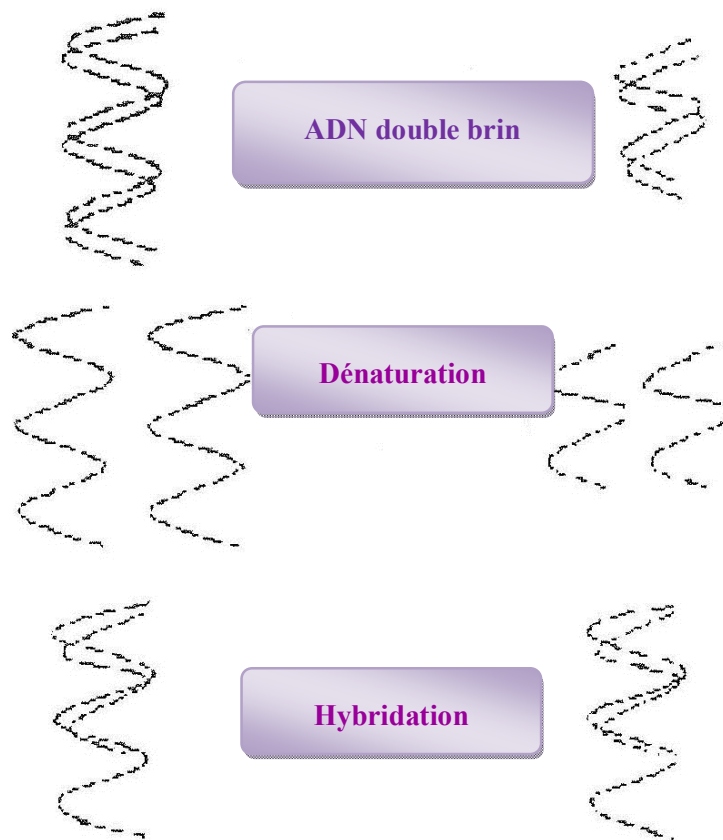


Figure 11 : principe de l'hybridation in situ [52]

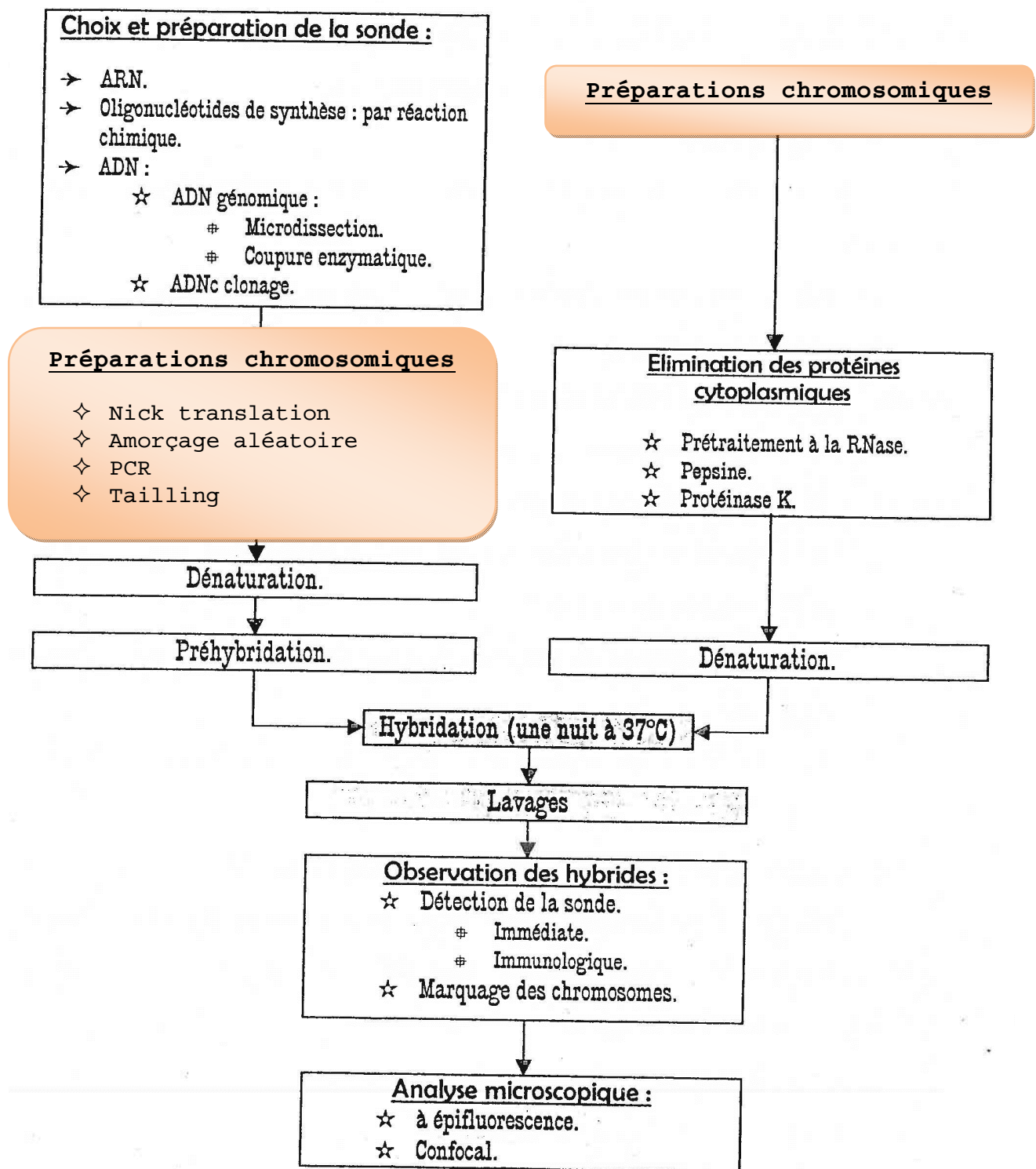


Figure 12 : Etapes de l'hybridation in situ en fluorescence.[52]

La réalisation de cette technique repose sur plusieurs étapes :

- La préparation du matériel chromosomique et de la sonde.
- Pour qu'un hybride puisse se former, la dénaturation de l'ADN du chromosome et de la sonde, si celle-ci est double brin, est nécessaire. Cette étape de dénaturation consiste à rompre les liaisons hydrogène, appariant les deux chaînes poly nucléotidiques de l'ADN pour les rendre simple brin.
- Au décours de cette étape, qui peut être selon la sonde employée, suivie d'une pré hybridation, l'hybridation peut avoir lieu. les conditions d'hybridation doivent tenir compte de plusieurs paramètres.
- Des lavages permettront ensuite l'élimination des hybridations aspécifiques.
- Les hybrides, ainsi formés seront observables au microscope à fluorescence, leur détection pourra être directe, ou précédée par une étape d'immunodétection suivant le marquage de la sonde utilisée.

La résolution de l'hybridation in situ en fluorescence est en fonction de la condensation de la chromatine. Elle augmente avec la condensation de celle-ci. En effet, plus la chromatine est condensée, plus deux séquences y apparaîtront proches d'un point de vue moléculaire.

Enfin, l'hybridation in situ se fait sur des préparations chromosomiques issues de prélèvements biologiques variés, aussi bien sur noyaux interphasiques (où l'ADN est condensé 1000 fois) que sur chromosomes métaphasiques, dans lesquels l'ADN est 6 à 10 fois plus condensé.

III. PARAMETRES INFLUENÇANT L'HYBRIDATION IN SITU :

III.1.Accessibilite de la sonde génomique :

III.1.1 Dénaturation:

Avant l'hybridation, il est nécessaire de dénaturer l'ADN cible et l'ADN sonde, si celui-ci est double brin.

La sonde est dénaturée par la chaleur seule (5 à 10 min entre 70° et 10°c).

Classiquement l'ADN du chromosome est traité par la chaleur à 70°C dans du formamide ultra pur dés ionisé, en général utilisé à 70% dans du 2 SSC (chlorure du sodium et citrate de sodium).

Cependant, il est nécessaire d'augmenter la température pour obtenir une bonne accessibilité de la cible dans les cas particuliers suivants:

- les préparations chromosomiques qui sont hybridées avec oligonucléotides de synthèse sont dénaturées à 80°C.
- Certaines préparations de tumeurs nécessitent également d'être dénaturées à une température supérieure.
- les préparations des chromosomes étirés par cytocentrifugation doivent être dénaturées à 80° c.

III.1.2- Elimination des protéines cytoplasmiques résiduelles:

Il s'agit d'une étape facultative et la nécessité de ce traitement dépend peut être de la qualité des préparations chromosomiques. Néanmoins, cette étape est importante pour l'hybridation sur noyaux interphasiques.

Pour l'élimination des protéines cytoplasmiques résiduelles, on dispose de l' ARNase suivie de l'emploi d'une protéinase ou de la pepsine.

III.1.3. Le pH des solutions:

Il est compris entre 7 et 7.5 ce qui correspond au pH physiologique compatible avec la préservation du matériel biologique. Précision que s'il est possible d'ajuster le pH des solutions avec de l'acide chlorhydrique l'ajout de soude est déconseillé car elle altérerait la qualité des chromosomes.

III.2 Paramètre influençant la formation et la stabilité de L'hybride

III.2.1 Théorie de la stabilité des hybrides :

Quand on chauffe une solution d'ADN double brin au-delà d'une certaine température, les deux brins se séparent par rupture des liaisons hydrogène.

La température de fusion (T_m) donne une mesure de la stabilité des hybrides. Elle correspond à la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN sont en simple brin. Elle est déterminée par plusieurs paramètres donnés par l'équation de THOMAS et DANCIS :

$$T_m : 81,5 + 16,610g (M) + 0,4 (\% GC) - 8 (011 - 0,6 (\% F)).I$$

- M: force ionique du milieu

- % GC : pourcentage en Guanine et Cytosine de la sonde.
- l: longueur de la sonde en bases.
- % F : Pourcentage en formamide dans la solution.

On conclut alors que la stabilité des hybrides est favorisée par :

Une force ionique élevée du milieu

- Une sonde de grande longueur.
- Un pourcentage élevé en Cytosine et en Guanine ce qui assure la formation des 3 liaisons hydrogène.

III-2-2- Composition de la solution d'hybridation:

La composition de la solution d'hybridation vise à créer les conditions physico-chimiques les mieux adaptées à l'hybridation moléculaire stable entre les séquences d'acides nucléiques de la sonde et de la cible.

- le formamide : permet d'abaisser la température de dénaturation, afin de préserver la qualité des préparations d'ADN chromosomique.
- le sulfate de dextran permet d'augmenter le signal d'hybridation en favorisant l'association entre molécules hybridées et partiellement hybridées.
- la concentration en sels de sodium: représentée par le SSC.
- le sodium dodécyl sulfate (SDS): C'est un détergent, il permet de diminuer l'hybridation aspécifique.

III-2-3- La température et la durée d'incubation:

La température d'incubation détermine la vitesse de réassociation des séquences complémentaires de l'ADN de la sonde et de l'ADN cible. En effet, si la température est de 20° C en dessous du T_m la réaction est trop lente. Par contre si elle n'est que 5°C en dessous du T_m la réaction est trop rapide et ne peut donc se faire.

La durée d'incubation est en moyenne 16 heures, elle est rallongée à plusieurs jours dans certains cas, comme pour la CGH (hybridation génomique comparatif).

III.3 La spécificité de l'hybridation

Plusieurs paramètres interviennent :

III.3.1- La taille et la nature de la sonde:

Si la sonde est constituée d'ADN génomique, plus sa séquence est longue, plus l'hybride formé sera grand et stable, donc facile à détecter. Cependant, plus la sonde est grande, plus elle risque de contenir des séquences répétées susceptibles de générer du bruit de fond. Si la sonde est petite mais si la séquence est répétée en tandem un grand nombre de fois dans l'ADN cible, la détection des hybrides sera facilitée. Si la sonde est constituée d'ADN complémentaire (contenant exclusivement des exons), la taille du signal dépendra de l'organisation des séquences exotiques dans l'ADN cible: dans certaine limite, le signal pourra être d'autant plus fort que ces séquences seront dispersées sur une plus grande distance d'ADN cible.

Ce type de sonde donne un signal d'hybridation très propre puisqu'il ne contient pas de séquences répétées.

III ·3·2· Concentration de la sonde dans le milieu d'hybridation:

Il faut adapter la concentration de sonde utilisée en fonction de la taille de la sonde et de la nature de la séquence cible dans les chromosomes.

III. 3·3· Lavages post hybridation :

Ils permettent l'élimination des hybrides aspécifiques et de la sonde non hybridée. Leur efficacité est liée à leur astringence laquelle est déterminée par:

- La température de lavage entre 37°C et 60°C.
- La durée de chaque bain s'échelonne de quelques minutes à 30 minutes.
- La concentration en formamide
- La concentration en sels de sodium.

Les lavages sont adaptés en fonction de la nature de la sonde.

IV. PREPARATION DE LA SONDE

IV.1 Définition:

Une sonde est une séquence polynucléotidique marquée à l'aide d'une molécule modifiée que l'on peut ensuite détecter. La propriété d'une séquence d'ADN de retrouver sa séquence complémentaire et de s'hybrider avec elle de façon stable, dont les conditions expérimentales confèrent à la sonde sa spécificité.

