

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE  
FES



Année 2012

Thèse N° 142/12

# **APPORT DE LA CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE DANS LES SYNDROMES MICRODELETIONNELS (A propos de 05 cas)**

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 01/11/2012

PAR

**Mme. SAMRI IMANE**

Née le 09 Août 1984 à Fès

**POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE**

**MOTS-CLES :**

Syndrome microdélétionnel - Cytogénétique moléculaire -  
Hybridation in situ en fluorescence - Hybridation génomique comparative

**JURY**

M. HIDA MOUSTAPHA.....	PRESIDENT
Professeur de Pédiatrie	
M. OULDIM KARIM.....	RAPPORTEUR
Professeur agrégé de Génétique	
M. ATMANI SAMIR.....	JUGE
Professeur de Pédiatrie	
M. EL KOUACHE MUSTAPHA.....	MEMBRE ASSOCIE
Professeur assistant d'Anatomie	

## PLAN

INTRODUCTION .....	5
HISTORIQUE .....	8
BASES FONDAMENTALES.....	12
A. Le cycle cellulaire.....	13
I. La mitose.....	14
II. La méiose .....	31
III. Accidents du cycle cellulaire .....	41
B. La structure de la chromatine et du chromosome .....	44
I. La chromatine.....	44
II. Le chromosome .....	50
CYTOGENETIQUE CLASSIQUE.....	58
A. Introduction .....	59
B. Le caryotype humain normal .....	60
1. Principe et technique d'obtention du caryotype métaphasique .....	60
2. Classement des chromosomes métaphasiques : le caryotype .....	64
3. Indications du caryotype métaphasique.....	67
4. Techniques particulières .....	68
C. Les anomalies chromosomiques.....	71
1. Introduction.....	71
2. Incidence .....	73
3. Anomalies de nombre .....	73
4. Anomalies de structure .....	78
CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE .....	94
A. Introduction .....	95
B. Historique .....	96
C. Hybridation in situ en fluorescence (FISH).....	97
C.1. Principe .....	97
C.2. Substrats de la FISH .....	100
C.3. Sondes utilisées.....	100
C.4. Dénaturation/Hybridation .....	109

C.5. Visualisation et analyse des hybrides .....	110
C.6. Nomenclature .....	112
C.7. Paramètres influençant la FISH .....	112
C.8. Indication de la FISH .....	114
C.9. Limites de la FISH .....	116
C.10. Dérivées de la FISH .....	117
D. Hybridation génomique comparative (CGH) et dérivées .....	120
D.1. Principes techniques .....	120
D.2. Applications cliniques .....	122
D.3. Limites de la CGH .....	123
D.4. Dérivées de la CGH .....	124
a. La CGHarray .....	124
b. Les puces à SNPs .....	127
CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE : APLICATIONS CLINIQUES.....	130
A. La FISH .....	131
A.1. La FISH sur métaphase : un complément du caryotype.....	131
a. Diagnostic cytogénétique des microremaniements chromosomiques .....	131
b. Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes.....	132
c. Caractérisation d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype.....	132
d. Détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées	133
A.2. La FISH interphasique .....	134
a. Le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques .....	134
b. Le diagnostic pré-implantatoire des anomalies chromosomiques	136
c. La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans hémopathies malignes .....	136
d. Le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires.....	137
B. La CGH array.....	139

B.1. La CGH array, technique de recherche clinique en pathologie acquise .....	139
B.2. La CGH array : technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles .....	139
a. Classification des CNVs .....	140
b. Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents .....	143
c. Utilisation des bases de données de variants de structure du génomome .....	144
B.3. CGH array et recherche clinique en pathologie constitutionnelle .....	144
CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE ET SYNDROMES MICRODELETIONNELS .....	146
A. Définition .....	147
B. Données fondamentales.....	147
C. Microdélétions interstitielles .....	149
C.1. Microdélétions péricentromériques .....	149
a. Le syndrome de DiGeorge et délétion 22q11.2.....	150
b. Le syndrome de Williams et Beuren et délétion 7q11.23.....	156
c. Le syndrome de Prader-Willi et d'Angelman, région 15q11-q13.	159
d. Le syndrome de Smith-Magenis et délétion 17p11.2.....	164
C.2. Autres microdélétions interstitielles .....	165
a. Syndromes connus et microdélétions interstitielles.....	166
ü Syndrome de WAGR et délétion 11p13.....	166
ü Syndrome de Langer-Giedon et délétion 8q24.1.....	167
ü Syndrome d'Alagille et délétion 20p11.23 (SAG).....	167
ü Syndrome de Rubinstein-Taybi et délétion 16p13.3.....	168
b. Délétions interstitielles et nouvelles entités syndromiques .....	169
ü Délétion 8p23.1 (monosomie 8p) .....	169
ü Délétion 2q22-q23 (syndrome de Mowat Wilson).....	169
D. Microdélétions subtélomériques .....	170
v Syndrome de Miller et Dieker (SMD) et la délétion 17p13.3 (Syndrome agyrie-pachygyrie).....	170

v Syndrome d'ostéodystrophie héréditaire d'Albright et délétion 2q37.3.....	172
v Délétion 22q13.3 ou syndrome de Phelan-McDermid .....	172
E. Prise en charge .....	174
F. Conseil génétique .....	175
OBSERVATIONS CLINIQUES.....	176
METHODES ET RESULTATS .....	186
DISCUSSION .....	191
CONCLUSION .....	196
RESUME .....	199
BIBLIOGRAPHIE .....	203
ANNEXES.....	213

# INTRODUCTION

L'apparition des techniques de haute résolution et le développement de la microcytogénétique ont permis de combler le fossé qui séparait, il y'a quelques années, la pathologie génétique et la pathologie chromosomique.

La cytogénétique moléculaire d'apparition relativement récente est une discipline frontière entre la cytogénétique et la génétique moléculaire qui a révolutionné l'approche traditionnelle de la cytogénétique. Actuellement, ses outils principaux sont l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur préparation chromosomique et l'hybridation génomique comparative sur puces d'ADN (CGH-array).

De nombreux syndromes décrits cliniquement, depuis les années soixante, ont été rattachés, grâce à ces techniques, à des microremaniements, alors qu'à l'inverse, la description de nouvelles microdélétions a permis d'identifier de nouveaux tableaux cliniques.

Ces syndromes, dits microdélétionnels représentent des entités cliniques, associant généralement : un retard mental, une dysmorphie avec des malformations d'organes et des troubles du comportement. Il s'agit d'un syndrome de gènes contigus le plus souvent de novo par perte de fragment chromosomique de petite taille infra-microscopique (< 5 mégabases) non visible sur un caryotype standard.

A l'heure actuelle, la recherche de ces microdélétions justifie le recours à des marqueurs spécifiques de chaque région avec des techniques adaptées. Il est donc indispensable d'avoir une orientation clinique préalable, facilitée par l'amélioration des connaissances de l'expression phénotypique de ces syndromes, étudiés sur des cohortes de patients et à différents âges de vie.

Les deux syndromes les plus étudiés, diagnostiqués et suivies sont : le syndrome de la délétion 22q11 et le syndrome de Williams.

A travers ce travail, nous mettrons à jour les dernières actualités scientifiques sur ces syndromes ainsi que l'intérêt d'une approche multidisciplinaire :

- Ø En définissant les syndromes microdélétionnels les plus connus,
- Ø En rappelant les aspects cytogénétiques et moléculaires de ces syndromes,
- Ø En citant les principaux outils pour le diagnostic ainsi que l'intérêt de la cytogénétique moléculaire dans l'approche de ces syndromes,
- Ø En insistant sur le rôle du conseil génétique et de la prise en charge pluridisciplinaire.

# HISTORIQUE

Si Gregor Mendel met en évidence, en 1865, l'hérédité des caractères transmis, il aura fallu attendre 1956 pour que Tjio et Levan parviennent à connaître le nombre des chromosomes humains (46). Parallèlement aux découvertes touchant la cytogénétique, les recherches concernant l'ADN ont avancé rapidement, et en 1953, Francis H. Crick et James D. Watson décrivent la structure en double hélice de l'ADN. Après cela les progrès de la génétique seront fulgurants pendant toute la seconde moitié du XXe siècle, avec le passage d'une médecine clinique descriptive au diagnostic cytogénétique et génétique des pathologies. [1]

Le caryotype classique est, depuis 1959 et le diagnostic de la trisomie 21 l'analyse de référence en cytogénétique. Cette technique a été la première réalisant une étude pangénomique, c'est-à-dire une étude permettant une analyse globale de l'ensemble du génome. En colorant les chromosomes de façon homogène et en les classant selon leur taille et la position des centromères, il a été possible de décrire les anomalies cytogénétiques de nombre des chromosomes et les remaniements de grande taille.

En 1970, la cytogénétique va connaître un nouvel essor grâce aux techniques de marquage chromosomique, qui permettront d'analyser la structure des chromosomes sous la forme de séquences de bandes par une dénaturation par la trypsine –bandes G – ou par la chaleur – bandes R. Ceci a permis la mise en évidence d'un éventail de pathologies chromosomiques de structures (monosomies et trisomies partielles, translocations, inversions déséquilibrées, etc.) [2]

Puis, il y eu l'émergence des techniques dites de haute résolution améliorant la résolution chromosomique et permettant la mise en évidence de remaniements plus fins. Parallèlement, la mise en place des techniques de biologie moléculaire va permettre de localiser des gènes responsables de maladies, comme la myopathie de

Duchenne en Xp21.2, le WAGR en 11p13 (tumeur de Wilms, aniridie, anomalie des organes génitaux externes et retard mental) tirant avantage d'anomalies chromosomiques présentes chez certains patients. [3]

Dans les années 1990, la cytogénétique devient moléculaire par l'utilisation de sondes marquées par des fluorochromes (marquage non radioactif), et l'amélioration des microscopes. Le développement des méthodes d'hybridation in situ, ADN ou ARN, a permis la localisation génique et le début de la cartographie physique du génome. Parallèlement, la mise en place de sondes correspondantes aux pathologies les plus connues va devenir un outil de diagnostic fin, permettant de détecter des microdélétions et d'autres remaniements. Aucun laboratoire de cytogénétique réalisant des diagnostics de routine post- et/ou prénatale, hématologique ou encore préimplantatoire ne peut, de nos jours, se passer de cette technologie. [2][3]

Mais, dès l'origine il est apparu évident que cette technique n'était pas suffisante puisqu'il n'était possible de diagnostiquer que ce que l'on recherchait, et donc a fortiori que ce que l'on connaissait. Or, la majorité de ces anomalies est due à la présence de séquences répétées ou LCR (low copy repeats) homologues de part et d'autres de ces régions. Ces séquences sont susceptibles d'entraîner des échanges méiotiques inégaux, en raison de leur homologie, et de créer des délétions ou duplications chromosomiques. Ainsi, l'hypothèse de l'existence de très nombreux autres syndromes microdélétionnels sur l'ensemble du génome a été émise. [4][5]

Il a donc fallu imaginer le développement d'une technique permettant de réaliser une FISH sur l'ensemble du génome. Plusieurs étapes ont été nécessaires pour obtenir ce que l'on appelle aujourd'hui la CGH-array, le développement de la CGH sur chromosome (début des années 1990), puis, par le développement de

l'informatique, des techniques de biologie moléculaire, la connaissance de la séquence du génome humain et le développement de la CGH-array ou puce (début des années 2000).[1][5]

Enfin, il est possible que, dans un avenir proche, cette technique soit elle-même supplantée par le séquençage haut débit (début des années 2010).Mais, son utilisation n'est toujours pas réalisable dans les laboratoires dits de routine, ni même dans les laboratoires de référence en biologie moléculaire vu la nécessité de biostatisticiens qui sont les seuls capables de manipuler des machines afin d'analyser plusieurs centaines de milliards d'informations en une seule fois. [2][3]

# BASES FONDAMENTALES

## A- LE CYCLE CELLULAIRE

Le passage d'une génération d'êtres vivants à une autre génération est assuré par une série de phénomènes biologiques assez simples. Quelque soit l'espèce, cette multiplication des individus nécessite une multiplication des cellules. Les cellules peuvent subir soit la mitose soit la méiose, deux modes de division cellulaire qui ont des bases communes mais aussi des particularités et même des oppositions.[6]

La plupart des êtres vivants présente une alternance entre deux phases : l'une haploïde (cellule à  $n$  chromosomes) et l'autre diploïde (cellule à  $2n$  chromosomes).cette alternance est ponctuée par la réunion de matériels haploïdes lors de la fécondation et par le passage de l'état haploïde à l'état diploïde lors de la méiose. Néanmoins, des mitoses peuvent se produire en phase haploïde ou diploïde (fig 1).[6]

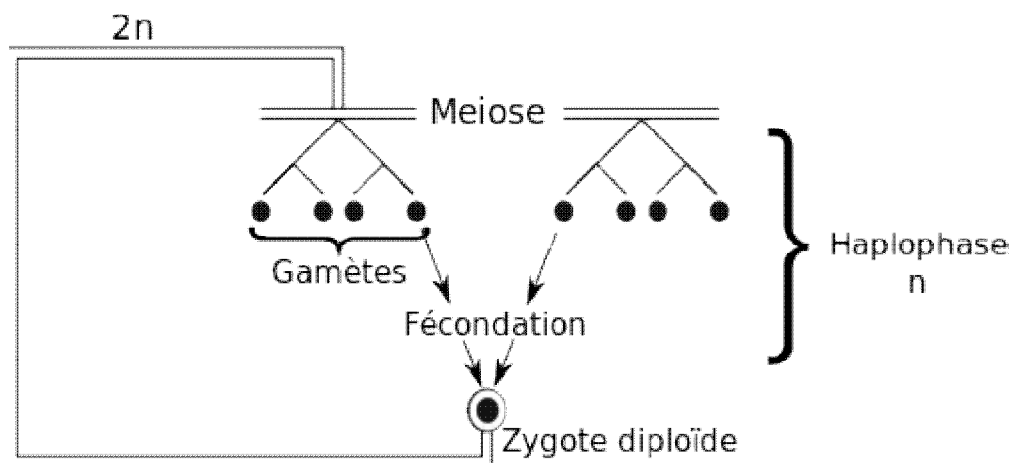


Figure 1 : Schéma simplifié du cycle diplophasique.svg

## I. LA MITOSE

La mitose est un processus critique pour tous les organismes eucaryotes (organismes avec un noyau cellulaire) et fournit une base pour la reproduction asexuée. Le matériel génétique est partagé entre les cellules filles durant la division nucléaire (=caryocinèse), le résultat est la production de deux noyaux fils contenant chacun une composition chromosomique identique à celle de la cellule mère. La caryocinèse est suivie par une division du cytoplasme(=cytocinèse), les organites qui y baignent se répliquent eux même et leur prolifération permettra la reconstitution du cytoplasme dans les cellules filles.[7]

La taille des cellules filles correspond à environ la moitié de celle de la cellule mère mais la quantité d'ADN de chaque cellule fille est équivalente à celle de la cellule mère permettant ainsi une reproduction conforme et répartition égale de l'information génétique.

### I-a LE ROLE DE LA MITOSE

Cette division cellulaire permet :

- Le développement embryonnaire par multiplication division des cellules de l'embryon
- La croissance générale depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte.
- La croissance continue (ongles, cheveux,...)
- Le renouvellement des cellules mortes (cellules cutanées, globules rouges...)
- La cicatrisation
- La conservation de l'identité cellulaire lors du développement et du renouvellement des cellules appartenant aux mêmes organes, tissus,...

Ce processus étant bien régulée, toute dérégulation aboutira à une production anarchique et désordonnée des cellules qui perdent les caractéristiques de la cellule mère productrice et engendrant le développement des tumeurs et des néoplasies.

[6][7]

#### I-b FACTEURS DECLENCHANT LA MITOSE

L'entrée de la cellule en division obéit à divers signaux d'ordre physique et biochimique. Chaque cellule possède un facteur héréditaire de taille déterminant sa taille ultime qui une fois dépassée entrainera la division de cette cellule. Aussi, un rapport précis entre la taille du noyau, du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique serait d'un rôle déclenchant de la mitose ceci s'explique d'une part, par la capacité du noyau de ne contrôler qu'une quantité de cytoplasme bien définie et la réduction de moitié de ce volume cytoplasmique rétablirait un contrôle efficace en ramenant le rapport nucléocytoplasmique en faveur du noyau, et d'autre part, par le pouvoir de la membrane cytoplasmique de n'assurer des échanges efficaces que pour une quantité limitée de cytoplasme alors là aussi la division de moitié du volume cytoplasmique ramènera le rapport membrano-cytoplasmique en faveur de la membrane. Ainsi, le noyau cellulaire et la membrane cytoplasmique n'assure le contrôle que d'un cytoplasme d'un volume bien limité. En outre, il existe également des signaux cytoplasmiques de division cellulaire car il a été démontré qu'un noyau présent dans des conditions le ramenant normalement à se diviser ne se divisait pas s'il est transplanté dans un autre cytoplasme.[8]

#### I-c LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire (d'une division à la suivante) a une durée très variable selon qu'il s'agisse d'une cellule sanguine, hépatique, épithéliale par exemple, de quelques heures à plus d'un an. La seule constante est la durée de la phase M (la mitose

proprement dite) qui est d'environ 1 à 2 heures. Le reste du cycle est qualifié d'interphase : c'est la partie du cycle pendant laquelle la cellule ne se divise pas, elle est au repos. Le cycle cellulaire est divisé classiquement en quatre phases, dont la plus importante est la mitose, division du noyau puis de la cellule (fig 2).[6]

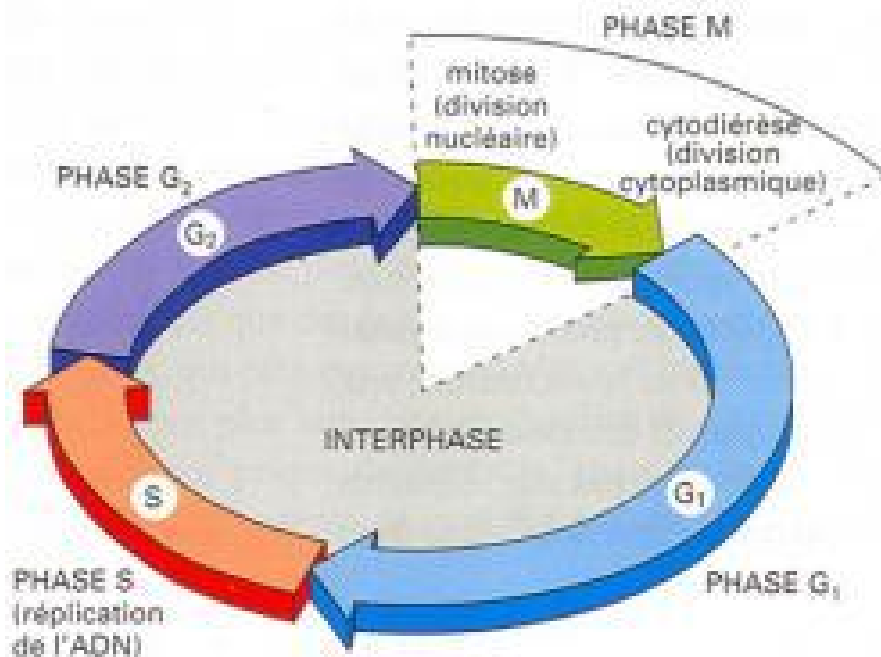


Figure2 :les étapes du cycle cellulaire

PhaseG1 (gap1) :présynthèse d'ADN

PhaseS :synthèse d'ADN

PhaseG2 :postsynthèsed'ADN

Phase M : mitose

## 1- INTERPHASE

Il s'agit d'une période de préparation à la division cellulaire caractérisée par un accroissement du volume cellulaire , la cellule transcrit ses gènes et les chromosomes sont dupliqués à la fin de laquelle l'ADN de la cellule se trouve en quantité double. Elle peut être subdivisée en trois phases :

Ø La phase G1 :

G est la première lettre de l'anglais "*Gap*" ou *Gap of time*"=intervalle.

C'est l'intervalle de temps qui s'écoule entre la fin de la mitose et le début de la phase suivante ou synthèse. C'est pendant la phase G1 que la cellule contrôle sa taille et son environnement. Elle est active métaboliquement et produit des copies de ses organites cytoplasmiques. Cette étape détermine la taille finale des cellules filles issues de la mitose. A noter que c'est aussi pendant cette phase qu'une cellule qui n'a pas encore commencé à répliquer son ADN peut entrer dans un état quiescent appelé G0 (G zéro) qui peut durer de quelques jours à plusieurs années.

Enfin, une cellule qui ne se divise plus reste en phase G1 jusqu'à sa mort.

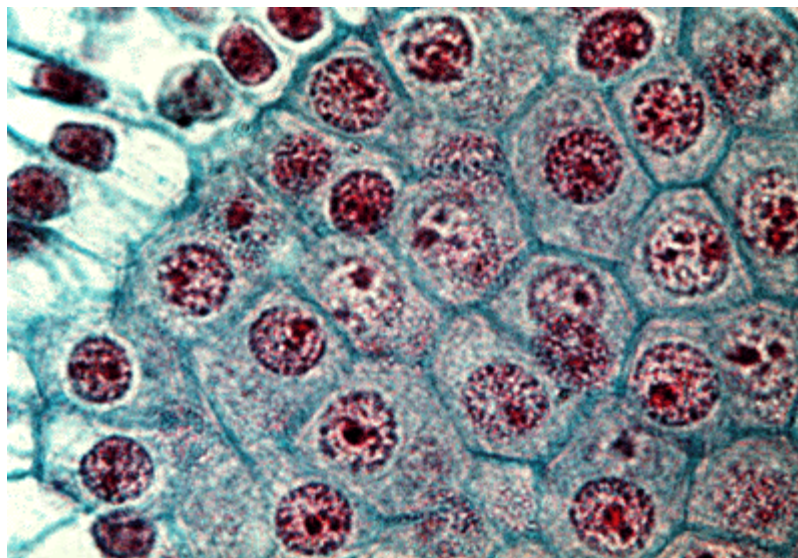
Ø La phase S :

De l'anglais *synthesis* ou phase de synthèse, pendant laquelle la cellule réplique son ADN et fabrique les histones qui sont nécessaires pour la confection des nouveaux brins d'ADN. Cette synthèse des histones se fait dans le cytoplasme, puis les nouvelles molécules entrent dans le noyau par les pores nucléaires et se combinent à l'ADN en formant les nucléosomes. On parle de réplication de l'ADN, ou duplication : c'est la copie conforme de l'information génétique, grâce à un complexe de réplication qui contient, entre autres, une enzyme : l'ADN polymérase. Ainsi, le matériel génétique sous forme de chromatine sera dédoublé aboutissant à la formation des deux chromatides sœurs de chaque chromosome et qui seront reliées entre elles par le centromère. Cette réplication est qualifiée de semi conservatrice, car chacune des 2 molécules constituées est formée à partir d'un brin de la molécule initiale (Annexe 1).

Ø La phase G2 :

C'est pendant cette période que la cellule va vérifier que son ADN a été correctement répliqué (elle est donc provisoirement tétraploïde), mais aussi qu'elle va poursuivre sa croissance, synthétise des enzymes et des protéines (le MPF : *Maturation Promoting Factor*, impliqué dans la condensation des chromosomes interphasiques en chromosomes mitotiques) en prévision de la division de la cellule proprement dite qui suit immédiatement celle du noyau.

A la fin de cette phase, chaque chromosome est parfaitement identique à son homologue. [9]



Photographie au microscope de cellules de "Lilium microsporogenesis" en interphase

## 2- LA PHASE MITOTIQUE

Le nom mitose provient du grec *mitos* ou filament. C'est un processus de partage et de distribution des chromosomes par disjonction des chromatides sœurs, aboutissant à la formation de deux cellules diploïdes et ainsi à la transmission intégrale et égale du matériel génétique.

Ce partage rigoureux est traduit sous le terme de mitose équationnelle.

L'évolution morphologique des constituants cellulaires conduit à subdiviser la mitose en 4 étapes successives s'enchaînant les unes aux autres.[7]

Ce sont dans l'ordre : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

( Fig3)

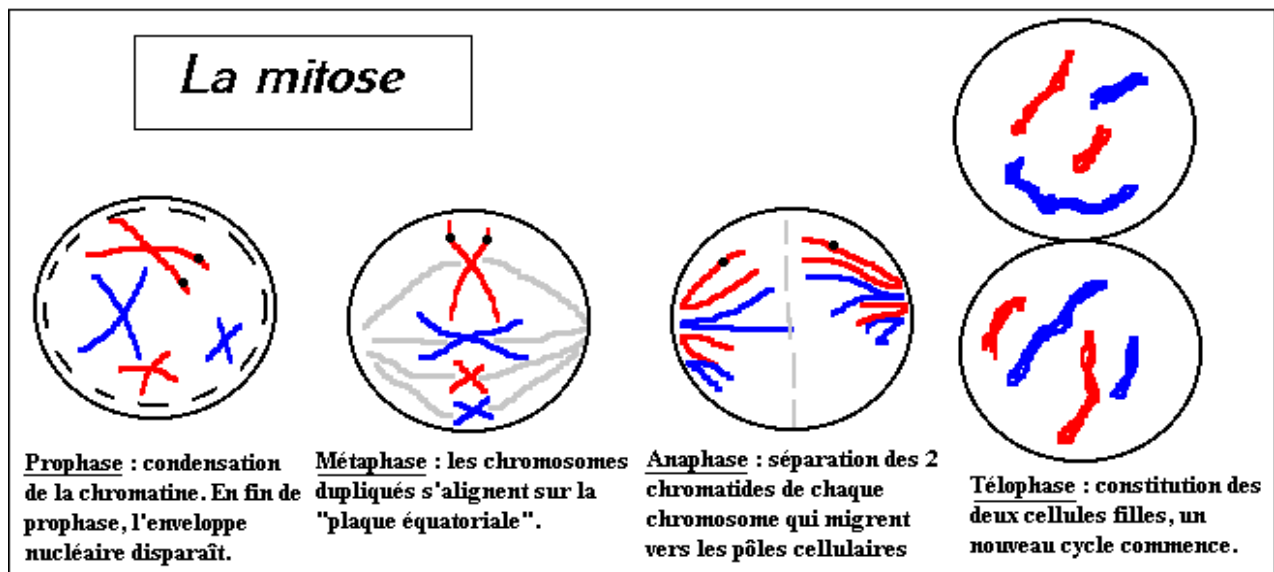


Figure 3 : les phases de la mitose

#### a- La prophase

Le stade le plus long (15 à 60min). C'est une phase d'organisation où la membrane cytoplasmique de la cellule modifie sa perméabilité et les échanges diminuent.

Dans le noyau, la chromatine subit une condensation intense aboutissant à des chromosomes individualisables dont chacun est formé par deux chromatides sœurs reliées par un centromère et une protéine nommée cohésine permettant leur union.

Dans le cytoplasme, le fuseau de division se forme ; chacun des deux centrosomes (chacun formé par deux centrioles perpendiculaires) migre vers un pôle de la cellule et le cytosquelette des microtubules se réorganise pour former le fuseau mitotique, structure bipolaire qui s'étend entre les deux centrosomes en entourant le noyau.

La membrane nucléaire et le nucléole se fragmentent et disparaissent progressivement libérant ainsi les chromosomes dans le cytoplasme mais qui restent emprisonnés dans la cage des fibres du fuseau. [6][7][9]

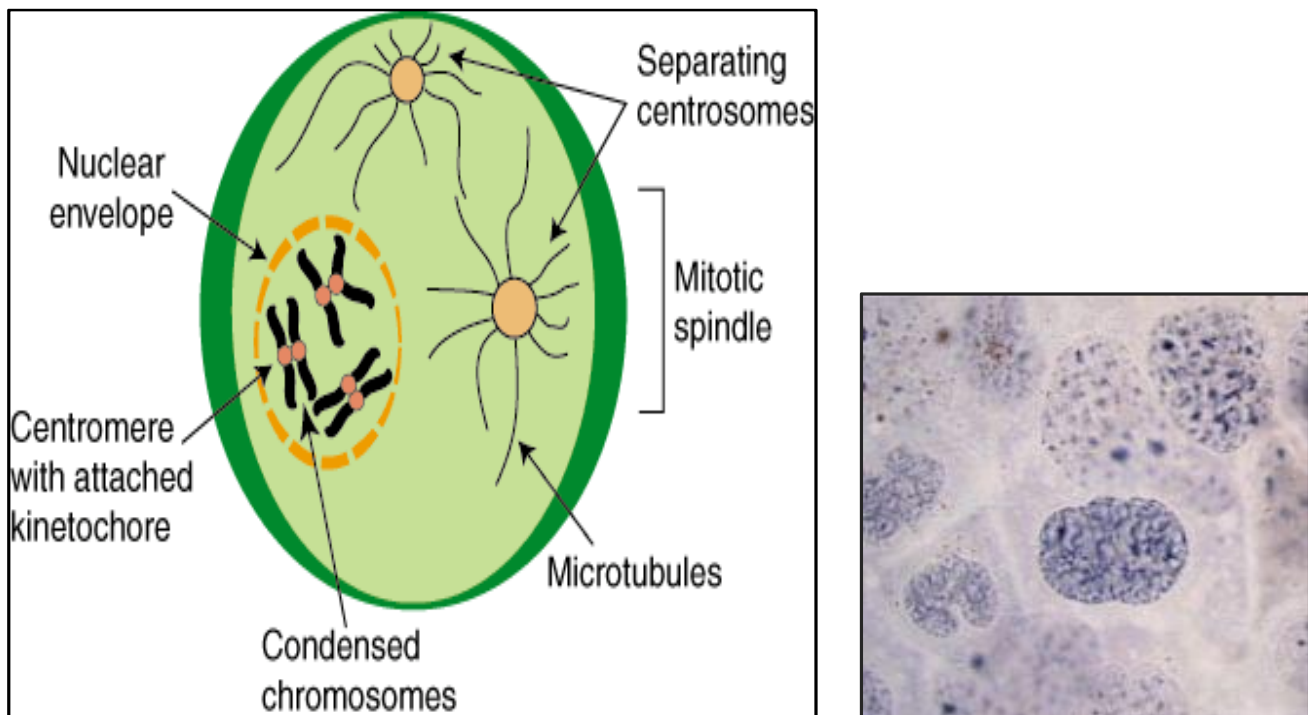


Figure 4 : la prophase

#### *b- La métaphase*

C'est une étape statique, de courte durée 2 à 10min

Elle débute brutalement par la rupture de la membrane nucléaire ; des structures spécialisées (kinétochores) se forment de part et d'autre des centromères

et se comportent en centres organisateurs de microtubules. Les kinétochores se lient à des microtubules : microtubules kinétochoriens. Le fuseau est complété et les chromosomes s'y fixent via leurs kinétochores.

Les microtubules kinétochoriens s'allongent et les chromosomes migrent alors vers le plan équatorial du fuseau où ils se rassemblent.

Les oscillations des chromosomes permettent d'aligner leurs centromères sur un même plan formant ainsi la plaque équatoriale située à mi chemin des deux pôles de la cellule.

C'est la meilleure période pour observer les chromosomes, les chromatides sont très distinctes mais encore unies par le centromère.

A noter que tout chromosome non aligné envoie un signal inhibiteur au passage à l'étape suivante. [6][7][9]

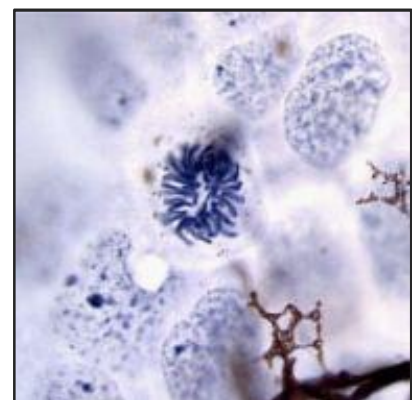
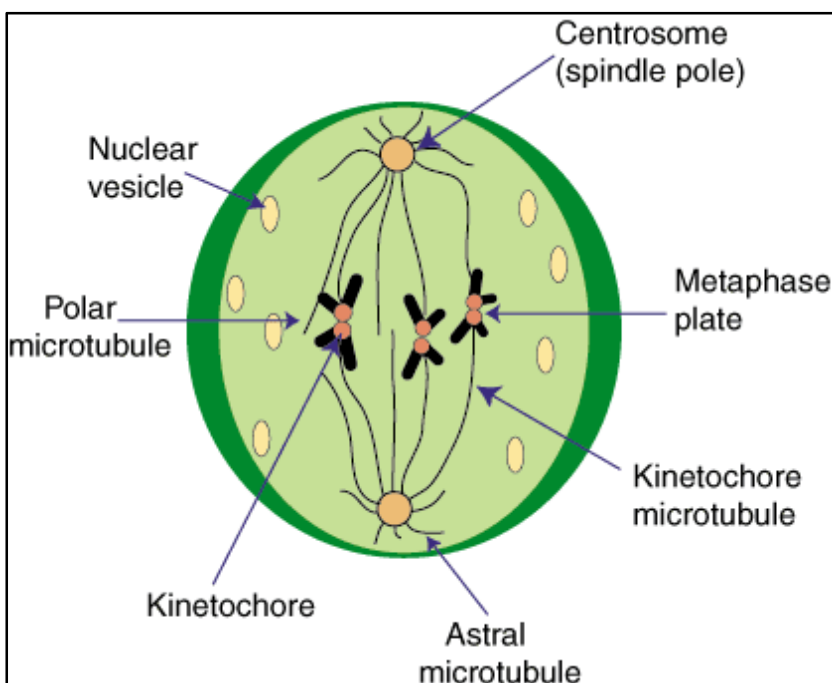


Figure 5 : la métaphase

*c- L'anaphase*

Cette phase est rapide (2à 3min) et commence quand le centromère dédoublé de chaque chromosome se sépare en deux, libérant ainsi les chromatides sœurs.

La séparation des deux chromatides est sous l'action d'une enzyme, la séparase, qui dégrade la cohésine liant les chromatides. Le signal d'activation de cette enzyme provient de la tension subite par les kinétochores et qui atteint un seuil précis.

Toutes les chromatides sœurs se séparent et se déplacent chacune vers un pôle opposé de la cellule et à la même vitesse (1micromètre/min).

Les microtubules kinétochoriens se raccourcissent, les fibres du fuseau s'allongent et les deux pôles s'éloignent encore.

À la fin de l'anaphase, les deux pôles possèdent des jeux équivalents et complets de chromosomes et les mitochondries se concentrent au niveau de la plaque équatoriale. [6][7][9]

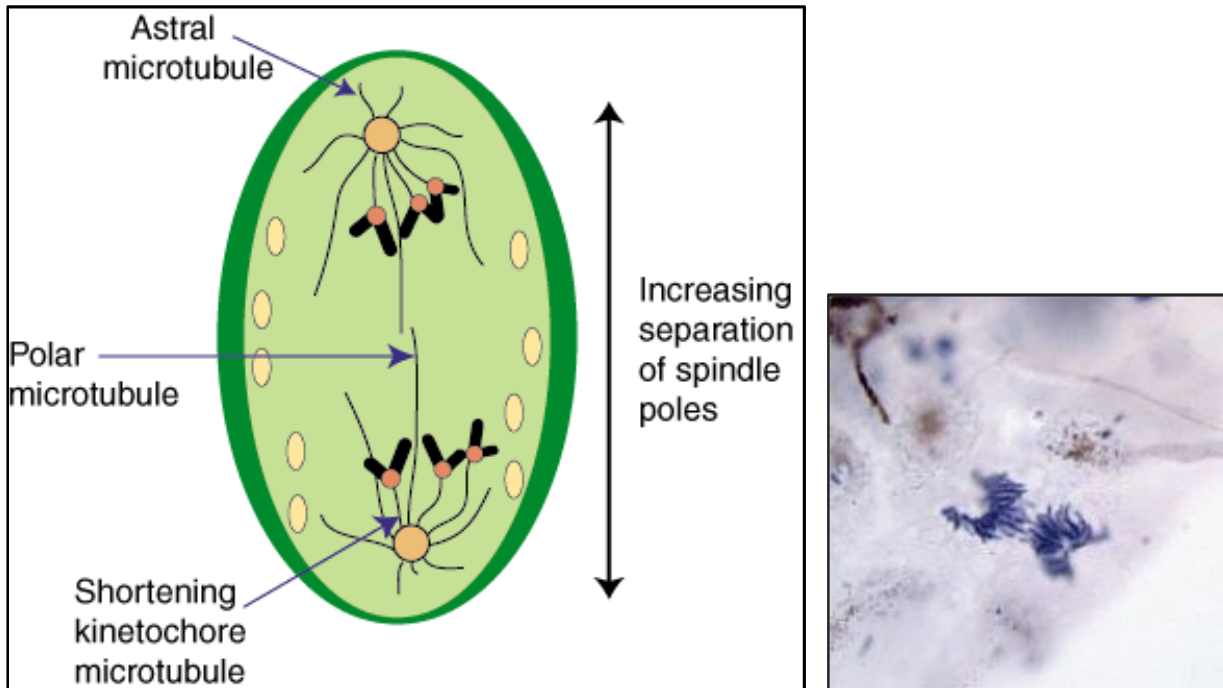


Figure 6 : l'anaphase

#### *d- La télophase*

Elle dure entre 30 et 60 min

Dès qu'un lot complet de 46 chromosomes est rassemblé dans un pôle de la cellule parentale, une enveloppe nucléaire se forme, à partir des fragments de l'enveloppe nucléaire de la cellule mère et des portions de membranes fournies par le réticulum endoplasmique, et rassemble ce lot chromosomique dans un noyau avec apparition des nucléoles.

Les chromosomes se décondensent et reprennent la forme d'une chromatine diffuse.

Les mitochondries et les autres organites se répartissent des deux côtés de la cellule.

La mitose, c'est-à-dire la division d'un noyau en deux noyaux génétiquement identiques, vient de se terminer. [6][7][9]

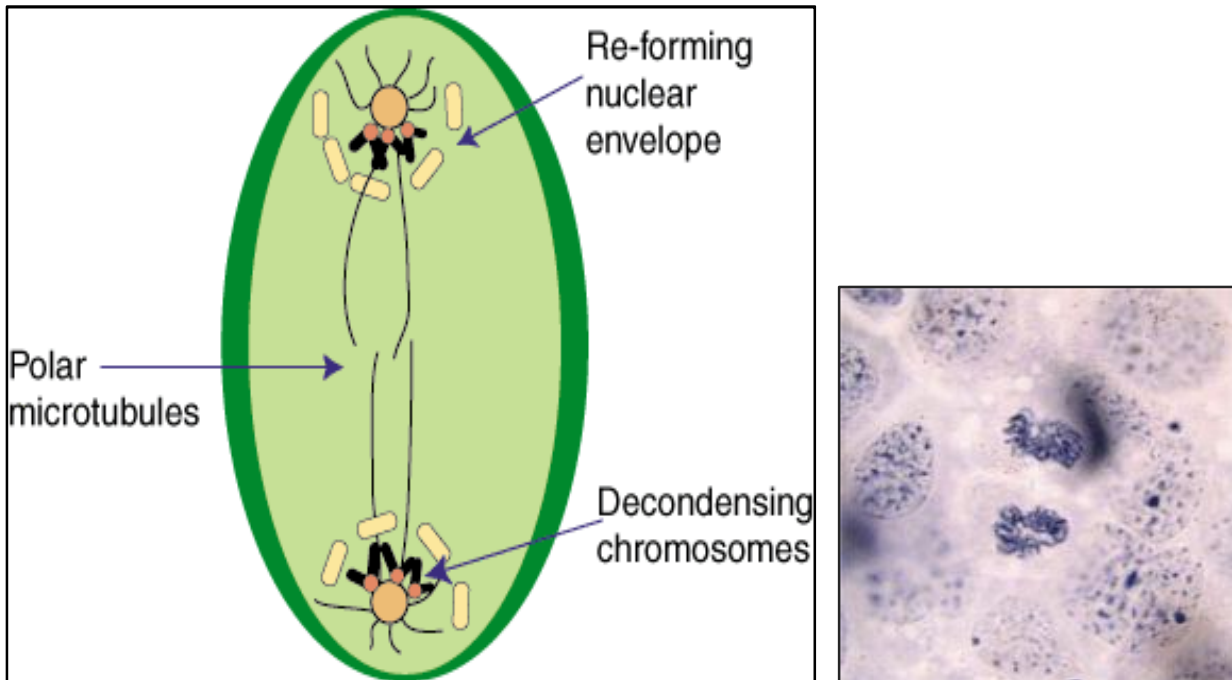


Figure 7 : la télophase

e- *La cytokinèse (la cytodière)*

Le cytoplasme se partage par un phénomène de clivage et de segmentation. Au niveau de la plaque équatoriale, la membrane cellulaire s'invagine autour du centre de la cellule et perpendiculairement à l'axe du fuseau et entre les deux noyaux formés se creuse le sillon de division jusqu'à ce qu'il rencontre les restes du fuseau mitotique.

En fin de télophase, les deux cellules filles restent unies par un pont cytoplasmique formé de faisceau de microtubules et qui persiste un peu avant de se désintégrer et libérer définitivement les deux cellules filles.

Le phénomène de mitose ainsi achevé aboutissant à la formation de deux cellules filles identiques génétiquement entre elles et à la cellule mère dont elles sont issues avec la même quantité du matériel chromosomique.

Les cellules filles passent directement en interphase avec possibilité de reprendre une deuxième mitose ou rester en quiescence en phase G0. [6][7][9]

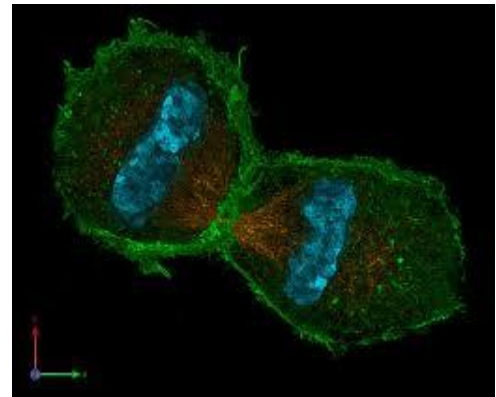
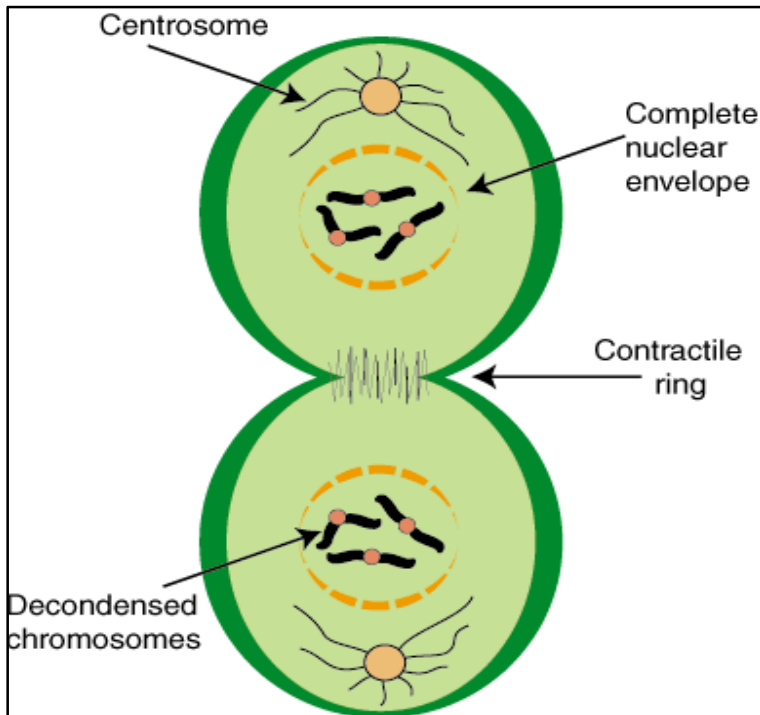


Figure 8 : la cytokinèse

### 3- Le contrôle du cycle cellulaire (Annexe 2)

Toutes les étapes du cycle cellulaire sont sous la dépendance de 2 familles de protéines interactives (des protéines kinases et des cyclines), constituant un véritable contrôle central qui s'exerce à certains points critiques du cycle (réplication de l'ADN, mitose et cytotérièse) grâce à des rétrocontrôles émanant des étapes déjà réalisées. Ainsi, une nouvelle phase ne débutera que si la précédente s'est correctement et totalement réalisée. [8]

Ø *Les protéines de contrôle du cycle cellulaire (fig 9)*

a. Les protéines kinases Cdk ou protéines kinases cycline-dépendantes (en anglais cyclin-dependant protein kinases) :

Ce sont des enzymes qui sont capables de transférer un groupement phosphate (phosphorylation) sur des protéines cibles : tyrosine et thréonine.

Une protéine phosphorylée (= active) par une kinase, peut à tout moment être déphosphorylée par une phosphatase et devient inactive.

Ces protéines Cdk vont s'associer à des cyclines pour déclencher les phases du cycle cellulaire. En fait, on connaît actuellement au moins 9 kinases dont Cdk1 à Cdk7 qui vont intervenir pendant le cycle cellulaire, en s'associant à des cyclines spécifiques. Cdk 8 et Cdk 9 sont impliquées dans la transcription.

A noter que les Cdk étaient antérieurement dénommées CDC (Cell division control) et que CDC2 correspond aujourd'hui à Cdk1. [7][8]

b. Les cyclines :

Ce sont des protéines spécialisées qui se lient aux molécules Cdk pour contrôler leur pouvoir de phosphorylation. Cette liaison est indispensable au bon fonctionnement du complexe enzymatique.

Les cyclines doivent leur nom au fait qu'elles subissent un cycle de synthèse et de dégradation à chaque cycle cellulaire. Les biologistes distinguent au moins 15 cyclines, dont les cyclines mitotiques (cycA et B) qui se lient aux molécules Cdk1 et Cdk2 pendant la phase G2 et vont permettre le déclenchement de la mitose, et les cyclines G1 (cycD et E) qui vont se lier aux Cdk2, Cdk4 et Cdk6 pendant la phase G1 pour déclencher la phase S (de synthèse). C'est la dégradation des cyclines qui induit la fin des phases S et M.

A noter également cette propriété étonnante des cyclines : elles favorisent l'expression des cyclines de la phase suivante et répriment l'expression des cyclines de la phase précédente, tout en favorisant leur dégradation.

MPF et SPF : le MPF est le facteur déclenchant la mitose (en anglais Mitotic promoting factor), c'est-à-dire le complexe CycB-Cdk1 (ou CycB-CDC2). Les SPF ou facteurs de promotion de la phase S sont indispensables pour préparer et déclencher la phase S. Ce sont des complexes formés de CycD et CycE, associées à Cdk 2, 4 et 6. [6][8]

c. Les CKI ou CdkI :

Cyclin-dépendant kinase inhibitor ou protéines inhibitrices des kinases cycline-dépendantes. Ces protéines capables d'inhiber les Cdk en s'associant avec elles ou avec le complexe Cyc-Cdk interviennent en interdisant le passage à la phase suivante. On comprend mieux le rôle fondamental de ces CKI dans la régulation ou la suppression des tumeurs.

