

UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT
FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE –RABAT

ANNEE : 2015

THÈSE N°:03

**TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE
CONVENTIONNELLES ET MODERNES
REVUE DE LA LITTERATURE
THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement le:.....2015

PAR
Mlle. SOUKAINA NAAMA
Née le 24 Décembre 1985 à Zagoura

Pour l'Obtention du Doctorat en Médecine

MOTS CLES : Cytogénétique humaine , Caryotype métaphasique, Hybridation in situ fluorescente, Hybridation génomique comparative.

MEMBRES DE JURY

Mr. M. ZOUHDI

Professeur de Microbiologie

Mr O.CHOUKAIRI

Professeur d'Histologie-Embryologie Cytogénétique

Mme. M. BARKIYOU

Professeur d'Histologie-Embryologie Cytogénétique

Mme. A. MDAGHRI ALAOU

Professeur de Pédiatrie

PRÉSIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إننا أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية 31

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ



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

DOYENS HONORAIRES :

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



ADMINISTRATION :

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

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

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique

Novembre 1983

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI Rhumatologie

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima Cardiologie
Pr. BENSALD Younes Pathologie Chirurgicale

Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAOUI Mohamed
Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENABDELLAH Chahrazad
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib

Neurologie

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

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

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie



Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. OUAZZANI Taibi Med Charaf Eddine
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Microbiologie

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

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



Mars 1995

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

Décembre 1996

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

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie
Urologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale



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

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

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Janvier 2000

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

Novembre 2000

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

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

Gastro-Entérologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

ORL



Décembre 2001

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

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique



Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL BARNOUSSI Leila
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. EL MANSARI Omar*
 Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HADDOUR Leila
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. ISMAEL Farid
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISI Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHABOUZE Samira

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

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



Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENHALIMA Hanane
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vascul
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie



Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie (mise en disposition)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

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

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leïla
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AMMAR Haddou*
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*

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

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale



Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL BEKKALI Youssef*
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GANA Rachid
 Pr. GHARIB Nouredine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 Pr. MOUTAJ Redouane *
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIQUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*

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

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire



Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. AZENDOUR Hicham*
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KADI Said *
 Pr. KARBOUBI Lamyia
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. ZOUHAIR Said*

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir

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

Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice



Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. LEZREK Mounir
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Mai 2012

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

Février 2013

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

Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Ophtalmologie
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Anatomie pathologique

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

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-ENT2ROLOGIE
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique
Immunologie
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Chimie Thérapeutique



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

Avril 2013

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

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

 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne



***Enseignants Militaires**

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Biochimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique



Mise à jour le 13/02/2014 par le
Service des Ressources Humaines

Dédicaces



A mon très cher père

Aucune expression ne saurait traduire les sentiments que j'ai pour toi.

Ta force ; ton courage ; ton sens du devoir et du sacrifice sont autant de qualités humaines et professionnelles qui font de toi un père dont je suis fière toute ma vie.

Je te remercie pour toute les valeurs morales que tu m'as inculquées et pour l'éducation que tu m'as donnée.

A ma très chère mère

La aucune dédicace ; ni aucune travail ; ne saurait exprimer reconnaissance ; le respect et l'amour que je te porte.

Ta bonté ; ta générosité ta patience sont sans limite. Tu as su être pour moi la mère ; la sœur et l'amie.

Sans tes prière ; tes précieux conseils ; ton dévouement sans bornes ; je n'en serais pas là aujourd'hui.

Que dieu tout puissant te protège et te prête une longue vie.



A mes très chères sœurs Nzaha et Amal

Aucune dédicace ne saurait exprimer la profondeur de mon amour et mon attachement.

Vous étiez toujours aimables ; sages et généreuses avec moi.

En témoignage de ma gratitude ; je vous exprime mes sentiments les plus profonds.

A mes très chers frère Aziz et Hagi

Je voudrais à travers ce travail ; vous exprimer l'amour que je vous porte.

Je vous souhaite un très bel avenir ; aussi grand que votre gentillesse ; aussi beau que votre pureté d'âme.

A mes très chères nièces Hala et Houda

Vous êtes la lumière de mes jours ; et une source de joie permanente dans ma vie.

Je vous souhaite un très bel avenir plein de joie et de réussite.



A mon beau-frère Lahssan

En témoin de l'amour de l'estime que je te porte.

Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Tu as toujours été pour moi l'ami dont j'avais besoin.

Je prie dieu de te prêter santé et longue vie.

A mes oncles et tantes ;

A mes cousins et cousines

Que ce travail soit le témoin de mon amour et mon estime pour vous.

Puisse dieu vous préserver santé et bonheur.



*A la mémoire de mes grands parents paternels et
maternels*

Que dieu ait votre âme en sa sainte miséricorde.

*A mes très chères amies Zainab Dukaha et
Hajar Toto*

Vous êtes mes amies les plus proches et les plus fidèles.

Zainab je te souhaite tout le bonheur dans ta vie conjugale et professionnelle.

*Hajar je te souhaite de réaliser tout tes rêves car vous êtes l'être le plus gentil au
monde.*

*A tous mes amis(es) proche : Sofia Nader ;
zainab Emrini ; Morad Nassiri ; abdellah
Ait abou ; Mohamed firwana ;...*

Chères frères ; je remercie Allah de nous avoir unies dans une si belle amitié.

Je vous souhaite tous un avenir plein de succès et de bonheur.



Remerciements



A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur Mimoun Zouhdi

Professeur de microbiologie



Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce travail.

Nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre compétence ; votre sérieux et votre richesse d'enseignement.

Veillez trouver ; cher maître ; dans ce modeste travail ; l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.

A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE

Monsieur Omar Chokairi

Professeur d'histologie embryologie Cytogénétique



Vous m'avez fait le grand honneur d'accepter de me diriger dans ce travail avec bienveillance et rigueur. Votre attachement au travail bien fait est l'objet de ma considération.

Votre amabilité ; Votre dynamisme ; votre dévouement pour le travail et votre compétence ont suscité mon admiration.

Je garde un excellent souvenir de la qualité de l'enseignement que vous nous avez prodigué.

J'espère être digne de la confiance que vous avez placée en moi en me guidant dans l'élaboration et la mise au point de ce travail.

Veillez trouver dans ce travail ; très cher maître ; le témoignage de ma profonde gratitude et l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE

Madame Malika Barkiyou

Professeur d'histologie embryologie cytogénétique



Que vous accepter de juger mon travail ne peut que le rendre plus intéressant

Votre présence parmi les membres de ce jury constitue pour moi un grand honneur.

Veillez trouver dans ce travail; l'expression de ma reconnaissance et mes vifs remerciements.

A NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE

Madame Asmaa Mdaghri Alaoui

Professeur de pédiatrie



Je vous adresse toute ma gratitude pour votre disponibilité et votre sympathie.

Je suis particulièrement honoré par votre présence dans ce jury de thèse.

Veillez trouver dans ce travail ; l'expression de ma reconnaissance et mes vifs remerciements.



SOMMAIRE



INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	4
BASES FONDAMENTALES	9
A .structure de la chromatine	10
B .structure du chromosome.....	17
CYTOGENETIQUE CLASSIQUE	25
A .Introduction	26
B .Le caryotype humain normal.....	27
1. Principe et technique d’obtention du caryotype métaphasique.....	27
2.Classification des chromosomes métaphasiques :le caryotype.....	31
3.Indications du caryotype :	35
a .période néonatale.....	35
b. chez le nné et l’enfant.....	36
c. chez l’adulte.....	36
4.Le caryotype de haute résolution	36
C. Les anomalies chromosomiques.....	37
1.Introduction	37
2.Incidence	39
3.Anomalies du nombre	39
4.Anomalies de structure.....	44
5.L’instabilité chromosomique	62
CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE	65
A. Introduction	66
B. Hybridation in situ en fluorescence (FISH)	67
1.Principe.....	67
2.Substrats de la FISH.....	69

3.Sondes utilisées	70
4.Dénaturation-Hybridation	80
5.Visualisation et analyse des hybrides.....	81
6.Nomenclature	83
7.Paramètres influençant la FISH	83
8.Indication de la FISH	85
9.Limites de la FISH	87
10.Dérivées de la FISH	88
C. La FISH : Applications cliniques	90
1.La FISH sur métaphase :Un complément du caryotype	81
a. diagnostic cytogénétique des microremaniements chromosomiques	91
b. diagnostic des anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes	92
c. caractérisations d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype	92
d. détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées.....	93
2.La FISH interphasique :	93
a. le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques	94
b. le diagnostic préimplantatoire des anomalies chromosomiques	95
c.la détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes	96
d. le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires ..	97
3. Cytogénétique moléculaire et syndrome microdélétionnels.....	98
a. définition.....	98
b. les microdélétions interstitielles	99

c. les microdélétions subtélomériques	117
d. prise en charge.....	121
e. conseil génétique	122
D. Hybridation génomique comparative (CGH).....	122
1.Principe technique	123
2 .Applications cliniques.....	125
3.Limites de CGH	126
4.Dérivées de CGH	127
a.la CGH array.....	127
b.les puces à SNPs.....	130
5. La CGH array : Applications	132
a.la CGH array : technique de recherche clinique en pathologie acquise.....	132
b.la CGH array : technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles.....	132
α classification des CNVs	133
β. nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents.....	136
Ω. utilisation des bases des données de variants de structure du génomome	137
c.CGH array et recherche clinique en pathologie constitutionnelle	137
F. MLPA (multiplex-ligation-dependent-probe-amplification).....	138
CONCLUSION.....	140
RESUME	142
BIBLIOGRAPHIE	146



INTRODUCTION



La *cytogénétique* humaine (ou génétique chromosomique) est une discipline récente dont l'essor date de 1956 avec la détermination du nombre exact de chromosomes chez l'homme. Ce dénombrement a été rendu possible par l'introduction d'un choc hypotonique parmi les différentes étapes techniques de préparation, qui a permis d'obtenir un étalement correct des chromosomes.

En 1970, l'introduction des techniques de marquage en bandes des chromosomes a grandement amélioré la résolution et la sensibilité de l'analyse cytogénétique.

Enfin, l'apparition de l'*hybridation in situ* fluorescente en 1986 et son développement rapide offre aujourd'hui toute une panoplie d'outils permettant une étude de plus en plus fine et précise des chromosomes et de leur structure.

Alors que les techniques classiques de caryotypage offrent une vue d'ensemble du *génome* mais avec une faible résolution (une sous-bande chromosomique correspond au mieux à environ à 2 Mb sur un *caryotype* en haute résolution), l'hybridation in situ apporte une résolution de l'ordre de quelques *Kb* (ou même moins si l'hybridation est réalisée sur une fibre d'*ADN* étiré), ce qui comble le fossé analytique entre l'étude cytogénétique et moléculaire.

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).

A Travers ce travail ; nous mettons en valeur l'importance des techniques cytogénétiques dans la pratique médicale en :

→ décrivant les différentes techniques cytogénétiques classiques et modernes

→ rappelant l'évolution historique de la cytogénétique

→ décrivant les principales applications cliniques de ces techniques

→ insistant sur le rôle de la cytogénétique moléculaire dans le diagnostic des syndromes microdélétionnels ; dans le diagnostic prénatale ; et des hémopathies malignes



HISTORIQUE



La cytogénétique, pratiquement née avec le vingtième siècle, est une discipline jeune. Les progrès les plus récents ont amené la transformation des méthodes et l'élargissement des applications. La connaissance de l'organisation des chromosomes a permis de rendre compte des particularités et des variations de l'ADN constitutif. A l'heure actuelle, l'apport cytogénétique est devenu indispensable à plusieurs pathologies humaines.

Il y a de nombreuses façons d'approcher l'histoire de la cytogénétique humaine. T.C. Hsu définit 4 périodes (Hsu, 1979) :

La première période (1891-1923) ou "âge des Ténèbres de la Cytogénétique Humaine" débute par le travail d'un cytologiste D. von Hanseman qui en 1891, dénombre le premier 18, 24 et plus de 40 chromosomes dans 3 cellules de tissu humain normal. Ces premières, puis d'autres observations donnent lieu à des estimations contradictoires du nombre des chromosomes. En 1910, Branca définit le nombre somatique normal à 48 chromosomes. Tous ces auteurs ont utilisé des techniques d'histologie classique sur des prélèvements post-mortem de testicule humain. En 1912, Winiwarter améliore cette technique en prenant des biopsies de testicules prélevées chirurgicalement ; A la suite de ces améliorations techniques, Winiwarter conclut à la présence de 47 chromosomes dans les spermatogonies ($46A+X$) et de 48 ($46A+X+X$) dans les ovogonies et à un mécanisme du déterminisme du sexe à XX/XO . Le chromosome Y est décrit plus tard par Painter (1921,1922) et conclut en 1923 à l'existence de $46A+X+Y$ pour l'homme et à $46A+X+X$ pour la femme et à un mécanisme du déterminisme du sexe lié à la formule XX ou XY (Painter, 1923).[1]

La deuxième période (1952-1959) de la cytogénétique commence avec la découverte fortuite, en 1952, par Hsu, du prétraitement par le choc hypotonique

des préparations chromosomiques obtenues in vitro à partir de cellules de tissu splénique. A la suite de cette découverte, deux cytologistes Albert Levan et Joe Hin Tjio, en 1956, déterminent le nombre de 46 chromosomes dans les cellules somatiques humaines. Cette découverte est à la base de l'étude systématique du caryotype humain. parallèlement aux découvertes touchant la cytogénétique, les recherches concernant l'ADN ont avancé rapidement, et en 1953, Francis H. Crick 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][2]

La troisième période (1959-1969) commence par la publication le 26 janvier 1959 par Lejeune, Gauthier et Turpin dans les Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences (Paris) de la présence chez neuf enfants mongoliens d'un petit chromosome acrocentrique surnuméraire. Cette découverte marque la naissance de la "Cytogénétique Clinique". Un effort collectif des cytogénéticiens et des cliniciens pour rechercher dans les anomalies congénitales une éventuelle étiologie chromosomique fait suite à cette découverte. Rapidement, différentes anomalies de nombre et de structure chromosomiques sont décrites : le syndrome de Klinefelter (47,XXY) par Jacobs et Strong (1959), la monosomie du syndrome de Turner (45,X) par Ford et coll., (1959), le syndrome triple-X par Jacobs et coll. (1959), la trisomie 13 par Patau et coll (1960), la trisomie 18 par Edwards et coll (1960), la polyploidie par Böök et Santesson (1960), la délétion du bras court du chromosome 5 de la maladie du cri-de-chat par Lejeune et coll (1963). Carr (1963) établit que des anomalies chromosomiques peuvent être à l'origine d'avortements spontanés. Cet essor de la cytogénétique

humaine révèle la grande fréquence des aberrations chromosomiques chez l'Homme.[2][4]

La quatrième période de la cytogénétique (après 1969) est celle du banding chromosomique. La première technique de banding est due à Caspersson, qui utilise la moutarde de quinacrine pour individualiser chaque chromosome par l'apparition de bandes caractéristiques : les bandes Q (Caspersson, 1969, 1970). D'autres techniques sont rapidement mises au point : banding G (Seabright, 1971), banding R (Dutrillaux et Lejeune, 1971), banding C (Sumner et al., 1971), banding NOR (Howell et al., 1975). La découverte des bandes chromosomiques va améliorer considérablement les potentialités d'analyse et permet la reconnaissance plus aisée de délétions, translocations, inversions, localisations de points de cassures, caractérisation des centromères et de la nature hétérochromatique des certains segments chromosomiques qui n'étaient pas évidentes auparavant.