La sonde idéale doit donner un signal d'hybridation aussi intense que possible mais aussi focal que possible. La sonde peut être constituée soit:

➤ **d'ADN:**

- **Bicaténaire:** il peut s'agir d'un fragment d'ADN génomique ou bien d'ADN complémentaire (ADNc).
- **Monocaténaire:** plus rarement utilisé en hybridation in situ.
- **d'ARN (Acide ribonucléique):** obtenu par la transcription in vitro d'un ADNc inséré dans un plasmide.
- **oligonucléotides de synthèse.**

IV. 2. TYPE DE SONDES

Le type de matériel qui peut être utilisé comme sonde varie de la petite séquence d'ADN génomique (ou d'ADNc) jusqu'à l'ADN d'un chromosome entier voir d'un génome entier. Des banques d'ADN spécifiques de chaque chromosome humain sont maintenant commercialisées ainsi que des sondes spécifiques de la plupart des centromères, télomères et d'un grand nombre de loci spécifiques.

Les fragments d'ADN, qui vont être marqués, peuvent être obtenus de plusieurs façons. L'ADN est obtenu après clonage dans un vecteur ou après synthèse in vitro.

IV-2-1- ADN cloné dans un vecteur:

a. Méthodes d'obtention de l'ADN:

Le fragment d'ADN initial peut être de l'ADN génomique, ou un ADN complémentaire.

→ADN génomique

Il peut être obtenu par:

- **Coupage enzymatique.**
- **ou microdissection** : Elle est réalisée sous microscope inversé.
A partir d'un chromosome initial marqué en bandes G, on prélève à l'aide d'une aiguille fine siliconée un fragment de ce chromosome et

on le place dans une microgoutte de collecte. Ce fragment est traité par la protéinase K, l'ADN est ensuite extrait par le phénol puis coupé par une enzyme de restriction.

L'ADN ainsi obtenu est ligaturé à un oligonucléotide duplex contenant une séquence servant d'amorce pour l'amplification par DOP-PCR. Il s'agit d'une amplification en deux étapes: la première étape a lieu à basse température, permettant l'hybridation de l'amorce, elle est ensuite suivie d'une étape classique de PCR.

Les produits de PCR obtenus sont ensuite clivés par une enzyme de restriction pour les séparer de leur amorce, puis introduits dans un vecteur de clonage.

➤ **ADN complémentaire**

Il est uniquement constitué de séquences exotiques, et est obtenu in vitro à partir d'un ARNm par transcription inverse ; ce fragment est ensuite intégré dans un vecteur .

b. Le clonage moléculaire: les différents vecteurs de clonage.

Le but du clonage est d'obtenir un grand nombre de copies absolument pures d'une séquence d'ADN. Cette étape s'effectue par la sélection d'un clone bactérien recombinants contenant le vecteur dans lequel l'ADN que l'on désire obtenir est intégré. Différents vecteurs peuvent être utilisés, leur choix se fait en fonction de la taille du fragment d'ADN à intégrer.

- **les bactériophages**: ce sont des virus infectant une bactérie. les plus couramment utilisés sont les phages: lambda et M 13. Ils infectent Echerichia-Coli. La taille du fragment d'ADN que l'on peut insérer dans ce vecteur peut varier de 5 à 20 Kb.
- **Les plasmides**: ce sont des molécules d'ADN circulaires extrachromosomiques d'origine bactérienne, leur réplication est indépendante de celle du génome bactérien, ils peuvent recevoir jusqu'à 10 kilobases d'ADN exogène.
- **Les cosmides**: sont des plasmides auxquels les séquences COS du phage lambda ont été rajoutées. Ils permettent d'y insérer des fragments d'ADN exogène de grande taille pouvant mesurer jusqu'à 45 kilobases. Ce type de sondes, qui présente l'avantage de donner des signaux d'hybridation gros, est très utilisé en FISH.
- **Les YACS**: (Yest Artifidul Chromosome). Il s'agit de chromosomes artificiels de levure comportant une séquence centromérique, deux séquences télomériques, et une séquence nécessaire à leur réplication. On y insère des fragments d'ADN variant de 150 à 1000 kilobases. Ces YACS recombinants sont ensuite introduits dans des levures et se multiplient comme des chromosomes normaux. Leur inconvénient est qu'ils ne sont pas stables, au cours de leur recombinaison, ils peuvent perdre des séquences ou bien juxtaposer des séquences qui sont normalement éloignées dans leur génome.

IV-2-2- ADN synthétisé in vitro:

Outre le clonage, il est également possible d'obtenir des sondes par synthèse in vitro qui sont des oligonucléotides synthétiques, soit des ADN amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

a. Oligonudéotides synthétiques:

Ces sondes sont synthétisées sous forme d'ADN monocaténaire de taille variant de 15 à 20 nucléotides. Elles sont obtenues par des réactions chimiques utilisant la voie des phosphoramitides ou des phosphates, et s'effectuant dans des appareils automatisés.

b- Produit de PCR :

De plus en plus fréquemment, des sondes amplifiées par PCR (ADN de petite taille ou obtenu par microdissection), sont utilisées pour l'hybridation in situ sur chromosomes. En général, des fragments de quelques centaines de paires de bases à quelques Kb sont amplifiés.

IV.3. Les sondes disponibles

IV-3-1- Les sondes de peinture chromosomique:

Elles sont constituées d'un ensemble de séquences spécifiques d'un chromosome entier ou d'une partie de chromosome. La principale difficulté dans leur utilisation tient dans le fait qu'en plus des séquences spécifiques de chromosome, elles contiennent des séquences répétées à tous les chromosomes. Il s'agit de séquences IRS (Inter speed répétitive séquence) de type:

- **SINE:** (Small Interspeed Repetitive Element, telles que les séquences AL 4 surtout représentées dans les bandes R).
- **LINE:** (Large Interspeed Repetitive Element, telles les séquences LINE et THE 1 prédominantes dans les bandes G et Q).

Pour éviter les hybridations non spécifiques, un protocole appelé CISS (chromosomal In Situ Suppression hybridation) a été élaboré. Il consiste à ajouter dans la solution d'hybridation où se trouve la sonde, de l'ADN compétiteur. C'est un ADN humain non marqué et dénaturé en même temps que la sonde, puis a lieu une étape de préhybridation à 37°C s'échelonnant de 30 minutes à 2 heures, au cours de laquelle, vont se réassocier les séquences répétées du compétiteur et de la sonde.

Au décourt de cette étape, la sonde sera donc essentiellement constituée de séquences spécifiques du chromosome. L'utilisation de ces sondes disponibles actuellement pour tous les chromosomes humains et dans différents marquages, est intéressante dans différents contextes. L'utilisation de ces sondes présente certaines limites:

- toutes les sondes ne donnent pas le même marquage, ces différences seraient peut être dues à leur mode de fabrication.
- Il est déconseillé de les utiliser sur noyaux interphasiques, car elles peuvent être source d'erreurs d'interprétation liées ou chevauchement des chromosomes peints.

IV-3-2-Les sondes alpha satellites:

Il s'agit de sondes constituées de séquences répétées s'hybridant avec les ADN alpha satellites ou alphasatellites présents dans tous les centromères.

Ces séquences sont très différentes dans leur organisation, d'un chromosome à un autre, ces sondes peuvent donc être chacune spécifique d'un centromère. Mais ceci ne s'applique pas aux chromosomes 13 et 21, ainsi qu'aux chromosomes 14 et 22 dont les séquences alpha satellites de leurs centromères présentent 99.7% d'homologies entre-elle. Il en résulte une hybridation croisée.

IV-3-3- Les sondes locus spécifiques:

De nombreuses maladies génétiques ont été associées à une anomalie chromosomique touchant un locus identifié. Beaucoup de sondes locus spécifiques marquées de façon différente sont actuellement commercialisées et utilisables sur chromosomes métaphasiques.

Elles permettent la mise en évidence d'une micro délétion se traduisant par l'absence de signal d'hybridation sur le chromosome au niveau de la séquence étudiée. Elles sont souvent associées à une sonde contrôle correspondant à un locus du même chromosome afin d'être sûr que l'hybridation a bien eu lieu d'une part, et d'autre part de pouvoir repérer le chromosome étudié.

Leur utilisation présente certaines limites:

- Pour être détectées sans ambiguïté, la taille des sondes doit excéder 25 kb.
- De plus elle doit recouvrir plus de 50% de la cible avec laquelle elle s'hybride.

IV-3-4- Les sondes télomériques et subtélomériques :

De nombreux gènes responsables de maladies génétiques sont localisés dans ces régions. Le télomère localisé à chacune des deux extrémités d'une chromatide maintient l'intégrité du chromosome. Il est constitué d'une répétition en tandem de six paires de bases 5' TTAGGG 3', d'une longueur variant de 2 à 30 kilobases. Ainsi, les sondes oligonucléotidiques reconnaissant cette séquence sont utilisées en hybridation in situ pour détecter tous les télomères.

Les régions subtélomériques sont constituées de différentes séquences, répétées avec des périodicités différentes. Elles présentent donc un important polymorphisme de longueur. Ces séquences sont souvent spécifiques d'un chromosome et sont reconnues par des sondes oligonucléotidiques.

L'utilisation de ces sondes peut permettre de mettre en évidence par la FISH, des délétions et des translocations cryptiques difficilement détectables par les techniques de cytogénétique conventionnelles.

IV.4. Marquage des ADN à l'usage des sondes :

IV.4 1- Marquage radioactif:

Il n'est plus utilisé en pratique courante.

VI-4-2- Marquage non radioactif:

a- Marquage indirect de l'ADN:

La sonde contient une molécule rapporteur, introduite chimiquement ou par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique, ce procédé la rend détectable par immunocytochimie. La molécule rapporteur ne doit pas interférer dans la réaction d'hybridation et avec la stabilité de l'hybride obtenu, cette même molécule doit être accessible aux anticorps.

Deux types d'haptènes sont employés:

- **La biotine (vitamine H) :**

L'adjonction de la biotine à l'ADN peut se faire par voie enzymatique ou par voie photochimique. La biotine se fixe sur l'uracyle du dUTP en position C5, par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée de longueur variable, on obtient alors un nucléotide biotinylé. Ce dernier peut être détecté, soit par son affinité pour l'avidine, soit par un anticorps anti biotine..

- **La digoxigénine**

Elle est extraite de la Digitale. Comme dans le cas de la biotine, la digoxigénine est située en position C5 sur l'Uracyle du dUTP, par une chaîne carbonée d'onze atomes de carbone suivant les mêmes procédés enzymatiques.

Les propriétés de la digoxigénine font que l'ADN ainsi marqué, peut être détecté, par un anticorps spécifique directement fluorescent ou bien couplé à une enzyme ou à un second anticorps.

Ces deux haptènes offrent le même rendement en hybridation in situ en fluorescence. L'utilisation de ces deux haptènes peut se faire simultanément lorsque l'on veut faire une hybridation multiple.

b- Marquage direct de l'ADN:

La molécule fluorescente est directement liée à la sonde, et forme un hybride avec l'ADN cible, qui peut être directement visualisé au microscope à fluorescence. L'hybride sonde marqué cible doit résister aux différentes étapes du protocole de la FISH et la molécule rapporteur ne doit pas interférer dans la réaction. Les techniques de marquage seront décrites dans le paragraphe suivant.

WIEGANT en 1991, ainsi que KOCH en 1992 ont mis au point les premiers nucléotides fluorescents. Il s'agissait de fluorescéines d'UTP. Depuis d'autres nucléotides fluorescents ont été commercialisés.

Leur emploi présente divers avantages:

- Le protocole de la FISH est simplifié puisque l'étape de détection de la fluorescence par un anticorps est évitée.
- L'absence d'utilisation d'un anticorps permet une considérable diminution du bruit de fond.

Leur utilisation présente aussi des inconvénients:

- La sensibilité de détection de ces sondes est limitée aux séquences répétées, ou aux sondes insérées dans un cosmide.
- Leur maniement nécessite de grandes précautions, puisque ces sondes doivent rester en permanence à l'abri de la lumière.

C- Les techniques de marquage de l'ADN:

C.1. Procédés enzymatiques

C.1.1 Nick translation ou déplacement de coupures :(figure12)

Elle a été appliquée aux nucléotides non radioactifs par LANGER en 1981. C'est la technique de marquage la plus ancienne, et la mieux appropriée à un ADN de taille supérieure à 500 paires de bases. La réaction se fait par l'action conjuguée de deux enzymes:

* ADN polymérase 1 (ADN pol1) qui possède trois activités:

- Exonucléasique dans le sens 3' 5'.
- Exonucléasique dans le sens 5' 3'.
- ADN polymérasique dans le sens 5', 3' à partir d'une amorce 3'OH.
- DNase 1: génère des coupures aléatoires dans l'ADN simple brin en présence d'ions Mg^{++} .

Après que la DNase 1 ait introduit des coupures aléatoires simple brin, l'enzyme pol 1 élimine les nucléotides terminaux dans le sens 5' 3' sur chaque brin, par son activité exonucléasique, et synthétise un brin complémentaire par son activité polymérasique, en incorporant des nucléotides modifiés.

Les deux actions de ces enzymes sont simultanées.

Le taux de nucléotides modifiés incorporés est contrôlé par trois paramètres:

- la durée de la réaction,
- La concentration de l'ADN pol 1
- la concentration du nucléotide modifié.