Elles sont connues sous les noms de :

- ✓ p21 : si des lésions de l'ADN sont apparues pendant le cycle cellulaire et notamment pendant la phase S, une protéine p53 va activer p21 qui est un inhibiteur de Cdk. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en G1, avec soit réparation de l'ADN, soit apoptose (mort cellulaire).
- ✓ p27 : comme la précédente, cette protéine empêche le passage de la phase G1 à la phase S.
- ✓ p57 : agissant aussi en bloquant le passage G1 --> S, on a constaté que, chez les humains, une expression aberrante de la protéine p57 est associée à divers néoplasmes, ainsi qu'au syndrome de BECKWITH-WIEDEMANN. [7][9]

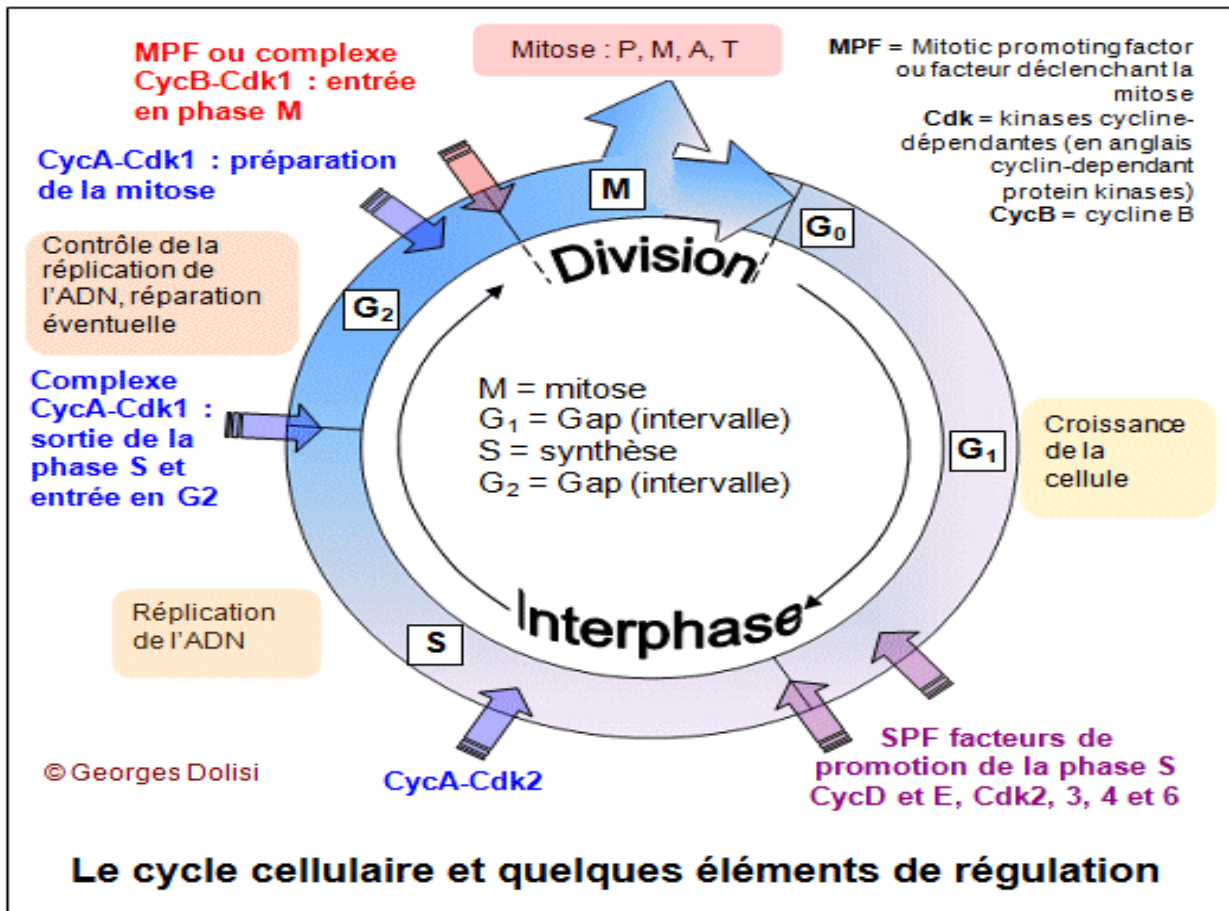


Figure 9 : le cycle cellulaire et quelques éléments de régulation

### Ø Les points de surveillance du cycle cellulaire

En collaboration avec les complexes cycline/Cdk, d'autres mécanismes surveillent des processus très importants du cycle, détectent des anomalies et imposent l'arrêt du cycle si des anomalies sont constatées :

Ces mécanismes interviennent lors : (fig 10)

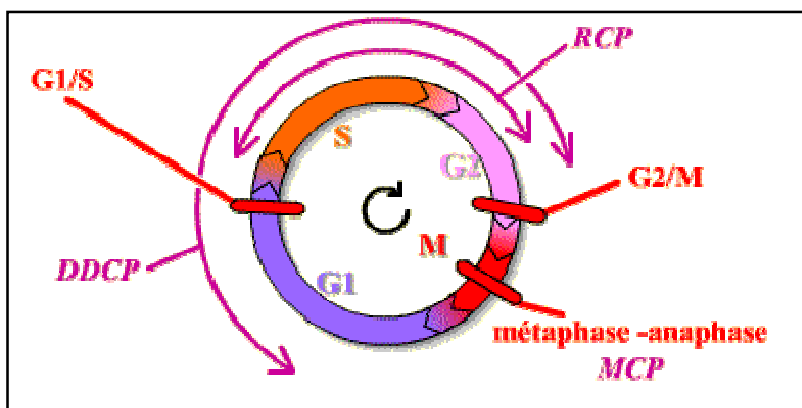
- des lésions d'ADN (DDCP = DNA Damage Check point) ou
- des anomalies de réplication de l'ADN (RCP = Réplication Check point)
- contrôle des chromatides-sœurs pour qu'elles se répartissent équitablement dans les deux cellules filles (MCP = Mitotic Check point).

Ils assurent en quelque sorte le « contrôle qualité » du cycle cellulaire en assurant le maintien de l'intégrité de l'ADN et la qualité de la réplication de l'ADN .

En effet, si seules les Cdk intervenaient, l'enchaînement des phases du cycle pourrait continuer à avoir lieu, même si l'ADN était endommagé, ce qui conduirait finalement à des anomalies génétiques ou chromosomiques graves pour les cellules, par exemple perte d'un chromosome ou d'un morceau d'ADN.

Si l'ADN présente des lésions ou si la réplication ne s'effectue pas correctement, le cycle est arrêté pour donner à la cellule le temps de réparer et de terminer correctement la réplication. Un autre aspect du contrôle veille à ce que le partage des chromosomes entre les 2 cellules-filles s'effectue de façon parfaitement équitable au cours de la transition métaphase - anaphase : si tous les chromosomes ne sont pas correctement attachés aux fibres kinétochoriennes, l'anaphase ne débute pas, les deux chromatides-sœurs de chaque chromosome restent liées l'une à l'autre. [8][9]

Dans tous les cas, si les anomalies sont trop importantes ou si les mécanismes de réparation échouent, un programme de mort cellulaire par apoptose est mis en place.



- DDCP et transition G1/S
- RCP et transition G2/M
- MCP et transition métaphase-anaphase

Figure 10 :mécanismes de surveillance du cycle et points de transition essentiels

\*\*\*\* POINTS DE SURVEILLANCE \*\*\*\*

∅ La surveillance de l'intégrité de l'ADN (DDPC) s'effectue tout au long de l'interphase (G1, S, G2). Ainsi, lorsqu'une lésion de l'ADN existe, le cycle peut être arrêté soit en G1, (la cellule n'effectue alors pas la transition G1/S), soit en S, soit en G2, (la cellule ne rentre alors pas en mitose). La transition G1/S ne pourra donc avoir lieu que si l'ADN est en bon état.

∅ La surveillance de l'accomplissement de la réplication (RCP) s'étale tout au long de la phase S et de la phase G2. Ainsi, la cellule ne pourra pas commencer la mitose tant que la réplication n'est pas correctement terminée et lorsqu'un défaut de réplication est détecté, la cellule arrête le cycle. La transition G2/M ne pourra donc se faire que si la réplication est correctement terminée et si l'ADN n'est pas lésé.

∅ La surveillance de l'attachement correct des chromosomes métaphasiques au fuseau ou check point mitotique (MCP) ne s'exerce que dans le court laps de temps de la métaphase et jusqu'à ce que le dernier chromosome ait atteint la plaque métaphasique. La transition métaphase-anaphase ne peut avoir lieu que si tous les chromosomes sont alignés en plaque métaphasique [6][9]

∅ *Des molécules nouvelles interviennent*

Les mécanismes de surveillance font intervenir des molécules nouvelles, différentes des Cycline / Cdk (qui assurent la progression du cycle cellulaire) et différentes des molécules qui interviennent directement dans les événements du cycle.

Parmi ces molécules se trouvent des kinases qui se lient à l'ADN, (DNA-PK) :

- ✓ kinase ATM (ataxia-télangiectasia mutée),
- ✓ kinase ATR (ataxia-télangiectasia Related),

- ✓ les protéines sérine-thréonine kinases Chk1 et Chk2 (check-point protein kinase).

La protéine Mad2 (Mitotic arrest deficient-2) intervient au point de surveillance métaphase – anaphase.

En conclusion,

- ✓ Le passage en phase S est retardé quand l'ADN est lésé
- ✓ La réplication est suspendue quand l'ADN est endommagé
- ✓ L'entrée en mitose est suspendue quand la réplication n'est pas terminée ou que l'ADN est lésé.
- ✓ La séparation des chromatides en mitose est retardée si un seul chromosome n'est pas correctement attaché au fuseau.

## II. LA MEIOSE

Chez les eucaryotes, en outre de la mitose, qui concerne les cellules somatiques et assure la naissance de cellules identiques à la cellule mère lors de la multiplication asexuée (elle conserve donc l'information génétique), il existe un deuxième type de division cellulaire : la méiose, et qui aboutit à la production de cellules sexuelles ou gamètes pour la reproduction.

Chez les animaux, la méiose est un processus se déroulant durant la gamétogénèse (spermatogénèse ou ovogénèse : les spermatozoïdes chez le mâle et les ovules chez la femelle) chez les espèces dites diploïdes. Chez les végétaux, la méiose produit des spores, qui par mitose donneront une génération haploïde (le pollen).

Elle donne des cellules haploïdes (cellules contenant  $n$  chromosomes) à partir de cellules diploïdes (cellule contenant  $2n$  chromosomes) ; chez l'homme, une cellule normale contient  $2n = 46$  chromosomes (donc 23 paires) alors qu'un gamète contient  $n = 23$  chromosomes au cours de deux divisions.

En plus de ce rôle de division, la méiose a un rôle important dans le brassage génétique (mélange des gènes) et ce, grâce à deux mécanismes de brassage : le brassage interchromosomique et le brassage intrachromosomique.

Ainsi, durant la méiose, la quantité d'ADN au sein de la cellule évolue au cours du temps.

Chaque cellule va donc séparer son patrimoine génétique en deux afin de ne transmettre que la moitié de ses gènes aux cellules filles.

Elle se déroule en plusieurs étapes formant un ensemble de deux divisions cellulaires, successives et inséparables. [6][7]

### II-a Description de la méiose

La méiose est une série de deux divisions cellulaires successives par lesquelles une cellule diploïde donne naissance à quatre cellules haploïdes. Ces deux divisions successives sont désignées "méiose I" ou division réductionnelle et "méiose II" ou division équationnelle, et il ne s'effectue qu'une seule réplication des chromosomes avant la méiose I.

#### a- La méiose I ou division réductionnelle

La première division est appelée division réductionnelle car elle aboutit à la formation de deux cellules à  $n$  chromosomes.

Elle est précédée par une interphase identique à celle de la mitose, au cours de laquelle chacun des chromosomes se réplique et se retrouve constitué de deux chromatides-sœurs identiques. Elle comprend 4 phases :

### *1-Prophase I :*

La prophase de la méiose est marquée par un phénomène absent au cours de la mitose: les chromosomes répliqués recherchent leurs chromosomes homologues et s'accolent à eux sur toute leur longueur. Comme chaque chromosome est formé de deux chromatides soeurs, on peut donc observer de petits groupes de quatre chromatides appelés tétrades.

C'est la plus longue phase : 90% de la durée de la méiose.

La prophase I est divisée en cinq étapes qui correspondent à cinq états caractéristiques de la chromatine : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

#### *1-1 Leptotène:*

- Condensation de la chromatine
- Attachement des télomères à l'enveloppe nucléaire par la plaque d'attache.

#### *1-2 Zygotène :*

- Début de l'appariement des chromosomes homologues (synapsis) sur toute leur longueur par *le complexe synaptonémal* (ou synapton) et convergence des télomères vers le centromère (un peu comme une fermeture éclair)
- NB : ce phénomène est absent lors de la mitose.
- NB : Le complexe synaptonémal est une structure protéique complexe constituée d'un élément central, SYCP1 relié à deux éléments latéraux. Les éléments latéraux sont en fait les cohésines SMC1, SMC3 formant un hétérodimère maintenu en place par hREC8 hHR23.

*1-3 Pachytène :*

- Phase la plus longue ~ 2 semaines pour des spermatozoïdes humains
- Appariement strict des chromosomes homologues qui sont sous forme de tétrade (car 4 chromatides) ou bivalent (car 2 chromosomes) (en plus d'une vésicule sexuelle chez le mâle : chromosome X et Y inactivés)
- Apparition des nodules de recombinaison (chiasmata) qui permettent les enjambements (crossing-over par échanges entre chromatides homologues).
- Cette phase a une importance considérable dans le brassage chromosomique.

*1-4 Diplotène :*

- Désintégration du complexe synaptonémal
- Désynapsis : séparation des chromosomes bivalents qui se repoussent sauf au niveau des chiasmata. Pour le bon déroulement de la méiose il en faut au minimum un par chromosome, en moyenne 2-3.
- Disparition de la vésicule sexuelle
- Décondensation de la chromatine et formation des grandes boucles permettant un fort taux de transcription.
- Cette étape de la prophase I peut durer plusieurs années chez l'ovocyte. En effet au cours de ce stade, l'ovocyte I augmente de volume, la décondensation des chromosomes permet la synthèse d'ARN messager et d'ARN ribosomiques qui seront stockés dans le cytoplasme et serviront de réserve pour le futur zygote lors des premières divisions de segmentation.

*1-5 Diacinèse :*

- Recondensation de la chromatine
- Détachement des télomères de l'enveloppe nucléaire.
- Glissement des chiasmas vers les télomères (terminalisation des chiasmas).
- À la fin, il y a disparition de l'enveloppe nucléaire. [6][7][9]

*2-Métaphase I*

- les bivalents se placent de part et d'autre de la plaque équatoriale sans dédoublement des centromères et les chiasmata sont sur la plaque équatoriale.
- Leur orientation se fait de façon aléatoire : on appelle ce phénomène la « ségrégation indépendante ». Cette ségrégation permet un second degré de diversification des cellules-filles : le brassage interchromosomique.

*3-Anaphase I*

- Rupture des chiasmata
- Ségrégation aléatoire des chromosomes homologues aux pôles cellulaires opposés sans clivage des centromères.

*4- Télophase et cytotodièrese*

- Reconstitution de la membrane nucléaire autour des deux lots de chromosomes homologues
- Cytodièrese suivie d'une courte interphase sans phase S.

À la fin de la méiose I, on se trouve donc devant la situation suivante : chaque cellule fille possède deux copies d'un membre de chaque paire de chromosomes

homologues (le chromosome maternel ou le chromosome paternel) et aucune copie de l'autre membre. [6][7][9]

b- La méiose II ou division équationnelle

Elle est identique à la mitose, sauf que les chromosomes ne se répliquent pas avant qu'elle commence.

Les chromatides présentes dans les deux cellules filles de la méiose I sont simplement partagées entre les quatre cellules grâce à la division des centromères. Elle se déroule également en quatre étapes :

1- Prophase II : identique à la prophase I mais brève car les chromosomes sont restés compactés.

2- Métaphase II : alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale

3- Anaphase II : clivage des centromères et ségrégation aléatoire des chromatides sœurs

4- Télophase II : reconstitution de la membrane nucléaire et cytodierèse

- o Au terme de la télophase de la seconde division de méiose, on obtient quatre cellules-filles haploïdes possédant chacune un simple jeu de chromosomes non dupliqués et sont non identiques suite aux recombinaisons génétiques de la méiose I. [6][8][9]

II-b La diversité des gamètes

Les gamètes créés par la méiose sont différents bien qu'ils descendent de la même cellule. Cette différenciation joue un rôle clef dans l'évolution des espèces, les deux principaux mécanismes de différenciation sont :

1- *Le brassage interchromosomique :*

C'est un brassage allélique par ségrégation indépendante des chromosomes homologues

Au moment de la métaphase I et de la métaphase II de la méiose, les chromosomes se disposent aléatoirement de part et d'autre du plan équatorial. Chaque chromosome (allèle) d'une paire migre ensuite vers un pôle (anaphase I), sans influencer les sens de migration des allèles des autres paires. Chaque cellule fille possèdera donc un jeu de chromosomes (et donc de gènes) différent de celui de la cellule mère.

2- *Le brassage intrachromosomique :*

C'est un échange d'allèle au sein d'une paire de chromosome

À chaque méiose, sauf cas exceptionnels, il peut se produire un échange réciproque de fragments de chromatides appartenant à deux chromosomes homologues : c'est le phénomène d'enjambement ou crossing-over qui survient pendant la prophase I (donc avant la séparation métaphasique des chromosomes homologues). Cet enjambement est provoqué par un nodule de recombinaison (complexe multi-enzymatique). Les chromatides recombinées se distinguent des chromatides d'origine.

La superposition des deux brassages permet une diversité considérable des gamètes.

- § Si l'individu possède  $h$  gènes hétérozygotes, le seul brassage intrachromosomique permet  $2^h$  arrangements possibles.
- § S'il possède  $n$  paires de chromosomes, le seul brassage interchromosomique permet  $2^n$  arrangements possibles.

En tout,  $2^{h \cdot n}$  gamètes différents peuvent être produits. En réalité, c'est un peu plus complexe car le nombre d'enjambements par chromosome n'est pas illimité. [9][10]

### II-c GAMETOGENESE

Le déroulement de la gamétogénèse et en particulier celui de la méiose dans l'espèce humaine présente des particularités selon le sexe

En effet, bien que le principe et le résultat, au point de vue génétique, soient identiques dans les deux sexes, des différences importantes séparent néanmoins les méioses masculine et féminine. . (Annexe 3)

#### *1- Spermatogénèse :*

Correspond à la gamétogénèse masculine. C'est un phénomène continu de la puberté à la mort.

Une cellule souche « spermatogonie » permet en se divisant par méiose la production continue de 4 gamètes « spermatozoïdes » matures.

Cependant, une spermatogonie avant de se lancer dans la méiose, elle subit une mitose somatique qui donne deux spermatogonies filles, l'une est laissée en stock et l'autre est destinée à la méiose. Au cours de la division méiotique, la spermatogonie donne un spermatocyte I qui donne naissance à 4 spermatozoïdes haploïdes identiques au niveau de la taille et des fonctions.

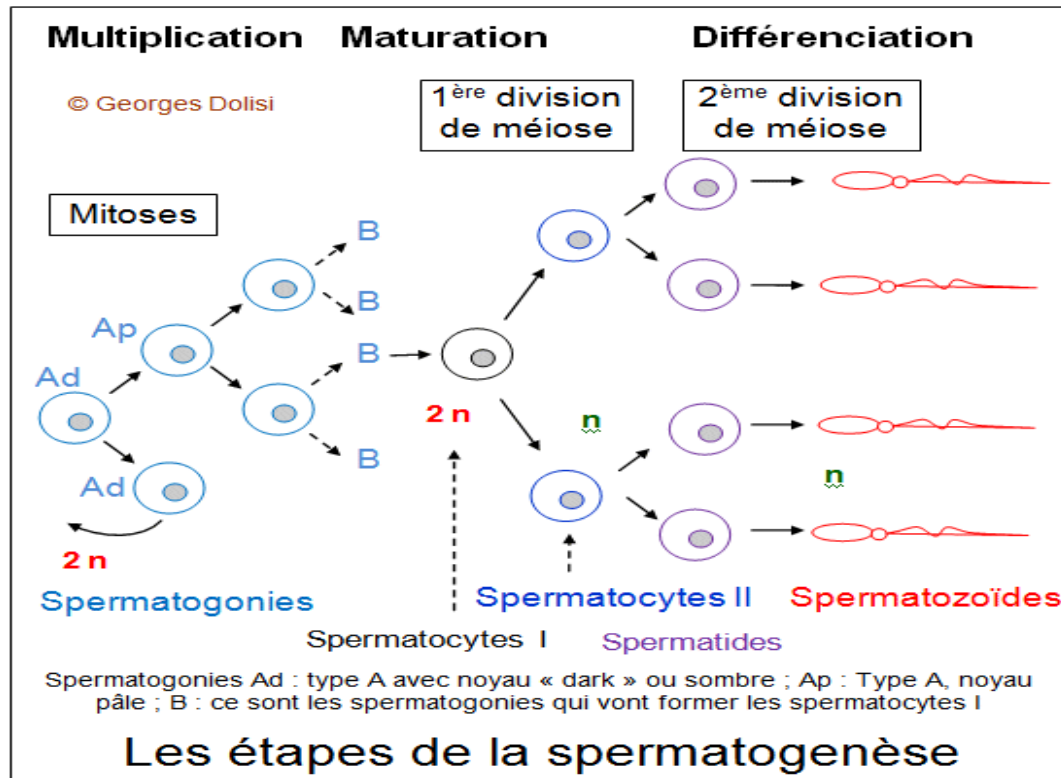


FIGURE 11

2- *Ovogénèse : (figure 12)*

Elle Correspond à la gamétogénèse féminine.

Elle débute dès la vie fœtale, entre les 4ème et 7ème mois de la vie intra-utérine, pour s'arrêter ensuite et reprendre à la puberté.

Pendant la phase intra utérine, les ovogonies (cellules germinales féminines) subissent plusieurs mitoses pour constituer un stock d'environ 7millions qui ne sera pas renouvelé. Puis chaque ovogonie débute sa méiose donnant un ovocyte I qui sera bloquée en prophase I (stade diplotène) jusqu'à la puberté.

De nombreux ovocytes dégénèrent au cours de la prophase I aux stades zygotène et pachytène (atrésie folliculaire). Les ovocytes I (au nombre de 2 millions environ) ayant survécu constituent alors une réserve de cellules sexuelles au repos qui attendent plusieurs années le signal pour continuer leur évolution.

A partir de la puberté (environ 400 000 cellules persistent), l'ovogenèse se poursuit de façon cyclique et ne s'achève que s'il y a fécondation. En effet, à chaque cycle menstruel, la méiose se poursuit dans une trentaine d'ovocytes jusqu'en métaphase II (stade qui correspond à l'ovulation et auquel n'arrive qu'un seul ovocyte sélectionné parmi les 30). L'ovocyte II bloqué en métaphase II est libéré dans les trompes et dégénère en l'absence de fécondation. Seule la pénétration d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire assure la reprise de la méiose II.

Dans la méiose féminine, les 2 divisions aboutissent à la production d'une seule cellule fonctionnelle dite ovule qui va conserver tout le cytoplasme original (servant par la suite au développement embryonnaire) mais un capital chromosomique haploïde. Les autres lots chromosomiques vont être repris au niveau de cellules plus petites de point de vue taille appelées globules polaires. Le premier globule polaire est expulsé après la mitose réductionnelle alors que le second, issu de la division équationnelle, est éjecté au moment de la fécondation.

[7][9][10]

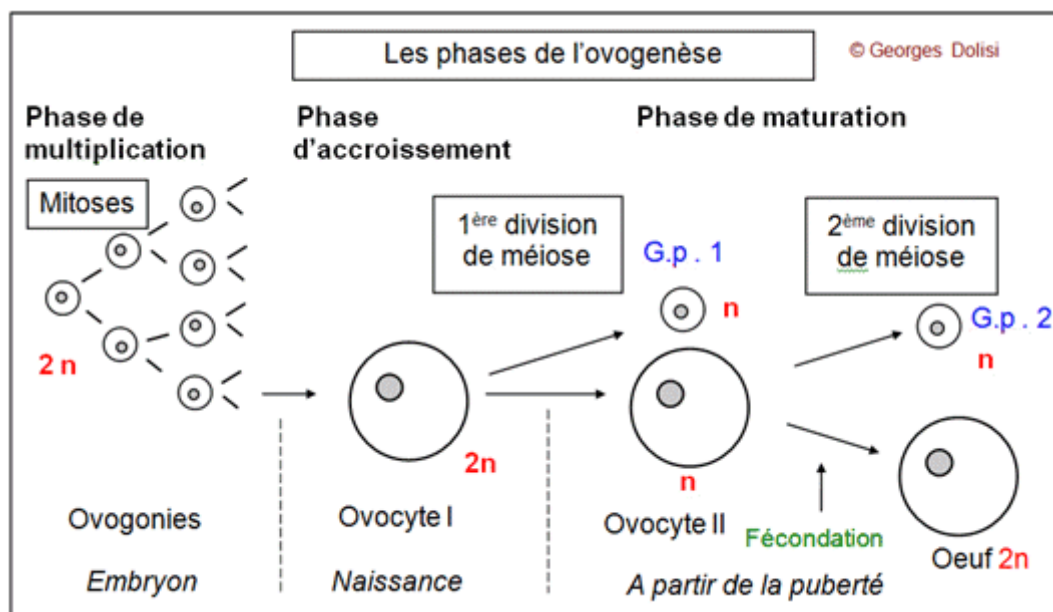


Figure 12: les phase de l'ovogenèse

### III- ACCIDENTS DU CYCLE CELLULAIRE :

Bien entendu, des erreurs peuvent survenir lors de la formation des nouvelles cellules : le processus peut en effet mal se dérouler. Et lorsque ces erreurs mitotiques ou méiotiques surviennent pendant les premières divisions cellulaires d'un zygote, elles peuvent avoir des conséquences particulièrement néfastes.(figure 13)

^^ *Exemples d'erreurs mitotiques :*

#### 1. Phénomène de non-disjonction :

Un chromosome ne se sépare pas pendant l'anaphase. Une cellule fille recevra les deux chromosomes homologues et l'autre n'en recevra aucun. Une des cellules filles aura alors une trisomie et l'autre une monosomie, qui sont des cas d'aneuploïdie.

#### 2. Délétion, translocation, inversion, duplication chromosomale :

La mitose est un processus traumatique. La cellule subit des changements importants dans son ultrastructure, ses organites se désintègrent et se reforment plusieurs heures après, et les chromosomes sont constamment déplacés par les microtubules. Occasionnellement, les chromosomes peuvent être endommagés. Un bras du chromosome peut être cassé et le fragment est alors perdu, causant une délétion. Le fragment peut être incorrectement rattaché à un autre chromosome non homologue, ce qui cause une translocation. Il peut être réattaché au chromosome initial, mais en sens inverse, causant une inversion. Ou encore, il peut être considéré à tort comme un chromosome séparé, causant alors une duplication chromosomale. L'effet de ces anomalies dépend de la nature spécifique de l'erreur.

Parfois il n'y aura aucune conséquence, d'autre fois, cela peut induire un cancer, ou même causer la mort de l'organisme. [6][8]

^^*Exemples d'erreurs méiotiques :*

1- aneuploïdie homogène : accident de ségrégation de la méiose I ou II par non disjonction des chromosomes homologues ou chromatides sœurs

Peut intéresser les autosomes ou les gonosomes

Non viables sauf quelques cas : trisomies 13,18 et 21 ; tri ou tétra ou pentasomie X ou Y ; monosomie X.

2- les anomalies de structures des chromosomes : résultantes d'anomalies de réplication et de réparation d'ADN se déroulant en interphase. Même mécanisme que les anomalies au cours de la mitose.

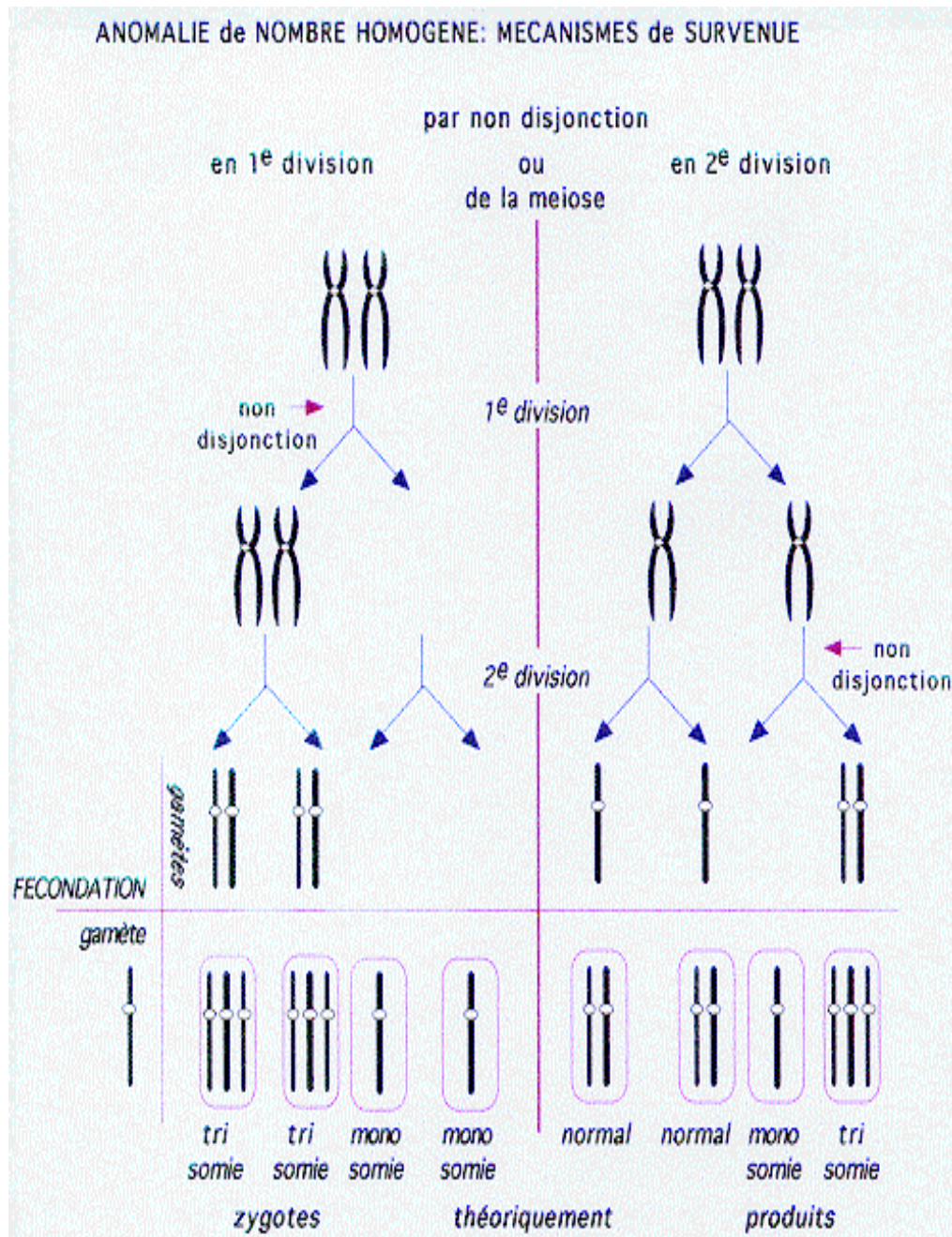


Figure 13

## B- LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET DU CHROMOSOME

Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique est organisé en une structure complexe constituée d'ADN (35%) et de protéines (histones 35% et protéines non histones 10 à 25%) et il est localisé dans un compartiment spécialisé, le noyau. Cette structure a été baptisée chromatine (du grec khroma : couleur et sôma : corps). C'est donc la chromatine qui porte le message héréditaire. [9][10]

Chez l'homme, on estime la longueur de l'ADN à  $3 \cdot 10^9$  paires de bases (un mètre par génome haploïde).

Environ deux mètres d'ADN dans chaque cellule doivent être contenus dans un noyau de quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre. En plus de cet énorme degré de compaction, l'ADN doit être rapidement accessible afin de permettre son interaction avec les machineries protéiques régulant les fonctions de la chromatine : la réplication, la réparation et la recombinaison.

### I- La chromatine

Support de l'information génétique, elle correspond à la substance nucléaire qui fixe les colorants basiques. Dans le noyau interphasique, elle représente un mélange de fibres irrégulières dont le diamètre est variable en fonction du degré d'empilement.

L'unité structurale de la chromatine est le nucléosome et représente le premier niveau de compaction de l'ADN. Cette structure est ensuite régulièrement répétée pour former le nucléofilament qui peut, lui-même, adopter des niveaux d'organisation plus compacts, le niveau de condensation le plus élevé étant atteint au sein du chromosome métaphasique.

A partir d'observation histologiques, il est apparu que la chromatine avait une structure hétérogène faite d'un enchevêtrement de fibres dont le diamètre varie non seulement au cours du cycle cellulaire mais aussi en fonction des régions chromosomiques observées. [10][11]

Au sein du noyau interphasique, la chromatine est organisée en territoires fonctionnels et divisée en :

- euchromatine et
- hétérochromatine. (figure 14)

### 1. L'euchromatine

L'euchromatine peut se présenter sous deux formes :

- ✓ forme active (transcriptionnellement). Elle est alors constituée d'une fibre dont le diamètre est de 10 à 11nm (diamètre du nucléosome).
- ✓ forme inactive. Elle s'enroule en un solénoïde sous la contrainte d'une histone (H1) qui va relier deux nucléosomes consécutifs. Son diamètre est de 30nm. D'autres protéines, non histones interviennent pour replier la fibre de chromatine en boucles.

L'euchromatine est décondensée pendant l'interphase du noyau.

Elle représente la majeure partie du génome et contient les gènes structuraux (gènes codant pour les protéines et les ARN non traduits).

Elle est localisée à l'intérieur du nucléoplasme et représente la forme transcriptionnellement active de l'ADN. [9][10]

### 2. L'hétérochromatine

L'hétérochromatine a été définie comme une structure qui ne change pas d'état de condensation au cours du cycle cellulaire tandis que l'euchromatine apparaît décondensée pendant l'interphase.

L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole tandis que l'euchromatine est répartie à l'intérieur du nucléoplasme.

On distingue :

- l'hétérochromatine constitutive qui contient peu de gènes, formée principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères et des télomères, de
- l'hétérochromatine facultative qui contient des régions codantes pouvant adopter les caractéristiques structurale et fonctionnelle de l'hétérochromatine, comme le chromosome X inactif chez la femelle des mammifères. [10][12]

#### LOCALISATION DE LA CHROMATINE

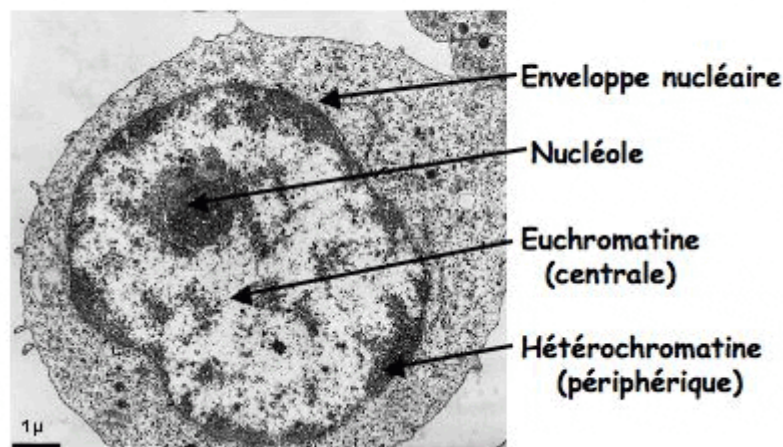


Figure 14

a- *Le nucléosome (figure 15) :*

La microscopie électronique a révélé que la chromatine est constituée de particules régulièrement espacées dont l'aspect rappelle celui d'un "collier de perle", les nucléosomes.

Chaque nucléosome est constitué :

- d'une partie centrale (cœur) : composée de 146 paires de bases (pb) d'ADN enroulés selon environ 1.7 tour autour d'un octamère protéique comprenant les histones H2A, H2B, H3 et H4 en deux exemplaires chacune (octamère d'histones). Cette structure est très conservée parmi les espèces.

- d'une une région de liaison (ou région internucléosomale) qui relie les particules cœurs adjacentes et où les histones se lient à l'ADN. Ces histones sont de types variables et peu conservées parmi les espèces. Elles auraient un rôle dans l'espacement des unités nucléosomales et dans la compaction de l'ADN en créant une région d'interaction entre les nucléosomes adjacents.

La longueur de cette région varie selon l'espèce et le type cellulaire. En conséquence, la longueur d'ADN d'un nucléosome peut varier selon l'espèce entre 160 et 241pb. [10][11]

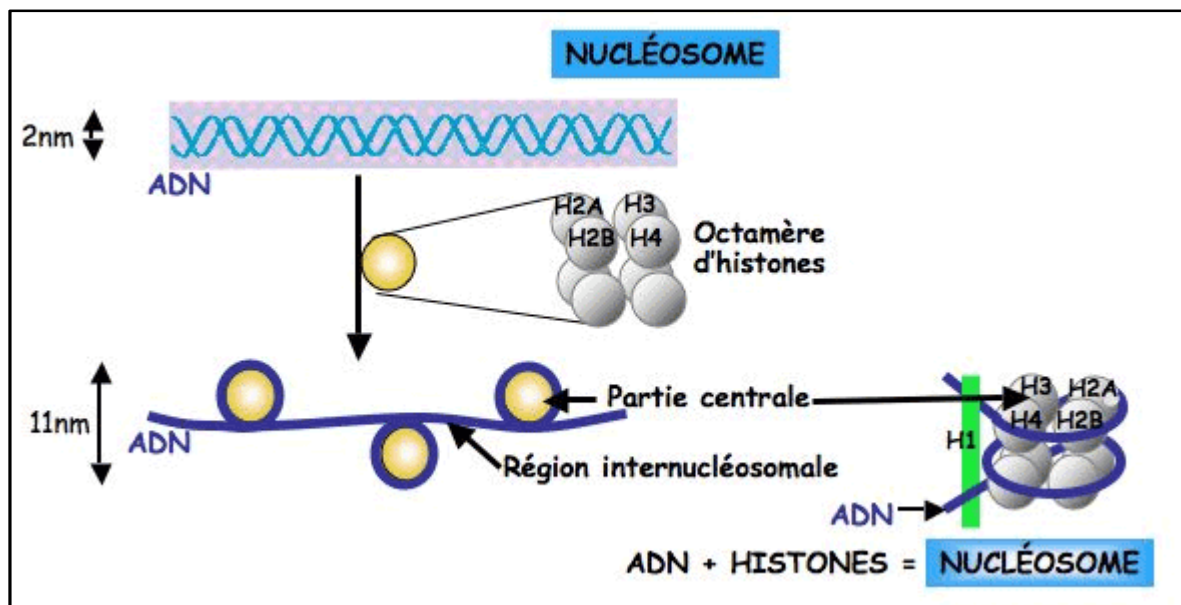


Figure 15 : structure du nucléosome

*b- Les histones*

\* Les histones de la particule coeur

Les histones de la particule coeur, H3, H4, H2A et H2B sont de petites protéines basiques très conservées au cours de l'évolution . La région la plus conservée de ces histones est leur domaine central. En revanche, les extrémités N-terminales de ces histones sont plus variables et sont dépourvues de structure secondaire. Ces extrémités sont particulièrement riches en résidus lysine et arginine et donc très basiques. Elles sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant affecter leurs charges mais aussi l'accessibilité à l'ADN et les interactions protéines/protéines avec le nucléosome.

\* *Les histones internucléosomales*

Les histones internucléosomales H1 sont les protéines qui s'associent à la région d'ADN de liaison entre deux nucléosomes. Contrairement aux histones de la particule cœur, elles sont peu conservées parmi les espèces. Chez les eucaryotes supérieurs, elles sont composées de trois domaines : un domaine globulaire central non polaire, essentiel pour les interactions avec l'ADN, et deux extrémités N- et C-terminales non structurées, hautement basiques, et soumises à des modifications post-traductionnelles. Les histones internucléosomales joueraient un rôle dans l'espacement des unités nucléosomales et dans la compaction de l'ADN au sein du nucléosome en créant une région d'interaction entre les nucléosomes adjacents.

[10][11]

*c- Les protéines non histones*

Constituent une minorité (environ 10%), leur pH est moins basiques que les histones et peuvent exercer des fonctions régulatrices.

*d- Les niveaux de compaction de la chromatine (figure 16)*

L'assemblage de l'ADN en chromatine comprend plusieurs étapes qui commencent par la formation de son unité fondamentale, le nucléosome, et finissent par des niveaux d'organisation supérieurs en domaines spécifiques dans le noyau. (ANNEXE 4A, ANNEXE 4B)

1- Formation du nucléosome : mise en place sur l'ADN d'un tétramère d'histones (H3-H4)<sub>2</sub> auquel s'adjoit deux dimères H2A-H2B. Le nucléosome ainsi formé est composé de 146 pb d'ADN enroulées autour un octamère d'histones.

2- Formation du nucléofilament : étape qui permet un espacement régulier des nucléosomes (11nm de diamètre)

3- Incorporation d'histones internucléosomales : étape qui permet le repliement du nucléofilament en fibre de 30nm. Puis, la chromatine forme successivement des fibres de 300 et 700nm.

Finalement chaque molécule d'ADN a été empaquetée dans un chromosome mitotique 50000 fois plus court que la molécule déroulée.

Les premières étapes de la compaction de l'ADN peuvent avoir une grande incidence sur la structure (repliement) et l'activité finale de la chromatine.

C'est le résultat de modifications au niveau :

- ✓ de l'ADN (exemple : méthylation)
- ✓ des histones (modifications post-transcriptionnelles : acétylation, phosphorylation...)
- ✓ de l'incorporation d'histones internucléosomales et de protéines non-histones. [9][11]

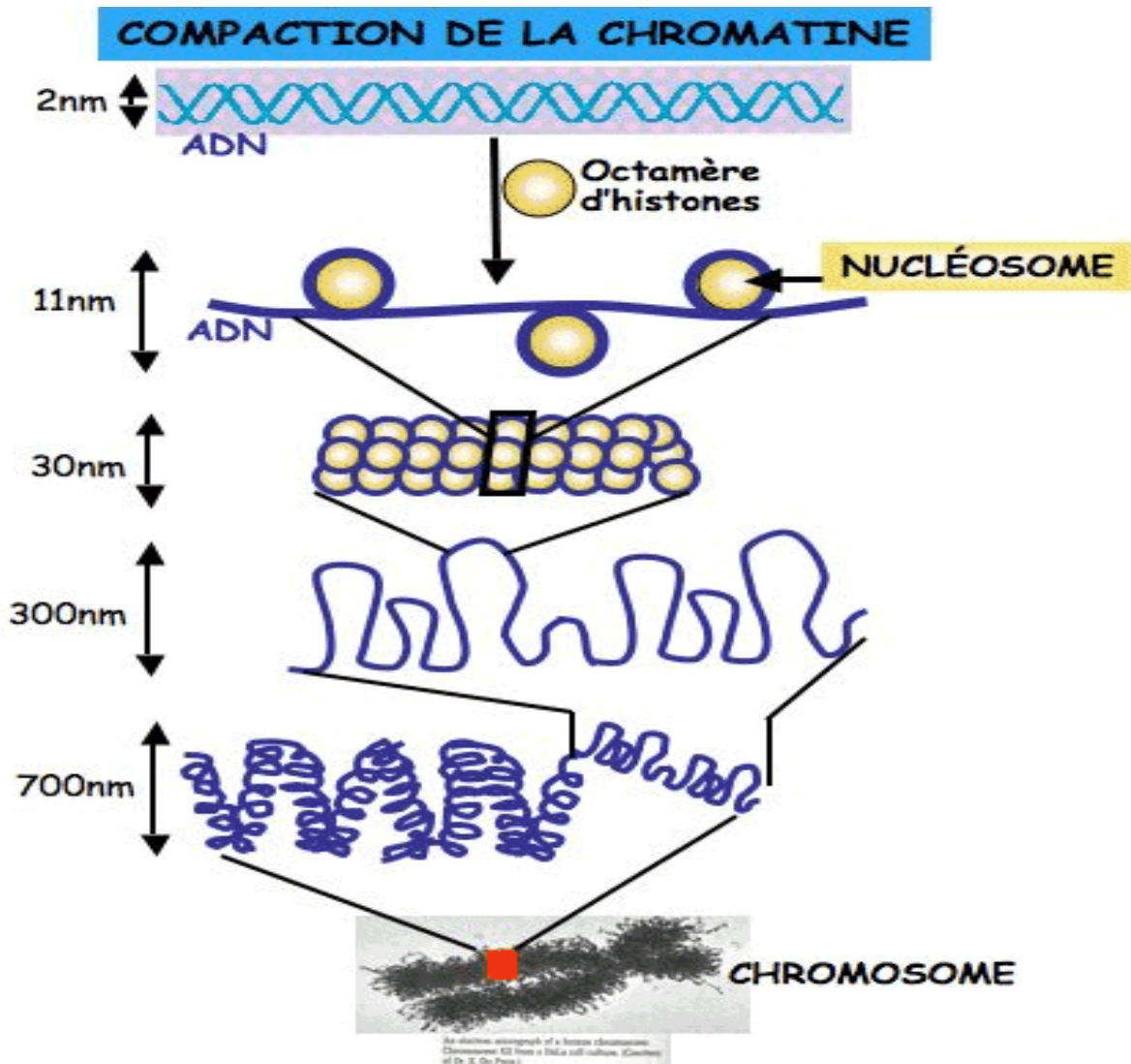


Figure 16 : compaction de la chromatine

## II- Le chromosome

On peut envisager deux états fonctionnels du génome pendant le cycle cellulaire :

- ✓ Un état décondensé pendant l'interphase, où l'ADN est visible en microscopie optique sous la forme de chromatine dans le noyau et permettant l'expression des gènes.

- ✓ Un état condensé au moment de la division, où chaque molécule d'ADN est compactée sous la forme d'un chromosome avec perte provisoire de la fonction transcriptionnelle. De ce point de vue, le chromosome au sens microscopique n'est donc pas un élément stable de la cellule mais une structure dynamique et transitoire.[10][13]

*a- Morphologie du chromosome métaphasique*

Le chromosome métaphasique est visualisé lors de la métaphase de la mitose, meilleur moment d'analyse des chromosomes où la condensation de la chromatine est maximale.

Il est constitué de deux chromatides, chaque chromatide représentant une des deux molécules d'ADN identiques issues de la réplication en phase S. Ces deux chromatides sont étroitement associées au niveau du centromère, qui constitue la constriction primaire du chromosome et correspond à la zone de fixation sur les fibres du fuseau de division. [10][12]

La constriction centromérique est un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court (par convention situé au-dessus du centromère) et un bras long (en-dessous du centromère).

Les extrémités des bras chromosomiques sont des régions possédant une architecture particulière sur le plan moléculaire et sont appelées télomère. Il y a un télomère pour le bras court et un télomère pour le bras long. (figure17)

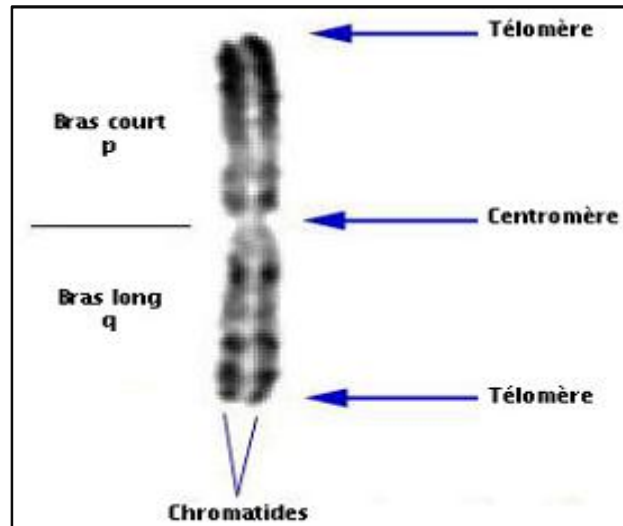


Figure 17 : structure du chromosome métaphasique

En fonction de la taille respective des bras courts et longs, on reconnaît trois groupes morphologiques de chromosomes :

Ø Les chromosomes métacentriques, (figure 18) dont les bras courts et longs sont de taille semblable. L'index centromérique (rapport de la taille du bras court sur la taille du bras court + la taille du bras long) est autour de 0,5.

Exemples : chromosomes 1, 2, 3, 16, 19, 20, X.

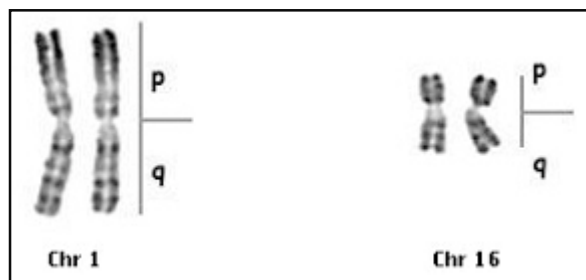


Figure 18

∅ Les chromosomes submétacentriques, (figure 19) dont les bras courts sont franchement plus courts que les bras long. L'index centromérique est très inférieur à 0,5.

Exemples : chromosomes 4, 5, 6 à 12, 17, 18, Y.

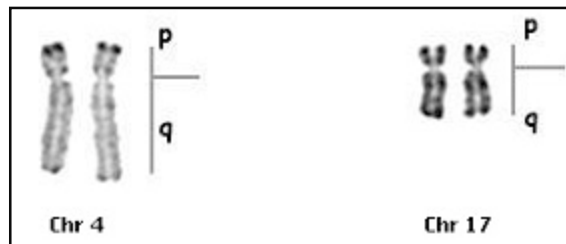


Figure 19

∅ Les chromosomes acrocentriques, (figure 20) dont le bras court est peu ou pas visible. L'index centromérique est proche de 0. La particularité essentielle de ce groupe de chromosomes est qu'ils hébergent les mêmes gènes sur leur bras courts, qui ont tous une structure identique. Il s'agit des gènes responsables de la synthèse des ARN ribosomiques, présents à plusieurs centaines d'exemplaires dans la cellule. Exemple : chromosomes 13, 14, 15, 21, 22.

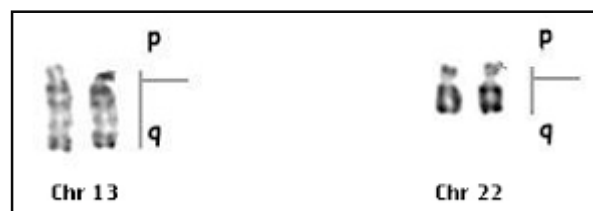


Figure 20

Le nombre et l'aspect général des chromosomes sont caractéristiques de chaque espèce, et sont donc identiques chez tous les individus d'une espèce donnée.