Puis, il y eu l'émergence des techniques dites de haute résolution améliorant la résolution chromosomique et permettant la mise en évidence de remaniement 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 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. [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.[1][5]

Enfin, il est possible que, dans avenir proche, cette technique soit elle-même supplantée par le séquençage haut débit (début des années 2000).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



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. [6][7]

Chez l'homme, on estime la longueur de l'ADN à 3.109 paires de bases (un mètre par génome haploïde).

Environ deux mètres d'ADN dans chaque cellule doivent être contenus dans un noyau de quelques μm 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.

A-structure de 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'observations 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 1)

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 11 nm (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 30 nm. 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. [8][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]

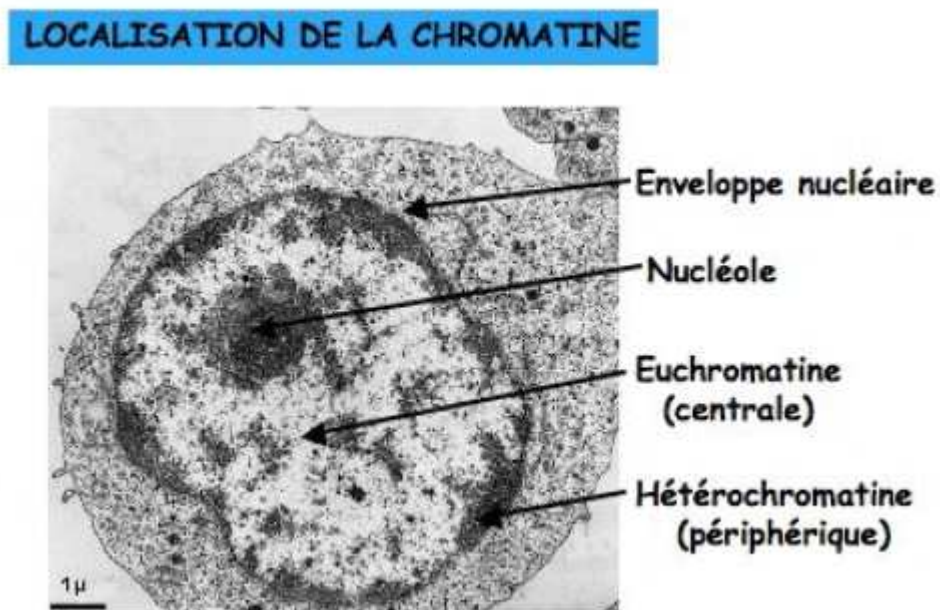


Figure 1

a- Le nucléosome (figure2) :

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 région de liaison (ou région internucléosomale) qui relie les particules coeurs 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]

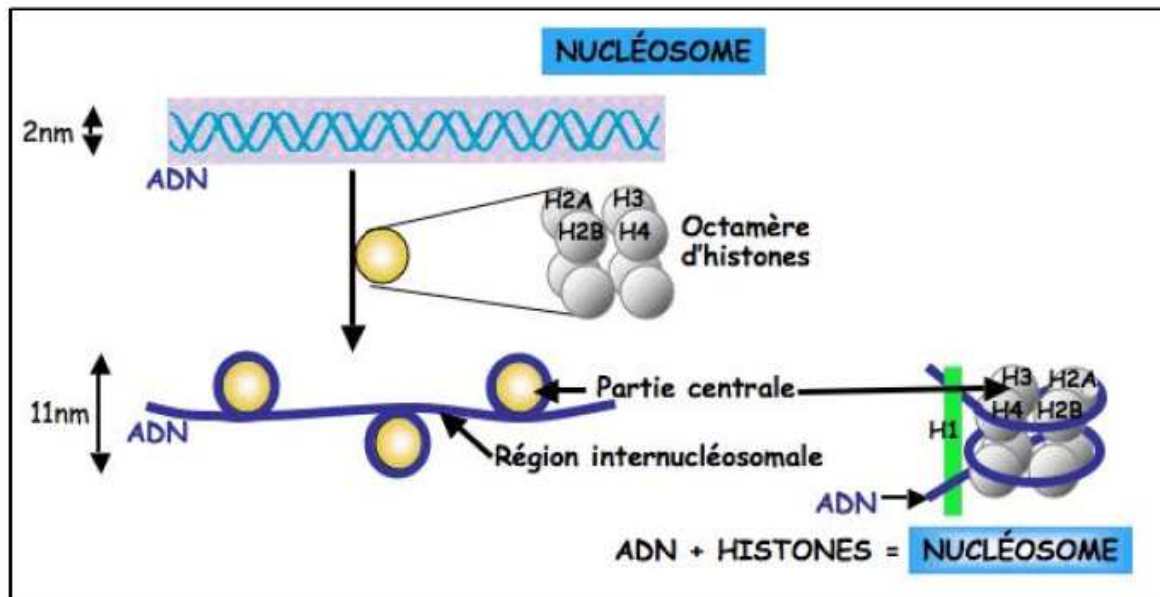


Figure 2 : structure du nucléosome

b- Les histones

* Les histones de la particule cœur

Les histones de la particule cœur, 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 3)

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.

1- **Formation du nucléosome** : mise en place sur l'ADN d'un tétramère d'histones (H3-H4)₂ auquel s'adjoint 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]

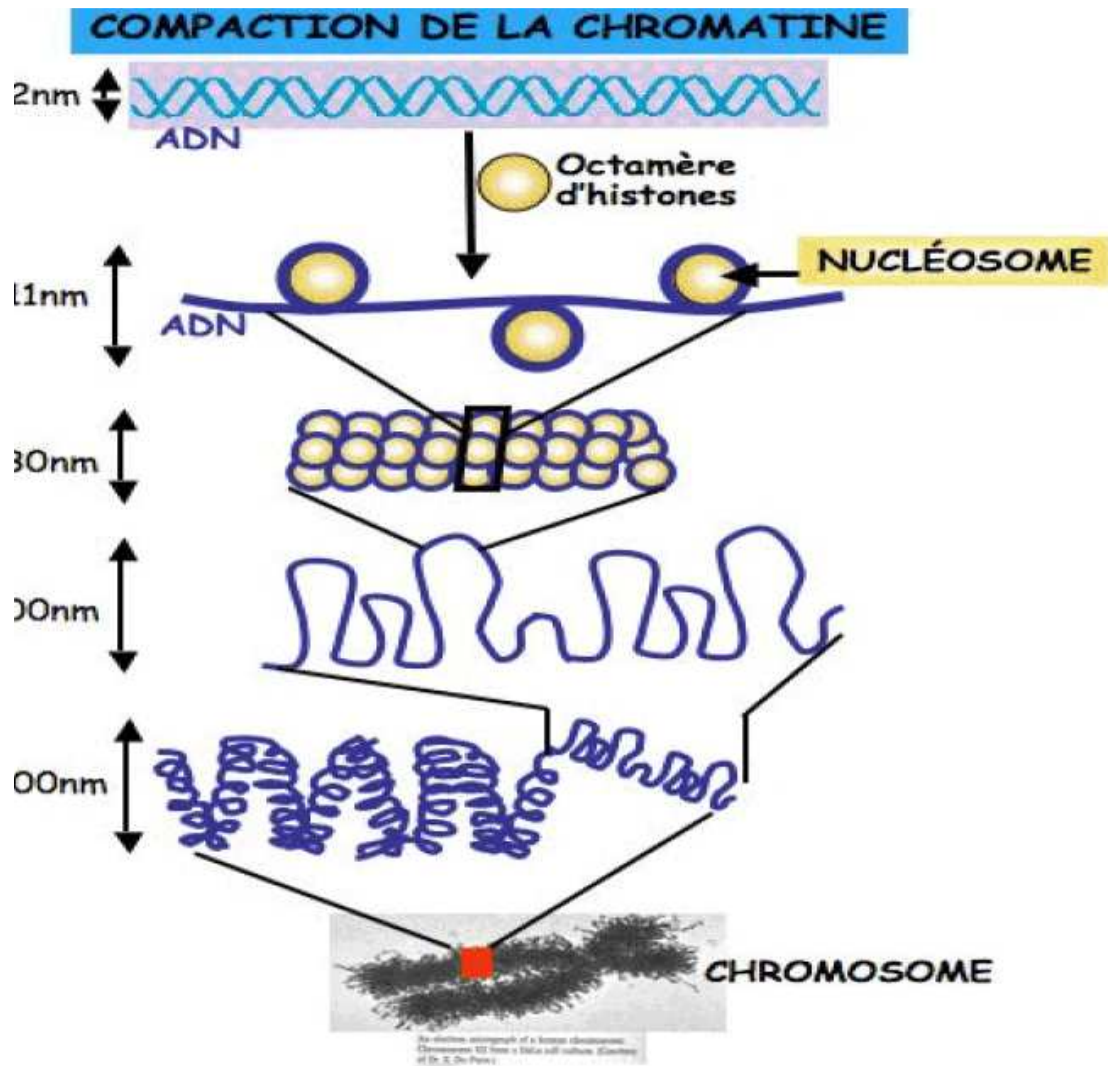


Figure 3 : compaction de la chromatine

B-structure du 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 associés 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. (figure 4)

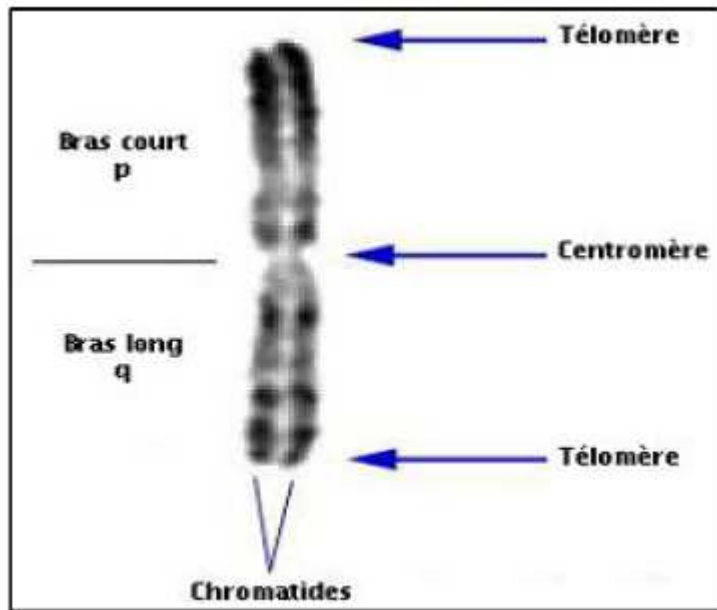


Figure 4 : structure du chromosome métaphasique

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

□ Les chromosomes métacentriques, (figure 5) 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.

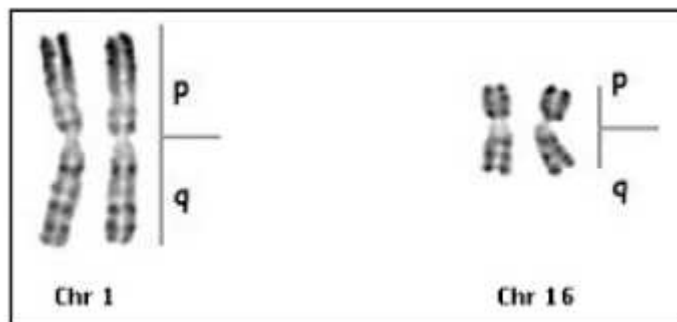


Figure 5

. □ Les chromosomes submétacentriques, (figure 6) 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.

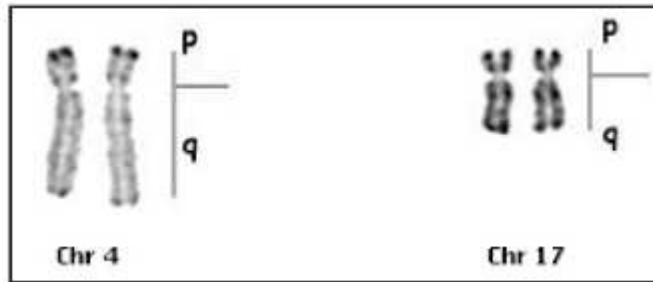


Figure 6

. □ Les chromosomes acrocentriques, (figure 7) 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 7

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 8)

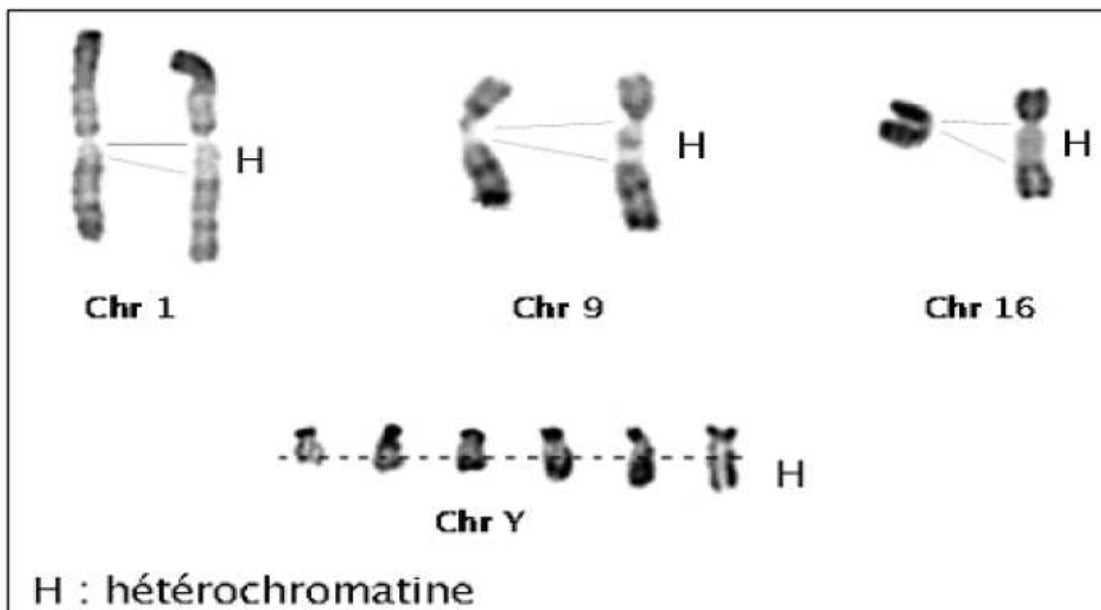


Figure 8 : Constituants de la chromatine

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 implication 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 noeuds 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 9)

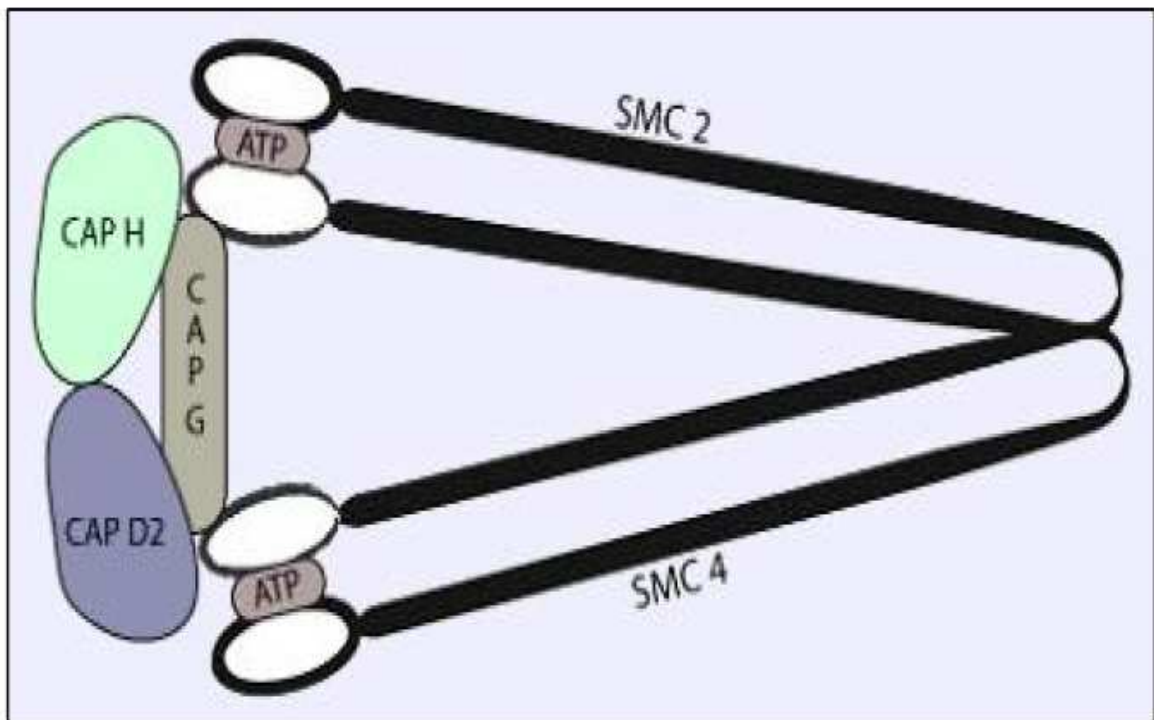


Figure 9

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

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 sanguines).

