HAL
open science

Caractérisation de 10 marqueurs chromosomiques surnuméraires (MCS) : apport de l'hybridation génomique comparative sur microréseau (CHG-ARRAY)

Grégory Egea

▶ To cite this version:

Grégory Egea. Caractérisation de 10 marqueurs chromosomiques surnuméraires (MCS) : apport de l'hybridation génomique comparative sur microréseau (CHG-ARRAY). Sciences pharmaceutiques. 2010. dumas-00593116

HAL Id: dumas-00593116
https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00593116v1

Submitted on 13 May 2011

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2010 N°

CARACTERISATION DE 10 MARQUEURS CHROMOSOMIQUES SURNUMERAIRES (MCS) : APPORT DE L'HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE SUR MICRORESEAU (CGH-ARRAY)

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

EGEA Grégory

Né le 12 janvier1981 à ECHIROLLES

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE LE 22 JUIN 2010

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury :
Monsieur Patrice FAURE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Directeur de thèse :
Monsieur Damien SANLAVILLE, Maître de conférence à la Faculté de Médecine de Lyon

Membres
Monsieur Joël LUNARDI, Professeur à la Faculté de Médecine de Grenoble
Madame Florence AMBLARD, Praticien Hospitalier au CHU Grenoble
Madame Caroline SCHLUTH-BOLARD, Assistante Hospitalière de Recherche à Lyon

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.
GRENOBLE 1

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice –Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2009-2010

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (N=17)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (GREPI – TIMC)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2 / PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR / LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie - Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

Mise à jour le 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

PROFESSEUR EMERITE (N=1)

FAVIER	Alain

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (N=2)

RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (N=1)

GAUCHARD	Pierre Alexis	Chimie (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.
GRENOBLE 1

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice –Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2009-2010

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B - LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A.)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I. / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie –Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Mise à jour du 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

ENSEIGNANTS ANGLAIS (N = 3)

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER (N = 5)

ATER	**ELAZZOUZI** Samira	Pharmacie Galénique
ATER	**SHEIKH HASSAN** Amhed	Pharmacie Galénique
ATER	**MAS** Marie	Anglais Master ISM
ATER	**ROSSI** Caroline	Anglais Master ISM
ATER	**SAPIN** Emilie	Physiologie Pharmacologie

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

REMERCIEMENTS

A Monsieur SANLAVILLE, Maître de conférence à la Faculté de Médecine de Lyon, pour sa disponibilité et son implication totale dans la réalisation de ce travail.

A Monsieur FAURE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Grenoble, qui me fait l'honneur de bien vouloir présider ce jury.

A Monsieur LUNARDI, Professeur à la Faculté de Médecine de Grenoble, qui me fait l'honneur de juger mon travail.

A Madame AMBLARD, Praticien Hospitalier au CHU de Grenoble, qui me fait l'honneur de juger mon travail.

A Madame SCHLUTH-BOLARD, Assistante Hospitalière de Recherche à Lyon, qui me fait l'honneur de juger mon travail. Je la remercie de m'avoir donné l'opportunité de faire ce travail.

A Madame TILL, Praticien Hospitalier au HCL, pour son aide et son dynamisme.

A Monsieur EDERY, Professeur à la Faculté de Médecine de Lyon, qui m'a accueilli trois semestres dans le service de cytogénétique du CBPE.

A l'équipe de la plate-forme CGH-*array*, Audrey LABALME, Chantal BECHE, Isabelle MORIN et Hélène GUILBERT, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide. Je voudrais tout particulièrement remercier Audrey LABALME qui m'a formé à la CGH-*array* et m'a été d'une aide précieuse.

A Michel PAILLET, qui a bien voulu relire plusieurs fois mon travail.

A mes parents, pour m'avoir soutenu.

A Thanh-Lan PAILLET pour tout ce qu'elle m'apporte au quotidien d'attention, de soutien et d'amour.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **6**

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES **9**

ABBREVIATIONS **13**

INTRODUCTION **14**

1. REVUE DE LITTERATURE **15**

1.1. Définition **15**

1.1.1. ISCN 2009 15

1.1.2. Liehr 15

1.2. Généralités sur les marqueurs chromosomiques **15**

1.2.1. Epidémiologie 15

1.2.2. Mosaïcisme 18

1.2.3. Les différents types de marqueurs 18

1.2.4. Les conséquences cliniques des marqueurs 25

1.2.5. MCS associés à un phénotype décrit 25

1.2.6. MCS et DUP 30

1.2.7. Trouble de la fertilité 31

1.2.8. Absence d'anomalie du phénotype 34

1.3. Historique des différentes stratégies pour l'identification des MCS **35**

1.3.1. Cytogénétique conventionnelle 35

1.3.2. Hybridation *in situ* en Fluorescence (FISH) 38

1.3.3. Microdissection chromosomique 49

1.3.4. CGH-array 49

2. MATERIEL ET METHODES 56

2.1 Les patients 56

2.2 Les puces *Agilent*® 58

2.3 Protocole de l'hybridation génomique comparative 61

2.4. Hybridation *in situ* en fluorescence 65

2.5. Protocole MultiFISH 66

2.6. Méthodologie de l'étude 67

3. RESULTATS 68

4. DISCUSSION 99

4.1. Corrélation génotype-phénotype des MCS 99

4.2. Comparaison des deux puces utilisées 106

4.3. Place de la CGH-*array* dans d'identification d'un MCS 107

4.4. Apports et limites de la CGH-*array* 109

4.5. Les applications cliniques de la CGH-*array* 111

4.6. Le Prénatal 112

CONCLUSION 114

BIBLIOGRAPHIE 116

ANNEXE 124

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Tableau I : Fréquence des MCS

Tableau II : Origine parentale des MCS

Tableau III : Fréquence des principaux signes cliniques de l'inversion duplication du chromosome 15.

Tableau IV : Revue de littérature de quelques cas de MCS avec DUP

Tableau V: Résumé des sondes utilisées en AcroMFISH

Tableau VI: Les différents mélanges de fluorochromes utilisés en fonction des chromosomes

Tableau VII : Principaux avantages et inconvénients de la CGH-array et des différentes techniques de FISH

Tableau VIII : Résumé des caractéristiques des 10 patients inclus dans l'étude

Tableau IX : Résultats obtenus en CGH-*array* sur les puces 244K personnalisées et 180K d'Agilent®

Tableau X : Confirmation des résultats par FISH

Figures

Figure n°1 : La fréquence des MCS

Figure n°2: Comparaison de la fréquence de novo et familiale des MCS dans les villosités choriales (CVS), liquide amniotique (AFC) et le sang des nouveaux-nés

Figure n°3 : Distribution des différents types de MCS selon leur origine acrocentrique ou non-acrocentrique

Figure n°4 : Aspects des petits marqueurs chromosomiques surnuméraire (MCS): inversion duplication chromosomique (inv dup), chromosome minute (min) ou chromosome en anneau (r)

Figure n°5 : Mécanisme de formation d'une inversion duplication d'un chromosome acrocentrique et illustration de l'évolution d'un chromosome néocentromérique en relation avec un échange de type U

Figure n°6 : Formation d'un chromosome en anneau par double cassure, recollement des extrémités, accompagné d'une double délétion

Figure n°7 : Formation d'un chromosome en anneau par délétion d'une partie du chromosome

Figure n°8: Formation d'un chromosome en anneau par réarrangement chromosomique complexe

Figure n°9 : Formation d'un chromosome en anneau par réunion de chromatides sœurs cassées

Figure n°10: Formation d'un chromosome en anneau à partir d'un chromosome minute

Figure n°11 : Formation d'un chromosome minute par dégradation du chromosome

Figure n°12: 47 cas avec un MCS néocentromérique sont rapportés dans la littérature. Leur répartition est montrée ici en fonction de leur origine chromosomique

Figure n°13 : Résultats de la revue de la littérature montrant l'origine chromosomique de 1 396 cas de MCS

Figure n°14 : MCS dérivé du chromosome 22 responsable du CES

Figure n°15 : Les différents types du CES

Figure n°16 : Représentation schématique du chromosome 15, montrant les 5 points de cassure, et le segment d'environ 4Mb comprenant la région critique PWS/AS.

Figure n°17 : Distribution chromosomique des MCS chez les patients infertiles en fonction du sexe

Figure n°18 : Pourcentage de MCS(14) et de MCS(15) chez les porteurs de MCS dans la population générale et les patients infertiles

Figure n°19 : Distribution des différentes causes d'infertilité chez 111 patients avec MCS

Figure n°20 : Origine parentale de MCS

Figure n°21 : Comparaison entre l'origine familiale et *de novo* des MCSs en fonction des indications cliniques

Figure n°22 : Caryogramme 46,XY en bandes G (résolution 400 bandes)

Figure n°23 : Caryogramme 46,XX en bandes R (résolution 450 bandes)

Figure n°24 : Principe de l'Hybridation *in situ* en Fluorescence

Figure n°25 : Caryogramme normal en M-FISH avec le kit 24XCyte-Metasystem®

Figure n°26 : Trois chromosomes anormaux sont montrés : A gauche le chromosome pseudocolorée en M-FISH, à droite la détection par l'hybridation avec l'arm-kit (5p, 7p, 8p, 16p) ainsi que l'interprétation (+ ou -).

Figure n°27 : Schéma montrant les sondes utilisées pour l'AcroM-FISH

Figure n°28: AcroM-FISH sur metaphase

Figure n°29: Caryotype avec un MCS(14) obtenu par la technique de cenM-FISH

Figure n°30: Cibles des sondes du kit subcenM-FISH

Figure n°31: Caryogramme normal obtenu avec la technique subcenM-FISH

Figure n°32 : Principe de l'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN

Figure n°33 : Détail d'une puce ADN Agilent™ après hybridation. Ratios de fluorescence mesurés par le logiciel DNA-analytics™ et présentés sous forme graphique

Figure n°34 : Exemple de puce 180K ou 244K d'Agilent®

Figure n°35 : Technique d'oligo-synthèse via la chimie des phosphoramidites. Le processus est répété 60 fois

Figure n°36 : Schéma d'un plan expérimental en trio (puce 3x244K)

Figure n°37 : Schéma d'un plan expérimental en quatuor (puce 4x180K)

Figure n°38 : Caryogramme en bandes R du patient n°1 montrant le MCS

Figure n°39: Métaphases du patient n°1 observées après hybridation avec le kit 24XCyte Human Multicolor FISH (M-FISH) et traitement par le logiciel MetaSystems®.

Figure n°40 : Caryogramme couleur obtenu en MultiFISH du patient n°1 avec le MCS

Figure n°41: Sonde wcp7 hybridant les chromosomes 7 et le MCS

Figure n°42 : Caryogramme en bandes R du patient n°2 montrant le MCS

Figure n°43 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 244K personnalisée

Figure n°44 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 180K

Figure n°45: Sondes Vysis® CEP9 (rouge) et CEP7 (vert) hybridant les centromères des chromosomes 7, 9 et le MCS (peint en 9). Le MCS est hybridé avec le centromère du chromosome 9.

Figure n°46 : Caryogramme en bandes R du patient n°3 montrant le MCS

Figure n°47 : Profil en CGH-*array* du chromosome 5 sur puce Agilent® 244K

Figure n°48 : Profil en CGH-*array* du chromosome 5 sur puce Agilent® 180K

Figure n°49: Sonde Aquarius® wcp5 hybridant les chromosomes 5 et le MCS (Mitose).

Figure n°50 : Caryogramme en bandes R du patient n°4 montrant le MCS

Figure n°51 : Caryogramme en bandes R du patient n°5 montrant le MCS

Figure n°52 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 244K

Figure n°53 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 180K

Figure n°54: Sondes wcp1 (vert) et 1qh (rouge) hybridant les chromosomes 1 ainsi que le MCS.

Figure n°55 : Caryogramme en bandes R du patient n°6 montrant le MCS

Figure n°56 : Profil en CGH-*array* du chromosome 22 sur puce Agilent® 244K

Figure n°57 : Profil CGH-*array* du chromosome 22 sur puce Agilent® 180K

Figure n°58 : Sondes peintures wcp 21(vert) et wcp 22 (rouge) hybridant les chromosomes 21, 22. Le MCS est peint avec la peinture du chromosome 22

Figure n°59 : Caryogramme en bandes R du patient n°7 montrant le MCS.

Figure n°60 : Profil en CGH-*array* du chromosome 8 sur puce Agilent® 244K

Figure n°61 : Profil en CGH-*array* du chromosome 8 sur puce Agilent® 180K

Figure n°62 : Sondes peintures wcp 8(vert) hybridant les chromosomes 8 et le MCS

Figure n°63 : Caryogramme en bandes R du patient n°8 montrant le MCS

Figure n°64 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 244K

Figure n°65 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 180K

Figure n°66 : Sondes D9Z1 (rouge) et 9ptel30 (rouge) hybridant les chromosomes 9. Le MCS hybride avec la sonde D9Z1.

Figure n°67 : Hybridation des sondes 9q21.3 (Orange) et 9p ter (V) Contrôle. Le MCS, isochromosome 9p hybride avec la sonde spécifique 9pter.

Figure n°68 : Caryogramme en bandes R du patient n°9 montrant le MCS

Figure n°69 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 244K

Figure n°70 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 180K

Figure n°71: Sondes wcp1 (vert) hybridant les chromosomes 1 ainsi que le MCS.

Figure n°72 : Caryogramme en bandes R du patient n°10 montrant le MCS

Figure n°73 : Profil en CGH-*array* du chromosome 19 sur puce Agilent® 244K

Figure n°74 : Profil en CGH-*array* du chromosome 19 sur puce Agilent® 180K

Figure n°75: Sondes wcp19 (vert) hybridant les chromosomes 19 ainsi que le MCS.

Figure n°76 : Arbre décisionnel d'identification d'un MCS.

ABBREVIATIONS

BAC	*Bacterial Artificial Chromosome*
CEP	*Chromosome Enumeration Probe*
CGH	*Comparative Genomic Hybridation*
CNP	*Copy Number Polymorphism*
CNV	*Copy Number Variation*
DLRS	*Derivative Log Ratio Spread*
DUP	Disomie Uniparentale
FISH	*Fluorescence in situ hybridization* (hybdridation *in-situ* en fluorescence)
ISCN	*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*
LCR	*Low Copy Repeat*
MCS	Marqueur Chromosomique Surnuméraire
MLPA	*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
PAC	*P1-derived artificial chromosome*
PCR	*Polymerisation Chain Reaction*
SMC	*Supernumerary Marker Chromosome* = MCS
WCP	*Whole Chromosome Painting*

INTRODUCTION

Les chromosomes, support de l'information génétique, sont localisés au niveau du noyau des cellules. L'espèce humaine comporte 23 paires de chromosome : 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes. Les chromosomes humains sont numérotés de 1 à 22, du plus grand au plus petit, et les deux chromosomes sexuels sont nommés X et Y. Les cellules de l'espèce humaine sont donc normalement constituées de 46 chromosomes.

Lors de la réalisation d'un caryotype, un fragment chromosomique surnuméraire dont on ne sait pas déterminer l'origine est parfois mis en évidence. Il s'agit d'un Marqueur Chromosomique Surnuméraire (MCS), nommé « mar » pour marqueur. Le caryotype d'une personne porteur d'un MCS montre donc un 47ème chromosome pouvant dériver de n'importe quel chromosome.

La première description d'un MCS a été réalisée en 1961 par Ilberry *et al.*, chez un enfant de 2 ans. Le MCS est alors décrit comme une particule « centrique » de la taille du 17p. Ces chromosomes additionnels de structure indéterminée font alors l'objet d'études approfondies car ils peuvent être associés à des phénotypes anormaux.

En pathologie constitutionnelle, il existe trois situations différentes pour lesquelles un MCS peut être mis en évidence : durant la grossesse (diagnostic prénatal), chez les enfants (phénotype évocateur d'une anomalie chromosomique), chez les adultes sains présentant des problèmes de fertilité.

En raison des origines diverses des marqueurs et de leur constitution variable en euchromatine, le phénotype associé aux MCS varie significativement. Cette variabilité pose un grand dilemme pour le conseil génétique lorsque le MCS est détecté en période prénatale.

Ce travail a pour objectif d'évaluer l'apport de la technique d'Hybridation Génomique Comparative sur microréseau (CGH-*array*) pour l'identification et la caractérisation de MCS à travers l'étude de 10 MCS difficilement identifiables.

Dans un premier temps, nous réaliserons une revue des différents types de MCS déjà décrits dans la littérature et des techniques utilisables pour les identifier. Dans un second temps, nous détaillerons l'étude que nous avons menée sur 10 MCS. Enfin, nous discuterons les résultats obtenus et proposerons un arbre décisionnel pour l'identification des MCS.

1. REVUE DE LITTERATURE

1.1. Définition

Les marqueurs chromosomiques surnuméraires trouvés en diagnostic pré- et postnatal sont en général des fragments chromosomiques qui s'additionnent aux 46 chromosomes de l'individu.

1.1.1. ISCN 2009

L'ISCN défini un marqueur chromosomique surnuméraire (MCS) comme un chromosome additionnel de structure anormale dont la composition ne peut être déterminée par les techniques de cytogénétique conventionnelle (Shaffer LG *et al*., 2005).

1.1.2. Liehr

Thomas Liehr apporte un supplément d'information à celle donnée par l'ISCN : les petits marqueurs chromosomiques surnuméraires sont des anomalies chromosomiques dont la taille est inférieure ou égale à un chromosome 20 dans la même métaphase (Liehr *et al*., 2004).

1.2. Généralités sur les marqueurs chromosomiques

1.2.1. Epidémiologie

Un petit marqueur chromosomique surnuméraire (MCS) est trouvé dans 0,044% de la population générale (Liehr et Weise, 2007). La moitié des cas de MCS sont dérivés du chromosome 15 (Crolla ,1998 ; Crolla *et al*., 1998).

Parmi les cas restants, il y a une grande variation sur l'origine chromosomique du MCS. Le pourcentage de phénotype anormal varie en fonction des types de MCS. Dans environ 30% des cas, l'individu porteur d'un MCS (en excluant les 60% de MCS dérivant d'un chromosome acrocentrique) ont un phénotype anormal.

En période prénatale, le risque d'avoir un phénotype anormal avec un MCS de *novo* (non hérité des parents) est d'environ 13% (Warburton, 1991). Quand le MCS dérive des chromosomes acrocentriques 13, 14, 21 et 22, le risque d'avoir un phénotype anormal est de 7%. Par contre, ce risque atteint 28 % lorsqu'il s'agit de chromosomes non acrocentriques (Crolla, 1998).

Liehr et Weise ont collecté tous les cas de MCS dans la littérature permettant d'apporter une information sur la fréquence des MCS en période prénatale et en période postnatale, chez les individus présentant un retard mental et les sujets infertiles (Figure n°1). Au total, 1 288 693 cas ont été étudiés en cytogénétique avec 980 MCS rapportés. Lors de cette étude il a été noté que la fréquence des MCS n'est pas influencée par l'ethnie. Les proportions de MCS observés en fonction des cas sont reportés dans le tableau I et la figure n°1.

- ✓ En période prénatale : 688 030 cas provenant de plus de 240 laboratoires ont permis la mise en évidence de 514 MCS, ce qui représente une fréquence de 0,075%. La fréquence est identique pour les prélèvements de villosités choriales et les prélèvements de liquide amniotique (0,074%).
- ✓ En période postnatale : 54 MCS sont détectés parmi les 12 694 cas postnataux, ce qui correspond à un taux de 0,044% d'individus porteurs de MCS dans l'étude.
- ✓ Les infertilités : L'étude permet de montrer 41 MCS sur un total de 30 510 patients présentant des problèmes de fertilité, ce qui représente une fréquence de 0,125%. Il semblerait que la fréquence soit dépendante du sexe. En effet, le taux chez les hommes est de 0,165% alors que celui des femmes est de 0,022%.
- ✓ Chez les individus présentant un retard mental : 200 MCS ont été détectés parmi les 69 332 cas étudiés, ce qui représente une fréquence de 0,288%.

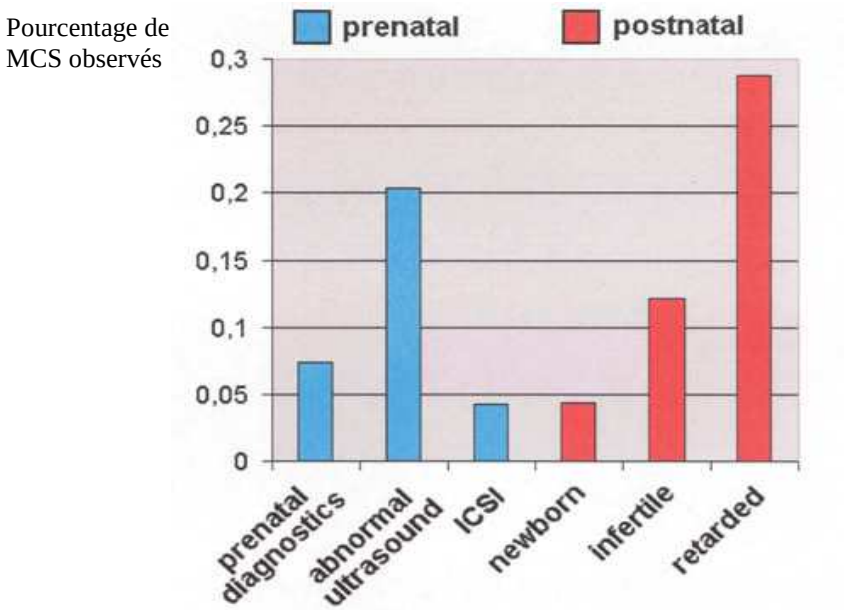


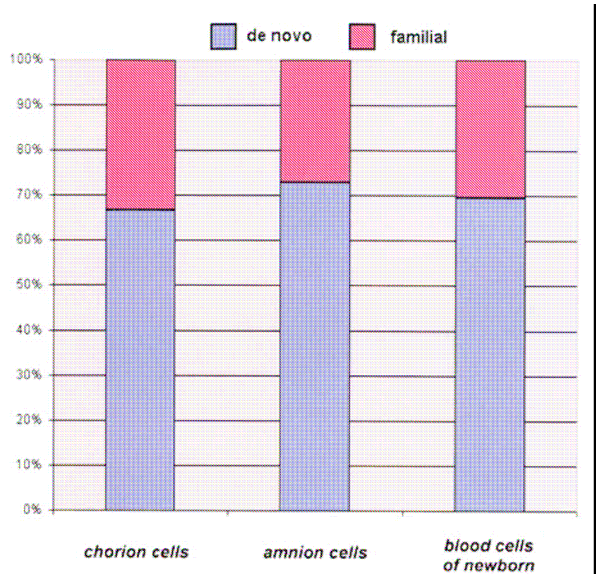
Figure n°1 : La fréquence des MCS (d'après Crolla, 1998).

	Prénatal	Postnatal		
		Retard mental	globale	infertilité
Fréquence MCS	514/688030=**0,075%**	200/69332=**0,288%**	54/12694=**0,044%**	41/30510=**0,125%**

Tableau I : Fréquence des MCS

L'origine des MCS (*de novo* ou hérité) a été étudiée (Figure n°2, Tableau II).

Les études montrent que le MCS dans les villosités choriales, liquide amniotique et le sang des nouveaux-nés est *de novo* dans 70% des cas et familiale dans environ 30% des cas. L'origine des MCS est donc principalement *de novo* avec une proportion *de novo*/familiale d'environ 2:1.



(Prénatal) (Prénatal) (Postnatal)

Figure n°2: Comparaison de la fréquence de novo et familiale des MCS dans les villosités choriales, liquide amniotique et le sang des nouveaux-nés (d'après Crolla, 1998).

	Villosité choriale	Liquide amniotique	Sang Nouveau-né
Fréquence MCS	44/59144=**0,074%**	382/519015=**0,074%**	10/13908=**0,071%**
De novo	8/9705=**0,082%**	82/122051=**0,067%**	7/13908=**0,050%**
Familiale	4/9705=**0,041%**	31/122051=**0,025%**	3/13908=**0,022%**

Tableau II : Origine parentale des MCS

1.2.2. Mosaïcisme

1.2.2.1. Définition

Le mosaïcisme est défini par la présence dans l'organisme de plusieurs populations cellulaires (au moins deux) de formules chromosomiques différentes, normales et anormales. Ces cellules dérivent d'un seul zygote (cellule provenant de la fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde).

La mosaïque résulte d'une anomalie de ségrégation (non-disjonction mitotique dans une cellule de l'embryon au cours de la segmentation ou de la gastrulation).

Environ 1 à 2% des amniocentèses révèlent la présence d'une mosaïque. Cependant un très faible pourcentage (0,1-0,4%) de ces cas reflète un vrai mosaïcisme (Welborn *et al*, 1990). En effet, le mosaïcisme le plus apparent est provoqué par l'addition d'un chromosome surnuméraire au cours d'une culture cellulaire *in vitro* et il est qualifié de pseudomosaïcisme.

1.2.2.2. Mosaïcisme en association avec le MCS

Les MCS sont fréquemment retrouvés en mosaïque. Crolla a réalisé une étude basée sur une revue de la littérature incluant 144 cas avec un MCS. Le MCS a été trouvé en mosaïque dans 78 cas (54%). Sur ces 78 cas en mosaïque, au moins 60% présentent un retard du développement psychomoteur et/ou des signes dysmorphiques.

La corrélation entre le mosaïcisme et les conséquences pour le phénotype reste non résolue.

1.2.3. Les différents types de marqueurs

Il existe différents mécanismes de formation de MCS : les tentatives de correction de trisomie, de monosomie, d'erreurs de post fertilisation et les complémentations de gamètes (Bartels *et al*., 2003).