Il existe cependant certaines régions dont la morphologie peut présenter des variations de taille non pathologiques, appelés polymorphismes.

Ces variations sont liées à la présence de séquences répétées en nombre variable, non codantes, ce qui explique l'absence de retentissement clinique.

En dehors de ces zones polymorphes, les régions d'ADN répété non codant qui forment l'hétérochromatine constitutive se retrouvent également au niveau des centromères de tous les chromosomes. (figure 21)

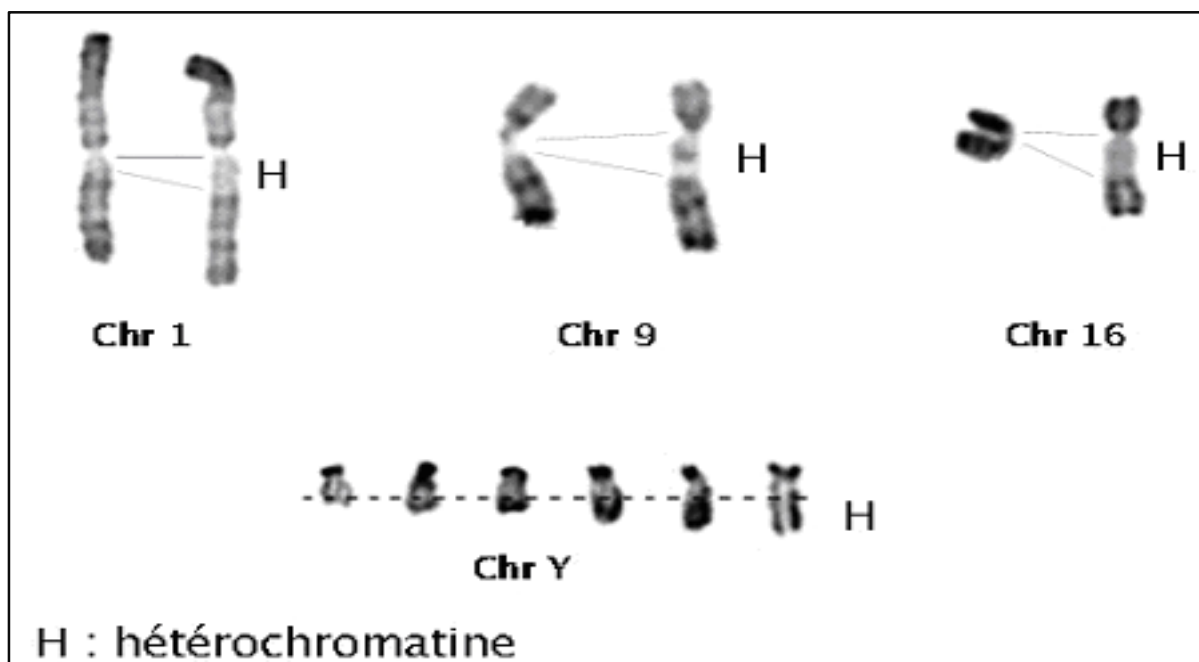


Figure 21

*b- Le centromère*

C'est le site de fixation des microtubules de tubulines formés au cours de la division cellulaire. Cela aboutit à l'alignement correct des chromosomes en métaphase et leur ségrégation correcte au cours de l'anaphase.

La perte de cette structure aboutit à une instabilité chromosomique.

Le domaine centromérique englobe le centromère proprement dit et la région adjacente. Ce domaine est constitué d'ADN satellites (séquences répétées), les plus abondantes sont les séquences alpha-satellites.

NB : la faible homologie des séquences alphoides de deux chromosomes différent est utilisée en FISH via les sondes centromériques. Ceci ne s'applique pas aux chromosomes acrocentriques qui présentent une homologie importante des séquences alphoides ce qui explique leur implications dans les translocations robertsoniennes.

*c- Le télomère*

Localisé à chacune des extrémités de chaque chromatides, il permet le maintien de l'intégrité du chromosome lors des divisions cellulaires.

L'ADN télomérique est riche en séquences répétées en tandem. D'autres séquences moyennement répétées subtélomériques sont riches en cytosine et guanine (CG) constituent un polymorphisme de longueur spécifique de chaque chromosome.

Après 40 à 60 cycles de réplication, la cellule meurt suite au raccourcissement des télomères due la perte de l'activité télomérase à la naissance (sauf au niveau des leucocytes et la moelle osseuse permettant leur régénération continue).

*d- Composition de l'axe protéique du chromosome*

Deux principales protéines sont constitutives du "squelette" interne du chromosome : la Topoisomérase II et les Condensines I et II.

**\*\* La topoisomérase :**

La Topoisomérase est une protéine dont la fonction est de supprimer les super tours au niveau de la molécule d'ADN et de supprimer les nœuds créés par l'activité des différentes enzymes actives au niveau de l'ADN.

La Topoisomérase II a la capacité de couper la molécule d'ADN, de faire passer le brin coupé en dehors de la boucle et de ressouder les deux extrémités. Cette fonctionnalité est essentielle pour permettre une séparation correcte des deux chromatides sœurs pendant l'étape de condensation des chromatides en prophase.

Un déficit en Topoisomérase II se traduit alors par un défaut de condensation des chromosomes, avec pour conséquence une séparation incomplète des deux lots chromosomiques en anaphase et la persistance de masse de chromatine au niveau du plan de division cellulaire. Cette protéine n'est cependant pas un composant fixe de l'axe protéique, elle en constitue au contraire un élément dynamique en renouvellement permanent

**\*\* La condensine**

Le deuxième constituant essentiel de l'axe chromosomique est la Condensine, dont il existe deux sous types, Condensine I et II.

Ces protéines sont en fait des complexes multiprotéiques associant 2 sous unités SMC (SMC2 et SMC 4 pour Structural Maintenance of Chromosome) et 3 sous unités non SMC (CAP H/H2, CAP D2/D3, CAP G/G2). Les deux sous unités SMC s'associent pour former un V porteur d'un site de fixation pour l'ATP à l'extrémité de chacune des deux branches. (Figure 22)

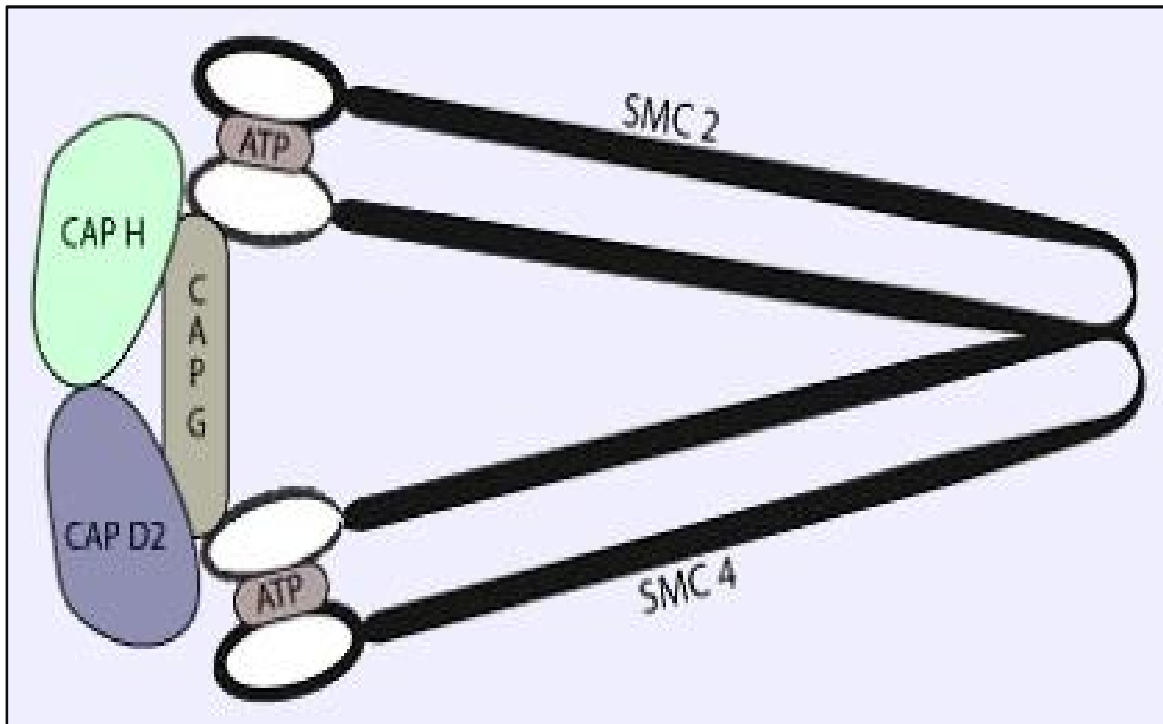


Figure 22 : constituants de la condensine

Les sous-unités non SMC permettent de contrôler l'ouverture de la pince constituée par les deux protéines SMC. Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, les Condensines ont la capacité de se lier à l'ADN et de générer des supertours et des boucles, ce qui entraîne une condensation de la chromatine.

De manière surprenante au regard du rôle présumé des Condensines, leur inactivation n'entraîne pas une abolition de la compaction, qui survient malgré tout mais de façon retardée et incomplète.

Cette compaction imparfaite entraîne cependant une morphologie anormale des chromosomes en raison d'une désorganisation de l'axe protéique des chromatides, ainsi qu'une ségrégation anormale en raison de masses chromatiniennes persistantes au niveau de la plaque équatoriale en fin d'anaphase.

[11][12][13]

CYTOGENETIQUE

CLASSIQUE

## A- INTRODUCTION

La cytogénétique classique est une discipline médicale chargée de l'étude des chromosomes et de leurs anomalies chez l'homme. Elle est basée sur l'analyse de la constitution chromosomique de l'individu représentée sous forme d'un caryotype à la recherche d'anomalies chromosomiques responsables des malformations congénitales, du retard mental, des anomalies de la reproduction et des principaux cancers.

Depuis les premières observations de chromosomes en 1880 par Flemming, la génétique est longtemps restée une science marginale, c'est pourquoi ce n'est qu'en 1956 que le nombre de chromosomes de l'espèce humaine a été correctement établi à 46 par Tjio et Levan, à partir de cultures de tissus, et en ayant eu l'idée d'introduire le choc hypotonique pour améliorer l'étalement des chromosomes.

Les techniques utilisées aujourd'hui pour l'établissement du caryotype classique n'ont que peu évolué par rapport à cette période.

En 1959, a été décrite par Jérôme Lejeune et ses collaborateurs la première anomalie chromosomique liée à une pathologie, la trisomie 21. Elle a été suivie, la même année, par la description par Jacobs et Strong de la première anomalie des chromosomes sexuels, avec une formule XXY, dans le syndrome de Klinefelter.

En 1960, a été établie à Denver la première nomenclature internationale pour la classification des chromosomes, basée sur leur taille et la position de leur centromère.

Les causes des syndromes malformatifs chromosomiques les plus fréquents ont été découvertes très rapidement ensuite : syndrome de Turner, trisomies 13 et 18...

En 1960, a été identifiée aussi, par Nowell et Hungerford, la première anomalie chromosomique dans une affection maligne, donc acquise, le chromosome Philadelphie, initialement décrit comme un 22 délété, dont Rowley a démontré par la suite qu'il était le résultat d'une translocation t(9;22). [3][5][14]

## B- LE CARYOTYPE HUMAIN NORMAL

Le caryotype est la représentation obtenue par microphotographie de l'aspect morphologique de l'ensemble des chromosomes d'une cellule en métaphase. C'est donc la configuration chromosomique d'un sujet.

Etant l'examen clé de la cytogénétique, c'est aussi le seul examen d'analyse globale du génome permettant la détection des anomalies du nombre et de la structure des chromosomes. Cependant, du fait de sa résolution, cette technique ne détecte pas les déséquilibres génomiques inférieurs à 5 mégabases.

La morphologie et le nombre des chromosomes sont constants et caractéristiques de l'espèce considérée. Le caryotype humain normal comprend 46 chromosomes. Il est dit euploïde avec 44 autosomes et deux gonosomes. [10][13]

### 1- Principe et technique d'obtention du caryotype métaphasique (Annexe : protocole technique)

Les chromosomes ne sont visibles que pendant une courte période du cycle cellulaire, lors de la division cellulaire (*mitose* ou *méiose*). Toutes les techniques cytogénétiques visent donc à obtenir un maximum de cellules bloquées à ce stade.

a- Culture cellulaire

Pour cela, il est nécessaire d'avoir des cellules en phase de multiplication active, soit spontanément (cas des *villosités choriales* ou de certaines cellules tumorales), soit par une culture préalable le plus souvent (fibroblastes, tout type cellulaire capable de se diviser) parfois associée à une stimulation (lymphocytes sanguins).

La durée de cette culture est variable en fonction du type cellulaire considéré et de la quantité de matériel biologique disponible au départ :

\*\* les lymphocytes sanguines (cellules les plus utilisées) : le sang total recueilli stérilement sur un tube hépariné est incubé 48 à 72heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (phytohémagglutinine) ainsi que des antibiotiques pour éviter la pullulation microbienne.

\*\* les fibroblastes : obtenues après biopsie cutanée le plus souvent nécessitant une culture cellulaire de une à trois semaines.

\*\* Les cellules de la moelle osseuse : une culture de 24 à 48heures en fonction de la pathologie étudiée.

\*\* Le caryotype foetal réalisable sur :

- Cellules amniotiques : culture de 10 à 15jours
- Cellule du trophoblaste
- Cellule fœtales en circulation
- Villosités choriales : ne nécessitant pas de culture.

b- Blocage des cellules en métaphase

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division (classiquement c'est la Colchicine qui est utilisée ou son équivalent synthétique la

Colcémide) qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des tubulines dans les microtubules.

c- Choc hypotonique

Les cellules sont alors plongées dans une solution hypotonique ce qui entraîne leur gonflement suivi de l'éclatement de membrane nucléaire et la dispersion des chromosomes. Cette étape est indispensable à l'obtention d'un étalement correct des chromosomes.

d- Fixations/ Etalement

Enfin, la dernière étape consiste en une fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique. Cette acidification du milieu permet l'arrêt du choc cellulaire. La répétition des fixations élimine les débris cellulaires avec un bon lavage des lymphocytes.

La préparation est alors étalée en laissant tomber quelques gouttes de la suspension cellulaire sur une lame propre.

Cas particulier : certains types cellulaires comme les fibroblastes adhèrent au support lors de la culture. On peut obtenir des métaphases à partir de ces cellules sans les détacher de leur support, toutes les étapes précédentes étant réalisées directement sur la surface de culture (sauf l'étalement qui est bien sûr inutile dans ce cas).

e- Vieillissement des lames

Les lames étalées sont séchées à l'air libre puis remises à l'étuve à 37°C pour parfaire la fixation et permettre une meilleure dénaturation.

f- Dénaturation /Coloration

Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur

longueur. On ne peut donc les distinguer les uns des autres que par leur taille et leur forme. Cependant, ces critères sont insuffisants pour assurer la reconnaissance et l'interprétation correcte des anomalies chromosomiques.

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration inhomogène des chromosomes par le Giemsa et l'apparition de bandes. C'est la succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez tous les individus pour un chromosome donné, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un code à barres.

Il existe deux principales techniques de marquage en bandes des chromosomes (banding), utilisées en routine :

Les *bandes G*, obtenues par digestion trypsinique modérée des chromosomes. Elles sont les plus utilisées en raison de leur facilité d'obtention

Les *bandes R*, obtenues par dénaturation thermique ménagée.

Dans les deux cas, les bandes ne deviennent visibles qu'après une coloration avec le Giemsa. Ces deux techniques donnent un marquage réciproque, c'est-à-dire que là où l'on obtient une bande sombre avec l'une des deux techniques, on observe une bande claire avec l'autre.

D'autres techniques de marquage complémentaires existent qui permettent d'analyser certaines régions particulières du *génome* :

**Bandes C** : cette coloration par le Sulfate de Baryum permet de mettre en évidence l'hétérochromatine constitutive, qui correspond à des régions non codantes du génome comme les régions centromériques (1, 9, 16, Yq).

**Bandes Q** : obtenues après coloration par la moutarde de Quinacrine. Sous UV les chromosomes présentent des bandes fluorescentes, de même que les bandes G.

*NOR* : cette technique consiste en un dépôt de nitrate d'argent qui met en évidence les organisateurs nucléolaires. Ces structures correspondent aux régions du génome contenant les *gènes* qui codent pour les *ribosomes*.

Bandes T : une dénaturation thermique poussée ne laisse persister le marquage qu'au niveau des télomères. [12][13]

## 2- Classement des chromosomes métaphasiques : le caryotype

### a- Structure du chromosome métaphasique

Les chromosomes métaphasiques sont constitués d'un bras court (noté p) et d'un bras long (noté q), reliés entre eux par le centromère qui correspond à un étranglement situé à un niveau variable du chromosome et qui sert de point d'attache au fuseau de division pendant la division cellulaire. (Figure 23) [14]

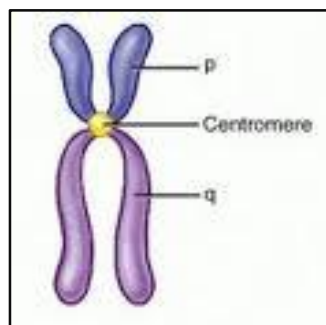


Figure23 : chromosome métaphasique

### b- Critères de classement des chromosomes

Plusieurs critères vont permettre de reconnaître et de classer les chromosomes :

- la taille

Par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit.

- l'index centromérique (IC), c'est-à-dire le rapport entre la taille du bras court et la taille totale du chromosome ( $p/p+q$ ) (figure 24)

Cet index permet de reconnaître trois familles de chromosomes :

- ✓ Les chromosomes métacentriques dont les deux bras ont une taille à peu près équivalente ( $IC = 1/2$ ) : centromère au milieu (chromosomes 1, 3, 16, 19 et 20).
- ✓ Les chromosomes submétacentriques qui ont un bras franchement plus petit que le bras long ( $IC \approx 0$ ) : centromère terminal (13, 14, 15, 21, 22)
- ✓ Les chromosomes acrocentriques dont le bras court est quasi inexistant ( $0 < IC < (1/2)$ ) : centromère en position intermédiaire

NB : on ne trouve sur ces bras courts que les gènes codant pour les ribosomes ; ces gènes étant présents à plusieurs centaines d'exemplaires double génome, la perte du bras court d'un chromosome acrocentrique n'a pas de conséquence clinique. [15]

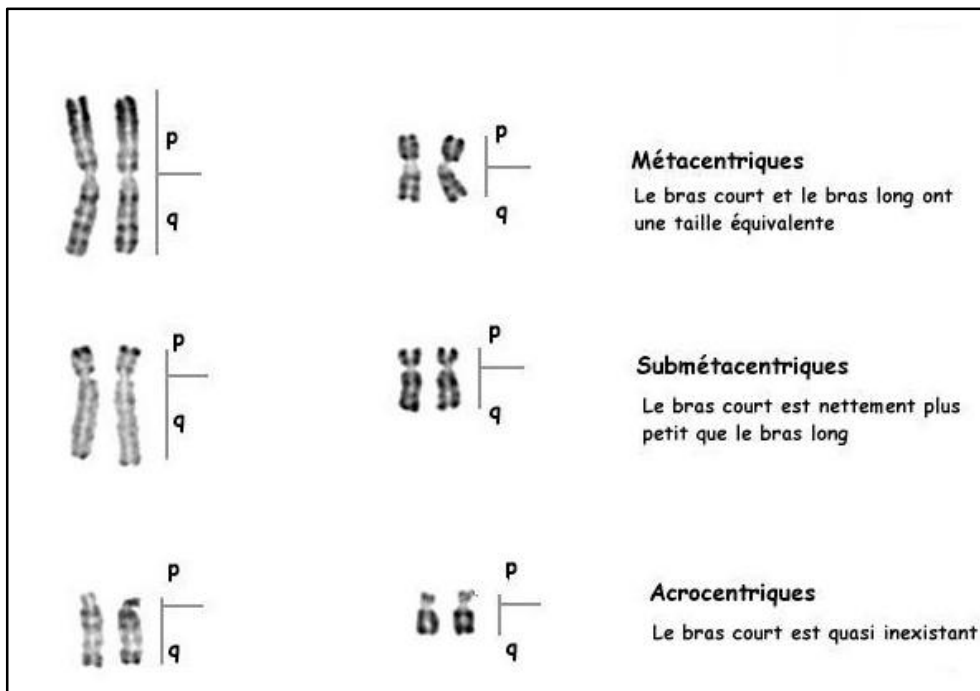


Figure 24: morphologie des chromosomes en fonction de l'index centromérique

En fonction de la taille et de la position du centromère, les chromosomes sont classés en 7 groupes :

- ✓ Le groupe A : Les grands médians et submédians 1, 2, 3.
- ✓ Le groupe B : Les grands distaux 4, 5.
- ✓ Le groupe C : Les médians et submédians moyens 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et X.
- ✓ Le groupe D : Les grands acrocentriques 13, 14 et 15.
- ✓ Le groupe E : Les petits submédians 16, 17 et 18.
- ✓ Le groupe F : Les petits médians 19, 20.
- ✓ Le groupe G : Les petits acrocentriques 21, 22 et Y.

- Les bandes chromosomiques, qui sont caractéristiques de chacune des paires. Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome. Plus les chromosomes sont condensés, moins on peut observer de bandes et moins l'analyse permet de dépister des anomalies de petite taille.

Le nombre de bandes par lot haploïde (c'est-à-dire pour 23 chromosomes) permet de définir la résolution de l'analyse cytogénétique ;

un caryotype standard a une résolution de 300 à 550 bandes ; certaines techniques dites de haute résolution permettent d'augmenter le nombre de bandes visualisées en bloquant les chromosomes au tout début de leur condensation (en prométaphase) : on peut ainsi obtenir 800 ou même 1000 bandes par lot haploïde.

Ces techniques de haute résolution sont de réalisation et d'interprétation plus délicates que le caryotype standard, mais permettent la mise en évidence d'anomalies de taille beaucoup plus réduite. [14][15]

c- Nomenclature :

La formule chromosomique normale de l'homme : 46, XY.

La formule chromosomique normale de la femme : 46, XX.

- Chaque bras chromosomique est divisé en régions numérotées de 1 à 3, chaque région est divisée en bandes numérotées, et certaines bandes en sous bandes.
- Donc pour la précision d'une zone sur un chromosome, on utilise : le numéro du chromosome, bras court ou bras long, région, bande, sous bande.

Exp. : Xq27,3 : bras long du ch.X, région2, bande 7, sous bande 3. [12]

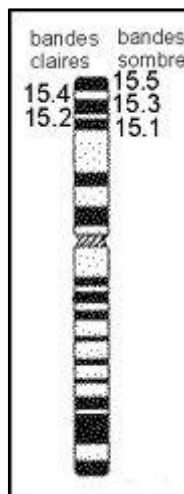


Figure 25: Banding du chromosome 11

3- Indications du caryotype métaphasique

A - Période néonatale :

- Antécédents d'anomalies chromosomiques.
- Anomalie chromosomique de structure équilibrée chez un parent.
- Age maternel avancé.
- Signes d'appel échographiques.

- Risque élevé aux tests sériques.
- diagnostic du sexe dans les maladies récessives liées à l'X
- instabilité chromosomique.

#### B- Le nouveau-né et l'enfant :

- Ambiguïté sexuelle.
- Polymalformations.
- Retard mental.
- Dysmorphie (surtout avec retard mental).
- Retard de croissance chez une fille.
- Impubérisme.
- maladies cassantes.
- Leucémies.

#### C - L'adulte :

- Aménorrhée, anomalies du spermogramme.
- Hypogonadisme d'origine basse.
- Maladie abortive.
- Leucémies.
- Bilan d'une procréation médicalement assistée PMA. [13]

## 4- Techniques particulières

### a- Le caryotype de haute résolution

L'étude des cellules en prométaphase (fin de prophase ou début de métaphase) par synchronisation des cultures associée à l'incorporation d'analogues de bases (bromodésoxyuridine ou BrdU) qui modifient les propriétés tinctoriales des

bandes chromosomiques, permet d'améliorer la résolution du caryotype et d'observer 800 à 1000 bandes par lot haploïde de chromosomes.

Des remaniements chromosomiques plus fins peuvent être observés mais l'interprétation est délicate et plus efficace si elle est focalisée sur un chromosome ou une région chromosomique donnée.

Cet examen est tjrs demandé en deuxième intention après un caryotype standard.

Son indication est posée dans deux situations principales :

\*\* préciser les points de cassure d'un remaniement dépisté sur un caryotype standard

\*\* rechercher un microremaniement quand la clinique évoque très fortement l'existence d'une anomalie chromosomique alors que le caryotype standard est normal. [11]

#### b- Instabilité chromosomique

##### \*\* Anémie de Fanconi (AF)

L'hypersensibilité cellulaire aux agents pontant l'ADN est à la base du diagnostic biologique et le test de cassures chromosomiques reste indispensable pour affirmer un diagnostic d'AF.

On recherche l'existence de cassures chromosomiques spontanées et, surtout, l'augmentation du nombre de ces cassures après exposition à un agent dit « cassant » : caryolysine, cyclophosphamide,...

Certaines figures chromosomiques, dont l'apparition est secondaire aux cassures : figures tri-radiales et tétra-radiales, sont aussi caractéristiques pour le cytogénéticien.

De façon rare, ce test de cassure peut être normal dans le sang du fait d'une réversion génétique (mosaïcisme somatique). Plus récemment un nouveau test diagnostique, dont la mise au point a été possible grâce à la compréhension de la voie Fanconi, a montré son intérêt : le test FancD2. Il se fait sur les lymphocytes du sang mais aussi sur les fibroblastes obtenus après biopsie de peau ; cette dernière approche permet le diagnostic des formes avec réversion génétique. [10]

#### \*\* Syndrome de Bloom

Le syndrome de Bloom se caractérise par un retard de croissance pré et post-natal ainsi que par des érythèmes survenant le plus souvent au visage lors de l'exposition au soleil. Le diabète et les infections pulmonaires ou auriculaires sont fréquents. Les garçons sont stériles et les filles présentent une ménopause précoce. Des troubles de l'apprentissage sont habituels. Les individus atteints de ce syndrome ont une incidence de cancer très élevée ce qui constitue la principale cause de mortalité. Ces cancers surviennent précocement.

Le diagnostic est posé par l'identification d'une augmentation du taux d'échange entre les chromatides sœurs en comparaison avec des cellules normales lors de l'exposition à la bromodésoxyuridine. Cette anomalie ne survient que chez les individus porteurs du syndrome de Bloom et constitue l'unique moyen de faire le diagnostic. [12][14]

#### \*\* Ataxie-Télangiectasie

Elle se caractérise par une ataxie cérébelleuse progressive survenant entre un et quatre ans, une apraxie oculomotrice, des infections fréquentes secondaires à un déficit immunitaire surtout humoral, une chorée-athétose, des télangiectasies apparaissant tardivement mais surtout évidentes au niveau de la conjonctive et une augmentation du risque de cancer, surtout de leucémie et de lymphome.

Le diagnostic de cette maladie est facile en raison d'une augmentation quasi systématique de l'alpha-fœtoprotéine au-dessus de 10 ng/ml (ainsi qu'un déficit en IgA et E).

La cytogénétique de l'ataxie télangiectasie est absolument caractéristique de cette maladie avec de nombreuses cassures chromosomiques équilibrées et deux tiers de ces remaniements n'impliquent que les chromosomes 7 et/ou 14. [17]

## C- LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

### 1- Introduction

On appelle anomalie chromosomique tout remaniement du nombre ou de la structure des chromosomes.

∅ Ces remaniements peuvent s'observer de manière :

\*\* Constitutionnelle : les différents organes ont la même anomalie. L'accident chromosomique existait déjà chez l'embryon ; il s'est produit avant la fécondation, dans l'un des gamètes, ou peu après, dans une des cellules du zygote, ou,

\*\* acquise : un seul organe est touché, les autres organes sont normaux. L'accident chromosomique s'est produit au cours de la vie de l'individu ; il est acquis par rapport au caryotype constitutionnel. Le sujet est porteur d'un processus cancéreux sur l'organe impliqué. (Ils ne sont observés alors qu'au niveau des cellules tumorales).

∅ Ils résultent d'un accident survenant soit au cours de la *méiose*, soit au cours d'une *mitose*. Ils peuvent impliquer un ou plusieurs chromosomes.

- ∅ On reconnaît par ailleurs les anomalies dites homogènes (quand toutes les cellules examinées portent l'anomalie) et les anomalies en mosaïque (quand une fraction seulement des cellules est anormale : notion de clone).
- ∅ Leurs conséquences sont variables en fonction du remaniement considéré. En règle générale, les remaniements dits équilibrés (c'est-à-dire sans perte ni gain de matériel génétique) n'ont habituellement pas de conséquence pour le sujet porteur alors que les remaniements déséquilibrés se traduisent par des manifestations cliniques d'autant plus graves que la perte ou le gain de matériel est plus important.(figure 26) [15]

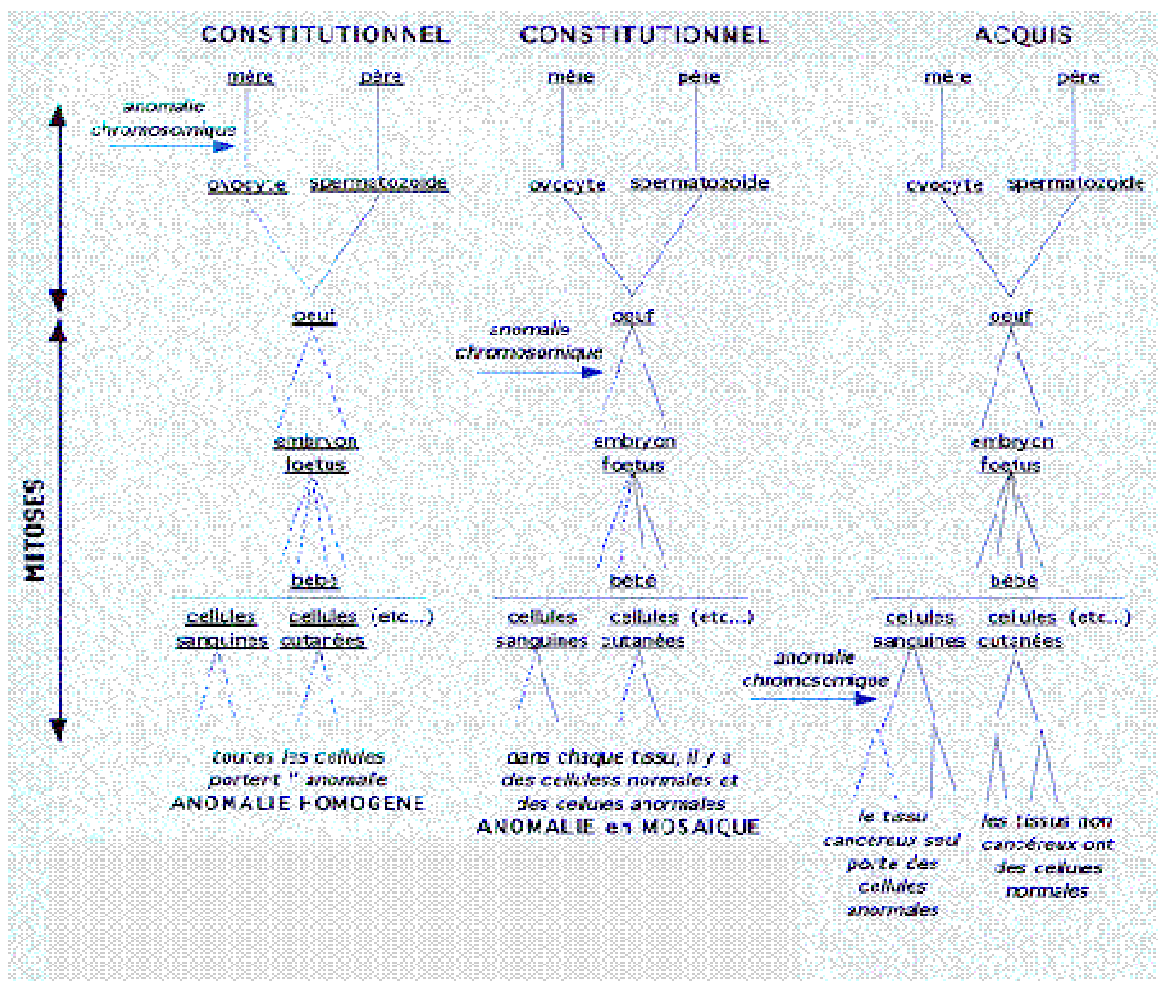


Figure 26: anomalies chromosomiques:constitutionnel/acquis;homogène/mosaïque

## 2- Incidence

Il existe une très forte sélection de la conception à la naissance :

n 60% des fausses couches spontanées sont dues à des anomalies chromosomiques.

n 5% des fausses couches tardives, morts fœtales in utéro et morts nés.

n 0.6% des naissances vivantes

Dans les hémopathies malignes :

n Leucémie myéloïde chronique : 95%

n Leucémie aigue lymphoïde : 70 à 80%

n Leucémie aigue myéloïde : 50%

## 3- Anomalies de nombre

### a- L'aneuploïdie

Une cellule aneuploïde est une cellule qui possède un nombre anormal de chromosomes par perte d'un chromosome entier ou présence d'un ou plusieurs chromosomes surnuméraires.

Elles résultent d'une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire, les deux chromosomes d'une même paire migrant tous les deux vers la même cellule fille. On obtient une cellule fille avec trois copies du même chromosome (soit 47 chromosomes) et une deuxième cellule fille avec une seule copie (soit 45 chromosomes).

Ces malségrégations peuvent s'observer aussi bien au cours de la mitose que de l'une des deux divisions de méiose. [15][18]

\*\* Aneuploidie homogène : Accident de ségrégation par non disjonction en meiose I ou II, toutes ne sont pas compatibles avec la vie. (figure 27)

- Une non disjonction en première division produit 4 gamètes déséquilibrés.
- Une non disjonction en deuxième division produit 2 gamètes déséquilibrés et 2 gamètes normaux.

Après fécondation :

- Les gamètes possédant un autosome en excès produisent un zygote trisomique : de nombreuses trisomies ne sont pas viables et involuent très précocement, ou sous forme de fausses couches spontanées (trisomie 16 par exemple). D'autres sont plus ou moins viables : trisomies 21, 13, 18, 8.
- Les gamètes nullosomiques produisent des monosomies. Les monosomies, bien que produites en nombre théoriquement égal aux trisomies, subissent une élimination précoce encore plus stricte.
- Pour les gonosomes, la viabilité des conceptus déséquilibrés est plus grande, et le phénomène de non disjonction apparaît alors, dans la grande variété de ses conséquences : trisomie X et Y, monosomie X, tétra et pentasomie Y sont viables.

Il ne s'agit pas d'un événement rare, mais d'un phénomène très fréquent, compensé le plus souvent par l'élimination précoce du conceptus déséquilibré. Les malségrégations méiotiques sont habituellement accidentelles, mais elles sont favorisées par l'accroissement de l'âge maternel et par l'existence de certains remaniements chromosomiques chez l'un des parents. [18]



Les trisomies en mosaïque sont viables par opposition aux monosomies qui ne le sont pas.

Les aneuploïdies en mosaïque des gonosomes sont viables vu l'inactivation du chromosome X et le faible contenu en gènes du chromosome Y. [16]

b- La polyploïdie

Une cellule polyploïde renferme un multiple de lots haploïdes de chromosomes.

C'est accident survenant en général lors de la fécondation plus rarement lors de la gamétogénèse

Ces accidents de la fécondation sont donc banals et sont estimés à 2 à 3 % des œufs fécondés. [10][12]

- Triploïdies le plus souvent :  $3N = 69$  chromosomes 69, XXX ou 69, XXY ou 69, XYY. Présentes dans 20 % des fausses couches spontanées, elles peuvent aboutir à la naissance d'enfants vivants, qui meurent cependant très rapidement.

Le mécanisme de formation des triploïdies est double : (figure 27)

1. la digynie(B) : non expulsion du 2ème globule polaire. ( $N_{\text{paternel}} + 2N_{\text{maternel}}$ )
2. la diandrie : fécondation d'un ovocyte I par 2 spermatozoïdes normaux : dispermie(A) ; ou d'un ovocyte I par un spermatozoïde diploïde : diplospemie(C). ( $N_{\text{maternel}} + 2N_{\text{paternel}}$ ).

La diandrie est 4 fois plus fréquente que la digynie.

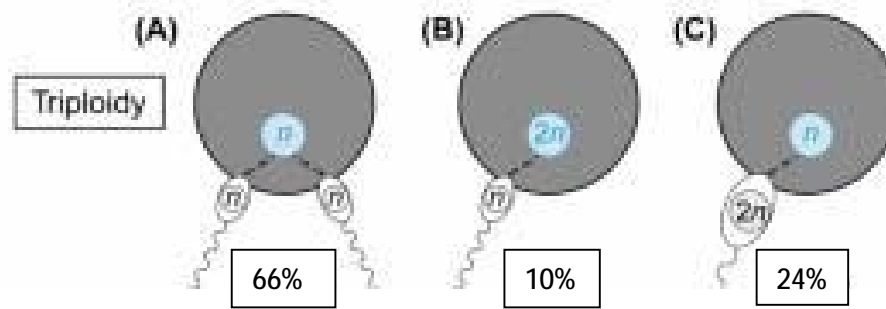


Figure 27: mécanisme de la triploidie

- Tétraploïdies :  $4N = 92$  chromosomes (très rares naissances vivantes décrites, rapidement fatales). Présentes dans 6 % des fausses couches spontanées.

#### c- Nomenclature

Selon la nomenclature de l'ISCN, pour le caryotype anormal, on indique successivement :

- le nombre total de chromosomes (autosomes et gonosomes ou sexuels)
- une virgule
- les chromosomes sexuels
- une virgule
- le signe + pour le chromosome surnuméraire, ou le signe - pour le chromosome manquant
- et enfin, le numéro du chromosome surnuméraire ou manquant.

Exemple : trisomie 21 chez une fille s'écrit : (47,XX,+21). Monosomie 21 chez un garçon s'écrit : (45,XY,-21).

∅ Quand il s'agit d'une aberration portant sur les chromosomes sexuels, on indique :

- le nombre total de chromosomes (autosomes et gonosomes ou sexuels)
- une virgule
- les chromosomes sexuels

Exemple : monosomie X (syndrome de Turner) s'écrit : (45,X) ; syndrome Klinefelter (47,XXY).

∅ Pour la polyploïdie, on indique :

- le nombre total de chromosomes (autosomes et gonosomes ou sexuels)
- une virgule
- les chromosomes sexuels.

Exemple : triploïdie (69,XXY) ou (69,XXX)... Tétraploïdie (92,XXXY) ou (92,XXXX)...

∅ Pour la mosaïque on indique les différentes populations cellulaires séparées par (/).

Exemple : (45,X/46,XX) soit (mos 45,X/46,XX) ; (45,X/46,XX/47,XXX) soit (mos 45,X/46,XX/47,XXX)...

#### 4- Anomalies de structure

Les anomalies de structure sont le résultat de cassures des chromosomes durant la méiose suivies de recollement anormale. (Annexe5)

Ces anomalies sont aléatoires mais il existe des sites préférentiels (anomalies récurrentes).

Une délétion, une duplication ou la formation d'un isochromosome se traduiront par un phénotype anormal, il s'agit d'anomalies déséquilibrées tandis que l'insertion, l'inversion, ainsi que la translocation peuvent être équilibrées. Ceci signifie que les porteurs de ces anomalies de structures sont phénotypiquement sains, car la totalité du matériel génétique est présente.

Ces réarrangements peuvent porter sur un seul ou plusieurs chromosomes et peuvent être transmises (anomalie familiale) ou de novo. [13][16]

a- Aberrations portant sur un seul chromosome

a-1 *Délétion*

Une délétion résulte d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminal) ou de deux cassures sur le même bras avec perte du segment intercalaire (délétion interstitielle ou intercalaire). (Figure 28)

Une délétion est une anomalie déséquilibrée qui entraîne une « monosomie partielle » par perte des gènes portés sur le segment délété.

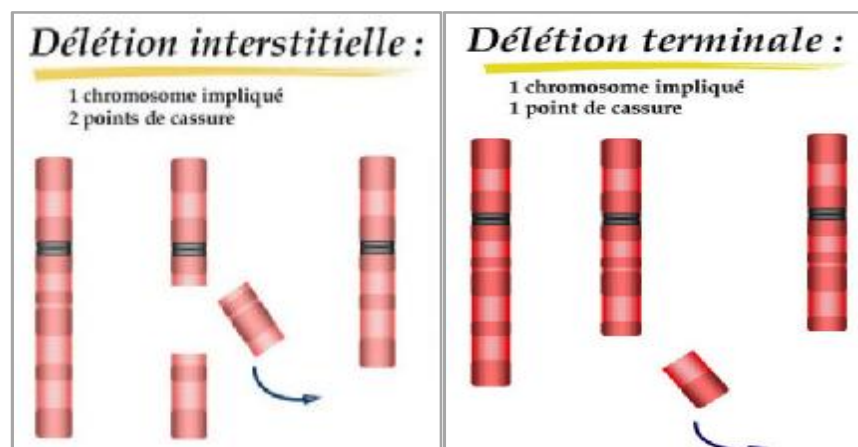


Figure 28 : Types de délétions

Selon l'ISCN, la délétion est noté del, suivi du numéro du chromosome dans une première parenthèse, suivi dans une deuxième parenthèse des 2 points de cassure indiquant la région délétée (délétion interstitielle). Dans le cas où la délétion semble terminale, un seul point de cassure est noté.

#### Cas particuliers : les microdélétions

Il s'agit, comme leur nom le suggère, d'une catégorie particulière de délétions de toute petite taille dont la caractéristique principale est de ne pas être visible sur le caryotype standard.

Ces pertes de matériel chromosomique concernent en effet au plus une sous-bande chromosomique et ne sont dépistées qu'avec les techniques de haute résolution ou actuellement par hybridation in situ fluorescente avec des sondes moléculaires spécifiques. Cette dernière approche est à la fois plus sensible et plus spécifique que le caryotype haute résolution, mais elle n'est applicable que quand la clinique est suffisamment évocatrice de tel ou tel syndrome pour orienter le choix de la région chromosomique à explorer et donc de la sonde à utiliser. [12]

#### *a-2 Inversion*

Une inversion résulte de deux cassures sur un même chromosome suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire.

L'inversion est paracentrique si les points de cassure sont localisés sur un même bras.

L'inversion est péricentrique si les points de cassure sont localisés de part et d'autres du centromère. (Figure 29)

L'inversion est une anomalie équilibrée mais entraîne des difficultés d'appariement lors de la méiose. [13]

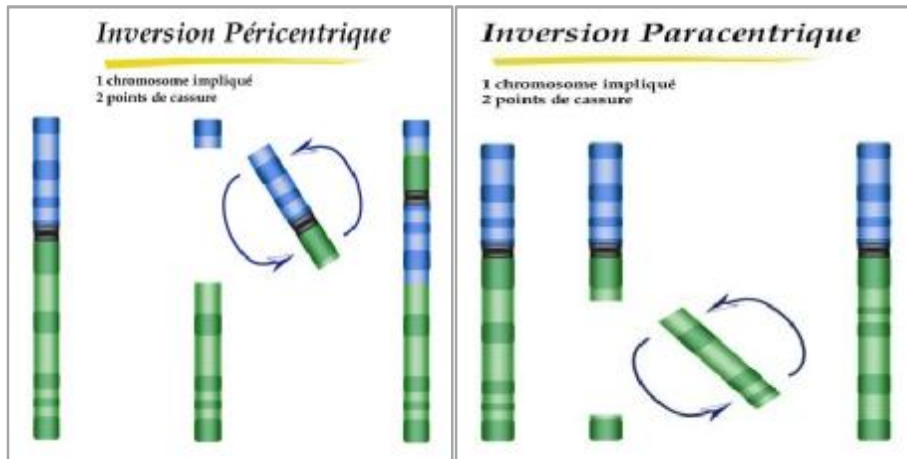


Figure 29 : types d'inversions

Selon l'ISCN, l'inversion est notée inv, suivi du numéro du chromosome dans une parenthèse, suivi d'une autre parenthèse indiquant les points de cassure. Ex : inv(9) (p11q13).

### *a-3 Duplication*

Une duplication se définit comme la répétition une ou deux fois d'un segment de chromosome.

Le segment dupliqué peut être :

Dans la même orientation que le segment d'origine, c'est une duplication directe « en tandem »

Inversé à 180° par rapport au segment d'origine, c'est une duplication indirecte « en miroir » (figure30)

La duplication est une anomalie chromosomique déséquilibrée. [12]

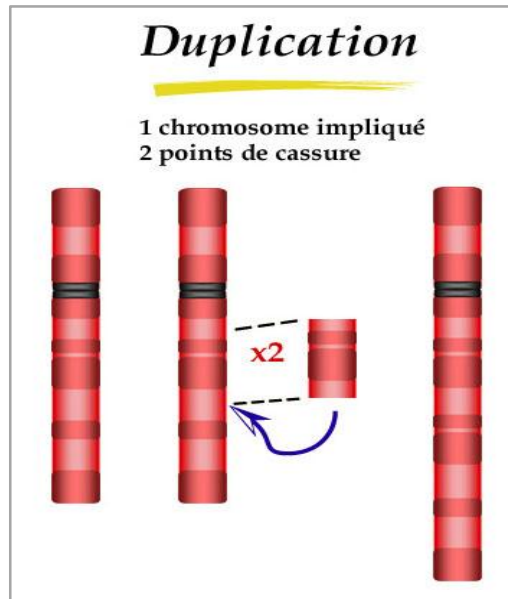
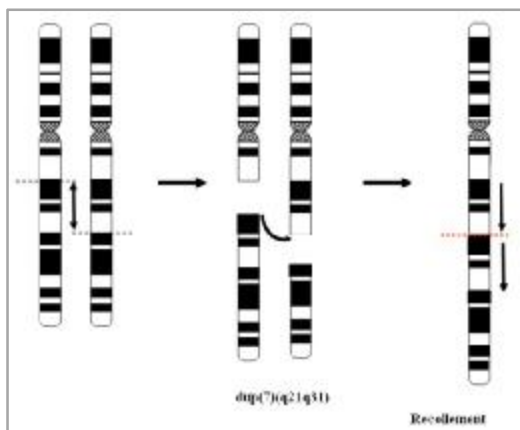
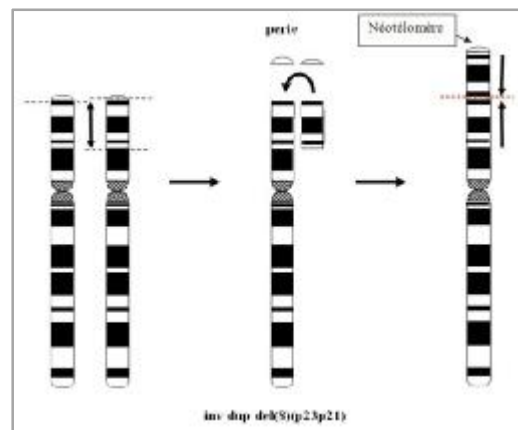


Figure 30 : mécanismes de la duplication



Duplication en tandem



Duplication en miroir

Selon l'ISCN, une duplication est notée dup, suivi du numéro du chromosome dans une première parenthèse, suivi dans une deuxième parenthèse des 2 points de cassure indiquant la région dupliquée.

*a-4 Isochromosome*

Un isochromosome est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec pert de l'autre bras. Donc équivalent d'une monosomie pour un bras et d'une trisomie pour l'autre: remaniement déséquilibré

Fréquence de ce réarrangement sur le chromosome X (syndrome de Turner par  $i(Xq)$ ).

Fréquent en tant qu'anomalie acquise (exemple:  $i(17q)$ , anomalie secondaire de la leucémie myéloïde chronique).