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 (phytohéماغglutinine) 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 fœtal 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 cellulaire 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 10) [14]

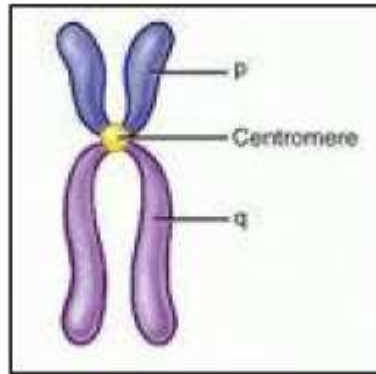


Figure 10 : Chromosome métaphasique

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 11)

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

génomique, la perte du bras court d'un chromosome acrocentrique n'a pas de conséquence clinique. [15]

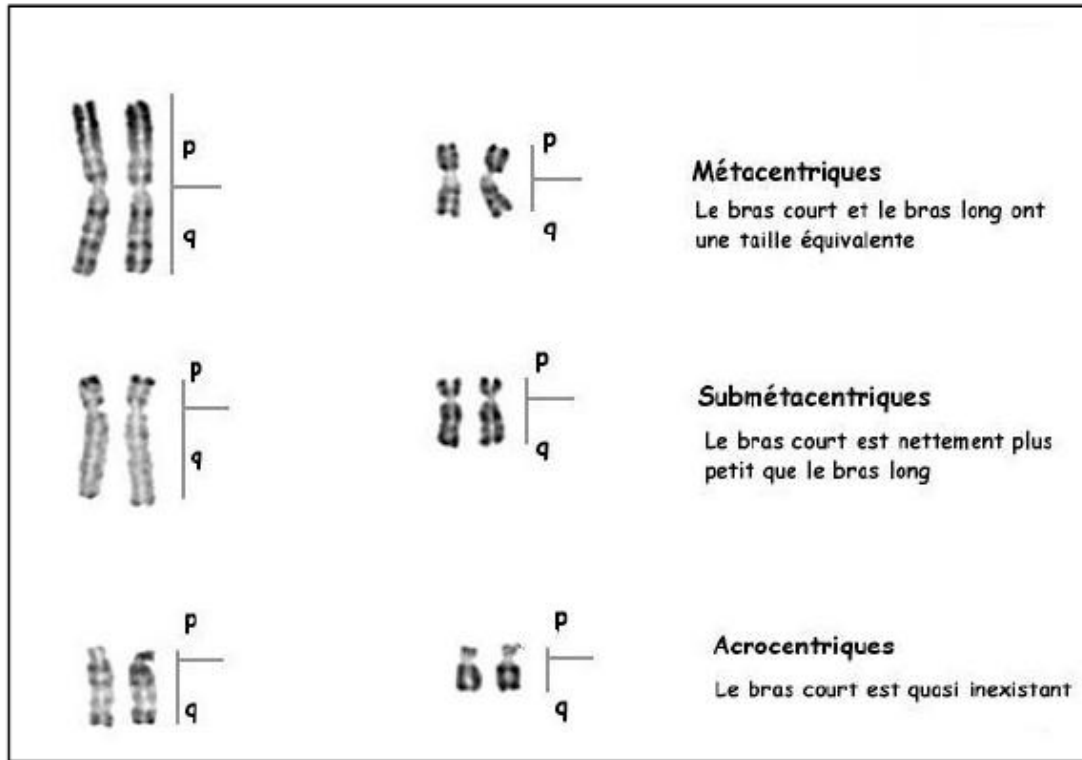


Figure 11 : Morphologie des chromosomes en fonction de l'index centromérique

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]

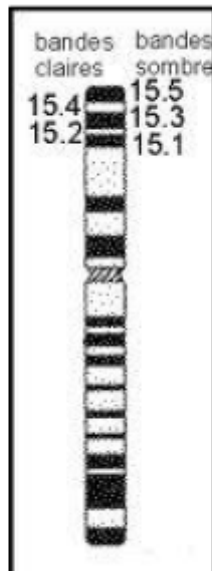


Figure 12 : Banding du chromosome 11

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- 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]

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 13) [15]

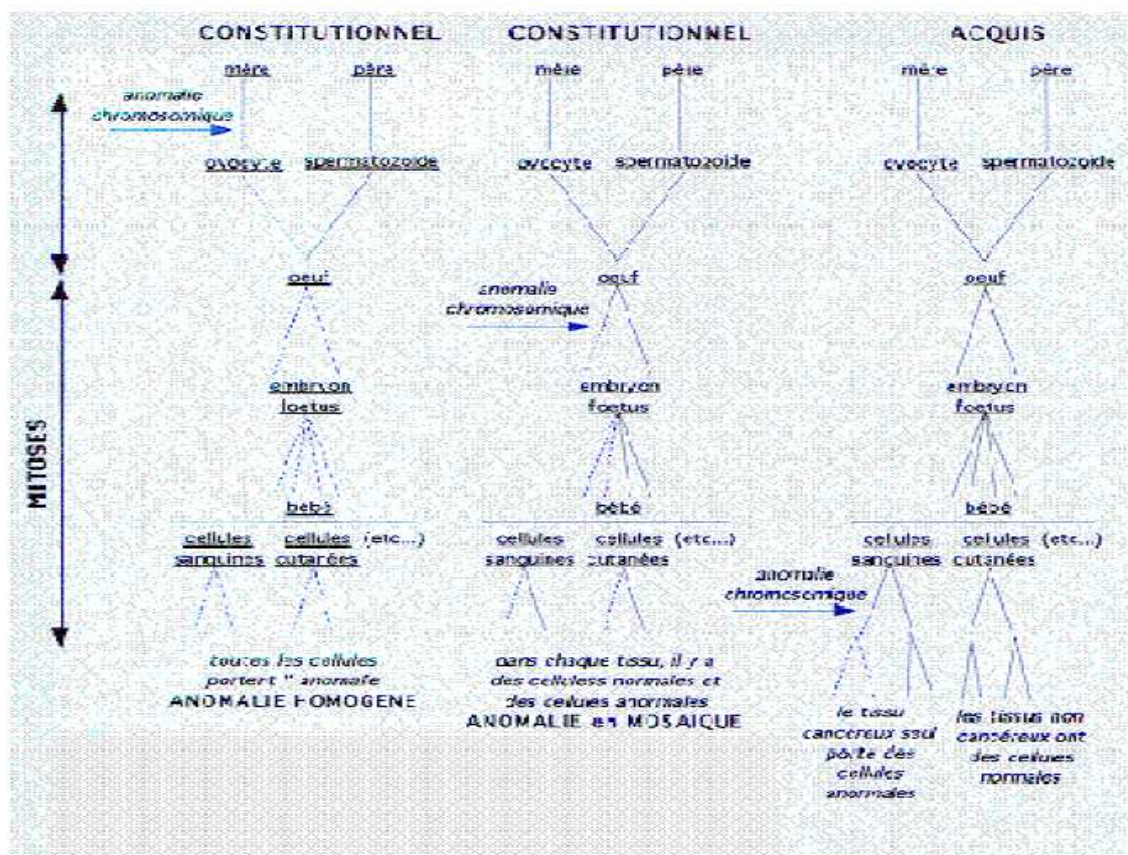


Figure 13 : Anomalies chromosomiques : constitutionnel /acquis ;
homogène/mosaïque

2- Incidence

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

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

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

- 0.6% des naissances vivantes

Dans les hémopathies malignes :

- Leucémie myéloïde chronique : 95%

- Leucémie aigue lymphoïde : 70 à 80%

- 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]

**** Aneuploïdie homogène** : Accident de ségrégation par non disjonction en meiose I ou II, toutes ne sont pas compatibles avec la vie. (figure 14)

- o Une non disjonction en première division produit 4 gamètes déséquilibrés.

o 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]

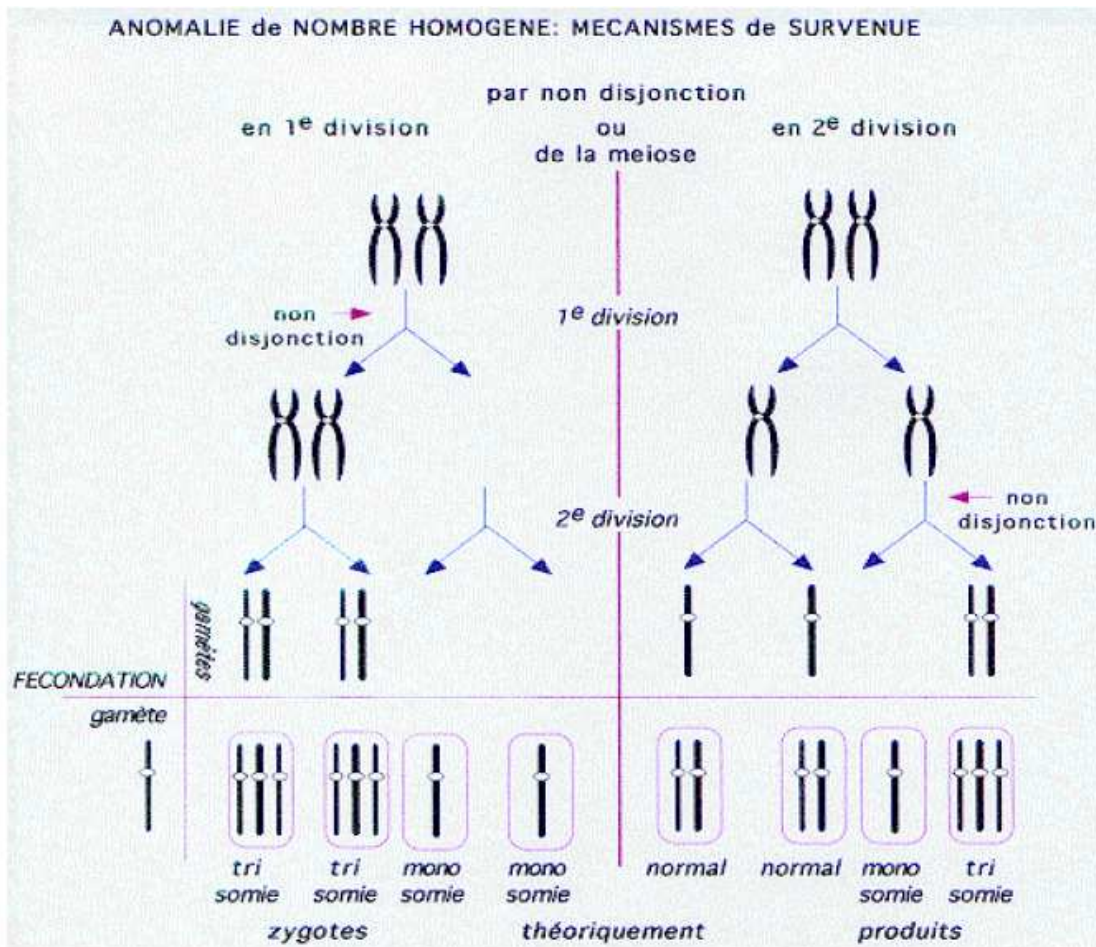


Figure 14 : Anomalie de nombre homogène ; mécanisme de survenue

**** Aneuploidie en mosaïque :** Accident de ségrégation par non disjonction lors des mitoses post zygotique.

Un individu en mosaïque est constitué de deux (ou plus de deux) populations à contenu chromosomique différent, mais provenant du même zygote (une mosaïque est notée par une barre oblique entre les 2 clones décrits; ex: trisomie 21 en mosaïque 46, XY / 47, XY, +21).

L'intensité du phénotype dépend du dosage respectif de ces deux (ou plus) populations cellulaires.

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

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

b- La polypléidie

Une cellule polypléide 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 oeufs 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 15)

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 : diplopermie(C). ($N_{\text{maternel}} + 2N_{\text{paternel}}$).

La diandrie est 4 fois plus fréquente que la digynie.