La figure 3 montre que les mécanismes de formation des MCS sont différents selon leur origine chromosomique :

- Parmi les MCS acrocentriques, les dérivés d'« inversion-duplication » sont prédominants, suivis par les chromosomes minutes et les anneaux ;
- Parmi les MCS non-acrocentriques, les chromosomes en anneau et les chromosomes minute sont retrouvés de façon très préférentielle (Liehr *et al*., 2008).

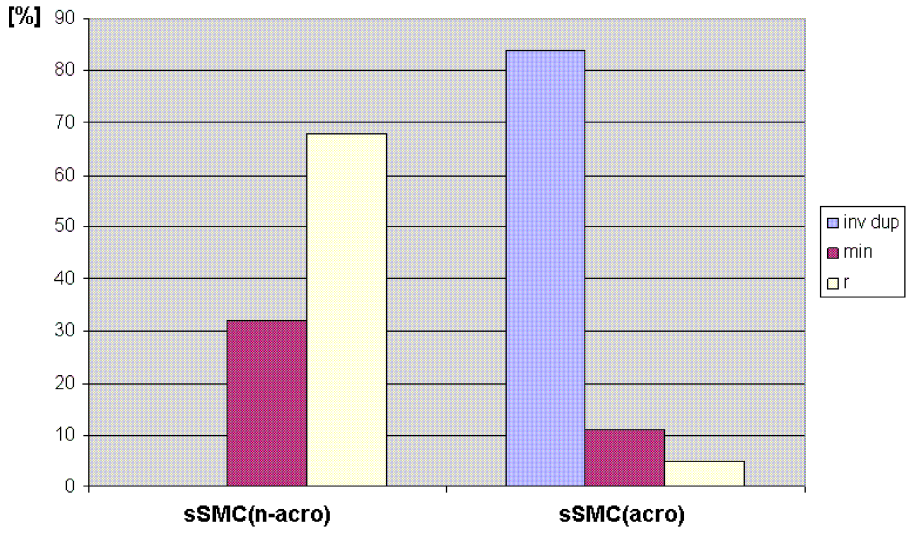


Figure n°3 : Distribution des différents types de MCS selon leur origine acrocentrique ou non-acrocentrique (d'après Crolla, 1998).

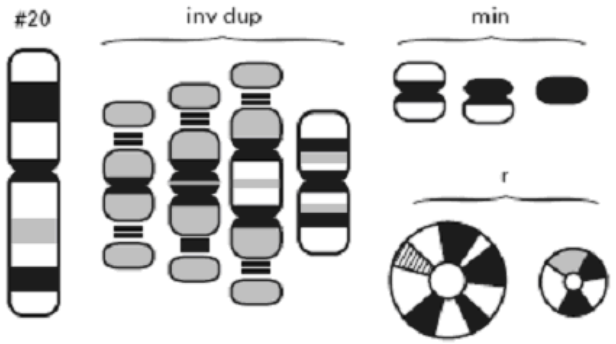


Figure n°4 : Aspects des petits marqueurs chromosomiques surnuméraire (MCS): inversion duplication chromosomique (inv dup), chromosome minute (min) ou chromosome en anneau (r) (d'après Liehr *et al*., 2004).

La formation d'un MCS peut donc avoir plusieurs origines:

1.2.3.1. Inversion duplication

Plusieurs modes de formation des chromosomes inversés dupliqués (acrocentrique) ont été proposés. Cependant la thèse la plus plausible selon Liehr est un échange de type U résultant d'une erreur de croisement des chromatides de deux chromosomes homologues durant la méiose (Schreck *et al*., 1977 ; Figure n°5).

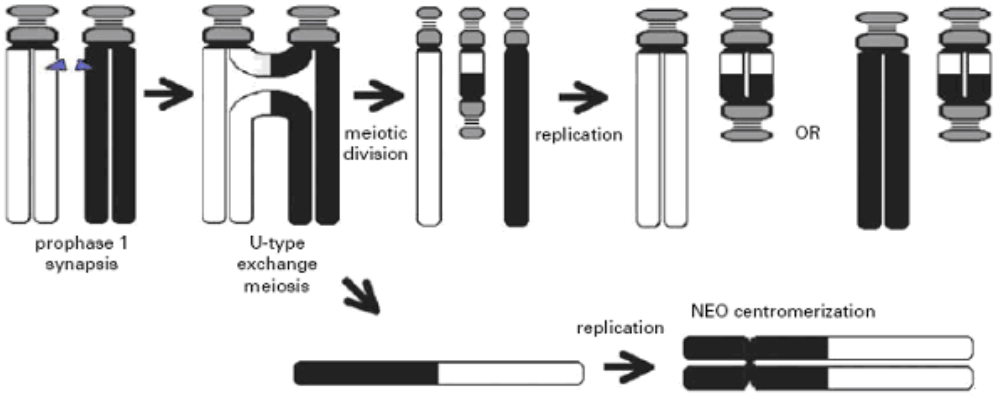


Figure n°5 : Mécanisme de formation d'une inversion duplication d'un chromosome acrocentrique (même explication pour la formation d'un MCS à partir d'un non acrocentrique) et illustration de l'évolution d'un chromosome néocentromérique en relation avec un échange de type U (d'après Liehr *et al*., 2004).

1.2.3.2. Anneau

Il existe des anneaux centriques (anneaux pourvus d'un centromère) et des anneaux acentriques (anneaux dépourvus de centromère). Ces derniers sont généralement rapidement perdus au cours des divisions cellulaires.

Les chromosomes en anneau sont habituellement le résultat d'une double cassure suivie du recollement des extrémités et leur formation est accompagnée d'une double délétion (Figure n°6). La première cassure se produit sur le bras court (p), la seconde sur le bras long (q), puis ces deux extrémités du fragment centrique restant fusionnent afin de former un anneau, lequel est constitué d'ADN du bras p et q (Baldwin *et al.*, 2008).

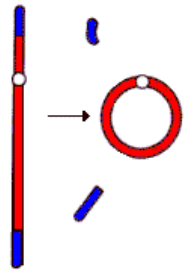


Figure n°6 : Formation d'un chromosome en anneau par double cassure, recollement des extrémités, accompagné d'une double délétion

Cependant, plusieurs explications sont possibles pour la formation des petits MCS non-néocentriques en anneau (Liehr *et al*., 2004).

Le second mécanisme de formation de MCS en anneau décrit (Baldwin *et al.*, 2008) consiste en une première cassure au niveau du centromère et une seconde cassure au niveau du bras court ou au niveau du bras long du chromosome (Figure n°7).

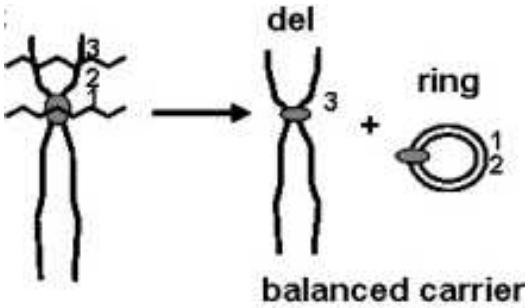


Figure n°7 : Formation d'un chromosome en anneau par délétion d'une partie du chromosome (d'après Baldwin *et al.*, 2008)

Le troisième mécanisme a été décrit pour les cas avec MCS(18) et MCS(X) en anneau : dans ce cas les MCS en anneau sont associés avec un réarrangement chromosomique complexe (Stankiewicz *et al.*, 2001 ; Figure n°8). Une cassure chromosomique peut conduire à la formation d'un isodicentrique dans un premier temps, puis, dans un deuxième temps, des phénomènes délétionnels sur les bras longs et courts vont engendrer la formation de l'anneau.

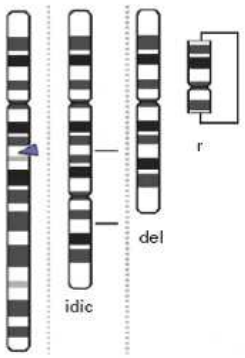


Figure n°8: Formation d'un chromosome en anneau par réarrangement chromosomique complexe (d'après Liehr *et al*., 2004)

Un quatrième mécanisme est proposé : il s'agit d'une inversion-duplication avec la réunion en U entre chromatides sœurs cassées (Figure n°9).

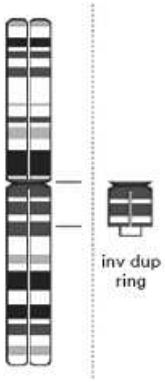


Figure n°9 : Formation d'un chromosome en anneau par réunion de chromatides sœurs cassées (d'après Liehr *et al*., 2004)

Enfin, la formation en anneau peut débuter avec un chromosome minute (Figure n°10). Cependant certains chromosomes en anneau restent inexpliqués par les théories précédentes.

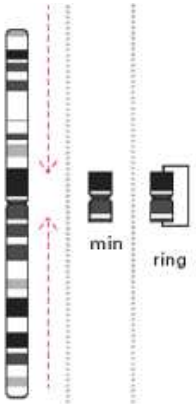


Figure n°10: Formation d'un chromosome en anneau à partir d'un chromosome minute (d'après Liehr *et al*., 2004)

Ces réarrangements n'ont pas de conséquence phénotypique si aucune information génétique essentielle n'est perdue.

Toute structure en anneau est instable du fait des remaniements qui s'y produisent au cours des mitoses successives. Des cas de chromosomes en anneau ont été rapportés pour toutes les paires chromosomiques, cependant, ceux impliquant les chromosomes 13 et 18 sont les plus fréquents. Les chromosomes en anneau, dérivés des chromosomes 4, 5, 13 ou 18, sont particulièrement recherchés en diagnostic prénatal (Wolstenholme et Burn, 1992).

Le symbole à utiliser pour désigner un anneau, selon l'ICSN, est « r » pour ring chromosome.

1.2.3.3. Chromosome minute

Il s'agit d'un très petit chromosome ou partie de chromosome avec un centromère contenant de l'ADN alpha satellite. Ce sont des marqueurs avec des régions péricentromériques sans rattachement des deux extrémités, mais qui n'ont pas de télomères (Cotter *et al.*, 2005).

La formation résulterait d'une dégradation des télomères vers le centromère d'une grande partie du chromosome (Liehr *et al.*, 2004 ; Figure n°11).

Le symbole à utiliser pour désigner un chromosome minute, selon l'ICSN, est « min ». Il est alors défini comme un fragment acentrique et plus petit que la largeur d'une chromatide.

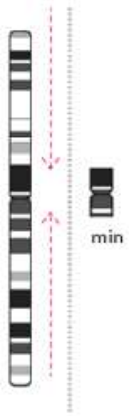


Figure n°11 : Formation d'un chromosome minute par dégradation du chromosome (comme l'indique les flèches)(d'après Liehr *et al.*, 2004)

1.2.3.4. MCS avec néocentromère ou MCS néocentromérique

Ces dernières années, une augmentation du nombre de MCS a été rapportée avec une structure de type centromérique mais ne contenant pas d'ADN alpha-satellite (MCS néocentromérique).

Beaucoup de MCS néocentromériques rapportés dans la littérature (Liehr *et al.*, 2004) sont de petits isochromosomes.

Le développement de la majorité des MCS néocentromériques est basé sur un échange de type U. Le fragment acentrique créé pendant l'échange de type U est dans ce cas inclus dans le gamète. Un néocentromère est activé et le fragment chromosomique ainsi constitué est transmis au cours des cycles cellulaires de manière à peu près stable. Cette théorie est fondée sur une observation : la fréquence des « inversion-duplication » du chromosome 15 est semblable à celle observée pour les chromosomes 15 néocentromérique (Voullaire *et al.*, 2001 ; Figure n°5). Comme le montre la figure n°12, 11 des 18 cas de MCS dérivant de chromosomes acrocentriques avec un néocentromère (60%) dérivent du chromosome 15. De plus, la moitié des patients porteurs d'un MCS présente des MCS acrocentriques dont 60% sont des « inversion duplication » du chromosome 15 (Figure n°13).

Une conformation en anneau est décrite pour les MCS (1) (Slater *et al.*, 1999), MCS(2) (Choo, 1997), MCS(4) (Grimbacher *et al.*, 1999) et le MCS (13) néocentromérique. Le mécanisme de formation du chromosome en anneau est schématisé par la figure n°7. Une partie du chromosome est excisé par un mécanisme inconnu créant un chromosome néocentromérique.

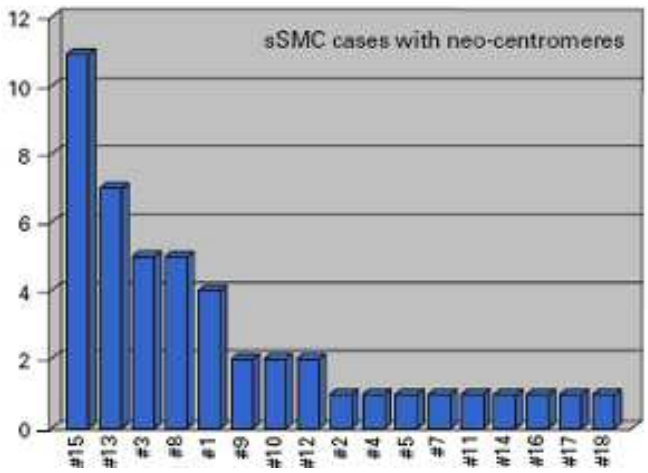


Figure n°12: 47 cas avec un MCS néocentromérique sont rapportés dans la littérature. Leur répartition est montrée ici en fonction de leur origine chromosomique (d'après Liehr *et al.*, 2004).

1.2.4. Les conséquences cliniques des marqueurs

Une revue de la littérature réalisée par Liehr *et al*. (2004) montre que le MCS peut être associé à des signes cliniques pouvant constituer un syndrome particulier comme le Cat Eye Syndrome, l'inversion duplication du chromosome 15 ou encore le syndrome de Pallister-Killian (Figure n°13).

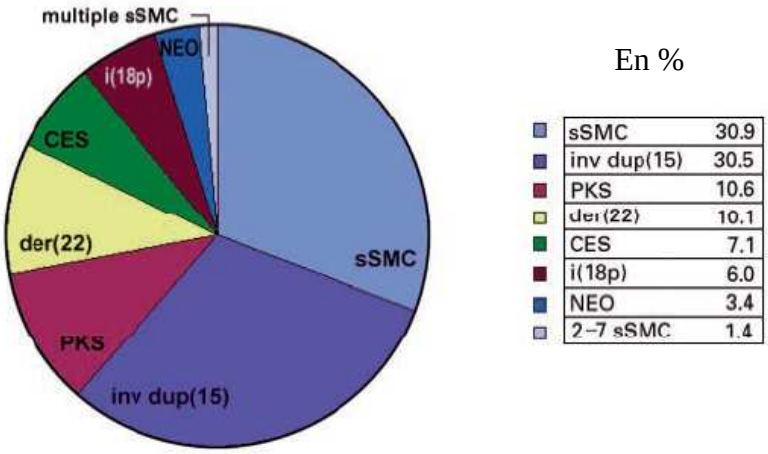


Figure n°13 : Résultats de la revue de la littérature (Liehr *et al*., 2004) montrant l'origine chromosomique de 1 396 cas de MCS
(MCS non corrélés à un syndrome clinique (sSMC), syndrome de Pallister-Killian (PKS), isochromosome 18 (i(18p)), syndrome de Cat Eye (CES), syndrome d'Emanuel (der(22)) et MCS néocentromérique (NEO)).

Les MCS ont été décrits à partir de tous les chromosomes humains (soit les 24) avec différentes tailles et formes. Cependant, il est difficile de prévoir les manifestations cliniques associées à un MCS car plusieurs facteurs entrent en jeu : la taille, la présence de matériel euchromatique, le degré de mosaïcisme et/ou la présence d'une disomie uniparentale (DUP) associée.

1.2.5. MCS associés à un phénotype décrit

1.2.5.1. Cat eye syndrome

Historique

Le syndrome de « cat-eye » ou CES (Cat Eye Syndrome) a été décrit au niveau clinique pour la première fois en 1965 par Schachenmann. Sept ans plus tard au niveau cytogénétique, Buhler *et al* (Buhler *et al*., 1972) expose le premier cas de trisomie partielle de la région 22pter→q11 en relation avec le CES. Ultérieurement, il a été montré que le

syndrome de CES était secondaire à une tétrasomie 22q proximale et non une trisomie. Aujourd'hui, plus de 150 cas sont rapportés (http://www.med.unijena.de).

Clinique

Le CES se caractérise par une hétérogénéité clinique importante. Seulement 41% des patients présentent la triade classique : atrésie anale, colobome irien (dont l'aspect évoque la forme de la pupille du chat donnant ainsi le nom au syndrome) et des anomalies pré-auriculaires (sinus ou tubercules prétragiens).

Les patients ont un développement intellectuel normal ou subnormal dans 44% des cas. Dans 48% des cas, un retard mental modéré est observé et dans 7% des cas, le retard mental est sévère (Hastings *et al*., 1999 ; Rosias *et al*., 2001). Ce retard est sans corrélation avec la présence de malformations, le degré de mosaïcisme ou la taille de la duplication.

Les patients porteurs de marqueurs du chromosome 22 ne contenant pas d'euchromatine ne présentent pas un phénotype anormal.

D'autres anomalies peuvent être observées comme une cardiopathie, des anomalies du tractus urinaire ou du squelette (Bartsch *et al*., 2005).

Caractéristiques cytogénétiques

La prévalence du CES dans la population générale est estimée à 1 / 74 000.

Dans 5 cas sur 6, le caryotype montre la présence d'un petit chromosome surnuméraire dérivé du chromosome 22 (trisomie/tétrasomie 22 proximale). Ce marqueur, le plus souvent dicentrique, porteur de satellites et en mosaïque, correspond à la duplication inversée de la partie proximale d'un chromosome 22. La duplication inversée du chromosome 22 survient *de novo* et la transmission est possible par le père ou la mère, avec un risque de transmission à la descendance de 50%.

Trois types de CES sont décrits en fonction de la localisation du point final du point de cassure distal (Belien *et al*., 2008 ; Figure n°14 et n°15) :

- Le CES de type I : le plus fréquent, consiste en un marqueur surnuméraire bisatellisé, avec deux points de cassure au niveau du LCR 22A (ou LCR22-2),
- Le CES de type IIa : rare, consiste en un MCS bisatellisé symétrique, avec des points de cassure au niveau des LCR 22D (ou LCR22-4),
- Le CES de type IIB : plus rare, consiste en un MCS bisatellisé asymétrique, avec un point de cassure au niveau du LCR 22A et un point de cassure au

niveau du LCR 22D, générant la présence d'une région 22q en trisomie (entre les LCR 22A et 22D) et une autre en tétrasomie.

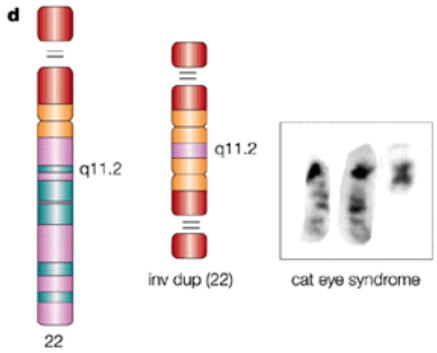


Figure n°14 : MCS dérivé du chromosome 22 responsable du CES

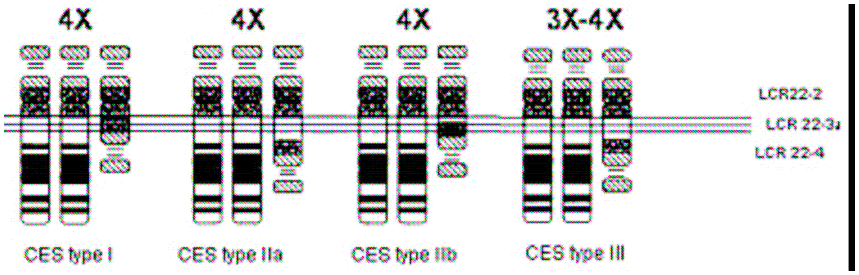


Figure n°15 : Les différents types du CES (d'après Belien *et al*., 2008)

Méthode de diagnostic

Le diagnostic prénatal est possible par la réalisation d'un caryotype et par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) des prélèvements foetaux.

Traitement

Un traitement chirurgical est nécessaire en cas d'atrésie anale ou de malformations cardiaques sévères.

L'espérance de vie est proche de la normale pour les patients légèrement ou modérément atteints, mais les rares cas présentant des malformations multiples et sévères décèdent au cours de l'enfance.

1.2.5.2. L'inversion duplication du chromosome 15 ou inv dup(15)

Epidémiologie

L'inversion duplication 15q11 ou le chromosome 15 isodicentrique (inv dup(15) ou idic(15)) est rapporté avec une fréquence de 30,5% parmi 1396 cas porteurs d'un MCS (Liehr *et al*., 2004). Ainsi, cette anomalie est la plus fréquente des MCS. L'incidence à la naissance est estimée à 1/30 000 avec un sex ratio d'environ 1:1.

Clinique

La présence d'un tel MCS est généralement associée à un phénotype anormal : hypotonie centrale, retard mental, retard de développement, crises d'épilepsie de sévérité et de fréquence variables (début entre 6 mois et 9 ans), troubles du comportement de type autistique (Battaglia *et al*., 2008). La fréquence des signes cliniques observés dans ce syndrome est rapportée dans le tableau III

>75%	**Entre 25% et 75%**	**<25%**
Hypotonie, ligaments lâches	Anomalie du cerveau	Anomalie cardiaque congénitale
Retard développement,	Anomalie tractus génito-urinaire	microcéphalie
Comportement autistique	Retard de croissance	
Epilepsie		
dysmorphie faciale mineure		

Tableau III : Fréquence des principaux signes cliniques de l'inversion duplication du chromosome 15.

Caractéristiques cytogénétiques

L'inversion duplication du chromosome 15 est responsable d'une tétrasomie 15p et une tétrasomie 15q partielle. Elle peut contenir la région du syndrome de Prader-Willi/ Angelman. La région chromosomique 15q11q13 est connue pour son instabilité en raison de la présence d'éléments d'ADN répétés (Donlon *et al*., 1986 ; Christian *et al*., 1999).

Plusieurs réarrangements peuvent survenir au niveau de cette région soumise à empreinte : des délétions associées soit au syndrome de Prader-Willi (PWS), soit au syndrome d'Angelman (AS), selon l'origine parentale ; des translocations ; des inversions et des MCS formés par un mécanisme d'inversion duplication d'une partie du chromosome 15. Les

duplications interstitielles, triplications et translocations réciproques équilibrées sont beaucoup moins fréquentes.

Deux types de MCS avec inv dup(15) sont décrits :

- Des chromosomes métacentriques ou submétacentriques et hétérochromatiques, ne contenant pas la région critique PWS/AS. Il s'agit dans ce cas de idic(15)(q11). Ce MCS peut être familial ou *de novo*, et est le plus fréquent des MCS (30,5% des MCS). Le phénotype est le plus souvent normal (Cheng *et al*., 1994).
- Une inv dup(15) de plus grande taille (plus grande qu'un chromosome du groupe G) contenant de l'euchromatine 15q. La région critique PWS/AS est incluse et est décrite par dic(15)(q12 ou q13). La grande majorité de ces derniers dérivent des deux chromosomes maternels lors de la méiose et sont généralement liés à l'augmentation de l'âge maternel lors de la conception (correction de trisomies).

Cinq points de cassures (BP) récurrents sont décrits et beaucoup d'idic(15) sont issus de recombinaisons BP3:BP3 ou BP4:BP5. Le fragment de 4Mb contenant la région PWS/ASCR est compris entre BP2 et BP3 (Figure n°17). L'idic(15) le plus fréquemment rencontré est caractérisé par la recombinaison asymétrique entre BP4 et BP5. Cela conduit à une tétrasomie pour les régions génomiques comprises entre le centromère et BP4 et une trisomie entre BP4 et BP5.

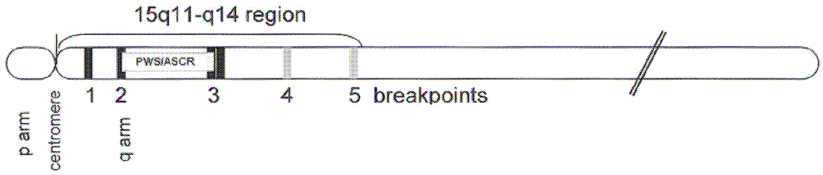


Figure n°16 : Représentation schématique du chromosome 15, montrant les 5 points de cassure, et le segment d'environ 4Mb comprenant la région critique PWS/AS (D'après Battaglia *et al*., 2008).

1.2.6. MCS et DUP

La disomie uniparentale (DUP) intervient lorsque deux chromosomes d'une même paire proviennent d'un même parent. Elle peut quelquefois être partielle, n'intéressant qu'une région chromosomique.

Selon le mode de formation, les deux chromosomes peuvent être génétiquement identiques (isodisomie) ou différents (hétérodisomie) ce qui complique la situation. Du fait des échanges méiotiques, il coexiste souvent des régions d'iso et d'hétérodisomie. Une disomie uniparentale peut n'avoir aucune conséquence phénotypique, mais peut aussi révéler une maladie récessive rare (en cas d'isodisomie) ou une pathologie liée au phénomène d'empreinte parentale, comme dans certains cas de syndrome de Prader-Willi ou d'Angelman.

Un certain nombre de cas de porteurs de MCS avec une DUP sont rapportés dans la littérature (Kotzot, 2002 ; Shaffer *et al*., 2001, Starke *et al*., 2003).