Il peut avoir un centromère (monocentrique) ou deux centromères (dicentrique) selon le mécanisme de formation.(figure 31) [12]

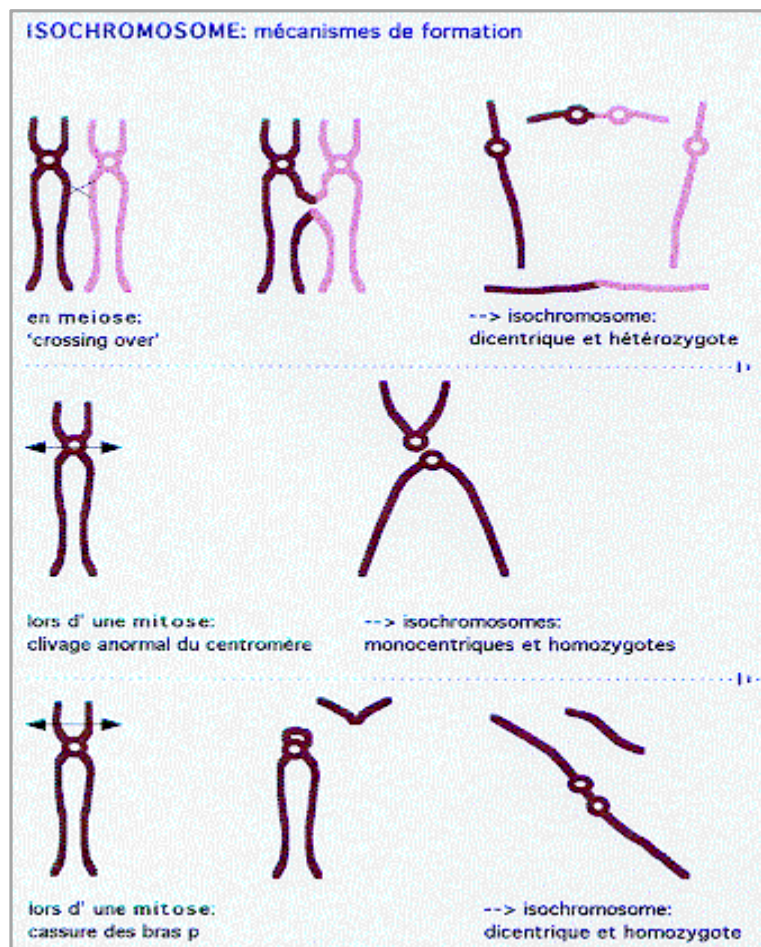


Figure31 : isochromosome, mécanisme de formation

Selon l'ISCN, l'isochromosome est noté i suivi d'une parenthèse indiquant le numéro du chromosome impliqué et la lettre du bras dupliqué (ex: i(17q) ou i(17)(q10): perte du bras p et duplication du bras q).

#### *a-5 chromosome en anneau*

Un chromosome en anneau correspond à des délétions plus ou moins étendues (souvent peu importantes) aux deux extrémités d'un chromosome et recollement du segment intermédiaire (par absence de télomères), ce qui aboutit à une structure annulaire .(figure 32)

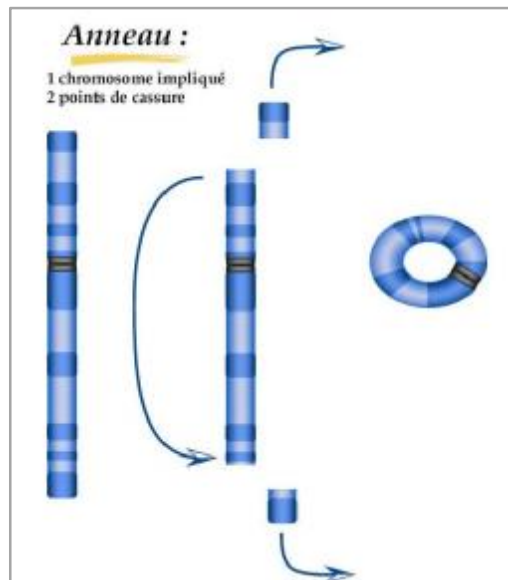


Figure 32 : mécanisme du chromosome en anneau

NB : il existe également des anneaux acentriques, mais ceux ci sont rapidement perdus, comme tout fragment ne possédant pas de centromère

Un anneau est une anomalie déséquilibrée, le plus souvent de novo, présent fréquemment en mosaïque et connu comme structure instable en mitose et lors de la gamétogénèse donc rarement transmis à la descendance.

Phénotypiquement, le retentissement peut être celui d'une délétion, mais aussi d'une duplication (Par échange de chromatides soeurs lors d'une mitose, l'anneau peut se dupliquer en anneau double dicentrique ).

Le plus fréquemment rencontré est l'anneau du 13. [13]

Selon l'ISCN, l'anneau chromosomique est noté r(ring), suivi du numéro du chromosome dans une parenthèse, suivi éventuellement d'une deuxième parenthèse indiquant les points de cassure, si ceux-ci sont localisables. ex: r(13)(p12q33)

#### *a-6 Marqueur chromosomique*

Élément chromosomique surnuméraire non reconnaissable.

Dérive souvent des chromosomes acrocentriques et en particulier le 15 et le 22

Ses conséquences phénotypiques dépendent de son origine et de sa constitution génique. [13]

Selon l'ISCN, le marqueur chromosomique est noté mar. Ex : 47,XY,+mar

#### **b- Aberrations portant sur deux chromosomes : Les translocations**

C'est la transposition d'un fragment chromosomique sur un autre chromosome suite à une cassure chromosomique.

Il s'agit d'une anomalie le plus souvent équilibrée impliquant souvent deux chromosomes mais parfois complexe avec un risque de déséquilibre chez la descendance.

En présence de deux points de cassures : translocation réciproque ou robertsonienne.

En présence de trois points de cassures : insertion interchromosomique. [10]

#### **b-1 Translocation réciproque**

Il s'agit d'un échange de matériel entre deux chromosomes non homologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués.

Dans la majorité des cas, une translocation réciproque est apparemment équilibrée et l'individu est phénotypiquement normal. Mais, si cet échange s'accompagne d'une perte de matériel génétique, elle est déséquilibrée. (Figure 33)

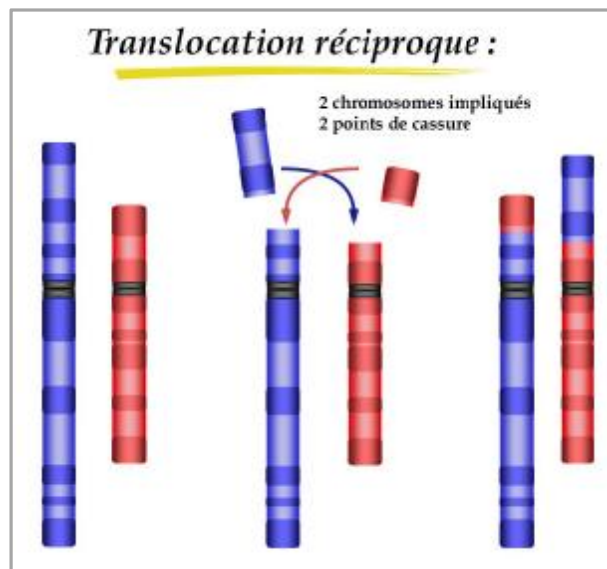


Figure 33 : mécanisme de la translocation réciproque impliquant deux chromosomes

Selon l'ISCN, cette anomalie est notée t, suivi d'une parenthèse indiquant les numéros des 2 chromosomes impliqués, séparés d'un point virgule ; une deuxième parenthèse indique les points de cassure sur chacun des 2 chromosomes. Ex : 46,XY, t(2;6)(p13;q32)

Les translocations réciproques sont responsables d'anomalie de la reproduction, de stérilité, de fesses couchées spontanées à répétition ou la naissance d'un enfant polymalformé car les translocations empêchent le déroulement normal de la méiose.

Au moment de la méiose, lors de l'appariement des chromosomes, les chromosomes transloqués vont former un tétravalent ce qui entraîne des difficultés de ségrégation. (Figure 34)(Annexe6, Annexe7)

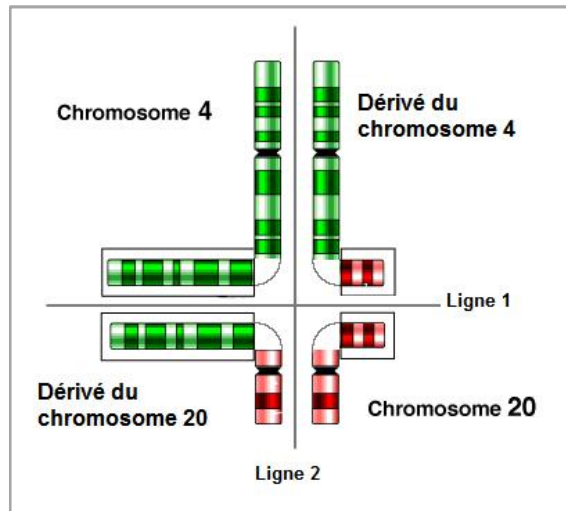


Figure 34 : exemple d'un tétravalent

#### b-2 translocation robertsonienne

Translocation impliquant deux chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) dont le bras court de très petite taille ne code que pour des gènes répétés.

La translocation consiste en une fusion des chromosomes avec perte des bras courts, sans aucune conséquence clinique directe pour le sujet porteur. (Figure 35)

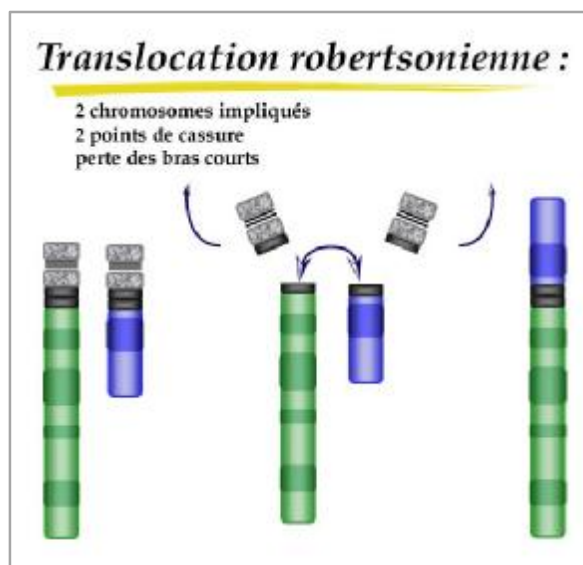


Figure 35 : mécanisme d'une translocation réciproque

Les deux chromosomes impliqués :

\*\* soit ils fusionnent par leurs centromères (fusion centromérique) formant un chromosome monocentrique.

\*\* soit par cassures dans les régions juxtacentriques des bras courts, puis fusion entre ces deux bras courts formant ainsi un chromosome dicentrique (95% des cas).

Les fusions centriques représentent l'anomalie chromosomique la plus fréquente dans la population humaine. La plus fréquente est la t(14q21q).

Cette anomalie aboutit à des gamètes déséquilibrés avec des zygotes monosomiques ou trisomiques (en effet ce type de translocation est responsable des formes familiaux de la trisomie 13 et 21). (Annexe3) [12][13]

Selon l'ISCN, elle est noté t, suivi d'une parenthèse indiquant le numéro de chaque chromosome suivi de la notation q . Ex: 45,XX,t(14q21q)

### *b-3 Insertion*

Il s'agit d'un cas particulier de translocation, avec transfert d'un segment chromosomique intercalaire à l'intérieur d'un autre chromosome ;

Cette anomalie nécessite trois points de cassure. L'un sur le chromosome receveur et deux sur le chromosome donneur libérant le fragment intercalaire.

Le chromosome donneur peut être aussi le chromosome receveur, dans ce cas là, il s'agit d'un déplacement d'un fragment chromosomique d'un site à un autre sur le même chromosome, le fragment peut garder la même orientation « insertion directe » ou une orientation inverse « insertion inversion » (figure 36)

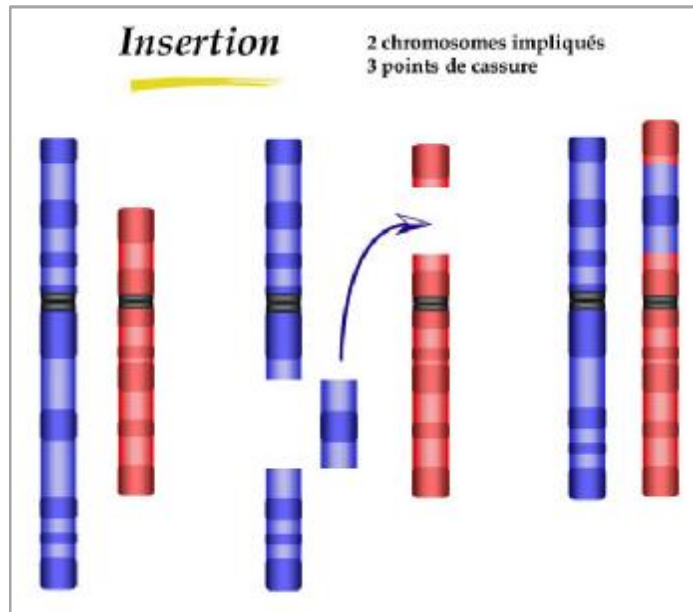


Figure 36 : mécanisme d'une insertion

C'est un remaniement équilibré mais très instable en méiose.

Selon l'ISCN, une insertion est notée *ins*, suivi d'une parenthèse indiquant le numéro du chromosome qui reçoit l'insertion, suivie éventuellement d'un point virgule indiquant le numéro du chromosome donneur du segment (si ce chromosome n'est pas le même que celui qui reçoit), suivie d'une deuxième parenthèse indiquant le point d'insertion suivi d'un point virgule seulement si le chromosome donneur est différent, suivi des points de cassure du fragment.

[10][13]

Ex : *ins(2)(p13q31q34)* et *ins(5;2)(p12;q31q34)*: le fragment q31q34 d'un chromosome 2 est inséré respectivement en p13 du même chromosome 2, et sur un chromosome 5 en p12.

c- Anomalies particulières

*c-1 sites fragiles*

C'est une zone de fragilité constitutionnelle (cassure ou lacune) localisée sur un chromosome donné.

Se transmet comme un caractère dominant.

L'anomalie la plus connue est la fragilité du site q27.3 sur le chromosome X responsable du syndrome de l'X fragile, une des causes majeurs du retard mental chez le garçon. (Figure 37)

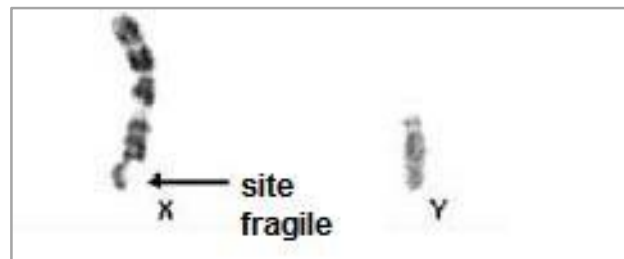


Figure 37 : exemple d'un site fragile sur le chromosome X

*c-2 Disomie uniparentale (DUP)*

Présence de deux allèles identiques homologues provenant du même parent voir de deux chromosomes entiers.

Une DUP peut être observée pour presque toutes les paires chromosomiques, mais seules certaines disomies sont associées à des manifestations cliniques en révélant une maladie récessive rare (cas d'iso disomie) ou une pathologie liée à l'empreinte parentale (syndrome de Prader-willi/ Angelman). (Figure 38) [12]



Figure 38 : exemple d'une disomie uniparentale

### *c-3 Dicentrique/ Pseudodicentrique*

Chromosome possédant deux centromères : issus de mécanismes variés tels que ceux précédemment décrits, c'est également et surtout le mode de recollement alternatif d'une translocation réciproque.

Lorsque les deux centromères sont suffisamment éloignés, l'un d'entre eux devient non fonctionnel, d'où le nom de chromosomes pseudodicentriques. (Figure 39)

Remaniement déséquilibré.

Fréquent en cas de translocation robertsonienne ; Rare en tant qu'anomalie acquise.

Hautement instable à moins que l'un des centromères ne s'inactive ou que la distance intercentromérique soit très faible. [13]

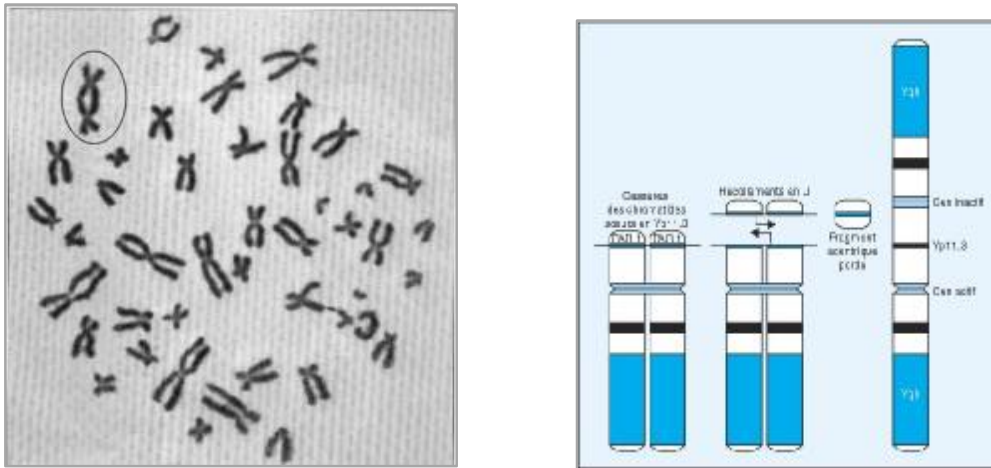


Figure 39 : a-chromosome dicentrique sur une mitose

b-mécanisme de formation du dicentrique

Selon l'ISCN, il est noté dic, ou psu dic (pseudo dicentrique), quand l'un des 2 centromères s'inactive.

c-4 Fragments Minus ; HSR

Fragments minus (notés DM : double minute) ; très petit(s) élément(s) supplémentaire(s), souvent par 2, acentriques ; généralement très nombreux. (Figure 40)

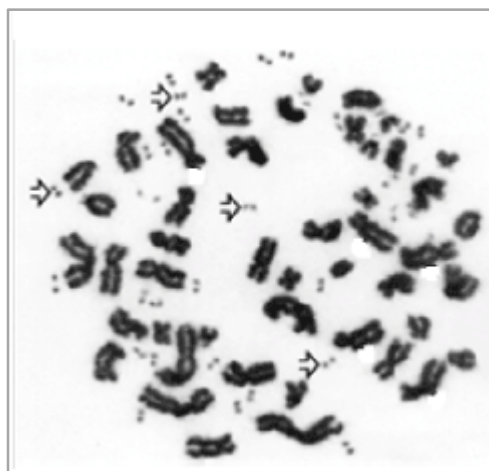


Figure 40 : plusieurs doubles minute sur mitose

HSR : noté ainsi pour « homogeneously staining region » : région de coloration homogène et de taille variable, souvent importante, présente au sein d'un ou de plusieurs chromosome(s).

Expérimentalement, les HSR peuvent se rencontrer après une exposition chronique à certains toxiques.

DM et HSR sont des éléments hautement corrélés à la présence d'une amplification génique importante. Se rencontrent lors des processus malins, en particulier en cas de tumeur solide. [10][12]

#### *c-5 Remaniements complexes*

Impliquant plus de 2 chromosomes et/ou plus de 3 points de cassures.

- Fréquence des porteurs malformés apparemment équilibrés dans la descendance (conseil génétique)
- Fréquent dans beaucoup de tumeurs solides et de lymphomes.

#### *c-6 Polymorphisme*

Correspondant à de l'hétérochromatine constitutive, il est sans conséquence phénotypique.

La transmission est familiale comme un trait autosomique dominant

Les plus connus sont :

L'inversion péricentrique du chromosome 9

La longueur du bras long du chromosome Y

La longueur et la morphologie des bras court des chromosomes acrocentriques

Taille de la constriction secondaire des chromosomes 1, 9 et 16. [12][13]

# CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

## A- Introduction

La cytogénétique médicale est en pleine révolution. Le caryotype mis au point en 1956, n'est désormais plus l'examen de première intention pour l'exploration des anomalies chromosomiques associées à une déficience intellectuelle et/ou aux malformations congénitales.

Depuis la fin des années 80, les cytogénéticiens ont à leur disposition de nouvelles techniques alliant l'établissement du caryotype et la biologie moléculaire dont le niveau de résolution se situe à une échelle intermédiaire : la cytogénétique moléculaire. (Figure 41)

Les techniques de la cytogénétique moléculaire reposent sur le principe de l'hybridation de la molécule d'ADN avec une séquence complémentaire variable en fonction de la technique utilisée et la pathologie étudiée.

Les principales méthodes de cette discipline sont l'Hybridation in situ Fluorescente « FISH » (examen ciblé nécessitant la connaissance préalable du locus étudié) et l'Hybridation Génomique Comparative « CGH » (étude pangénomique ne détectant que les déséquilibres génomiques). [14][18]

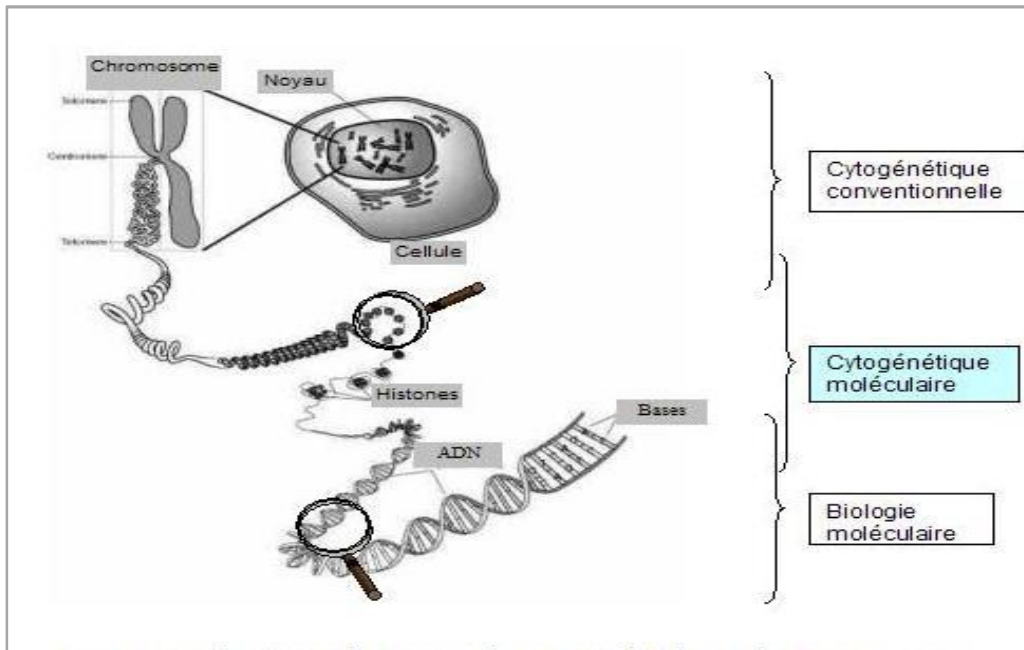


Figure 41 : Représentation schématique du génome humain à différentes échelles.

## B- Historique

L'hybridation in situ fut appliquée à l'homme au début des années 70 pour localiser des séquences d'ADN satellite, jusqu'en 1981, seules les séquences hautement répétées purent être localisées.

Le principe consistait à hybrider une sonde d'ADN marquée par un radio-isotope sur une préparation chromosomique ; la détection était réalisée par autoradiographie. L'analyse s'effectuait par comptage des grains d'argent sur les chromosomes colorés au Giemsa.

Au début des années 80 des améliorations techniques permirent la mise en évidence de séquence unique : utilisation de sondes clonées, introduction du sulfate de dextran dans la solution d'hybridation permettant d'augmenter le signal d'hybridation. Cependant, malgré leur réelle efficacité, la lourdeur de ces techniques nécessitant l'utilisation de la radioactivité en limitait l'exploitation : précautions liées

à la manipulation de radio-isotopes, durée des temps d'exposition (2 à 3 semaines), longueur de l'analyse, manque de précision dans la localisation des signaux. [15][18]

L'introduction de marqueurs non radioactifs par modification chimique ou physique des acides nucléiques (marquage enzymatique des sondes par la biotine ou la digoxigénine détectées indirectement par des anticorps spécifiques) et le développement de systèmes de détection efficace, notamment la fluorescence (sonde marquée directement par un fluorochrome) a permis aux laboratoires de diagnostics une utilisation en routine devenue indispensable au début des années 90.

Les multiples progrès ont permis l'apparition de nouveaux outils spécialisés basés sur les mêmes principes. : FISH multicolore, CGH (hybridation génomique comparative), biopuces à ADN...Utilisées pour des applications particulières et exploitées par certains centres. [19][20]

## C- HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)

### C-1 Principe

Cette toute première technique de cytogénétique moléculaire repose sur trois propriétés de l'ADN :

\*\* La complémentarité obligatoire des bases azotées (Adénine—Thymine ; Cytosine—Guanine).

\*\* Les liaisons hydrogènes faibles (covalente) qui assurent la cohésion des deux brins de la double hélice.

\*\* Les liaisons phosphodiester (40 fois plus fortes que les liaisons hydrogènes) qui assurent la stabilité de l'enchaînement des nucléotides de chaque brin d'ADN.

Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les deux brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier de façon spécifique (étape appelée la renaturation). (Figure 42) [19][20]

En 1981, l'équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (du dUTP) couplé à de la biotine dans un fragment d'ADN (cette opération s'appelle le « marquage ») qui est alors appelé « sonde ». Dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées (cette étape est la formation d'hybrides).

Les hybrides non spécifiques et les sondes non hybridées sont éliminés par des lavages.

La sonde hybridée est révélée par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, le FITC.

Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde.

Ainsi naquit l'hybridation in situ fluorescente, permettant l'observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme in situ (à la différence du Southern blot qui est l'hybridation d'une sonde sur de l'ADN fixé sur une membrane de nylon).

L'utilisation de plusieurs fluorochromes et de filtres microscopiques ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d'hybrider plusieurs sondes de façon concomitante. Grâce à ces progrès, il est possible aujourd'hui d'étudier de façon simultanée plus de 20 loci sur des chromosomes. [20][21]

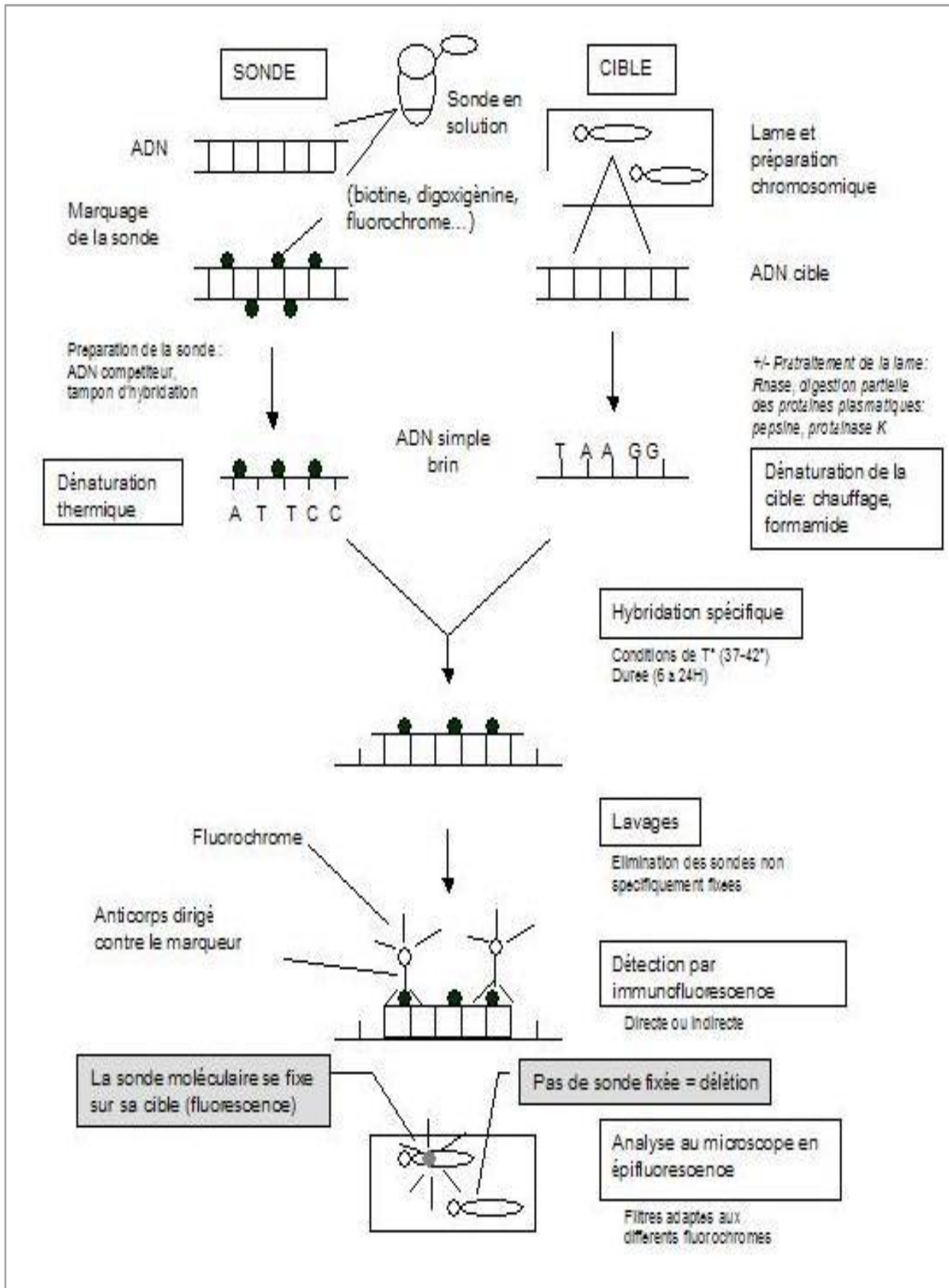


Figure 42 : Principe de la FISH

## C-2 Substrats de la FISH

Le substrat habituel est une préparation chromosomique de métaphase ou d'interphase obtenue par caryotype classique (culture, blocage, choc, fixation, étalement).

Pour l'analyse des métaphases, les lames fraîches permettent d'obtenir un meilleur résultat que les lames congelées, mais les culots fixés de manière prolongée à -20°C sont également analysables.

Des noyaux interphasiques de préparations cellulaires totales (étalement de sang, de moelle osseuse,...) ou des sections minces de tissu paraffiné peuvent être également utilisées. [20][22]

## C-3 Sondes utilisées

Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome.

Pour la FISH, on utilise des sondes spécifiques de régions chromosomiques ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée ou loci particuliers.

On distingue deux grandes catégories de sondes :

- Les sondes composées de séquences spécifiques d'ADN répété : Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilobase), mais s'hybrident sur des séquences spécifiques (séquences alphoides des centromères ou séquence d'hétérochromatine) répétées en tandem sur plusieurs centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité.

- Les sondes composées de séquences uniques : On distingue les sondes spécifiques de loci et les sondes spécifiques d'un bras chromosomique ou d'un chromosome entier.

#### Ø Types de sondes

Les différents types de sondes commercialisées sont :

Les sondes centromériques, locus spécifiques, télomériques et subtélomériques et les sondes de peinture chromosomique. (Figure43)

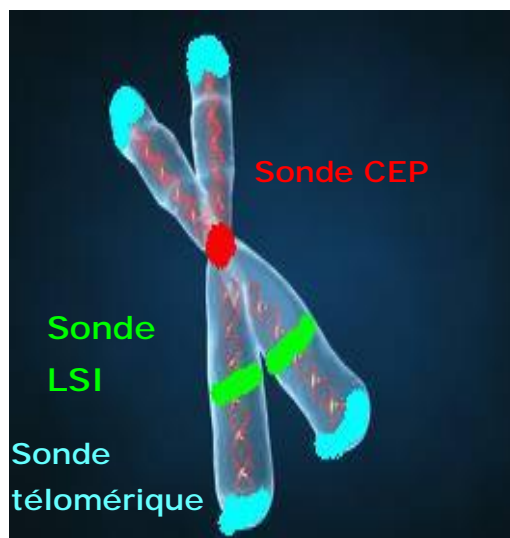


Figure 43 : Emplacement des sondes CEP, LSI et Télomérique

ü *Les sondes CEP* (Chromosome Enumeration Probe) (Figure44) ; elles s'hybrident au niveau des centromères des chromosomes. Les séquences dont elles sont complémentaires sont naturellement présentes en un grand nombre d'exemplaires au niveau des centromères ; le signal obtenu est donc en général intense car la sonde s'hybride sur chacune des séquences complémentaires présentes. Ces sondes sont surtout utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi

bien en métaphase qu'en interphase et pour identifier l'origine de chromosomes marqueurs.

Des sondes centromériques sont disponibles pour tous les chromosomes sauf les chromosomes 13 et 21, 14 et 22 qui s'hybrident entre eux car leurs centromères présentent 99.7% d'homologie entre eux.

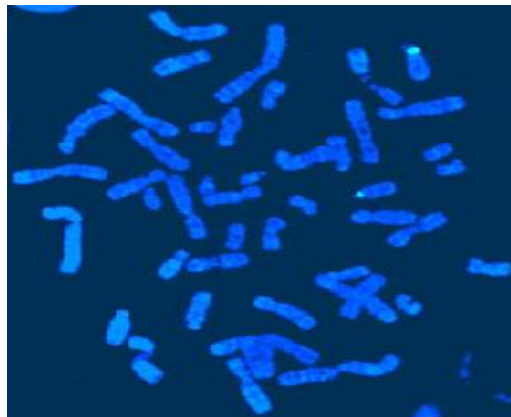


Figure 44 : Sonde centromérique ( $\alpha$ -satellite) des chromosomes 15(Vysis®) sur une métaphase normale ;

- Marquage direct avec un fluorochrome (FITC) modifié (« *spectrum green* »),
- Contre colorant bleu : DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole)

ü *Les sondes LSI* (Locus Specific Identifier) (Figure 45) ; comme leur nom l'indique, ces sondes de petite taille permettent d'identifier une région très précise du génome.

Pour être entièrement séquencé, le génome humain fut fragmenté en segments de 100-200 kb puis clonés dans des vecteurs appelés BACs («chromosomes artificiels de bactéries»). Ces BACs sont aujourd'hui utilisés comme sondes pour la technique de FISH.

Elles sont obtenues par marquage de l'ADN cloné dans différents vecteurs (plasmides, cosmides, YACS, BACs...).

Leur intérêt principal réside dans la mise en évidence rapide de remaniements impliquant une région chromosomique précise (microdélétions, translocations, inversions ...)

La sonde LSI est souvent associée à une sonde contrôle correspondant à un locus du même chromosome afin d'être sûr que l'hybridation a eu lieu d'une part et pouvoir localiser le chromosome étudié d'autre part.

Pour être bien détectée, cette sonde doit avoir une taille >25kb et recouvrir plus de 50% de sa cible.

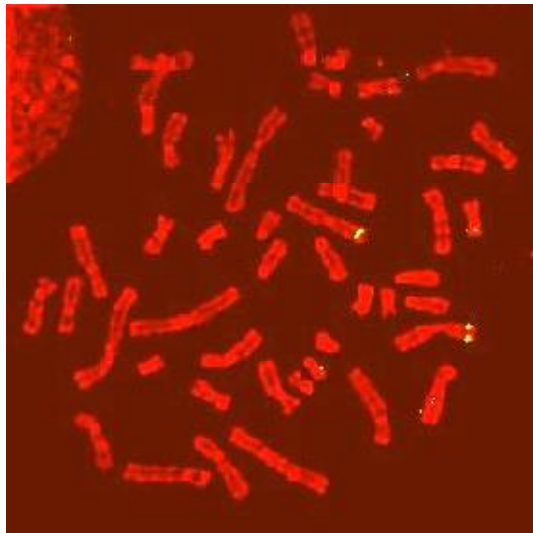


Figure 45 :

Sonde locus spécifique de la région 3p25 englobant le gène responsable de la maladie de Von Hippel-Lindau.

Sonde marquée à la biotine détectée par immunofluorescence indirecte par la FITC,  
Contre colorant : IP.

#### ü *Les sondes télomériques et subtélomériques* (Figure 46)

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

6 paires de base 5'TTAGGG3' d'une longueur jusqu'à 30kb. Ces sondes peuvent alors détecter tous les télomères.

Les régions subtélomériques sont constituées aussi d'une répétition de séquences mais avec une périodicité et longueur spécifiques de chaque chromosome. L'utilisation de sondes spécifiques permettra de mettre en évidence des anomalies cryptiques à ce niveau.

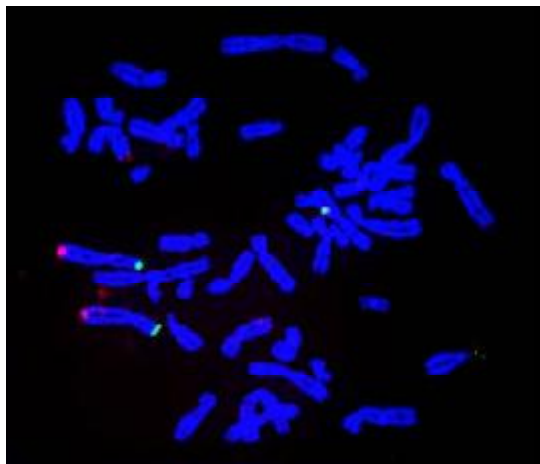


Figure 46 :

Sondes subtélomériques du chromosome 6 (Cytocell®),  
Visualisation sur la même métaphase des deux extrémités du chromosome :  
✓ marquage direct des sondes par FITC pour les bras courts,  
✓ marquage direct par le rouge Texas pour les bras longs

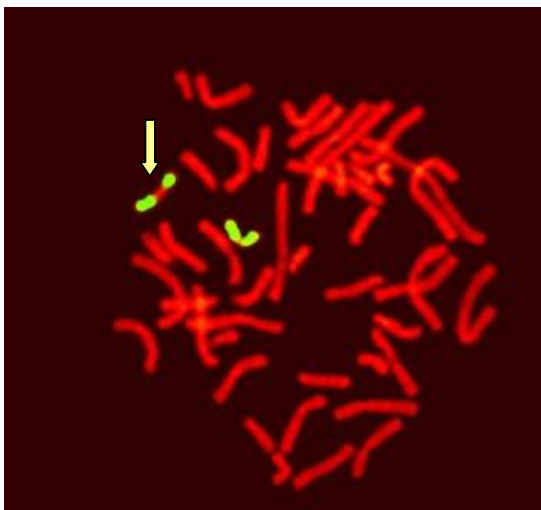
ü Les sondes WCP (Whole Chromosome Painting) (Figure 47), sonde peinture chromosomique ; elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome.

Ces sondes sont obtenues après isolement et marquage de l'ADN d'un chromosome ; leur réalisation ne nécessite pas de connaître la séquence de cet ADN.

Après hybridation, on observe un marquage de tout le chromosome. Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques.

Vue que ce type de sonde s'hybride avec toutes les séquences d'un chromosome, alors elles contiennent en plus des séquences spécifiques du chromosome cible, des séquences communes à tous les chromosomes donc il y'a un risque d'hybridation non spécifique ; ce problème a été résolu en réalisant une préhybridation de la sonde avec un ADN (dit compétiteur) comprenant uniquement les séquences communes, alors à la fin, la sonde sera constituée essentiellement des séquences spécifiques d'un chromosome donné.

Ces sondes sont très utiles pour interpréter certaines translocations complexes, mettre en évidence des échanges de petite taille, identifier précisément l'origine d'un fragment non identifié. [21][23]



**Figure 47** : Peinture chromosomique sur métaphase normale du chromosome 16 (Biosys®),

\*sonde marquée à la biotine détecté par immunofluorescence indirecte par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC),

\*contre colorant rouge : Iodure de Propidium (IP).

Sur le chromosome indiqué par une flèche la partie centrale n'est pas couverte par la sonde, cette portion correspond à un polymorphisme (variant) de l'hétérochromatine constitutive de ce chromosome sur son bras long.

ù Les sondes "réarrangements chromosomiques spécifiques" ;  
permettent de détecter des réarrangements connus dans certaines pathologies. Ex :  
t(9;22) ou t(15;17)

*NB* : en fonction de la taille de la sonde souhaitée, différents types de vecteurs  
sont utilisés pour son clonage :

Plasmide (0,5 à 5kb) ; Phages (9 à 23kb) ; Cosmides (35 à 50kb) ; PAC (100 à  
120kb) ; BAC (120 à 150kb) ; YAC (100 à 2Mb)

Les sondes utilisées en FISH > 35kb.

*NB* : L'ensemble de ces sondes peuvent être employées seules ou être  
combinées entre elles pour obtenir un marquage multicolore permettant une  
interprétation plus aisée de certains remaniements.

#### Ø Marquage des sondes

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un  
fragment d'ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus  
souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les  
sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la  
streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des  
fluorochromes.

Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides.  
Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment  
d'ADN. Les plus connues sont le Random-priming et la Nick-translation. [20][21]

#### a- Les fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation  
d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation  
( $\lambda_{exc}$ ) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur

d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission.

Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- Le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- Le FITC (Fluorescein isothiocyanate) ( $\lambda_{exc}$  495nm –  $\lambda_{em}$  519nm) fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) ( $\lambda_{exc}$  495nm –  $\lambda_{em}$  519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red ( $\lambda_{exc}$  589nm –  $\lambda_{em}$  615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 ( $\lambda_{exc}$  650nm –  $\lambda_{em}$  670nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5.5 ( $\lambda_{exc}$  675nm –  $\lambda_{em}$  694nm) fluoresce dans le rouge

b- multifluorescence

La FISH offre la possibilité d'étudier plusieurs loci simultanément lors d'une seule hybridation. Il suffit pour cela d'hybrider des sondes marquées avec des fluorochromes différents dont les spectres d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas.

Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes. On obtient alors une sonde dont la fluorescence est complexe, composée des longueurs d'émission des différents fluorochromes. Le signal de ce type de sonde ne peut être analysé qu'après numérisation.

En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes de peinture, chacune spécifique d'une paire

chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multifuorescence (figure 48). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère. (Figure 49)(Figure 50) [22][23]

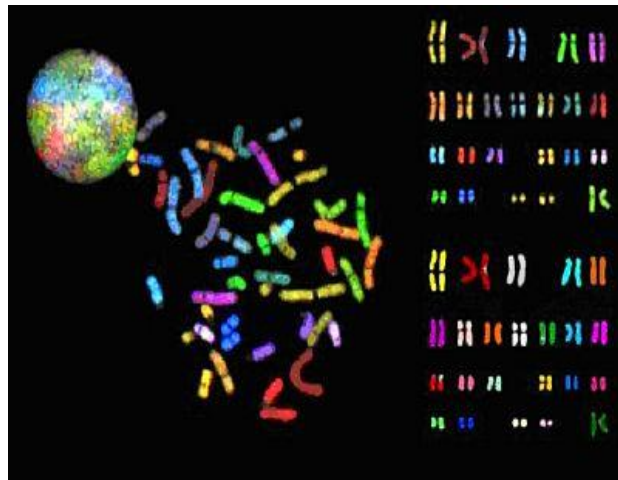


Figure48 : hybridation de 24 sondes de peinture chromosomique réalisant un caryotype en multifuorescence

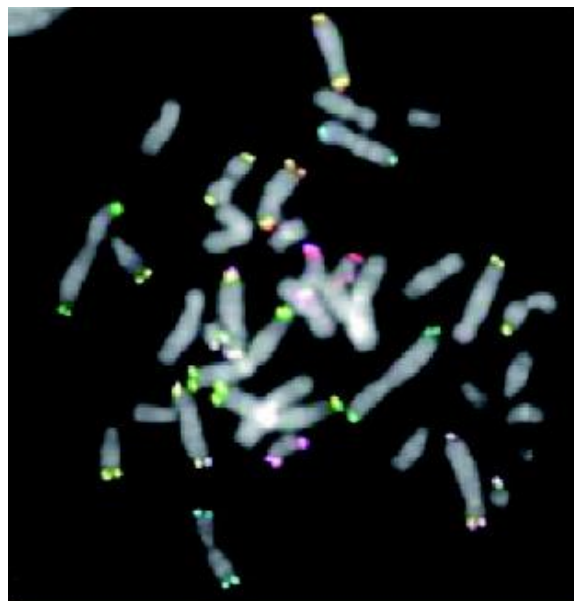


Figure 49: hybridation de 12 sondes spécifiques des régions subtélomériques de 12 chromosomes

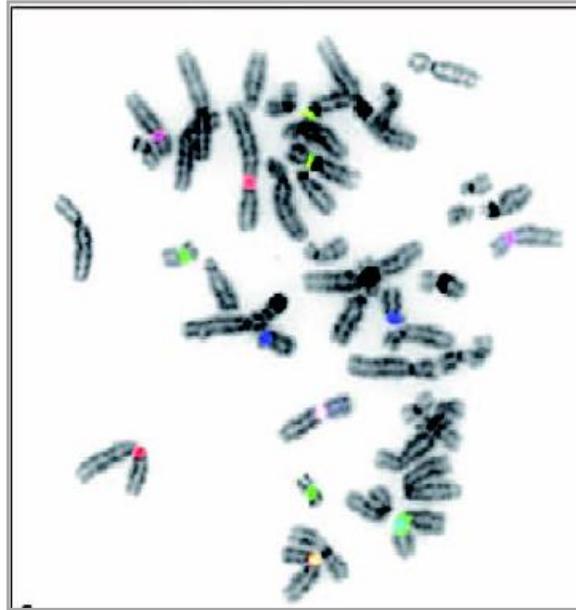


Figure 50 : Hybridation d'un des lots du système M-centromère

#### C-4 Dénaturation / Hybridation

C'est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Cette hybridation se déroulera dans des conditions précises de température, pH et salinité.

Un appareil nommé « thermobrite » est utilisé pour garder la préparation à s'hybrider à la température requise. (Figure 51)

L'efficacité de cette étape dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d'hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, à 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

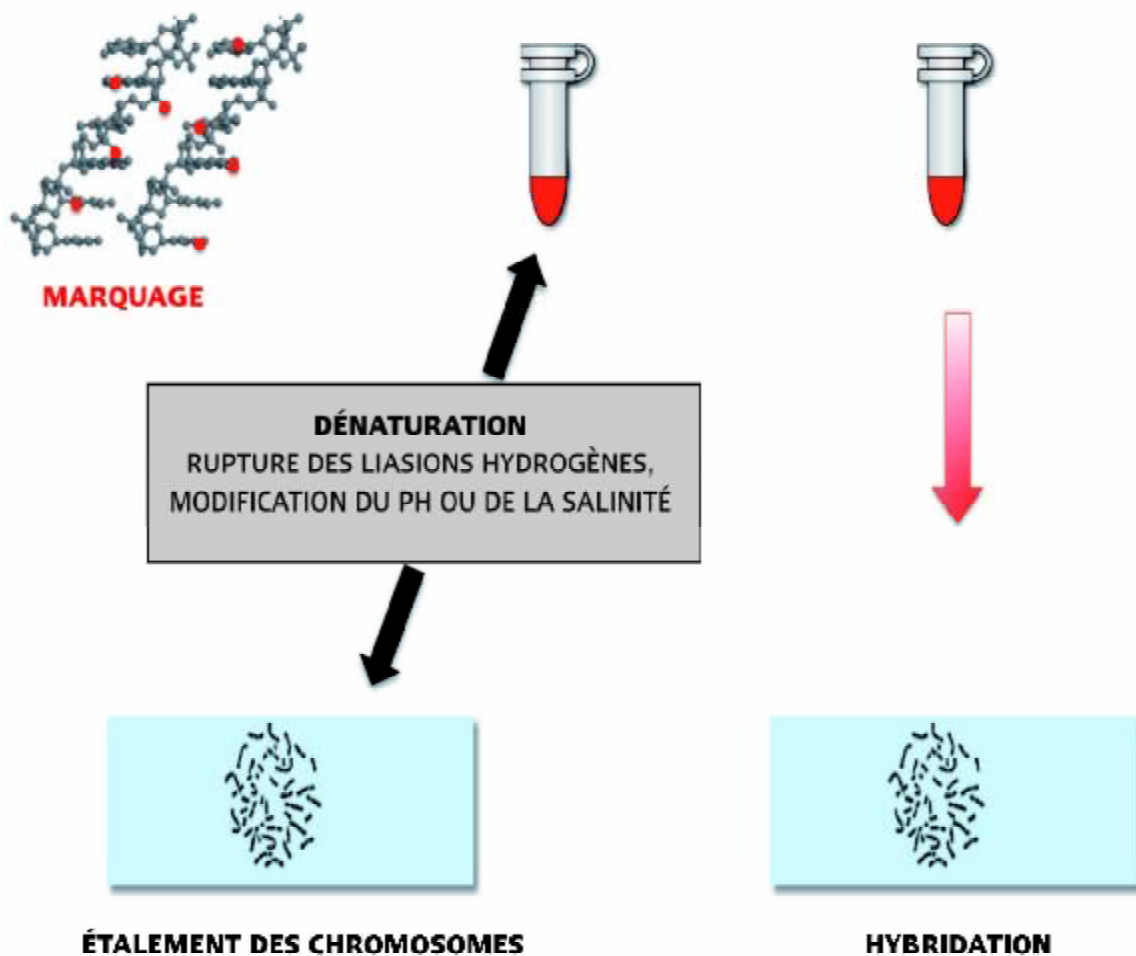


Figure 51 : l'hybridation

Un traitement à la pepsine avec des lavages post hybridation sont nécessaires pour éliminer les hybridations non spécifiques et diminuer le bruit de fond de la préparation. [20][23]

### C-5 Visualisation et analyse des hybrides

Après contre coloration des noyaux , l'analyse des lames est faite à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé de filtres appropriés aux nombreux fluorochromes disponibles : isothiocyanate de fluorescéine (vert-jaune), rouge Texas, rhodamine (rouge), coumarine (bleu),...