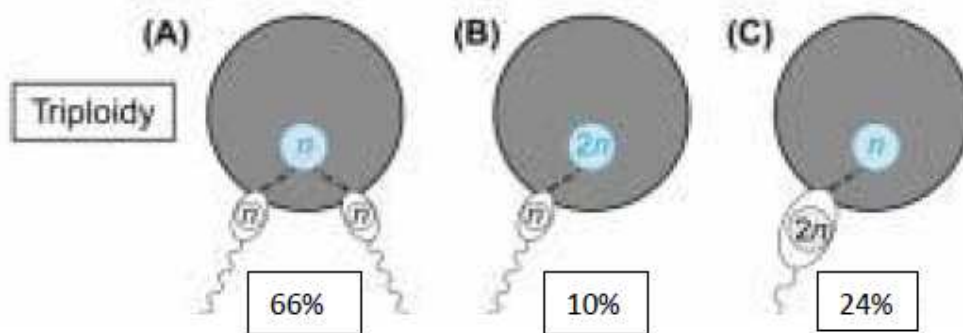


Figure 15 : Mécanisme de triploïdie

- **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 (mos45,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. 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 terminale) ou de deux cassures sur le même bras avec perte du segment intercalaire (délétion interstitielle ou intercalaire). (Figure 16)

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

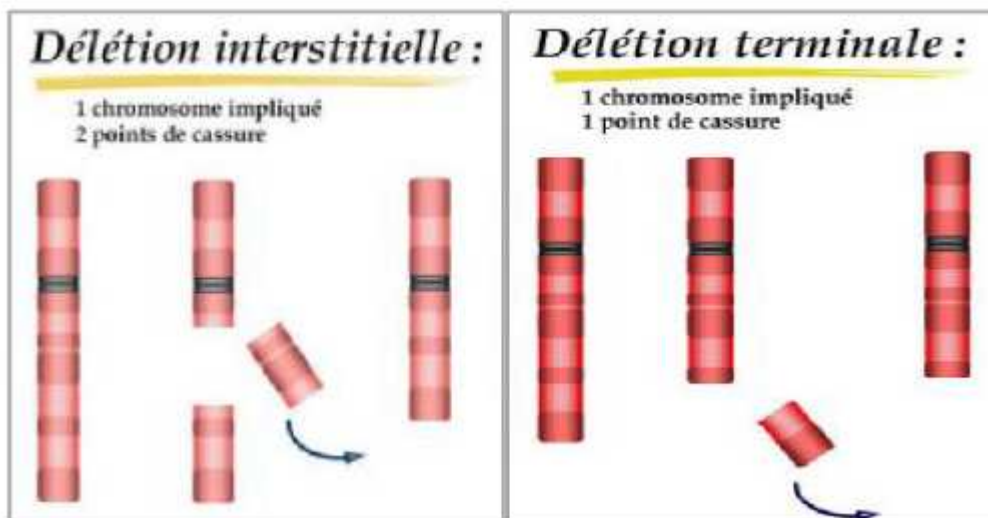


Figure 16 : Types de délétions

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'autre du centromère. (Figure 17)

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

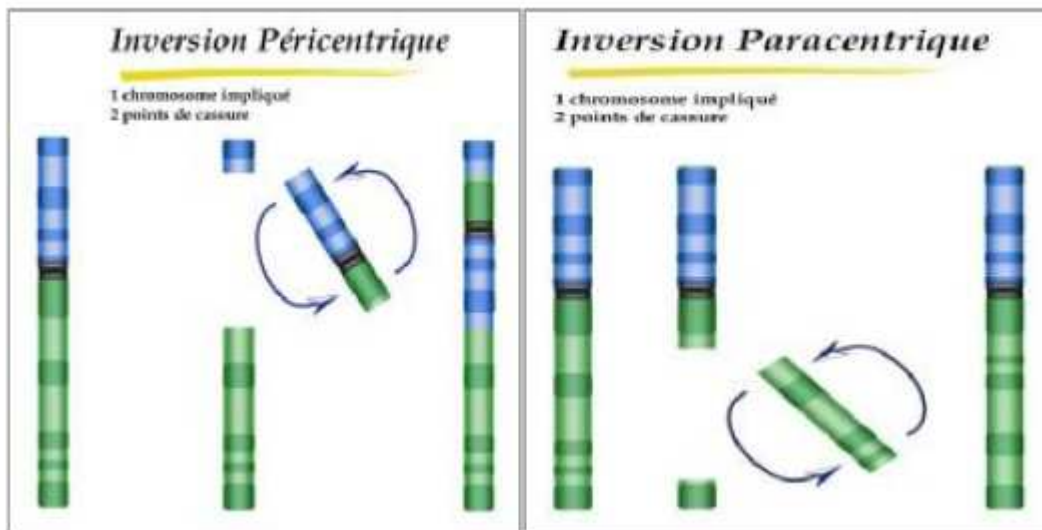


Figure 17 : Types d'inversions

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 » (figure18)

La duplication est une anomalie chromosomique déséquilibrée. [12]

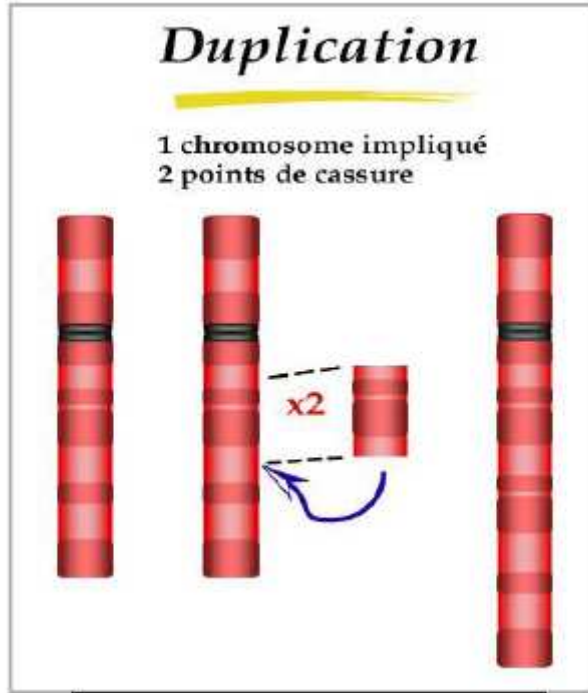
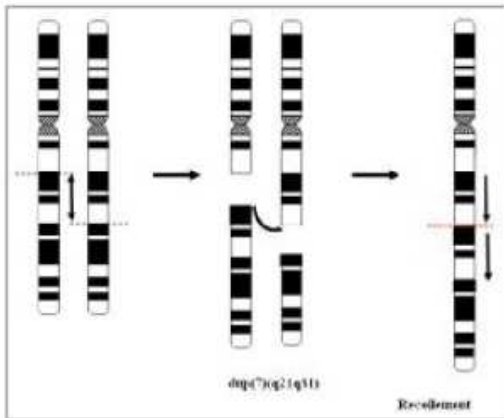
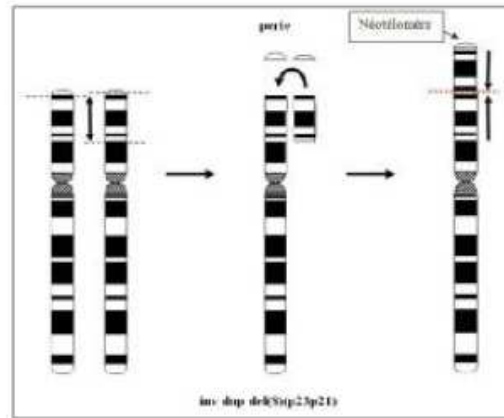


Figure 18 : Mécanisme de la duplication



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 perte 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 19) [12]

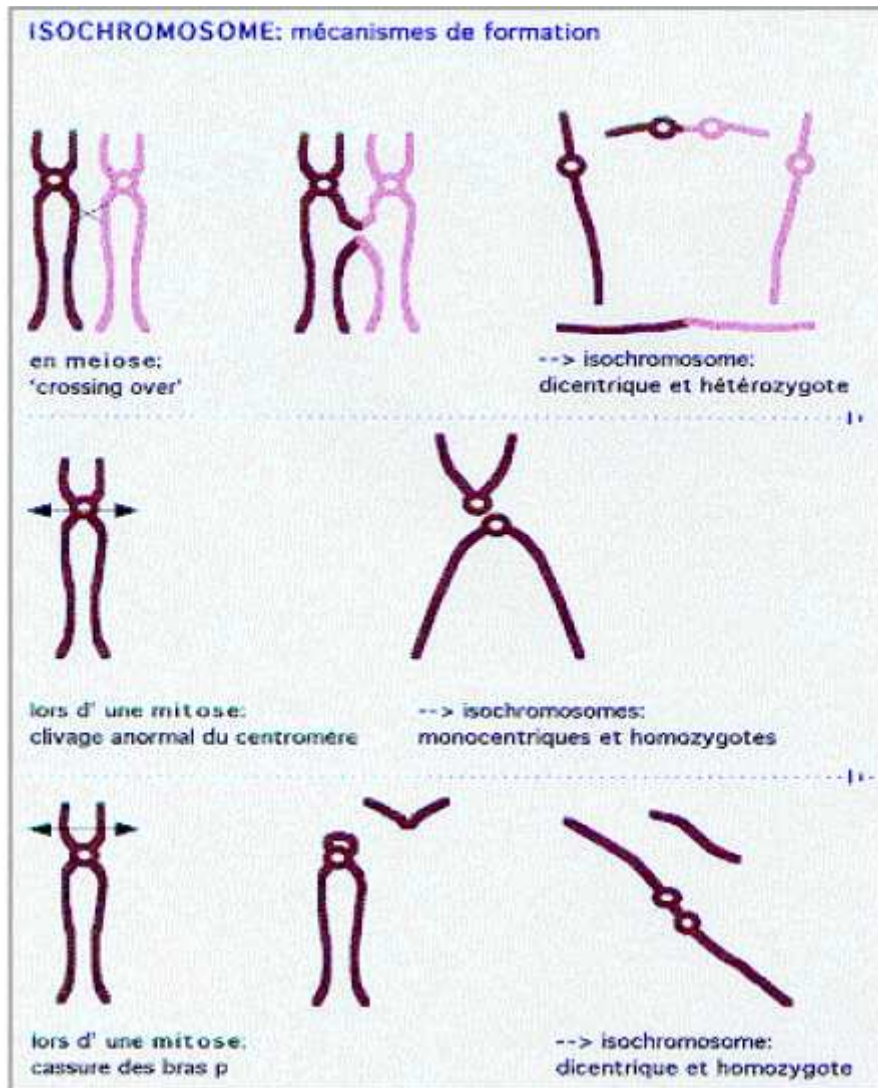


Figure 19 : Isochromosome ; mécanisme de formation

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 20)

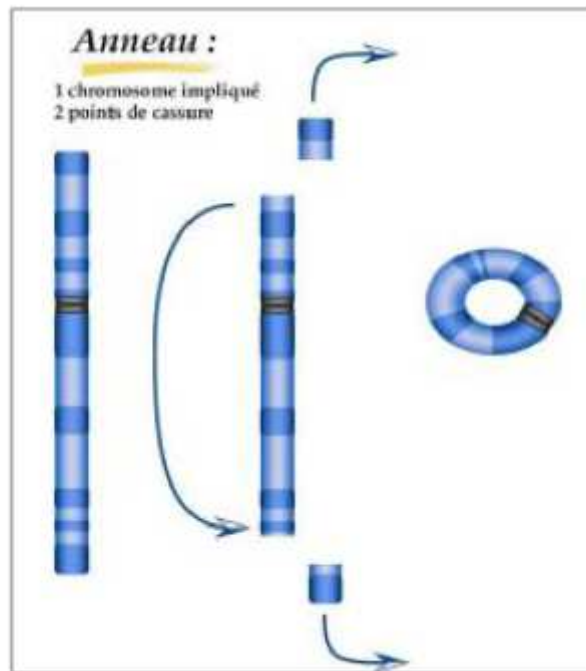


Figure 20 : Mécanisme du chromosome en anneau

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 21)

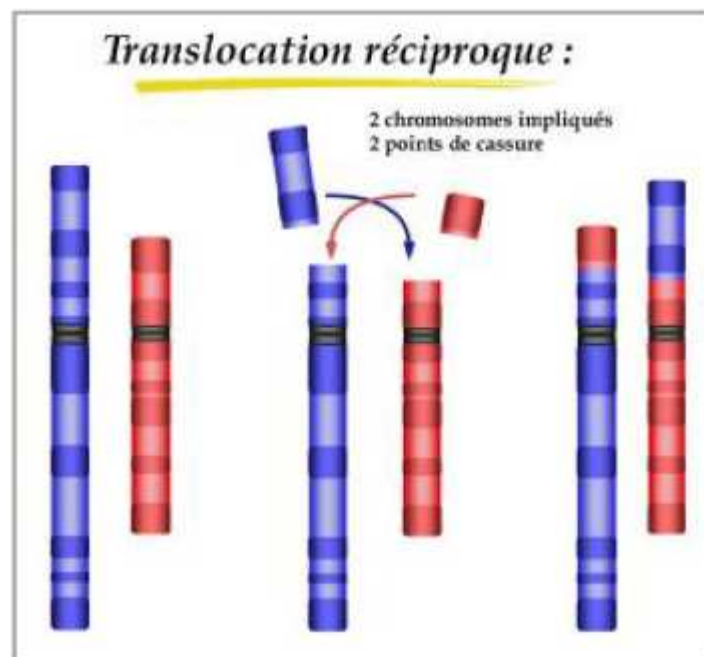


Figure 21 : Mécanisme de la translocation réciproque

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 22)

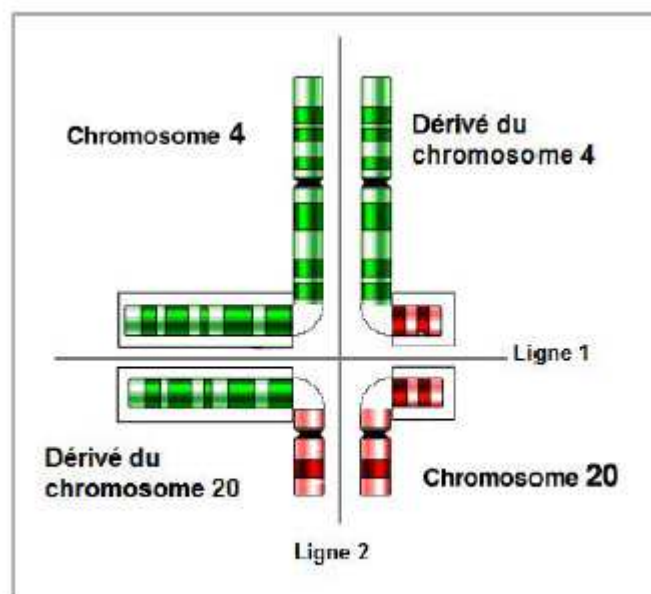


Figure 22 : Exemple d'un tétravalent

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 23)

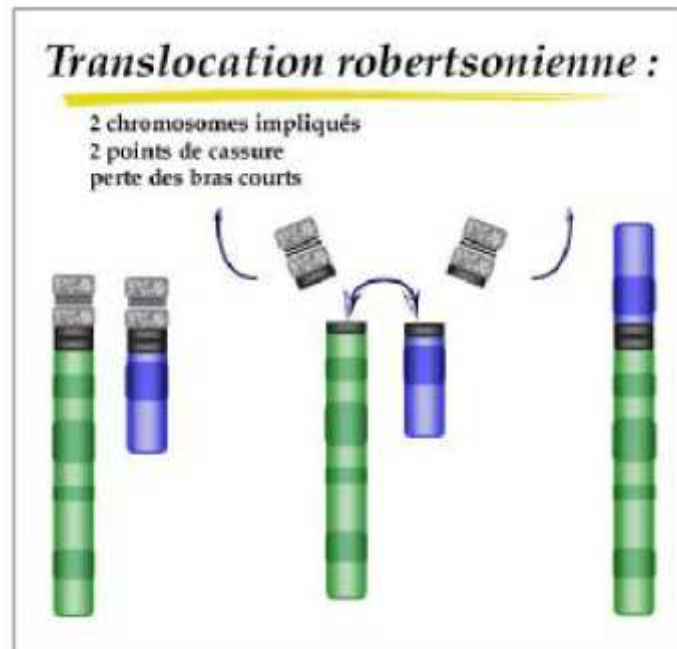


Figure 23 : Translocation robertsonienne

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). [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 24)