DUP	publications
MCS(15)	Robinson *et al*., 1993; Cheng *et al*., 1994; Bettio *et al*., 1996; Mignon *et al*., 1996; Roberts *et al*., 2002
MCS(1)	Röthlisberger *et al*., 2001; Finelli *et al*., 2001
MCS(7)	Miyoshi *et al*., 1999
MCS(4)	Starke *et al*., 2003
MCS(6)	James *et al*., 1995
MCS(9)	Anderlid *et al*., 2001
MCS(10)	Schlegel *et al*., 2002
MCS(11)	Starke *et al*., 2003
MCS(12)	Von Eggeling *et al*., 2002
MCS(20)	Chudoba *et al*., 1999
MCS(22)	Bartels *et al*., 2003

Tableau IV : Revue de littérature de quelques cas de MCS avec DUP
(d'après Liehr *et al*., 2004)

Prédire les effets de la DUP sur le phénotype est complexe car trois facteurs indépendants sont impliqués (Ledbetter et Engel, 1995) :

- Les effets de la trisomie sur le placenta ou le fœtus,
- La présence d'une maladie récessive autosomique en cas d'isodisomie,
- Les effets des gènes soumis à l'empreinte parentale de certains chromosomes (6, 7, 11, 14, 15 et 20).

Des phénotypes anormaux associés à une disomie uniparentale ont été observés entre autre, dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (DUP11p paternel), le syndrome d'Angelman (DUP15 paternel), le syndrome de Prader-Willi (DUP15 maternel), et le diabète transitoire du nouveau-né (DUP6). Plusieurs publications rapportent des cas de MCS avec DUP (Tableau IV).

1.2.7. Trouble de la fertilité

Une corrélation entre la présence d'un MCS et d'une infertilité est grandement suspectée. Plusieurs études rapportent une incidence élevée de patients porteurs de MCS parmi les hommes infertiles avec un phénotype normal (Pandiyan *et al*., 1996 ; Testart *et al*., 1996 ; Wang *et al*., 2009).

Le taux de MCS présent dans la population générale a récemment été déterminé et atteint 0,044%. Celui-ci s'élève à 0,125% dans les groupes infertiles. Par ailleurs, une différence est observée entre les hommes (0,165%) et les femmes (0,022%) infertiles (Liehr *et al*., 2007 ; Figure n°17).

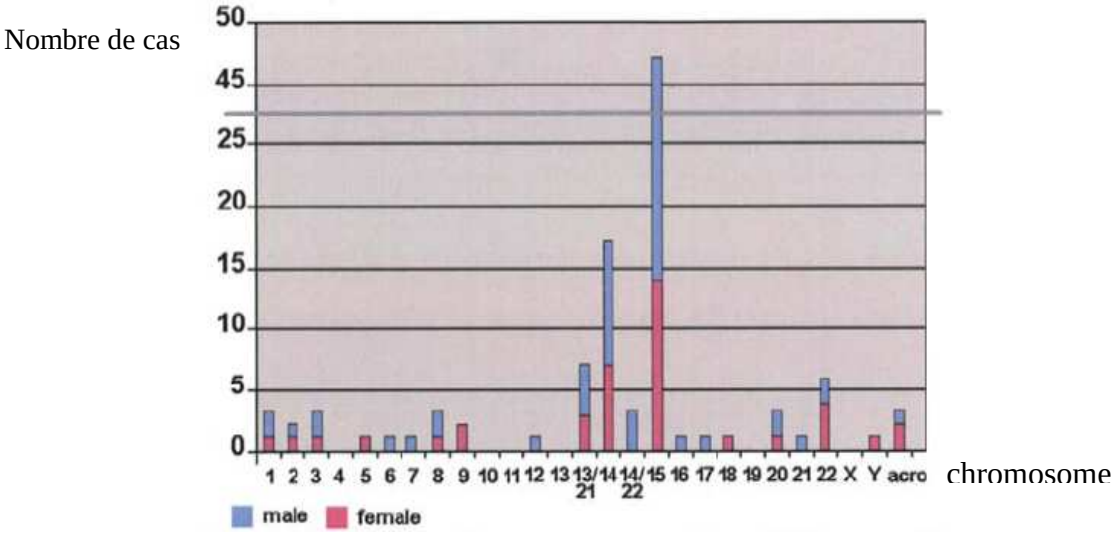


Figure n°17 : Distribution chromosomique des MCS chez les patients infertiles en fonction du sexe (d'après Manvelyan *et al*., 2008)

Le MCS(15) est plus spécifiquement rapporté chez les hommes infertiles avec oligo- ou azoospermie. C'est pourquoi le sperme des hommes infertiles porteur du MCS dérivé du chromosome 15 a été préférentiellement étudié.

L'analyse de patients avec une MCS(15) montre que 82,7% des spermatozoïdes sont unisomiques, 17% sont disomiques et 0,3% sont trisomiques pour le chromosome 15 (Eggermann *et al*., 2002) . Une étude de la ségrégation méiotique montre que la fréquence d'aneuploïdie est significativement plus élevée, au cours de la gamétogenèse, chez les patients avec un MCS (Martin *et al*., 1986). Le MCS, même sans euchromatine, pourrait donc avoir un rôle dans l'infertilité masculine en affectant le processus de la gamétogenèse lors de la méiose I et en augmentant le taux de non-disjonctions méiotiques.

Lorsque les patients infertiles sont porteurs d'un MCS, celui-ci est originaire d'un chromosome acrocentrique dans 88% des cas et ils proviennent des chromosomes 15 ou 14 dans 60% des cas (Manvelyan *et al*., 2008 ; Figure n°17 et 18).

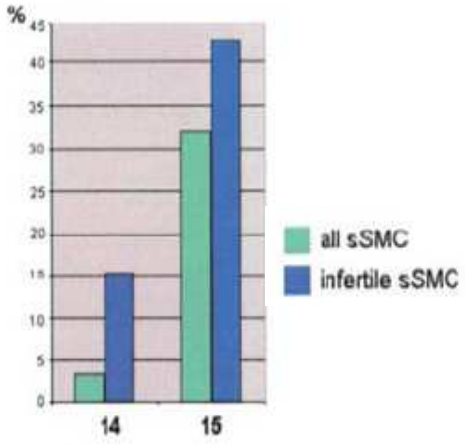


Figure n°18 : Pourcentage de MCS(14) et de MCS(15) chez les porteurs de MCS dans la population générale et les patients infertiles (d'après Manvelyan *et al*., 2008).

Le taux de MCS(14) dans le groupe des patients infertiles est environ 4 fois plus élevé que pour l'ensemble des cas de MCS étudiés. Aucune hypothèse n'a été proposée pour expliquer cette observation.

Les patients infertiles peuvent être divisés en 4 groupes (Figure n°19a):

i) Syndrome oligoasthénoteratozoospermique (OAT),

ii) Aménorrhée,

iii) Avortements répétés (RAB),

iv) Infertilité inexpliquée (FP).

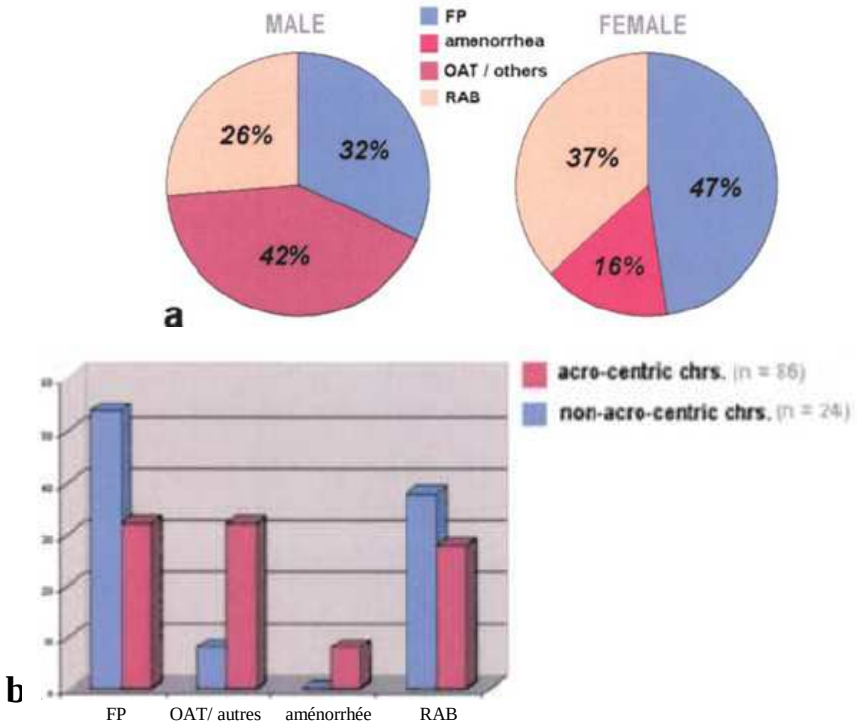


Figure n°19 : Distribution des différentes causes d'infertilité chez 111 patients avec MCS, présenté selon le sexe du patient porteur (a) et l'origine chromosomique (b) (d'après Manvelyan *et al*., 2008).

Les aménorrhées et les OAT apparaissent plus souvent quand le MCS est d'origine acrocentrique (Figure n°19b). Etonnement, 53% des porteurs de MCS infertiles sont hérités, avec une transmission préférentiellement maternelle (Figure n°20).

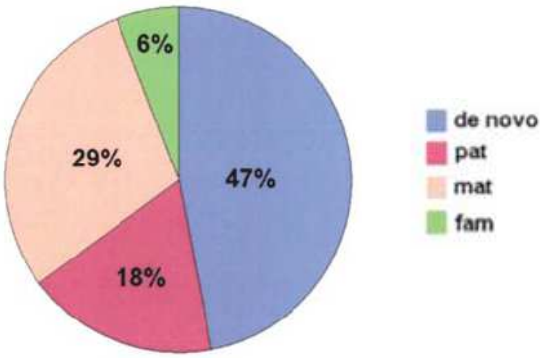


Figure n°20 : Origine parentale de MCS (d'après Manvelyan *et al*., 2008).

Enfin, les MCS hérités semblent plus fréquemment associés aux avortements répétés ou aux OAT que les MCS *de novo* (Figure n°21).

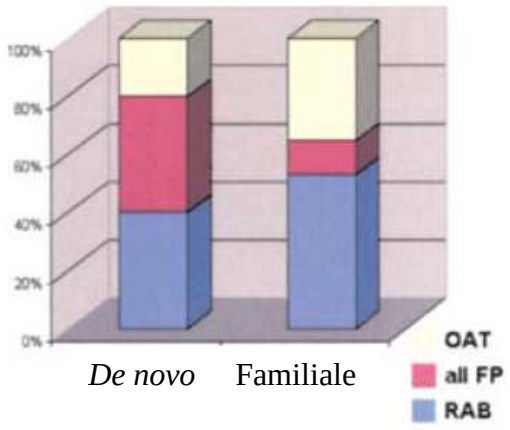


Figure n°21 : Comparaison entre l'origine familiale et *de novo* des MCSs en fonction des indications cliniques (d'après Manvelyan *et al*., 2008).

1.2.8. <u>Absence d'anomalie du phénotype</u>

Il est bien établi que dans 2 cas sur 3, les MCS sont dérivés de chromosomes acrocentriques. Presque 70% de ces derniers sont des « inversions duplications », dicentriques, ne possédant pas d'euchromatine et pouvant être transmis sur plusieurs générations. Dans ces cas, le MCS le plus fréquent est le MCS dérivé du chromosome 15 : 50% des porteurs sont cliniquement sains. L'absence d'euchromatine chez certains MCS, donc de zones actives transcriptionnellement, explique l'absence d'anomalie phénotypique parmi les porteurs.

1.3. Historique des différentes stratégies pour l'identification des MCS

Afin de déterminer l'origine et la composition d'un MCS, plusieurs techniques sont disponibles allant des techniques conventionnelles aux techniques de cytogénétique moléculaire les plus avancées comme la FISH mutlicouleurs ou la CGH-*array*.

Avant d'aborder les techniques moléculaires, nous passerons en revue les différentes techniques de cytogénétique conventionnelle.

1.3.1. Cytogénétique conventionnelle

Le caryogramme permet l'observation et la classification des chromosomes présents au cours de la métaphase ou de la prométaphase. La résolution de la cytogénétique classique est celle de la microscopie photonique, limitée à 5 mégabases.

Différentes techniques de marquage en bandes permettent d'identifier les chromosomes avec certitude et de détecter des anomalies fines de la structure chromosomique. Après coloration, ces traitements font apparaître le long des chromosomes, de façon reproductible d'une métaphase à l'autre, une alternance de bandes claires (peu colorées) et sombres (fortement colorées). La disposition topographique de ces bandes est caractéristique d'un chromosome donné. Elle est identique sur les 2 chromatides soeurs et sur les deux chromosomes homologues. Le nombre de bandes observables pour l'ensemble des chromosomes varie d'environ 300 à 450, jusqu'à 800 par lot haploide.

Plusieurs techniques de marquage en bandes des chromosomes sont utilisées dans les laboratoires de cytogénétique. Ces techniques sont apparues dans les années 70. Les bandes Q ont constitué la première méthode de coloration utilisée pour produire des schémas de bandes spécifiques. La coloration est réalisée par la moutarde de Quinacrine avec observation au microscope à fluorescence (Caspersson *et al*., 1970). Les bandes G (coloration au Giemsa) et les bandes R (schéma inverse des bandes G) ont ensuite été décrites en 1971 par, respectivement, Seabright (Seabright, 1971) et Dutrilleux et Lejeune (Dutrilleux et Lejeune, 1971). En 1973, Dutrilleux met au point les bandes T (coloration des extrémités des télomères) puis Bloom *et al*, la coloration des NOR (*nucleolar organizing region*) en 1976 (Bloom et Goodpasture, 1976). La même année, Yunis met au point une technique de marquage haute résolution des chromosomes en prométaphase avec le Bromo-desoxy-uridine ou BrdU (Yunis *et al*., 1976).

Les deux principales techniques de marquage en bandes des chromosomes utilisées en routine sont:

- ✓ **Les bandes G** obtenues par dénaturation enzymatique, avec de la trypsine, des chromosomes. La trypsine digère les protéines et permet l'apparition après coloration au Giemsa d'une succession de bandes permettant de classer et d'analyser les chromosomes. Les bandes G marquent des régions d'ADN riches en liaison A-T et correspondent à des centres de condensation précoces pauvres en gènes actifs et en séquences *Alu* (Figure n°22).

- ✓ **Les bandes R** obtenues par dénaturation thermique des chromosomes. Les bandes R marquent des régions d'ADN riches en liaison G-C correspondant à des régions riches en gènes actifs et en séquences *Alu* (Figure n°23).

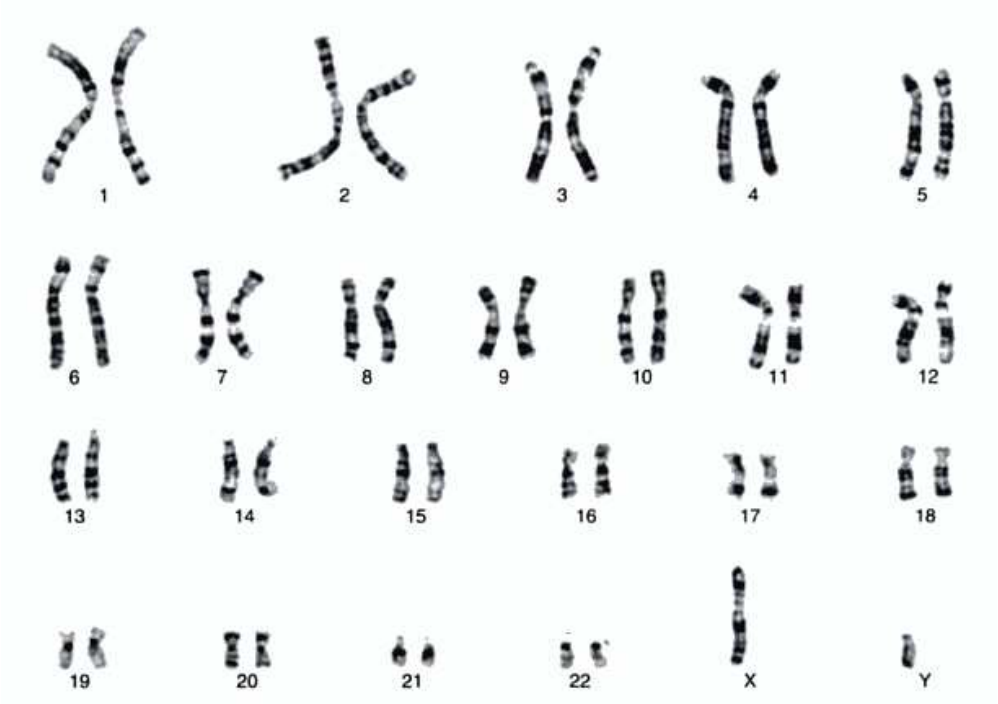


Figure n°22 : Caryogramme 46,XY en bandes G (résolution 400 bandes)

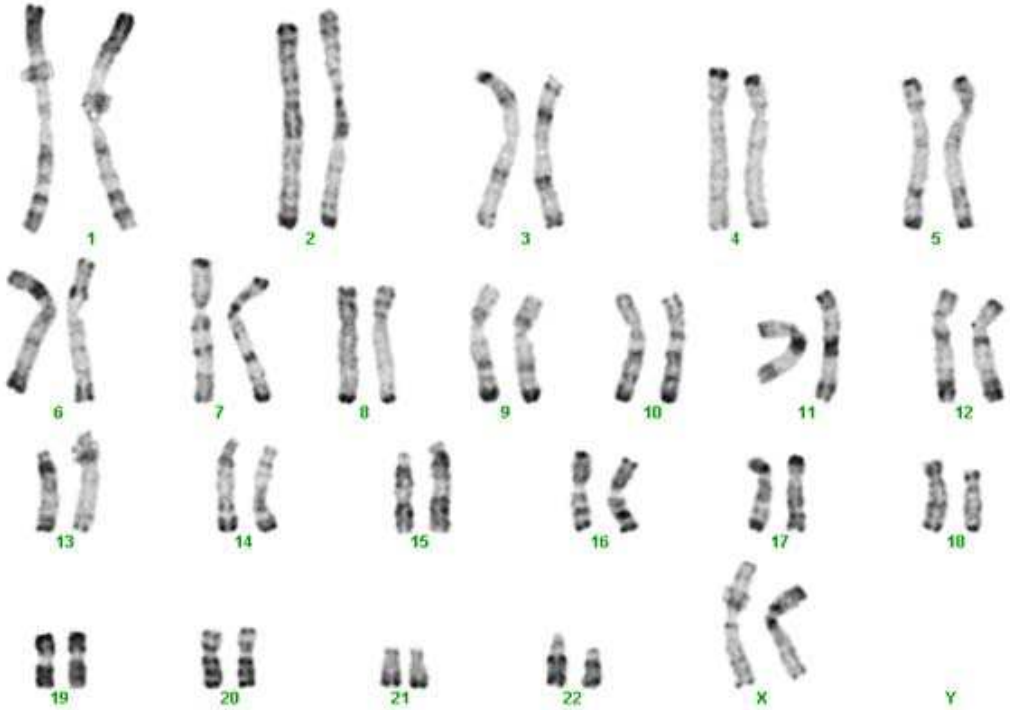


Figure n°23 : Caryogramme 46,XX en bandes R (résolution 450 bandes)

Il existe par ailleurs d'autres techniques de marquage complémentaires qui permettent d'analyser certaines régions particulières du génome :

- ✓ **Les bandes C** qui, par coloration au sulfate de Baryum, mettent en évidence l'hétérochromatine constitutive (1, 9, 16, Y). Elles correspondent à des régions non codantes du génome comme les régions centromériques (Arrighi et Hsu, 1971).
- ✓ **Les bandes Q,** superposables aux bandes G, colorent intensément la partie distale, hétérochromatique, des bras longs de l'Y, certains centromères et certains bras courts des acrocentriques (Caspersson *et al*., 1970).
- ✓ **Les NOR** qui, par dépôt de nitrate d'argent, mettent en évidence les organisateurs nucléolaires. Ces structures correspondent aux régions du génome contenant les gènes qui codent pour les ribosomes (Bloom et Goodpasture, 1976).

Ces techniques de cytogénétique conventionnelle sont efficaces pour repérer les anomalies de nombre ainsi que certains remaniements de structure avec un niveau de résolution maximum de cinq mégabases. La réalisation d'un caryotype est donc la technique de référence pour détecter un MCS, mais elle est souvent insuffisante pour identifier l'origine chromosomique dont il dérive. L'identification d'un MCS requiert souvent l'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire. Néanmoins, le banding obtenu sur des MCS de grande taille (exemple : isochromosomes 9p ou 12p) ou la présence de satellites permet d'orienter fortement les explorations complémentaires en cytogénétique moléculaire.

1.3.2. Hybridation *in situ* en Fluorescence (FISH)

Les anomalies chromosomiques d'une taille inférieure à 5 Mb, ou les réarrangements complexes, sont très difficiles à identifier avec les techniques de bandes conventionnelles. Les techniques modernes de cytogénétique moléculaire, basées sur la FISH et qui combinent la cytogénétique conventionnelle avec la génétique moléculaire, tentent de palier à cette limite.

A la fin des années 80, le développement technologique et l'augmentation de la sensibilité des anticorps ont facilité le développement rapide des méthodes basées sur l'hybridation *in situ* en fluorescence, permettant ainsi l'étude des cellules en interphase et une caractérisation plus précise des anomalies chromosomiques.

Le principe général de la FISH est illustré par la figure n°24. Les techniques d'hybridation *in situ* sont fondées sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. Une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué) en solution peut hybrider spécifiquement avec sa séquence cible (préparation chromosomique dénaturée) grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. La sonde s'apparie par des liaisons hydrogène établies selon les critères de Watson et Crick. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par lavages, puis les hybrides spécifiques sont révélés, en général par fluorescence directe. Enfin, l'observation s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence.

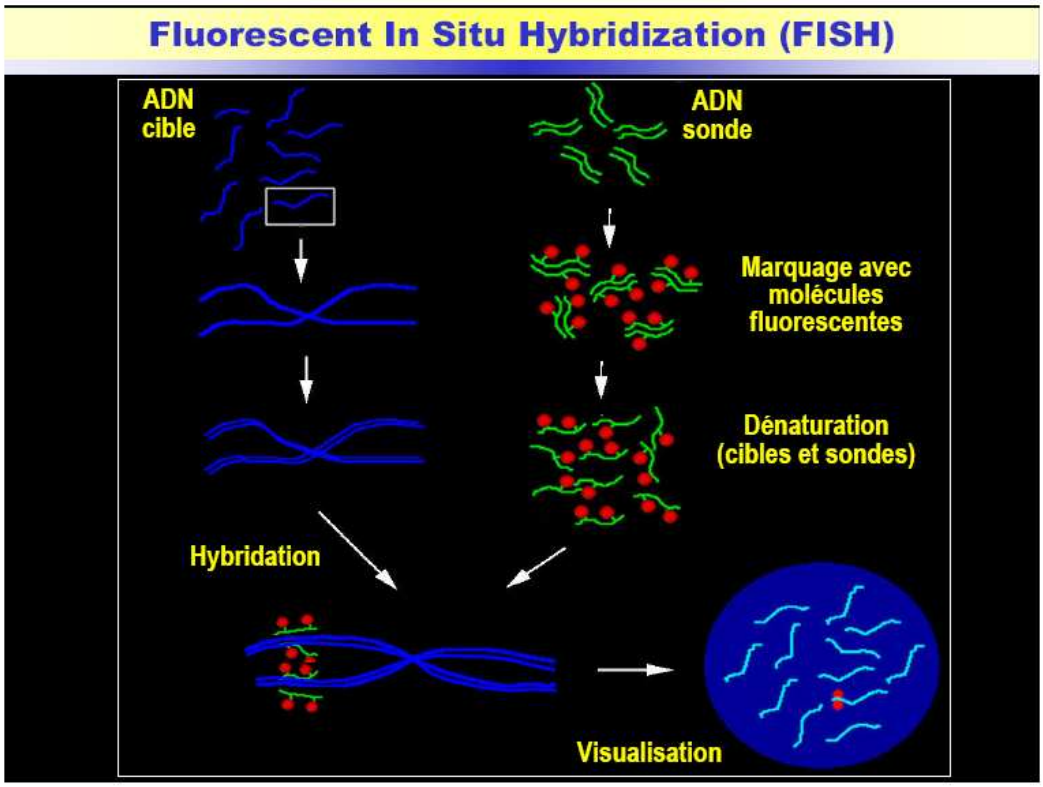


Figure n°24 : Principe de l'Hybridation *in situ* en Fluorescence

1.3.2.1. Techniques ciblées ou FISH conventionnelle

On distingue quatre types de sondes en FISH conventionnelle, en fonction des structures capables d'être identifiées dans les noyaux cellulaires ou sur métaphases : les sondes spécifiques d'un gène ou d'un locus, les sondes centromériques, les sondes subtélomériques et les sondes de peintures chromosomiques.

A l'heure actuelle, un grand nombre de sondes commerciales sont disponibles, permettant toutes un résultat rapide et fiable pour caractériser des anomalies chromosomiques.