Les molécules émettent une lumière lorsqu'elles sont excitées par une longueur d'onde appropriée. Des filtres sont disponibles avec plusieurs bandes passantes permettant de détecter plusieurs couleurs durant la même observation. (figure 52)

L'observation de couleurs difficilement perceptibles par l'oeil humain (cyanine, rouge sombre) ou la distinction de combinaisons nombreuses couleurs (Multi-FISH) bénéficie indéniablement de l'avantage des caméras numériques de capture couplées au microscope. Il en est de même des logiciels adaptés au traitement de l'image. [21][23]

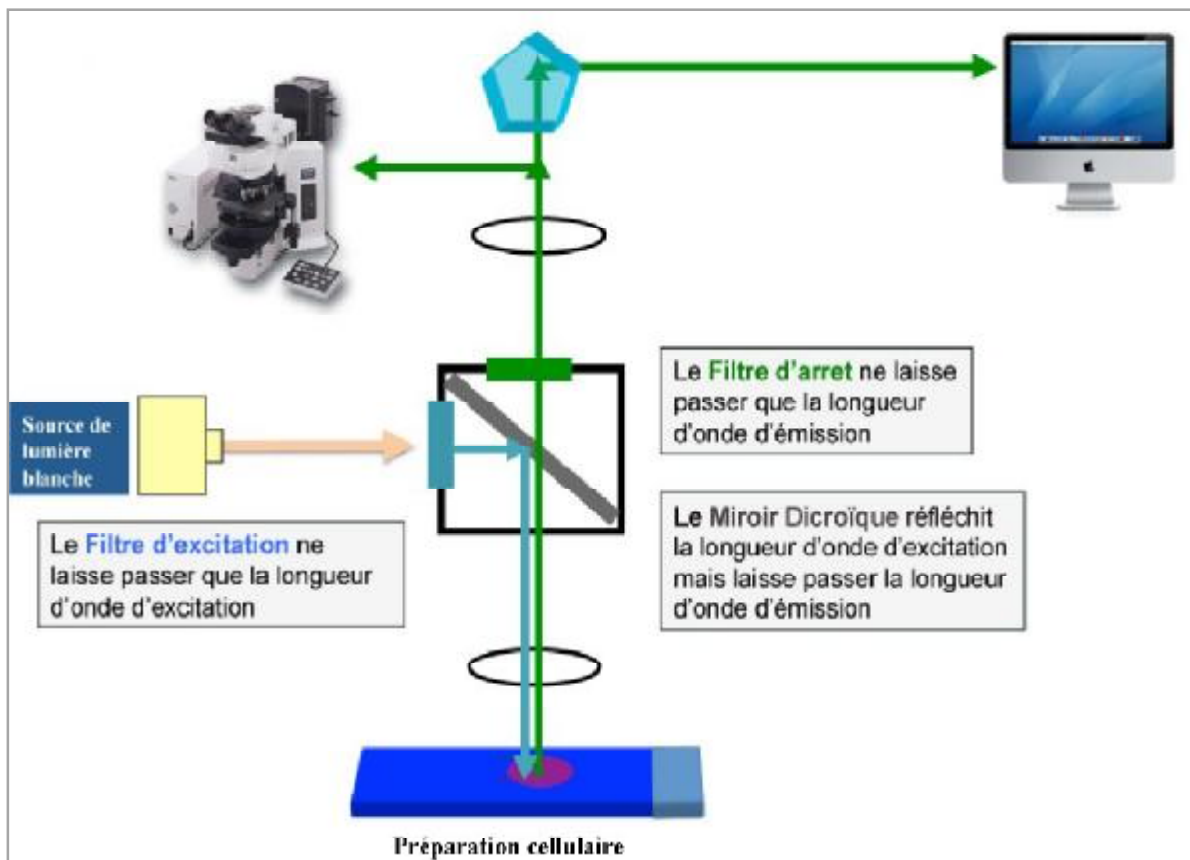


Figure 52: principe du microscope à épifluorescence

## C-6 Nomenclature

Du fait de la pratique actuelle courante de la FISH et son implication dans divers domaines de génétique médicale, une nomenclature internationale a été établie pour la première fois au congrès de cytogénétique internationale aux Etats Unies d'Amérique en 1994 (*An International System for human Cytogenetic Nomenclature* « ISCN », Tennessee, USA, 1994) avec une actualisation permanente des données.

Le but de ces recommandations est la standardisation et l'uniformisation du langage des généticiens à travers le monde.

Quelques exemples de nomenclature :

- ∅ Quand le caryotype a été fait, .ish suit la formule.
- ∅ Quand il y a plusieurs anomalies, la formule FISH est tout à la fin après le nombre de mitoses étudiés et non plus après l'anomalie étudiée.
- ∅ Si le caryotype n'a pas été fait, on écrit directement ish.
- ∅ Quand la FISH est faite sur les noyaux, on met nuc devant ish.
- ∅ Quand la FISH est faite sur métaphases et noyaux, les 2 formules doivent être écrites sur des lignes différentes :

46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5]

nuc ish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[50]

## C-7 les paramètres influençant la FISH

Plusieurs paramètres interviennent dans la qualité du résultat de la technique FISH. [20][22]

a- La taille et la nature de la sonde

Si la sonde est constitué d'ADN génomique ; plus sa séquence est longue, plus l'hybride formé sera stable et donc facile à détecter. Cependant, plus la sonde est grande, plus elle risque de contenir des séquences répétées susceptibles de générer un bruit de fond. Les sondes de petite taille sont difficiles à visualiser sauf si leur séquence est répétée en tandem un grand nombre de fois dans l'ADN cible.

Si la sonde est constituée d'ADN complémentaire (contenant uniquement des exons), l'intensité du signal dépendra de l'organisation des séquences exoniques dans l'ADN cible : avec certaines limites, le signal sera d'autant plus fort que ces séquences sont dispersées sur une plus grande distance d'ADN cible. Ce type de sonde donne un signal d'hybridation très propre vue l'absence de séquences répétées.

b- La concentration de la sonde

La concentration de la sonde est à adapter en fonction de sa taille et la nature de la séquence cible

c- La température de fusion « Tm »

Elle correspond à la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN et des sondes sont dénaturés (ADN simple brin). A adapter en fonction de la sonde utilisée

d- 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 avec la cible. Ce paramètre est très dépendant de la Tm.

e- Le pH du milieu

Les solutions du milieu doivent avoir un pH entre 7 et 7.5 ce qui correspond au pH physiologique compatible avec la préservation du matériel biologique

f- Les lavages post hybridation

Ils permettent d'éliminer l'excès de sonde non hybridée et les hybrides non spécifiques. Leur efficacité est liée à leur stringence laquelle dépendant de : la température du lavage (37°C et 60°C), la durée de chaque bain (quelques minutes à 30minutes) et la concentration en sels de sodium.

g- Le contenu de l'hybride en CG

Plus le nombre des séquences CG est important plus l'hybride est stable du fait de l'importance des triples liaisons d'hydrogène générées.

## C-8 Les indications de la FISH

### Ø *EN POSTNATAL*

- 1- Caractérisation d'un remaniement de novo et/ou complexe faisant intervenir plusieurs chromosomes
- 2- Précision des points de cassure d'une anomalie de structure révélée par caryotype standard
- 3- Diagnostic des microremaniements (microdélétion, microduplications,.....)
- 4- Déterminations de l'origine des marqueurs chromosomiques
- 5- Etude des translocations cryptiques et semi-cryptiques
- 6- La recherche des remaniements subtélomériques (surtout en cas de retard mental)
- 7- Evaluation et exploration d'un mosaïcisme

8- Explorations d'anomalies de nombre ou de structure des gonosomes (nombre des chromosomes X, présence du chromosome Y chez la femme,...)

Ø *EN PRENATAL ET PREIMPLANTATOIRE*

Sur amniocytes non cultivées, sur sang du cordon, sur tissu fœtal et sur blastomère :

- Recherche d'une aneuploidie : de routine pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y
- Recherche des microdélétions
- Détermination du sexe (maladies récessives liées à l'X)

Ø *EN HEMATOLOGIE*

- Détection des aneuploidies et leur origine vu leur fréquence dans les hémopathies malignes avec évaluation du mosaïcisme.  
Ex : trisomie 12 dans la leucémie lymphoïde chronique, trisomie 8 dans la leucémie aigue myéloïde et les syndromes myélodysplasiques, monosomie 7 dans les syndromes myélodysplasiques.
- Caractérisation des anomalies complexes : devant un caryotype complexe, le recours aux techniques de peinture chromosomique et l'usage des sondes centromériques permet l'identification des chromosomes impliqués dans les remaniements structuraux ainsi que l'origine des chromosomes transloqués.
- Détection des anomalies spécifiques ; Ex : t(9;22) dans la leucémie myéloïde chronique surtout si elle est cryptique.
- Suivi du chimérisme post greffe de la moelle osseuse : après greffe de la moelle allogénique avec mismatch de sexe (donneur et receveur de

sexe différent), le suivi par FISH (sondes spécifiques pour les chromosomes X et Y) est parfaitement adapté pour évaluer le degré de chimérisme et l'identification précoce des rechutes.

#### Ø *EN ONCOGENETIQUE TISSULAIRE*

- Au niveau des tumeurs solides, il existe souvent des remaniements complexes : gains, pertes de chromosomes entiers ou partiellement, délétions ou amplifications chromosomiques. La FISH est un moyen adapté pour le diagnostic et le suivi de l'évolution spontanée ou sous traitement de ces anomalies découvertes.

### C-9 les limites de la FISH

La réalisation de la technique FISH nécessite souvent la réussite d'une culture cellulaire (noyaux interphasiques et métaphases), ce qui n'est pas toujours obtenue.

La FISH avec des sondes spécifiques de loci est une technique d'étude ciblée, donc la connaissance préalable de l'anomalie à rechercher est indispensable, à la différence du caryotype qui permet d'explorer l'ensemble du génome. (On ne trouve que ce qu'on cherche)

La FISH avec les sondes de peinture a une résolution de 1,5Mb pour la détection des translocations télomériques. En cas d'insertion chromosomique, elles ne permettent pas de déterminer la région chromosomique impliquée. Enfin, elles ne sont pas d'une grande utilité pour la détection des duplications. [25][26]

## C-10 Les dérivés de la FISH

Le développement de la biologie moléculaire a permis à la cytogénétique de prendre un nouvel essor par les techniques d'hybridation in situ fluorescente. Les techniques permettant l'analyse spécifique d'un chromosome ou d'une région chromosomique sont dénommées techniques FISH ciblées. Parmi ces sondes, nous distinguons les peintures chromosomiques, les sondes centromériques et les sondes locus spécifiques. L'apparition des procédés de multihybridation avec plusieurs sondes sur la même préparation cellulaire a permis d'analyser l'ensemble des chromosomes en une seule expérimentation. Ces techniques permettant l'analyse simultanée de tous les chromosomes sont définies comme globales. [23][24]

### a- La FISH multicolore

Encore appelée la FISH 24 couleurs est une technique permettant l'hybridation simultanée de 22 paires d'autosomes et de la paire des gonosomes. Développée en 1996, deux types de FISH multicolore sont décrits : la multiplex-FISH (M-FISH) par Speicher et al. Et le caryotype spectral par Schrock et al. La multi-FISH utilise 24 sondes marquées par 5 fluorochromes différents utilisés séparément ou en combinaison de deux ou trois. Chaque paire chromosomique possède une combinaison de couleurs caractéristiques. Cette technique permet en une seule hybridation l'identification des chromosomes. La FISH 24 couleurs est un outil indispensable pour identifier l'euchromatine d'un chromosome marqueur surnuméraire et étudier les échanges interchromosomiques. Cependant, elle ne permet pas de déterminer les déséquilibres intrachromosomiques. La résolution de cette technique n'est que de 5 à 10 mégabases.

b- La FISH multicolore spécifique des bras chromosomiques

(arm-specific multicolour FISH ou armFISH)

Elle dérive de la FISH multicolore

Cette technique correspond à l'hybridation simultanée de 42 peintures spécifiques de chaque bras des 24 chromosomes humains en excluant les bras courts des chromosomes acrocentriques et du chromosome Y. L'utilisation de l'armFISH permet donc d'identifier chaque bras chromosomique, avec une résolution identique à celle de la FISH 24-couleurs.

c- Le *banding* multicolore

(M-Band ou MCB ou m-banding)

Cette technique permet l'obtention d'une succession de bandes fluorescentes de couleurs différentes sur « une paire chromosomique donnée ». Chaque bande est obtenue par une sonde ou la superposition de plusieurs sondes fluorescentes. Le m-banding permet de caractériser les réarrangements intrachromosomiques et ainsi de déterminer par exemples les bandes d'un marqueur chromosomique, mais impose de connaître au préalable le chromosome dont il est issu.

d- Le *banding* multicolore multiple

(Multitude MCB)

Il permet en une seule hybridation un marquage en bandes de tous les chromosomes, correspondant à 24 techniques simultanées du m-banding. Cette méthode autorise donc l'identification d'un marqueur chromosomique en une seule étape.

e- La FISH 24 couleurs spécifique des centromères

(cenM-FISH)

Elle correspond à l'hybridation simultanée de tous les centromères développée en 2001 par Nietzel et al. et Henegariu et al.

Un grand intérêt pour la détermination des petits marqueurs chromosomique mais ne reconnaît pas ceux qui sont anaphoïdes.

f- La FISH 24 couleurs subcentromérique

(subcenM-FISH)

Starke et al. ont développé cette technique en utilisant un ensemble de sondes *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) et *Yeast Artificial Chromosomes* (YACs), localisées dans la région péri-centromérique de chaque chromosome. Cette est une méthode concurrente des précédentes pour l'étude des aberrations subtélomériques surtout en cas de retard mental.

g- L'acroM-FISH

C'est une autre technique de cytogénétique moléculaire décrite par Langer et al. en 2001. Elle permet l'identification simultanée d'hétérochromatine et d'euchromatine des chromosomes acrocentriques ; avec un mélange de sondes centromériques et de peintures spécifiques des chromosomes des groupes D et G (13, 14, 15, 21 et 22). [23][24]

## D- HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE

De ces échecs et des limites de l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) classique est née l'idée de mettre au point une technique permettant une analyse globale du génome, en s'affranchissant de la contrainte représentée par l'obtention préalable de métaphases, Publiée pour la première fois en 1992 par Kallioniemi et al. , l'hybridation génomique comparative, ou CGH (Comparative Genomic Hybridization), répond au moins en partie à ces exigences. [26][28]

### D-1 Principes techniques

La technique repose sur l'hybridation compétitive de deux ADN marqués différemment sur des chromosomes lymphocytaires normaux (*figure 53*).

La première étape consiste à extraire l'ADN des cellules du patient étudié. Cet ADN peut être extrait à partir de suspensions cellulaires (sang, moelle osseuse, liquides d'épanchements) ou de tissu (tumeur, ganglion...). Par ailleurs, le tissu d'origine peut être du matériel frais, mais également du matériel congelé ou fixé (blocs de paraffine, culots de cytogénétique...).

Après extraction, cet ADN du patient (ADN test) est marqué par un fluorochrome émettant dans le vert, On marque parallèlement un ADN témoin (ADN de référence), extrait à partir du sang d'un individu normal, dans les mêmes conditions, mais avec un autre fluorochrome émettant dans le rouge. Ces deux ADN marqués correspondent à des sondes qui vont être hybridées en compétition sur une cible.

Dans la CGH classique, la cible est constituée par les chromosomes d'un sujet normal, il s'agit de métaphases préalablement fixés et étalés sur lames, en présence d'un ADN enrichi en séquences répétées afin de saturer ces dernières.

Cette hybridation se fait sur 2 jours à 37 °C. Après lavages pour éliminer l'ADN non hybridé, les chromosomes sont contre-colorés au DAPI afin de faire apparaître des bandes permettant leur identification.

Les lames sont ensuite examinées grâce à un microscope à fluorescence. On sélectionne alors une dizaine de métaphases comportant des chromosomes relativement allongés, avec peu de chevauchements, et montrant une fluorescence intense et homogène pour les deux fluorochromes.

Ces métaphases sont alors acquises grâce à une caméra CCD (non nécessairement refroidie) couplée à un logiciel d'analyse d'image. On réalise ensuite le caryotype de ces métaphases et on mesure l'intensité de fluorescence de chacun des fluorochromes le long de l'axe de chaque chromosome.

Les résultats de chacune des métaphases analysées sont ensuite regroupés et l'on trace le profil moyen correspondant au ratio de fluorescence de chaque chromosome.

Le ratio d'intensité des deux fluorochromes au niveau d'une bande aura une valeur théorique proche de 1 (un rapport compris entre 0.8 et 1.2 est considéré comme normal) si le nombre de molécules des deux génomes est identique au niveau de la bande observée :

- Ø En cas de délétion (perte de matériel génétique), ce rapport théorique sera de 0,5 et de 1,5 en cas de trisomie (gain de matériel génétique).

Une différence dans le nombre de copies d'ADN entre l'ADN étudié (test) et l'ADN de référence, pour un locus donné, modifiera le rapport d'intensité des deux fluorochromes. [27][28]

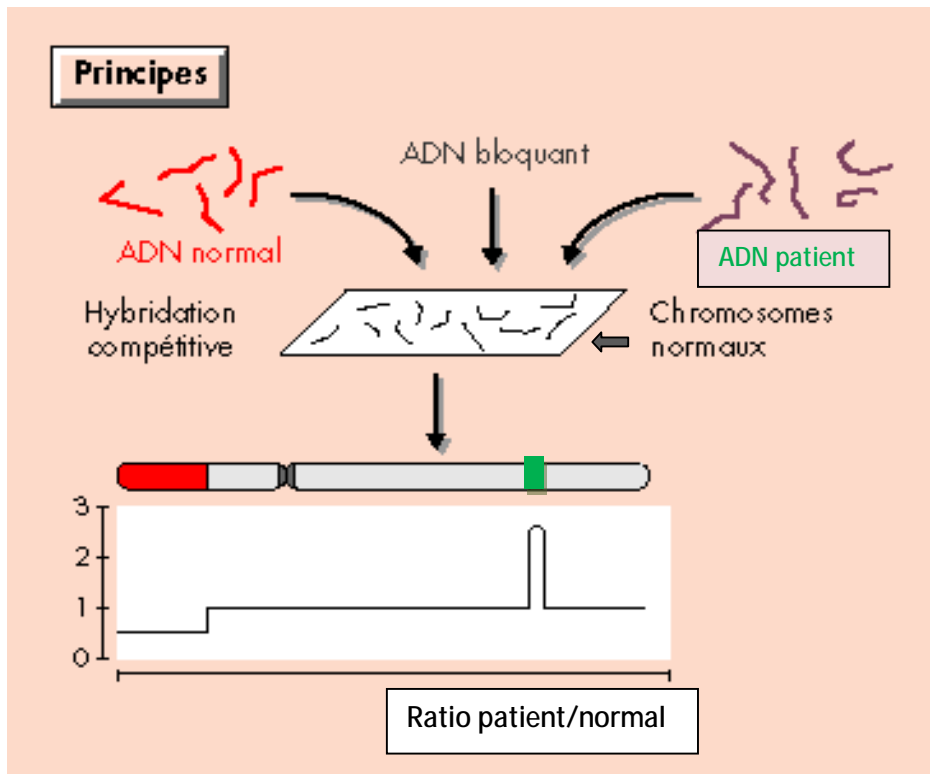


Figure 53 : dans cet exemple, l'ADN patient est marqué en vert. Le calcul du ratio de fluorescence le long de ce chromosome montre la présence d'une délétion de l'extrémité distale du bras court (hybridation préférentielle de l'ADN normal rouge) et une amplification génique sur le bras long (nette prédominance d'ADN patient vert se traduisant par un pic de fluorescence en regard)

## D-2 Applications cliniques

Initialement utilisée pour la détection de déséquilibres génomiques dans les tumeurs solides, la CGH a jusqu'à présent été peu employée dans les laboratoires de routine de cytogénétique constitutionnelle du fait des exigences techniques qu'elle impose. C'est pourtant la technique d'étude globale du génome la plus performante pour le diagnostic des déséquilibres génomiques et ce sans nécessité d'obtenir des métaphases.

Ses applications sont nombreuses :

- n Identification de fragments chromosomiques transloqués ou insérés dans un chromosome et détectés au préalable par les techniques de bandes. Elle constitue une alternative aux méthodes plus longues et moins précises de FISH avec les sondes de peinture.
- n Détection de microremaniements dès lors que leur taille est supérieure à 5 Mb. C'est ainsi que nous avons récemment montré que la CGH permettait non seulement le diagnostic de microremaniements interstitiels difficilement détectables par les techniques classiques mais aussi celui de la majorité des anomalies télomériques. Elle constitue donc une alternative à la FISH avec des sondes subtélomériques.

La CGH paraît être à ce jour la technique de choix à utiliser en cytogénétique constitutionnelle devant un tableau clinique de retard mental associé à des signes évocateurs d'anomalie chromosomique mais s'accompagnant d'un caryotype normal.

- n Etudes des grands déséquilibres génomiques observés dans les hémopathies malignes, les tumeurs solides et tous les processus cancéreux. [28][30]

### D-3 Limites de la CGH

Malgré son grand apport comme technique de pointe pour une étude globale du génome, elle ne permet pas de détecter les remaniements équilibrés (par exemple chez les parents d'un sujet atteint, les translocations ou inversions fréquentes dans les leucémies aiguës par exemple ne seront pas repérées).

La seconde limite est la contamination par des cellules non tumorales en pathologie cancéreuse. Comme toute technique globale, elle analyse l'ensemble des cellules du prélèvement, et si celui-ci est fortement contaminé par des cellules normales (cellules stromales, cellules réactionnelles...), les anomalies éventuellement présentes seront masquées par les cellules normales. On admet que le pourcentage de cellules tumorales doit être supérieur à 50 %.

La troisième limite est la résolution de la technique. En effet, une délétion ne peut être mise en évidence que si elle est supérieure à 10 à 15 Mb. Ceci tient au fait que l'on travaille sur des chromosomes métaphasiques et donc le niveau de résolution est celui de la bande chromosomique qui est de l'ordre de 5 à 10 Mb.

La dernière limite de la technique, outre le manque de reproductibilité, est en fait une contrainte technique. Il est en effet relativement difficile et très aléatoire d'obtenir de bonnes lames supports de l'hybridation. [29][30]

#### D-4 Dérivées de la CGH :

##### a- La CGH array

Compte tenu des limites de résolution de la CGH (5-10 Mb), tous les microremaniements ne peuvent être détectés par cette technique. Ceci est en particulier le cas pour les syndromes microdélétionnels connus qui sont générés par des microremaniements génomiques de l'ordre de 1-5 Mb.

Pour faire face à cette contrainte, Solinas-Toldo et Pinkel et al. proposent, vers la fin des années 1990, une autre technique de CGH sur des lames sur lesquelles sont fixés des fragments d'ADN.

Il s'agit de la CGH sur réseau d'ADN ou CGH array. [28][30]

Ø PRINCIPE :

A la fin des années 90, ces auteurs démontrent qu'il est possible d'effectuer une CGH sur des fragments d'ADN fixés sur des lames de verre. Très rapidement, avec le séquençage du génome, il fut possible de fixer sur ces lames, des séquences génomiques, appelées « sondes », représentant une partie plus ou moins importante du génome. Ces lames furent appelées « puce à ADN » ou *microarray*. (Figure 54)



Figure 54 : Puce à ADN

Comme pour la CGH sur métaphases, une même quantité d'ADN témoin et d'ADN patient marquée par deux fluorochromes différents (ce mélange est appelé « cible ») sont déposées sur la lame. (Figure 55)

Le rapport d'intensité de fluorescence est calculé au niveau de chaque fragment d'ADN fixé (appelé « sonde »).

Un traitement statistique des données est ensuite réalisé grâce à des logiciels dédiés.

Les résultats sont donnés sous forme graphique où un « point » correspond à la valeur du ratio d'intensité de fluorescence au niveau d'une sonde. L'ensemble des « points » est placé sur un idéogramme pour chaque chromosome.

A la différence de la CGH sur métaphases, l'existence d'un déséquilibre génomique sera objectivée par une déviation du ratio d'intensité de fluorescence non plus au niveau d'une bande chromosomique, mais au niveau des sondes fixées sur la lame.

Cette technique a plusieurs avantages. L'un des plus importants est sa modularité. En effet, il est possible de concevoir une puce qui puisse répondre à une problématique précise. Le niveau de résolution de la puce et sa complexité sont complètement modulables pour les équipes possédant la technologie nécessaire à la préparation des clones et à leur « spotting » sur une lame de verre.

Par exemple, une puce sur laquelle sont fixés des fragments d'ADN (extrait de BAC) couvrant tout le génome et espacés de 1Mb permet de détecter des déséquilibres génomiques avec une résolution de l'ordre de 1 Mb.

Mais il est également possible de faire une puce dite en contig, c'est-à-dire sur laquelle seront déposés des fragments d'ADN couvrant sans interruption une extrémité chromosomique d'intérêt. Par extension, il est possible de couvrir l'ensemble du génome humain (32 433 clones), ce qui a été montré en mars 2004 par Ishkanian et al. en créant les « puces pangénomiques » (représentant l'ensemble du génome). Cette puce permet en théorie de détecter tous les déséquilibres génomiques de plus de 150 kb (taille d'un clone). Cette technique a également l'avantage d'offrir la possibilité de connaître la séquence d'une région et donc les gènes, puisque les fragments d'ADN déposés ont été séquencés.

Ces données ont été reprises au sein de banques de données que l'on peut consulter sur internet. Il est ainsi possible, en se connectant sur le site de l'université de Californie (<http://genome.ucsc.edu/>) ou du *Sanger institute*

(<http://www.ensembl.org/>), de connaître la séquence nucléotidique d'une région donnée du génome ainsi que son contenu en gènes. [30][33]

Depuis le milieu des années 2000, les puces à oligonucléotides firent leur apparition. Il s'agit de lames sur lesquelles sont fixés des oligonucléotides d'environ 60-80 bases (ou « mer ») qui peuvent être déposés ou directement synthétisés dessus. Le nombre d'oligonucléotides peut atteindre plusieurs millions ce qui permet d'obtenir une résolution d'environ mille paires de base. Ces lames sont aujourd'hui commercialisées par de nombreuses compagnies.

La CGH array permet la détection de déséquilibres chromosomiques dont la taille varie avec la résolution de la puce utilisée. Parce que la CGH est une comparaison de nombre de molécules d'ADN d'un individu par rapport à un autre, un déséquilibre génomique de plus de 1 kb détecté par cette technique a été appelé CNV pour « *Copy Number Variant* » ou en français « Variation de Nombre de Copies ». [28][34]

#### b- UNE VARIANTE : les puces à SNPs

Il est possible de fixer sur les lames (avec le même principe qu'en CGH array) des oligonucléotides contenant des « Single Nucleotide Polymorphisms » ou SNPs. Ce sont des variations portant sur une seule paire de base, et distribuées uniformément dans le génome humain. On estime le nombre de SNPs à plus de 10 millions avec une répartition d'un SNP tous les 100 à 1000 paires de bases (1kb).

La carte des SNPs étant établie, différents procédés ont été mis au point pour synthétiser des oligonucléotides contenant pour un locus donné les 2 allèles du SNP.

L'avantage de l'utilisation de ces puces dites puces à SNPs est de pouvoir détecter les situations d'isodisomies uniparentales (perte d'hétérozygotie) et de déterminer l'origine parentale d'un remaniement (avec l'étude des parents).

Pour la plupart des sondes, l'hybridation s'effectuera sur les deux allèles. En cas de perte d'hétérozygotie, un seul allèle sera détecté. Celle-ci aura une signification lorsqu'elle impliquera plusieurs sondes adjacentes.

Ces puces ont initialement été développées à des fins d'haplotypage et d'analyse de liaison. Cependant, elles donnent également une information sur le nombre de copies d'ADN aux loci étudiés. [36][38]

Ces deux techniques sont aujourd'hui totalement automatisables et permettent de ce fait l'étude des déséquilibres génomiques à haut débit. L'acronyme ACPA qui signifie « Analyse Chromosomique sur Puces à ADN » (acronyme choisi par le réseau français AChro-Puce, (<http://www.renapa.univ-montp1.fr>) désigne aussi bien la technique de CGH array que celle des puces à SNPs. [32][34]

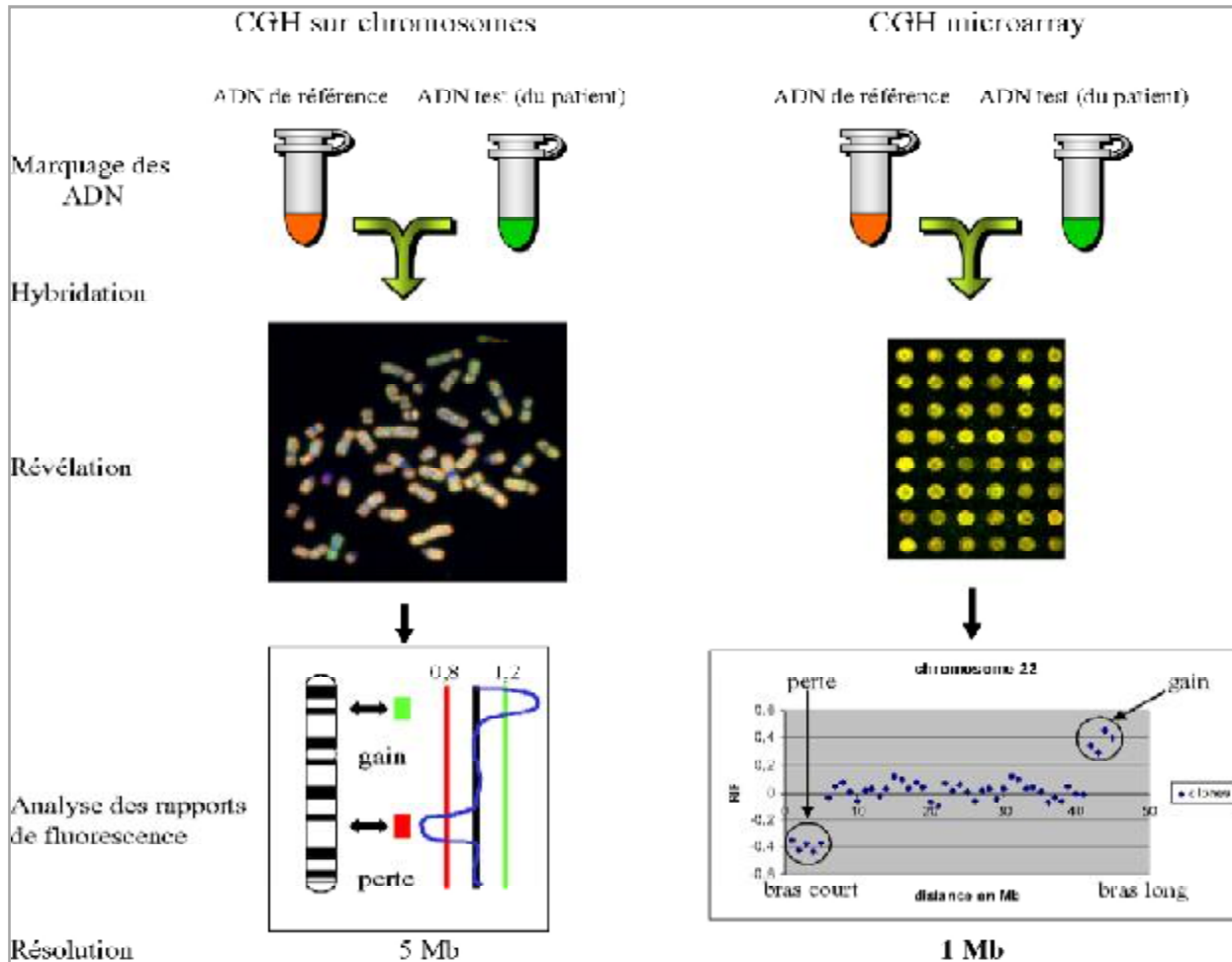


Figure 55 : Synoptique comparatif des principales étapes entre la CGH sur chromosomes à gauche et la CGH microarray à droite. Pour les deux techniques, l'ADN génomique d'un patient (ADN test) est marqué par un fluorochrome émettant dans le vert et de l'ADN génomique d'un sujet normal (ADN de référence), marqué par un fluorochrome émettant dans le rouge. Ces deux ADN seront cohybridés sur des chromosomes pour la CGH sur chromosomes ou sur des fragments d'ADN génomique déposés sous forme de spots pour la CGH microarray. La fluorescence est capturée soit à l'aide d'une caméra (CGH sur chromosomes), soit à l'aide d'un scanner (CGH microarray) et un logiciel calcule les rapports de fluorescence entre les deux ADN et représente les résultats sous forme graphique. Pour la CGH sur chromosome (en bas à gauche), les intensités de fluorescence rouge et verte sont mesurées le long du chromosome. Le ratio de fluorescence est calculé comme le quotient des intensités vert/rouge. Un profil est ainsi obtenu pour chaque chromosome et mis en regard d'un idéogramme permettant la localisation cytogénétique d'une éventuelle anomalie. Les régions chromosomiques ayant un ratio en dehors des limites 0,8–1,2 sont considérées comme étant respectivement sous- ou surreprésentées (inférieur à 0,8 : perte ; supérieur à 1,2 : gain). Pour la CGH microarray, chaque point correspond à un fragment d'ADN qui a été fixé sur la lame et qui est reporté sur l'axe des abscisses en fonction de sa position en Mb par rapport au télomère du chromosome analysé. Les ratios de fluorescence sont représentés en ordonnées. Normalement, il y a autant d'ADN marqué en vert que d'ADN marqué en rouge, le ratio entre les deux doit donc être proche de 1. Pour des problèmes de représentation graphique, la plupart des auteurs utilisent le  $\log_2$  de ce ratio, qui est donc égal à 0 ( $\log_2 1 = 0$ ). Si ce ratio est inférieur à  $-0,3$  il y a une perte (clones de gauche), s'il est supérieur à  $+0,3$ , il y a gain pour les clones concernés (clones de droite). Les bornes du remaniement sont données par le dernier clone normal et le premier clone redevenant normal. Ici est représenté un profil obtenu chez un patient présentant une perte proximale en 22q et un gain distal en 22 (En bas à droite).

CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE  
APPLICATIONS  
CLINIQUES

## A- LA FISH

Le caryotype est resté pendant plus de 50 ans le seul examen d'étude globale du génome. Il a été déterminant pour le diagnostic et la prise en charge de nombreuses pathologies constitutionnelles et acquises, notamment dans les hémopathies malignes (nosologie et choix thérapeutique). Ses principales limites sont sa résolution (au maximum 5 millions de paires de bases, 5Mb), la difficulté de caractériser certaines anomalies (les bandes noires, grises ou blanches de différents chromosomes se ressemblent respectivement), la nécessité d'obtenir des mitoses et l'impossibilité d'établir un rapport phénotype - génotype précis c'est-à-dire au niveau moléculaire. L'utilisation de la FISH sur des métaphases et sur des noyaux a permis de dépasser certaines de ces limites. [25][27]

### A.1 La FISH sur métaphase : un complément du caryotype

#### a- Le Diagnostic cytogénétique des microremaniements chromosomiques

L'une des applications les plus communes de la FISH est le diagnostic des microremaniements chromosomiques. Il s'agit le plus souvent de microdélétions ou de microduplications spécifiques de syndromes cliniques bien individualisés dont les plus connus et diagnostiqués sont les syndromes de DiGeorge (22q11.2), de Williams (7q11.23). Néanmoins, dans la grande majorité des syndromes, un chromosome candidat avait été identifié grâce aux techniques standards, par la découverte de translocations intéressant la région correspondante. Quand ces nouveaux syndromes sont décrits et reconnus cliniquement, la cytogénétique moléculaire peut remplacer ou compléter la technique de haute résolution, d'autant plus que des délétions infra-microscopiques ont été décrites.

Aussi, l'un des exemples les plus démonstratifs de ces dernières années a été l'étude des régions terminales des chromosomes par FISH grâce à l'isolement de sondes subtélomériques spécifiques. Celles-ci ont permis de découvrir de nombreux remaniements télomériques chez des patients atteints de retard mental avec dysmorphie et dont le caryotype avait été considéré comme normal. [26][27]

#### b- 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. [27]

#### c- Caractérisation d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype

Une autre application majeure de la technique de FISH est la caractérisation d'une anomalie chromosomique décelée sur le caryotype. La découverte d'une telle anomalie, apparue de novo et/ou complexe nécessite parfois le recours à la cytogénétique moléculaire quand l'observation des bandes chromosomiques n'est pas déterminante pour en connaître avec certitude l'origine. Le choix des sondes

s'effectue grâce à l'orientation donnée par l'aspect chromosomique obtenu par différentes techniques classiques (bandes G, R, Q...) et parfois grâce aux données cliniques évocatrices.

L'origine de certains anneaux, de petits chromosomes surnuméraires, d'un deuxième chromosome impliqué dans une translocation de petite taille, d'une translocation ou d'une insertion apparue de novo sont autant d'indications de l'utilisation de la FISH dans ce cadre. La vérification d'une délétion, d'une duplication..., la précision des points de cassures de certains remaniements permettent par ailleurs un affinement du diagnostic. [24][26]

#### d- Détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées

Certaines translocations ne sont pas détectables par les techniques de bandes. C'est le cas lorsque les anomalies sont de petites tailles ou lorsque les segments échangés sont de même taille et même aspect.

Les chromosomes dérivés ressemblent alors à ceux qui ne sont pas remaniés. Dans ces situations, la FISH sur métaphase avec des sondes de peinture ou des sondes télomériques peut être d'un grand intérêt. C'est fut le cas lors de la découverte de la translocation la plus fréquente associée aux leucémies aiguës lymphoblastique de la lignée B de l'enfant : la t(12.21)(p13;q21) . [27]

## A.2 La FISH interphasique

La FISH interphasique est une technique qui s'est rapidement imposée car elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. En effet, les signaux d'hybridation générés par les sondes d'une taille de plus de 150 kb sont visibles sur les noyaux. Un plus grand nombre de cellules (les noyaux sont 10 à 50 fois plus nombreux que les métaphases sur une préparation de cellules cultivées) peuvent être ainsi étudiées.

Ses applications concernent la détection d'anomalies chromosomiques associées à des pathologies constitutionnelles ou acquises. [26][28]

### a- Le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques

L'une des applications les plus connues de la FISH interphasique est le diagnostic des aneuploïdies et plus particulièrement les trisomies 13, 18 et 21 sur amniocytes non cultivées mise au point dès les années 1994. L'hybridation de sondes centromériques ou de toute autre sonde générant un signal ponctuel et fort permet de repérer un ou plusieurs locus dans des noyaux en interphase (Figure 56). On peut ainsi dénombrer rapidement les chromosomes identifiés par ces sondes sur un grand nombre de cellules. Cette technique permet d'effectuer des diagnostics rapides, en 24 heures, aneuploïdies complètes ou en mosaïque, syndromes microdélétionnels, qui sont particulièrement utiles en période prénatale. [31][32]

À partir de cellules obtenues par ponction de liquide amniotique, au premier trimestre de grossesse, l'hybridation de sondes spécifiques de loci des chromosomes 13, 18 et 21 permet en 24 heures, sans attendre 10 à 15 jours de culture, la détection d'une aneuploïdie impliquant ces 3 chromosomes.

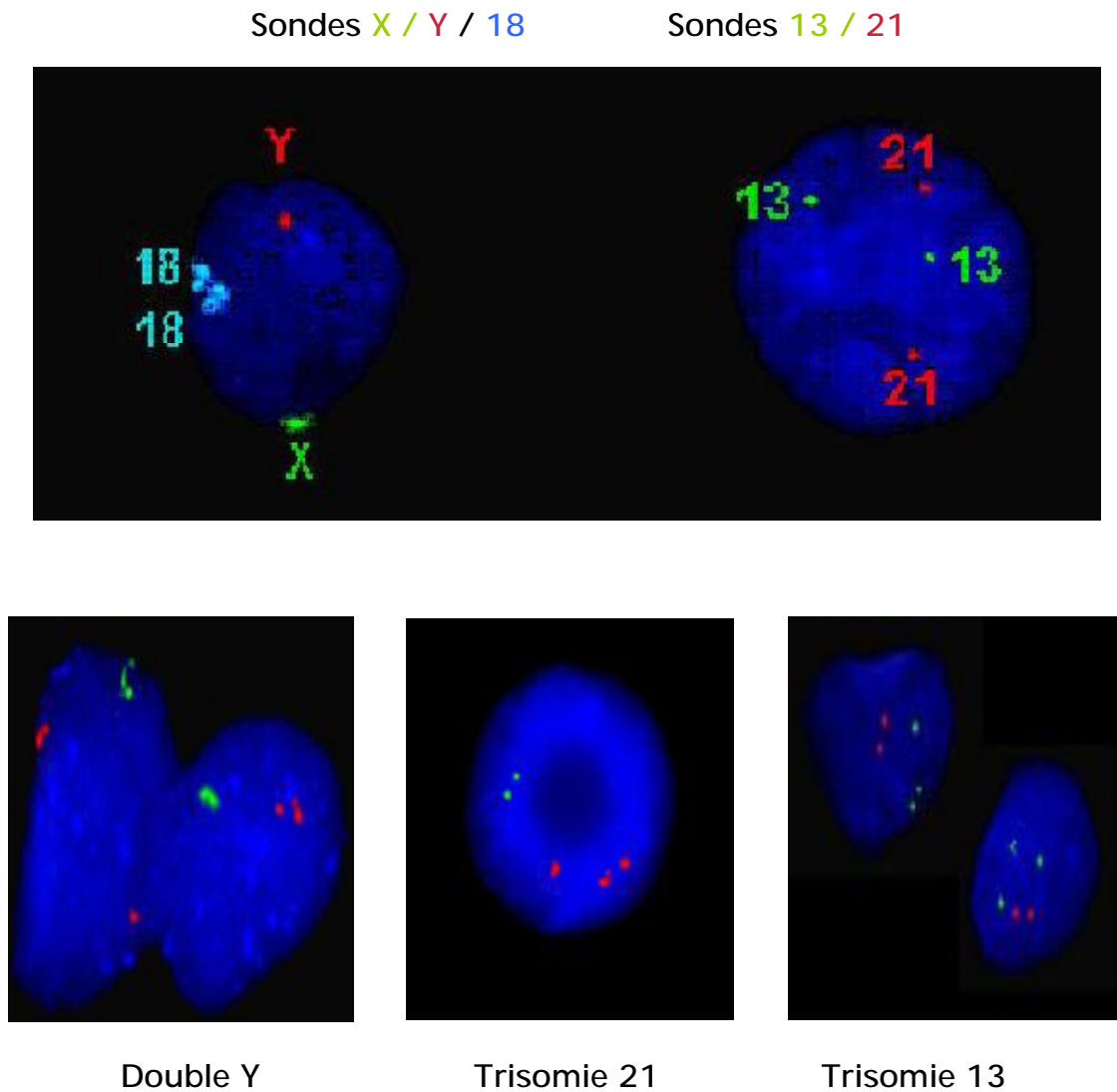


Figure56 : FISH INTERPHASIQUE

Dépistage aneuploïdies des chromosomes 13, 18, 21, X et Y

b- Le Diagnostic préimplantatoire des anomalies chromosomiques

L'une des applications les plus spectaculaires de la FISH sur noyau interphasique est certainement le diagnostic préimplantatoire des anomalies chromosomiques. La situation la plus fréquente est celle où l'un des parents est porteur d'une translocation équilibrée (cela concerne 1 couple sur 300). La ségrégation méiotique peut générer des gamètes déséquilibrés à l'origine de trisomies ou de monosomies partielles conduisant, selon l'importance du déséquilibre génomique, à des fausses couches spontanées, des morts fœtales in utero ou des enfants présentant une déficience intellectuelle et/ou des malformations congénitales.

Après fécondation in vitro, il est possible de prélever des blastomères d'une morula non compactée et de détecter par FISH les embryons porteurs d'un déséquilibre génomique. Pour cela, on utilise 3 sondes télomériques, dont deux spécifiques des télomères des segments chromosomiques transloqués. L'étude du nombre de signaux après hybridation de ces sondes sur les deux blastocystes prélevés permet de repérer les embryons sans déséquilibre chromosomique afin de les réimplanter.

Aussi, le diagnostic du sexe dans les affections récessives liées à l'X est une indication d'important impact pour la sélection et la réimplantation que des embryons de sexe féminin. [31][32]

c- La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans hémopathies malignes

L'une des difficultés de l'étude chromosomique dans les hémopathies malignes est l'existence de mosaïcismes et de chromosomes très remaniés, peu reconnaissables. De plus, il peut être difficile dans certains types de cancers,

d'obtenir un nombre de mitoses suffisant issues des cellules cancéreuses pour établir avec certitude un diagnostic.

L'utilisation de la FISH en interphase est le moyen le plus facile dans ces situations pour détecter les anomalies chromosomiques spécifiques dont dépendent le diagnostic et le pronostic de l'hémopathie étudiée.

Les remaniements du gène MLL dans les leucémies aiguës peuvent facilement être recherchés sur noyaux en interphase. Il existe des pathologies, dans lesquelles certaines équipes ne pratiquent que la FISH interphasique comme examen des chromosomes. C'est le cas des leucémies lymphoïdes chroniques pour lesquelles elles ne recherchent par FISH interphasique que les délétions des gènes P53, et ATM et du locus 13q14 ainsi que la trisomie 12, anomalies dont dépend le pronostic, et également la caractérisation de la translocation t(9;22) qui peut se faire grâce à l'utilisation d'un couple de sondes localisées aux points de cassure et révélées par des fluorochromes différents (FISH bicolore) sur noyaux.

Par ailleurs, la FISH interphasique peut aider à la surveillance de greffes de moelle avec donneur de sexe différent par recherche de chimérisme XX/XY. [35]

#### d- Le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires

Il est possible d'hybrider des sondes sur des coupes fines de tissus fixés par de la paraffine et sur des cellules obtenues par apposition de coupes de tissus congelés. Ces techniques de FISH sont d'une très grande utilité en fœtopathologie ou en pathologie cancéreuse, lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir du tissu vivant ou des cultures du tissu concerné.

Par ailleurs, du point de vue fondamental, le ou les gènes jouant un rôle dans le processus évolutif de la cancérogenèse peuvent être localisés au niveau des points de cassure des remaniements spécifiques ou récurrents d'un type particulier de

tumeurs. La FISH peut aider à la caractérisation de ces gènes (oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur) par une première approche fine de localisation pour aboutir à leur clonage. Au niveau des tumeurs solides, il existe souvent des remaniements complexes : gains, pertes de chromosomes entiers ou partiellement, délétions ou amplifications chromosomiques. L'analyse cytogénétique classique est parfois difficile : culture cellulaire aléatoire, qualité médiocre des métaphases obtenues, index mitotique faible, contamination des cellules tumorales par du tissu sain. La FISH permet en partie de limiter les inconvénients de ce type de culture de tumeur notamment par le grand nombre de cellules pouvant être examinées aussi bien en métaphase qu'en interphase pour les sondes centromériques et locus spécifique. [22]

*En résumé, la FISH sur métaphase est devenu le complément indispensable du caryotype. Sur noyau interphasique, elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. Cependant, elle reste un examen ciblé du génome qui nécessite de connaître l'anomalie à rechercher.*

## B- LA CGH ARRAY

### B.1 La CGH array, technique de recherche clinique en pathologie acquise

Les anomalies chromosomiques impliquées dans le diagnostic et le pronostic des cancers sont souvent équilibrés. Dans les hémopathies malignes, près de 400 anomalies chromosomiques récurrentes et équilibrées ont été rapportées. Pour ces raisons (anomalies équilibrées, mosaïcisme et anomalies ciblées), la CGHarray n'est pas, en 2012, un examen de première intention pour le diagnostic cytogénétique de ces pathologies. Néanmoins, en recherche, l'étude d'échantillons tumoraux par CGH array a permis d'identifier des anomalies récurrentes, de mieux classifier les tumeurs, de reconnaître des facteurs pronostiques (progression tumorale, réponse thérapeutique) et d'identifier de nouveaux oncogènes. L'une des découvertes majeure fut la mise en évidence de délétions du gène IKAROS à l'origine de l'acutisation des leucémies myéloïdes chroniques. [19][29]

### B.2 La CGH array : Technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles.

À l'inverse des pathologies acquises, la CGH est aujourd'hui l'examen de choix pour l'étude en routine des pathologies associées aux anomalies chromosomiques constitutionnelles. En effet, outre de très rares anomalies de structures équilibrées de novo (inversions ou translocations), ce sont les déséquilibres génomiques (gains ou pertes de matériel chromosomique) qui sont les principales causes chromosomiques des syndromes décrits.

La CGH array, permet non seulement de détecter les anomalies chromosomiques déséquilibrées détectées par le caryotype (taille supérieure à 5 et

10 Mb) mais aussi celles qui sont cryptiques. Aujourd'hui, c'est une technique fiable, reproductible et automatisable. [34][36]

Ø Comment interpréter une CGH array ?

Après cohybridation, la lecture de la puce à ADN en CGH array s'effectue à l'aide d'un scanner qui détermine les rapports d'intensité entre chaque fluorochrome et compare ainsi le nombre de copies de chaque ADN (patient et référence) au niveau de chaque marqueur étudié. L'analyse recherche la différence de nombre de copies (CNV pour copy number variation) entre le patient et la référence.