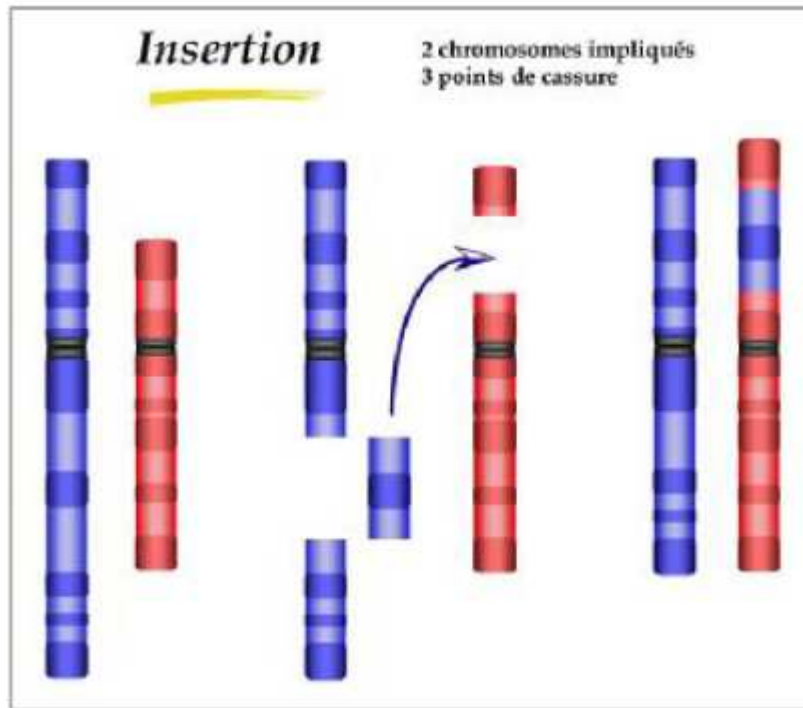


Figure 24 : Mécanisme d'une insertion

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 25)

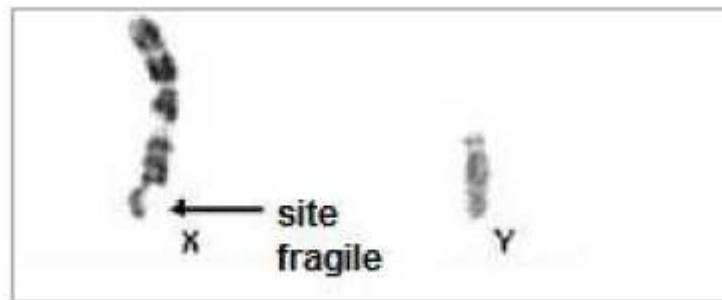


Figure 25 : Exemple d'un site fragile sur le chromosome X

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 26) [12]

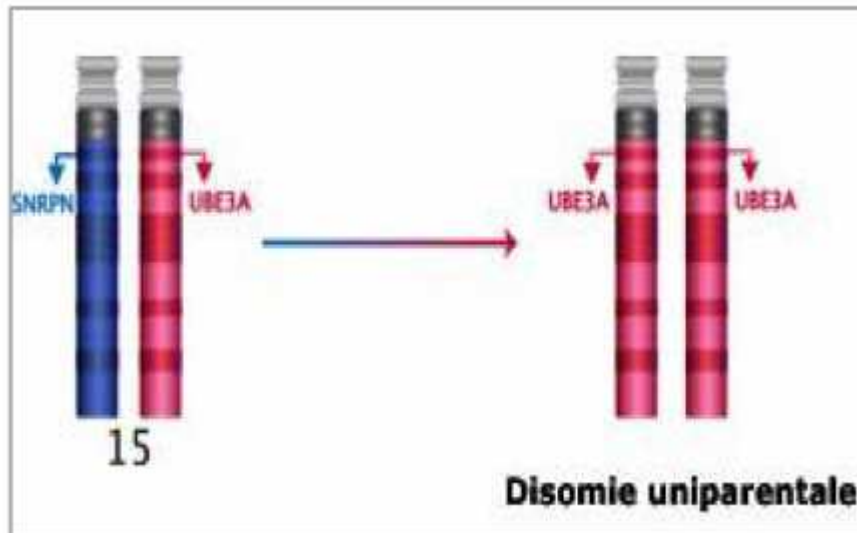


Figure 26 : Exemple d'une disomie uniparentale

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. (Figure27)

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]

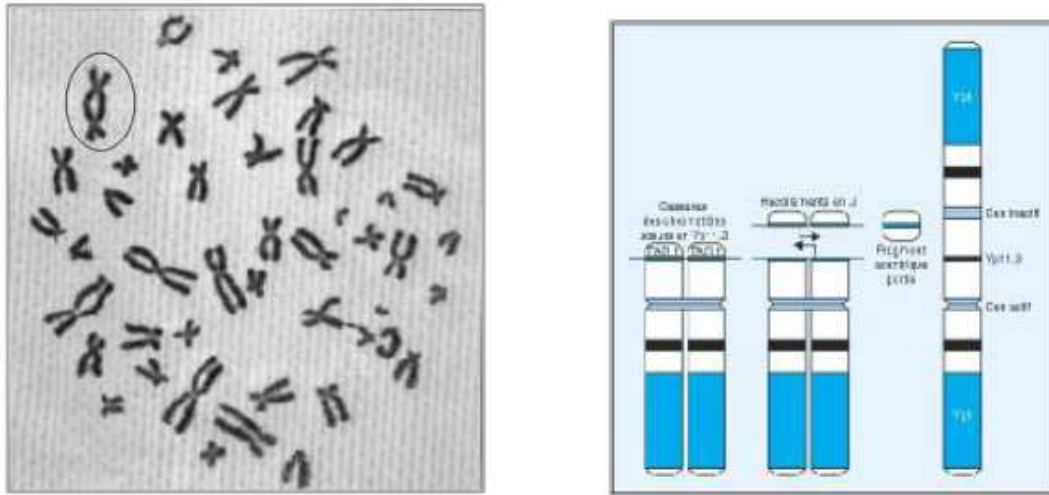


Figure 27 : Chromosome dicentrique sur une mitose

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. (Figure28)

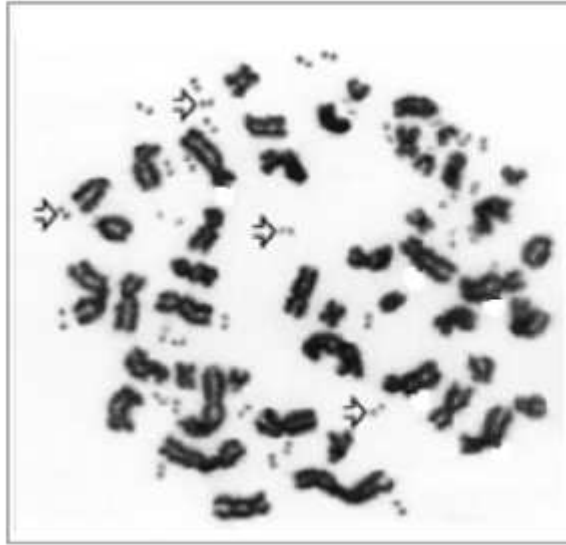


Figure 28 : Plusieurs doubles minute sur mitose

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]

5- Instabilité chromosomique

a- 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 postnatal 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-foetoprotéine 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]



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 29)

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]

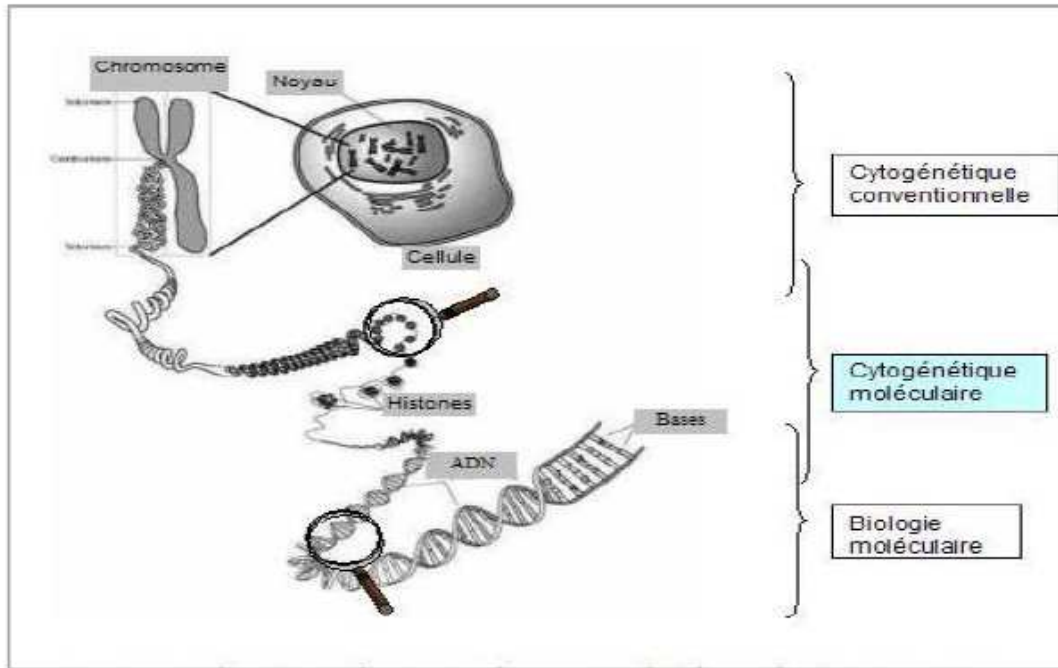


Figure 29 : Représentation schématique du génome humain à différentes échelles

B- HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)

B-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 30) [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]

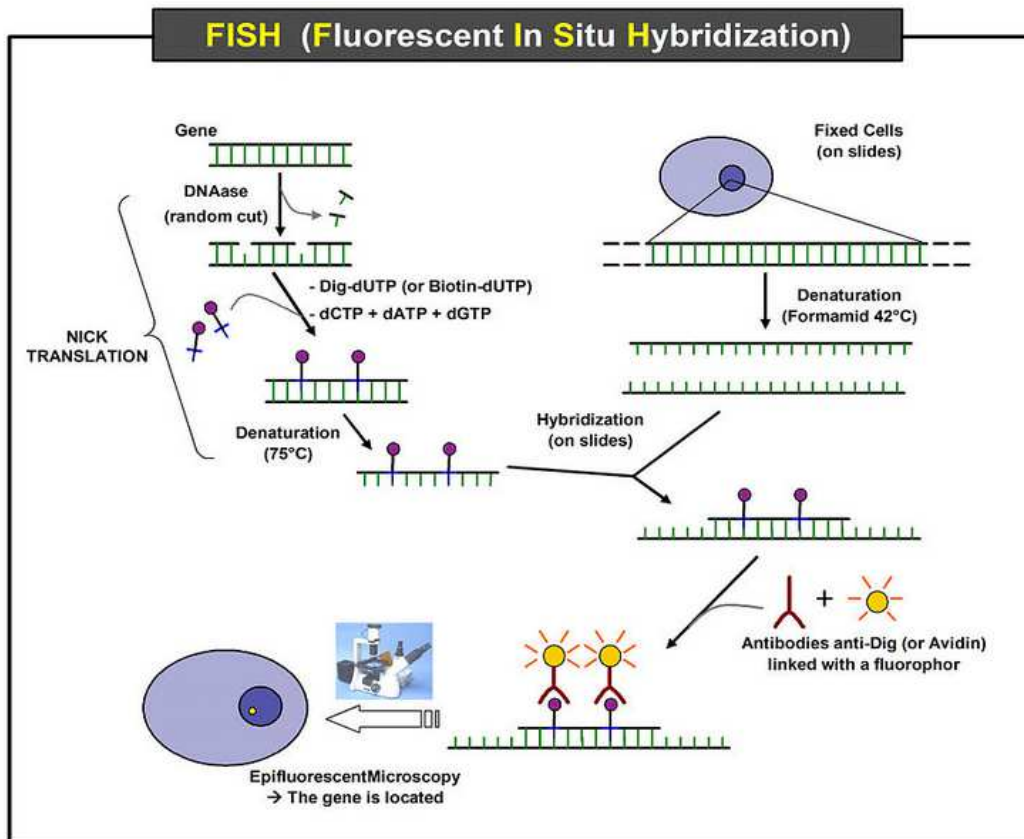


Figure 30 : Principe de FISH

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.

□ Types de sondes

Les différents types de sondes commercialisées sont :

Les sondes centromériques, locus spécifiques, télomériques et subtélomériques et les sondes de peinture chromosomique. (Figure31)

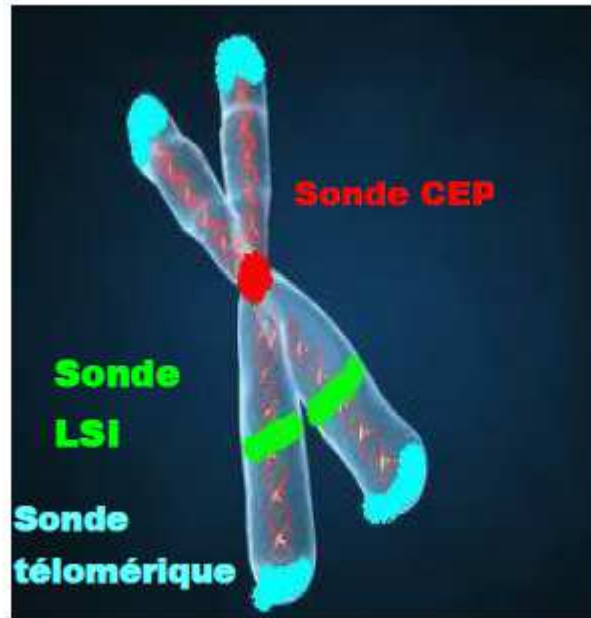


Figure 31 : Emplacement des sondes CEP ; LSI et Télomérique

□ Les sondes CEP (Chromosome Enumeration Probe) (Figure32) ; 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.

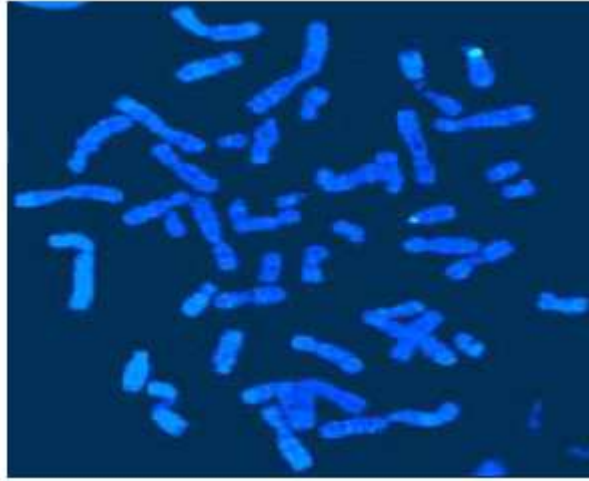


Figure 32 : Sonde centromérique (α -satellite) des chromosome 15 (vysis) sur une métaphase normale ;

→ Marquage direct avec un fluorochrome (FITC) modifié (spectrum green)

→ Contre colorant bleu : DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole)

□ **Les sondes LSI (Locus Specific Identifier)** (Figure 33) ; 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.