1.3.2.1.1. WCP FISH

Les sondes WCP (*Whole Chromosome Painting*) sont des sondes complexes d'ADN, générées, par exemple, à partir de microfragments des chromosomes, puis amplifiées par DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primer – Polymerase Chain Reaction*). Ces sondes identifient et hybrident avec de multiples séquences du chromosome. Ainsi, après l'hybridation, la peinture apparaît uniforme sur tout le chromosome. Elles sont utilisées pour détecter des translocations difficiles à identifier avec les techniques de cytogénétique conventionnelle mais aussi pour identifier l'origine d'un matériel additionnel présent sur un dérivé chromosomique ou d'un MCS.

Les principaux inconvénients de l'utilisation de ces sondes sont l'indétectabilité des inversions paracentriques et leur niveau de résolution qui empêche la détection de remaniements chromosomiques inférieurs à 2-3 Mb.

1.3.2.1.2. Sondes centromériques spécifiques (CEP)

Les sondes CEP (*Chromosome enumeration probe*) identifient les régions centromériques, lesquels sont pratiquement identiques pour tous les chromosomes. Cependant, ces régions se différencient par 2-3% de leur séquence, permettant ainsi de distinguer les centromères individuellement, à l'exception des chromosomes 13 et 21.

Elles permettent de détecter les chromosomes et d'identifier des anomalies de type numérique, notamment les monosomies, les trisomies et autres aneuploïdies en métaphase, mais également en interphase.

1.3.2.1.3. Sondes locus spécifiques

Les sondes locus spécifiques hybrident avec une séquence unique d'ADN, c'est-à-dire qu'elles sont spécifiques d'un locus déterminé. Les sondes de séquence unique permettent de détecter les réarrangements de structures de gènes ou de régions chromosomiques et d'identifier des délétions et des duplications submicroscopiques jusqu'à 3Mb (Ledbetter et Ballabio, 1995). Néanmoins, leur utilisation requiert de connaître à priori la région à étudier.

Donc, ces sondes permettent la mise en évidence rapide des microdélétions, microduplications, translocations, inversions au niveau d'une région précise. De plus, elles peuvent nous renseigner sur la constitution d'un MCS, par exemple en mettant en évidence le locus SNRPN sur un MCS(15).

1.3.2.1.4. Sondes subtélomériques

Les sondes subtélomériques sont des sondes d'ADN qui identifient les régions chromosomiques proches des télomères contenant des séquences uniques spécifiques de chaque chromosome. La taille de la sonde varie entre 30 et 100Kb. Il s'agit d'un outil très utile pour détecter de nombreuses anomalies chromosomiques impliquant les régions subtélomériques (Flint et Knight, 2003).

Les techniques ciblées précédemment présentées ne permettent pas d'explorer l'ensemble des chromosomes simultanément. Aussi, en l'absence d'orientation clinique ou cytogénétique, des techniques d'approche plus globale peuvent être envisagées.

1.3.2.2 Les techniques de FISH 24-couleurs

La technique de cytogénétique moléculaire FISH multiplex (M-FISH) utilise simultanément un mélange de 24 sondes de peinture chromosomique qui hybrident spécifiquement tous les chromosomes sur une même métaphase, permettant une identification des 22 paires d'autosomes homologues et la paire de gonosome (Speicher *et al*., 1996). Le résultat obtenu est un caryotype en couleur qui permet la détection et la classification, de manière rapide, des anomalies de nombre et de structures interchromosomiques.

Le mélange de sondes de 24 couleurs utilisé est habituellement commercial. Par exemple, Metasystem® a mis au point un kit commercial (24XCyte Human Multicolor FISH Probe Kit) donnant d'excellents résultats avec les préparations de lymphocytes, moelle osseuse et cellules cultivées. Pour l'obtention de ces mélanges, il faut suivre un protocole spécifique pour extraire et marquer l'ADN. Une fois l'ADN obtenu, le marquage est réalisé avec une grande variété de fluorochromes par différentes méthodes (*nick translation, DOP-PCR ou random primer*). La M-FISH utilise 24 sondes marquées par cinq fluorochromes différents utilisés séparément ou en combinaison de deux ou trois. Chaque paire chromosomique possède une combinaison de couleurs caractéristiques (Figure n°25).

La technique de M-FISH améliore l'efficacité des autres techniques de FISH conventionnelle puisqu'elle permet la visualisation de toutes les sondes de peinture chromosomique sur une même métaphase, simultanément, et avec une hybridation unique. L'analyse est ainsi plus rapide et requiert moins de quantité en échantillon. Cette technique permet l'identification rapide de translocations, d'insertions cryptiques plus ou moins complexes, d'aneusomies et des MCS.

Parallèlement, Schröck *et al*., (1996) ont développé une méthode similaire à la M-FISH, qui permet d'obtenir un caryotype spectral (*Spectral Karyotyping, SKY*).

Les deux techniques ont une résolution d'environ 1Mb (Schröck *et al*., 1996 ; Jalal et Law, 1999).

La différence entre les deux techniques réside sur le mode d'acquisition et d'analyse des images. Tandis que la M-FISH utilise un filtre optique spécifique pour la capture de chaque fluorochrome, le SKY utilise un interféromètre, réalisant une interprétation basée sur un spectre généré au niveau de chaque pixel. Le spectre est ensuite transformé en une pseudo-couleur permettant la réalisation d'un caryotype spectral.

Dans la technique de M-FISH, il y a une analyse digitale des images acquises séparément pour chacun des cinq fluorochromes au moyen d'une caméra CCD (*Charge Couple Device*). Ces images sont ensuite analysées par un logiciel spécifique, générant une image composée, dans laquelle chaque chromosome est pseudocoloré en fonction de sa combinaison de fluorochromes.

Dans la technique SKY, l'analyse nécessite une caméra CCD couplée à la spectroscopie de Fourier. Un interféromètre émet un spectre fluorescent suivant la longueur d'onde de chaque pixel, le long de chaque chromosome, puis un logiciel applique une classification algorithmique afin d'obtenir l'image des 24 chromosomes pseudocolorés.

Ces techniques ont donc le grand avantage de combiner la sensibilité de la FISH avec une vision globale des anomalies chromosomiques présentes, dans une expérience unique. Cependant, ces méthodes ne permettent pas la mise en évidence de microdélétions, insertions et translocations de petites tailles (inférieures à 500-1500 Kb), pour lesquelles il est nécessaire d'utiliser des sondes locus spécifiques.

Dans le cadre des MCS, la technique de M-FISH est un outil permettant l'identification de l'euchromatine du marqueur sans indiquer la région chromosomique impliquée mais apportant une information sur l'origine du MCS dans la plupart des cas (Senger *et al*., 1998 ; Uhrig *et al*., 1999).

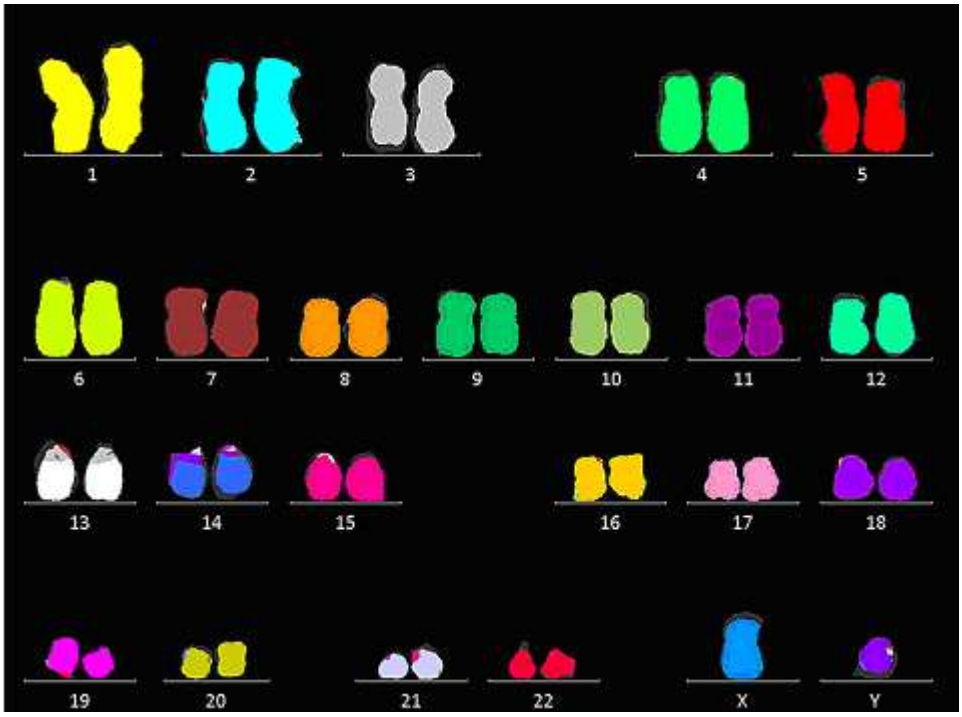


Figure n°25 : Caryogramme normal en M-FISH avec le kit 24XCyte-Metasystem®

1.3.2.3 ArmFISH

La technique armFISH est une nouvelle technique, variante de la M-FISH, permettant d'identifier, par une couleur différente, tous les bras chromosomiques. Développée par Karhu *et al*. (2001), cette technique M-FISH à 42 couleurs utilise deux étapes :

- une analyse conventionnelle de M-FISH est en premier lieu réalisée avec le kit commercial M-FISH-kit (24XCyte, MetaSystems, Altlussheim, Germany). Les chromosomes sont classés et les translocations sont détectées.
- une analyse est ensuite réalisée avec l'arm-kit. Ce kit est constitué de sondes spécifiques des bras chromosomiques pour l'ensemble des bras p et q chromosomiques de l'homme, à l'exception des bras courts (p-) des chromosomes acrocentriques et Y. Le mélange arm-kit contient les sondes suivantes : 1q, 2p, 3p, 4p, 5p, 6q, 7p, 8q, 9p, 10q, 11q, 12q, 16p, 17p, 18p, 19p, 20p, et Xp. L'hybridation avec l'arm-kit se combine à la première étape de classification et s'interprète « + » ou «-».

L'analyse par armFISH permet de définir les translocations de façon plus précise qu'avec la technique M-FISH. Par exemple, les translocations t(5;8), t(16;15;16), et t(7;17) montrées par M-FISH se révèlent être t(5q ;8p), t(16p;15q;16p), et der(7)t(7p;17q) en armFISH (Figure n°26).

L'armFISH est donc une technique efficace pour les caractérisations des aberrations chromosomiques qui peut être appliquée aux MCS.

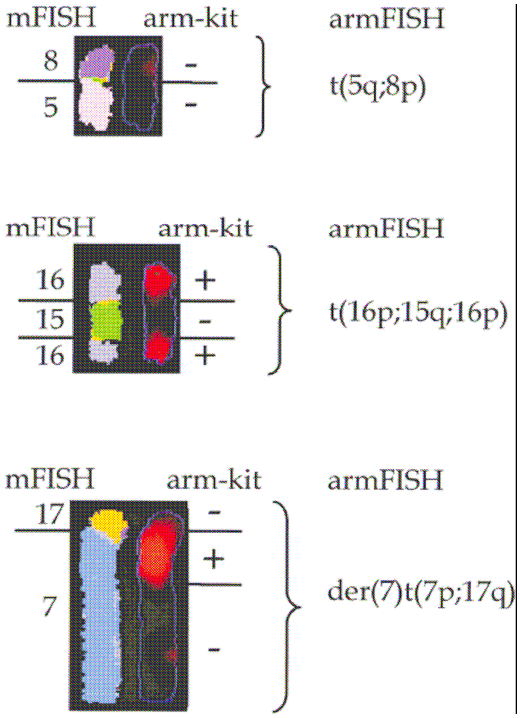


Figure n°26 : Trois chromosomes anormaux sont montrés : A gauche le chromosome pseudocolorée en M-FISH, à droite la détection par l'hybridation avec l'arm-kit (5p, 7p, 8p, 16p) ainsi que l'interprétation (+ ou -). Après l'analyse par l'armFISH les réarrangements peuvent être définis comme t(5q;8p), t(16p; 15q,16p), et der(7)t(7p;17q) (d'après Karhu *et al*., 2001).

1.3.2.4 AcroMFISH

L'acroMFISH est une technique permettant l'identification des chromosomes acrocentriques avec un mélange de sondes peintures pour chaque chromosome acrocentrique (13, 14, 15, 21 et 22), de sondes centromériques (13+21, 14+22, et 15) et de sondes ADN-ribosomale permettant de repérer l'ADNr (Figure n°27, 28 et Tableau V). La caractéristique particulière de l'acroMFISH est la détection simultanée des régions hétérochromatiques et euchromatiques des chromosomes des groupes D et G. Cette technique a été décrite en 2001 par Langer *et al.* (Langer *et al*, 2001).

Tous les signaux sont clairement visibles et les composants respectifs des chromosomes acrocentriques peuvent être identifiés avec facilité.

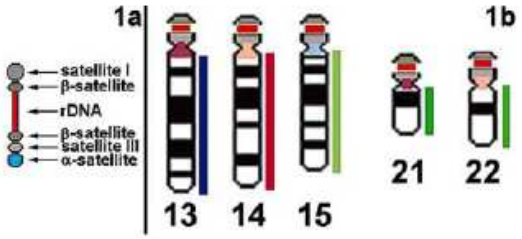
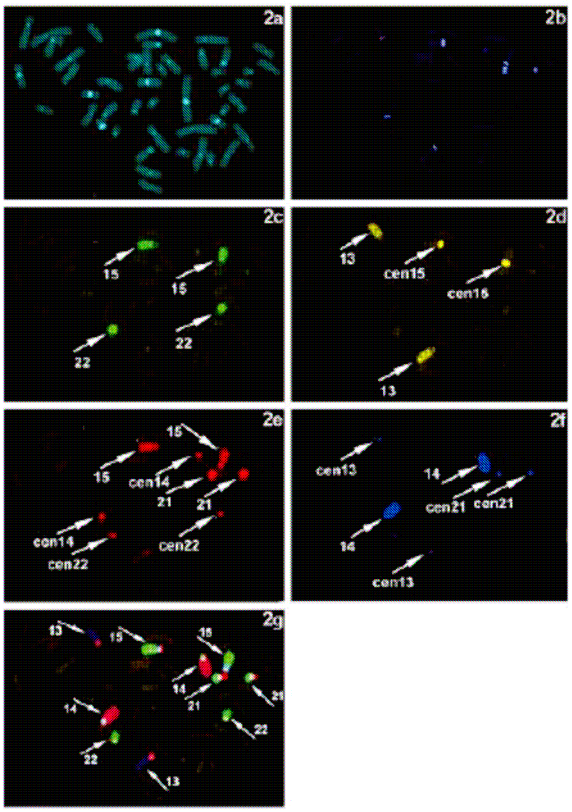


Figure n°27 : Schéma montrant les sondes utilisées pour l'AcroM-FISH (d'après Langer *et al*, 2001).



a - DAPI.
b - image avec tous les satellites hybridés (DEAC).
c - isothiocyanate Fluoresceine.
d - Cy3.
e - Cy3.5.
f - Cy5.
g - image générée à partir des cinq images précédentes (b–f)

Figure n°28: AcroM-FISH sur métaphase (d'après Langer *et al*, 2001).

Probe	DEAC	Digoxin → FITC	Cy3	Biotin → Cy3.5	Cy5
Chromosome 13 specific paint			X		
Chromosome 14 specific paint					X
Chromosome 15 specific paint		X		X	
Chromosome 21 specific paint				X	
Chromosome 22 specific paint		X			
Chromosomes 13/21 centromeres					X
Chromosomes 14/22 centromeres				X	
Chromosome 15 centromeres			X		
RNA probe	X				

Tableau V: Résumé des sondes utilisées en AcroMFISH (d'après Langer *et al*, 2001).

Cette technique est rapide, efficace et exhaustive pour caractériser les MCS satellisés. Elle est basée sur le fait que deux tiers des MCS dérivent de chromosomes acrocentriques (15 et 22 les plus communs). L'acroMFISH permet donc de caractériser environ deux tiers de tous les MCS. Pour le tiers restant, l'utilisation d'autres techniques est nécessaire.

1.3.2.5. CenMFISH

La technique cenM-FISH est basée sur le même principe que la FISH-24 couleurs à la différence que les sondes utilisées correspondent aux différentes régions centromériques. La technique nécessite 5 fluorochromes différents dans un seul mélange et vont s'hybrider simultanément (Tableau VI).

Les centromères des chromosomes 1, 5 et 19, 4 et 9, 13 et 21, et 14 et 22 partagent presque la même région alpha centromérique. Pour surmonter le problème, on utilise des sondes spécifiques centromériques des chromosomes 14, 22 de couleurs différentes. Pour le chromosome 5, une sonde spécifique est utilisée, et pour le chromosome 1, une sonde spécifique pour l'hétérochromatine subtélomérique en 1q12 est employée. L'ADN α-satellite des chromosomes 13 et 21 est identique à 99,7% et aucune sonde spécifique n'a pu être développée. Donc, mise à part les chromosomes 13 et 21, tous les centromères sont couverts (Nietzel *et al*., 2001, Figure n°29).

L'utilité de la technique cenM-FISH pour l'identification de très petits MCS sans euchromatine a été démontrée aussi bien en pathologie acquise que constitutionnelle (Nietzel *et al*., 2001).

L'avantage de cette technique est la possibilité d'identifier de manière rapide les petits MCS constitués principalement d'hétérochromatine, en 24 heures, après la détection en cytogénétique conventionnelle (bandes R ou G). Cela en fait un bon outil dans le domaine du diagnostic prénatal.

L'inconvénient de cette technique réside dans l'incapacité d'identifier des MCS avec un néocentromère et de ne donner aucun renseignement sur la composition possible en euchromatine du marqueur.

	Spectrum Green	Spectrum Orange	Biotinyl-amino-coumarin	Cy 5	Spectrum Red
#1					
#2					
#3					
#4					
#5midi					
#6					
#7					
#8					
#9					
#10					
#11					
#12					
#13/21					
#14/22					
#15					
#16					
#17					
#18					
#19/15					
#20					
#22					
#X					
#Y					

Tableau VI: Les différents mélanges de fluorochromes utilisés en fonction des chromosomes (d'après Nietzel *et al*., 2001).

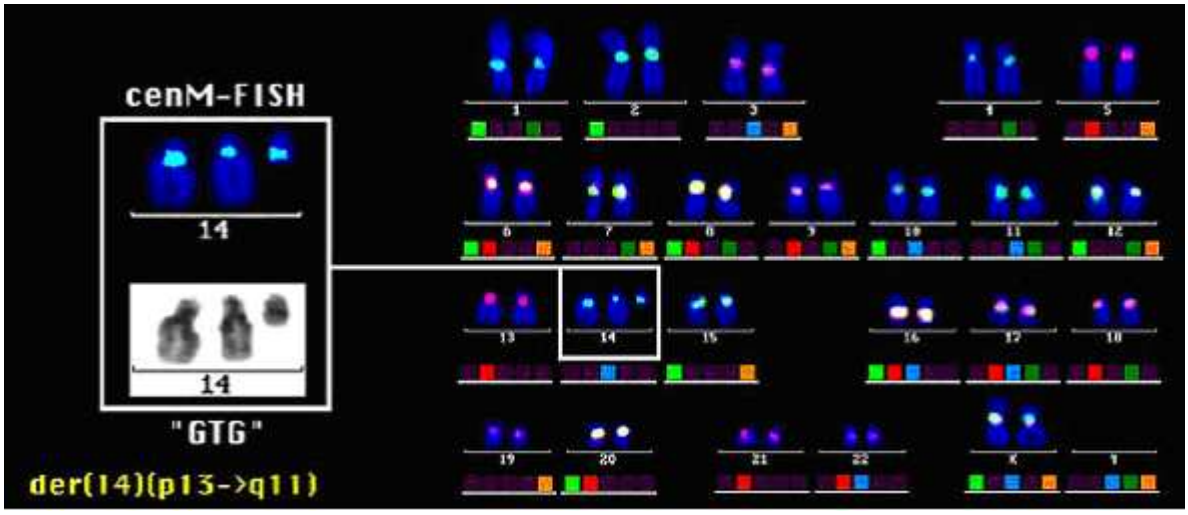


Figure n°29: Caryotype avec un MCS(14) obtenu par la technique de cenM-FISH (d'après Nietzel *et al*., 2001).

1.3.2.6 SubcenM-FISH

La technique SubcenM-FISH utilise 43 sondes différentes obtenues à partir de chromosomes artificiels de bactérie (BAC) et de chromosomes artificiels de levure (YAC) permettant de localiser la région proximale de chaque chromosome humain.

Les bras courts des chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 sont couverts par une sonde qui hybride tous les bras courts des chromosomes acrocentriques (Figure n°30 et n°31).

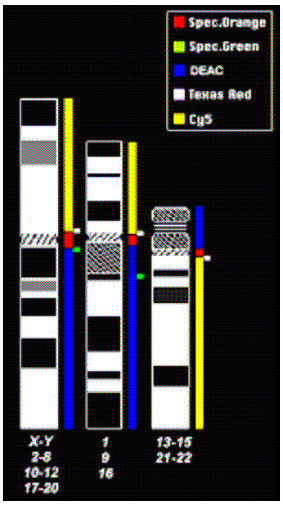


Figure n°30: Cibles des sondes du kit subcenM-FISH (d'après Starke *et al*., 2003).

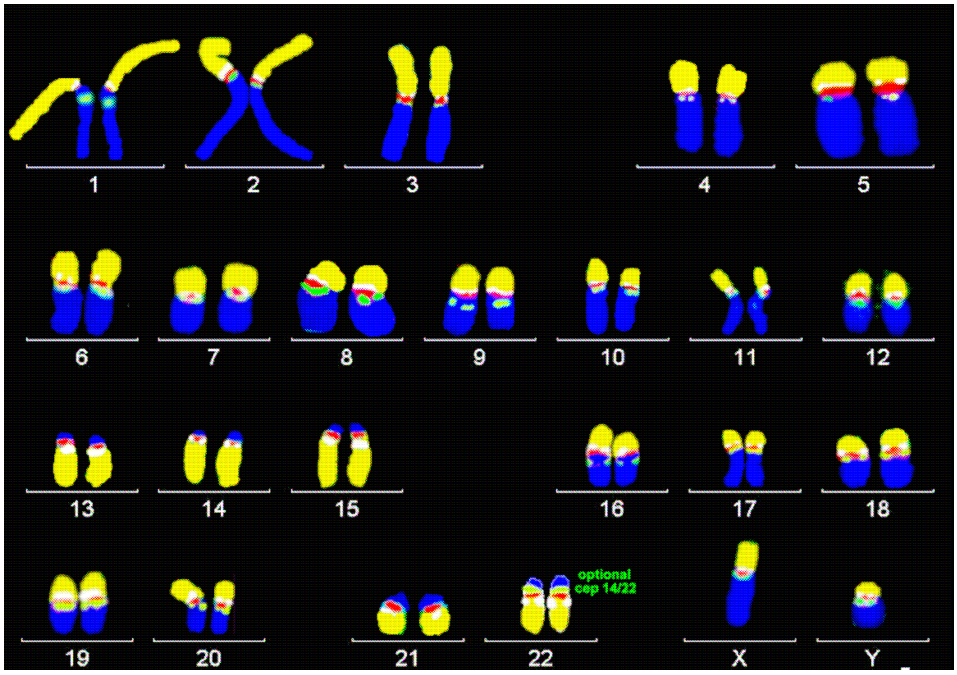


Figure n°31: Caryogramme normal obtenu avec la technique subcenM-FISH (d'après Starke *et al*., 2003).

Ces techniques d'approche globale sont insuffisantes pour caractériser le MCS et parfois ne permettent pas son identification. D'autres techniques ont donc été développées.

1.3.3. Microdissection chromosomique

La microdissection fait appel à un système laser ou à de fines aiguilles de verres qui se déplacent grâce à un micromanipulateur contrôlé électroniquement. Elle permet, à partir de métaphases de patients, d'isoler une région spécifique d'un chromosome ou un éventuel MCS. Le matériel isolé est amplifié par DOP-PCR et caractérisé par la technique de FISH inverse, réalisant ainsi une « reverse painting ».

Cette technique nécessite un matériel adapté et coûteux mais permet de déterminer l'origine chromosomique d'un MCS.

1.3.4. CGH-array

1.3.4.1 Historique

La cytogénétique connaît depuis une vingtaine d'années un nouveau développement grâce à l'essor des techniques de cytogénétique moléculaire. Ces techniques sont largement utilisées en pratique clinique, aussi bien en cytogénétique constitutionnelle pré- et post-natale qu'en cytogénétique hématologique et oncologique.

L'hybridation génomique comparative sur chromosomes (CGH) a été décrite en 1992 par Kallioniemi *et al* (Kalloniemi *et al*, 1992). Il s'agit alors d'une technique d'analyse globale du génome reposant sur l'hybridation compétitive de fragments d'ADN d'un patient et d'un témoin, sur des métaphases normales. Après cohybridation des deux ADN marqués par des fluorochromes différents (le patient en vert et le témoin en rouge par exemple), un logiciel informatique calcule le rapport de fluorescence des deux fluorochromes. Cette technique permet l'identification de déséquilibres chromosomiques et également de déterminer l'origine et la composition d'un MCS (Breen *et al*., 1999). La résolution est celle de la bande chromosomique, c'est-à-dire 5-10Mb. A la fin des années 1990, Solinas-Toldo *et al*. (Solinas Toldo *et al*., 1997) puis Pinkel *et al*. (Pinkel *et al.*, 1998) ont montré la possibilité de réaliser des CGH sur des lames où sont fixés des milliers de fragments d'ADN. Ces progrès technologiques ont ouvert la voie à la mise au point d'une nouvelle technique d'exploration du génome automatisable, ayant une sensibilité pouvant atteindre quelques kilobases : la CGH-*array* ou hybridation génomique comparative sur puces à ADN.