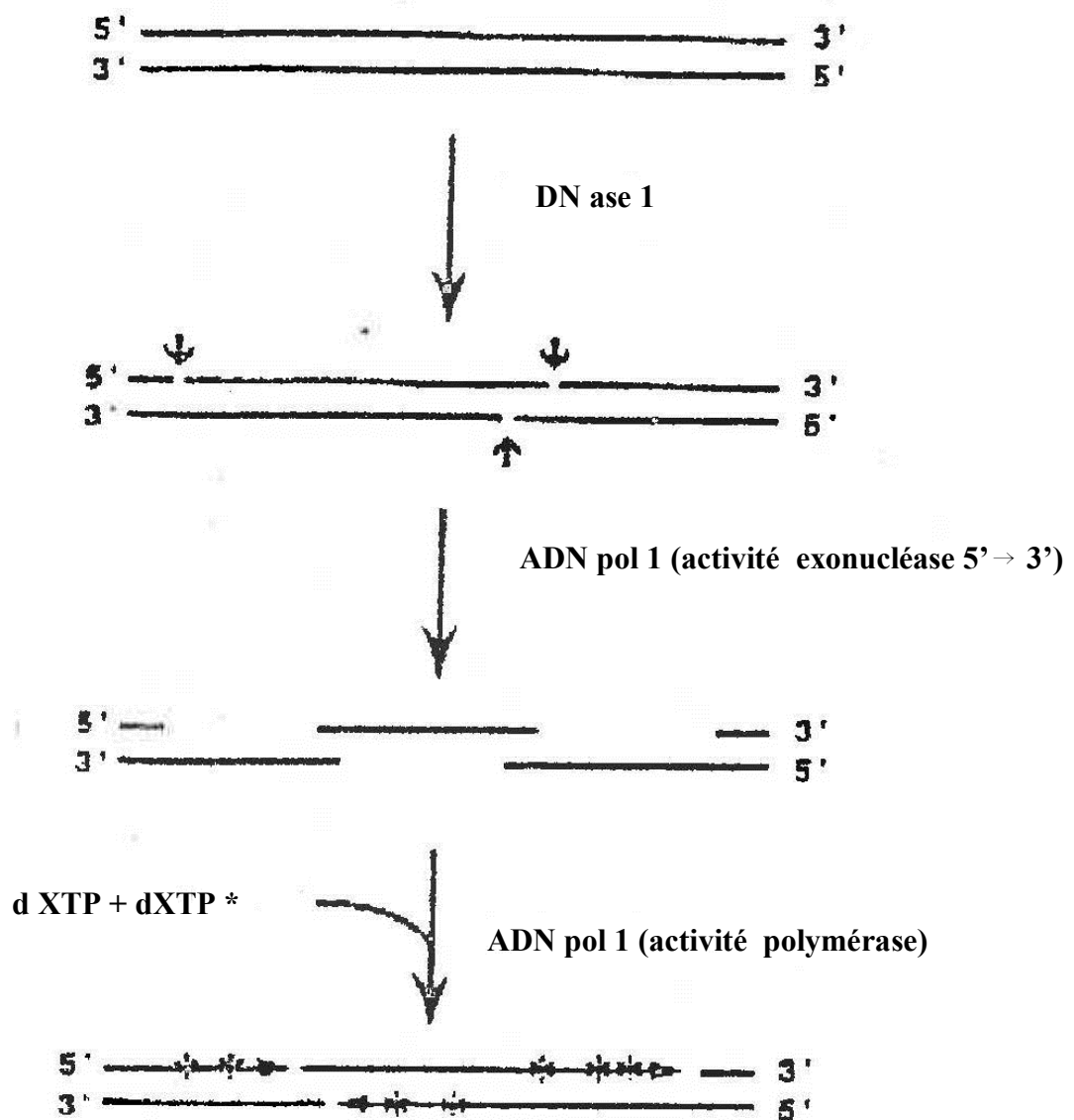


Figure 13 : La Nick translation [52]

C.1.2 L'amorçage aléatoire ou « random priming»

Cette technique de marquage a été développée en 1984 par FEINBERG et VOLGELSTEIN et est aujourd'hui abandonnée au profit de la Nick translation.

C.1.3 La réaction en polymérisation en chaîne (PCR) :

Après dénaturation de l'ADN, on ajoute deux amorces oligonucléotidiques complémentaires d'une séquence sur l'un des brins et flanquants le segment à amplifier, Chaque amorce s'hybride sur sa séquence cible et sert d'amorce pour la synthèse d'un nouveau brin en présence de nucléotides modifiés. Cette réaction est catalysée par l'ADN polymérase et se fait dans le sens 5' vers 3'.

Ce cycle est répété environ une vingtaine de fois, pour obtenir une purification presque parfaite des copies; le produit de PCR est directement utilisé comme sonde.

C.1.4 Le « Tailing » : (figure 13)

Il s'agit d'une technique peu sensible consistant à former une queue polynucléotidique contenant des nucléotides modifiés, à partir de l'extrémité 3'OH des oligonucléotides de synthèse.

Cette réaction est limitée car elle est réservée uniquement aux oligonucléotides de synthèse, d'autre part la détection est réduite puisque seule une partie de la sonde est marquée.

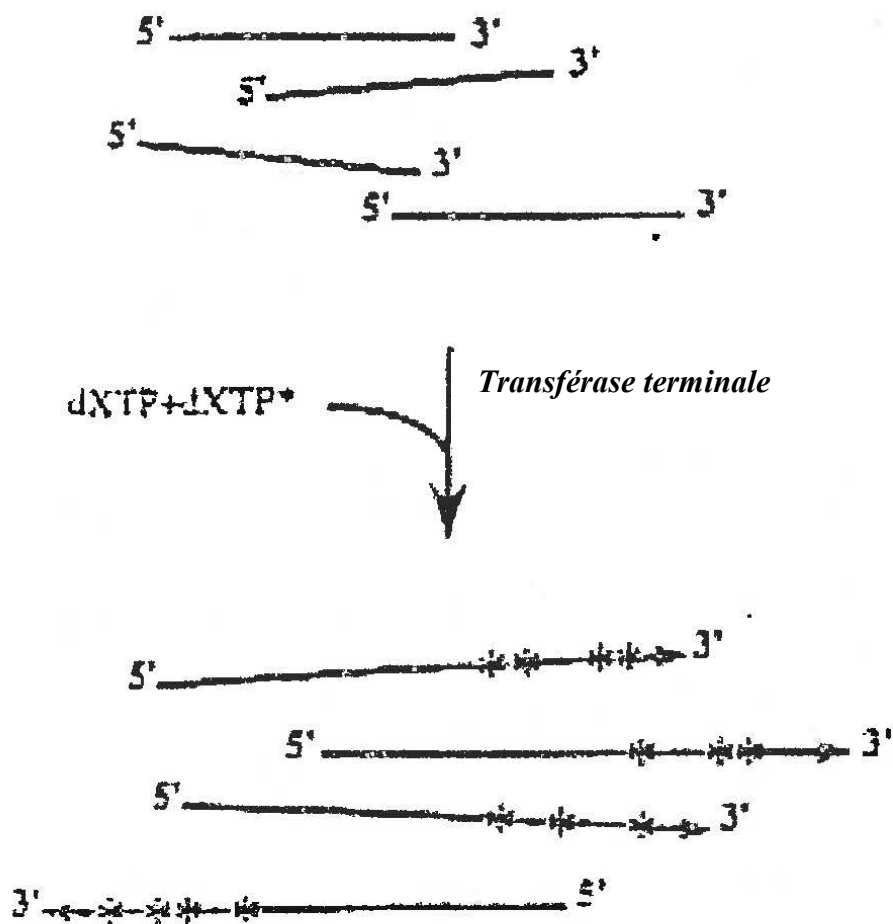


Figure 14 : le «Tailing» [52]

C.2. Procédés chimiques :

Ce système ne nécessite pas d'incorporer des nucléotides modifiés dans la sonde, leur modification se faisant directement par réaction chimique. Ce procédé est rarement utilisé en hybridation in situ sur chromosomes.

C.2.1 Marquage par Acétaminofluorène:

Ce procédé mis au point par TCHEN et al. En 1984, consiste à introduire chimiquement des AAF dans la sonde pour la rendre immunogène. Une immunodétection indirecte est réalisée par un premier anticorps anti AAF, suivie de l'action d'un second anticorps marqué par un fluorochrome et dirigé contre la partie Fc du premier anticorps.

C.2.2 La mercuration:

La sonde est modifiée par un atome de mercure puis hybridée. On ajoute alors un ligand lié à un haptène qui réagit de façon covalente avec cet atome de mercure.

Ces deux techniques ne sont actuellement utilisées, que pour la formation de sondes servant à la détection des ADN répétés.

d. vérification de marquage :

Deux paramètres sont vérifiés:

→la taille des fragments marqués: Elle est contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose, la taille optimale du fragment se situe entre 200 et 500 bases.

→le taux d'incorporation de nucléotides modifiés: ce paramètre est important car plus la sonde contient des nucléotides modifiés, plus le signal d'hybridation est fort; par contre l'hybride est moins stable. On considère pour cela qu'un taux de substitution de 25% à 30% donne les meilleurs résultats.

→Ce taux est estimé par une méthode immunoenzymatique sur membrane, donnant une tache colorée pour chaque sonde déposée sur cette membrane et dont l'intensité est comparée à un ADN témoin.

e• Purification de la sonde:

Elle est effectuée par la séparation des nucléotides non incorporés sur colonne de Séphadex par chromatographie, suivie d'une précipitation dans l'éthanol absolu. Cette étape n'est pas obligatoire s'il s'agit d'un marquage à la digoxigénine..

V. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE :

V.1 Culture Cellulaire

De nombreux tissus sont utilisés pour réaliser des préparations chromosomiques. Les tissus les plus communément cultivés sont le sang et les biopsies de peau, pour le diagnostic d'anomalies constitutionnelles ou pour la recherche. Dans un but de diagnostic prénatal les amniocytes, les villosités chorales et plus rarement le sang fœtal peuvent être utilisés. L'analyse d'anomalies chromosomiques acquises peut être réalisée à partir de différentes tumeurs (leucémies ou tumeurs solides). D'autre part, des préparations de chromosomes méiotiques peuvent être obtenues à partir de biopsies testiculaires. Enfin, les lignées cellulaires immortalisées sont une source de matériel intéressante pour de nombreuses applications de recherche. Toutes ces cultures nécessitent des conditions strictes de stérilité.

V-1-1- Lymphocytes:

La technique de culture se fait sur sang périphérique total.

Le milieu de culture pour un tube est constitué par un milieu 199, en présence de 10 % du sérum du veau fœtale, héparine, et de la solution de phytohémagglutinine (PHA.C), des antibiotiques.

Le Sang total est prélevé par ponction veineuse dans un tube stérile contenant de l'héparine. Il peut être conservé à +4°C pendant quelques jours avant sa mise en culture. Les cultures sont effectuées stérilement dans des tubes à fond conique de 10 ml.

En premier, on prépare un tube de culture contenant 8 ml du milieu.

On Ensemence 0.5 ml de sang total (environ 3000 lymphocytes), on homogénéise, et on place le tube, horizontalement dans une étuve sèche à 37° C (pendant 48, 72 ou 96 heures. La phytohémagglutinine C (PHA-C) contenue dans le milieu provoque une transformation plastique, assurant le passage de la phase Go à la phase G1 du cycle cellulaire. D'autres agents mitogènes Peuvent être utilisés, la conconavaline (Con A) et l'extrait de hitolocca americana (Pok eweed mitogen: PWM). La PHA et la con-A stimulent presque exclusivement les lymphocytes T, alors que le PWM provoque la transformation des lymphocytes B et T. La PHA est le mitogène le plus efficace.

Lors de la stimulation des cellules par la PHA, les premières mitoses apparaissent après 40h d'incubation à 37°C, le nombre maximum de métaphase en seconde division est observé au bout de 70 à 76h.

V-1-2- Fibroblaste:

Une biopsie cutanée est réalisée de façon stérile et est découpée en plusieurs fragments de 0.5 mm. Ces morceaux sont mis en culture dans des flasques dans une étuve à 37° C, sous 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé 24 heures plus tard puis deux à trois fois par semaine. Quand la croissance est suffisante, c'est à dire lorsque les cellules sont confluentes, celles-ci sont décollées par de la trypsine et préparées suivant les méthodes d'obtention d'un caryotype standard.

V-1-3- lignées cellulaires:

Les conditions de culture doivent être adaptées à chaque lignée. Le milieu de culture utilisé est fonction des exigences de la lignée cellulaire.

Il est recommandé de faire une courbe de croissance des cellules en fonction du temps de culture (numération cellulaire toutes les 24 h). On peut ainsi en déduire le temps de doublement de la population cellulaire, connaître le nombre maximum de cellules/ml de milieu de culture (ou par flacon) et le temps nécessaire pour atteindre la confluence. A la confluence, les cellules d'un flacon sont divisées dans deux flacons de culture. Pour les lignées en suspension, un traitement mécanique à la pipette pasteur est nécessaire pour homogénéiser la suspension cellulaire avant la division. Pour les lignées adhérentes, un décollement par la trypsine est nécessaire pour remettre les cellules en suspension avant la division. Pour effectuer des préparations chromosomiques après un passage, les cellules sont cultivées dans un milieu enrichi en sérum de veau fœtal (10%). Les préparations chromosomiques sont effectuées environ 24 h après un passage.