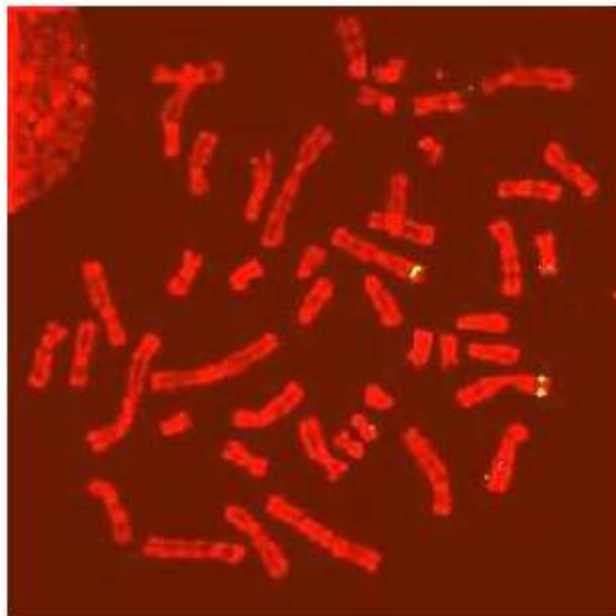


Figure 33 : Sonde locus spécifique de la région 3p25 englobant le gène responsable de la maladie de von Hippel-Lindau. Sonde marquée à la biotine détectée par immunofluorescence indirecte par la FITC ; Contre colorant : IP.

□ **Les sondes télomériques et subtélomériques** (Figure 34)

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 34 : Sonde 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

□ **Les sondes WCP (Whole Chromosome Painting)** (Figure 35), 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]

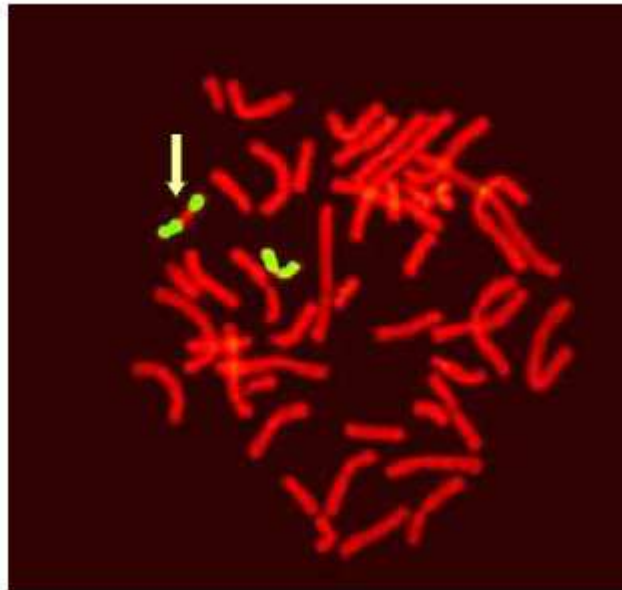


Figure 35 : Peinture chromosomique sur métaphase normale du chromosome 16
(Biosys®) ;

→ Sonde marquée à la biotine détecté par immunofluorescence indirect 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.

□ **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.

. □ 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 (λ_{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 (λ_{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)
- . □ Le FITC (Fluorescein isothiocyanate)
- . □ La Cyanine 3 (Cy3)
- . □ Le Texas red

- . □ La Cyanine 5
- . □ La Cyanine 5.5

b- multifuorescence

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 (figure36). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère. (Figure 37)(Figure 38) [22][23]

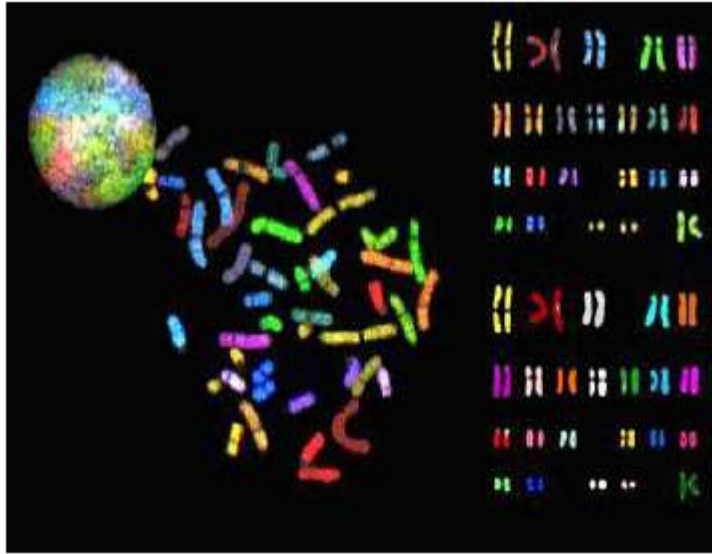


Figure 36 : Hybridation de 24 sondes de peinture chromosomique réalisant un caryotype en fluorescence



Figure 37 : Hybridation de 12 sondes spécifiques des régions subtélomériques de 12 chromosomes

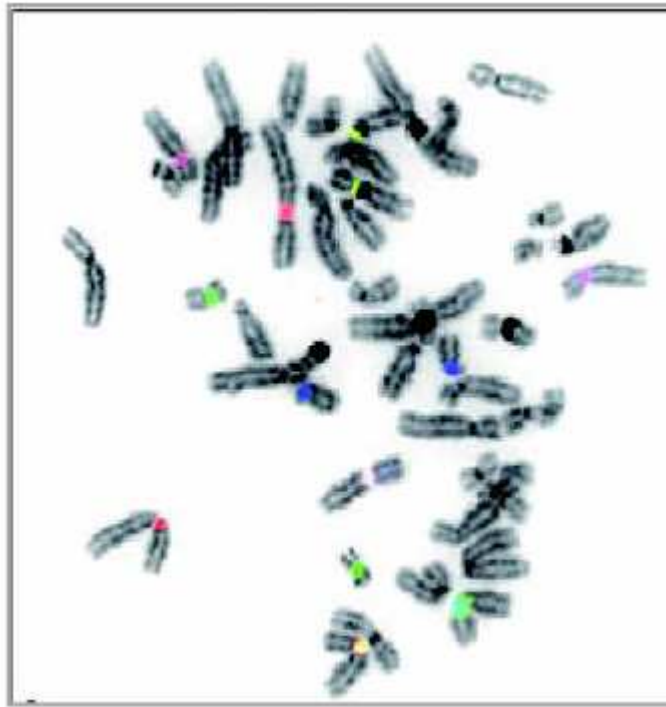


Figure 38 : Hybridation d'un des lots du système M-centromère

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 39)

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.

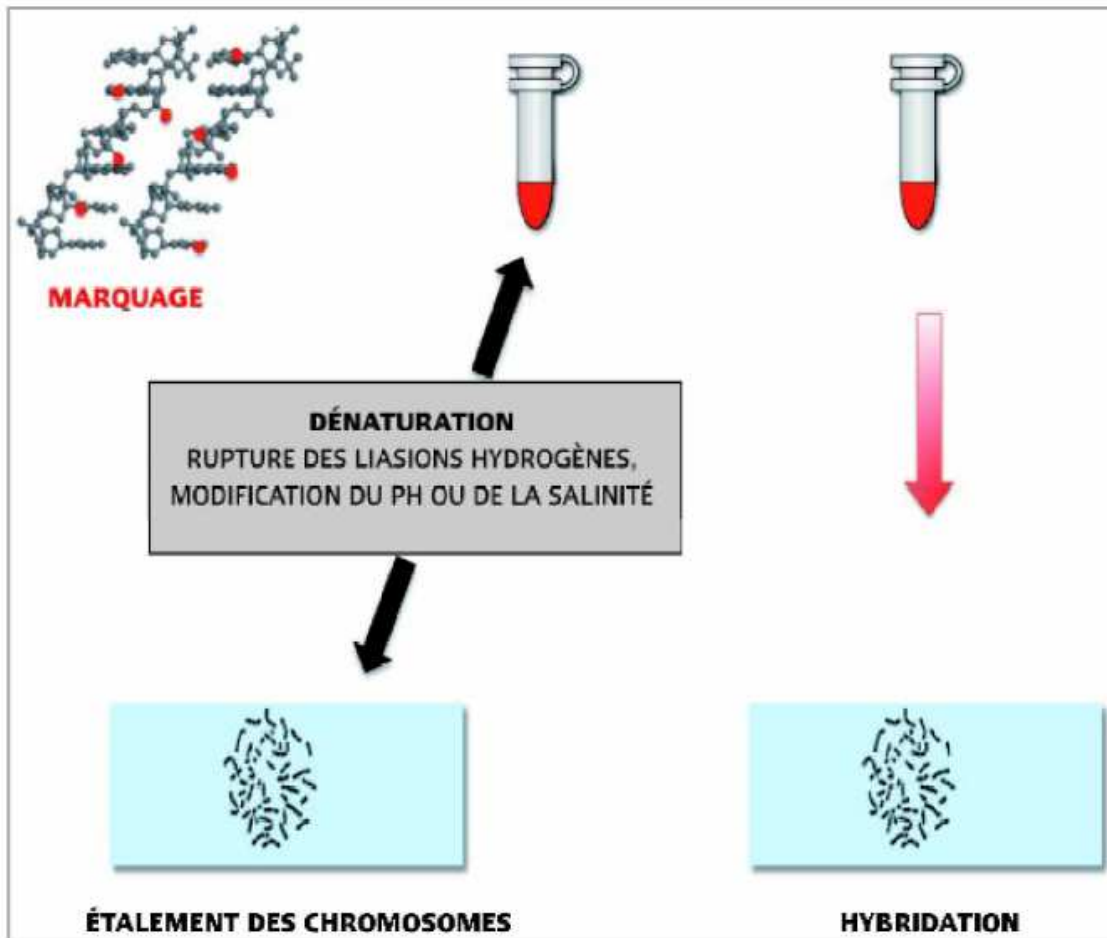


Figure 39 : L'hybridation

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 40)

L'observation de couleurs difficilement perceptibles par l'œil humain (cyanine, rouge sombre) ou la distinction de combinaisons nombreuses couleurs (Multi-FISH) bénéficient 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]

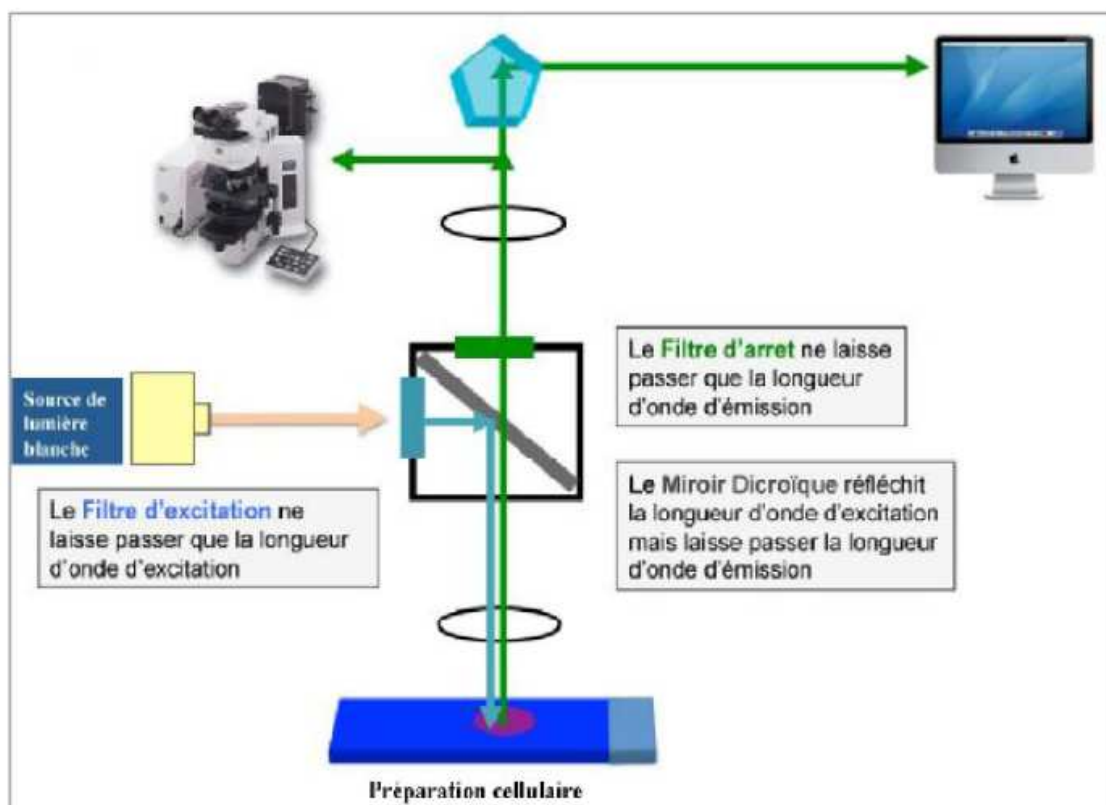


Figure 40 : Principe du microscope à épifluorescence

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 constituée 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 vu 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 « T_m »

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 T_m .

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 30 minutes) 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

□ 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,...)

. □ EN PRENATAL ET PREIMPLANTATOIRE

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

. □ Recherche d'une aneuploïdie : de routine pour les chromosomes 13, 18, 21, X et Y

. □ Recherche des microdélétions

. □ Détermination du sexe (maladies récessives liées à l'X)

. □ EN HEMATOLOGIE

. □ Détection des aneuploïdies 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.

□ 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 Schrok 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 mbanding 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 analphoïdes.

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 péricentromérique 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- LA FISH :APPLICATION CLINIQUE

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]

D1 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 aigües lymphoblastique de la lignée B de l'enfant : la $t(12.21)(p13;q21)$. [27]

D.2 La FISH interphasique

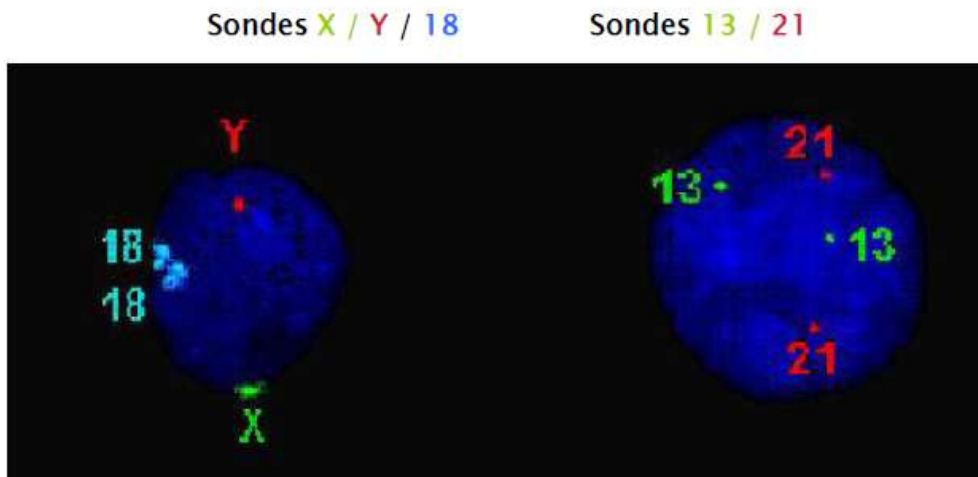
La FISH interphasique est une technique qui s'est rapidement imposée car elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. En effet, les signaux d'hybridation générés par les sondes d'une taille de plus de 150 kb sont visibles sur les noyaux. Un plus grand nombre de cellules (les noyaux sont 10 à 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 41). 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.