Des fragments d'ADN séquencés ou de BACs ont pu être fixés sur des lames. La position des BACs sur le génome étant connue, la résolution de la technique est déterminée par le nombre de BACs ainsi que leur localisation. Par exemple, une puce à ADN

composée de 3000 clones correspond à des loci chromosomiques espacés toutes les mégabases permettant d'obtenir une résolution d'une mégabase. Ainsi, la réalisation d'une CGH-*array* utilisant ce type de puce permet d'obtenir une résolution cinq fois plus importante que celle des techniques de cytogénétique conventionnelle estimée à cinq mégabases.

En 2004, la résolution est portée à 80kb (Ishkanian *et al*., 2004) grâce à une puce contenant 32433 BACs couvrant ainsi l'ensemble du génome.

En 2006, des puces contenant des milliers d'oligonucéotides de tailles comprises entre 20 et 80pb ont encore permis d'améliorer la résolution à quelques kilobases (Lockwood *et al*., 2006).

Par la suite, il a été possible de fabriquer des puces personnalisées. Par exemple, Ballif *et al* ont développé une technique de CGH-*array* haute densité avec un grand nombre de clones BACs dans les régions péricentromériques pour analyser des MCS (Ballif *et al*., 2007).

Enfin, une technique utilisant la technique de CGH sur microréseau a été développée. Il s'agit de l'« *array*-painting ». Elle est utilisée pour identifier les points de cassure de translocations mais peut également être utilisée pour caractériser des MCS (Gribble *et al*., 2009). Comme la microdissection, le marqueur chromosomique est isolé puis amplifié. Il est ensuite hybridé sur micro-réseau.

1.3.4.2 Principe général de la CGH

La CGH-*array* est une technique reposant sur le même principe que la CGH sur chromosomes mais elle permet une analyse avec un plus haut niveau de résolution. Le principe repose sur l'hybridation comparative de deux ADNs marqués par des fluorochromes différents, non pas sur des chromosomes, mais sur des séquences d'ADN déposées sur une lame de verre formant un microréseau. Cette technique permet de mettre en évidence des variations du nombre de copie (CNV) entre les deux ADNs. Les fragments d'ADN déposés sur la lame peuvent être des BACs, PACs, séquences d'oligonucléotides longues ou courtes. Ces oligonucléotides sont produits le plus souvent par synthèse *in situ*. Il est ainsi possible de déposer plusieurs milliers de sondes sur une lame, chaque sonde correspondant à une région précise du génome dont la position est connue. Le niveau de résolution obtenu dépend du nombre de sondes déposées sur la lame.

La première étape consiste à extraire l'ADN d'un patient à partir des lymphocytes. Ensuite, une quantité équivalente de l'ADN du patient et de l'ADN d'un témoin sont

marqués par « random priming ». L'ADN témoin est marqué en cyanine 5 (Cy5) ou en Alexa Fluor 5(Al5) (rouge) et l'ADN test en cyanine 3 (Cy3) ou Alexa Fluor 3 (Al3) (vert). Les sondes sont ensuite mélangées avec de l'ADN Cot-1 (sature les séquences répétées contenues dans les sondes) et déposées sur la lame. La lame est ensuite placée dans une chambre d'hybridation pendant au minimum 24 heures à 37 °C. Pendant cette période, les ADN marqués vont s'hybrider de façon compétitive au niveau des séquences d'ADN déposées sur la lame. Après lavage de la lame permettant d'éliminer les sondes non hybridées, la lecture des signaux (intensité de fluorescence de l'ADN marqué à la Cy3 et de l'ADN marqué à la Cy5) est réalisée grâce à un scanner laser automatisé. Une analyse bioinformatique des données est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel. Il attribue, grâce à une grille, l'oligonucléotide correspondant à chaque point de l'image. Les points aberrants dont le signal est hétérogène sont identifiés et pourront être retirés lors de l'analyse des résultats. Plusieurs facteurs de correction sont appliqués afin de soustraire le bruit de fond, corriger les erreurs de mesure et normaliser l'intensité des fluorochromes. Après normalisation des intensités de fluorescence, le logiciel établit un rapport des intensités de fluorescence (RIF) et donne une représentation graphique de ce rapport exprimé en échelle logarithmique (*log2 ratio*) (Figure n°32).

Cette analyse est répétée pour l'ensemble des séquences d'ADN présentes sur la lame. Pour chacune d'entre elles, un RIF égal à 1 correspond à un nombre de copies normal c'est-à-dire deux ; un RIF de 1,5 correspond à un gain d'une copie et un RIF 0,5 à la perte d'une copie.

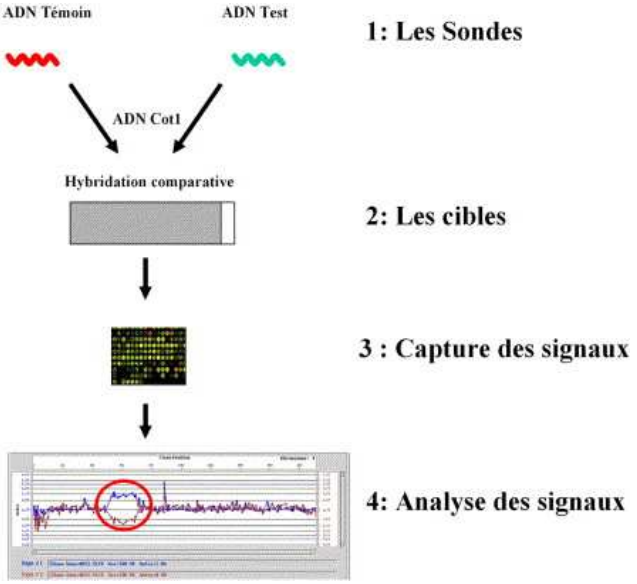


Figure n°32 : Principe de l'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (d'après Beri-Dexheimer *et al*., 2007)

1.3.4.3 Interprétation

Les résultats sont présentés dans un graphique montrant le rapport d'intensité de fluorescence V/R exprimé en échelle logarithmique en fonction de la position sur le chromosome (du télomère du bras court au télomère du bras long). Un rapport V/R<1 indique une perte de l'ADN test, un rapport V/R>1 un gain de l'ADN test et la valeur 1 correspond à une absence de déséquilibre. Cette ligne indique la présence d'une quantité équivalente entre l'ADN test et l'ADN témoin. La méthode de marquage inverse, dye swap, de l'ADN test et témoin, permet de confirmer le déséquilibre (image en miroir). Chaque point du graphique correspond à une cible dont la cartographie physique sur le chromosome est connue, permettant ainsi de quantifier la taille de l'anomalie et d'apprécier les gènes impliqués dans le remaniement.

Il existe des logiciels permettant d'aider dans l'interprétation des résultats. Par exemple, le logiciel *DNA Analytics* met à disposition les outils biostatistiques suivants:

- le *scatter-plot* permettant de visualiser les points du microréseau en fonction de leur position sur le chromosome.
- la moyenne mobile permettant une visualisation rapide des pertes et gains sur les chromosomes. Elle est représentée par une ligne le long de chaque chromosome (Figure n°33).
- Les outils statistiques comme le z-score ou les ADM (1 et 2) permettant de déterminer les régions déséquilibrées.

Avant d'analyser les résultats, les données de contrôle qualité déterminées également par le logiciel sont importantes pour juger de la qualité de l'expérience. Il s'agit du bruit de fond, de l'intensité du signal, du rapport signal/bruit et de la dispersion de la dérivée du log-ratio (DLRS). Plus le DLRS est faible (<0,2), meilleure est la qualité des résultats. Un rapport de contrôle qualité (*QC report*) récapitule ces données et permet d'évaluer la qualité de l'expérience d'un coup d'oeil (Annexe 1).

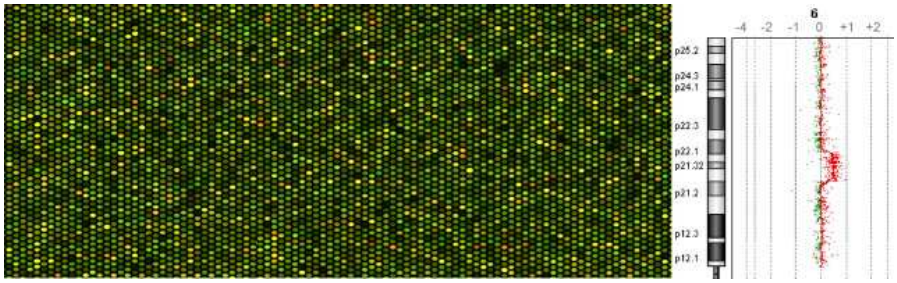


Figure n°33 : Détail d'une puce ADN Agilent™ après hybridation. Ratios de fluorescence mesurés par le logiciel DNA-analytics™ et présentés sous forme graphique (exemple d'une duplication 6p21.2p22.1).

Les critères utilisés pour retenir un CNV (Copy Number Variation) varie selon le type de puce utilisé et l'expérience des équipes. Pour les puces à oligonucléotides de la société Agilent, un CNV est généralement retenue lorsqu'au moins 3 oligonucléotides contigus dévient dans le même sens. La principale difficulté consiste à établir si la variation (CNV) possède un effet délétère ou s'il s'agit d'un polymorphisme (CNP = copy number polymorphism), c'est-à-dire sans conséquence phénotypique. Pour aider l'interprétation, il existe des bases de données mises à jour régulièrement comme DGV (*Data of Genomic Variation*) qui rapportent l'ensemble des polymorphismes connus. En principe, on retient la variation comme un polymorphisme lorsque celui-ci est rapporté plusieurs fois dans le même sens (gain ou perte). Cependant, il faut rester prudent sur l'utilisation de cette banque de donnée car des CNV répertoriés comme polymorphisme peuvent par la suite s'avérer délétères. Il est donc indispensable de confronter le CNV (l'implication d'éventuels gènes contenus dans cette région) avec les signes cliniques du patient.

S'il s'agit d'un polymorphisme, il n'y a pas lieu de poursuivre les investigations mais il faut le mentionner dans le compte rendu technique. Par contre, si la variation n'est pas rapportée dans *DGV*, il faut chercher à savoir si les gènes contenus dans le CNV sont connus pour être impliqué en pathologie. Des bases de données comme UCSC, NCBI, OMIM ou BACH, ECARUCA ou DECIPHER vont pouvoir nous donner des informations sur ces gènes, en indiquant leur rôle et notamment leur implication dans d'éventuelles pathologies.

Toute anomalie décelée par la CGH-*array* doit être vérifiée par une seconde technique indépendante : FISH, MLPA ou PCR quantitative.

Les remaniements de structures équilibrés et les anomalies de ploïdie (triploïdie) ne sont pas détectés par cette technique purement quantitative. Donc la CGH-*array* est limitée aux anomalies déséquilibrées. Ainsi, dans le cas de la mise en évidence d'une anomalie déséquilibrée chez un patient, l'analyse des parents est nécessaire pour rechercher un éventuel remaniement équilibré (Beri-Dexheimer *et al*., 2007). Cette analyse fait appel à une technique FISH sur métaphases à l'aide de sondes spécifiques, afin d'identifier une translocation, une inversion ou une insertion, pouvant alors avoir un impact sur la récurrence d'un déséquilibre ultérieur dans la descendance du couple mais aussi de ses apparentés.

La dernière notion importante est celle du mosaïcisme. En effet, certaines variations sont retrouvées en mosaïque. Ballif *et al* (Ballif *et al*., 2006) ont montré que la CGH-*array* a une bonne sensibilité pour détecter les déséquilibres chromosomiques en mosaïques supérieures à 10%. Les rapports des log2 ratio sont alors modifiés (et il faut être attentif à la variation de la moyenne mobile).

Ainsi, chaque technique de cytogénétique moléculaire actuellement disponible possède leurs avantages et leurs inconvénients. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau VII.

	AVANTAGES	INCONVENIENTS
FISH conventionnelle	▪ Permet d'étudier les anomalies sur métaphase et interphase ▪ Rapide ▪ Analyse sur un grand nombre de cellules ▪ Haute sensibilité et spécificité ▪ Applicable avec peu de cellules	▪ Nécessite de connaître à priori l'anomalie à étudier ▪ Nécessite l'utilisation de sondes « maisons » en l'absence de sondes commerciales disponible ▪ Etudie seulement une ou peu d'anomalies en une expérience
M-FISH/SKY	▪ Permet l'obtention d'information sur tous les chromosomes ▪ Très utile pour des caryotypes complexes et les réarrangements cryptiques ▪ Identifie l'euchromatine d'un MCS	▪ Nécessite des cellules en division ▪ Ne détecte pas des anomalies de structure intrachromosomique ▪ Ne détecte pas les anomalies de structures <2Mb ▪ Ne détermine pas les bandes chromosomiques exactes impliquées dans le réarrangement
CenM-FISH	▪ Permet d'étudier les anomalies sur métaphase ▪ Temps d'hybridation court (0.5-2h)	▪ Ne distingue pas les centromères des chromosomes 13 et 21 ▪ Ne détecte pas les MCS ne contenant pas de séquences alpha-satellite (néocentromères)
CGH-*array*	▪ Haute résolution (dépend de la taille et de l'espace des sondes utilisés sur la puce) ▪ Pas besoin de suspecter un type d'anomalie ▪ Permet de détecter des déséquilibres inférieurs à 100 kb	▪ Ne détecte pas les réarrangements équilibrés ▪ Détecte beaucoup de polymorphismes

Tableau VII : Principaux avantages et inconvénients de la CGH-*array* et des différentes techniques de FISH.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Les patients

L'objectif de l'étude était double :

- Identifier et caractériser par CGH-*array* 10 MCS détectés sur le caryotype de patients présentant un retard mental.
- Comparer l'efficacité de 2 puces à oligonucléotides : une puce commerciale 180K et une puce réalisée à façon (personnalisée) 244K de la société Agilent.

Les patients sélectionnés pour l'étude présentaient des marqueurs difficilement identifiables par les techniques de cytogénétique conventionnelle.

Les patients et leurs parents ont tous consulté un généticien, été informé de l'étude et signé un consentement qui a reçu l'aval du CPP (Comité de Protection des Personnes) Sud Est IV.

Patient 1 : Abdoulkadir A., né en 2003, présente un retard psychomoteur avec une dysplasie vermienne. Le caryotype est demandé en raison d'un retard global des acquisitions, d'une hypertonie segmentaire, d'un retard de croissance et d'une dysmorphie faciale. Par ailleurs, le patient a développé un asthme. Le caryotype a permis de mettre en évidence un MCS de petite taille, en anneau et en mosaïque estimée à 28%.

Patient 2 : Cécilia A. est née en 2004. Son caryotype est réalisé dans un contexte de retard psychomoteur et de chromosome surnuméraire familial. Un petit MCS en mosaïque, à hauteur de 25%, a été mis en évidence sur le caryotype de la mère et de la sœur. Le caryotype révèle un MCS de petite taille, en anneau et en mosaïque estimée à 40% qui pourrait être à l'origine du retard mental familial.

Patient 3 : Ines B. est né en 1992. Son caryotype est réalisé dans le cadre d'un retard mental associé à une dysmorphie faciale. Le caryotype montre un petit MCS en anneau et en mosaïque estimée à 16%.

Patient 4 : Yanis L., né en 2003, est issu d'un couple non apparenté et sans antécédent particulier. La grossesse a été marquée par une clarté nucale augmentée (5mm)

motivant la réalisation d'un caryotype fœtal (46,XY). Par la suite, il n'y a pas eu de retard des acquisitions motrices mais une propreté acquise à 4 ans et un retard de langage. Il présente une dysmorphie faciale, des troubles de la coordination et de l'organisation des gestes, un écartement des mamelons et au niveau des pieds, un écartement des espaces entre le gros orteil et le deuxième doigt. Le caryotype révèle un MCS de petite taille en mosaïque sur 8% des cellules examinées.

Patient 5 : Alyssia S., née en 2007, est le premier enfant d'un couple non apparenté sans antécédent familial. L'enfant présente un retard psychomoteur associé à une splénomégalie, une dysmorphie faciale, une grande taille et une microcéphalie. Le caryotype est réalisé en raison d'un retard mental non isolé. Le caryotype révèle un MCS en anneau et en mosaïque estimée à 29%.

Patient 6 : Morgane V., née en 1993, est le deuxième enfant d'un couple. Son frère aîné est bien portant. La patiente présente un colobome ainsi qu'un reflux vésico-urétéral. L'examen clinique montre également un retard mental, une dysmorphie faciale et une aménorrhée primaire. Le caryotype est réalisé en raison de difficultés d'apprentissage dans un contexte syndromique et révèle un MCS de petite taille, en anneau avec un taux de mosaïque estimé à 58%.

Patient 7 : Kyllian V., né en 1999, est un patient présentant des difficultés d'apprentissage. Il a un frère et une sœur bien portants. Un caryotype est réalisé en raison de la présence d'un retard mental associé à une dysmorphie faciale. Le caryotype révèle un MCS de petite taille, en anneau et en mosaïque estimée à 75% des cellules examinées.

Patient 8 : Elise S., née en 1989, présente un retard mental, une dysmorphie faciale et une épilepsie. Le caryotype des parents est normal. Le caryotype de la patiente est complexe avec présence d'une translocation entre le chromosome 9 et 21 sur 10% des cellules examinées ainsi qu'un MCS en anneau sur 40% des cellules examinées.

Patient 9 : Lucie M., née en 2005, se voit prescrire un caryotype en raison d'un retard mental. L'examen clinique révèle un retard psychomoteur avec des troubles de la coordination, de l'équilibre, un retard de langage important, un retard des acquisitions motrices et psychomotrices, une dystonie des membres inférieurs et une laxité ligamentaire. Par ailleurs, aucune dysmorphie faciale n'est mise en évidence. Le caryotype montre un MCS de très petite taille en mosaïque estimée à 27% des cellules examinées. Le caryotype des parents ne révèle pas de MCS.

Patient 10 : Thomas P., né en 2004, est un patient pour lequel un caryotype a été demandé en raison de la présence d'un retard mental associé à des troubles du comportement évocateur de TED (Trouble Envahissant du Développement), une grande taille (+3DS), sans dysmorphie faciale. Le caryotype met en évidence un MCS de petite taille, en anneau et en mosaïque sur 38% des cellules examinées. Le caryotype des parents ne révèle pas de MCS.

Le tableau VIII ci-dessous, résume les principales caractéristiques des dix patients de l'étude.

Patient /signes cliniques	Retard mental	Dysmorphie faciale	MCS de novo	MCS familiale	mosaïcisme sur caryotype (%)
1	X	X	X		28
2	X			X	40
3	X	X	X		16
4	X	X	X		8
5	X	X	X		29
6	X	X	X		58
7	X	X	X		75
8	X	X	X		40
9	X		X		27
10	X		X		38

Tableau VIII : Résumé des caractéristiques des 10 patients inclus dans l'étude

2.2 Les puces *Agilent*®

Le fabriquant Agilent dispose de plusieurs puces sur microréseau pour la routine: 1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K ... Des puces à façon permettant de cibler certaines régions chromosomiques peuvent être également élaborées. La majorité des MCS ont une

composante centrique. Nous avons donc façonné une puce très enrichie au niveau des régions péricentromériques sur la base de la puce commerciale 244K (Figure n°34) afin d'augmenter notre probabilité d'identifier et de caractériser (de façon très précise) les MCS. Souhaitant savoir si ce type de puce personnalisée avait un intérêt, nous avons parallèlement utilisé le format de lame que nous utilisons en diagnostic, à savoir les puces 4x180K d'Agilent.

Figure n°34 : Exemple d'une puce 244K d'Agilent®

2.2.1. La puce 244K personnalisée d'*Agilent*®

Notre puce personnalisée 244K d'*Agilent*® est une puce pangénomique densifiée au niveau des régions péricentromériques localisées 5 Mb au dessus et en dessous du centromère de chaque chromosome. Ce format est constitué d'oligonucléotides longs (60 mer) synthétisés sur la surface d'une lame de verre (*in situ*). Dans ce cas, les sondes sont des oligonucléotides synthétisés *in situ* par une technique dite de « jet d'encre » par oligo-synthèse via la chimie des phosphoramidites (Figure n°35). Le processus est répété 60 fois. Cette puce de haute résolution est composée de 243 504 oligonucléotides, dont 5 045 contrôles négatifs (pas d'hybridation du fait de leur conformation) ainsi que 1 000 triplicats (évalue la reproductibilité). L'intervalle moyen entre deux oligonucléotides est de 6,4kb. Les régions codantes et non codantes de chaque chromosome sont couvertes ainsi que des gènes connus, des promoteurs, des micro-ARNs, des télomères. De plus, un renforcement particulier au niveau des régions péricentromériques a été réalisé dans le but d'identifier les MCS des 10 patients. La couverture au niveau des régions péricentromérique est très importante permettant d'obtenir un niveau de résolution de l'ordre de 2,8 kb en moyenne. Les oligonucléotides sont répartis aléatoirement sur la puce afin que ces derniers, représentant une même région, ne se jouxtent pas en cas de problème technique sur une zone partielle de la lame. La séquence de chaque oligonucléotide est disponible et leur position indiquée sur le génome.

L'objectif de cette puce personnalisée est de détecter et de caractériser les MCS des 10 patients par CGH-*array*, avec une meilleure résolution que les puces classiques.

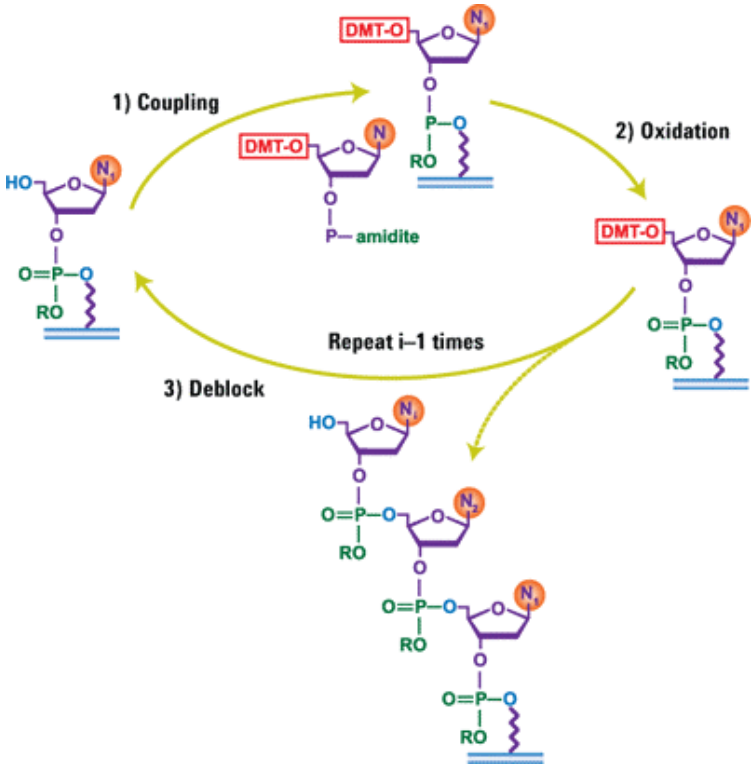


Figure n°35 : Technique d'oligo-synthèse via la chimie des phosphoramidites. Le processus est répété 60 fois (d'après www.chem.agilent.com)

2.2.2. La puce 180K d'*Agilent*®

La puce 180K d'*Agilent*® est une puce de dernière génération avec une haute résolution. Ce format est utilisé en routine pour le diagnostic au sein de la plateforme CGH de Lyon, notamment dans le cadre de retard mental. Comme la puce 244K personnalisée, ce format est constitué d'oligonucléotides longs (60 mers) synthétisés sur la surface d'une lame de verre (*in situ*) par oligo-synthèse via la chimie des phosphoramidites (Figure n°35). Cette puce est composée de 4 plages de 180 880 oligonucléotides, dont 5045 contrôles négatifs. L'intervalle moyen entre deux oligonucléotides est de 13kb. Les sondes couvrent les régions codantes et non codantes avec un accent sur les gènes connus, les micro-ARNs, les régions pseudo-autosomiques et télomériques.

Le passage des échantillons des 10 patients sur cette puce en parallèle de la puce 244K personnalisée d'*Agilent*® donne l'opportunité d'effectuer une comparaison entre ces deux puces.

2.3 Protocole de l'hybridation génomique comparative

La technique d'hybridation génomique comparative comporte 8 étapes.

Extraction de l'ADN

Les ADN sont extraits à partir d'échantillons sanguins. Le kit utilisé est le Midikit QIamp Blood de QIAGEN®. Ce dernier permet d'extraire des acides nucléiques à partir de 1 à 2 ml de sang total prélevé sur EDTA.

Digestion de l'ADN génomique

Les échantillons sont ajoutés à un mélange de digestion qui comprend pour chaque patient :

- 5µl d'eau nuclease-free,
- 5,2µl de 10X Buffer C,
- 0,4µl d'acetyled BSA,

} Pour chaque couleur

- Les enzymes de digestion : 0,5µl d'*AluI* (10UI/µl) et 0,5µl de *RsaI* (10UI/µl).

L'ADN et le mélange doivent être bien mélangés, puis centrifugés brièvement. Ensuite, ils sont incubés au bain marie pendant 2 heures à 37°C puis 20 minutes à 65°C pour arrêter la réaction de digestion. Enfin, les tubes sont microcentrifugés avant l'étape de marquage.