V-1-4- Les prélèvements pour diagnostic prénatal:

a- Amniocytes :

Depuis le premier caryotype réalisé à partir d'un échantillon de liquide amniotique par Kingler en 1965, l'amniocentèse ou prélèvement de liquide amniotique (PLA) s'est imposée comme la plus simple et la plus répandue des techniques d'accès au fœtus.

Elle peut être pratiquée à partir de 2 semaines d'aménorrhée (2 S.A) jusqu'au terme de la grossesse et il est habituel de distinguer:

- L'amniocentèse précoce entre 13 et 15 S.A.
- L'amniocentèse classique entre 16 et 20 S.A.
- L'amniocentèse au-delà de la 20 S.A.

Sur le plan pratique, les deux dernières sont peu différentes, se distinguant seulement par un rapport moins favorable entre volume fœtal et volume du liquide amniotique après 20 S.A. Classiquement la 17ème S.A est la période optimale pour sa réalisation car c'est au cours de celle-ci que ce rapport est le plus propice et que la proportion d'amniocytes et de cellules fœtales desquamées vivantes est la plus importante.

Deux milieux de cultures différents sont utilisés en parallèle pour chaque prélèvement et 1ml de liquide amniotique estensemencé dans un flacon de culture (25 cm^l).

Le prélèvement peut être directement mis en culture sans centrifugation préalable, 2.5 ml de liquide amniotique sontensemencés par lames. Les cultures peuvent être effectuées dans de petits flacons de culture soudés sur des lames de verre (flaskettes).

b. Villosités choriales :

Développé en France depuis 1982, le prélèvement de villosités choriales (PVC) ou biopsie de trophoblastes, permet d'obtenir un diagnostic cytogénétique ou biochimique dès la 10^e S.A. le principal avantage de la technique en est la précocité.

Des cultures à court et moyen terme sont effectuées pour chaque prélèvement.

Plus le temps de culture augmente plus les risques de contamination de la culture par des cellules maternelles sont grands: l'étape de séparation des villosités des tissus maternels doit être effectuée avec minutie.

Pour la culture à moyen terme, le volume de la suspension cellulaire déposé sur la lame de verre est ajusté en fonction de sa richesse en cellule, de « l'âge » et de l'état initial des cellules.

c. Le sang fœtal:

Réalisé pour 10 première fois en 1983 en France par Duflos, il est le plus souvent pratiqué dans un but diagnostique, mais peut l'être aussi dans un but thérapeutique, principalement pour transfusion in utero (dans le cadre d'une incompatibilité Rhésus ou d'une infection à Parvovirus B par exemple).

d. Les cellules cœlomiques :

Le liquide est recueilli par cœlocentèse. Ce mode de prélèvement, décrit par JURKOVIC en 1993, consiste, en une ponction dans la cavité cœlomique

par voie vaginale, sous échographie, entre 7 et 9 semaines de grossesse. La qualité du prélèvement, est ensuite vérifiée par le dosage de l'HCG dans le liquide cœlomique.

Le liquide recueilli, peut être:

- soit mis en culture dans des flasquettes en plastique, en présence d'un mélange de milieux de cultures frais et ayant auparavant servi à la culture de fibroblastes fœtaux. La culture dure en moyenne 16 jours, les mitoses sont ensuite obtenues suivant les méthodes d'un caryotype classique
- Soit directement utilisé, un choc hypotonique et plusieurs fixations sont effectués, les lames obtenues, sont ensuite employées pour de l'hybridation in situ.

V -1-5- Prélèvement de patients leucémiques:

a- Moelle osseuse:

Les conditions de culture utilisées pour les lymphocytes sont reprises pour les cellules de la moelle osseuse. Le prélèvement de 10 moelles estensemencé immédiatement, à raison de 10^6 cellules nucléées par ml. Trois types de tubes sont préparés:

- un tube destiné à l'examen immédiat, contenant de la colchicine.
- un tube mis à incuber durant 24 h à 37°C.
- un tube mis à incuber durant 48 h à 37°C.

On procède ensuite aux préparations chromosomiques

b- Sang:

En cas de présence de blastes circulants, l'examen peut être effectué à partir du sang périphérique. Les conditions de culture sont identiques à celles de la moelle osseuse.

Deux types de tubes uniquement sont préparés:

- un tube mis à incuber durant 24 h, à 37°C.
- un tube mis à incuber durant 48 h, à 37°C.

On procède ensuite aux préparations chromosomiques. La quantité de sang à ensemercer est variable en fonction du nombre de leucocytes, à raison de 10^6 cellules/ml.

En parallèle, une culture de lymphocytes stimulés par la PHA-C durant 72h, à 37°C est effectuée pour établir le caryotype constitutionnel du patient et confirmer le caractère acquis des remaniements observés.

c. Tissus lymphoïdes:

Le fragment de biopsie est mis dans une boîte de pétri dans un milieu de culture T199. Ce fragment est dissocié au scalpel, on prélève la suspension cellulaire obtenue à la pipette pasteur. Une partie de la suspension cellulaire obtenue après dilacération n'est pas mise en culture mais traitée pour examen immédiat. L'autre partie est mise en culture (mêmes conditions que la mise en culture Lymphocytaire). Avec ou sans PHA, à raison de 10 cellules/ml.

Après 24 ou 48 heures de culture, procéder aux préparations chromosomiques.

d- Tumeurs solides:

Deux exemples de cultures de tumeurs solides sont décrits: Tumeurs du sein et du côlon. Il faut prendre soin d'éliminer les parties nécrotiques de la tumeur durant l'étape de dissociation mécanique.

La biopsie peut être traitée par action enzymatique (collagénase 0,8% à 37°C) avant l'étape de dissociation mécanique. Le temps de dissociation enzymatique dépend du type tumoral (2 à 3h pour les tumeurs épithéliales, plus de 16h pour les sarcomes).

Les cultures sont de courte durée favorisant la pousse des cellules tumorales ou détriment des cellules normales qui ont tendance à se développer dans les cultures à plus long terme (fibroblastes du stroma). Les prélèvements de tumeurs coliques sont non stériles, favorisant le développement d'infections dans la culture. La Thymidine a le double avantage de synchroniser les cellules tumorales et de bloquer la division des germes et bactéries présentes dans le prélèvement.

e- Cellules germinales:

Parmi les cellules méiotiques, les spermatocytes sont plus faciles à examiner que les oocytes. La culture des cellules germinales mâles a été décrite par Dutrillaux en 1971.

On commence par dilacérer les tubes séminifères, par la suite on transfère la suspension cellulaire obtenue dans, un ou deux tubes à méplat contenant du milieu, en fonction de la taille du culot obtenu. On répète l'opération jusqu'à ce que le liquide reste opalescent après dilacération. On incube pendant 48 h dans une étuve sèche à 36°C (peut être prolongée durant 96 h). La culture se fait dans un milieu de type [Eagle (IX)] modifié contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Et par la suite, on procède ensuite aux préparations chromosomiques.

V.2. Réalisation des préparations chromosomiques

V-2-1- Synchronisation des cultures cellulaires:

Elle n'est que parfois réalisée, son intérêt est d'obtenir un indice mitotique plus élevé par lame, et de provoquer un allongement des chromosomes. Elle est obtenue par des agents chimiques ou physiques.

a. Les agents chimiques:

- La Thymidine en excès: elle bloque le cycle cellulaire en milieu de phase S, par inhibition de la synthèse de 2 déoxy-cytidine .
- La bromodéoxy-uridine (BrdU) : elle bloque le cycle cellulaire en milieu de la phase S.
- La fluodeoxyuridine (FudUr): elle bloque la voie de synthèse de novo des pyrimidines. L'adjonction de la Thymidine ou de BrdU lève le blocage.
- Le méthotrexate: il induit un blocage en milieu de phase S, il est introduit dans le milieu de culture 24 heures avant la levée de celle-ci.

b- Les agents physiques:

C'est par exemple le cas du froid à 4°C pendant 8 heures (rarement utilisé).

V-2-2-les préparations chromosomiques:

a. Les chromosomes prométaphasiques et métaphasiques:

a.1 blocage des cultures en mitose:

Les propriétés antimitotiques de la colchicine sont utilisées pour bloquer le cycle cellulaire en mitose et ainsi accumuler les cellules, en métaphase. Chaque molécule de colchicine (alcaloïde extrait du colchique) se lie étroitement à une molécule de tubuline et empêche sa polymérisation. Cette association provoque la disparition du fuseau mitotique et empêche tout mouvement des chromosomes en quelques minutes.

a-2- Traitement hypotonique:

Une différence de pression osmotique entre le milieu extérieur, hypotonique, et le milieu intracellulaire provoque le gonflement des cellules.

Les traitements hypotoniques les plus utilisés sont:

- Solution de plasma humain dilué au 1/6',
- solution de chlorure de potassium (KCl) 0.00 75 TM.
- solution de citrate tri sodique 1 % (0.56%).

Les traitements hypotoniques par une solution de KCl sont utilisés pour obtenir des marquages.

Cependant, les chromosomes sont en général plus condensés qu'après un traitement ou plasma dilué.

Le traitement hypotonique par une dilution de citrate trisodique est utilisé pour les cellules amniotiques, les villosités chorales, les tissus lymphoïdes, les polypes, certaines tumeurs solides et parfois les cellules germinales.

a.3 fixation:

La fixation a pour but d'assurer une immobilisation des constituants cellulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant. Elle doit être adaptée, d'une part, à la préservation des constituants chimiques (ADN) et de la structure nucléaire ou chromosomique et, d'autre part, à la technique effectuée ultérieurement sur la préparation.

Les fixateurs adaptés à la FISH les plus utilisés sont le fixateur de carnoy I (mélange d'éthanol: 3 et d'acide acétique: 1,3/1), de carnoy II (mélange d'éthanol: 6, de chloroforme: 3 et d'acide acétique: 1,6/3/1) et le mélange de méthanol et d'acide acétique.

a-4- Etalement:

La préparation de lames est une des étapes les plus importantes pour obtenir des étalements chromosomiques de qualité:

- la propreté de la lame.
- la densité de la suspension cellulaire.

b- fibres d'ADN nu:

Le principe consiste à éliminer toutes les protéines nucléaires en évitant de casser les molécules d'ADN puis d'étirer les fibres d'ADN nu sur des lames en verre, traitées au préalable pour favoriser l'adhésion des molécules.

Les techniques de FISH classique peuvent être effectuées en utilisant des plasmides ou des cosmides sur ces fibres d'ADN nu. Ces techniques utilisent soit de l'ADN humain total, soit des YAC comme cible, l'étirement d'ADN total de levure ou de YAC isolés peut permettre d'ordonner des sous-clones de YAC

VI. OBSERVATION DES HYBRIDES :

VI.1. Matériaux d'observations

VI-1-1- le microscope à lumière transmise:

Il est destiné à l'observation des préparations de l'hybridation in situ non radioactive, après détection colorimétrique.

VI-1-2- le microscope à épifluorescence :

Il est destiné à l'observation des préparations de l'hybridation in situ en fluorescence.

Son utilisation repose sur le principe suivant: le fluorochrome absorbe une énergie photonique transmise par une source lumineuse, il devient alors instable et libère une grande partie de son énergie sous forme de lumière, pour retrouver son état de stabilité. C'est cette lumière fluorescente qui produit l'image observée.

Deux types de sources lumineuses sont disponibles: une lampe de mercure ou de xénon à haute pression.

La lumière de la source passe au travers d'un filtre d'excitation, sélectionnant la longueur d'onde d'excitation, en fonction du fluorochrome utilisé, la fluorescence résultante, émise par le fluorochrome, traverse un miroir dichroïque, puis un filtre d'arrêt ne laissant passer que les longueurs d'onde proches de celles d'émission.

Pour la plupart des observations, une combinaison de trois filtres suffit, ils permettent de sélectionner les couleurs: rouge, bleu et vert, adaptées aux fluorochromes employés et au contre colorant.

Il est actuellement recommandé par la plupart des auteurs, de disposer de filtres, à doubles ou triples bandes passantes, permettent donc d'observer simultanément deux ou trois couleurs. En effet, selon certains auteurs le changement de filtre au cours de l'observation, occasionne une altération de la fluorescence observée. Par contre, ce type de filtre est moins adapté à 10 détections d'un petit signal, puisqu'il diminue l'intensité de la fluorescence du fluorochrome.

L'image obtenue est ensuite, soit photographiée, soit numérisée et stockée dans un ordinateur relié au microscope par l'intermédiaire d'une caméra à image digitale.