Ces CNV peuvent être en perte (délétion) : il manque une partie de la séquence nucléotidique chez le patient ou en gain (duplication) : il y a une portion de séquence nucléotidique supplémentaire chez le patient.

La signification d'un CNV identifié dans la pathogénèse du phénotype observé peut parfois être très difficile à établir. Certains CNVs sont clairement pathogènes mais parfois avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable alors que d'autres posent des problèmes d'interprétation. D'autres encore sont considérés comme bénins. [38]

a- Classification des CNVs

✓ Les CNVs bénins

Jusqu'à récemment, il était communément admis que l'ADN entre deux individus était identique à 99,9%. Seules les variations « qualitatives » de l'ADN liées à des modifications de bases nucléotidiques étaient alors connues. L'étude génomique de témoins par CGH array a mis en évidence l'existence de CNVs considérés comme bénins. L'étude de ces CNVs a montré qu'il s'agissait le plus souvent de répétitions en tandem de cassettes d'ADN de taille variable (la plupart

d'entre elles ont une taille inférieure à 100kb) pouvant comprendre des séquences codantes et non codantes. Le nombre de répétition de ces cassettes (de 0 à plus de 20) varie d'un individu à l'autre et définit les allèles du CNV qui se transmettent de manière mendélienne. Lorsque ces CNVs sont retrouvées chez plus de 1% de la population, on parle de polymorphismes ou *Copy Number Polymorphisms* ou CNPs. S'ils sont présents dans moins de 1% de la population, on parle de « variants bénins privés ». La majorité de ces CNPs sont sans conséquence phénotypique actuellement décelée alors que d'autres sont associés à des maladies multifactorielles fréquentes (comme le lupus) ou sont le témoin de l'adaptation humaine à l'environnement.

▼ Les CNV pathogènes

D'autres CNV sont clairement associés à un phénotype anormal. Ce sont souvent des CNV d'une taille supérieure à 400 kb.

Dans les grandes séries de patients avec retard mental et/ou malformations congénitales testés par CGH array, des CNVs pathogènes cryptiques sont retrouvés dans environ 10 à 15% des cas. Classiquement, ils surviennent de novo, correspondent à des délétions (70% des cas) et sont plutôt de grande taille (en moyenne de 2,8 Mb). On admet qu'à partir de 1,5Mb, un CNV est quasiment toujours associé à la pathologie observée. [36][39]

▼ Les CNV pathogènes avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable

Certains CNV identifiés chez des patients avec un phénotype anormal sont nécessaires à la survenue de la pathologie mais ils ne sont pas suffisants en raison de leur présence chez un des deux parents sains ou des individus normaux. Ces CNV rares confèrent un risque plus ou moins important de développer la pathologie.

Un exemple éloquent où il a été mis en évidence un CNV rare avec une pénétrance incomplète correspond au syndrome TAR (Thrombopénie et Absence de Radius). Cette pathologie associe une thrombopénie centrale et une absence bilatérale de radius. On note une grande variabilité phénotypique incluant, à des degrés divers, des anomalies cardiaques, gastro-intestinales, squelettiques et hématologiques. Par une approche CGH array Klopocki E and al. ont mis en évidence une délétion 1q21 d'environ 200 kb chez tous les patients présentant un syndrome TAR.

Cette délétion n'a pas été retrouvée chez 700 individus contrôles et n'est pas répertoriée dans la Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>). Cependant, environ 75% des parents sont porteurs de l'anomalie sans être atteints. Des facteurs génétiques ainsi que des facteurs épigénétiques et environnementaux peuvent modifier la pénétrance et l'expressivité d'une pathologie génétique. Dans le syndrome TAR, la présence d'un ou de plusieurs gène(s) modificateur(s) pourrait expliquer la pénétrance incomplète et l'expressivité variable de la maladie. Une meilleure compréhension des interactions entre ces différents facteurs permettrait d'établir des corrélations génotype-phénotype et ainsi de proposer un conseil génétique plus précis. [36][38]

✓ Les CNV dont la signification clinique est incertaine

Environ 10% des CNV soulèvent des difficultés d'interprétation. Ils correspondent le plus souvent à des duplications (70% des cas) d'une taille d'environ 700kb et héritées de l'un des deux parents sains ou retrouvés dans des populations témoins.

Plusieurs éléments sont à considérer pour déterminer si le CNV identifié est délétère ou non. Miller et al. ont ainsi proposé une table avec différents critères

d'évaluation des CNV pour aider à l'interprétation des résultats. Les arguments majeurs pour affirmer qu'un CNV est pathogène sont : son caractère de novo, sa taille supérieure à 400 kb, son contenu riche en gènes et l'existence d'autres patients avec le même CNV dont le phénotype est anormal (il peut s'agir de syndromes connus ou non). A l'inverse, un CNV hérité d'un parent sain, décrit chez des individus normaux dans les bases de données, pauvre en gènes et de petite taille est très souvent bénin.

En routine, pour éviter de détecter des CNV bénins et de signification incertaine, il est préconisé de fixer le seuil de détection d'une anomalie à 400 kb pour le diagnostic des microremaniements chez les patients avec déficience intellectuelle et/ou malformations congénitales.

Du fait de la difficulté d'interprétation de certains CNVs ou de la possible détection d'un CNV ayant un impact médical sans lien avec l'indication initiale, il est important qu'une information claire doive être fournie aux parents. Le recueil d'un consentement spécifique en vue de la réalisation de cette analyse est nécessaire.

[37][39]

b- Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents

Il est toujours nécessaire de vérifier par une autre technique un CNV mis en évidence par CGH array. Il convient en effet d'exclure un faux positif (ce qui est aujourd'hui rare avec les puces à oligonucléotides) mais surtout de déterminer le mécanisme chromosomique sous jacent du remaniement.

Par exemple, un gain de matériel chromosomique peut être le résultat de la présence d'une duplication « in situ », d'un dérivé d'une insertion ou d'un marqueur chromosomique. On peut utiliser des techniques de biologie moléculaire (qPCR,

QMPSF..., en particulier lorsqu'il s'agit d'une duplication de petite taille) mais la technique de référence reste la FISH sur chromosome car, réalisée sur le proposant et ses parents, elle renseigne sur le mécanisme chromosomique à l'origine du CNV et sont caractère de novo ou non. [40]

c- Utilisation des bases de données de variants de structure du génome

Pour aider à l'interprétation des résultats, il existe différentes bases de données.

La Database of Genomic Variant (<http://projects.tcag.ca/variation>), répertorie les CNV bénins identifiés chez des témoins.

Les bases de données DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk>) et ECARUCA (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca>) colligent les CNV retrouvées chez des patients avec DI et/ou MC.

Les informations fournies sont précieuses car elles aident le cytogénéticien dans l'établissement du rapport phénotype - génotype. [40][41]

### B.3 CGH array et recherche clinique en pathologie constitutionnelle

Du fait de la connaissance du contenu en gènes du segment remanié, le cytogénéticien peut rechercher le(s) gène(s) potentiellement impliqué(s) dans le phénotype. Par ailleurs, la comparaison d'anomalies chevauchantes chez plusieurs patients permet d'identifier des régions et/ou des gènes contribuant à un signe clinique spécifique voir à l'ensemble des symptômes du syndrome.

Par exemple, l'étude par CGH array de patients porteurs de délétions chevauchantes de la région 5q14.3q15 a permis l'identification du gène majeur (MEF2C) responsable du phénotype cognitif. En effet, des mutations dans ce gène

ont été mises en évidence chez des patients avec une déficience intellectuelle sévère.

Classiquement, les syndromes ont été initialement décrits cliniquement et les bases génétiques n'ont été découvertes que secondairement. La CGH array permet un processus inverse où l'indentification de l'anomalie chromosomique précède la description phénotypique. Ainsi, la CGH array permet d'aller du génotype au phénotype. De nombreux syndromes ont été ainsi décrits cliniquement comme la délétion 17q21.31. [36][37][39]

# CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE ET SYNDROMES MICRODELETIONNELS

## A- DEFINITION

Les syndromes microdélétionnels, bien connus par les pédiatres et les généticiens, correspondent à une entité clinique particulière, associant généralement : un retard mental, une dysmorphie avec des malformations d'organes et des troubles du comportement.

Ils sont liés à une microdélétion particulière, d'un segment chromosomique couvrant plusieurs gènes délétères, pouvant chacun contribuer indépendamment au phénotype et non visible sur un caryotype standard. Il s'agit d'un syndrome de gènes contigus le plus souvent de novo par perte de fragments chromosomiques de petites tailles infra-microscopiques (< 5 mégabases). Cette microdélétion est décelable uniquement par l'utilisation des techniques de haute résolution ou de cytogénétique moléculaire dont la plus utilisée en pratique médicale est l'hybridation in situ fluorescente « FISH » [36][42]

## B- DONNEES FONDAMENTALES

Les premiers syndromes par microdélétion/duplication ou syndromes de gènes contigus ont été décrits dès 1978 grâce aux techniques de cytogénétique de haute résolution.

Ces remaniements de petite taille, inférieure à 5 Mb, le plus souvent, sont associés de façon spécifique à des syndromes cliniques décrits indépendamment de l'anomalie chromosomique.

Le phénotype anormal résulte d'un dosage inapproprié de certains gènes dans une région critique. Ce déséquilibre peut résulter d'un mécanisme structurel (délétion ou duplication) ou fonctionnel (empreinte ou disomie uniparentale).

L'étude moléculaire de ces régions a permis de définir les régions minimales critiques impliquées dans l'apparition du phénotype. [43]

Les caractéristiques communes des syndromes microdélétionnels :

- Leur identification est clinique
- Dans certains cas, un des signes cliniques peut apparaître isolé et de transmission mendélienne.
- L'anomalie chromosomique associée est décelable par les techniques de haute résolution avec une fréquence variable.

Les exemples les plus connus des syndromes microdélétionnels incluent le syndrome de Prader-Willi (PWS) en 15q11-q13, le syndrome de Williams en 7q11, le syndrome de Smith-Magenis (SMS) en 17p11.2, et le syndrome de DiGeorge/vélocardiofacial (DG/VCFS) en 22q11.2.

Ces microdélétions/duplications surviennent habituellement de novo avec un taux de mutation élevé dans la population générale. Cette observation suggérait fortement l'existence de facteurs favorisant leur survenue. Le clonage des points de cassure de certains de ces syndromes microdélétionnels a mis en évidence des répétitions de séquences d'ADN d'un type particulier. Ces éléments très particuliers, appelés répétitions segmentaires, duplions ou encore LCR (*low-copy repeats*) représentent au moins 5 % de notre génome et constituent la base moléculaire de ces remaniements intrachromosomiques récurrents. [44]

En effet, la présence de séquences d'ADN répétées favorise l'apparition des réarrangements chromosomiques à l'origine du syndrome, du fait de leur rôle important dans différents processus méiotiques comme l'appariement de régions chromosomiques homologues et la recombinaison génétique. Un appariement défectueux de ces séquences entraîne une recombinaison anormale avec comme

conséquence l'apparition d'une aneusomie segmentaire (anomalie quantitative du matériel génétique).

Certaines régions du génome, plus particulièrement les régions péricentromériques et subtélomériques des chromosomes, sont enrichies en ce type de séquences. [45]

Ainsi, les syndromes microdélétionnels peuvent être classés en deux grands groupes :

- Les microdélétions interstitielles, parmi lesquelles les microdélétions péricentromériques occupant une place tout à fait essentielle ;
- Les microdélétions subtélomériques, qui font actuellement l'objet de nombreux travaux mais qui restent cependant encore mal définies cliniquement.

## C- MICRODELETIONS INTERSTITIELLES

### C-1 Microdélétions péricentromériques

De façon remarquable, il est apparu que les microdélétions localisées dans les régions proches des centromères étaient d'une taille équivalente chez la grande majorité des patients. La découverte des séquences répétées d'ADN (*LCR*) à ce niveau a envisagé un mécanisme commun de survenue en favorisant des échanges inégaux lors de la méiose expliquant ainsi le caractère accidentel et récurrent des aneusomies segmentaire de taille égale dans la population. [44]

Si le caractère accidentel correspond à la grande majorité des cas, il faut retenir que des remaniements chromosomiques parentaux apparemment équilibrés ont été rapportés : une donnée très récente, dans le syndrome de Williams, montre

que certains parents présentent une inversion de la région 7q11.23, facteur favorisant l'apparition de la délétion. Il a également été rapporté des cas de mosaïque germinale, deux dans le syndrome de DiGeorge et un dans le syndrome de Williams.

Ces données imposent sur un plan pratique de réaliser des analyses chromosomiques des parents en vérifiant avec la technique la plus adaptée la structure de la paire chromosomique impliquée d'une part, et prendre en compte dans l'évaluation du risque de récurrence, les cas de mosaïques germinales. [46]

L'expression phénotypique de ces syndromes a été étudiée sur de larges populations de patients permettant de définir les critères de diagnostic clinique englobant signes dysmorphiques, malformations connues et profil comportemental caractéristique.

a- Le syndrome de DiGeorge et délétion 22q11.2

Bien que cliniquement sous-estimé, le syndrome de délétion 22q11 est le syndrome de microdélétion la plus commune (MIM # 188400 / # 192430), avec une prévalence estimée à 1 sur 4000 naissances vivantes. Toutefois, l'incidence réelle peut être plus élevée en raison de la variabilité d'expression.

En comparaison avec la trisomie 21 qui est vu dans 1 cas sur 1200 nouveau-nés, la délétion 22q11.2 est la deuxième cause de retard de développement et d'anomalies cardiaques congénitales après le syndrome de Down, ce qui représente environ 2,4% des personnes atteints de retard mental et environ 10% à 15% des patients atteints de tétralogie de Fallot. [48]

Le spectre clinique du syndrome de DiGeorge est extrêmement étendu et variable de plusieurs syndromes proches (syndrome Vélocardiofacial, syndrome Dysmorphie Facial et Cardiopathie Conotruncale, syndrome de DiGeorge). Ceci

s'expliquent par l'origine de ces syndromes : la taille de la région délétée 22q11.2 est considérable aux environs de 3Mb mais il existe une sous région, dite la région critique de DiGeorge VéloCardioFacial, qui est beaucoup plus petite d'environ 250-300Kb et qui constitue la région obligatoirement délétée dans un syndrome de DiGeorge (*DGCR : DiGeorge Critical Region*). Après l'utilisation généralisée de la FISH, les patients avec une délétion de cette région sont désignés par leur étiologie chromosomique : les syndromes de la délétion 22q11.2 [49]

#### Ø *Diagnostic cytogénétique*

Le diagnostic de la microdélétion est fait grâce à la technique de FISH (positive dans 97% des cas) avec actuellement recours à la CGHarray afin de délimiter avec plus de précision la taille de la région impliquée et les gènes délétères. Cependant, un caryotype de haute résolution peut s'avérer nécessaire si une microdélétion importante ou une translocation impliquant le chromosome 22 sont suspectées.

Les sondes les plus utilisées en FISH sont : la sonde D22 et la sonde TUPLE 1 intéressants la bande 22d11.2, et la sonde ARSA spécifique de la région 22q13, à distance de la région critique, et qui est utilisée comme sonde témoin pour être sûr que le chromosome exploré est le chromosome 22. (Figure 57)

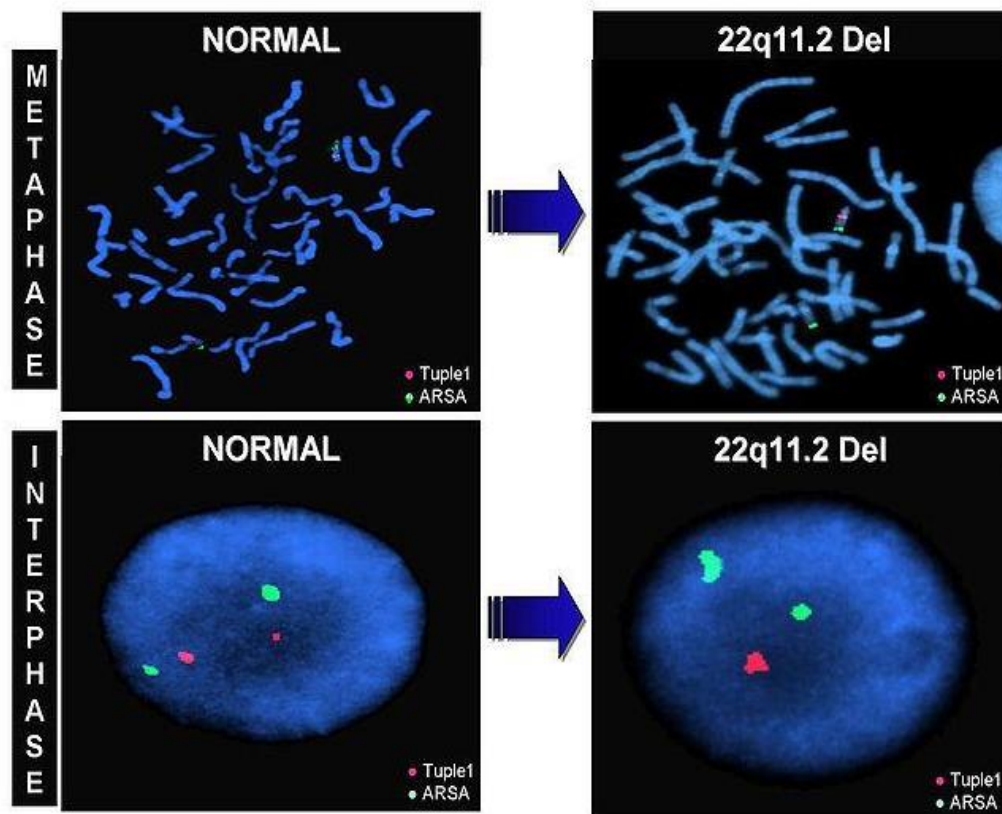


Figure 57 : FISH normale (deux spots rouges et deux spots verts) et délétion 22q11 (deux spots verts « sonde contrôle ARSA » et un seul spot rouge « sonde TUPLE 1 »)

L'étude moléculaire de la région 22q11.2 a permis l'identification de plus d'une vingtaine de gènes candidats qui pourrait être responsable des différents phénotypes observés en fonction des gènes emportés par la délétion. Parmi ces gènes, on cite le gène HIRA ou TUPPLE 1 (*Histone cell cycle Regulation S. cerevisiae homolog-like A*), facteur de transcription exprimé à la période critique du développement du cœur et des crêtes neurales ; CDC45L (*Cell Division Cycle 45, S. cerevisiae homolog-like*), codant une protéine impliquée dans la réplication ; UFD1L (*Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like*), codant une protéine qui intervient dans la voie de l'ubiquitination. Le meilleur candidat actuel semble être le gène TBX1 (*T-Box transcription Factor gene*), facteur de transcription, qui permet la migration des

cellules de la crête neurale du fœtus, dont l'inactivation chez la souris à l'état hétérozygote reproduit de façon remarquable les anomalies malformatives de ce syndrome. [31]

Le tableau clinique de cette délétion est caractérisé par une extraordinaire variabilité allant du syndrome de DiGeorge typique au patient asymptomatique.

#### Ø *Phénotype clinique*

##### ▼ *Syndrome de DiGeorge*

Dans sa forme complète, ce syndrome associe une dysmorphie faciale, une cardiopathie conotruncale, une hypoplasie thymique et une hypocalcémie par hypoplasie des parathyroïdes.

- La dysmorphie faciale, discrète mais caractéristique, est faite de fentes palpébrales étroites, hypertélorisme, oreilles arrondies mal ourlées et bas implantées, racine du nez élargie, nez tubulaire, un philtrum court, une petite bouche (microstomie) et une micrognathie. Le diagnostic est en général facile en période néonatale (équipe expérimentée). (Figure 58) [49][52]

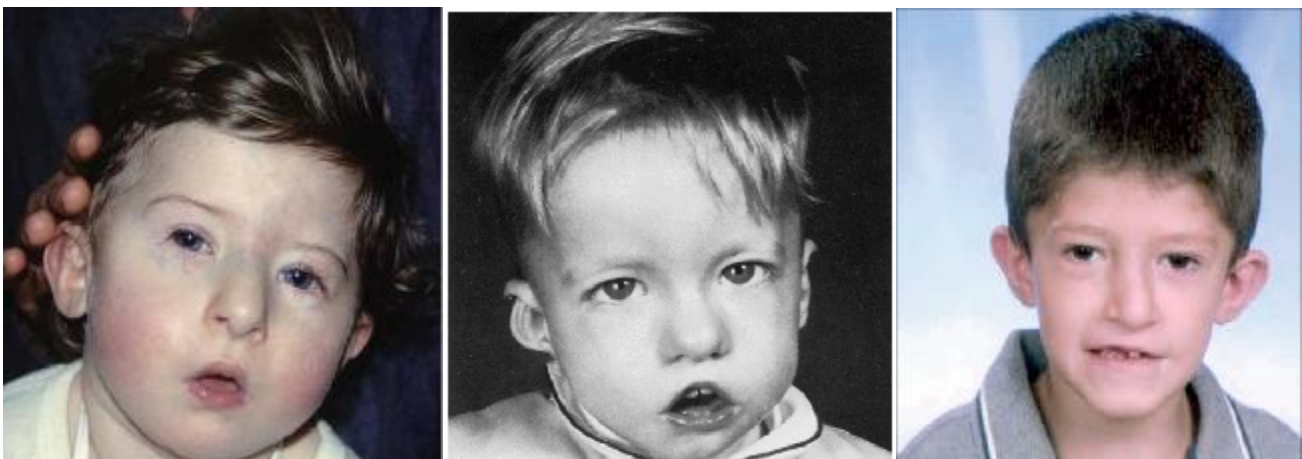


Figure 58 : Syndrome de Di George à différents âges de vie  
Noter le nez tubulaire caractéristique, l'hypertélorisme, la microstomie, le micrognathisme et l'aspect des oreilles chez les trois patients.

- La cardiopathie conotruncale, accessible à la chirurgie, est présente dans 75% des cas et elle est souvent le premier signe d'appel conduisant à une consultation spécialisée. Il s'agit d'une tétralogie de Fallot dans 22% des cas, d'une interruption de la crosse aortique dans 15% des cas, d'une communication interventriculaire dans 13% des cas, d'un tronc artériel commun dans 7% des cas et d'autres cardiopathies dans 18% des cas. [53]
- Le déficit immunitaire est présent dans 1% des cas, du fait de l'hypoplasie thymique, caractérisé par une susceptibilité aux infections bactériennes et virales.
- Le pronostic mental reste la question essentielle des familles ;une étude sur plusieurs centaines de patients montre que 62% des patients ont un développement mental normal ou un retard très modéré avec des difficultés d'apprentissage. Le retard mental sévère est rare.
- Des caractéristiques communes de comportement et de tempérament sont l'impulsivité, la désinhibition, la timidité et le retrait. Le manque d'attention et l'hyperactivité sont fréquents. A l'adolescence, le risque de trouble de l'humeur, de schizophrénie et trouble bipolaire est élevé. [49][51]

▼ *Le syndrome VCF ou vélo-cardio-facial (syndrome de Shprintzen ou syndrome de Takao)*

Ce syndrome, décrit par Shprintzen en 1978, associe une fente palatine avec insuffisance vélopharyngée, une malformation cardiaque de type conotruncale, une dysmorphie faciale, des difficultés d'apprentissage et des troubles psychotiques dans 15% des cas.

∅ La dysmorphie faciale, les cardiopathies ainsi que le profil comportemental est identique au syndrome de DiGeorge [52]

✓ *CATCH 22*

En fonction de la taille de la microdélétion et des gènes impliqués, cette anomalie chromosomique est associée à une grande variabilité clinique. Sa présence peut associer une cardiopathie conotruncale, une fente palatine et une hypoparathyroïdie isolée. Elle peut parfois être tout à fait inhabituelle avec association aux malformations rénales et des extrémités. Elle peut aussi se résumer à un simple retard du langage chez un enfant présentant un discret syndrome dysmorphique et nasonnement (signe d'insuffisance vélopharyngée même en absence de fente palatine).

Devant ce spectre clinique très large, une équipe britannique a proposé l'acronyme *CATCH 22* ou *CATCH phenotype* pour rappeler les signes majeurs de cette délétion : *Cardiac anomaly, Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia*. [31][48]

∅ *Conseil génétique et mode de transmission*

La plupart des délétions (94% des cas) sont le résultat d'un événement de novo même si probablement 5-10% sont héritées d'où la nécessité de rechercher l'anomalie chez les parents pour un conseil génétique adapté.

Cette délétion est transmise selon un mode autosomique dominant.

Si elle est absente chez les parents, elle est donc de novo et le risque de récurrence est négligeable. Cependant, si elle est présente chez l'un des parents, le risque de transmission est de 50% à la descendance. L'anomalie est le plus souvent d'origine maternelle.

En cas de cardiopathie conotruncale isolée sans microdélétion, le risque de récurrence est de 3%. [48][54]

b- Le syndrome de Williams et Beuren et délétion 7q11.23

Le syndrome de Williams ou syndrome de Williams-Beuren est une maladie génétique rare (MIM 194050) caractérisée par une anomalie du développement qui associe malformation cardiaque (sténose aortique supra- valvulaire -SASV- le plus souvent) dans 75% des cas, retard psychomoteur, dysmorphie du visage évocatrice et profil cognitif et comportemental spécifique.

L'incidence à la naissance des formes typiques est de 1/20 000, mais il existe des formes partielles dont l'incidence est mal connue. [31]

Ø *Phénotype clinique*

Les enfants atteints ont des traits dysmorphiques caractéristiques : racine du nez aplatie avec extrémité bulbeuse, macrostomie avec lèvre inférieure large et éversée, joues pleines, œdème périorbitaire, épicanthus et souvent des iris stellaires. Avec l'âge, les traits deviennent plus grossiers avec un cou long. Le faciès est décrit habituellement comme visage d'Elfe. (Figure 59)

Des anomalies buccodentaires avec fréquence des caries ont été observées.

40% des patients présentent des signes ophtalmologiques à type de strabisme et trouble de la réfraction. [55][57]



Figure 59 : patients atteints d'un syndrome de williams à différents âges de vie  
Noter l'aspect du nez, les joues pleines, la macrostomie et l'éversion de la lèvre inférieure

Il existe un retard de croissance postnatal avec une taille en dessous du 10<sup>e</sup> percentile et une microcéphalie modérée en rapport avec la taille.

Les anomalies cardiovasculaires caractéristiques sont la sténose aortique supra- valvulaire et les sténoses des branches de l'artère pulmonaire. On peut observer des sténoses des branches collatérales de l'aorte : artères rénales, cérébrales ou coronaires à l'origine d'une hypertension artérielle rénovasculaire.

Une hypercalcémie néonatale idiopathique est parfois présente, avec risque d'évolution vers une néphrocalcinose. [55]

Le retard mental est généralement modéré et le profil cognitif est dominé par un défaut des repères visuo-spatiaux contrastant avec un langage correct. Ces enfants ont un comportement de type hypersociable, amical avec un contact social très facile et familier ; ils présentent une hypersensibilité au bruit et des dispositions pour la musique.

La description clinique du syndrome s'est faite en 1961 respectivement par le cardiologue néo-zélandais J.C.P. Williams et le pédiatre allemand A.J. Beuren d'où le nom du syndrome. [57]

### Ø Diagnostic cytogénétique

C'est en 1993 que l'anomalie génétique impliquée dans ce syndrome a été mise en évidence : il s'agit d'une microdélétion de la région q11.23 d'un des chromosomes 7. Cette anomalie est présente dans 95% des cas. La délétion d'environ 1.4Mb englobe de nombreux gènes (environ 24gènes) dont celui de l'élastine : le syndrome de Williams et Beuren est un syndrome des gènes contigus.

Le diagnostic de la microdélétion est fait grâce à la technique de FISH (positive dans 95% des cas) avec actuellement recours à la CGHarray afin de délimiter avec plus de précision la taille de la région impliquée et les gènes délétères. Cependant, un caryotype de haute résolution peut s'avérer nécessaire si une microdélétion importante ou une translocation impliquant le chromosome 7 sont suspectées. [56]

(Figure 60a)(Figure 60b)

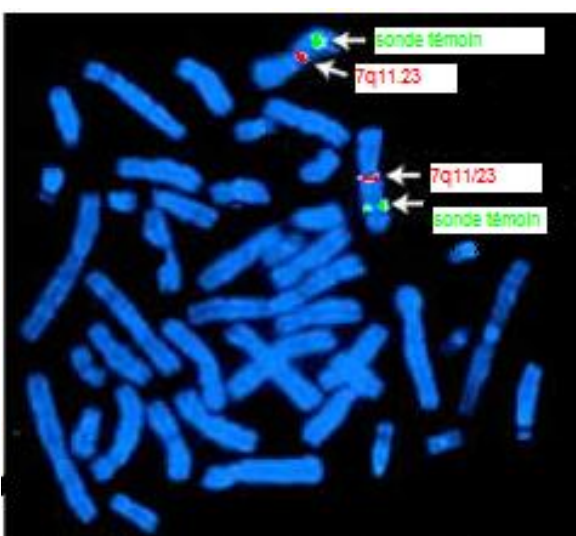


Figure 60a : FISH 7q11.23 normale (deux spots verts "sonde témoin" et deux spots rouges "sonde 7q11.23")

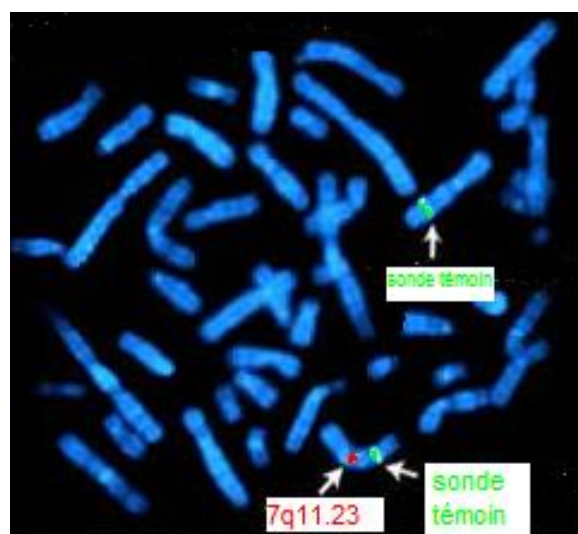


Figure 60b : délétion 7q11.23 (deux spots verts et un seul spot rouge)

Le gène de l'élastine est impliqué dans l'atteinte cardiaque et la dysmorphie, du fait de son rôle dans le développement de la paroi artérielle en régulant la prolifération musculaire lisse. D'autres gènes candidats sont en cours d'étude pour expliquer les autres traits du syndrome : Les gènes LIMK1 et GTF2IRD1 fortement exprimés dans le cerveau semblent être impliqués dans les déficits des repères visuospatiaux ; d'autres (CYLN2 et GTF21) interviendraient dans le profil cognitif.

#### Ø *Mode de transmission et conseil génétique*

Cette délétion survient presque toujours de nouveau, d'où le caractère habituellement sporadique de cette affection. Dans ce cas, le conseil génétique est rassurant.

Dans de rares cas, cette délétion est héritée d'un parent selon un mode autosomique dominant. [56][57]

Les autres syndromes microdélétionnels seront traités sous forme de données pratiques vu leur rareté.

#### c- Le syndrome de Prader-Willi et d'Angelman, région 15q11-q13

Ces deux syndromes sont un exemple des pathologies liées à l'empreinte parentale car les deux sont dus à la délétion de la région q11-q13 du chromosome 15, mais selon le chromosome atteint (maternel ou paternel) la présentation clinique est différente.

A l'état normal, chacun de nous possède deux chromosomes 15 dont l'un provient du père, l'autre de la mère. La région 15q11-q13 du chromosome 15 a une particularité : elle est soumise à ce que l'on appelle le phénomène d'empreinte parentale. Les gènes situés dans cette région remplissent différemment leur fonction selon qu'ils sont situés sur le chromosome hérité du père ou de la mère. Ainsi, à l'état normal, sur le chromosome 15 transmis par le père, les gènes localisés dans la

région 15q11-q13 sont fonctionnels, alors que ces mêmes gènes portés par la région 15q11-q13 du chromosome 15 transmis par la mère sont méthylés et donc « silencieux » et ne remplissent pas de fonction. [58]

Ø *Syndrome de Prader-Willi (SPW)*

Incidence : 1-5/10000

Etiologie : les gènes localisés dans la région 15q11-q13 du chromosome 15 transmis par le père ne sont pas fonctionnels ou sont absents. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de cette anomalie :

- dans 70 % des cas, elle est due à la délétion ou microdélétion 15q11-q13 du chromosome 15 hérité du père.
- dans 25 à 30 % des cas, l'enfant atteint de SPW a reçu deux exemplaires du chromosome 15 provenant de la mère (disomie uniparentale), et aucun du père.
- dans moins de 5% des cas, il s'agit d'une anomalie isolée ("mutation" ou "anomalie de méthylation") sans délétion détectable ni disomie au niveau de la région particulière du chromosome 15 appelée « centre de l'empreinte » : on parle alors d'anomalie d'empreinte.
- enfin dans des cas exceptionnels, un petit morceau d'un autre chromosome est venu se coller sur le chromosome 15 (translocation).

[59]

Clinique :

- Hypotonie majeure et difficultés alimentaires à la naissance
- Secondairement s'installe une hyperphagie et une obésité, associées à un retard mental le plus souvent modéré.

- Un hypogonadisme (micropénis et cryptorchidie chez le garçon et hypoplasie des petites lèvres et du clitoris chez la fille)
- La dysmorphie faciale est discrète : front étroit, rétraction temporale, yeux en amandes nez fin, petite bouche « en chapeau de gendarme » avec lèvre supérieure fine. (Figure 61)
- Le profil comportemental associe le caractère coléreux, entêté et obsessionnel.
- Le déficit intellectuel peut être modéré et extrêmement variable d'un enfant à un autre.

Conseil génétique :

98% des cas sont de novo, le conseil génétique est rassurant. Cependant, des cas de mosaïques familiales ont été rapportés.

En cas de mutation maternelle transmise, le risque de récurrence est de 50%.

[58][59]



Figure 61: aspect typique d'un syndrome de Prader-Willi

Ø *Syndrome d'Angelman (SA)*

Prévalence : 1/20000 à 1/10000

Etiologie : à l'état normal et au niveau du cerveau, le gène UBE3A d'origine maternelle situé dans la région 15q11q13 est fonctionnel et sa copie paternelle est silencieuse du fait de sa méthylation. Dans le SA, il s'avère que même l'exemplaire maternelle de ce gène est silencieux. Les mécanismes ont cause sont :

- dans 70% des cas, une délétion plus ou moins grande d'une partie de la région 15q11-q13 du chromosome d'origine maternelle ; le gène UBE3A d'origine maternelle est donc absent.
- dans 10% à 15% des cas, une mutation ponctuelle de l'exemplaire d'origine maternelle du gène UBE3A, ce qui le rend « silencieux » comme l'exemplaire d'origine paternelle.
- dans 5% des cas, la personne a hérité de deux chromosomes 15 de son père et d'aucun de sa mère : la personne possède alors deux gènes UBE3A d'origine paternelle qui sont tous les deux muets. On appelle ces cas des « disomies uniparentales d'origine paternelle ».
- dans 5% des cas, il s'agit d'une anomalie, présente sur le chromosome maternel, qui n'affecte pas directement le gène UBE3A mais qui le rend « silencieux » en y plaçant des marques (méthylation), comme sur le gène d'origine paternel : on parle d'anomalies de l'empreinte génomique.
- Enfin, dans 5% à 10% des cas, aucune anomalie ne peut être mise en évidence avec les techniques disponibles à ce jour.

Clinique :

- Un retard mental sévère est toujours présent, crises épileptiques à l'aspect électroencéphalographique (EEG) spécifique (activité delta triphasique à prédominance frontale).
- Un retard du développement moteur avec ataxie et troubles de la marche
- Le comportement social est très caractéristique : comportement joyeux, une hyperactivité sans agressivité, une attention réduite, une hyperexcitabilité, des troubles du sommeil (moindre besoin de sommeil), une hypersensibilité à la chaleur, ainsi qu'une attraction et une fascination par l'eau.
- La dysmorphie n'est pas caractéristique à elle seule. L'enfant peut présenter une microcéphalie, une macrostomie, une hypoplasie maxillaire avec un prognathisme. Le strabisme et la scoliose sont fréquents. (Figure 62) [31][58][59]



Figure 62 : Syndrome d'Angelman

Conseil génétique :

Le conseil génétique est recommandé en raison du risque de récurrence, qui varie de 0 à 50 % (comme le SPW) selon l'anomalie génétique en cause.

d- Le syndrome de Smith-Magenis et délétion17p11.2

Le syndrome de Smith Magenis (SMS) associe trois signes majeurs : un retard mental avec retard du langage, une dysmorphie faciale et des anomalies des extrémités.

Le retard mental est en règle générale modéré. Et les difficultés d'apprentissage du langage sont constantes. [31]

Les troubles du comportement associent une hyperactivité majeure, des accès de colère intense, des manifestations d'auto-agressivité et des troubles du sommeil.

La dysmorphie faciale est discrète : brachycéphalie, visage plat large, prognathisme qui s'accroît avec l'âge, une brachydactylie. La petite taille est fréquente. (Figure 63)

Les autres signes associent : voix rauque, cardiopathie congénitale, anomalies rénales, ORL et ophtalmologiques, scoliose, neuropathie périphérique. [60]

La prévalence dans la population générale est estimée à 1 sur 25 000.

Ce syndrome est dû à une microdélétion chromosomique dans la région 17p11.2. De nombreux gènes ont été localisés dans la région critique (2 à 9 mégabases, le plus souvent 4-5 MB), mais leur rôle n'est pas encore connu, l'haplo-insuffisance de plusieurs gènes pouvant rendre compte du phénotype.

Les troubles du sommeil majeurs et les troubles du comportement peuvent être en partie dus à la sécrétion inappropriée, diurne, de la mélatonine.

Le diagnostic repose sur l'identification des délétions allant de 2 à 9 mégabases (en général 4-5 Mb) par caryotype de haute résolution confirmé par FISH.

Une prise en charge précoce comportementale, éducative et orthophonique est nécessaire. En raison de l'inversion du rythme de la mélatonine, un traitement par bêtabloquants et mélatonine améliore les troubles du comportement et du sommeil. [60][61]



Figure 63: syndrome de Smith-Magenis (noter le prognathisme et le visage plat)

## C-2 Autres microdélétions interstitielles

A côté des microdélétions péricentromériques sus décrites, ils existent plusieurs ne portant que sur une bande chromosomique dont certaines ont été corrélées à un syndrome connu et d'autres à un tableau clinique sans syndrome connu.

### a. Syndromes connus et microdélétions interstitielles

#### ü Syndrome de WAGR et délétion 11p13

WAGR est un acronyme pour les mots anglais '*Wilms tumor--Aniridia--Genitourinary anomalies--mental Retardation*' (tumeur de Wilms, aniridie, anomalies génito-urinaires, retard mental).

La prévalence du syndrome WAGR est inférieure à 1 pour 100 000 naissances.

Le syndrome associe :

- ✓ un risque élevé de survenue de tumeur de Wilms (néphroblastome) à tout âge,
- ✓ une aniridie totale ou partielle avec éventuellement une cataracte ou un glaucome,
- ✓ des anomalies génito-urinaires allant de l'ambiguïté sexuelle à l'ectopie testiculaire,
- ✓ ainsi qu'un déficit intellectuel de degré variable.
- ✓ d'autres anomalies atypiques ont été rapportées (microphthalmie, dysfonction rétinienne, obésité, duplication des gros orteils)

Le syndrome est la conséquence d'une microdélétion de la région 11p13 du chromosome 11, et c'est l'un des syndromes des gènes contigus le mieux étudié. Le gène PAX6 est responsable de l'aniridie et le gène WT1 (WILMS TUMOR 1) est incriminé dans les anomalies génito-urinaires.

La microdélétion survient *de novo* dans la plupart des cas, mais elle peut résulter d'une translocation parentale.

Le caryotype des parents doit être déterminé devant une suspicion de syndrome WAGR pour éliminer une telle translocation. En l'absence d'anomalie, le

risque de syndrome WAGR lors de grossesses ultérieures n'est pas supérieur à celui de la population générale (<1%). [47]

#### ü Syndrome de Langer-Giedon et délétion 8q24.1

Connu également sous le nom de syndrome tricho-rhino-phalangien de type 2  
Il s'agit d'un syndrome peu fréquent dont la prévalence est inconnue.

Il se transmet sur le mode autosomique dominant, mais beaucoup de cas sont sporadiques.

Il se caractérise par l'association : cheveux rares, nez en poire, épiphyses en cônes, définissant le syndrome tricho-rhino-phalangien type 1 (TRP1), auxquels s'ajoutent des exostoses multiples et un retard mental variable.

Ce syndrome est dû à une microdélétion chromosomique de taille variable dans la région 8q23.3-q24.13 entraînant la perte d'au moins deux gènes : *TRPS1*(responsable du TRP1) et *EXT1*(responsable des exostoses). La délétion d'autres gènes de cette région et qui sont impliqués dans le développement du cerveau détermine le degré de sévérité du retard mental. [47]

#### ü Syndrome d'Alagille et délétion 20p11.23 (SAG)

Le syndrome d'Alagille (SAG) est caractérisé par une cholestase chronique liée à une paucité des voies biliaires intra hépatiques, une sténose des artères pulmonaires périphériques, des anomalies vertébrales, un faciès caractéristique, un embryotoxon postérieur/des anomalies du segment antérieur, une rétinopathie pigmentaire et une dysplasie rénale.

Sa prévalence est d'environ 1/70 000.

Une délétion de la région 20p11-p12p a été associée à ce syndrome.

La dysmorphie faciale est faite d'un front haut, des fentes palpébrales orientées en bas et en dehors, un nez long et un mentant proéminent.

Le plus souvent, le SAG est dû à des mutations du gène *JAG1* (*SAG1*) codant pour un ligand de la voie de signalisation Notch. La transmission est autosomique dominante, mais une pénétrance faible (plus de 50 % des cas) et un mosaïsme somatique (~8 %) sont communs. [31][47]

#### ü Syndrome de Rubinstein-Taybi et délétion 16p13.3

Le syndrome de Rubinstein-Taybi est caractérisé par des anomalies congénitales (microcéphalie, faciès caractéristique, pouces et gros orteils larges, retard de croissance), un déficit intellectuel et un comportement atypique.

La prévalence à la naissance est de 1/100 000 à 1/125 000.

Les anomalies faciales, plus visibles avec l'âge, sont des sourcils en accent circonflexe, de longs cils, des fentes palpébrales obliques, un nez crochu, un palais ogival et une micrognathie. Un sourire inhabituel s'accompagnant de la fermeture des yeux est presque toujours observé.

La constipation et l'obésité sont fréquentes.

Les enfants présentent une aptitude marquée à établir d'excellents contacts sociaux.

Ce syndrome est dû à une microdélétion ou une mutation en p13.3 du chromosome 16 (gène *CBP*) ou à une mutation du chromosome 22 en position q13 (gène *EP300*), survenant *de novo* et transmises sur un mode dominant. Le risque de récurrence est très faible (0,1%).

Des anomalies cytogénétiques ou moléculaires sont détectées dans 55% des cas. [47][62]

### b. Délétions interstitielles et nouvelles entités syndromiques

Elles sont nombreuses et on ne mentionnera que deux exemples :

#### ü Délétion 8p23.1 (monosomie 8p)

Cette anomalie chromosomique récemment identifiée, sa fréquence est encore probablement sous estimée (1/55000 à 1/7000 selon les études)

Dans sa forme complète, le tableau clinique associe un retard mental modéré, une microcéphalie associée une dysmorphie faciale discrète et une cardiopathie dans 50% des cas (le plus fréquemment un canal atrioventriculaire)

La dysmorphie faciale est faite d'une face ronde, des joues pleines, des fentes palpébrales orientées en haut et en dehors, des sourcils arqués et un petit nez. Les mains et les pieds sont petits.

Elle apparaît dans la majorité des cas de *novo*.

Le caryotype parental s'impose devant le risque de mauvaise ségrégation d'une anomalie de structure familiale. [47]

#### ü Délétion 2q22-q23 (syndrome de Mowat Wilson)

Des dizaines de cas ont été décrits pour cette délétion.

Le tableau clinique associe un retard mental sévère, une microcéphalie inférieure au troisième percentile, une dysmorphie faciale avec un front large, une énoptalmie, des sourcils épais, une columelle saillante, des oreilles larges et mal ourlées.

C'est l'association fréquente de cette anomalie à la maladie d'Hirschprung a permis d'identifier les points de cassure de cette délétion ainsi que le gène *Smad interacting protein 1 (SMADIP1)* dont les délétions et les mutations à son niveau rendent compte de l'ensemble des signes cliniques de cette entité syndromique et de sa variabilité. [47]

## D- MICRODELETIONS SUBTELOMERIQUES

La structure particulière des régions télomériques et leur richesse en séquences répétées permettent de penser qu'elles sont des sites préférentiels de survenue de remaniements chromosomiques.

La première étude de l'ensemble des régions subtélomériques sur une population atteinte d'un retard mental idiopathique a permis de révéler une fréquence élevée des délétions subtélomériques (6%), ouvrant un large champ d'étude des retards mentaux.

Les microdélétions subtélomériques ont des caractéristiques communes. Elles présentent en effet une grande variabilité de taille et de distribution des points de cassure. Elles résultent très fréquemment de la malségrégation d'une translocation cryptique parentale et ont, de ce fait, une récurrence non négligeable.

Nous avons choisi de rapporter ici les anomalies télomériques les plus fréquentes et/ou les plus étudiées. [43][46][47]

### ✓ *Syndrome de Miller et Dieker (SMD) et la délétion 17p13.3 (Syndrome agyrie-pachygyrie)*

Le SMD est une délétion chromosomique continue située en 17p13.3 caractérisée par une lissencéphalie classique (disparition ou rareté des sillons du cortex cérébral qui devient lisse) et des traits du visage caractéristiques. Ce syndrome est grave et aboutit au décès avant l'âge de deux ans.

Son incidence est de 1 sur 100 000 naissances. Cette lissencéphalie représenterait le quart de toutes les lissencéphalies.

Le tableau clinique de ce syndrome est remarquable par la constance des signes cliniques : des signes de souffrance neurologique s'installent dès la

naissance avec des crises épileptiques évoluant fréquemment vers des spasmes infantiles. [45]

La dysmorphie faciale est constante associant une rétraction temporale, des narines antéversées, une micrognathie, une lèvre supérieure longue et fine, des oreilles mal ourlées et d'implantation basse. (Figure 64)

L'IRM est l'examen le plus performant pour faire le diagnostic de la lissencéphalie. (Figure 65)

La délétion 17p13.3 incluant le gène *LIS1* est retrouvée chez quasiment 100% des patients atteints de lissencéphalie. [31][47]

La micro délétion est souvent un accident chromosomique de novo. Mais un petit nombre de délétion sont secondaires à un réarrangement chromosomique. En cas de mutation de novo le risque est très faible.



Figure 64 : faciès de patients atteints d'un syndrome de Miller-Dieker

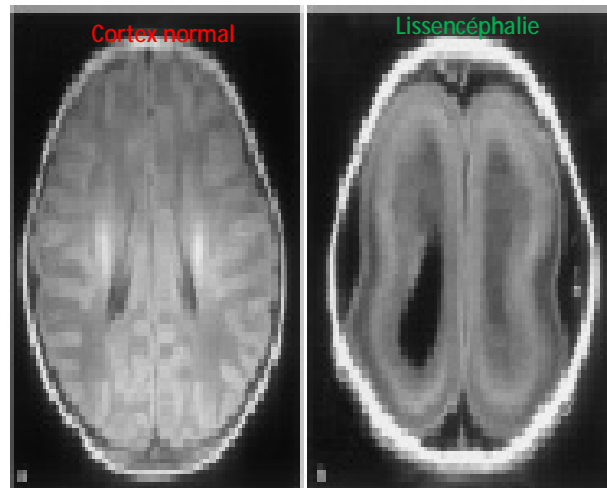


Figure 65 : aspect de lissencéphalie dans le syndrome de Miller-Dieker

✓ *Syndrome d'ostéodystrophie héréditaire d'Albright et délétion 2q37.3*

La monosomie 2q37, est une anomalie chromosomique en rapport avec une délétion de la bande chromosomique 2q37 et qui se manifeste par trois signes cliniques majeurs : un retard du développement, des malformations squelettiques et une dysmorphie faciale.

Son incidence annuelle est estimée à moins de 1/10 000 et plus de 100 cas ont été rapportés.

L'expression clinique de cette microdélétion associe une petite taille, une obésité, un faciès arrondi et une brachymétopie-métatarsie très évocatrice (en particulier des troisièmes, quatrièmes et cinquièmes métacarpiens et métatarsiens)

La dysmorphie faciale est caractéristique et comprend un visage rond, des cheveux et sourcils clairsemés, un front proéminent, des fentes palpébrales obliques, des yeux profonds, une hypoplasie médiofaciale, une racine nasale enfoncée, des ailes du nez basses et une columelle proéminente, une pointe de nez en forme de V, un vermillon des lèvres fin, et un palais ogival. Les mamelons sont souvent très écartés ou supernuméraires.