Marquage fluorescent de l'ADN génomique digéré avec incorporation d'Alexa

La technique de marquage de référence est le « random priming » ou amorçage aléatoire. Un volume de 25µl d'Alexa Fluor3 2X Reaction mix (tampon, amorces et dNTP marqués) est ajouté aux 26µl de produit de digestion afin que l'ADN soit marqué en Alexa 3 (Al3). L'ensemble est mélangé et centrifugé brièvement. La même chose est réalisée avec l'Alexa Fluor 5 2X pour marquer l'ADN en Alexa 5 (Al5). Une incubation de 5 minutes à 95°C suivie par un refroidissement immédiat de 5 minutes dans la glace sont nécessaires. Un volume de 3µl d'exo-klenow est ensuite ajouté par tube. L'ensemble est de nouveau mélangé et centrifugé avant d'être incubé 2 heures à 37°C. Les amorces contenant les séquences hexanucléotidiques aléatoires s'hybrident sur l'ensemble du génome. L'élongation du brin d'ADN à partir des amorces contenues dans le mélange de réaction d'Alexa est réalisée par l'exo-klenow (fragment de l'ADN polymérase I de *E.coli*). Les oligonucléotides marqués en Al3 ou Al5 s'incorporent dans le nouveau brin d'ADN synthétisé.

Purification de l'ADN génomique digéré et marqué

Les produits de marquage sont purifiés sur une colonne Purelink Spin Column. On ajoute 200µl de Binding Buffer B2 aux échantillons, tampon permettant de fixer l'ADN sur la membrane de la colonne. Le mélange est centrifugé 1 minute à 10000 g puis le filtrat est jeté. 650µl de tampon de lavage Wash Buffer W1 sont ensuite ajoutés; puis l'ensemble est centrifugé pendant 1 minute à 10000 g. Le filtrat est de nouveau jeté. Pour enlever les restes de tampon de lavage, une centrifugation à vitesse maximale est réalisée pendant 3 minutes. Les tubes sont ensuite placés sur un tube stérile ambré fourni avec le kit. Les ADN sont défixés de la colonne par ajout de 55µl de tampon d'élution E1. Après une incubation d'une minute à température ambiante, les colonnes sont centrifugées à 20000 g pendant 2 minutes. Enfin, pour les puces 180K, les ADN sont « speed Vaccer » pour obtenir un volume final d'environ 21µl. Si le volume est trop réduit, du tampon TE 1X pH à 8 est ajouté. Pour les puces 244K, du tampon TE 1X pH 8 est ajouté en quantité suffisante pour obtenir un volume final de 80,5µl.

Les réactifs cités ci-dessus sont tous fournis avec le Kit Invitrogen®.

Vérification du marquage au nanodrop

L'efficacité du marquage est évaluée par spectrométrie. Les ADN sont dosés par le NanoDrop ND-1000. Un volume d'1,5µl de chaque échantillon est utilisé à cet effet. Les échantillons dont la concentration en Alexa correspondante est inférieure à 2 pmol/µl sont rejetés.

Hybridation sur lames CGH-*array*

Les échantillons marqués en Alexa 3 et en Alexa 5 sont combinés selon le plan de dépôt défini au préalable. On ajoute l'ADN Cot-1 (1.0 mg/ml) qui bloque les séquences répétitives, l'agent bloquant 10X et le tampon d'hybridation 2X. Le mélange est dénaturé pendant 3 minutes, pré-hybridé pendant 30 minutes à 37°C puis centrifugé à 17900 g pendant 1 minute.

L'échantillon est déposé sur une lame « gasket », au centre puis en étalant à gauche et à droite sans faire de bulles. La Puce 180K ou 244K d'Agilent® est placée face imprimée vers le bas recouvrant la lame « gasket » constituée de joints plastiques pour l'étanchéité. La chambre d'hybridation est ensuite fermée en évitant de former des bulles puis, est hybridé à 65°C dans un four rotatif à 20 rpm pendant 24 heures pour les lames 180K et 40 heures pour les lames 244K personnalisées.

Lavages post-hybridation

Les chambres d'hybridation sont démontées dans le tampon de lavage 1. La lame doit être complètement immergée puis transférée dans un bac contenant la solution de lavage 1 pendant 5 minutes sous agitation (700 rpm). Elle est ensuite transférée dans un second bac contenant la solution de lavage 2 à 37°C et laissée 1 minute sous agitation. Enfin, la lame est sortie très délicatement afin qu'elle sorte sèche.

Le scan des lames

La lame est positionnée dans le carrousel puis dans le scanner *Agilent*®. Le logiciel utilisé est Agilent Scanner Control. Les paramètres sont une PMT de 100, une résolution de 3µ pour 180K et 5µ pour 244K.

Analyse des résultats

Le scanner mesure l'intensité de signal de fluorescence verte et rouge. Le résultat brut de l'analyse se présente sous forme d'une image numérisée (format TIFF) qui est ensuite analysée par le logiciel *Feature Extraction 9.5.3.1*.

L'interprétation des résultats est réalisée au moyen du logiciel *DNA Analytics 4.0.85* dont les paramètres utilisés pour notre étude sont les suivants :

- z-score à 2 ou ADM 2 à 6
- le *scatter-plot* : 0,25
- Cut off : 0,25
- Window : entre 0,2 et 1Mb selon la qualité de l'expérience.

Schémas expérimentaux

Selon la puce, on réalise des expériences en trio ou en quatuor.

Pour la puce 244K personnalisée, trois patients sont hybridés chacun l'un contre l'autre, ce qui correspond à trois hybridations (Figure n°36).

Dans la puce 180K, 4 patients sont hybridés chacun l'un contre un autre, ce qui correspond à quatre hybridations (Figure n°37).

Ainsi dans ce plan expérimental, chaque patient est hybridé deux fois, en Alexa5 et en Alexa3. Cette méthodologie qui consiste à réaliser deux hybridations en inversant le marquage des fluorochromes dans la même expérience est appelée *dye-swap*. Même si l'étape de normalisation a pour but de corriger les biais qui existent entre les intensités dans le rouge et dans le vert, il est très improbable que la correction soit optimale pour chacun

des spots de la lame. Le *dye-swap* permet d'éliminer les biais résiduels. Sur une puce, un patient est testé deux fois par *dye-swap* sans doubler le nombre de lame et on s'affranchit de la recherche d'un témoin normal en hybridant deux patients l'un contre l'autre (Menten *et al*., 2006)

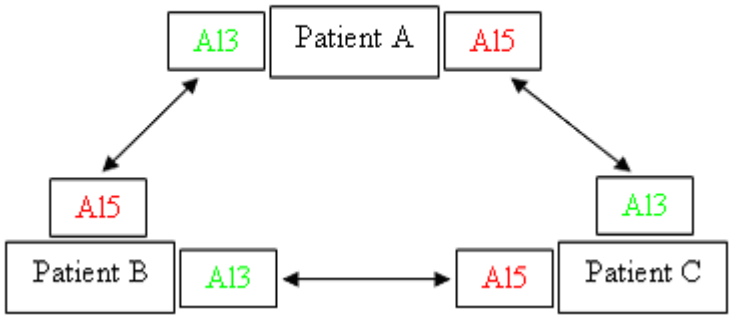


Figure n°36 : Schéma d'un plan expérimental en trio (puce 3x244K)

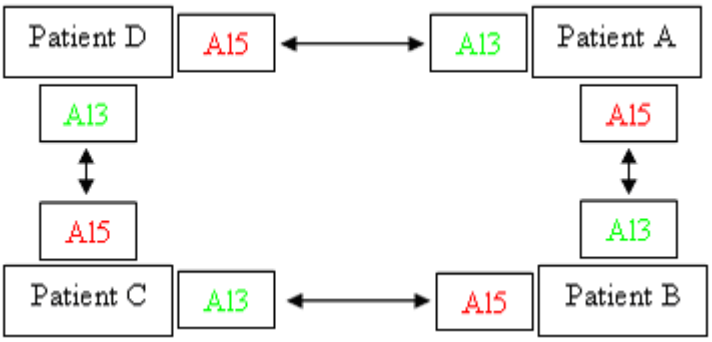


Figure n°37 : Schéma d'un plan expérimental en quatuor (puce 4x180K)

<u>La problématique du témoin en CGH-*array*</u>

Le choix des témoins est complexe en CGH-*array* car actuellement aucun ADN normalisé de référence n'est disponible. L'ADN témoin peut provenir d'un sujet « sain » unique, avec une même méthode d'extraction pour les patients et le témoin. Cependant, la limite de stock représente un inconvénient majeur. Certains auteurs utilisent des pools d'échantillons d'ADN en tant que référence. Cela permet d'obtenir une moyenne globale des événements polymorphiques associés à une région d'intérêt permettant d'interpréter les variations de l'ADN test (Iafrate *et al*., 2004). L'inconvénient de cette méthode est la diminution de détection des CNV dans les régions hautement polymorphes (CNP). En effet, le pool d'ADN lisse les polymorphismes des séquences d'ADN car c'est un intermédiaire entre les

formes polymorphes et non polymorphes. Nemos *et al* (Nemos *et al*., 2008) évoquent le problème de détermination de la nature du CNV avec cette méthode car elle induit une surestimation des CNV (en perte et en gain).

Une autre méthodologie consiste à hybrider deux patients l'un avec l'autre (Menten *et al*., 2006). L'hybridation en *Dye swap* réduit de moitié le nombre d'expériences et le coût par patient. Un des inconvénients lié à l'utilisation des patients comme référence dans les trois hybridations est que des déséquilibres identiques chez deux ou trois patients aboutiraient à des proportions d'intensité égales pour la région affectée et masqueraient potentiellement un déséquilibre. Cependant, le risque de découvrir un déséquilibre chromosomique semblable chez deux patients présentant des phénotypes différents est faible.

C'est cette dernière méthode qui est utilisée au laboratoire de cytogénétique de Lyon.

2.4. Hybridation *in situ* en fluorescence

Les résultats de la CGH-*array* ont ensuite été confirmés par la technique de FISH :

- Les MCS ont été vérifiés au moyen d'une sonde centromérique ou d'une sonde de peinture. Nous avons utilisé les sondes commerciales Oncor®, Vysis® ou Qbiogene®.
- La délétion a été vérifiée au moyen d'une sonde « maison » choisie sur le site de l'UCSC, qui a été marquée en rhodamine par *nick-translation*.

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence a été réalisée selon le protocole utilisé en routine dans le laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle de Lyon. Ce protocole se décompose en 6 étapes :

- Etalement du culot de lymphocytes sur une lame,
- Prétraitement dans un bain d'acide acétique 70%,
- Déshydratation dans des bains d'alcool successifs à 70%, 85% et 100%,
- Co-dénaturation à 74°C et hybridation dans une chambre humide à 37°C pendant une nuit,
- Lavages dans un bain de 0,5 SSC et de 1 SSC puis ajout du « DAPI/Antifade » sur la lame,
- Analyse au microscope à épifluorescence.

2.5. Protocole MultiFISH

La technique de MultiFISH a été ralisée dans le laboratoire d'hématologie du Pr JP Magaud. Cette technique peut être résumée en 4 grandes étapes :

Préparation du matériel à hybrider

La technique débute par l'étalement du culot sur les lames. Cette première étape est primordiale pour l'obtention d'une hybridation de qualité. La qualité de l'étalement est vérifiée selon 3 critères :

- ✓ présence ou non de cytoplasme : en cas de présence de cytoplasme faire un traitement avec la pepsine,
- ✓ obtention de métaphases bien étalées avec peu de chevauchement des chromosomes,
- ✓ qualité du matériel chromosomique.

Dénaturation des chromosomes

Les lames sont réhydratées dans une série de bains d'éthanol à 100%, 80%, 70%, 50% et 30% à température ambiante. Les lames sont ensuite plongées successivement dans des bains de 0,1XSSC et de 2XSSC à chaud, puis à froid, et un bain de NaOH 0,07N selon un ordre bien défini. Les lames sont enfin déshydratées dans une série de bains d'éthanol à 30%, 50%, 70%, 80% et 100% puis séchées.

Dénaturation de la sonde et hybridation

Avant utilisation, les sondes sont dénaturées par un choc thermique. La sonde est ensuite déposée sur la lame et cette dernière est placée dans une chambre humide à 37°C pendant 48 heures.

Lavages post-hybridation et détection

Après hybridation, les lames sont plongées dans des bains de 1XSSC et 4XSSCT dans des conditions bien définies. L'agent bloquant est tout d'abord déposé sur la lame, suivie de la solution d'anticorps. La lame est de nouveau plongée dans des bains bien définis (4XSSCT, PBS). Une fois la lame sèche, le réactif « DAPI/Antifade » est déposé sur la lame. La lecture se fait au moyen d'un microscope à épifluorescence.

2.6. Méthodologie de l'étude

L'identification des MCS des patients inclus dans l'étude s'est déroulée de la façon suivante :

Dans un premier temps, les ADN des dix patients de l'étude ont été explorés par la technique d'hybridation génomique comparative sur la puce 244K personnalisée et en parallèle sur la puce 180K utilisée en routine.

Dans notre étude, les gains d'au moins deux Mégabases et localisés au niveau des régions péricentromériques ont été considérés comme correspondant aux MCS. Une fois confirmé en FISH, le contenu en gène de la région euchromatique présente sur le marqueur a été analysé à l'aide des bases UCSC (http://genome.ucsc.edu) et OMIM (http://ncbi.nlm.nih.gov/omim) pour identifier d'éventuels gènes pouvant expliquer le phénotype observé et notamment le retard mental.

Les gains et les pertes d'au moins trois oligonucléotides ont été notés dans un compte rendu suivi d'une interprétation biologique. Les CNV ont été confrontés à la base de donnée de Toronto *DGV*. Si le CNV a été répertoriés au moins trois fois dans le même sens (perte ou gain), il est interprété comme un polymorphisme. Les CNV non répertoriés comme CNP ont été vérifiés par qPCR. L'analyse est réalisée en même temps chez les parents pour conclure sur le caractère *de novo* ou hérité du CNV. Si ce dernier est hérité d'un parent sain, il est généralement interprété comme un polymorphisme.

Dans un deuxième temps, lorsque la technique d'hybridation génomique comparative s'est révélée insuffisante pour identifier le MCS, la méthode MultiFISH (kit 24XCyte Human Multicolor FISH) a été utilisée pour compléter l'étude.

Une fois le MCS caractérisé par les précédentes méthodes, une revue de la littérature a été réalisée afin de conclure quant au caractère pathogène du marqueur et pour tenter d'établir un lien direct avec le phénotype observé chez le patient et la présence du MCS.

3. RESULTATS

Les échantillons sanguins des 10 patients ont été analysés par la technique de CGH-*array* sur la puce de routine 180K et la puce personnalisée 244K. Cette technique a permis de caractériser le MCS de huit patients parmi les dix inclus dans l'étude. Malgré l'utilisation de deux puces différentes et de deux schémas expérimentaux, deux MCS n'ont pu être identifiés (Patient n°1 et patient n°4).

Le tableau IX répertorie les résultats obtenus par la technique de CGH-*array* sur les puces 244K et 180K.

Pour les patients n°1 et n°4, une étude en MultiFISH a été réalisée permettant d'identifier le MCS du patient n°1. Cependant, le MCS du patient n°4 reste non identifié par l'emploi de cette seconde technique car sur les 100 métaphases observées, aucun MCS n'a été détecté.

La FISH a permis de confirmer tous les résultats obtenus en CGH-*array* et MultiFISH. Le tableau X résume les résultats observés.

Patients	Puce 244K personnalisée			Puce 180K			Nature	Mosaïque (CGH)
	Région	Taille fragment (Mb)	Position génomique (hg18)	Région	Taille fragment (Mb)	Position génomique (hg18)		
1	normal	normal	normal	normal	normal	normal	Normal	Normal
2	9p21.1p11.1	16,61	30,392,242-47,002,237	9p21.1p11.1	15,05	30,311,408-45,359,386	Gain	26%
3	5p14.1p11	20,84	25,316,789-46,154,233	5p14.1p11	20,43	25,710,449-46,136,124	Gain	18%
4	normal	normal	normal	normal	normal	normal	Normal	Normal
5	1q21.1q24.2	25,66	142,448,039-168,114,436	1q21.1q24.2	24,6	143,706,304-168,308,439	Gain	22%
6	22q11.1q12.2	13,90	14,884,298-28,780,068	22q11.1q12.2	14,28	14,513,474-28,788,931	Gain	83%
7	8p12q11.21	18,92	29,931,143-48,853,412	8p12q11.21	18,77	29,911,138-48,685,098	Gain	63%
8	9p 9q13q21.13	45,15 8,54	210,253-45,359,327 70,174,173-78,718,791	9p 9q13q21.13	45,16 8,56	194,193-45,359,327 70,174,301-78,739,321	Gain Perte	28% 100%
9	1p13.3p11.1	13,96	107,037,550-121,013,236	1p13.3p11.1	13,53	107,492,533121,023,900	Gain	35%
10	19p13.11q13.11	20,66	18,127,482-38,787,392	19p13.11q13.11	20,75	18,097,140-38,844,116	Gain	45%

Tableau IX : Résultats obtenus en CGH-*array* sur les puces 244K personnalisées et 180K d'Agilent®

Patients	FISH	Mosaïque
1	chromosome 7* (wcp7)	20%
2	chromosome 9 (wcp9)	40%
3	chromosome 5 (wcp5+D5Z1)	25%
4	(M-FISH)	/
5	chromosome 1 (wcp1)	30%
6	chromosome 22 (wcp22)	50%
7	chromosome 8 (wcp8)	37,50%
8	chromosome 9 (D9Z1) chromosome 9 (RP11-404E6)	43% 100%
9	chromosome 1 (wcp1)	22%
10	Chromosome 19 (wcp19)	40%

* identifié en M-FISH

Tableau X : Confirmation des résultats par FISH.

- **Patient n°1 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryotype masculin avec un MCS en mosaïque (28% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryotype est en anneau, non satellisé et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°38). Le caryotype des parents est normal.

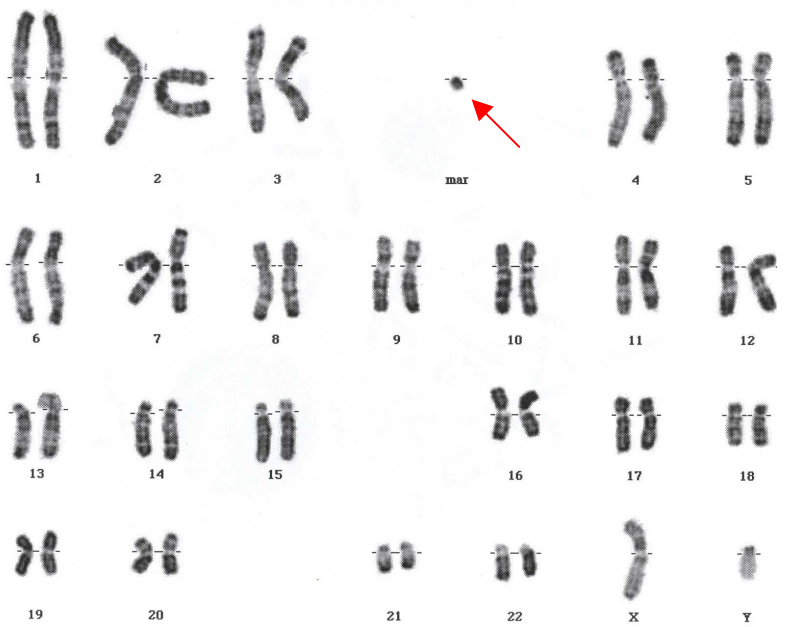


Figure n°38 : Caryogramme en bandes R du patient n°1 montrant le MCS

Une première tentative de caractérisation du MCS a été réalisée en MultiFISH centromère en 2007, avant la mise en place de la plateforme CGH sur Lyon. Cependant, la technique n'a pas permis l'identification du MCS.

La technique de CGH-*array* sur les différentes puces utilisées n'a pas permis d'identifier le MCS. En effet, l'observation attentive du profil des différents chromosomes n'a pas révélé de gain de la taille du MCS.

Parmi les méthodes possibles pour identifier ce MCS, le choix s'est à nouveau porté sur la technique MultiFISH qui est disponible au Hospices Civils de Lyon. Cette technique utilise le kit 24XCyte Human Multicolor FISH. Elle a permis de détecter et d'identifier le MCS sur certaines métaphases. Ainsi, après réalisation du caryogramme en couleur (Figure n°39 et n°40) le MCS apparaît dériver du chromosome 7.

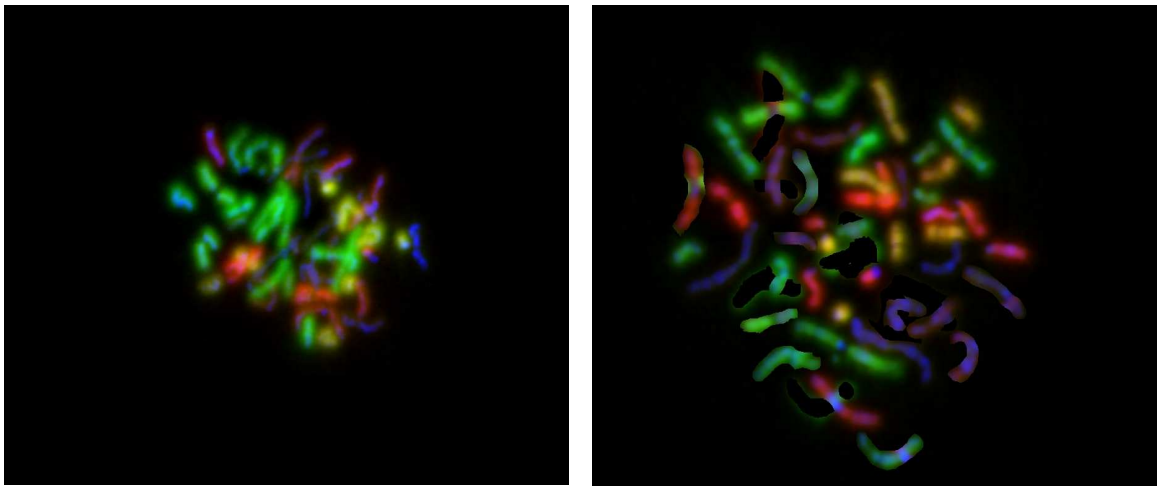


Figure n°39: Métaphases du patient n°1 observées après hybridation avec le kit 24XCyte Human Multicolor FISH (M-FISH) et traitement par le logiciel MetaSystems®.

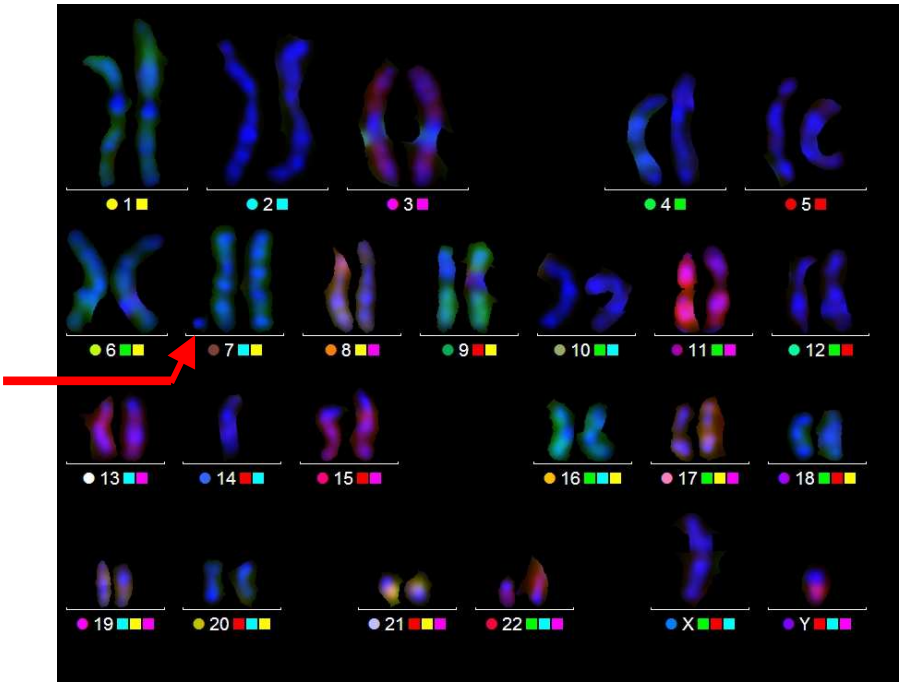


Figure n°40 : Caryogramme couleur obtenu en MultiFISH du patient n°1 avec le MCS (indiqué par la flèche rouge)

Le résultat a été confirmé par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence. La peinture du chromosome 7 (wcp7, AQUARIUS®) confirme l'origine du MCS.

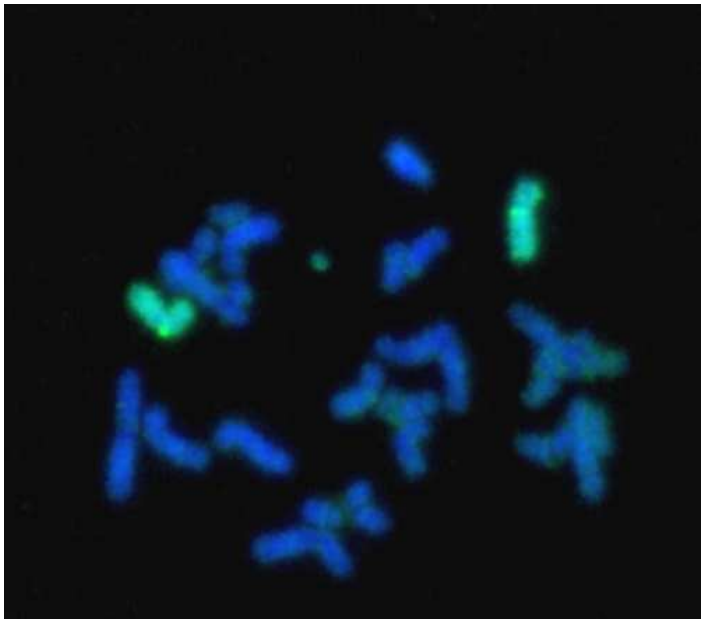


Figure n°41: Sonde wcp7 hybridant les chromosomes 7 et le MCS.