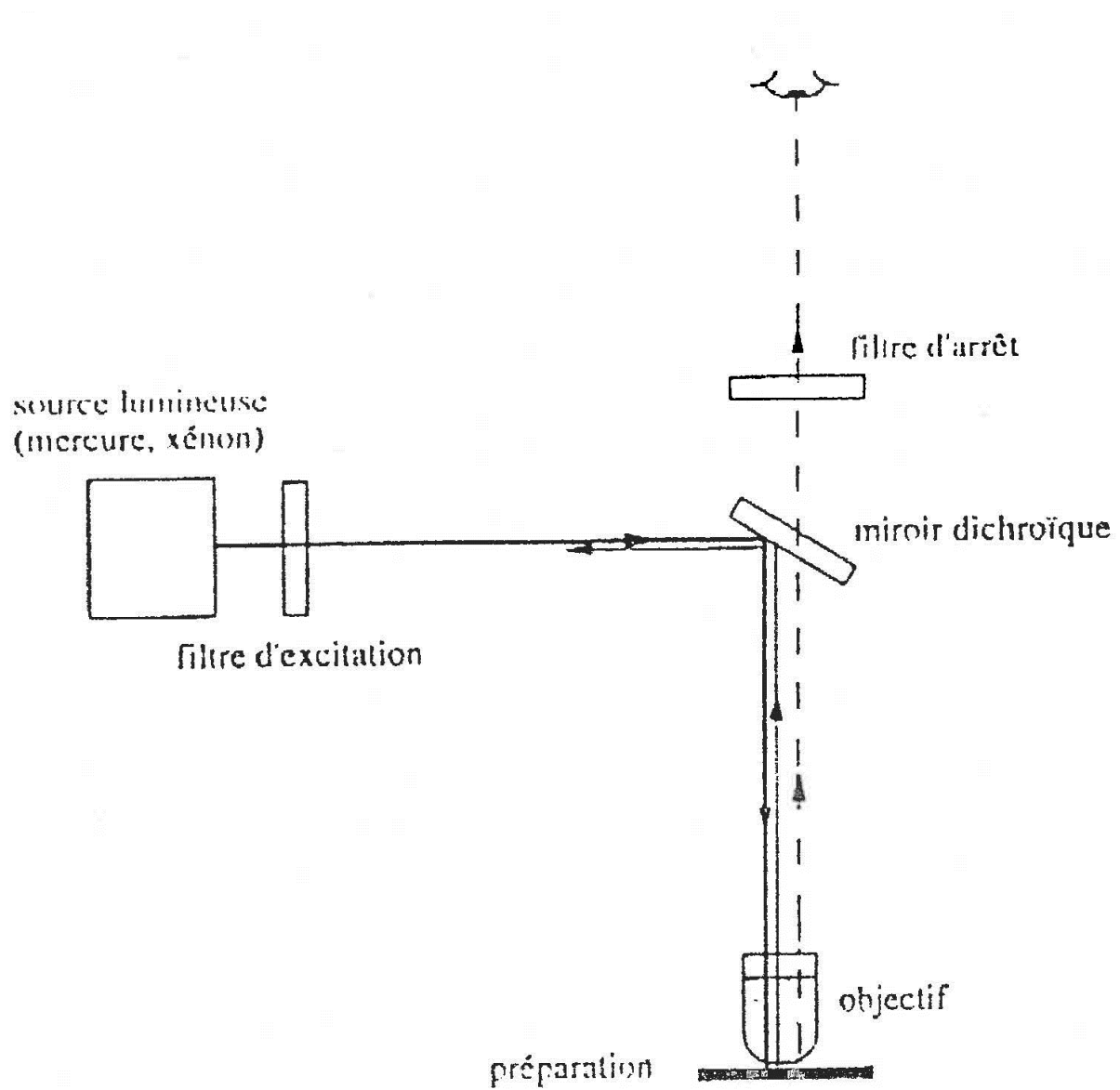


Figure 15 : Principe de la microscopie à fluorescence[52]

VI-1-3- Le microscope confocal à balayage laser:

Son utilisation repose sur le principe suivant: les rayons incidents, émis par la source lumineuse, sont réfléchis par un miroir dichroïque vers une lentille, seuls les rayons ayant illuminé le plan avec netteté, sont captés par le détecteur. Ainsi, tous les signaux localisés en dehors du point de focalisation, et qui seraient flous sont éliminés grâce à un diaphragme équipant le détecteur.

Un système de balayage, étudie la préparation plan par plan et, permet une acquisition de l'image point par point. Les images obtenues, sont traitées numériquement par un ordinateur relié au microscope.

Ce type de microscope présente un double avantage:

- la résolution et la précision des images sont améliorées d'une part,
- d'autre part, il fournit des coupes optiques parfaitement alignées, ce qui permet la reconstruction d'images tridimensionnelles des préparations observées.

VI-2-Détection des sondes :

Deux modes de détection sont distingués:

VI-2-1- Détection colorimétrique :

Il s'agit d'une réaction enzymatique, dont les substrats employés forment un précipité coloré, insoluble dans l'eau à l'endroit de la réaction.

Les deux enzymes couramment utilisés sont, la peroxydase de Raifort et la phosphatase alcaline, lesquels sont couplés à un anticorps.

VI-2-2- Détection fluorescente:

La sonde est liée à des fluorochromes, lesquels émettent de la lumière, lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse de longueur d'onde appropriée. La couleur de la fluorescence est donnée par la longueur d'onde d'émission, qui est supérieure à la longueur d'onde d'excitation.

L'utilisation de ces fluorochromes, nécessite la prise importante de précautions, du fait d'un taux important de photodécomposition, ils doivent être manipulés dans l'obscurité, et parfois, l'addition d'un agent chimique antioxydant est nécessaire afin de réduire le taux de photodécomposition.

Différents fluorochromes sont disponibles, leur longueur d'onde d'émission doit être différente de celle du fluorochrome utilisé pour la coloration des chromosomes;

➤ *La fluorescéine:*

Elle est peu photostable, et sensible aux variations de pH. Sa longueur d'onde d'excitation est située entre 490 et 500 nm, ce qui correspond au spectre de couleur bleue. Elle émet dans le vert-jaune. La plus utilisée est le FITC.

➤ *Les dérivés de la rhodamine:*

Ils sont plus photostables et insensibles aux variations de pH. Ils sont excités par une lumière de couleur vert-jaune, (entre 545 et 595 nm). Ils émettent une fluorescence rouge, les plus employés sont, la Rhodamine et le Texas red.

➤ ***Famille des cyanines :***

Ils sont plus photostables que les précédents, il en existe deux types: la Cyanine 3, émettant dans le rouge orangé, et la Cyanine 5, émettant dans le rouge sombre.

➤ ***Les dérivés de la coumarines:***

Ils sont excités par les rayonnements UV et, émettent une fluorescence bleue. Le plus utilisé est l'AMCA (7- amino 4- méthyl coumarine 3- acétique).

VI. 3 La détection

VI-3-1- La détection immédiate:

L'observation se fait dès la fin des étapes d'hybridation et de lavages. La sonde est directement fluorescente, et donne très peu de bruit de fond, ce qui permet une détection plus aisée des hybrides fluorescents. L'efficacité de la fluorescence est meilleure, lorsque la séquence d'ADN cible est de grande taille, c'est à dire pour les sondes de peinture chromosomique et les sondes alpha satellites.

L'utilisation de la Rhodamine est préférable à l'emploi de la fluorescéine ou de la camarine, pour une détection immédiate des séquences hautement répétées.

VI-3-2- Détection après amplification du signal:

a. L'immunodétection :

La détection se fait après l'amplification du signal d'hybridation. Il s'agit de la reconnaissance par un anticorps, d'un déterminant antigénique, qui peut être, la biotine, l'avidine, la digoxigénine, ou un fluorochrome.

L'anticorps est une IgG, ou un fragment d'IgG, se fixant par son fragment Fab à son déterminant antigénique. Cet anticorps, appelé anticorps primaire, est lui-même antigénique, ce qui permet la fixation d'un anticorps secondaire, anti espèce. Selon leur mode de fabrication, ces anticorps sont polyclonaux ou monoclonaux.

L'immunodétection peut être directe ou indirecte:

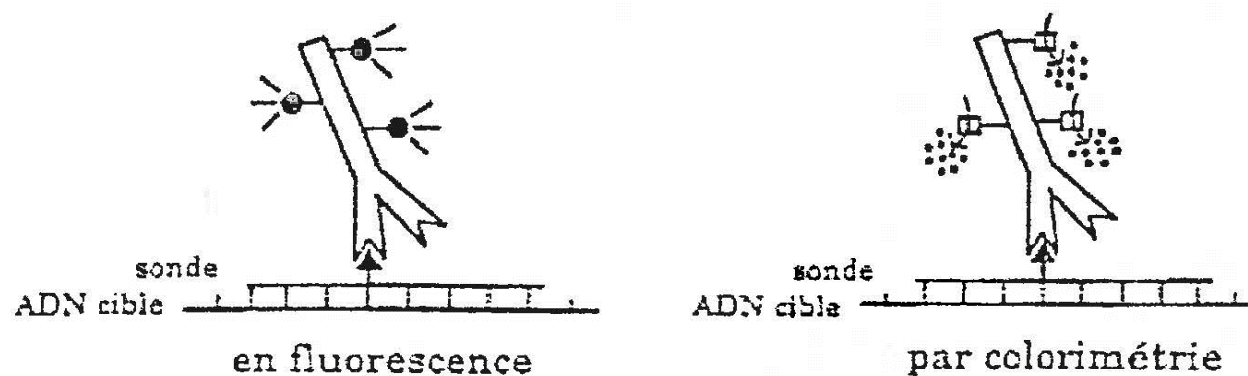
- **Directe:** l'anticorps reconnaissant la sonde hybridée, est couplé à un fluorochrome ou à une enzyme.
- **Indirecte:** plusieurs anticorps sont utilisés, l'anticorps primaire reconnaît la sonde, tandis que l'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome ou à une enzyme.

L'amplification présente des limites, d'une part, elle ne doit être appliquée, que lorsqu'elle est nécessaire, et uniquement si le bruit de fond est peu important. En effet, elle augmente, non seulement l'intensité du signal observé, mais aussi, l'intensité du bruit de fond fluorescent de la préparation. D'autre part, l'amplification est surtout réservée à la détection de sondes de séquence unique.

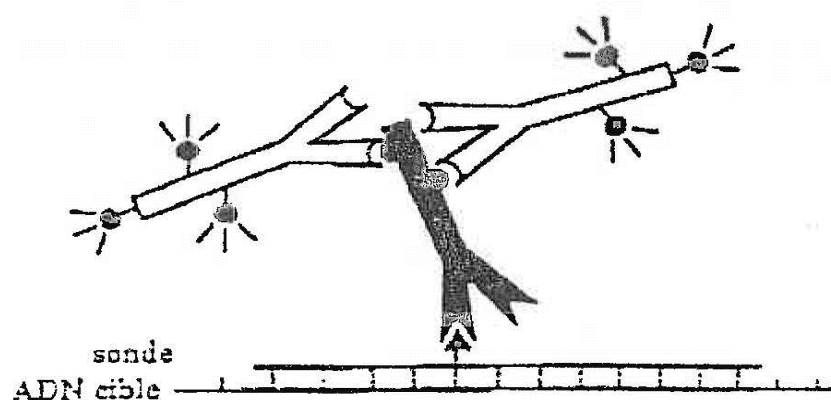
L'immunodétection a permis le développement de la détection multicolore, dont le principe est d'utiliser des sondes marquées, chacune par une proportion de nucléotides modifiés qui lui est propre. Il est recommandé de marquer la plus petite sonde à la biotine associée à la fluorescéine. Les autres sondes, seront marquées à la digoxigénine ou bien simultanément à la digoxigénine et à la biotine, ou bien, elles seront directement fluorescentes.

Tous les fluorochromes cités précédemment peuvent être employés, à l'exception de la cyanine 5 qui donne peu de contraste.

Si « n » représente le nombre de fluorochromes que l'on peut utiliser, le nombre de couleurs différentes que l'on peut obtenir est « $2^n - 1$ ». La couleur caractéristique de chaque sonde est calculée sur logiciel, par analyse d'images.



l'immunodétection directe



l'immunodétection indirecte

Figure 16 : immunodétection directe et indirecte.[51]

b. Utilisation du système avidine biotine : (figure 17)

L'avidine et la streptavidine sont des protéines se liant à la biotine. Elles possèdent chacune quatre sites de liaison avec la biotine.

L'avidine est une glycoprotéine de 68 Kda, présente dans le blanc d'œuf et ayant une très grande affinité pour la biotine. Elle se lie également aux biomolécules chargées négativement comme les acides nucléiques. L'affinité de l'avidine pour la biotine est cependant bien supérieure à celle des anticorps anti-biotine.

La streptavidine, protéine de 60 Kda sécrétée par *Streptomyces avidine*, a une affinité pour la biotine inférieure à celle de l'avidine mais une plus grande spécificité pour la détection des sondes biotinylées.

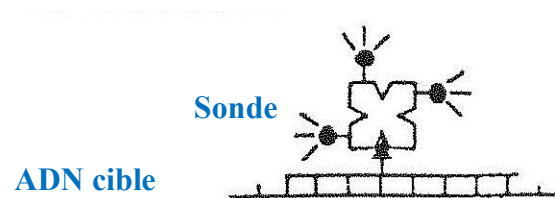
➤ Détection directe:

L'avidine ou la streptavidine sont couplées à un détecteur (fluorochrome ou enzyme). Cette méthode est utilisée pour détecter des sondes biotinyle chromosome spécifique ou des sondes reconnaissant le motif d'une séquence répétée.