Un profil comportemental autistique est souvent présent. [45]

La délétion concerne la région terminale du chromosome 2 avec des points de cassure dans la bande 2q37. La bande 2q37 contient trois sous-bandes avec plus de 80 gènes localisés dans la région 2q37.1-q37.3. Plusieurs gènes candidats sont en cours d'étude pour la corrélation génotype-phénotype. [47][43][44]

✓ *Délétion 22q13.3 ou syndrome de Phelan-McDermid*

La monosomie 22q13 est un syndrome de microdélétion chromosomique caractérisé par une hypotonie néonatale, un retard mental sévère, une croissance normale ou accélérée, une absence ou un retard sévère du développement du

langage ainsi qu'une dysmorphie mineure (dolichocéphalie, oreilles mal ourlées et épicanthus bilatéral). Le comportement est de type autistique.

En raison de la difficulté du diagnostic et, souvent, des examens de laboratoire insuffisants, le syndrome est sous-diagnostiqué et son incidence réelle est inconnue.

La perte de 22q13.3 peut provenir d'une délétion simple, d'une translocation, de la formation d'un chromosome en anneau ou d'anomalies structurelles du bras long du chromosome 22, en particulier de la région contenant le gène *SHANK3*.

Bien que la délétion puisse parfois être détectée par analyse chromosomique de haute résolution, il est recommandé, pour confirmer le diagnostic, d'utiliser la FISH ou la CGHarray.

Il est recommandé de proposer un conseil génétique, ainsi que de rechercher des réarrangements chromosomiques cryptiques ou une mosaïque chez les parents.

[47][44][45]

## E- PRISE EN CHARGE

La prise en charge des enfants présentant des syndromes microdélétionnels débute par un examen clinique complet de tous les appareils associé à des examens complémentaires dans le cadre du bilan malformatif (orienté par la clinique) afin de permettre un regroupement syndromique évocateur d'une entité décrite ou rapportée par la littérature.

La discussion diagnostique et thérapeutique se fait dans un cadre pluridisciplinaire associant pédiatre, généticiens, biologistes, cardiologues, neurologues, endocrinologues, orthophoniste, rééducateurs et kinésithérapeute et d'autres spécialités médicales vu le nombre important des systèmes atteints et des malformations découvertes.

Le traitement des malformations d'organes en particulier cardiovasculaire (engageant le pronostic vital) s'avère nécessaire avec recours fréquent à la chirurgie cardiaque (syndrome de DiGeorge et syndrome de Williams) avec un suivi médical à vie afin de détecter les complications et d'adapter le traitement (HTA en particulier).

Un suivi neurologique est impératif dans la quasi-totalité des cas vu l'association importante du retard mental et de l'épilepsie à un grand nombre de syndromes microdélétionnels.

Les troubles du comportement, et en particulier l'hyperactivité, sont particulièrement fréquents et difficiles à contrôler si l'enfant n'est pas bien pris en charge. Dans ces cas, l'enfant peut par exemple beaucoup crier, se replier sur lui-même, et être agressif. L'accompagnement de l'enfant par un pédopsychiatre et un psychomotricien est donc capital pour diminuer l'hyperactivité et les troubles de l'attention. De plus, l'attitude familiale, avec l'instauration d'un milieu de vie

sécurisant et l'intégration de règles sociales, et de repères stables dès l'enfance, participent à l'amélioration de ces troubles du comportement.

Toutes les autres disciplines médicales peuvent s'intégrer dans le suivi des malades en fonction de l'atteinte et de la particularité de chaque syndrome. [51][57]

## F- CONSEIL GENETIQUE DANS LES SYNDROMES MICRODELETIONNELS

Le conseil génétique se fera au cas par cas en fonction du syndrome étudié et en fonction de l'anomalie diagnostiquée par les moyens de la cytogénétique classique et de la cytogénétique moléculaire.

La plupart des anomalies (les délétions) apparaissent de novo alors le risque de récurrence est faible et la transmission se fera selon un mode autosomique dominant.

Devant toute récurrence familiale ou suspicion d'atteinte parentale, une étude des parents est nécessaire afin de prodiguer un conseil génétique et une estimation du risque adéquats.

Avec les avancées actuelles, un diagnostic prénatal et parfois préimplantatoire sont possible une fois l'anomalie en cause est reconnu chez le malade. Mais leur réalisation doit obéir à la réglementation et aux règles d'éthique du pays d'exercice.

[63][64]

# OBSERVATIONS CLINIQUES

## Observation 1 (FIGURE A)

M.A, nourrisson de sexe masculin, âgé de 6mois, originaire de Tahla, issu d'un mariage non consanguin, mère âgée de 40ans, père âgé de 41ans, mutualiste, de moyen niveau socio-économique.

Grossesse suivie, avec notion de métrorragies, accouchement à terme médicalisé par voie basse. Poids à la naissance : 3kg.

Notion de souffrance néonatale, accès de cyanose depuis la naissance et de pneumopathies à répétition.

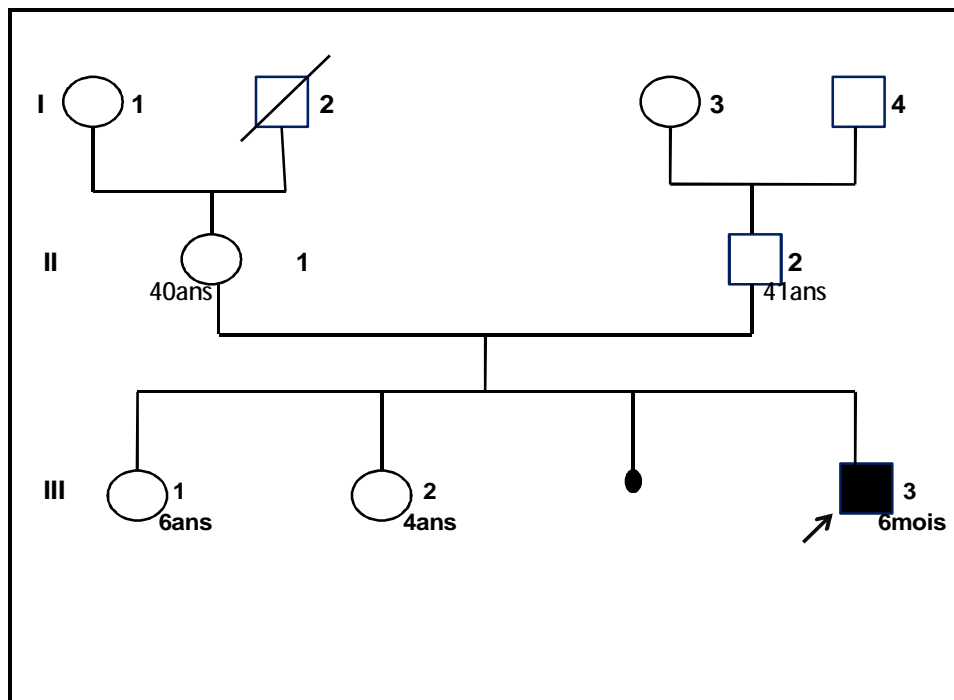
La dysmorphie faciale est faite de : visage arrondi, hypertélorisme, oreilles mal ourlées et bas implantées, base du nez large et pointe du nez bulbeuse, microstomie et micrognathisme, cou court. Les parents sont de phénotype normal.

Pas de cas similaires dans la fraterie.

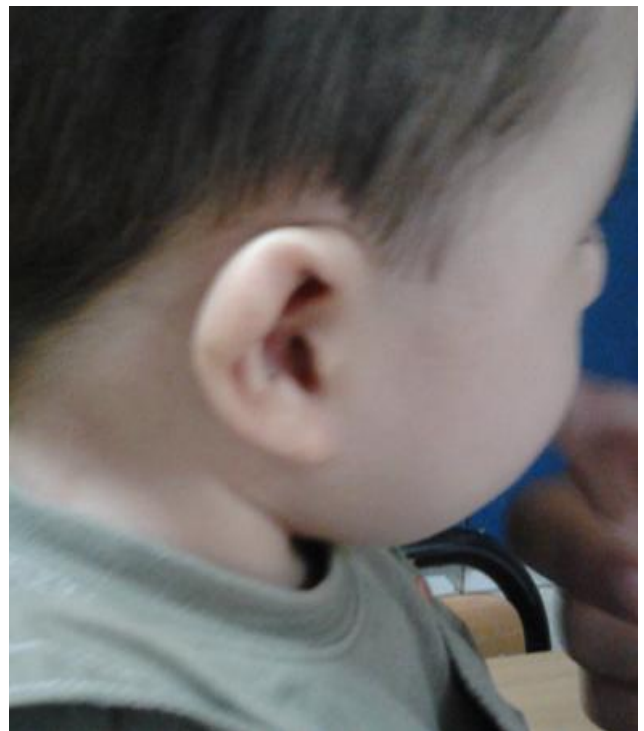
Le bilan biologique (numération formule sanguine, ionogramme sanguin et calcémie) est sans particularité.

Le bilan immunologique non fait.

L'échographie cardiaque a objectivé une atrésie pulmonaire à septum ouvert avec collatérales



Arbre généalogique du patient M.A (Observation 1)



Phénotype du patient M.A (Observation 1)

## FIGURE A

## Observation 2 (FIGURE B)

B.S, Nourrisson de 12 mois, de sexe féminin ,originaire de Meknes, issu d'un mariage non consanguin, mère âgée de 38ans, père âgé de 43ans, non mutualiste, de bas niveau socio-économique.

Grossesse suivie sans incidents, accouchement par voie basse médicalisé. PN:3Kg200 . Bonne adaptation à la vie extra-utérine.

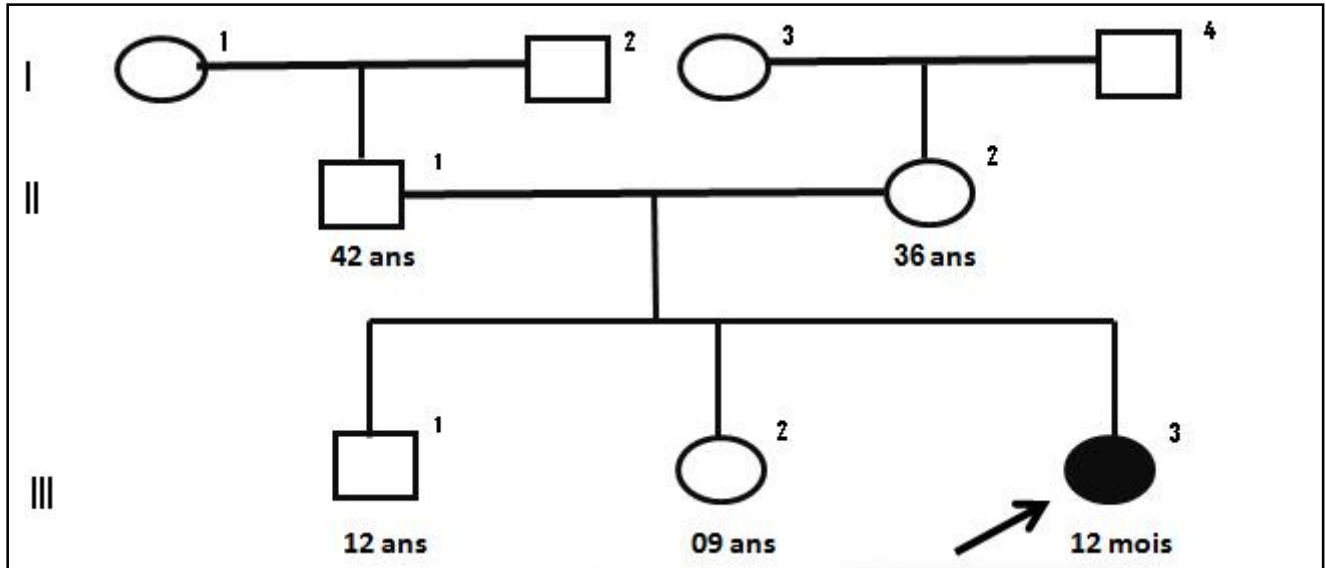
Le bébé présente un retard de croissance et mauvaise prise pondérale, une hypotonie musculaire et une hernie ombilicale.

La dysmorphie faciale est faite de : nez tubulaire, des arêtes nasales larges et proéminentes et des narines antéversées, des oreilles petites, mal ourlées, décollées et bas implantées, un philtrum court et une fente palatine. Les parents sont de phénotype normal.

Une cardiopathie congénitale de type conotruncal (tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire) a été objectivée à l'échocardiographie.

L'échographie abdomino-rénale, thymique et l'électroencéphalogramme sont normaux.

Le bilan immunologique, la calcémie, la numération formule sanguine, l'ionogramme ne montrent aucune anomalie.



Arbre généalogique de la patiente B.S (Observation 2)



Phénotype de la patiente B.S (Observation 2)

## FIGURE B

### Observation 3 (FIGURE C)

Y.S, nourrisson de 3mois, de sexe féminin, originaire de Fès, issu d'un mariage non consanguin, mère âgée de 21ans, père âgé de 35ans, non mutualiste, de bas niveau socio-économique.

Grossesse suivie, sans incidents, accouchement à terme par voie basse médicalisé. PN :3kg300. Bonne adaptation à la vie extra-utérine.

Le bébé présente une hypotonie avec difficulté alimentaire, un retard de croissance et mauvaise prise pondérale.

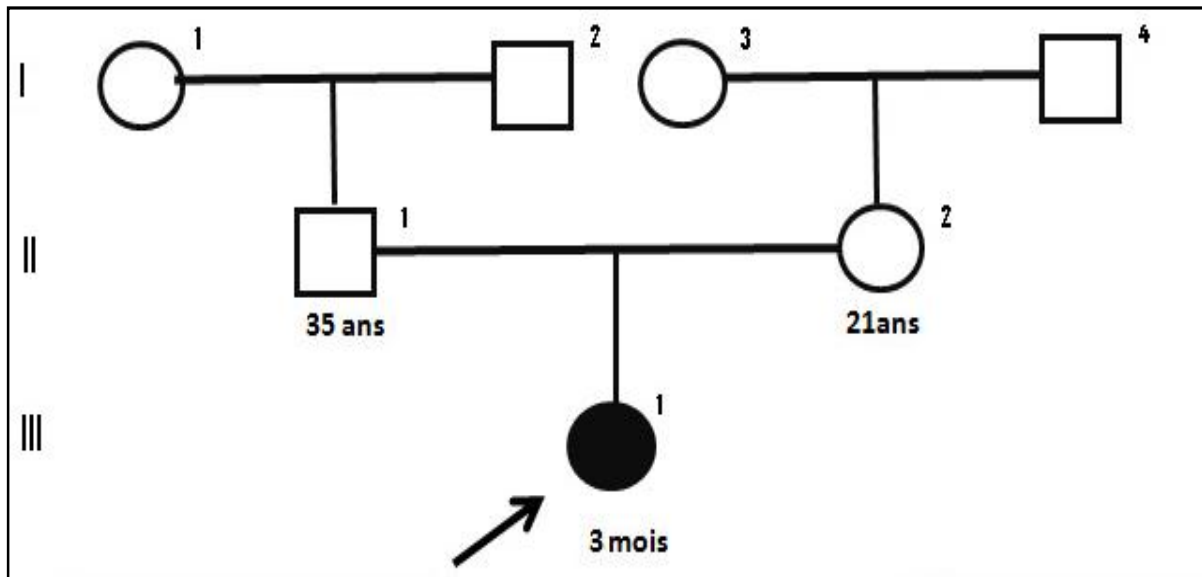
La dysmorphie faciale est très discrète : hypertélorisme, racine du nez large avec pointe du nez bulbeuse. Les parents sont de phénotype normal.

Une hétéradactylie des doigts post axial bilatérale est présente.

Une tétralogie de fallot a été retrouvée à l'échographie cardiaque.

L'échographie abdomino-rénale, thymique et l'électro-encéphalogramme étaient normaux.

Le bilan immunologique et la calcémie étaient par ailleurs normaux.



Arbre généalogique de la patiente Y.S (Observation 3)



Phénotype de la patiente Y.S (Observation 3)

## FIGURE C

## Observation 4 (FIGURE D)

M.J, enfant de 9ans, de sexe féminin, originaire de Sefrou, issu d'un mariage non consanguin, mère âgée de 44ans, père âgé de 44ans, mutualiste , de bon niveau socio-économique.

Grossesse suivie, notion d'infections urinaires, accouchement prématuré à 34SA par voie basse. PN :2kg900, bonne adaptation à la vie extra-utérine.

Retard des acquisition psychomotrices : marche et parole à 3ans.

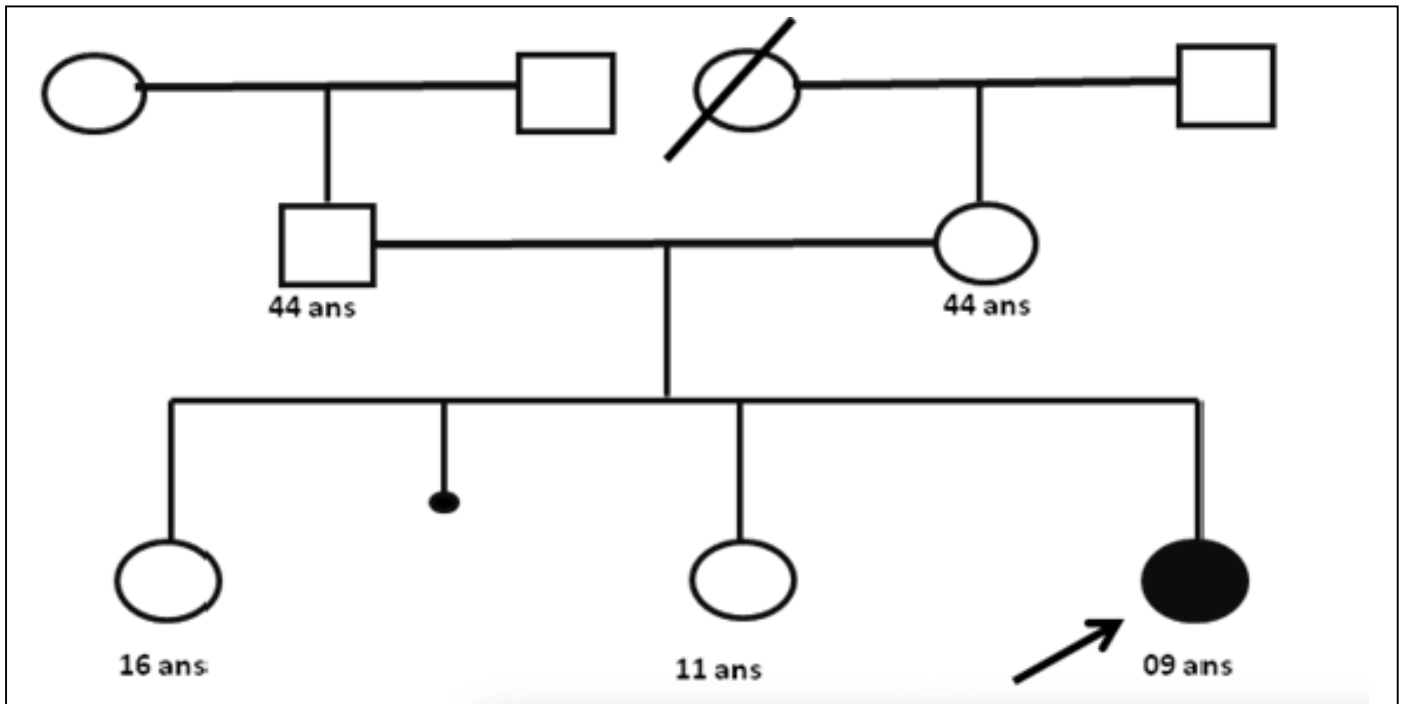
Notion de vomissements chroniques, douleurs abdominales et constipation.

L'enfant présente aussi un retard staturopondéral et une hypertension artérielle (PAS : 16 mmHg, PAD :11 mmHg) sous traitement.

La dysmorphie faciale associe :visage triangulaire,racine du nez aplatie avec extrémité bulbeuse, grande bouche avec lèvre inférieure large et éversée et un long philtrum, épicanthus et des iris stellaires. Les parents sont phénotypiquement normaux.

Le profil cognitif et comportemental regroupe : une hypersociabilité, hypersensibilité au bruit, des dispositions pour la musique et un retard cognitif modéré avec un langage préservé. Des troubles du sommeil ont été rapportés.

L'échocardiographie montre une hypertrophie ventriculaire gauche (Complication d'une HTA sans sténose de l'artère rénale). L'échographie abdomino-rénale et le bilan biologique (numération formule sanguine, ionogramme) sont sans particularités.



Arbre généalogique de la patiente M.J (Observation 4)



Phénotype de la patiente M.J (Observation 4)

## FIGURE D

## Observation 5 (FIGURE E)

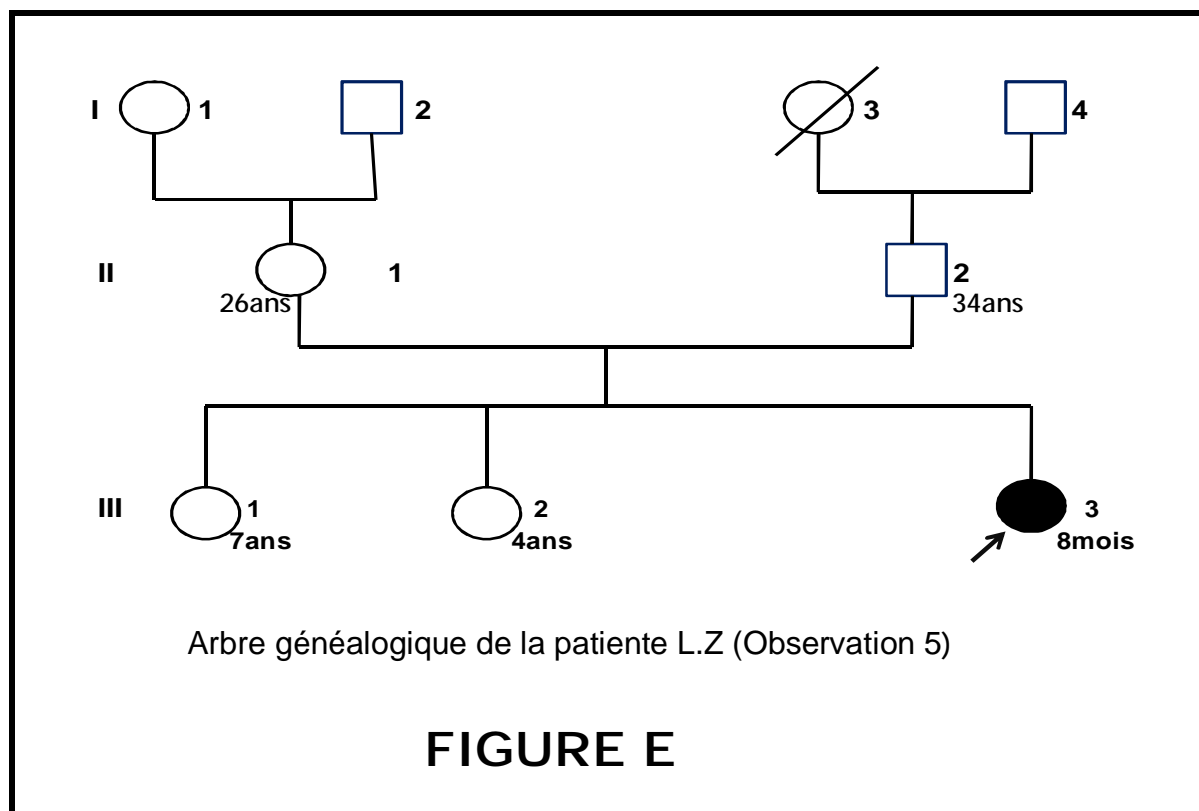
L.Z, nourrisson de 8mois, de sexe féminin, originaire de Taounate, issu d'un mariage non consanguin, mère âgée de 26ans, père âgé de 34ans, non mutualiste, de bas niveau socio-économique.

Grossesse suivie, notion de kyste de l'ovaire chez la maman, accouchement par voie haute pour dépassement de terme. PN :3kg

Notion de mauvaise prise pondérale et accès de cyanose péribuccale.

L'enfant présente un visage triangulaire, épicanthus, nez bulbeux, lèvre inférieure charnue et éversée avec une clinodactylie.

L'échographie cardiaque montre une sténose pulmonaire au dépend de l'artère pulmonaire droite.



METHODES

RESULTATS

Devant ces tableaux cliniques, nous avons suspecté un syndrome de DiGeorge (une microdélétion 22q11.2) pour les observations 1, 2 et 3 et un syndrome de Williams-Beuren (une microdélétion 7q11.23) pour les observations 4 et 5 .

Les préparations chromosomiques sont obtenues à partir de la culture des lymphocytes sanguins selon la technique du caryotype classique avec étalement sur des lames.

Un caryotype constitutionnel métaphasique en Bandes R est établie, à la recherche d'une éventuelle translocation impliquant les chromosomes 22 pour les observations 1, 2, et 3 et les chromosomes 7 pour les observations 4 et 5.

Une hybridation in situ fluorescente sur préparations chromosomiques (FISH : Fluorescence In Situ Hybridization) est effectuée. Les sondes utilisées sont (FISH sur chromosomes métaphasiques et noyaux) :

- Pour l'observation 1, 2 et 3 (propositus et parents) : Vysis DiGeorge Region Probe- LSI TUPLE 1 SpectrumOrange 22q11.2 /LSI ARSA SpectrumGreen 22q13.
- Pour l'observation 4 et 5 : Vysis Williams Region Probe - LSI ELN SpectrumOrange/LSI D7S486, D7S522 SpectrumGreen.

Tous les caryotypes sont normaux.

Nous avons confirmé par FISH le Syndrome de la délétion 22q11 pour l'observation 1, 2 et 3 : microdélétion hémizygote en position 22q11.2 (Figure F ).

Nous avons confirmé le diagnostic du Syndrome de Williams pour l'observation 4 et 5 : une microdélétion chromosomique hémizygote en position 7q11.23 (Figure G).

La FISH sur préparation chromosomique des parents de l'observation 1, 2 et 3 ne montrent aucune délétion, ce qui confirme que la délétion 22q11 chez les propositus des observations 1, 2 et 3 est de novo.

Pas d'indication médicale pour explorer les parents de phénotype normal des observations 4 et 5.

Les détails des résultats et les formules cytogénétiques des différentes observations sont :

#### Observation 1 : M.A

46,XY.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[10]

nuc ish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[40]

La délétion est présente sur 10 mitoses et 40 noyaux analysés.

#### Observation 2 : B.S

46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5]

nuc ish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[50]

La délétion du locus 22q11.2 est présente sur 5 mitoses et 50 noyaux analysés.

### Observation 3 : Y.S

46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[14]

nuc ish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[50]

La délétion du locus 22q11.2 est présente sur 14 mitoses et 50 noyaux analysés.

### Observation 4 : M.J

46,XX.ish del(7)(q11.23q11.23)(ELN-)[3]

nuc ish(ELN×1)(D7S522×2)[100]

La délétion du locus 7q11.23 est présente sur 3 mitoses et 100 noyaux analysés.

### Observation 5 : L.Z

46,XX.ish del(7)(q11.23q11.23)(ELN-)[10]

nuc ish(ELN×1)(D7S522×2)[100]

La délétion du locus 7q11.23 est présente sur 10 mitoses et 100 noyaux analysés

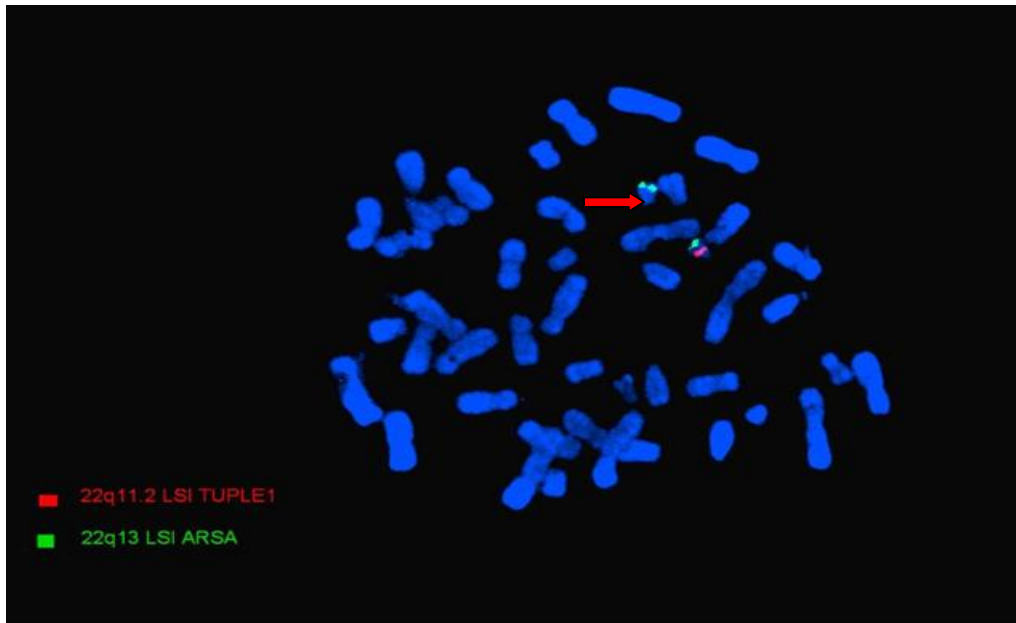


Figure F : Présence d'une microdélétion hémizygote en position 22q11.2 (la flèche montre l'absence du spot rouge sur l'un des chromosomes 22 sur la mitose)

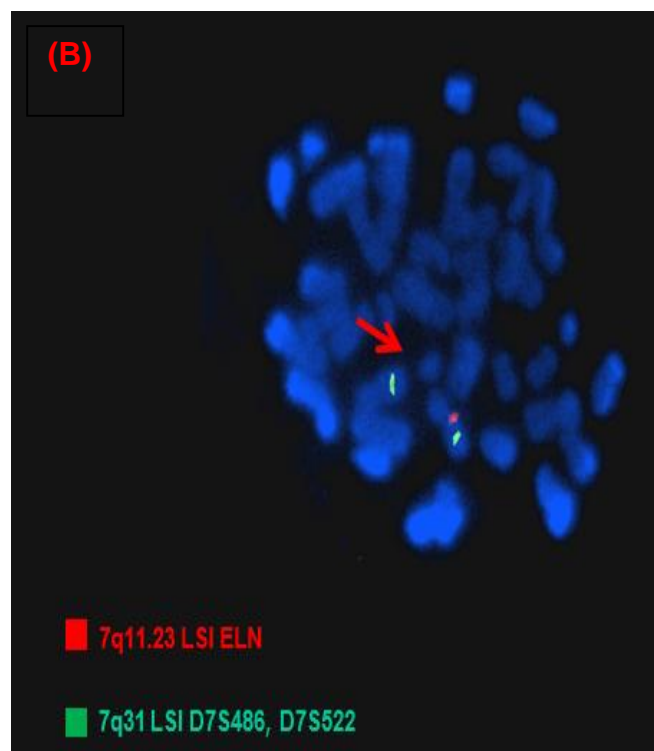
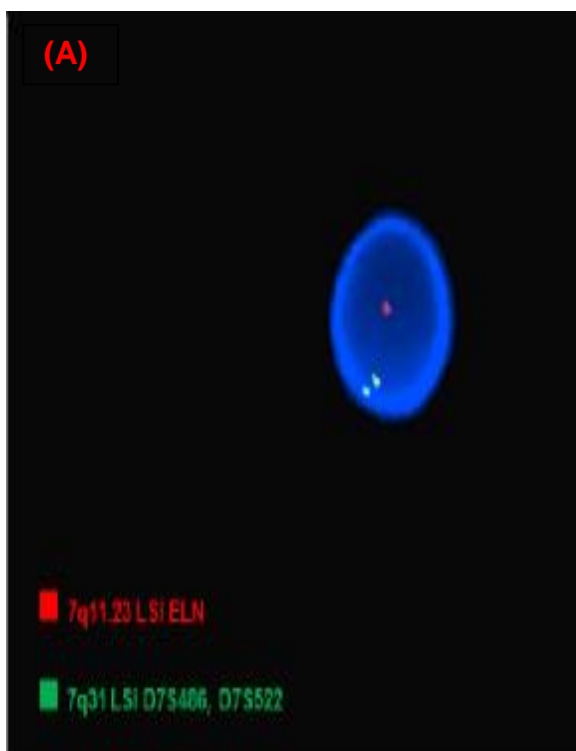


Figure G : présence d'une microdélétion hémizygote en position 7q11.23 ; (A) : présence de deux spots verts et un seul spot rouge sur le noyau coloré au DAPI, (B) : la flèche montre l'absence du spot rouge sur l'un des chromosomes 7 sur la mitose.

# DISCUSSION

L'apparition des techniques de haute résolution chromosomique dans les années 1980 a permis de mettre en évidence des microremaniements des syndromes individualisés dans les années 60.

La cytogénétique moléculaire d'apparition relativement récente est une discipline frontière entre la cytogénétique et la génétique moléculaire qui a révolutionné l'approche traditionnelle de la cytogénétique. Actuellement, ses outils principaux sont l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur préparation chromosomique et la comparative genomic hybridization-array (CGH-array).

La FISH permet de caractériser des microremaniements non détectables sur un caryotype standard mais évoqués devant un tableau clinique particulier, c'est le cas des syndromes microdélétionnels, les plus étudiés et fréquemment diagnostiqués en pratique médicale, c'est sans doute le syndrome de la délétion 22q1 et le syndrome de Williams-Beuren (SWB).

Ces syndromes associent généralement dysmorphie faciale, malformations d'organes et retard mental.

Dans le cas de tous nos patients, leur motif de consultation n'est pas la dysmorphie faciale mais plutôt la malformation d'organe en particulier la cardiopathie associée ou non au retard mental. Ce qui est souvent le symptôme alarmant pour les familles les motivant à consulter un spécialiste vu sa fréquence dans les syndromes de délétion 22q11 et Williams. La nature de la malformation d'organe est un critère majeur pour l'orientation diagnostique.

Sur le plan dysmorphique, nos patients avaient des signes discrets mais dont le regroupement est fort évocateur des syndromes étudiés. Ce qui explique la négligence de ce critère par les familles et les praticiens vue la difficulté de la description dysmorphique surtout en période néonatale (l'âge de 4 de nos patients)

et en l'absence d'autres signes majeurs associés. Le phénotype clinique doit être suivi et décrit à différents âges de vie.

Le retard de croissance, les difficultés alimentaires et la mauvaise prise pondérale sont retrouvés chez tous nos patients, signes assez fréquents dans les syndromes de délétion 22q11 et Williams et dont l'association aux autres signes est orientatrice vers ces diagnostics.

Le profil cognitif et comportemental n'a pas été très bien étudié chez la plupart des cas présentés vu leur âge (nourrissons de 3mois à 12mois) sauf pour la patiente de l'observation 4, âgée de 9ans et dont le profil comportemental fait d'hypersociabilité, hypersensibilité au bruit, des dispositions pour la musique est typique du syndrome de Williams qu'elle présente. Ce critère doit être pris en compte lors de la consultation spécialisée en l'évaluant à différents âges de vie afin de faire la distinction entre certains syndromes proches.

Notre patiente de l'observation 4, présentait un tableau clinique typique du syndrome de Williams en ayant une hypertension artérielle, des vomissements chroniques, douleurs abdominales et constipation signes rapportés dans ce syndrome en plus de la dysmorphie, la cardiopathie et le profil cognitif et comportemental spécifique.

L'héxadactylie et l'hernie ombilicale, rapportés dans le syndrome de délétion 22q11 sont retrouvés chez deux patients. (observation 2 et 3) par ailleurs aucune anomalie rénale n'a été retrouvée.

Nous avons confirmé la microdélétion 22q11.2 pour les observations 1, 2 et 3 (syndrome de délétion 22q11) et la microdélétion 7q11.23 pour les observations 4 et 5 (syndrome de Williams), par FISH sur métaphase et noyaux.

Tous les couples sont phénotypiquement normaux.

La recherche de la microdélétion chez les parents des enfants avec un syndrome de la délétion 22q11 confirmé a été réalisée. La plupart des microdélétions sont de novo (93 % des cas), alors que la microdélétion n'est héritée d'un des parents selon un mode de transmission autosomique dominant, que dans 7 % des cas. La mosaïque germinale (récurrence alors que les parents ne sont pas porteurs de la microdélétion) est exceptionnelle. Les patients ayant une microdélétion 22q11.2 ont 50 % de risque de la transmettre à leur descendance. La grande variabilité inter et intra familiale rend toute corrélation génotype-phénotype difficile, d'où la nécessité d'explorer par FISH systématiquement les parents avec phénotype normal d'un enfant porteur d'une délétion 22q11. Nus rappelons que l'étude par FISH de nos couples est revenue normale, ainsi, le conseil génétique est rassurant.

Dans le cas des parents phénotypiquement normaux, des enfants avec un syndrome de Williams confirmé par la présence de la délétion 7q11.23 , il n'y pas d'indication d'explorer les parents par FISH, la survenue de ce syndrome s'explique par une microdélétion de novo (il n'y a jamais eu de cas rapporté de microdélétion en 7q11.23 avec un phénotype normal). Le risque de récurrence d'un syndrome de Williams chez nos couples est très faible mais non nul, lié au mosaïcisme germinale.

Le pronostic vital est essentiellement conditionné par la sévérité de la cardiopathie congénitale et les autres malformations et troubles associés. À long terme, le pronostic dépend de l'association d'un retard mental et des troubles du comportement.

La prise en charge d'un enfant porteur d'un syndrome microdélétionnel doit être réalisée dans un cadre multidisciplinaire (pédiatre, généticiens, pédopsychiatre, cardiopédiatre, neuropédiatre, chirurgien, ...) avec un suivi personnalisé au cas par cas.

# CONCLUSION

L'apparition des techniques de haute résolution et le développement de la microcytogénétique ont permis de combler en partie le fossé qui séparait, il y a quelques années, la pathologie génétique et la pathologie chromosomique. De nombreux syndromes décrits cliniquement ont été rattachés à des microremaniements, alors qu'à l'inverse, la description de nouvelles microdélétions a permis d'identifier de nouveaux tableaux cliniques. Un grand nombre de syndromes, et le plus souvent sporadique, restent cependant sans étiologie précise. Il est donc important pour ces syndromes de continuer de réaliser de façon systématique des analyses chromosomiques de haute résolution.

A l'heure actuelle, en dehors des régions télomériques qui peuvent bénéficier d'un criblage global, la recherche de ces microdélétions justifie le recours à des marqueurs spécifiques de chaque régions en particulier les sondes fulorescentes utilisées en hybridation in situ fluorescente, technique la plus adaptée et qui a révolutionné l'étude des microremaniements chromosomiques. Il est donc indispensable d'avoir une orientation clinique préalable, facilitée par l'amélioration des connaissances de l'expression phénotypique de ces syndromes, étudiés sur de larges cohortes de patients et à différents âges de vie. La découverte des mécanismes d'apparition des microdélétions laisse supposer qu'il existe autant de microduplications de ces régions. Celles-ci sont cependant exceptionnellement rapportées probablement en raison de leur moindre influence sur le phénotype et de la difficulté de les mettre en évidence avec les techniques actuelles.

Le développement récent de l'hybridation génomique comparative sur puces à ADN (CGH*microarray*) permet d'envisager une approche « génome entier » pour la recherche des remaniements chromosomiques. Cette technique permet théoriquement la détection de déséquilibres génomiques de séquences spécifiques

au sein d'une copie avec une résolution d'une mégabase pour les puces à haute résolution chromosomique. Elle permet donc la détection avec la même sensibilité d'une délétion ou d'une duplication. Il est fort probable que l'application médicale de cette nouvelle technique va entraîner un bouleversement important du domaine.

# RESUME

## RESUME

Les syndromes microdélétionnels représentent des syndromes cliniques, associant généralement : un retard mental, dysmorphie avec des malformations d'organes et des troubles du comportement.

Il s'agit d'un syndrome de gènes contigus le plus souvent de novo par perte de fragment chromosomique de petite taille infra-microscopique (< 5 mégabases) non visible sur un caryotype standard. Cette microdélétion est décelable uniquement par l'utilisation des techniques de haute résolution ou de cytogénétique moléculaire dont la plus utilisée en pratique médicale est l'Hybridation In Situ Fluorescente (FISH), qui repère une séquence spécifique par une sonde complémentaire d'ADN marqué en fluorescence.

Les deux syndromes les plus étudiés, diagnostiqués et suivies sont : le Syndrome de la délétion 22q11 et le syndrome de Williams.

A travers cette thèse, nous mettrons à jour les dernières actualités scientifiques sur ces syndromes ainsi que l'intérêt d'une approche multidisciplinaire en :

- Ø En définissant les syndromes microdélétionnels les plus connus,
- Ø En rappelant les aspects cytogénétiques et moléculaires de ces syndromes,
- Ø En citant les principaux outils pour le diagnostic ainsi que l'intérêt de la cytogénétique moléculaire dans l'approche de ces syndromes,
- Ø En insistant sur le rôle du conseil génétique et de la prise en charge pluridisciplinaire.

## ABSTRACT

Microdeletion syndromes are clinical syndromes, usually involving: mental retardation, dysmorphic with organ malformations and behavioral disorders.

It is a contiguous gene syndrome, most often is de novo, or new, by loss of small sub-microscopic fragment of a chromosome (< 5 megabases) not visible on a standard karyotype. This microdeletion is detected only by the use of high-resolution techniques or molecular cytogenetics, the most used in medical practice is the Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), which identifies a specific sequence by a complementary DNA probe marked fluorescence.

The most studied, diagnosed and monitored syndromes are DiGeorge syndrome and Williams syndrome.

Through this thesis, we will update the latest news on these syndromes scientific interest and a multidisciplinary approach:

- Ø By defining the best known microdeletion syndromes
- Ø In recalling the cytogenetic and molecular aspects of these syndromes,
- Ø In citing the main tools for the diagnosis and the value of molecular cytogenetic in the approach of these syndromes,
- Ø In emphasizing the role of genetic counseling and multidisciplinary care.