Après les méthodes de cytogénétique conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°1 peut être décrit par :

mos 47,XY,+mar.ish r(7)(wcp7+)[20/100]dn

- **Patient n°2 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme féminin avec un MCS en mosaïque (40% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est en anneau, non satellisé et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°42). Le caryogramme des parents et de la sœur a été réalisé. La mère et la sœur sont porteuses du MCS dans 25% des cellules examinées. L'examen clinique de ces dernières révèle un déficit intellectuel.

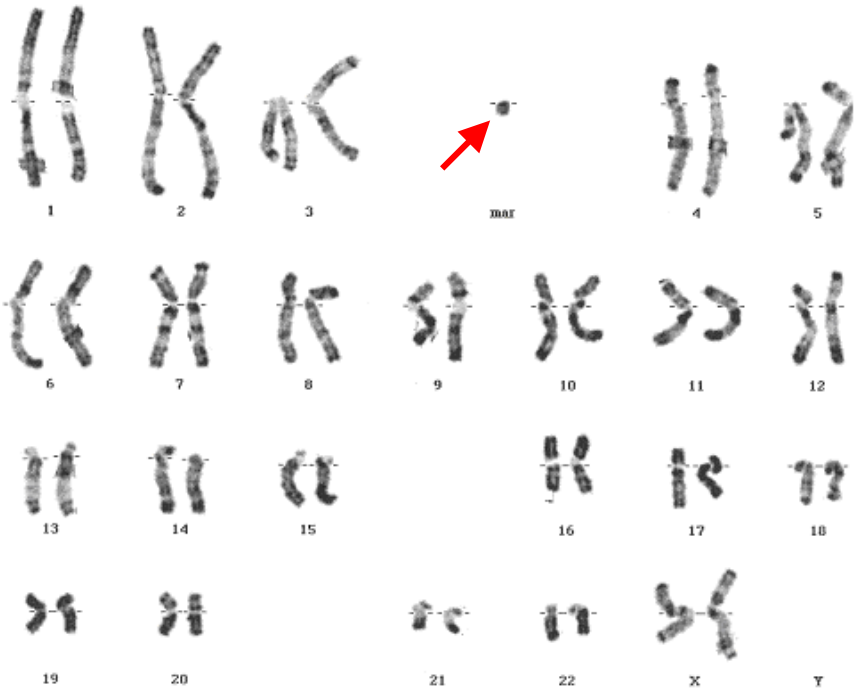


Figure n°42 : Caryogramme en bandes R du patient n°2 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un gain sur le chromosome 9, en mosaïque (26% à partir des valeurs des log2 ratio), indiquant que le MCS dérive du chromosome 9. La région se situe entre les bandes 9p21.1 et 9p11.1, allant de la position génomique 30,392,242 à 47,002,237 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°43). Sur la puce 180K (Figure n°44), la région impliquée se situe entre les bandes 9p21.1 et 9p11.1, allant de l'oligonucléotide 30,311,408 à 45,359,386 (hg18).

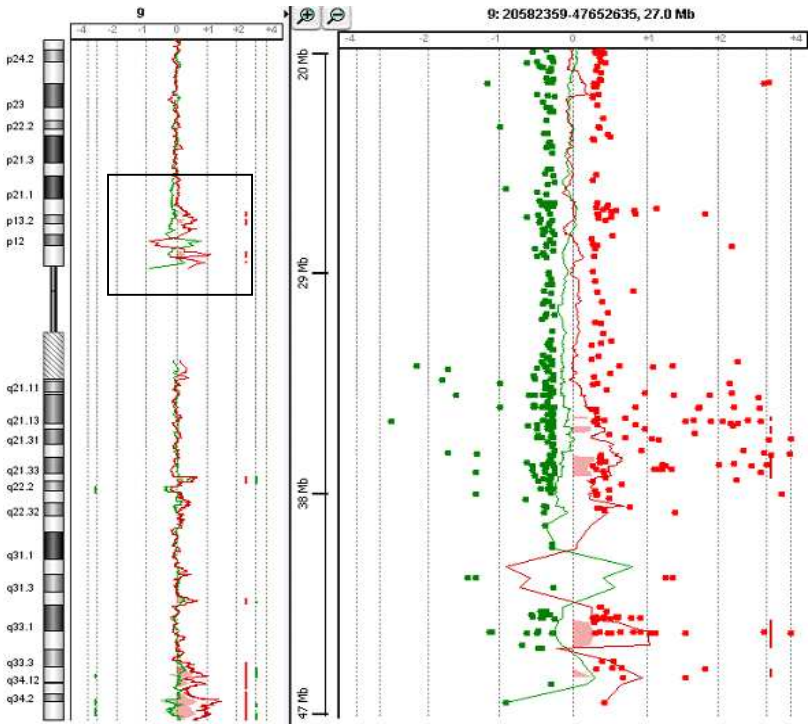


Figure n°43 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

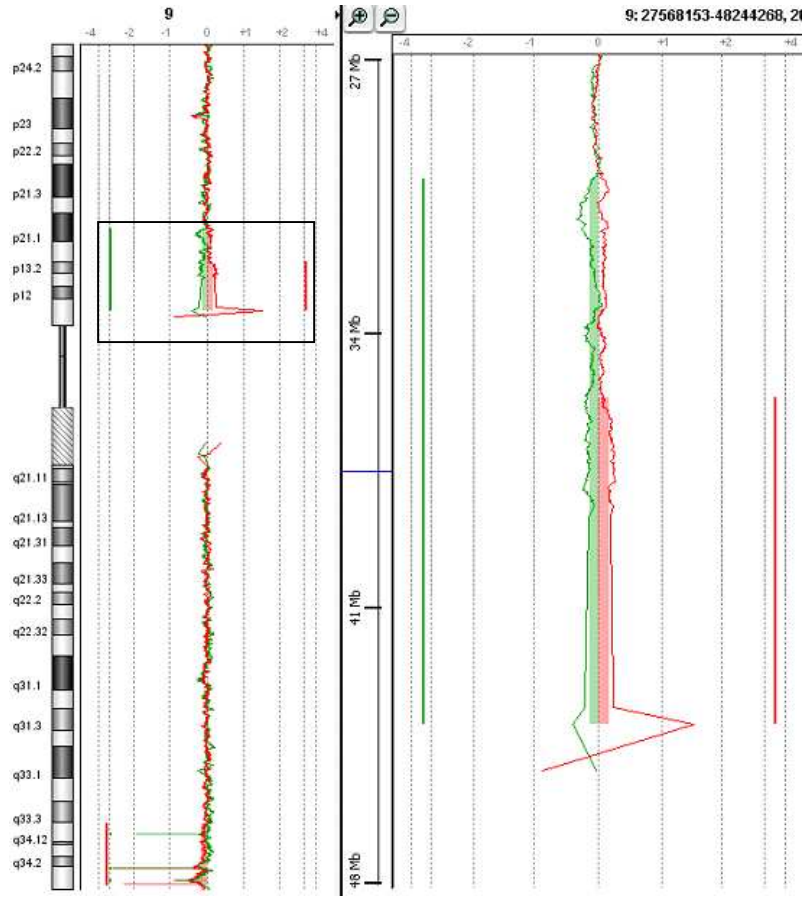


Figure n°44 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat a été réalisée par la méthode d'hybridation *in situ* en fluorescence. La sonde centromérique du chromosome 9 (D9Z1, AQUARIUS®) révèle une hybridation sur le MCS, confirmant que ce dernier dérive du chromosome 9 et qu'il inclut le centromère.

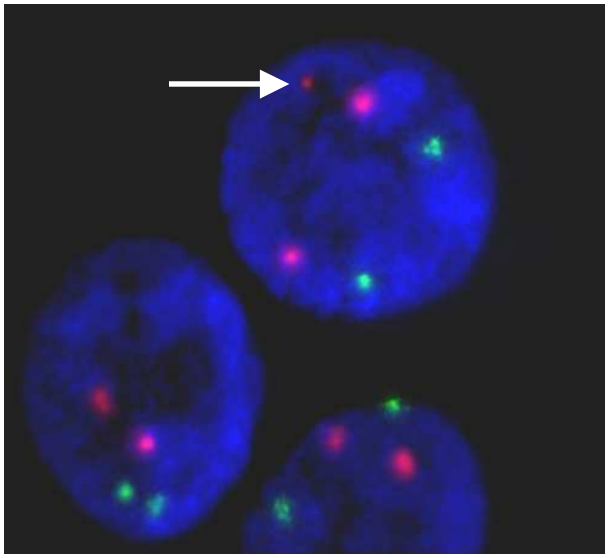


Figure n°45: Sondes Vysis® D9Z1 (rouge) et D7Z1 (vert) hybridant les centromères des chromosomes 7, 9. Le MCS est hybridé avec le centromère du chromosome 9.

Après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°2 peut être décrit par :

mos 47,XX,+r.ish r(9)(D9Z1x1)[40/100].arr 9p21.1p11.1(30,392,242-47,002,237)x2~3 mat

- **Patient n°3 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme masculin avec un MCS en mosaïque (16% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est en anneau, non satellisé et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°46). Le caryogramme des parents est normal.

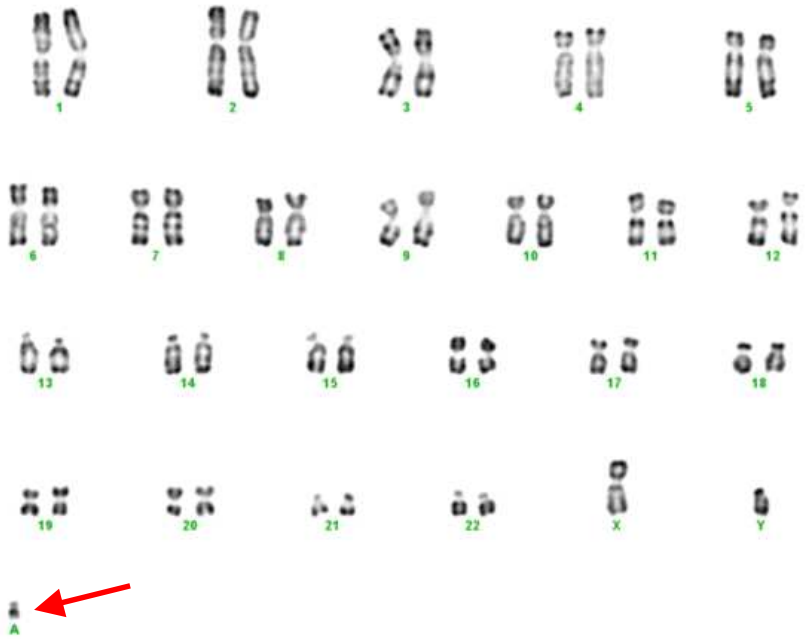


Figure n°46 : Caryogramme en bandes R du patient n°3 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un gain sur le chromosome 5, en mosaïque (18% à partir des valeurs des log2 ratio), indiquant que le MCS dérive du chromosome 5. La région se situe entre les bandes 5p14.1 et 5p11 allant de la position génomique 25,316,789 à 46,154,233 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°47). Sur la puce 180K (Figure n°48), la région impliquée se situe entre les bandes 5p14.1 et 5p11, allant de la position génomique 25,710,449 à 46,136,124 (hg18).

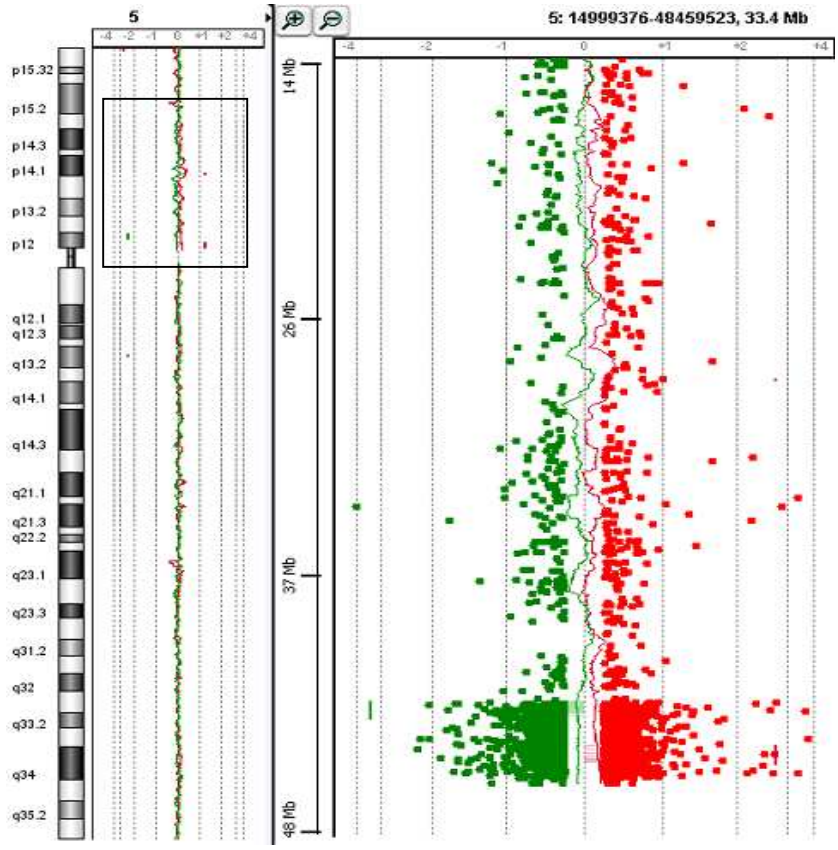


Figure n°47 : Profil en CGH-*array* du chromosome 5 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

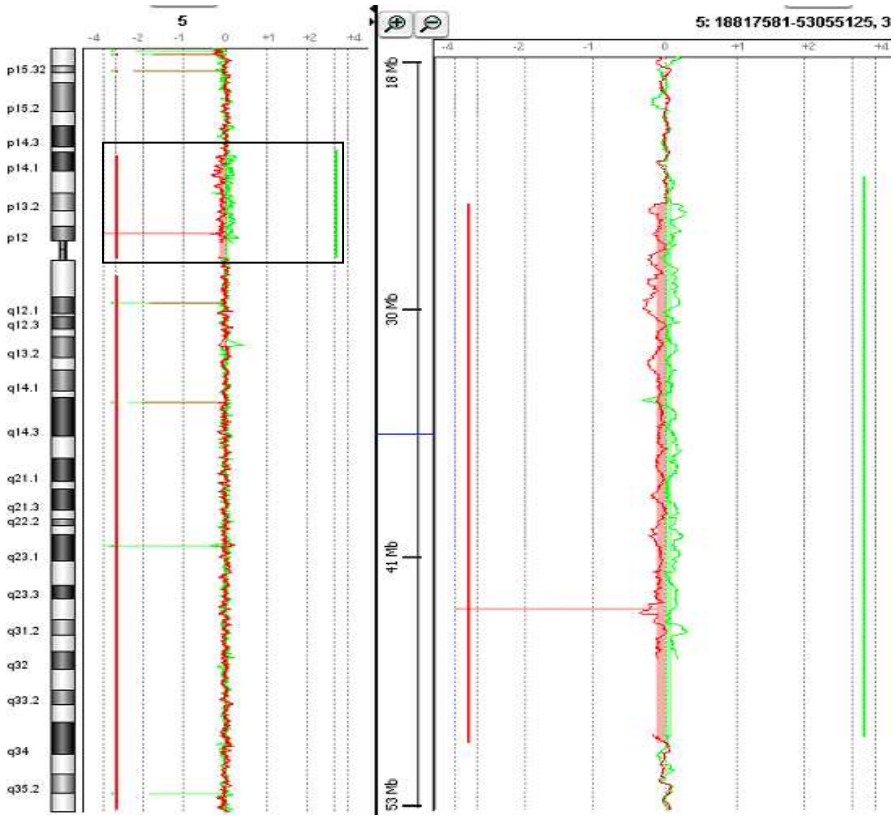


Figure n°48 : Profil en CGH-*array* du chromosome 5 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat a été réalisée par FISH. La sonde peinture du chromosome 5 (wcp5, AQUARIUS®) révèle une hybridation sur le MCS, confirmant que ce dernier dérive du chromosome 5 (Figure n°49).

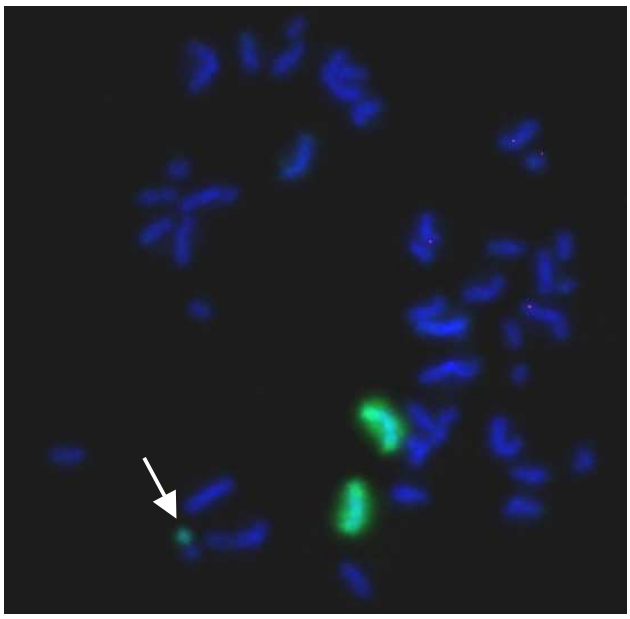


Figure n°49: Sonde Aquarius® wcp5 hybridant les chromosomes 5 et le MCS (Mitose).

Après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°3 peut être décrit par :

mos 47,XY,+r.ish r(5)(wcp5+)[25/100].arr 5p14.1p11(25,316,789-46,154,233)x2~3 dn

- **Patient n°4 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme masculin avec un MCS en mosaïque (8% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est monocentrique et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°50). Le caryogramme des parents est normal.

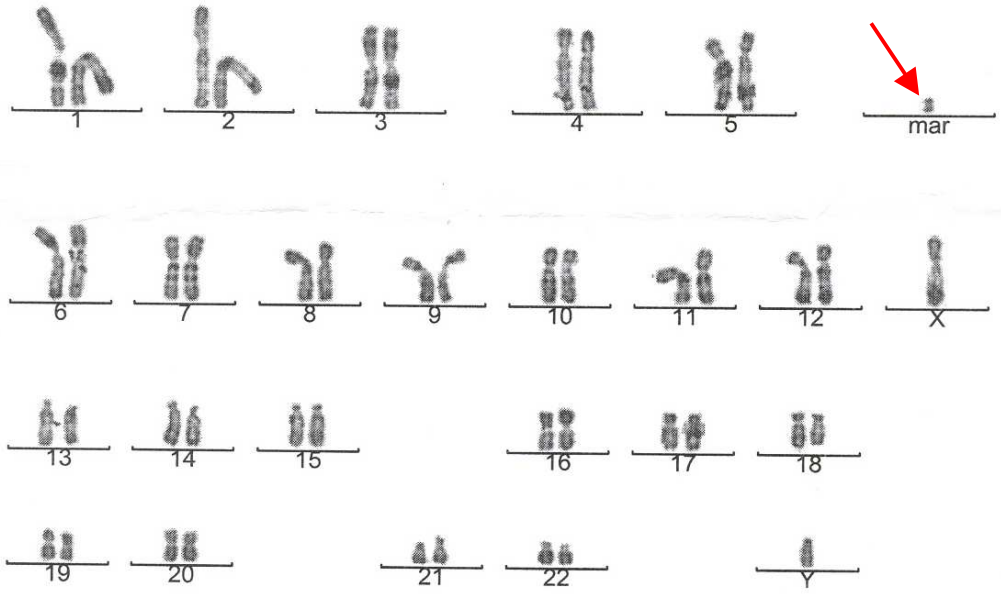


Figure n°50 : Caryogramme en bandes R du patient n°4 montrant le MCS

La technique de CGH-*array* sur les différentes puces utilisées n'a pas permis d'identifier le MCS. En effet, l'observation attentive du profil des différents chromosomes ne révèle pas de gain de la taille du MCS.

Comme pour le patient n°1 la technique MultiFISH a été réalisée pour identifier le MCS. Malgré une centaine de mitoses observées, le MCS n'a pas été détecté, il n'est donc pas identifié.

Dans ce cas, le caryogramme est : mos 47,XY,+mar dn

- **Patient n°5 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme féminin avec un MCS en mosaïque (29% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est en anneau et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°51). Le caryogramme des parents est normal.

Figure n°51 : Caryogramme en bandes R du patient n°5 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un gain sur le chromosome 1, en mosaïque (22% à partir des valeurs des log2 ratio), indiquant que le MCS dérive du chromosome 1. La région se situe entre les bandes 1q21.1 et 1q24.2, allant de la position génomique 142,448,039 à 168,114,436 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°52). Sur la puce 180K (Figure n°53), la région impliquée se situe entre les bandes 1q21.1 et 1q24.2, allant de la position génomique 143,706,304 à 168,308,439 (hg18).

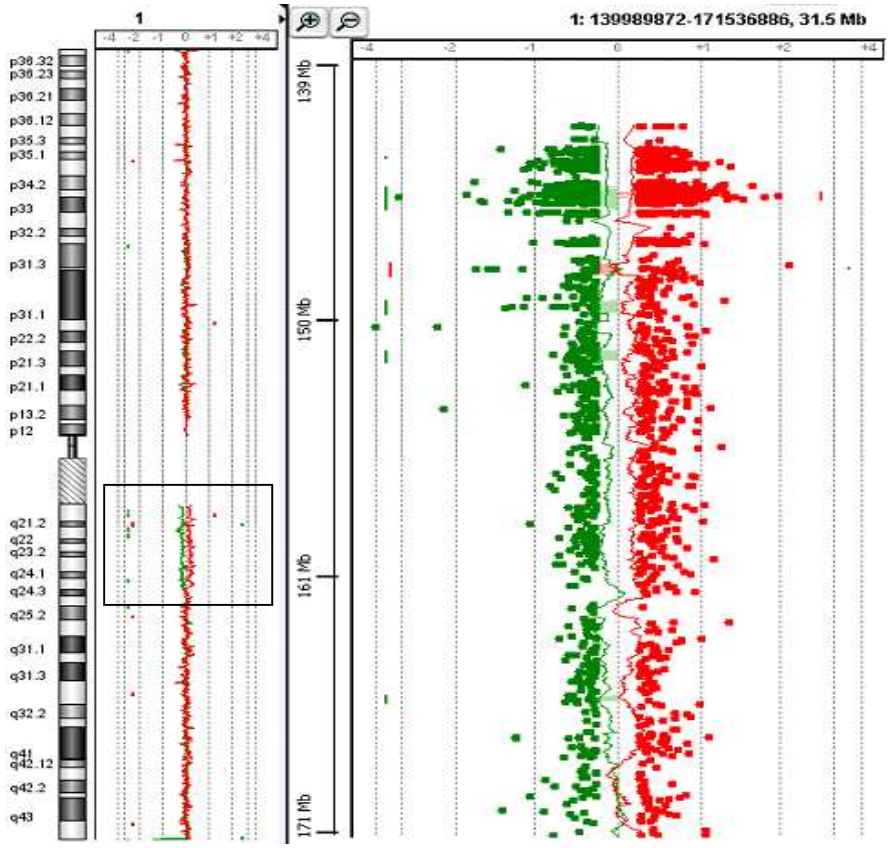


Figure n°52 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

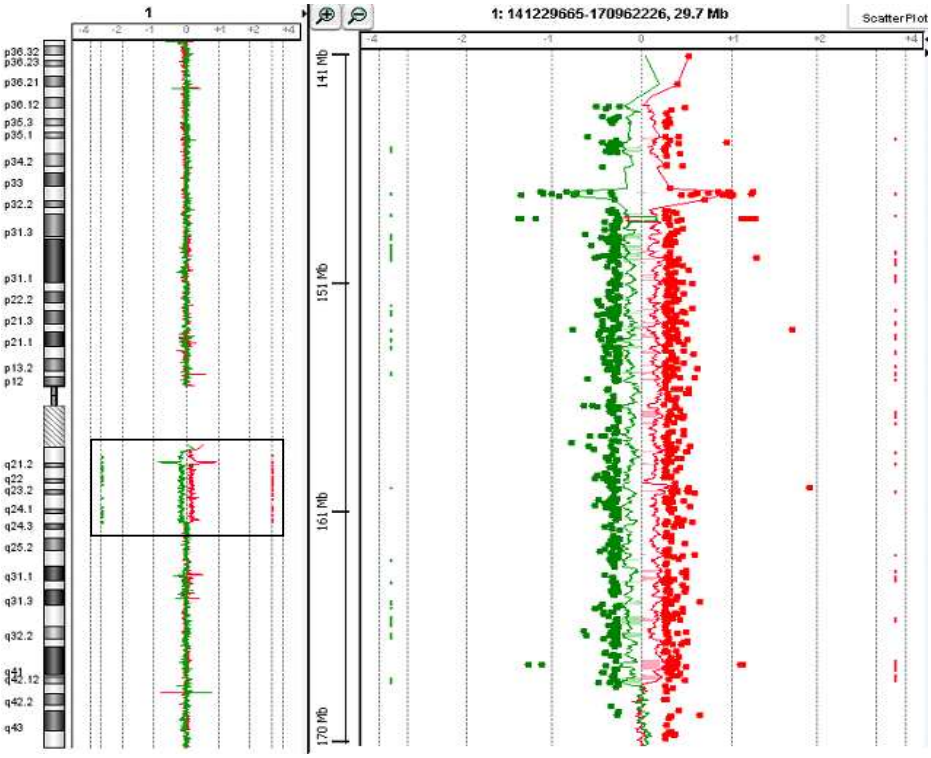


Figure n°53 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat a été réalisée par FISH. La peinture du chromosome 1 associée à la sonde 1qh (wcp1,1qh, AQUARIUS®) hybrident le MCS, confirmant que ce dernier dérive du chromosome 1(Figure n°54).