➤ Détection indirecte:

Une amplification du signal est souvent nécessaire pour l'observation des sondes biotinylées hybridées à des séquences génomiques uniques.

1. Détection directe d'une sonde biotinylée (en fluorescence)



2. Détection indirecte d'une sonde biotinylée (en fluorescence)

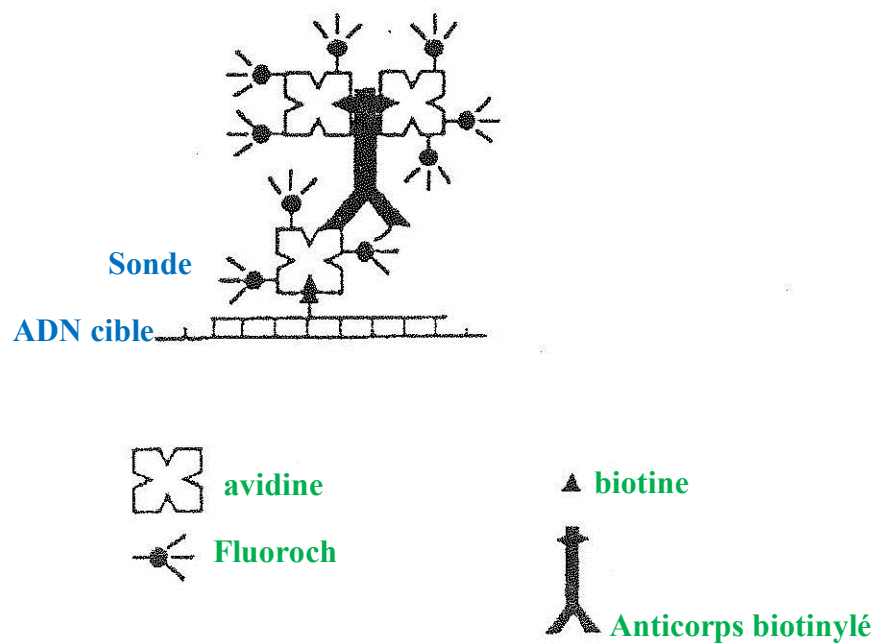


Figure 17 : Détection par le système avidine. [51]

VI.4 La coloration des chromosomes et leur marquage :

VI.4.1. La coloration :

La coloration des chromosomes est effectuée après la détection de la sonde. Cette étape est rapide et à lieu dans l'obscurité.

Divers colorants sont disponibles.

a- Les colorants non fluorescents:

Ils sont employés lors d'une révélation par colorimétrie; ce sont essentiellement le Giemsa et l'hématoxyline de Meyer.

b. Les colorants fluorescents:

Ce sont des agents s'intercalant dans l'ADN double brin. Il s'agit de :

- *L'iodure de propidium*

Il donne une couleur orangée, après excitation aux environs de 520 nm, il ne se lie pas spécifiquement avec certaines séquences d'ADN.

- *Le DAPI (4'-6' diamino 2 phénylindole) antifade* :

Lorsqu'il est excité aux alentours de 350 nm, il produit une couleur bleue. Il possède une forte affinité pour les régions riches en adénine et en thymine, ce qui permet d'obtenir une ébauche de marquage en bandes G et C, de même les constriction secondaires des chromosomes 1,9, 16 et Y, apparaissent très brillantes.

. D'autre fluorochromes sont moins couramment employés :.

Le Hoechst 33258 qui donne une fluorescence bleue, et la moutarde de quinacrine qui fournit une fluorescence verte.

VI-4-2- Le marquage:

Le faible marquage obtenu avec les colorants fluorescents précédemment cités, peut être amélioré. Cela permet, une meilleure identification des chromosomes, et par conséquent, une meilleure localisation du signal d'hybridation.

a- Détection calorimétrique:

Le marquage des chromosomes, est observé, soit en même temps que le signal d'hybridation, soit avant.

Selon LICHTER et CREMER ces deux méthodes apportent les mêmes résultats Si la première technique apporte un gain de temps, la seconde présente l'avantage, d'obtenir un marquage de meilleure qualité. En effet, ce dernier, n'est pas altéré par l'étape de dénaturation des chromosomes.

b- Détection fluorescente :

Le signal d'hybridation et le marquage des chromosomes, sont simultanément observés. Plusieurs méthodes sont employées:

- Lors de l'étape de culture cellulaire, on ajoute du BrdU, en début ou en fin de phase S, selon que l'on veut obtenir un marquage en bandes G ou en bandes R.

- le marquage sera révélé soit, par une coloration directe des chromosomes avec un colorant fluorescent, soit par des anticorps anti BrdU, couplés directement à un fluorochrome, ou bien à un second anticorps, lui-même couplé à un fluorochrome.
- l'amplification du marquage sera, dans ce cas, possible par immunodétection indirecte. Cette technique étant relativement lourde, nous n'y avons pas recours au laboratoire.
- Une autre méthode, décrite par SCHWEIZER et al en 1981, consiste en l'utilisation de couples colorants fluorescents, et contre colorants se liant spécifiquement aux bases AT ou CG. Par exemple, TUCKER et al en 1988, ont mis au point le couple DAPI/actinomycine D, se liant tous les deux aux bases A et T. Ainsi, l'actinomycine D, renforce le faible marquage en bande G obtenu par le DAPI.

VII. L'HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE ET NOMENCLATURE INTERNATIONALE :

Du fait que la FISH, a des apports importants dans divers domaines de la génétique médicale, et du fait qu'elle devenue de la pratique courante, une nomenclature internationale est a été adoptée au cours du congrès de cytogénétique internationale aux Etat Unis d'Amérique, en 1994 (An International system for Human cytogenetic Nomenclature, Recommendations of the International Stading Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Tennessee, USA, 1994)

Le but des ces recommandations internationales est de standardiser la nomenclature de toutes les anomalies cytogénétiques observées au cours de la technique de FISH sur différentes préparations.

Quelques exemples de nomenclature:

46,XX,del(15) (q11q13).ish del(15) (q11.2q11.2) (SNRPN-,D15S10-)

Cette nomenclature signifie: Détection par FISH sur la région 15q11-q13, d'une délétion de deux régions responsable du syndrome de Prader-Willi/Angelman

Le locus responsable du syndrome de Prader-Willi correspondant est le SNRPN

Le locus responsable du syndrome d'Angelman correspondant est le D15S10.

rev ish XX

Signifie qu'il y a présence de copies du chromosome X sur métaphase, mais ceci n'élimine pas un réarrangement intra chromosomique.

VIII. APPLICATIONS DE L'HYBRIDATION IN SITU :

VIII.1. Apport de la FISH en diagnostic anténatal:

L'hybridation in situ fluorescente est actuellement de pratique courante sur cellules amniotiques non cultivées. En effet, les techniques classiques de culture de cellules amniotiques permettent d'obtenir un caryotype fœtal entre 1 et 3 semaines selon les laboratoires. Depuis quelques années la FISH a permis un diagnostic rapide des principales anomalies chromosomiques, ainsi que la détection des remaniements chromosomiques de petite taille, des syndromes microdélétionnels, et de la détermination du sexe .

a. Sondes utilisées en anténatale:

L'hybridation in situ, comme cela a été décrit, est basée sur la propriété de l'ADN de s'hybrider et se déshybrider à une température donnée. Cette technique est possible sur chromosomes en métaphase mais également en interphase.

Divers types de sondes sont utilisables sur des noyaux en interphase et sont caractérisés par leur taille et par les séquences particulières qu'elles reconnaissent. Ces sondes sont marquées avec les fluorochromes et observées au microscope à fluorescence.

Les sondes commercialisées concernent:

- la peinture chromosomique ou «chromosome painting ».
- Des sondes centromériques spécifiques de chaque chromosome.

- les sondes télomériques.
- Des sondes spécifiques du génome, qui correspondent principalement à des syndromes microdélétionnels, permettant le diagnostic des syndromes de Prader-Willi, de Wolff Hirschhorn, syndrome de Di-George et autres .
- On peut également construire ses propres sondes, en utilisant des vecteurs qui sont par ordre de taille croissante des plasmides, des cosmides et des YACs. Ces vecteurs permettent de cloner un fragment plus ou moins important d'ADN génomique humain .

Actuellement, un prélèvement de cellules fœtales par amniocentèse, ponction de sang fœtal ou même biopsie de trophoblastes peut être traité directement par la FISH, et une autre fraction est gardée pour culture cellulaire. Cette analyse ne nécessite qu'un échantillon de 2 à 5 ml de liquide amniotique et le résultat peut être rendu en 24 heures.

b- Recherche d'aneuploïdies par hybridation in situ fluorescente sur cellule non cultivées:

Les sondes utilisées de routine pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y représentant 70% des anomalies chromosomique en cytogénétique humaine. D'autres chromosomes peuvent être étudiés de façon limitée.

La fiabilité de la FISH en interphase est de l'ordre de 99,9%, sachant que la FISH ne permet pas d'éliminer complètement toute anomalie chromosomique comme le fait le caryotype fœtal standard, tel que des anomalies de structure, équilibrées ou non.

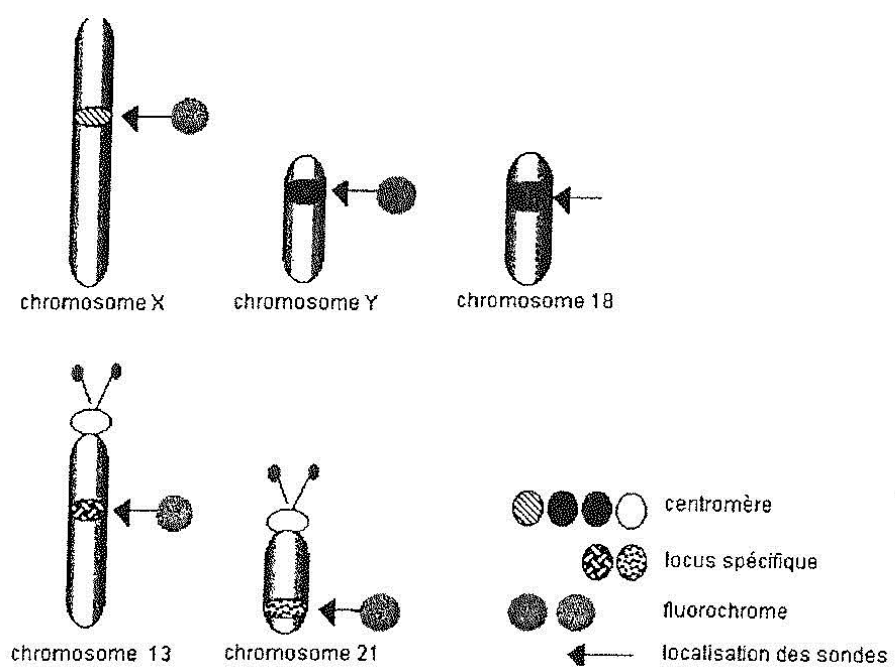


Figure 18 : Le diagnostic anténatal par FISH : Localisation des sondes. [53]

c· Recherche microdélétionnelle :

Parmi les syndromes microdélétionnels recherchés en anténatal, la microdélétion 4p à l'origine du syndrome de Woll-Hirshhorn, et de la microdélétion 22q11 qui s'associe au syndrome de Di-George et au syndrome vélocardiofacial regroupés sous l'acronyme CATCH 22 (anomalie cardiaque, dysmorphie labiale, hypoplasie thymique, fente labiale, hypocalcémie) sont les plus étudiés.

L'indication de la recherche de ces micro délétions doit être orientée en fonction de la clinique, des antécédents familiaux, des signes échographiques ou tout élément orientant vers un syndrome microdélétionnel .

d· détermination du sexe du fœtus :

Il existe environ 200 maladies liées au sexe de l'enfant en particulier les maladies récessives liées au chromosome X. L'hémophilie, la dystrophie musculaire de Duchenne et le syndrome de Lesch-Nyhan sont des exemples de ces maladies.

VIII .2. Apport de l'hybridation in situ en diagnostic préimplantatoire :

Le diagnostic préimplantatoire se présente comme une alternative au diagnostic anténatal, il associe la fécondation in vitro (FIV) aux techniques de biologie moléculaire permettant une analyse génétique sur cellule unique.

La première FIV (Fécondation in vitro) date de 1978, et est de pratique courante depuis le milieu des années 80. Les techniques de biologie moléculaire sont encore plus récentes. La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) date de 1987, la FISH du début des années 90.

La biopsie du blastomère au stade 6-10 cellules au 3eme jour post-insémination, selon Handyside et al, est utilisée par tous les centres de DPI. L'embryon est maintenu par une pipette à bord large, sur laquelle on exerce une légère pression négative. Un trou est pratiqué dans la zone pellucide qui entoure et maintient les cellules ensemble, soit en injectant un jet d'acide tyrode grâce à une pipette très fine ou, technique plus récente, à l'aide d'un laser. Une ou deux cellules sont ensuite prélevées par aspiration dans une micro pipette au diamètre légèrement inférieur à celui des blastomères. Techniquement, il s'agit de micromanipulations assimilables à l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Il est primordial de n'abîmer ni l'embryon, ni la cellule prélevée. Il a été démontré que le prélèvement d'une cellule au stade 4 cellules ou de 2 au stade 8 cellules ne compromet pas le développement ultérieur de l'embryon.