## ملخص

متلازمات الحذف الوراثي هي متلازمات سريرية عادة ما تنطوي على: التخلف العقلي، ملامح وجه مختلفة، عيوب خلقية بالأعضاء واضطرابات سلوكية يتعلق الأمر في معظم الأحيان بمتلازمة الجينات المتجاورة نتيجة حذف جديد لأجزاء صبغية صغيرة تحت مجهرية (أصغر من 5Mb ميجاباز) غير مرئية على الخريطة الصبغية القياسية

يتم الكشف عن هذا الحذف الوراثي فقط باستخدام تقنيات عالية الدقة أو علم الوراثة الخلوية الجزيئية أكثر التقنيات المستخدمة في الممارسة الطبية هي تقنية وميض التهجين الموضعي باستخدام مجس الحمض النووي

المتلازمات الأكثر دراسة، تشخيصا ومتابعة هي: متلازمة دي جورج ومتلازمة وليامز من خلال هذه الرسالة، سوف نقوم بتحديث آخر المستجدات العلمية عن هذه المتلازمات و كذلك التأكيد

على ضرورة اتخاذ مقاربة متعددة الإختصاصات و ذلك من خلال

- ✓ التعرف بأشهر متلازمات الحذف الوراثي،
- ✓ التذكير بالجوانب الوراثة الخلوية والجزيئية لهذه المتلازمات،
- ✓ تحديد أبرز وسائل التشخيص ودور علم الوراثة الخلوية الجزيئية في مقاربة هذه المتلازمات

✓ التأكيد على دور الاستشارة الوراثة والرعاية متعددة التخصصات

# BIBLIOGRAPHIE

1. A. Vigouroux, N. Chassaing, Évolution des techniques de diagnostic en génétique  
*Archives de Pédiatrie, Volume 16, Issue 6, June 2009, Pages 915-917*
2. R. Berger, Cytogénétique humaine. De 1956 à 2006 *Pathologie Biologie, Volume 55, Issue 1, February 2007, Pages 1-12*
3. P. Vago, Un demi-siècle de cytogénétique humaine et médicale  
*Morphologie, Volume 93, Issue 301, August-September 2009, Pages 42-50*  
l'équipe de cytogénétique médicale de Clermont-Ferrand
4. Jean-Claude Mounolou, Françoise Frindlansky, La génétique fondamentale : Gérard Seguin Que sais-je ? Puf, Paris, 2000, 127 p.  
*Nature Sciences Sociétés, Volume 10, Issue 1, 2002, Pages 97-98*
5. J.-P. Siffroi, S. Chantot-Bastaraud, L'avenir de la cytogénétique après le séquençage du génome humain *Morphologie, Volume 88, Issue 280, April 2004, Pages 19-23*
6. Pascal Hallouët, Anne Borry , 11 - Multiplication cellulaire  
*Mémo-guide de biologie et de physiologie humaines, 2009, Pages 48-52*
7. Pascal Hallouët, La cellule  
*Mémo-guide infirmier (2e édition), 2010, Pages 6-9*
8. J.F. Viallard, F. Lacombe, F. Belloc, J.L. Pellegrin, J. Reiffers, Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie  
*Cancer/Radiothérapie, Volume 5, Issue 2, April 2001, Pages 109-129*
9. Véronique Marck, Chapitre 1 - Bases biologiques, anatomiques et physiologiques  
*Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie, 2010, Pages 1-19*

10. Dictionnaire de Médecine Flammarion. Médecine- Sciences Flammarion 4e édition 1991.
11. Dupont JM . Ultrastructure du chromosome. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. June 2008
12. Aly Abbara, Lexique de la Médecine fœtale et de la morphologie humaine
13. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology
14. Principes de génétique humaine  
*Biofutur, Volume 1998, Issue 183, November 1998, Page 53*
15. V. Malan, S. Romana, Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention  
*Archives de Pédiatrie, Volume 19, Issue 4, April 2012, Pages 437-442*
16. J. Lespinasse, G. Nadeau, Apport de la génétique chromosomique moléculaire au diagnostic prénatal et périnatal des anomalies chromosomiques et des maladies géniques  
*La Presse Médicale, Volume 34, Issue 17, October 2005, Pages 1257-1263*
17. L. Bott, C. Thumerelle, J.C. Cuvellier, A. Deschildre, L. Vallée, A. Sardet, Ataxie-télangiectasie : de la clinique à la physiopathologie  
*Archives de Pédiatrie, Volume 13, Issue 3, March 2006, Pages 293-298*
18. J. Lamoril, N. Ameziane, J.-C. Deybach, P. Bouizegarène, M. Bogard, Notions de génétique moléculaire pour comprendre l'hérédité  
*Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 23, Issue 6, December 2008, Pages 331-352*

19. D. Rabineau et JM. Dupont, Cytogénétique Humaine, Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, Université PARIS V ,2011
20. M.C. Boffa, Hybridation in situ  
*La Revue de Médecine Interne, Volume 17, Issue 6, June 1996, Pages 505-507*
21. Nicolas Chevassus-au-Louis, FISH, la renaissance de la cytogénétique  
*Biofutur, Volume 2000, Issue 200, May 2000, Page 18*
22. P. Rochaix, FISH, applications en anatomie pathologique  
*Annales de Pathologie, Volume 24, Supplement 1, November 2004, Pages 68-73*
23. P. Brousset, Techniques d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH)  
*Annales de Pathologie, Volume 24, Supplement 1, November 2004, Pages 66-67*
24. N. Douet-Guilbert, A. Basinko, M.-J. Le Bris, A. Herry, F. Morel, M. De Braekeleer, Stratégies d'identification des marqueurs chromosomiques surnuméraires en cytogénétique constitutionnelle  
*Pathologie Biologie, Volume 56, Issue 6, September 2008, Pages 362-367*
25. J-M Dupont, Apports de l'hybridation in situ interphasique au diagnostic prénatal cytogénétique  
*Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 14, Issue 2, March-April 1999, Pages 98-102*
26. G Tachdjian, V Cacheux, S Romana, Techniques nouvelles en cytogénétique  
*Archives de Pédiatrie, Volume 3, Supplement 1, 1996, Pages S351-S352*
27. L. Gouas, T. Roucaute, C. Goumy, C. Benier, A. Buvat, L. Veronese, A. Tchirkov, P. Vago, Intérêt des techniques moléculaires de la cytogénétique en reproduction humaine  
*Morphologie, Volume 91, Issue 293, July 2007, Page 116*

28. B. Keren, C. Schluth-Bolard, G. Egea, D. Sanlaville, Nouvelles méthodes d'analyse globale du génome humain , *Archives de Pédiatrie, Volume 17, Issue 11, November 2010, Pages 1605-1608,*
29. Philippe Planchon, L'hybridation génomique comparative *Biofutur, Volume 1997, Issue 165, March 1997, Page 10A*
30. D. Sanlaville, J.M. Lapierre, A. Coquin, C. Turleau, J. Vermeesch, L. Colleaux, G. Borck, M. Vekemans, A. Aurias, S.P. Romana, La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle *Archives de Pédiatrie, Volume 12, Issue 10, October 2005, Pages 1515-1520*
31. Serge Romana, Valerie Malan, Cytogénétique moléculaire, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Service d'Histo-Embryo-Cytogenetique, Hopital Necker Enfants Malades, Paris,2010
32. G.LEFORT, Génétique, reproduction et développement, Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, 2010
33. F. Vialard, D. Molina Gomes, Les nouvelles technologies d'analyse du génome : quelles utilisations en diagnostic prénatal *Gynécologie Obstétrique & Fertilité, Volume 39, Issue 1, January 2011, Pages 32-41*
34. P. Jonveaux, Technique d'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN et fœtopathologie *Archives de Pédiatrie, Volume 17, Issue 7, July 2010, Pages 1119-1123*
35. M Lafage-Pochitaloff, Notions de base en cytogénétique conventionnelle et moléculaire : application au diagnostic des hémopathies malignes *Pathologie Biologie, Volume 51, Issue 6, 1 August 2003, Pages 307-311*

36. C. Goumy, C. Benier, M. Giollant, M.N. Bonnet-Dupeyron, J.Y. Jaffray, P. Vago, Apport des techniques de CGH et CGH ARRAY en cytogénétique constitutionnelle pré et post-natale  
*Morphologie, Volume 90, Issue 289, June 2006, Page 80*
37. M. Béri-Dexheimer, C. Bonnet, P. Chambon, K. Brochet, M.-J. Grégoire, P. Jonveaux, L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (puces à ADN) en pathologie chromosomique constitutionnelle *Pathologie Biologie, Volume 55, Issue 1, February 2007, Pages 13-18*
38. C. Nemos, A.-C. Bursztejn, P. Jonveaux,, Gestion des variations du nombre de séquences génomiques (CNV) en génétique humaine constitutionnelle utilisant l'hybridation génomique comparative en microréseau d'ADN (HGCM)  
*Pathologie Biologie, Volume 56, Issue 6, September 2008, Pages 354-361*
39. Jérôme Hinfray , Pucés à ADN et autres systèmes d'analyse génomique  
*Biofutur, Volume 2000, Issue 206, December 2000, Pages E1-E14*
40. D. Baron, M. Raharijaona, R. Houlgatte, Pucés à ADN  
*IRBM, Volume 28, Issues 5-6, November-December 2007, Pages 210-215*
41. J. Andrieux, Pucés à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques  
*Pathologie Biologie, Volume 56, Issue 6, September 2008, Pages 368-374*
42. E Mornet , ADN, les 50 ans de la double hélice : du concept d'hybridation moléculaire aux biopuces  
*Gynécologie Obstétrique & Fertilité, Volume 31, Issue 11, November 2003, Pages 895-899*
43. A. Goldenberg, P. Saugier-veber, Retards mentaux d'origine génétique  
*Pathologie Biologie, Volume 58, Issue 5, October 2010, Pages 331-342*

44. M Rio, L Colleaux, D Sanlaville, G Borck, F Molinari, A Munnich, Approche diagnostique du sujet présentant un retard mental sévère et syndromique  
*Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 6, June 2004, Pages 566-568*
45. E. Excoffier, A. Verloes, P. Eydoux, D. Lacombe, M. Bouvard, M.C. Mouren-Siméoni, Phénotypes psycho-comportementaux de l'enfant et de l'adolescent dans les syndromes microdélétionnels  
*Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique, Volume 161, Issue 1, 1 February 2003, Pages 54-58*
46. J.C Cuvellier, F Pandit, S Casalis, M.P Lemaître, J.M Cuisset, A Platof, L Vallée, Analyse d'une population de 100 enfants adressés pour troubles d'apprentissage scolaire  
*Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 3, March 2004, Pages 201-206*
47. Orphanet database
48. F. Minier, D. Carles, F. Pelluard, E.M. Alberti, L. Stern, R. Saura, Syndrome de Di George, étude rétrospective de 52 cas  
*Archives de Pédiatrie, Volume 12, Issue 3, March 2005, Pages 254-257*
49. A Levy-Mozziconacci, D Lacombe, B Leheup, F Wernert, F Rouault, N Philip, La microdélétion du chromosome 22q11 chez l'enfant: à propos d'une série de 49 patients  
*Archives de Pédiatrie, Volume 3, Issue 8, August 1996, Pages 761-768*
50. Siham Chafai Elalaoui, Ilham Ratbi, Souad Cherkaoui Deqaqi, Karim Ouldim, Abdelaziz Sefiani, Microdélétion 22q11.2 révélée par une hypocalcémie néonatale avec une dysmorphie faciale mineure  
*Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2009, Issue 409, February 2009, Pages 83-85*

51. Ouldin K, Bouguenouch L, Samri I, El Otmani I, Hamdaoui H, Bennis S, Lakhdar MI, Chaouki S, Atmani S, Hida M. Microdeletion syndromes (Williams syndrome and deletion syndrome 22q11) at CHU Hassan II of Fez: report of 3 observations,  
Pan Afr Med J. 2012;11:3. Epub 2012 Jan 12
52. D Lacombe, Phénotype extra cardiaque associé à la microdélétion 22q11  
*Archives de Pédiatrie, Volume 9, Supplement 2, May 2002, Pages 100-101*
53. G. Viot , cardiopathies congénitales : quel risque pour la fratrie ? *Journal de Pédiatrie et de Puériculture, Volume 15, Issue 5, July 2002, Pages 259-264*
54. E Robert-Gnansia, C Francannet, A Bozio, P Bouvagnet, Épidémiologie, étiologie et génétique des cardiopathies congénitales  
*EMC - Cardiologie-Angéiologie, Volume 1, Issue 2, May 2004, Pages 140-160*
55. Lacroix, M. Pezet, A. Capel, D. Bonnet, M. Hennequin, M.-P. Jacob, G. Bricca, D. Couet, G. Faury, J. Bernicot, B. Gilbert-Dussardier, Le syndrome de Williams-Beuren : une approche pluridisciplinaire  
*Archives de Pédiatrie, Volume 16, Issue 3, March 2009, Pages 273-282, A.*
56. N. Philip, Génétique moléculaire du syndrome de Williams *Archives de Pédiatrie, Volume 8, Supplement 2, May 2001, Pages 353-354*
57. T. Baubet, Le syndrome de Williams importance d'une prise en charge pluridisciplinaire précoce  
*Journal de Pédiatrie et de Puériculture, Volume 12, Issue 4, June 1999, Pages 225-230*
58. G. Diene, A. Postel-Vinay, G. Pinto, M. Polak, M. Tauber, Le syndrome de Prader-Willi  
*Annales d'Endocrinologie, Volume 68, Issues 2-3, June 2007, Pages 129-137*

59. JM Dupont, L Cuisset, Bases génétiques des syndromes de Prader-Willi et d'Angelman implications pour la conduite du diagnostic biologique *Archives de Pédiatrie, Volume 5, Issue 4, April 1998, Pages 418-424*
60. MO Livet, A Moncla, B Delobel, MF Croquette, N Philip, L Vallée, Le syndrome de Smith-Magenis  
*Archives de Pédiatrie, Volume 4, Issue 12, December 1997, Pages 1231-1237*
61. B Delobel, JC Cuvellier, L Vallée, F Boiddein, JF Lemaître, C Bernard, GA Loeville, O Fovet, MC Francannet, O Boute, MF Croquette, Syndrome de Smith-Magenis, à propos de huit observations: un phénotype comportemental, JP Nuyts *Hôpital Saint-Antoine, Lille; services de neuropédiatrie, Lille, Clermont-Ferrand: services de pédiatrie, Dunkerque, Seclin et CHR Lille*  
*Archives de Pédiatrie, Volume 4, Issue 10, October 1997, Page 1056*
62. N El Hafidi, Z Ghanimi, A Gaouzi, B Benhamou, F Alaoui-M'sseffer, Syndrome de Rubinstein-Taybi : à propos d'une forme familiale  
*Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 8, August 2004, Pages 978-979*
63. P. Labrune, Le conseil génétique  
*Journal de Pédiatrie et de Puériculture, Volume 6, Issue 8, December 1993, Pages 475-479*
64. P. Pellerin, Au-delà du diagnostic d'une maladie génétique, la question de l'information de la parentèle  
*Annales Pharmaceutiques Françaises, Volume 67, Issue 1, January 2009, Pages 20-24*
65. Sireteanu A, Covic M, Gorduză EV. Array CGH: technical considerations and applications.  
*Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2012 Apr-Jun;116(2):545-51.*

66. Shao XY, Zhang R, Hu C, Wang CR, Lu JY, Qin W, Yu HY, Bao YQ, Cheng XB, Jia WP Precise microdeletion detection of Prader-Willi Syndrome with array comparative genome hybridization.  
Biomed Environ Sci. 2010 Jun;23(3):194-8.
67. Xiang B, Zhu H, Shen Y, Miller DT, Lu K, Hu X, Andersson HC, Narumanchi TM, Wang Y, Martinez JE, Wu BL, Li P, Li MM, Chen TJ, Fan YS.  
Genome-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation: a multicenter experience of 1499 clinical cases. J Mol Diagn. 2010 Mar;12(2):204-12.

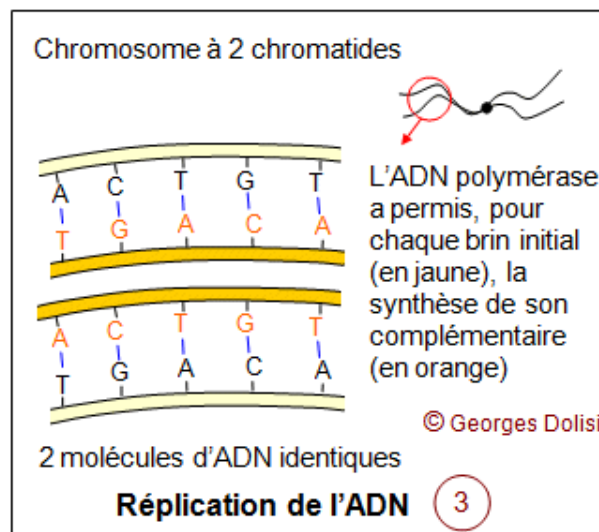
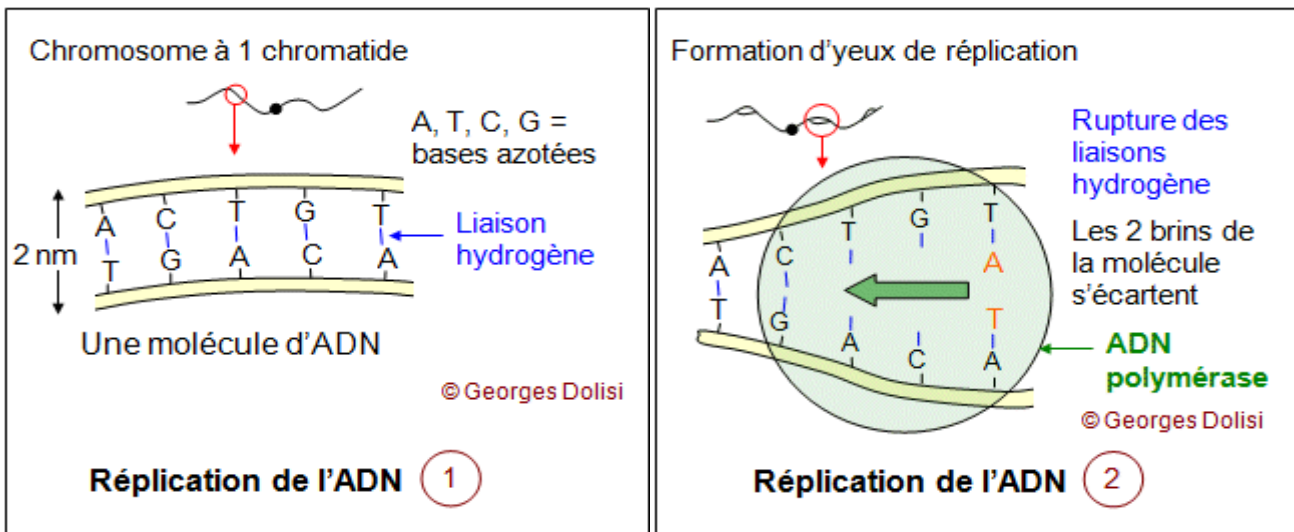
# ANNEXES

## ANNEXE 1 : la réplication de l'ADN

La réplication de l'hélice d'ADN commence avec la séparation de ses deux chaînes grâce à la rupture des liaisons hydrogène (en bleu sur les schémas). Ces séparations se produisent simultanément à plusieurs endroits de la molécule au niveau des "yeux de réplication".

Lorsque la séparation est effective, chaque brin de la molécule mère va servir de matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire (à raison d'environ 50 nucléotides par seconde), ce qui va produire finalement 2 hélices filles. L'information génétique est ainsi dupliquée dans son intégralité, de façon que deux doubles hélices complètes d'ADN soient formées, chacune ayant une séquence nucléotidique identique à celle de l'hélice d'ADN parentale qui a servi de matrice. C'est parce que chaque molécule d'ADN fille est constituée d'une chaîne d'origine et d'une chaîne complémentaire synthétisée que l'on a qualifié cette réplication de semi-conservative.

Tous ces mécanismes de réplication ne sont possibles que grâce à un complexe multienzymatique, dont l'ADN polymérase et une ligase. Cette ADN polymérase permet la reconnaissance de chaque nucléotide de l'ADN dont les deux brins ont été séparés, par un nucléotide complémentaire non polymérisé, de façon que les groupes donneurs et accepteurs de liaison hydrogène sur chaque base soient exposés pour l'appariement. Les nucléotides isolés entrants qui conviennent sont alignés pour leur polymérisation par catalyse enzymatique en une nouvelle chaîne d'acide nucléique.



## Annexe 2

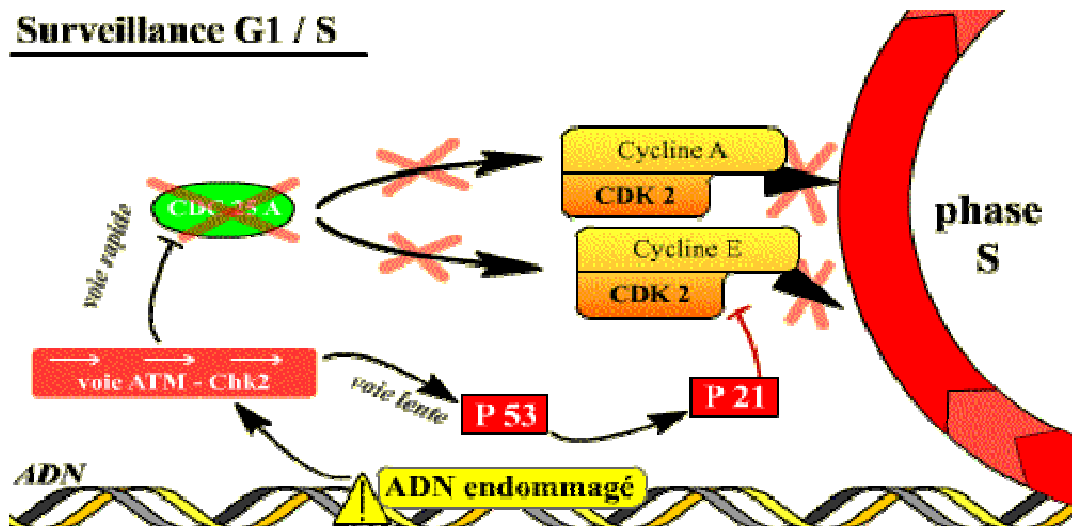
### Transition G1-S

Cette transition est sous contrôle positif des complexes cyclineA/CDK2 et cyclineB/CDK2

Si l'ADN est endommagé, la transition G1-S est bloquée par les mécanismes de surveillance de l'état de l'ADN (DDCP). Ces mécanismes aboutissent :

d'une part à la dégradation de Cdc25A, ce qui arrête le cycle puisque les complexes Cycline D / Cdk4 et Cyclines E, A / Cdk2 ne peuvent plus être activés par Cdc 25A,

d'autre part à l'accumulation dans la cellule de p 53 qui induit l'expression de p 21, inhibiteur des complexes Cyclines E, A / Cdk2. La p 53 induit également la transcription d'enzymes de réparation de l'ADN.



*Si l'ADN est lésé, l'activation de deux voies inhibitrices des complexes Cycline / Cdk de la phase S permet d'arrêter le déroulement de la phase S*

## Annexe 2

### Transition G2/M

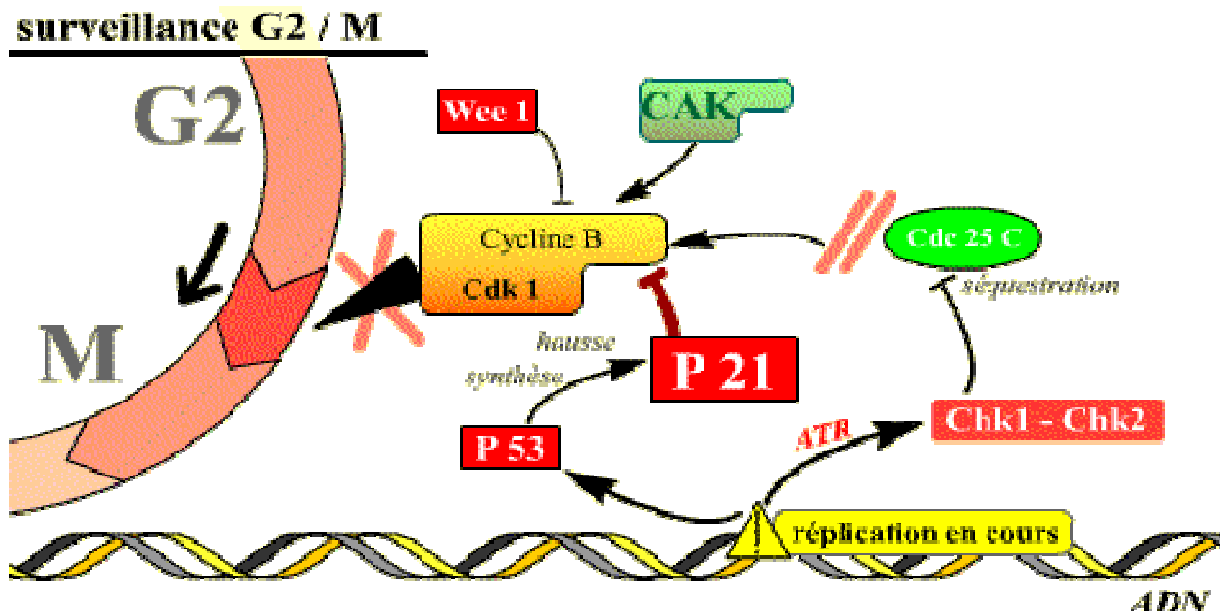
Dans ce cas, il s'agit pour la cellule de faire en sorte que la mitose ne soit pas déclenchée tant que la réplication n'est pas totalement achevée ou tant que les lésions détectées dans l'ADN qui s'est répliqué ne sont pas réparées. Pour cela, les molécules qui interviennent vont bloquer le processus d'activation de la Cdk1.

Deux types de réponses existent :

la phosphorylation de Cdc25C entraîne sa séquestration dans le cytoplasme, loin de son substrat nucléaire Cdk1.

Le maintien de l'arrêt en G2 fait intervenir également la p53, facteur de transcription de la p 21 et d'enzymes de réparation de l'ADN. La p 21 bloque l'activité de cycline B / Cdk1.

Ainsi, le complexe Cycline B / Cdk 1 garde ses phosphorylations inhibitrices, ou bien est bloqué par la p21, tant que la réplication n'est pas achevée : aucune mitose ne débute avant la fin de la réplication.



Si l'ADN est lésé, ou si la réplication n'est pas achevée, l'activation de plusieurs voies inhibitrices du complexe Cdk 1 / Cycline B permet d'empêcher l'entrée en mitose.

## Annexe 2

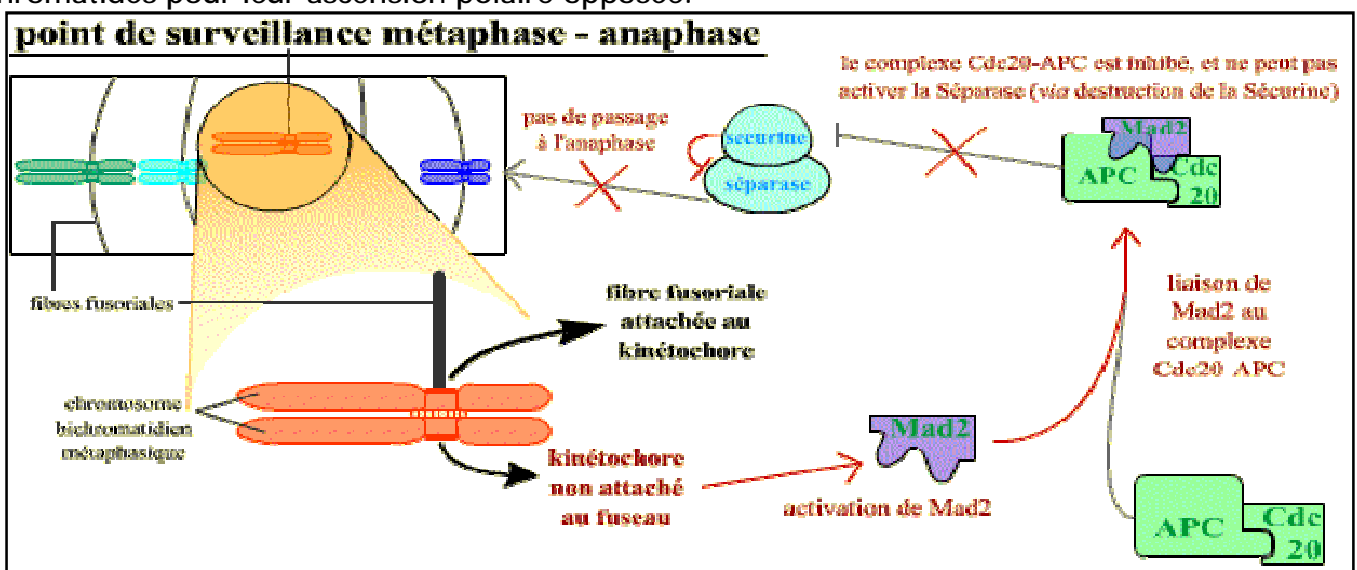
### Transition métaphase / anaphase

L'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique en plaque métaphasique est indispensable au déclenchement de l'anaphase. Le contrôle de cet attachement représente un point de surveillance important, au cours de la mitose.

Un mécanisme opère pour s'assurer que tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau avant que la séparation des chromatides-sœurs n'ait lieu. Les chromosomes non attachés au fuseau bloquent la séparation de toutes les chromatides-sœurs

Normalement, à l'anaphase, les chromatides-sœurs se séparent lorsque la séparase (une protéase) détruit par protéolyse spécifique la cohésine qui les maintient rassemblées. Or, tant que les chromosomes métaphasiques ne sont pas correctement attachés au fuseau par leurs kinétochores (et, il suffit qu'un seul ne le soit pas), la séparase est inhibée par la sécurine. La destruction de la sécurine est sous la dépendance de l'APC-Cdc20 (APC = Anaphase Promoting Complex, ubiquitine ligase active lorsqu'elle est associée à la protéine Cdc20) qui reste inhibée par la protéine Mad2 tant que les chromosomes ne sont pas tous correctement attachés.

Chaque kinétochore non correctement attaché au fuseau envoie un signal inhibiteur bloquant l'activation de APC-Cdc20. Ce signal généré par le kinétochore non attaché correspond à la protéine Mad2 : un seul kinétochore mal attaché a pour conséquence la liaison de Mad2 sur le complexe APC-Cdc20, et ainsi son inhibition. Une fois que tous les kinétochores sont attachés, Mad2 n'est plus activée et ne peut plus inhiber le complexe APC-Cdc20 qui devient actif, ce qui permet la destruction de la sécurine et la séparation des chromatides pour leur ascension polaire opposée.

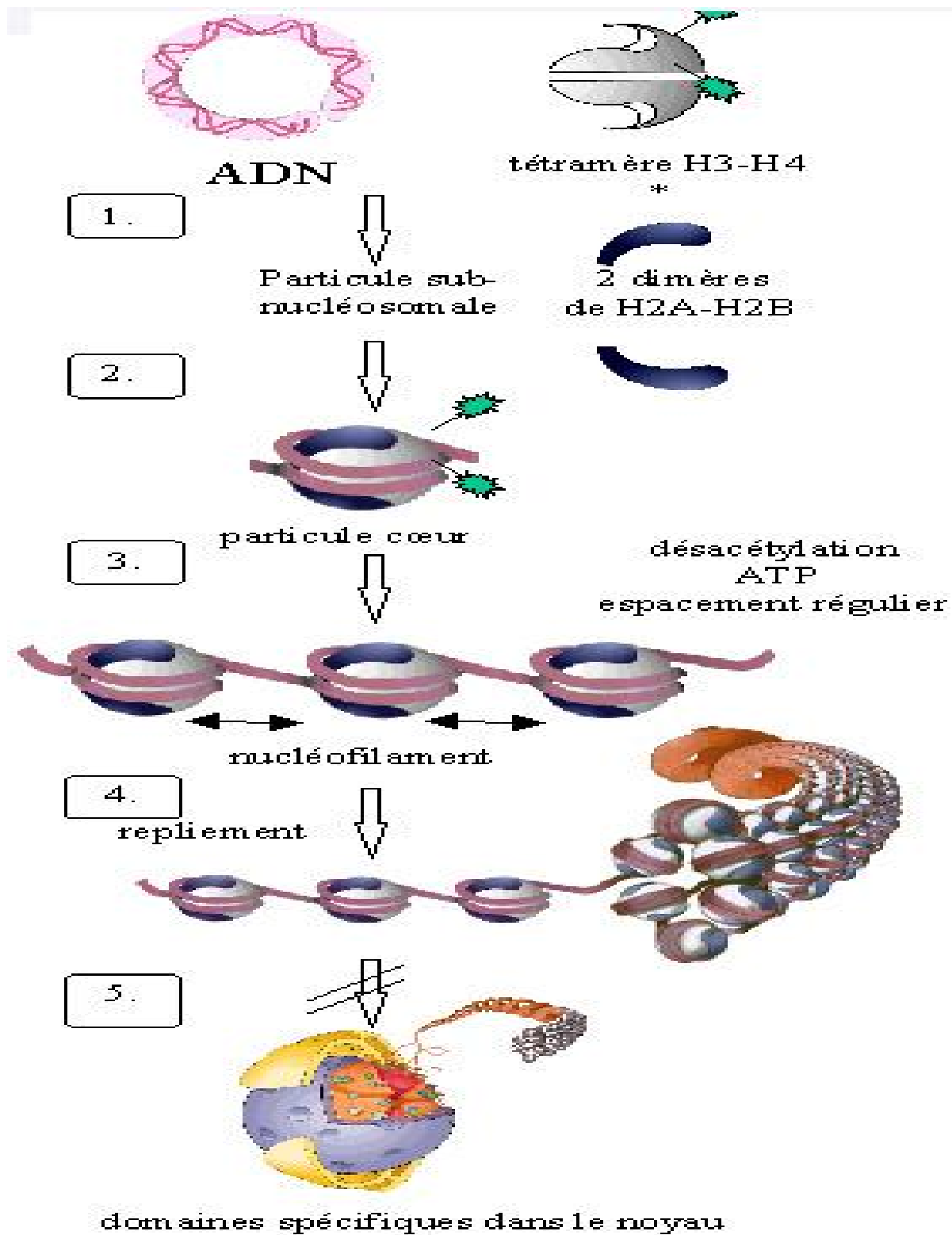


*Le point de contrôle de l'attachement correct au fuseau.*

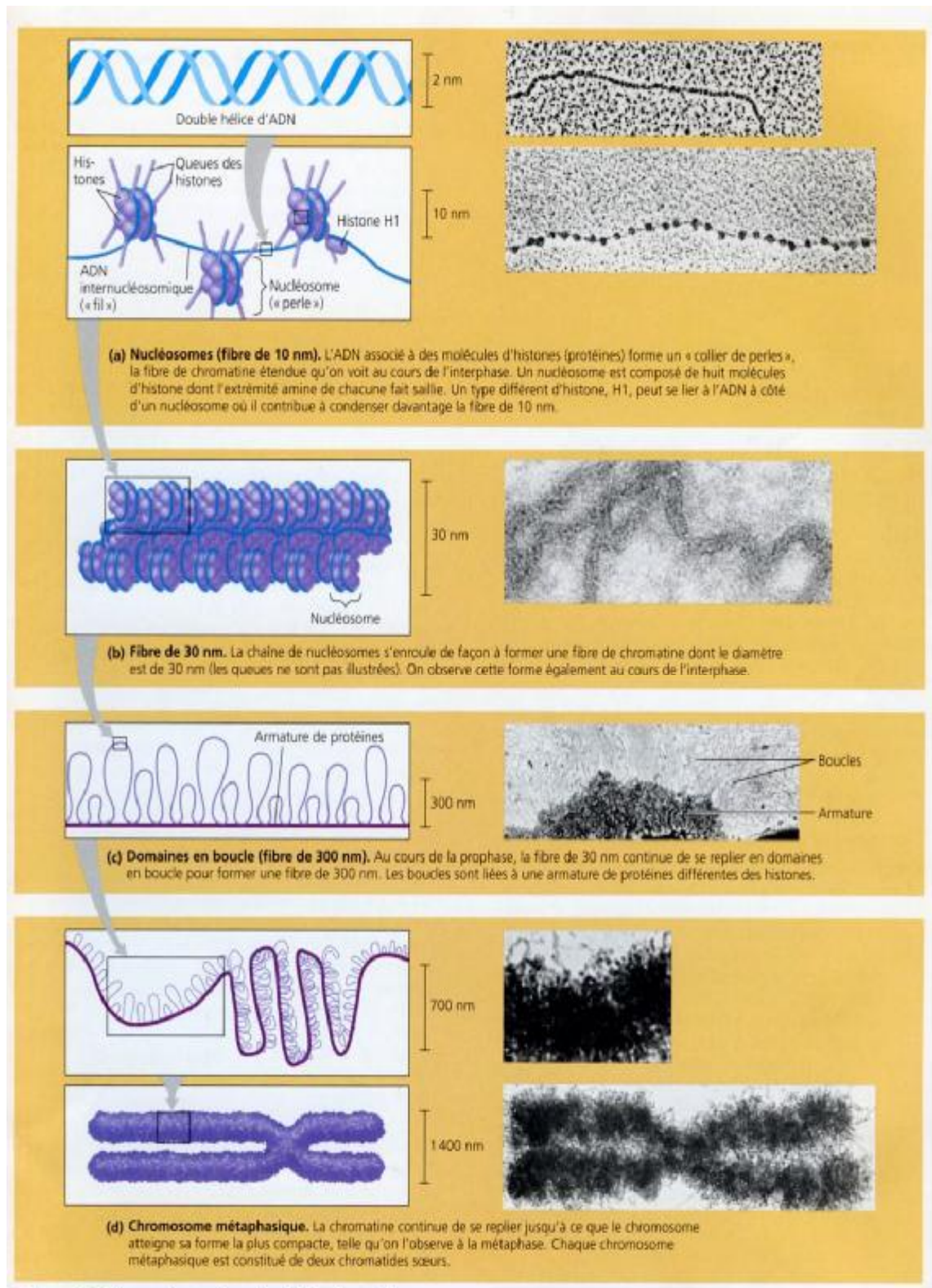
## ANNEXE 3

	Spermatogenèse	Ovogenèse
Nombre de gamètes	1 spermatogonie --> 4 spermatozoïdes.	1 ovogonie mature --> 1 ovocyte II et 2 globules polaires non fonctionnels.
Mobilité des gamètes	Cellules très mobiles grâce au flagelle.	Immobile. Le déplacement est assuré par les cils du pavillon et des trompes.
Gamétogenèse (durée)	De la puberté jusqu'à un âge avancé, avec diminution progressive du nombre et de la qualité.	De la puberté jusqu'à la ménopause.
Gamétogenèse (nombre)	Plusieurs millions de spermatozoïdes par jour.	Environ 500 000 à 700 000 à la naissance (nombre définitif), puis 1 à 2 ovules par cycle de 28 j.
Durée de vie du gamète	4 à 6 jours.	24h
Chromosomes	23 chromosomes dont 1 sexuel : soit Y, soit X.	23 chromosomes dont un sexuel : toujours X.
Dimensions du gamète	Environ 50 à 70 µ (microns) de long (avec le flagelle), 3 à 4 µ de large.	100 à 150 µ (microns) de diamètre. Un micron = 1 millième de millimètre.
Évolution du gamète	Dans les tubes séminifères des testicules.	Dans les ovaires, au sein de structures qui évoluent en même temps que le gamète : les follicules.
Durée de l'évolution	Environ 60 à 75 jours.	Une à plusieurs dizaines années, depuis la vie embryonnaire jusqu'à la fécondation (de la puberté à la ménopause).

## ANNEXE 4A

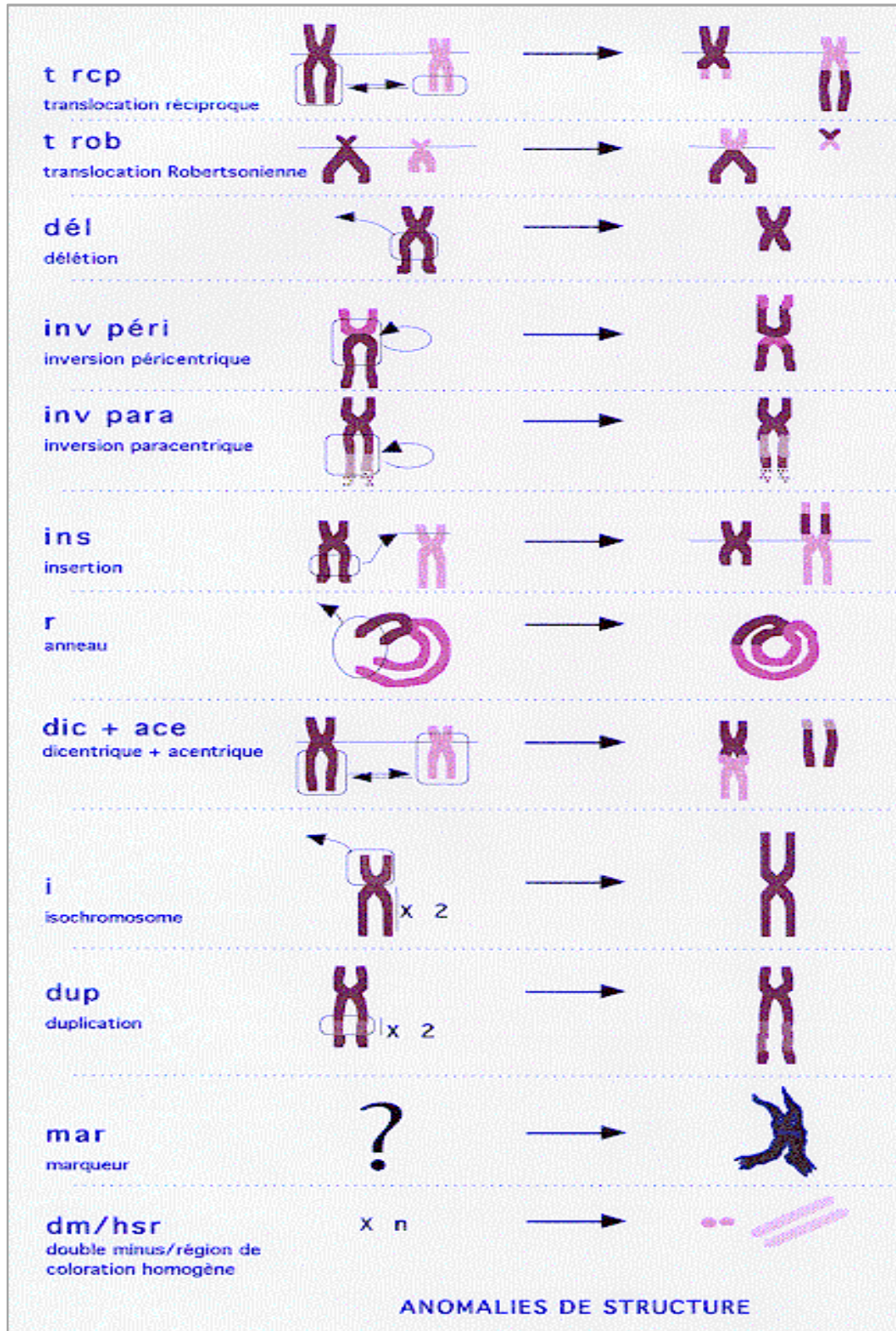


## ANNEXE 4B



## ANNEXE 5

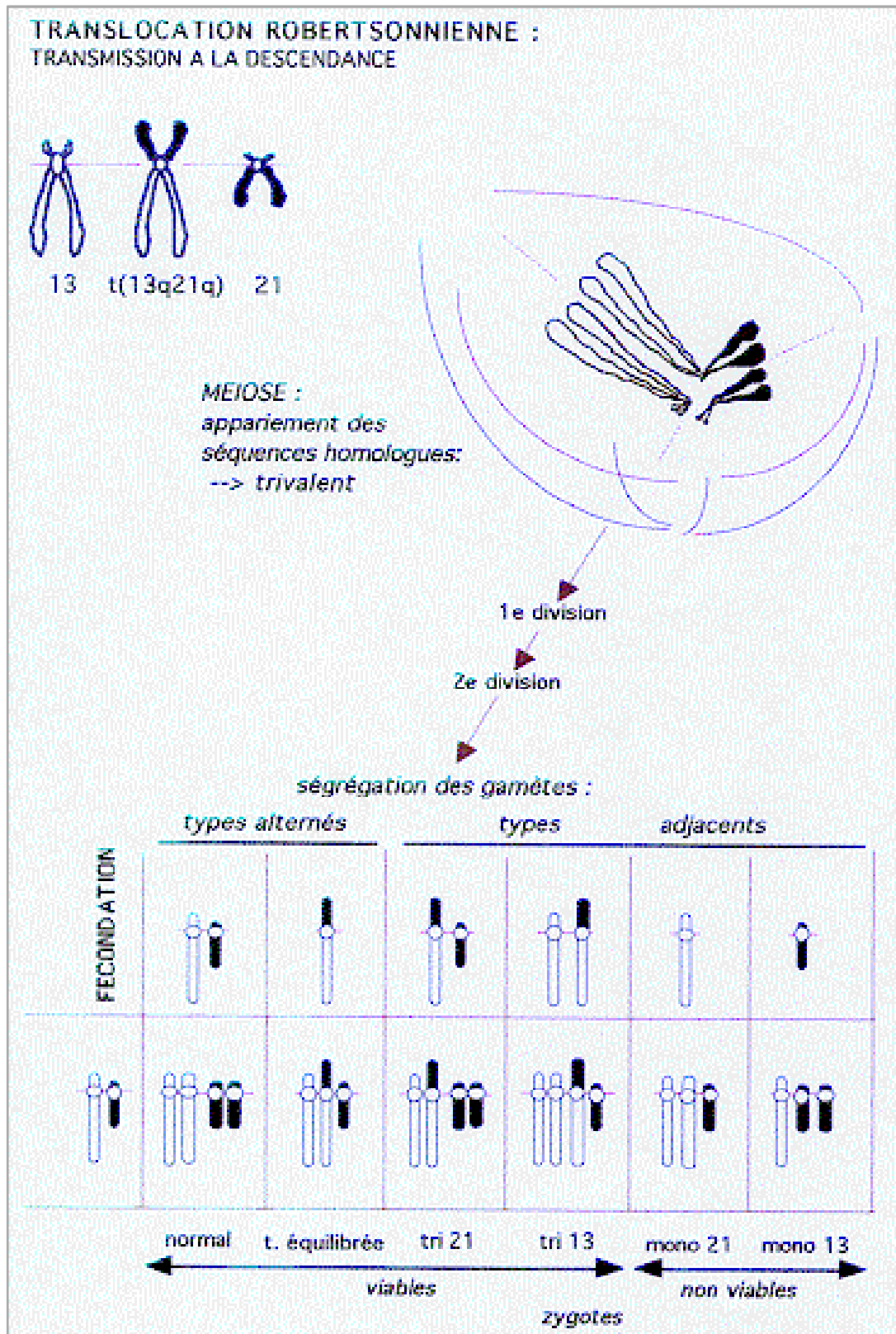
### Principales anomalies de structure





## ANNEXE 7

### Translocation robertsonienne : ségrégation des gamètes



## CARYOTYPE : Protocole expérimental

### a) Mise en culture des cellules sanguines

On prélève à partir du sang préalablement conservé dans le tube hépariné, 500  $\mu$ l qu'on ajoute, sous hôte, à un tube de 15 ml contenant un milieu de culture prêt à l'emploi (PB-MAX Karyotyping middle d'Invitrogène). On note sur ce tube les données du patient (nom, numéro du dossier, date de culture). Le tube est ensuite incubé en position inclinée à 37°C pendant 72 h.

### b) Blocage des cellules en métaphase

Après 72 h de culture, on y ajoute sous hôte 100  $\mu$ l de colchicine qui a pour rôle de bloquer les cellules en métaphase. Après avoir bien mélangé les constituants on remet le tube à l'étuve à 37°C pendant 50 minutes.

### c) Choc hypotonique

On prépare d'abord la solution hypotonique de KCl 0.065 M qui sert à éclater les cellules. Cette solution doit être à 37°C lors d'utilisation.

Après 50 minutes, on mélange le tube, on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on élimine le surnageant pour ne garder que le culot. On suspend ce dernier dans quelques gouttes de la solution de KCl 0.065 M à l'aide d'une pipette, puis on complète à 12 ml par la même solution. On homogénéise bien et on incube à 37°C pendant 20 mn.

### d) Fixation

Le fixateur ou solution de Carnoy I doit être préparé juste avant l'utilisation. Il est constitué de trois volumes de méthanol additionnés d'un volume d'acide acétique.

Après incubation, on effectue une série de fixations précédée par une préfixation:

- Préfixation:

On ajoute 1ml du fixateur au tube, soit 13 ml au total. On centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on élimine le surnageant.

- Première fixation:

On suspend le culot dans quelques gouttes de Carnoy I et on complète à 10 ml par la même solution. On homogénéise et on incube pendant 20 mn à température ambiante. Puis on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn, on retire le surnageant jusqu'à environ 0.5 ml.

- Deuxième fixation:

On remet le culot en suspension dans quelques gouttes du fixateur et on complète à 8 ml. On homogénéise et on laisse fixer à température ambiante pendant au moins 45mn. Ensuite, on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on retire le surnageant jusqu'à environ 1ml. Ensuite on procède à l'étalement.

e) Etalement

D'abord on prépare une pièce sous conditions de température de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  et d'humidité d'au moins  $45\% \pm 5$ . On prépare également des lames à bord rodé sur lequel on note les références du patient.

On remet le culot contenant les leucocytes en suspension dans quelques gouttes du Carnoy I, on aspire dans l'effilure de la pipette pasteur. Dans la zone humidifiée, on tient la pipette pasteur horizontalement au dessus de la lame avec une distance d'à peu près 15 cm, et on laisse tomber 2 à 3 gouttes de la culture d'une façon à couvrir l'ensemble de la lame. Puis on laisse sécher à température ambiante.

Une fois séchées, on incube les lames à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 4 jours pour permettre la déshydratation des chromosomes et pour rendre fragile les liaisons hydrogènes qui lient les deux brins d'ADN, à fin de les préparer pour l'étape de dénaturation.

f) Dénaturation et coloration

Au quatrième jour d'incubation on récupère les lames et on procède à la dénaturation thermique ménagée qui vise les liaisons A=T. On met les lames dans la solution saline Earl à 87°C pendant 1 h 25 mn, ensuite on rince les lames et on les met dans une solution de Giemsa 7% (colorant) pendant 8 mn à fin de colorer les chromosomes en bandes claires et sombres. En effet les liaisons A = T dénaturées dans l'étape précédente ne peuvent plus absorber le colorant et apparaissent claires sous microscope, alors que les liaisons G ≡ C qui sont restées intactes absorbent le colorant et apparaissent sombres sous microscope.

On laisse sécher la lame pour la lire sous un microscope relié à un ordinateur qui va permettre à l'aide du logiciel "Applied Imaging CytoVision™ 3.6" d'organiser les chromosomes sous la forme du caryotype classique.

## FISH : Protocole expérimental

La FISH suit dans ses premières étapes le protocole du caryotype jusqu'à obtention des lames étalées et sèches. Sur ces lames on délimite la zone riche en mitoses qui sera ciblée par les étapes qui suivent.

Avant de débiter la technique, on met au bain marie les solutions qui seront utilisées à chaud.

### a) Prétraitement

On immerge les lames, en premier lieu, dans la solution de 2XSSC (solution de lavage) à 37°C pendant 30mn, ensuite dans du PBS 1 X (solution de lavage) à température ambiante pendant 1 minute.

### b) Traitement à la pepsine

On place les lames sur le ThermoBrite (un système permettant d'automatiser les étapes de dénaturation et d'hybridation pour les protocoles de la FISH), à 37°C, on recouvre la zone délimitée par la pepsine diluée (pour éliminer les impuretés) et on laisse incuber entre 10 et 20 mn. Ensuite on immerge les lames dans du PBS 1 X pendant 2 mn, puis on déshydrate la lame dans un gradient d'éthanol 70%, 85% et 100%, 2 mn chacun. On laisse sécher les lames avant de procéder à l'étape d'Hybridation.

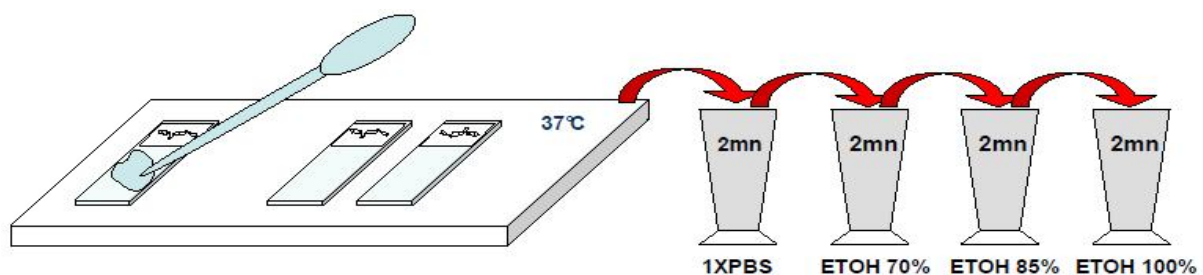


Figure 24: Traitement à la pepsine et lavages

c) Hybridation des échantillons

On prépare d'abord la sonde qui sera utilisée dans cette étape: on met dans un tube de 0.2 ml, dans l'ordre suivant, 7 $\mu$ l de tampon d'hybridation, 2  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O et 1  $\mu$ l de sonde. On vortexe et on centrifuge pour faire descendre les gouttes de la paroi. Puis on dépose les 10  $\mu$ l de la sonde préparée sur une lamelle.

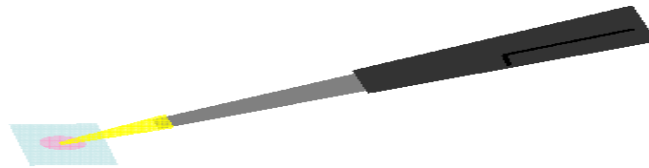


Figure 25: Dépôt de la sonde

On reprend, ensuite, la lame échantillon et on la retourne sur la lamelle exactement au niveau de la zone délimitée. On retourne immédiatement la lame et on scelle la lamelle à l'aide de Rubber Cement à fin de créer une sorte de "chambre" où va se dérouler la réaction d'hybridation.



Figure 26: Création de la chambre d'hybridation

On place la lame dans le ThermoBrite et on laisse incuber à 37°C pendant 5 mn avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation:

Température de dénaturation : 73°C / temps de dénaturation: 1 mn

Température d'hybridation : 37°C / temps d'hybridation : 20 h

d) Lavage Post-Hybridation

A partir de cette étape on travaille en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames.

A la fin de l'hybridation, on récupère les lames du ThermoBrite, on retire le Rubber Cement et on place la lame (avec la lamelle dessus) dans la solution de lavage 2 X SSC / 0,1% NP40 à t° ambiante pendant quelques secondes pour faciliter le décollement de la lamelle. On retire ensuite délicatement la lamelle et on transfère la lame dans la solution 0,4 X SSC / 0,3% NP40 à 73°C pendant 2 mn. On effectue un rinçage à température ambiante 30 s à 1mn, puis, on laisse sécher la lame à l'obscurité.

e) Contre-Coloration des noyaux au DAPI

On dépose 10 µl de DAPI sur une lamelle, puis on retourne la lame échantillon sur la lamelle (de la même façon que pour la sonde d'hybridation).

On place les lam