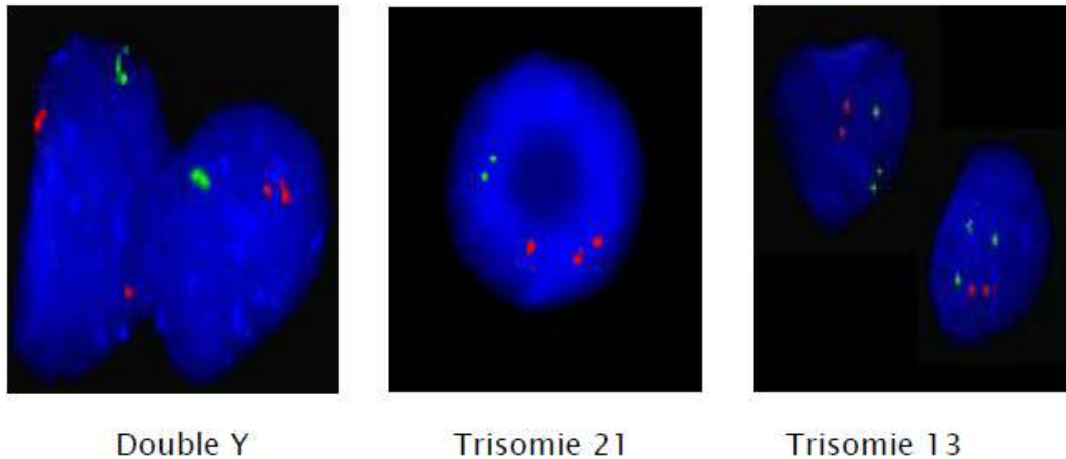


Figure 41 : FISH interphasique

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 foetales in utéro 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.

D.3 Cytogénétique moléculaire et syndromes microdélétionnels

a-définition

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]

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.

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.

b- MICRODELETIONS INTERSTITIELLES

b-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. . [45]

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.

⇒ 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]

□ 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 42)

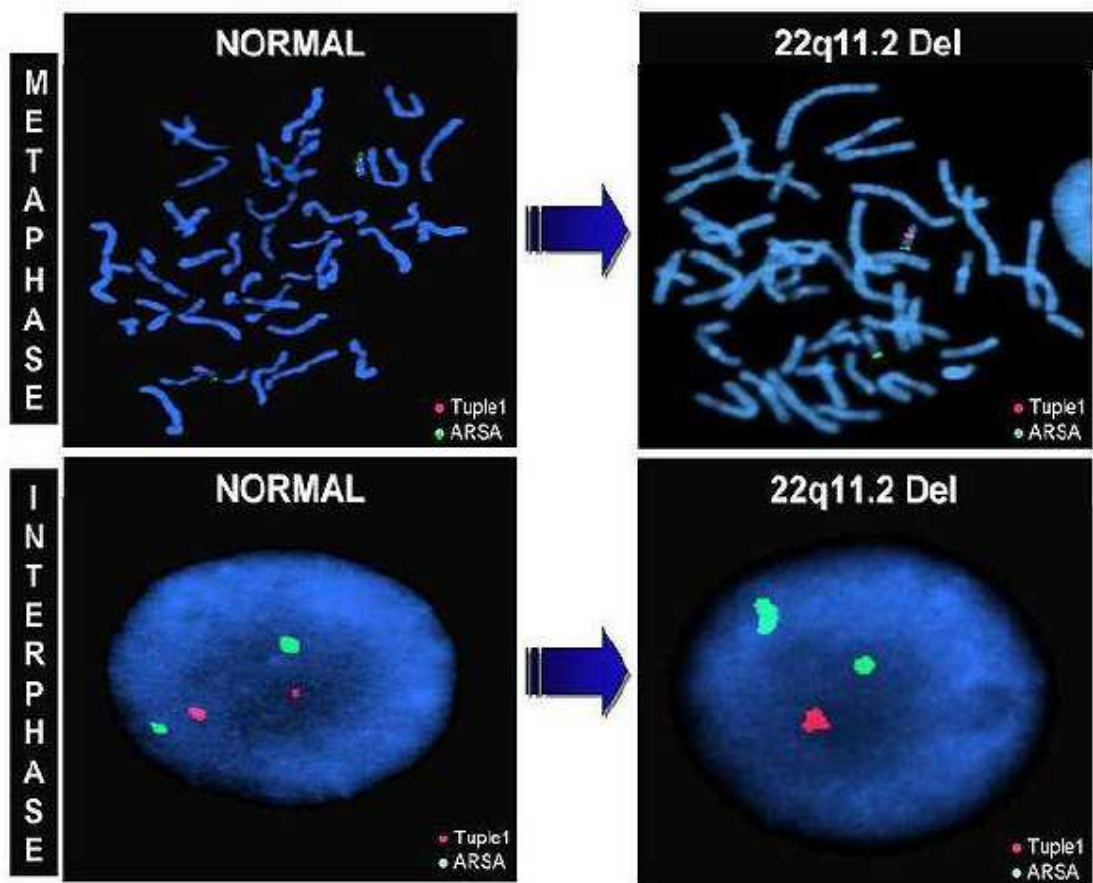


Figure 42 : FISH normale (deux spots rouges et deux spots verts) et délétion 22q11 (deux spots verts et un seul spot rouge)

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 coeur et des crêtes neurales ; CDC45L (Cell Division Cycle45, *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.

- . □ 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 43) [49][52]

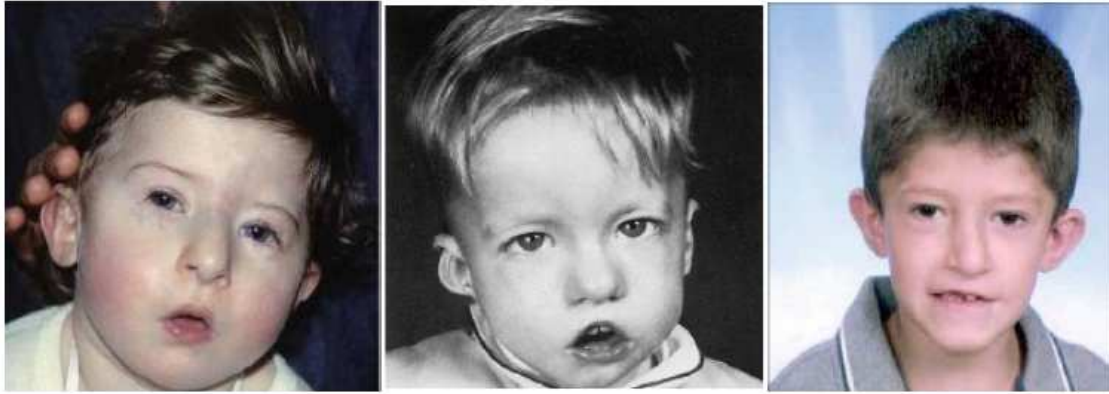


Figure 43 : Syndrome de Di George à différents âges de vie
Notez le nez tubulaire caractéristique ; l’hypertélorisme ; la microstomie ; le micrognathisme et l’aspect des oreilles chez les trois patients.

. □ 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]

⇒ **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]

. □ **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, oedème 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 44)

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 44 : Patients atteints d'un syndrome de Williams à différents âges de vie .
Notez 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 10e 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 familial ; 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]

□ **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 45a)(Figure 45b)

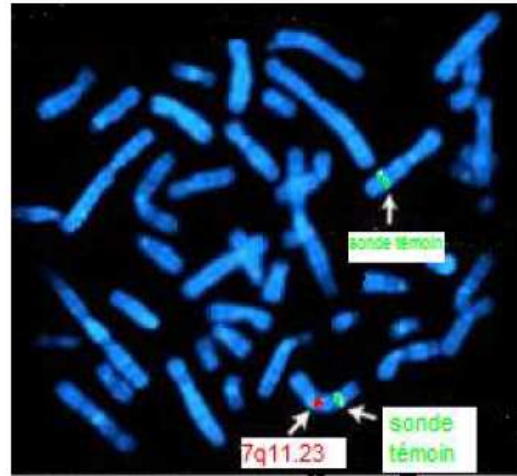
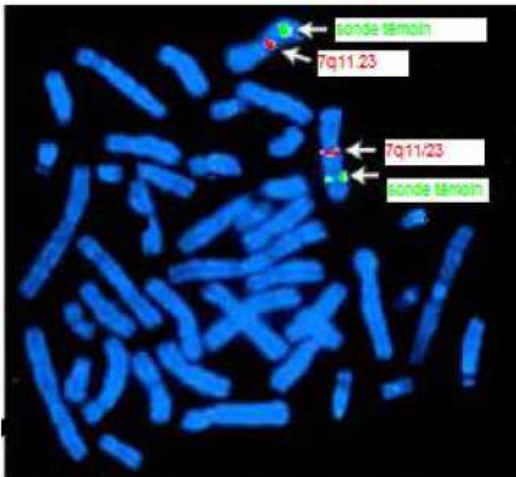


Figure 45a (à gauche) : FISH 7q11.23 normale(deux spots verts : sonde témoin ; et deux spots rouges : sonde 7q11.23)

Figure 45b (à droite) : 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.

□ 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.

⇒ 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]

□ 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 46)[66]
- ~ 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 46 : Aspect typique d'un syndrome de Prader-Willi

□ 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 (moins 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 47) [31][58][59]

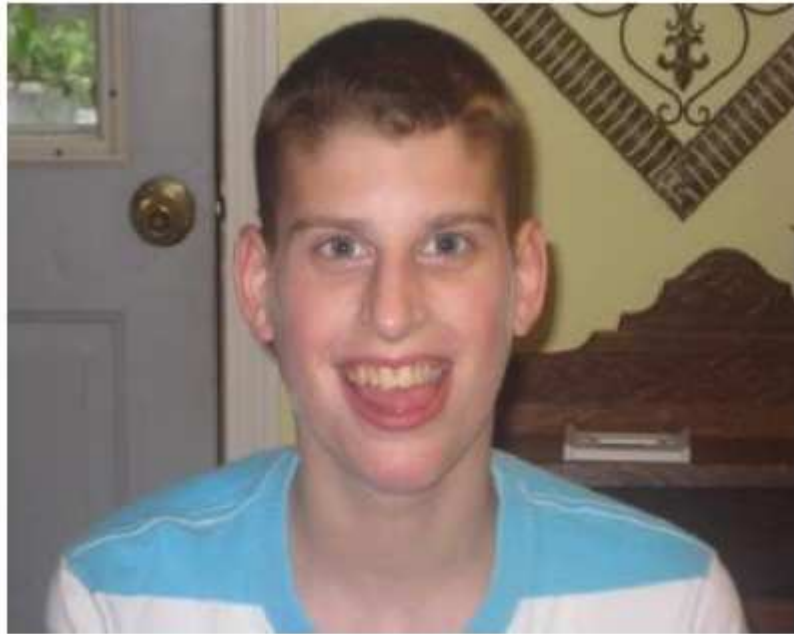


Figure 47 : Syndrome d'Angelman

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.

⇒ Le syndrome de Smith-Magenis et délétion 17p11.2

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 48)

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'haploinsuffisance 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 48 : Syndrome de Smith-Magenis (noter le prognatisme et le visage plat)

b-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.

⇒ **Syndromes connus et microdélétions interstitielles**

- □ **Syndrome de WAGR et délétion 11p13**
- □ **Syndrome de Langer-Giedon et délétion 8q24.1**
- □ **Syndrome d'Alagille et délétion 20p11.23 (SAG)**
- □ **Syndrome de Rubinstein-Taybi et délétion 16p13.3**

⇒ **Délétions interstitielles et nouvelles entités syndromiques**

Elles sont nombreuses et on ne mentionnera que deux exemples :

- □ **Délétion 8p23.1 (monosomie 8p)**
- □ **Délétion 2q22-q23 (syndrome de Mowat Wilson)**

c-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 mal ségrégation 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 49)

L'IRM est l'examen le plus performant pour faire le diagnostic de la lissencéphalie. (Figure 50)

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 49 (à gauche) : Faciès de patients atteints d'un syndrome de Miller-Dieker

Figure 50 (à droite) : 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 CGH array.

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]

d-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]

e-CONSEIL GENETIQUE

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]

E- 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 Kallionémi et al. , l'hybridation génomique comparative, ou CGH (Comparative Genomic Hybridization), répond au moins en partie à ces exigences. [26][28]

E-1 Principes techniques

La technique repose sur l'hybridation compétitive de deux ADN marqués différemment sur des chromosomes lymphocytaires normaux (figure 51).

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 :

□ 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]

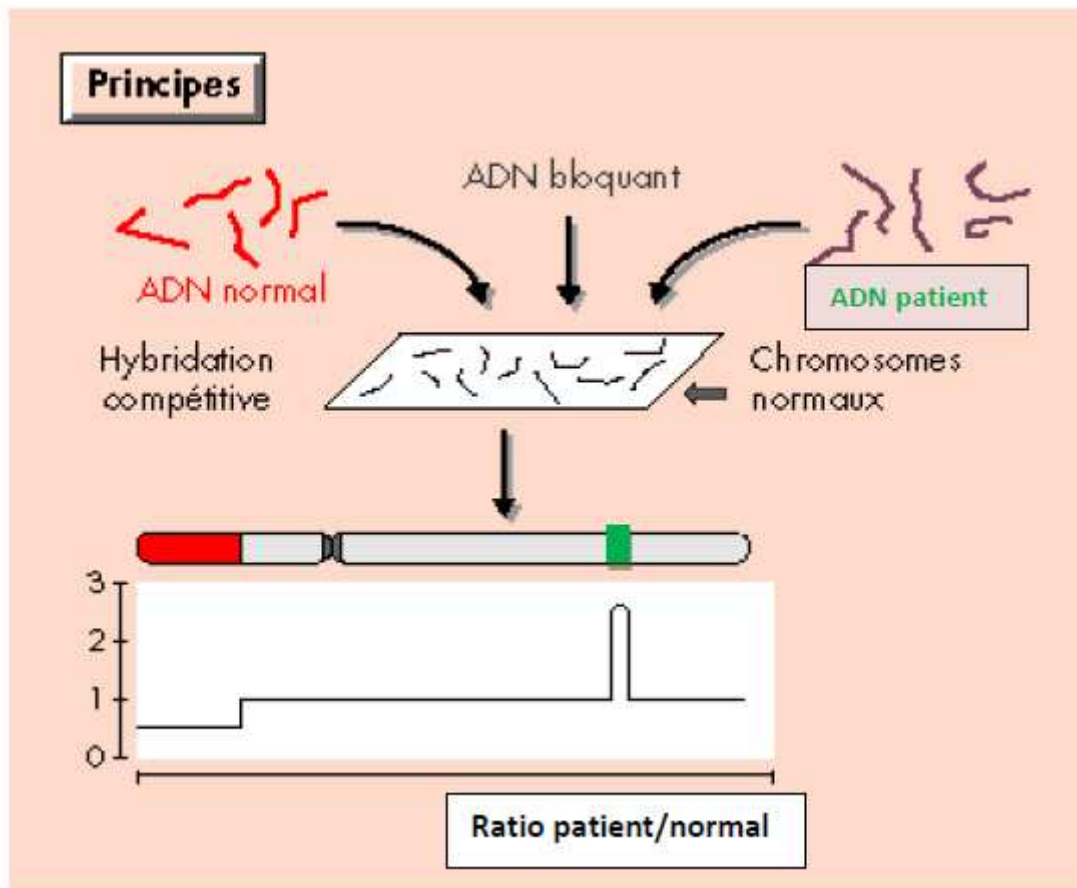


Figure 51 : Dans cet exemple ; l'ADN patient est marqué en vert. Le calcul du ratio de fluorescence le long de ce chromosome montre la présence d'une délétion de l'extrémité distale du bras court (hybridation préférentielle de l'ADN normale rouge) et une amplification génique sur le bas long (nette prédominance d'ADN patient vert se traduisant par un pic de fluorescence e regard) .