La place de la FISH en diagnostic préimplantatoire :

❖ Déterminer le sexe des embryons:

Alternative à la PCR pour déterminer le sexe des embryons, la FISH est plus fiable que la PCR car moins sensible aux contaminations. Un tel diagnostic est proposé pour les pathologies récessives liées au chromosome X (200 pathologies environ). L'inconvénient de cette technique est la non réimplantation de 50% d'embryons masculins sains.

❖ Recherche de translocations chromosomiques.

❖ Recherche d'aneuploïdies :

La recherche d'aneuploïdies est Interdites en France, proposées dans un nombre limité de centres d'AMP (Etats-Unis, Espagne, Italie) aux femmes incluses dans un protocole de FIV, présentant un risque élevé d'avoir des embryons avec des anomalies de nombre de chromosomes.

VIII.3. Apport de la FISH en diagnostic préconceptionnel :

Le terme de diagnostic préconceptionnel (DPC) désigne l'analyse génétique du premier et/ou du deuxième globule polaire (GP-I ou GP-II) de l'ovocyte.

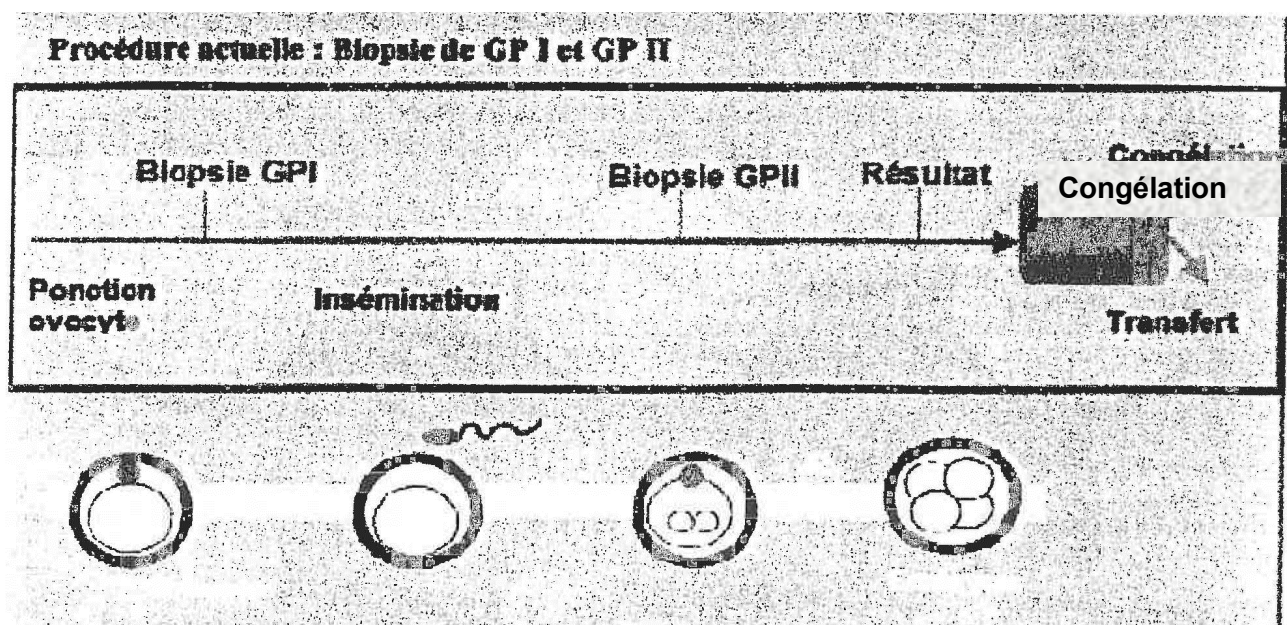


Figure 19 : Stratégie de détection des aneuploïdies à partir du globule polaire.[54]

Les indications de la FISH en préconceptionnel sont représentées par:

- Le diagnostic de sexe dans le cas des maladies liées au chromosome sexuel.
- Détection des aneuploïdies à partir du globule polaire, des chromosomes 13, 18, 21, X et Y. En effet l'analyse du seul GP-I en vue de détecter les aneuploïdies ovocytaires pourrait être appelée à se développer dans le cadre d'un DPC ou sens strict du terme, c'est-à-dire pratiqué avant la fécondation. Ces anomalies qui surviennent généralement suite à une mal ségrégation des chromosomes lors de la première division méiotique maternelle constituent, en effet une cause importante d'échec de reproduction. l'âge maternel avancé constituant le principal facteur de risque, leur détection devrait permettre d'augmenter significativement le taux de succès des tentatives de fécondation in vitro (FIV) réalisées chez les femmes de plus de 35ans,

Au total, le diagnostic préconceptionnel ne peut pas constituer une alternative satisfaisante au diagnostic préimplantatoire. Son indication est d'écarter de l'insémination les ovocytes aneuploïdes dont la fécondation aurait conduit à l'obtention et ou transfert éventuel d'embryons non évolutifs.

VIII.4. Contribution de la FISH dans la compréhension de la pathologie de la reproduction:

Dans l'espèce humaine, les aberrations chromosomiques représentent la cause la plus importante de perte fœtale. Elles sont responsables de la moitié des avortements spontanés survenus au-delà de la huitième semaine de grossesse. En effet 5% des (mort-nés) ont un caryotype anormal et 0.5% des nouveau-nés sont porteurs d'aberrations chromosomiques.

L'application de la FISH aux embryons bloqués, aux spermatozoïdes, ovocytes, zygotes bloqués, permet de mieux comprendre la place des anomalies chromosomiques en pathologie de la reproduction.

Conformément aux données de la littérature, le pourcentage de spermatozoïdes anormaux se situe aux environs de 13%, les chromosomes 1,9, 21, X et Y sont fréquemment atteints.

D'autres études ont montré que les aberrations chromosomiques de l'ovocyte varient de 20% à 59% avec une dominance significative de l'hypoploïdie.

L'hybridation in situ a révélé 30.8% de mixoploïdie (mosaïcisme / polyploïdie) dans la morula et 29.3% dans le blastocyte humain. Cette mixoploïdie apparaît de manière précoce lors du développement préimplantatoire de l'embryon en parallèle de l'aneuploïdie.

Méthodes non invasives du diagnostic anténatal :

Le diagnostic de certitude des aberrations chromosomiques et le diagnostic anténatal en général, nécessitent de travailler le plus souvent sur des cellules fœtales nucléées actuellement obtenues par des techniques invasives (choriocentèse, amniocentèse, cordocentèse). Toutes ces techniques comportent un risque fœtal (avortement, mort in utero, anomalie réductionnelle des membres, accouchement prématuré, réactivation de l'anticorps par hémorragie fœto-maternelle en cas d'allo-immunisation ...) mais aussi maternel (infections).

Des cellules fœtales passent dans le sang maternel. L'isolement de ces cellules pourrait permettre d'accéder à un diagnostic non invasif. La mise au point d'une telle technique de diagnostic représente donc un enjeu considérable. Différents types de cellules sont retrouvés dans le sang maternel, essentiellement des cellules trophoblastiques, des leucocytes et des érythroblastes. Leur nombre très faible (1 cellule fœtale pour 10^6 à 10^8 cellules maternelles) implique que des techniques d'analyse adaptées soient utilisées, les méthodes habituelles étant en défaut. Ces techniques sont le plus souvent précédées par un enrichissement du prélèvement maternel en cellules fœtales, principalement par des méthodes de tri cellulaire. De nombreuses équipes travaillent sur le sujet. Les résultats sont prometteurs mais ces techniques sont encore loin d'être utilisables en routine.

VIII.5. Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes

La majorité des anomalies chromosomiques de structure impliquées dans la pathogénèse des leucémies et des lymphomes sont clonales, récurrentes, non aléatoires et souvent spécifiques d'un type d'hémopathies malignes.

Il s'agit souvent de translocations équilibrées qui entraînent une recombinaison de deux gènes au point de cassure. Il y a donc formation d'un « gène de fusion » codant une protéine chimérique à l'origine de la prolifération maligne.

Le diagnostic par FISH de ces remaniements géniques est réalisé par l'utilisation de sondes spécifiques du locus ou des gènes impliqués.

C'est par exemple le cas des remaniements du gène BCR-ABL gène de fusion facilement diagnostiqué par l'utilisation de sondes spécifiques des chromosomes 9 et 22 dont la translocation t (9;22) en est à l'origine. Et dont la détection permet le diagnostic et le suivi dans la leucémie myéloïde chronique.



Conclusion

La naissance d'un enfant trisomique 21 implique la naissance d'une personne qui sera confrontée à des complications affectant divers systèmes de son organisme.

La prise en charge et le suivi de ces individus se révèle une tâche difficile mais une collaboration étroite entre parents et médecins devrait permettre d'éviter les accidents et complications que peuvent encourir ces enfants. Par ailleurs l'instauration d'un programme éducatif précoce est nécessaire afin de permettre une meilleure intégration sociale.

Le dépistage par les techniques de cytogénétique moléculaire notamment l'hybridation in situ fluorescente représente un outil efficace pour diminuer l'incidence de cette pathologie, Cet examen devrait être préconisé dès l'âge de 38 ans.



Résumé

Titre : Trisomie 21 : Revue de littérature et apport de l'hybridation in situ fluorescente.

Auteur : ASSIAD Asma

Mots clés : Trisomie 21 ; Diagnostic post natal ; Diagnostic prénatal ; L'hybridation in situ fluorescente.

La trisomie 21 est l'aberration chromosomique la plus fréquente chez l'enfant.

L'âge maternel est le principal facteur de risque.

Le diagnostic post natal repose sur les différents aspects cliniques : phénotype, malformations et retard mental, ainsi que sur les aspects biologiques et données de la cytogénétique.

Le diagnostic prénatal est indiqué devant des signes d'appel échographiques fœtaux, un dépistage sérique anormal chez la mère, des anomalies chromosomiques lors d'une grossesse antérieure, devant une translocation équilibrée impliquant le chromosome 21 chez un des parents, ou lorsque l'âge maternel dépasse les 38 ans.

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH), qui est une technique de cytogénétique moléculaire, a l'avantage de détecter rapidement cette aneuploïdie par des sondes chromosomiques spécifiques, sur des cellules non cultivées, en moins de 48h et sur une faible quantité de liquide amniotique.

Abstract

Title : trisomy 21 : Literature review and contribution of the in situ fluorescent hybridization.

Author : ASSIAD Asma

Key words : Trisomy 21 ; Postnatal diagnosis ; Prenatal diagnosis ; In situ fluorescent hybridization.

Trisomy 21 is the most frequent chromosomal aberration of children.

Maternal age is the main risk factor.

Postnatal diagnosis is based on the different clinical aspects: phenotype, malformations and mental retardation, on the biological aspects and data of cytogenetic.

Prenatal diagnosis Is indicated In front of fetal echographic signs , Abnormal serum screening in the mother , Chromosomal abnormalities in a previous pregnancy, in front of
A balanced translocation involving chromosome 21 in one of the parents, Or when the maternal age exceeds 38 years.

In situ fluorescence hybridization (FISH), which is a molecular cytogenetic technique, Has the advantage of rapidly detecting this aneuploidy By specific chromosomal probes, On uncultured cells, In less than 48 hours , And a small amount of amniotic fluid.

ملخص

العنوان: التثلث الصبغي :مراجعة الأدبيات، استيعاب التهجين في الموضع المتألق .

من طرف :أسماء أصياد

الكلمات الأساسية: التثلث الصبغي 21، التشخيص بعد الولادة، الفحص ما قبل الولادة ، التهجين في الموضع المتألق.

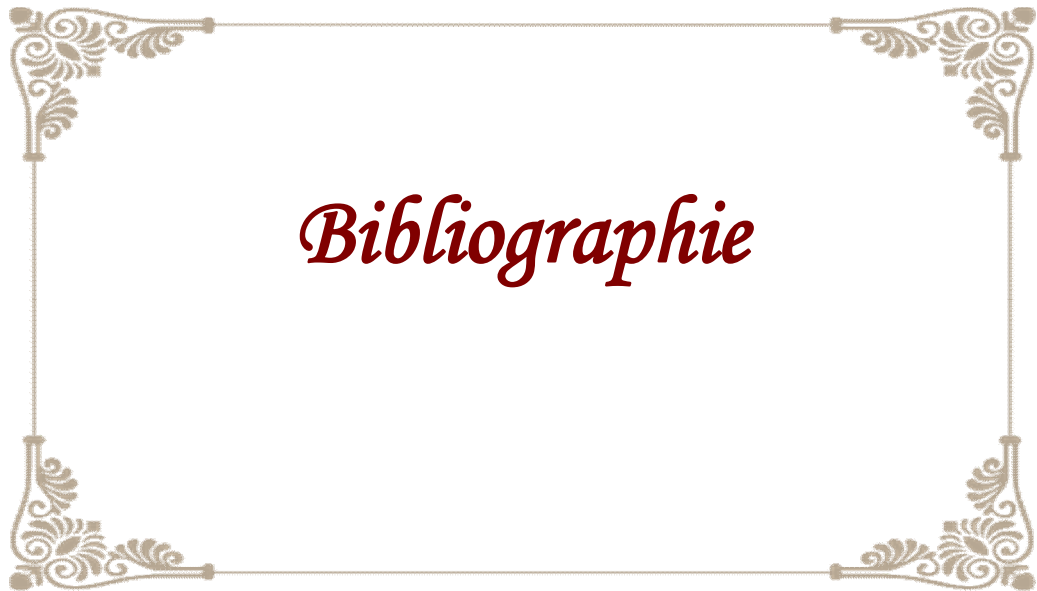
التثلث الصبغي 21 يشكل العيب الصبغي الأكثر توارثا لدى الطفل.