E-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 :

- . □ 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.
- . □ 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.

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

E-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]

E-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]

□ 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 52)



Figure 52 : 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 53)

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 Puce 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]

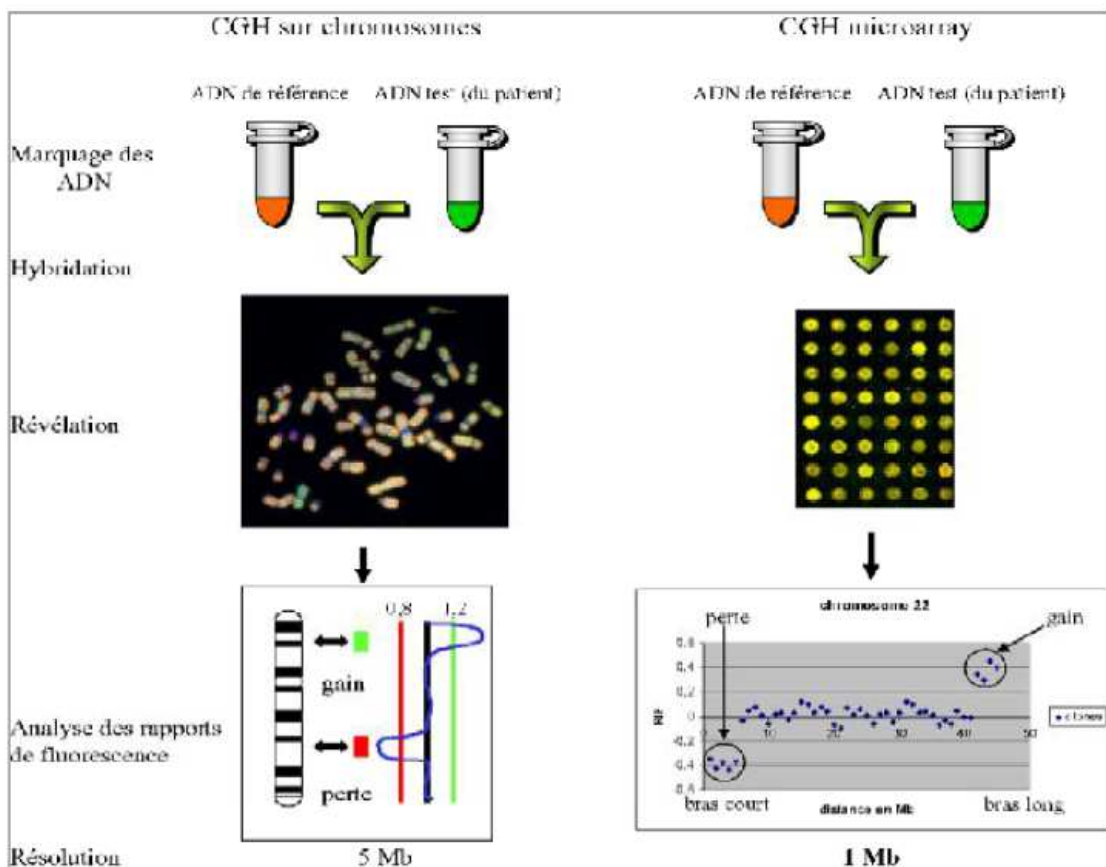


Figure 53 : Synoptique comparatif des principales étapes entre la CGH sur chromosomes à gauche et la CGH microarray à droite.

5- LA CGH ARRAY :APPLICATIONS

a- 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 CGH array 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- 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]

□ 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]

α- 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.[65]

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]

β- 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]

Ω- Utilisation des bases de données de variant 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]

C- 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.[67]

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'identification 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]

F- MPLA (Multiplex-Ligation-Dependent-probe-amplification)

A côté des analyses cytogénétiques ; il existe d'autres techniques plutôt de biologie moléculaire ; qui pourraient améliorer la prise en charge en DPN. Parmi ces techniques on trouve la MLPA basée sur l'utilisation de sondes de part et d'autres d'une séquence d'intérêt ; qui sont amplifiées par leur liaison par une enzyme (la ligase). Les produits d'amplification sont ensuite identifiés par leur tailles respectives (fig 54).

Des nombreux kits ont été développés permettant l'étude de plus de 40 locus différents. Parmi ceux-ci ; il existe celui permettant l'étude de l'ensemble des télomères ou encore celui permettant l'étude des syndromes microdélétionnels les plus fréquents [62].

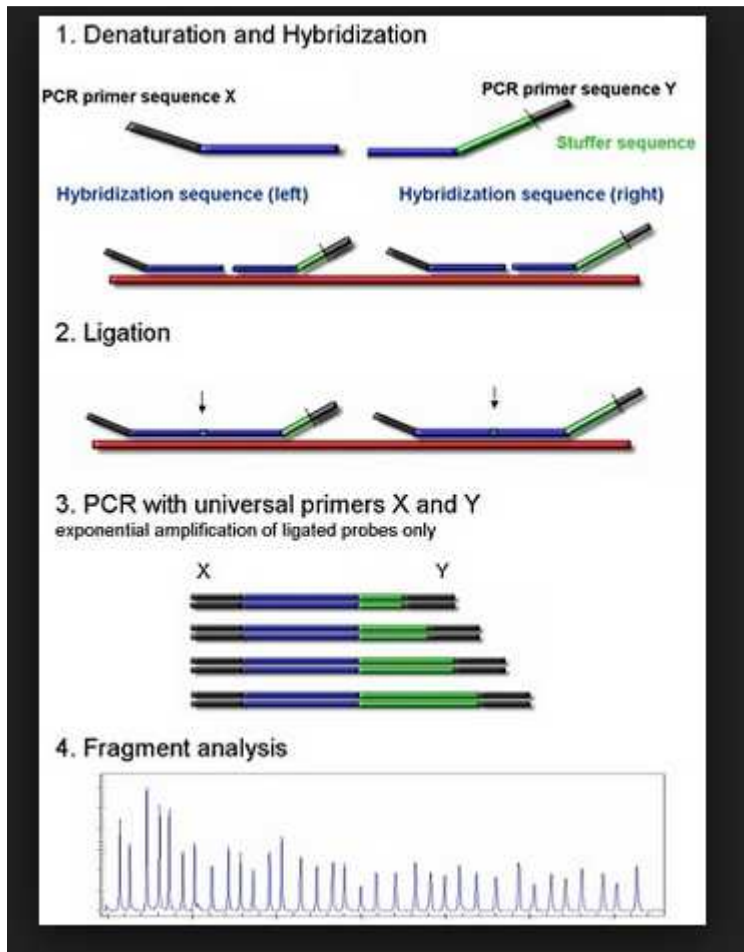


Figure 54 : Principe de MLPA



CONCLUSION



Le développement des techniques de la cytogénétique moléculaire entraîne une révolution profonde dans la pratique de la cytogénétique tant du point de vue du diagnostic que du point de vue de l'organisation des laboratoires, Par ailleurs, la détection de microremaniements dans des syndromes non étiquetés pour l'instant est une porte ouverte non seulement pour la description de nouveaux syndromes mais aussi pour l'identification de gènes impliqués dans le développement et/ou le fonctionnement du système nerveux central et dans celui de la morphogénèse. La mutation de la cytogénétique passe probablement par des étapes coûteuses tant sur le plan de la formation des hommes (techniciens, médecins et scientifiques) que sur le plan structurel et technique. C'est certainement l'un des défis majeurs que doit relever la génétique médicale .

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.



RÉSUMÉS



RESUME

Titre : Techniques cytogénétiques classiques et modernes

**Mots-clés : Cytogénétique humaine . Hybridation in situ fluorescente .
Hybridation génomique comparative**

Auteur : Naama Soukaina

Depuis la découverte en 1956 du nombre de chromosomes dans l'espèce humaine; la cytogénétique n'a cessé de progresser dans l'analyse de son sujet d'étude : le chromosome humain. La sensibilité et le degré de résolution des techniques de cytogénétique n'ont cessé de s'accroître tout d'abord avec l'introduction des techniques de marquage en bandes dans les années 1970 puis de celles dites de cytogénétique haute résolution ; mais aussi et surtout avec l'apparition des techniques d'hybridation in situ dans le début des années 1990 ouvrant ainsi le champ à la cytogénétique moléculaire. Ces dernières ont permis d'une part d'augmenter considérablement le pouvoir de résolution de la cytogénétique et d'autre part de s'affranchir de la nécessité de travailler à partir de cellules en division ; c'est-à-dire vivantes à leur arrivée dans les laboratoires.

Les avancées les plus récentes de la cytogénétique moléculaire concernent la possibilité de rechercher des désordres génomiques non plus directement par l'observation chromosomique mais par l'utilisation directe de l'ADN brut lors de techniques d'hybridation génomique comparative (CGH) parmi lesquelles la micro-CGH. Utilisant un support de puces à ADN ; jouera très certainement un rôle majeur.

La cytogénétique humaine ne s'affranchira néanmoins jamais des techniques de cytogénétique classique ; qui sont les seules à pouvoir diagnostiquer des remaniements équilibrés du génome. Ainsi ; la cytogénétique moderne ; alliant l'utilisation de techniques classiques à d'autres plus modernes et situées à la limite de la biologie moléculaire ; devrait-elle tenir une place privilégiée dans l'identification de nouveaux gènes responsables des maladies héréditaires ou acquises.

ABSTRACT

Title : Technical classic and modern cytogenetic

Key words: Human cytogenetics. Fluorescence in situ hybridization.
Comparative genomic hybridization

Author: Naama soukaina

Since the discovery in 1956 of the number of chromosomes in the human species; cytogenetics has grown steadily in the analysis of his subject of study: the human chromosome. The sensitivity and the degree of resolution of cytogenetic techniques have continued to increase first with the introduction of bands marking techniques in the 1970s and then the so-called high-resolution cytogenetic; but especially with the advent of in situ hybridization techniques in the early 1990s, opening the field to the molecular cytogenetics. The latter allowed one hand to significantly increase the cytogenetic resolution and the other to overcome the need to work from dividing cells; that is to say living on arrival in the laboratory.

The latest advances in molecular cytogenetics include the ability to search for genomic disorders either by chromosomal observation but by the direct use of crude DNA in comparative genomic hybridization techniques (CGH) including the micro-CGH. Using a microarray support; will certainly a major role.

Human cytogenetics did however never will free classical cytogenetic techniques; which are the only ones able to diagnose balanced rearrangements of the genome. thus; modern cytogenetics; combining the use of conventional techniques to more modern and on the boundary of the molecular biology; Should hold a special place in the identification of new genes responsible for hereditary or acquired diseases.

الملخص

العنوان : تقنيات الوراثة الخلوية القديمة و الحديثة

الكلمات الرئيسية : علم الوراثة الخلوية البشرية. تقنية وميض التهجين الموضوعي. تقنية التهجين الجينومي المقارن

المؤلف : النعمى سو كينة

مند اكتشاف عدد الكروموزومات البشرية عام 1956, نما علم الوراثة الخلوية بشكل سريع في تحليل موضوع دراسته : الكروموزوم البشري. حساسية و درجة تشخيص التقنيات الوراثة تطورت مع إدخال التقنيات العالية الدقة عام 1970, و الأهم من ذلك ظهور تقنية وميض التهجين الموضوعي عام 1990 التي فتحت الباب لعلم الوراثة الخلوية الجزئية, هذه مكنت من الرفع من دقة التقنيات الوراثة و تجاوز ضرورة العمل على خلايا حية في طور التقسيم.

التطورات الأخيرة في علم الوراثة الخلوية الجزئية مكنت من العمل مباشرة على الحمض النووي الخام بدلا من ملاحظة الكروموزومات من خلال تقنية التهجين الجينومي المقارن التي ستلعب دورا هاما في المستقبل.

علم الوراثة البشرية لن يستطيع تجاوز التقنيات الكلاسيكية لأنها الوحيدة القادرة على تشخيص التشوهات المتوازنة في الجينوم, و هكذا فإنه يسعى إلى الجمع بين التقنيات القديمة و الحديثة لتعريف جينات جديدة مسئولة عن أمراض وراثية أو مكتسبة



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-Bastarud,** 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 foetale 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. Cuvelier, 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 foetopathologie, 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 Hinfroy** , Puces 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**, Puces à ADN, IRBM, Volume 28, Issues 5–6, November–December 2007, Pages 210-215
- 41. J. Andrieux**, Puces 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-Weber**, 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 Cuvelier, 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, Issue3, 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. Ouldim 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. Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH.** Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Mcd Genec* 2003;40(12):907—i 2.
- 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, Gorduza 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.

Serment d'Hippocrate

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

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

Déclaration de Genève,

1948

قسم ابقرراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:
- بأن أكرس حياتي لخدمة الإنسانية؛
- وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه؛
- وأن أمارس مهنتي بوازع من ضميري وشرفي جاعلا صحة مريضى هدفي الأول؛
- وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي؛
- وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب؛
- وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي؛
- وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي؛
- وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها؛
- وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد؛
- بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسم بشرفي.
- والله على ما أقول شهيد.

جامعة محمد الخامس - الرباط
كلية الطب والصيدلة - بالرباط

أطروحة رقم: 03

سنة : 2015

تقنيات الوراثة الخلوية

القديمة و الحديثة

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : 2015.

من طرف

الآنسة : سو كينة النعمي

المزادة في 24 ديسمبر 1985 بزاكورة

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: علم الوراثة الخلوية البشرية، تقنية وميض التهجين الموضوعي، تقنية التهجين الجينومي المقارن، الخريطة الصبغية.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة:

رئيس

السيد : ميمون زهدي

أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

مشرف

السيد : عمر الشقيري

أستاذ في علم الأنسجة والأجنة والوراثة الخلوية

أعضاء

السيدة : مليكة بركيو

أستاذة في علم الأنسجة والأجنة والوراثة الخلوية

السيدة : أسماء المدغري العلوي

أستاذة في طب الأطفال