السن المتقدم للأم يعتبر حافزا كبيرا للتثلث الصبغي 21.

التشخيص بعد الولادة يعتمد على مختلف المظاهر السريرية ، الطبع الوراثي ، التشوهات العضوية والتخلف العقلي وكذا على مختلف المظاهر البيولوجية ومعطيات الوراثة الخلوية.

الفحص ما قبل الولادة يشار أمام إشارات النداء الموجات فوق الصوتية للجنين ، فحص مصل الدم غير طبيعي عند الأم ، شذوذ الكروموسومات في الحمل السابق ، أمام إزفاء متوازن الذي ينطوي على كروموسوم 21 عند أحد الوالدين ، أو عندما يتجاوز عمر الأم 38 عاما.

التهجين في الموضع المتألق الذي هو تقنية علم الوراثة الخلوية الجزيئية، لديه ميزة الكشف المبكر لعدم توازن الصبغيات، بواسطة تحقيقات الكروموسومات الخاصة على خلايا غير مزروعة في أقل من 48 ساعة، وعلى كمية قليلة من السائل الذي يحيط بالجنين.



Bibliographie

- [1] Docteur E.FLORI, Docteur B.DORAY et Docteur N. CARELLE.
«Module 02 de la conception à la naissance - item 31 : Trisomie 21 »
Faculté de médecine de Strasbourg. Février 2007.
- [2] Anonyme. «Le syndrome de Down». Tiré du bulletin W 179 INSIEME
Genève, décembre 2010, P 9-16.
- [3] ACLF. « Guide de bonnes pratiques en cytogénétique », Révision 2 :
juin 2010. PA-S.
- [4] M. VAUBOURDOLLE. « Biochimie, hématologie ». Collection le
Moniteur Internat, Ed.

WOLTERS KLUWER; 2007 : P11-12.
- [5] LE CAIGNEC. « Caryotype Humain ». Collège National des
Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Université Médicale
Virtuelle Francophone; 2010/2011.
- [6] Reddy UM, Mennuti MT « Incorporating first-trimester Dawn syndrome
studies into prenatal screening: executive summary of the National
Institute of Child Health and Human Development workshop ». Obstet
Gynecol, n°107 ; 2006
- [7] L. PENROSE. « The relative effects of paternal or maternal age in
mongolism ». J. Genet; 1933

- [8] M. VEKEMANS. « Âge maternel et autres facteurs de risque de la Trisomie 21 ». Ann brai clin, vol 61, n"4 juil-août 2003
- [9] N. DOUET-GUILBERT, A. BASINKO, M-J. LE BRIS, A. HERRY, F. MOREF, M. DE BRAEKELEER. « Stratégies d'identification des marqueurs chromosomiques surnuméraires en cytogénétique constitutionnelle». Pathologie-Biologie 56; 2008: P 364-354.
- [10] Dr. Florence Fellmann, Dr. Danielle Martinet. « Les techniques de diagnostic des maladies génétiques et le conseil génétique ». Premières Journées Européennes de l'X fragile, Conférence-discussion; 19 Novembre 2011.
- [11] Platon. « La République ». Ed Gallimard; 1993.
- [12] t UCHIDA, E. CURTIS. « A possible association between maternai radiation and mongolism ». Lancet 1961, 2 :848-50.
- [13] J. LEJEUNE, M. PRIEUR. « Contraceptifs oraux et Trisomie 21 ». Ann Génét 1979
- [14] S.E. ANTONARAKIS, S.D. KITTUR, C. METAXOTOU, P.c. WATKINES, A.S. PATEL. « Analysis of DNA haplotypes suggests a genetic predisposition to trisomy 21 associated with DNA sequences on chromosome 21 ». Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82 :3360-4.

- [15] D. WARBUTON, V. DELLARCO, P. VOYTECK, A. HOLLAENDER.
« Genetics factors influencing aneuploidy frequency. Aneuploidy :
etiology and mechanisms ». New York: Plenum Press, 1985, 133-48
- [16] B. CHADEFAUX-VEKEMANS, M. COUDE, F. MULLER et Al. {{
Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of
Down syndrome» *Pediatric Research* 200.
- [17] TJ. HASSOLD, LC BURRAGE, ER CHAN et Al. {{ Maternal folate
polymorphisms and the etiology of human non-disjunction ». *Am J Hum
Genet* 2001.
- [18] Féreché Encha-Razavi, Estelle Escudier. « Embryologie humaine: de la
molécule à la clinique ». Ed Elsevier; 2008.
- [19] Damien Sanlaville, Catherine Turleau. {{ Types, fréquences et
mécanismes de formation des anomalies chromosomiques ». Université
Médicale virtuelle francophone, Collège Nationale des Enseignants et
Praticiens de Génétique Médicale, France, 2010-2011.
- [20] E. SEGUIN. « L'instituteur des idiots ». Collection Sciences Humaines,
Ed. Economica; 1980.
- [21] E. Seguin. « L'Education physiologique ». Paris, Flammarion; 1931.
- [22] Senat. « Dépistage de la trisomie 21 au premier trimestre: pourquoi des
recommandations de la haute autorité de santé » *Gynécologie
Obstétrique et Fertilité*; 2007; 35 :1069-1070.

- [23] Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale. « Génétique médicale formelle, chromosomique, moléculaire, clinique ». Ed Masson; 01/2004.
- [24] Patricia Fergelot. « Génétique médicale». Campus référence, Ed Elsevier 2004.
- [25] Gérald Bussy, Vincent des Portes. « Définition du retard mental, épidémiologie, évaluation clinique ». mt pédiatrie, vol. 11, n" 4, juillet-août 2008.
- [26] Fernandez Beatrice - Del Rio Belen « Down Syndrome, understanding the gift of the life ». Faculté de psychologie et des sciences de l'éducation Genève, juin 2011.
- [27] Roubertoux PL, Kerdelhué B. «Trisomy 21: from chromosomes to mental retardation».
- [28] Behav Genet.36 (3); 2006 May.
- [29] Salvator Levi. ({ Le dépistage anténatal des malformations congénitales». Revue Hospitals.Be. Numéro: 02 - Volume 2 ; avril-mai-juin 2004.
- [30] Dr Jean-Michel FAURE et Michel CHARRET. ({ Comment je me sers de l'échographie des 2 et 3eme trimestres pour le dépistage de la trisomie 21». Numéro spécial 26-27, MarsDécembre 2007.

- [31] G. Ram and J. Chinen. « Infections and immunodeficiency in Down Syndrome ». British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 164; 2011.
- [32] A. Chaanine, C. Hugonenq, G. Lena, J. Mancini. « Les complications neurologiques liées à la trisomie 21 ». Archives de Pédiatrie 15; 2008, 388-396.
- [33] W. Ayed, L. Gouas, F. Penault-Llorca, A. Amouri, A. Tchirkov, P. Vago. « Trisomie 21 et cancers - Trisomy 21 and cancers ». Morphologie, Volume 96, Issues 314-315, OctoberDecember 2012.
- [34] Veyrat B, Dreux S, Piedimonte A, Muller F. ({ Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs maternels: conduite à tenir devant une AFP élevée ». Médecine Fœtale et Echographie en Gynécologie 2007 ; 70: 10-15.
- [35] Orlandi Sabrina. ({ Trente années de diagnostic prénatal de la trisomie 21 en France: étude de prévalence en population de 1977 à 2005 ». Thèse de Doctorat en Médecine à la Faculté de Médecine de Dijon, 2009.
- [36] P.Bouizegarène, N. Ameziane, M. Bogard, J.-c. Deybach, J. Lamoril. « Détection de la Trisomie 21 par J'étude de l'ADN - Diagnosis of Down Syndrome by biology tools ». Immuno-analyse et biologie spécialisée 23; 2008.

- [37] Fernandino Di Cunto and Gaia Berto. « Down Syndrome: Molecular Pathways of Down Syndrome Critical Region Genes ». Ed by Subrata Kumar Dey, March 6, 2013, P 951-953. 29- Docteur Florence AMBLARD. « Trisomie 21 ». Corpus médical - Faculté de Médecine de Grenoble ; novembre 2005.
- [38] Anonyme. « Réduction de la vascularisation des tumeurs chez des souris modèles de trisomie 21 ». Nouvelles du Chromosome 21 (Lettres de Juillet 2010).
- [39] Jean-Marc Costa, Alexandra Benachi. « Le diagnostic prénatal non invasif sur sang maternel : bilan et perspectives ». *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2010; 12 (1) : 26-32
- [40] Jayalakshama, Margaret M, Amudha S, Tilak P, Devi R, Rajangam S. « Cytogenetic analysis in Down syndrome ». *Int J Hum Genet.* 2010, 10:90-9.
- [41] Bernard Guérin du Masgenêt, Yann Robert, Philippe Coquel, Philippe Bourgeot, Yves Ardaens. ({ Échographie en pratique obstétricale ». Ed MASSON, 4^e édition, 2009.
- [42] Szymanowicz. ({ Les marqueurs tumoraux ». *Feuillets de biologie* 2011.
- [43] Françoise Jauzein. ({ Les marqueurs sériques utilisés dans le dépistage de la trisomie 21 ». ACCES-ENS Lyon, 09/2013.

- [44] Françoise Poloce, Catherine Boisson-Gaudin ({ Marqueurs sériques maternels d'anomalies fœtales (trisomie 21, anomalies chromosomiques, spina bifida, ...) »). Revue Francophone Des Laboratoires - Avril 2010 W421.
- [45] Service Evaluation économique et Santé Publique. ({ Évaluation des stratégies de dépistage de la Trisomie 21 »). Haute Autorité de Santé, juin 2007.
- [46] Alan H. Bittles, Carol Bower, Rafat Hussain and Emma J. Glasson. «The four ages of Down syndrome». Eur J Public Health; 2007.
- [47] Benedicte de Freminville, Jacqueline Bessuges, Bernadette Céleste, Martine Hennequin, Nathalie Noack. « L'accompagnement des enfants porteurs de trisomie 21». mt pédiatrie, vol. 10, n° 4, juillet-août 2007.
- [48] Prof. JA Rondal. « Nouvelles perspectives thérapeutiques en matière de Trisomie 21 ».
Journal de l'APEM-21, 3^e quadrimestre 2013, P 16-20.
- [49] B. Z. Azman, R. Ankathil, I. Siti Mariam, M. A. Suhaida, M. Norhashimah, A. B. Tarmizi, et al., « Cytogenetic and clinical profile of Down syndrome in Northeast Malaysia », SingaporeMed J, 48 (2007).

- [50] Mutton D, Alberman E, Hook EB, authors. « Cytogenetic and epidemiological findings in Dawn syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down syndrome cytogenetic register and the association of clinical cytogeneticists. »J Med Genet. 1996;33:387-94.
- [51] .MULERIS.M,APIOU F, RICHARD F, DUTRILLAUX B.
Hybridation en cytogénétique moléculaire, principe techniques.
- [52] MICHE Z, SAULEAU K
Mémoire de diplôme d'études spécialisées de biologie médicale :
L'hybridation in situ fluorescente en cytogénétique constitutionnelle.
Faculté de médecine de Rennes.
- [53] www.lefaitmedical.ch/48prenatal.html
- [54] .PETIT C,GERARD H
Le diagnostic préconceptionnel : Sa place par rapport au diagnostic préimplantatoire
- [55] RAY P, VIVILLE S.
Le diagnostic génétique préimplantatoire en France

[56] HONG S.E.SHUGART Y,Y. HUANG D.T. et al

Autosomal of the LIS1 lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations.

Nature Genet.2001,27 :225

[57] BODY G, PERROTIN F, GUICHET A , PALLEIT C, DESCAMPS P.

La pratique du diagnostic prénatal.1998.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- بأن أكرس حياتي لخدمة الإنسانية .
 - وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه .
 - وأن أمارس مهنتي بوانع من ضميري وشرعي في جاعلا صحة مريض هدي في الأول .
 - وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي .
 - وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب .
 - وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي .
 - وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي .
 - وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها .
 - وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد .
 - بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسما بشري في .
- والله على ما أقول شهيد .

جامعة محمد الخامس - الرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 47

سنة: 2017

التثالث الصبغي:

مراجعة الأدبيات، استيعاب التهجين في الموضع المتألق

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرف

الآنسة: أسماء أضياد

المزودة في 27 أكتوبر 1989

طبيبة داخلية بالمركز الاستشفائي الجامعي ابن سينا بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: التثالث الصبغي - الفحص ما قبل الولادة - التشخيص بعد الولادة -
التهجين في الموضع المتألق.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: ميمون زوهدي

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

مشرف

السيد: عمر شقيري

أستاذ في علم الأنسجة والأجنة

السيدة: فاطمة جابويريك

أستاذة في طب الأطفال

أعضاء

السيد: عبد الله دامي

أستاذ في الكيمياء الحيوية