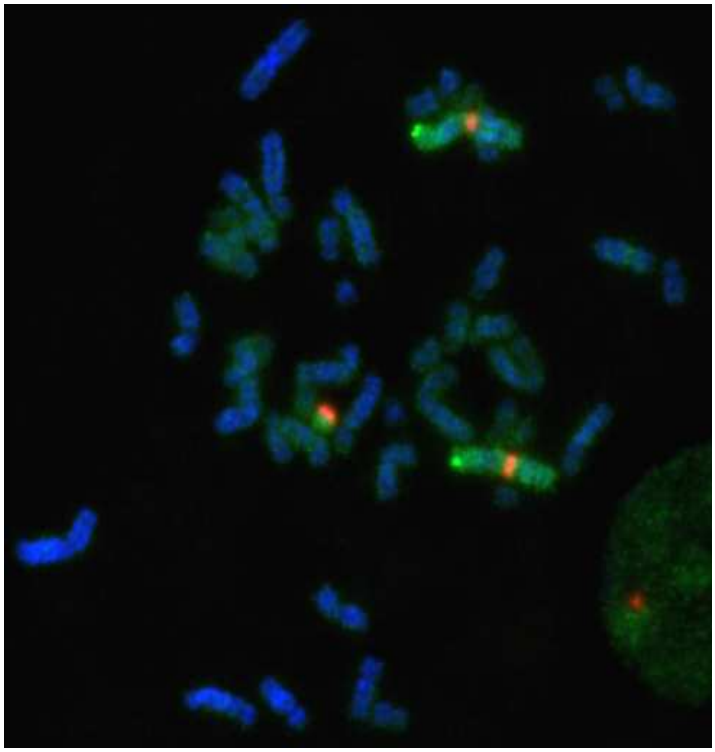


Figure n°54: Sondes wcp1 (vert) et 1qh (rouge) hybridant les chromosomes 1 ainsi que le MCS.

Après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°5 peut être décrit par :

mos 47,XX,+r.ish r(1)(wcp1+,1qh+)[30/100].arr 1q21.1q24.2(142,448,039-168,114,436)x2~3 dn

- **Patient n°6 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme féminin avec un MCS en mosaïque (57% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°55). Le caryogramme des parents est normal.

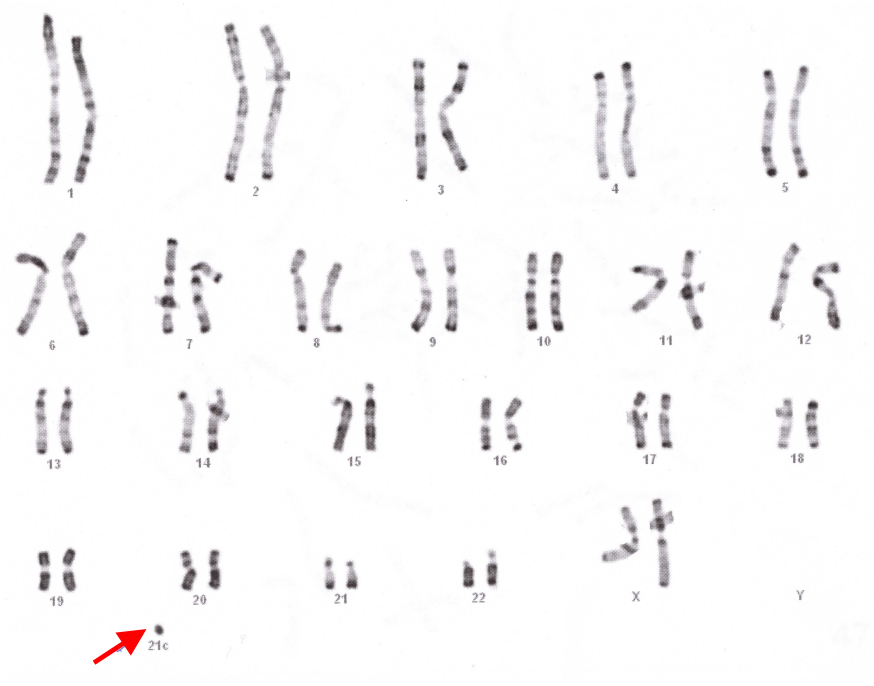


Figure n°55 : Caryogramme en bandes R du patient n°6 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un gain sur le chromosome 22, en mosaïque (83% à partir des valeurs des log2 ratio), indiquant que le MCS dérive du chromosome 22. La région se situe entre les bandes 22q11.1 et 22q12.2, allant de la position génomique 14,884,298 à 28,780,068 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°56). Sur la puce 180K (Figure n°57), la région impliquée se situe entre les bandes 22q11.1 et 22q12.2, allant de la position génomique 14,513,474 à 28,788,931 (hg18).

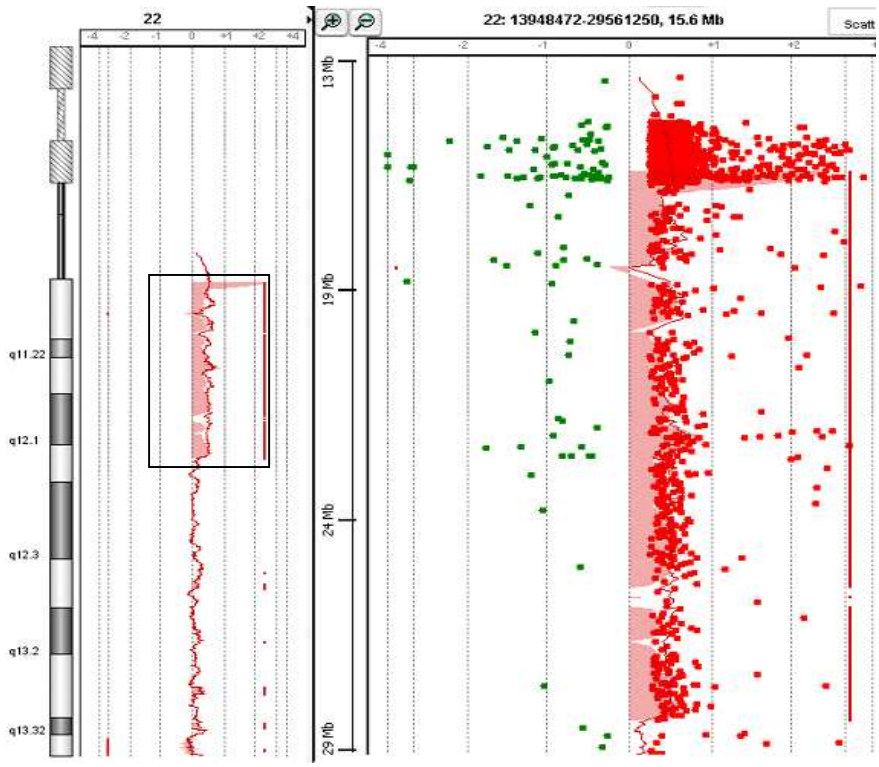


Figure n°56 : Profil en CGH-*array* du chromosome 22 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

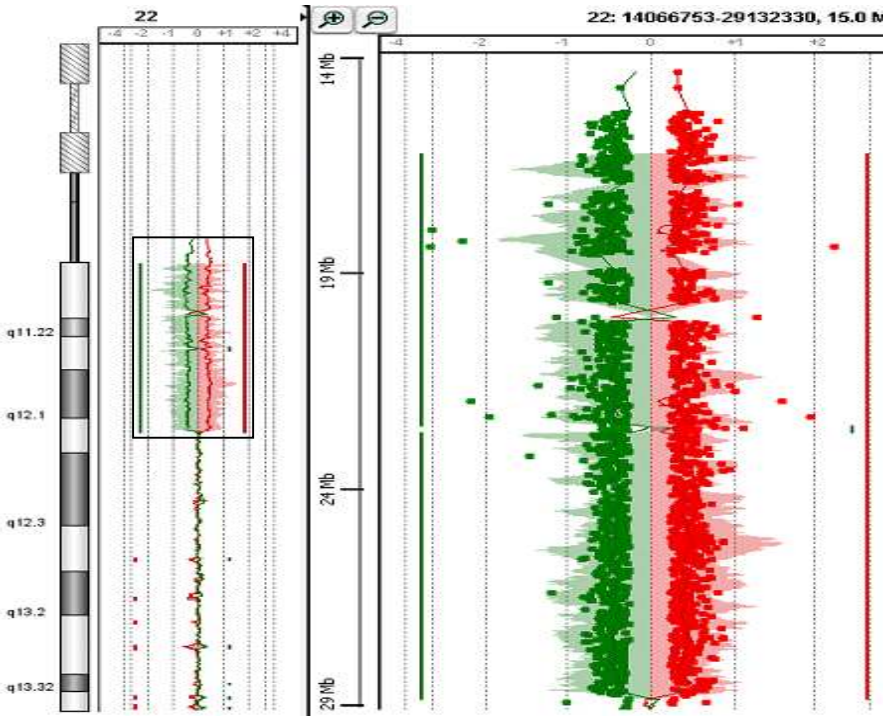


Figure n°57 : Profil CGH-*array* du chromosome 22 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat a été réalisée par FISH. La peinture du chromosome 22 (wcp22, AQUARIUS®) révèle un signal d'hybridation sur le MCS, confirmant que ce dernier dérive du chromosome 22 (Figure n°58).

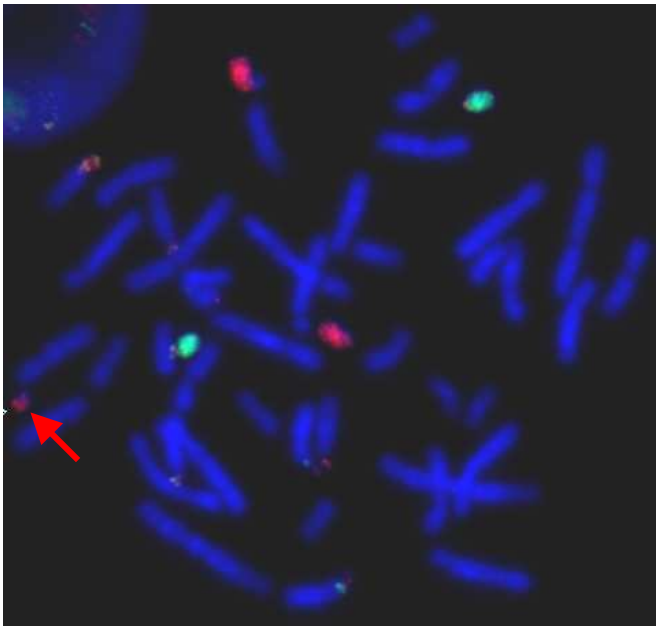


Figure n°58 : Sondes peintures wcp21 (vert) et wcp22 (rouge) hybridant les chromosomes 21, 22. Le MCS est peint avec la peinture du chromosome 22.

Après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°6 peut être décrit par :

mos 47,XX,+mar.ish mar(22)(wcp22+)[50/100].arr 22q11.1q12.2(15,429,384-28,780,068)x2~3 dn

- **Patient n°7 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme masculin avec un MCS en mosaïque (75% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est en anneau et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°59). Le caryogramme des parents est normal.

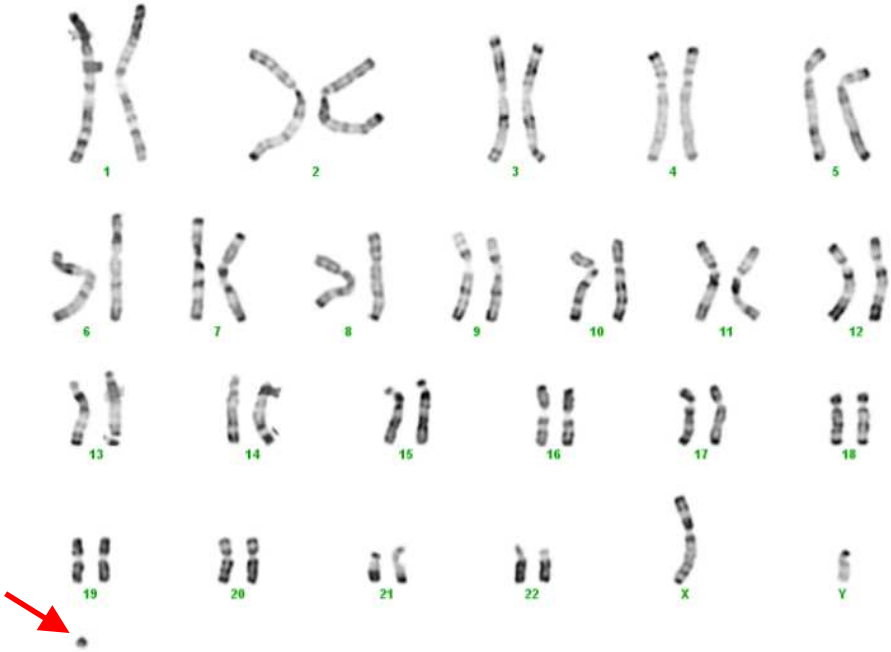


Figure n°59 : Caryogramme en bandes R du patient n°7 montrant le MCS.

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un gain sur le chromosome 8, en mosaïque (62.5% à partir des valeurs des log2 ratio), indiquant que le MCS dérive du chromosome 8. La région se situe entre les bandes 8p12 et 8q11.21, allant de la position génomique 29,931,143 à 48,853,412 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°60). Sur la puce 180K (Figure n°61), la région impliquée se situe entre les bandes 8p12 et 8q11.21, allant de la position génomique 29,911,138 à 48,685,098 (hg18).

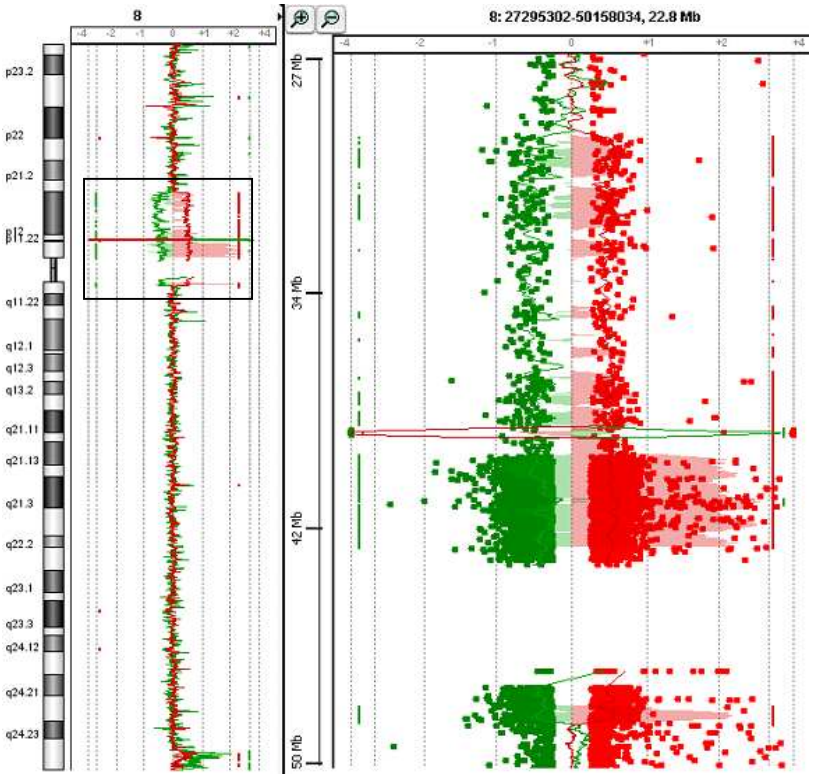


Figure n°60 : Profil en CGH-*array* du chromosome 8 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

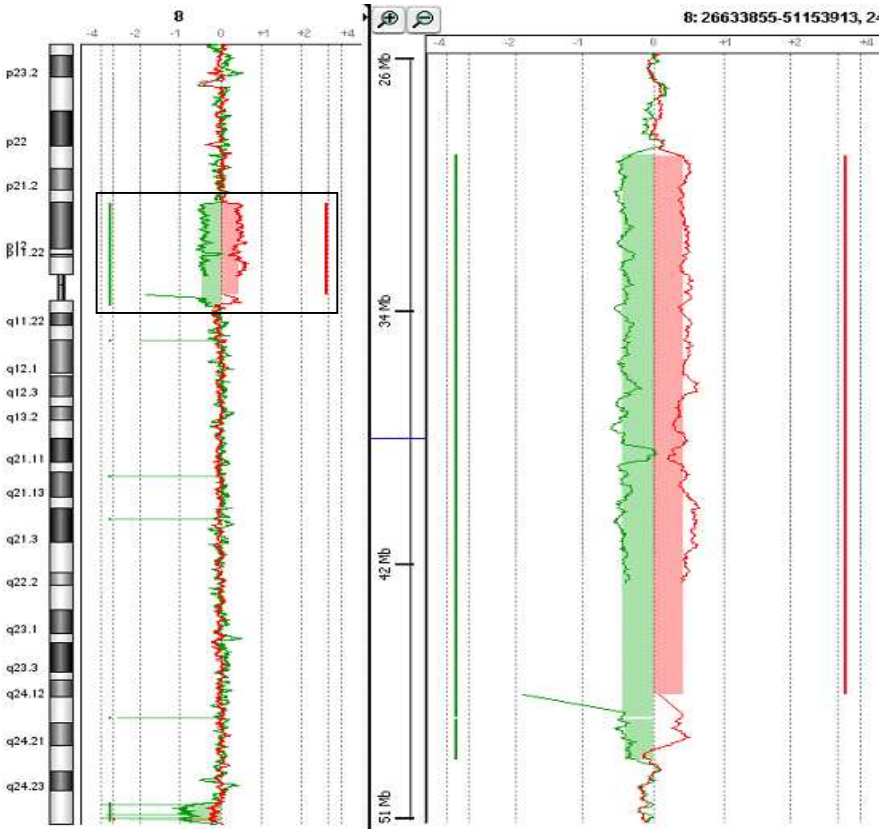


Figure n°61 : Profil en CGH-*array* du chromosome 8 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat est réalisée par FISH. La peinture du chromosome 8 (wcp8, Qbiogene®) révèle une hybridation sur le MCS, confirmant que ce dernier dérive du chromosome 8 (Figure n°62).

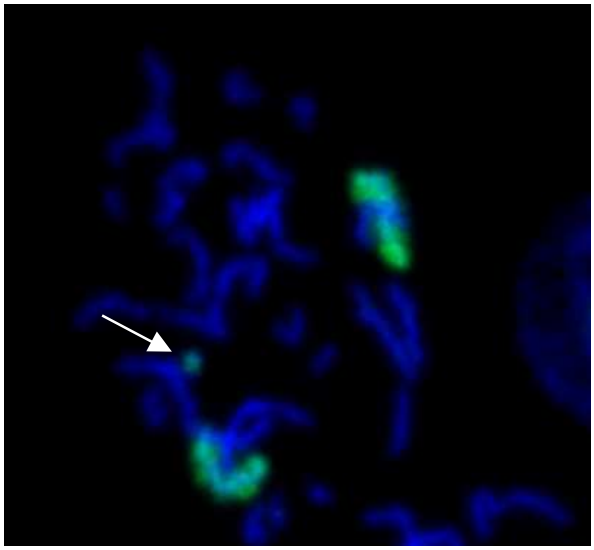


Figure n°62 : Sondes peintures wcp8 (vert) hybridant les chromosomes 8 et le MCS

Après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°7 peut être décrit par :

mos 47,XY,+r[40]/46,XY[15].ish r(8)(wcp8+)[15/40].arr 8p12q11.21(29,931,143-48,853,412)x2~3 dn

- **Patient n°8 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme féminin complexe, avec mise en évidence de 3 populations cellulaires :

- 50% des mitoses sont 46,XX,
- 40% des mitoses ont un MCS en anneau (Figure n°63),
- 10% des mitoses ont un dérivé 9 d'une translocation (9;21).

Le caryogramme des parents est normal.

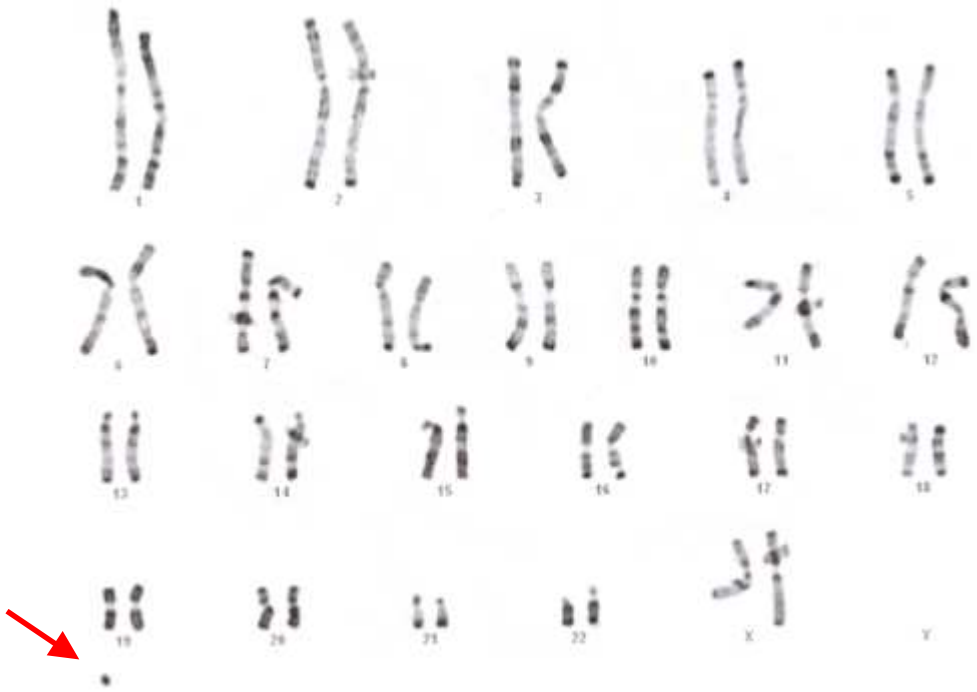


Figure n°63 : Caryogramme en bandes R du patient n°8 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un profil inhabituel en 9p en faveur d'un gain pour l'ensemble du bras court du chromosome 9. Ce gain, en mosaïque (28% à partir des valeurs des log2ratio), indique que le MCS dérive du chromosome 9. Il correspond à l'intervalle allant de la position génomique 210,253 à 45,359,327 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°64) et de la position génomique 194,193 à 45,359,327(hg18) sur la puce 180K (Figure n°65).

L'examen a également permis de détecter une délétion 9q21 hétérozygote et homogène allant de la position génomique 70,174,173 à 78,718,791 (hg18) sur la puce 244K. Cette délétion a également été identifiée par la puce 180K avec un intervalle quasiment similaire (70,174,301 à 78,739,321).

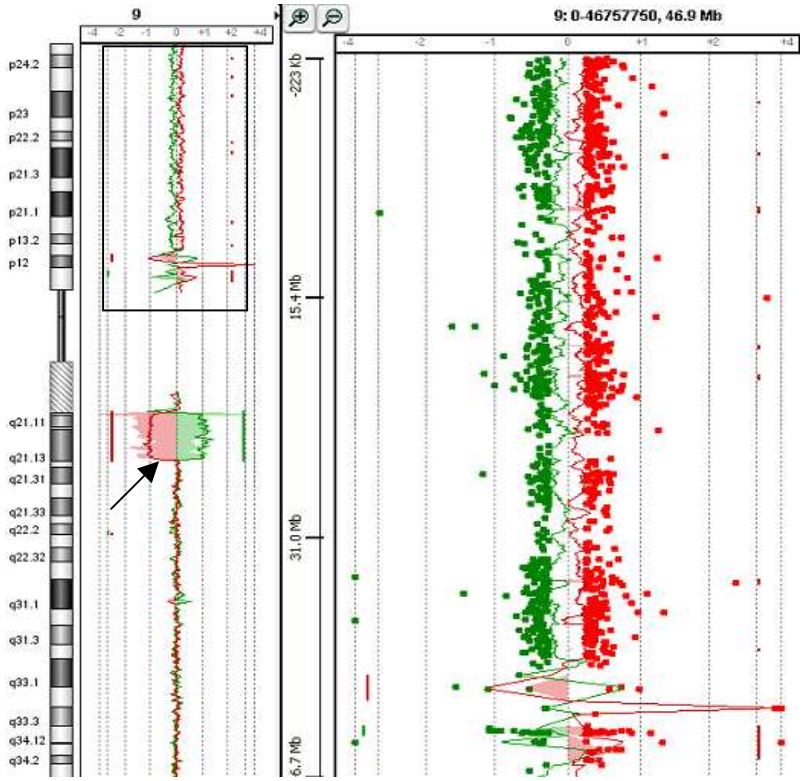


Figure n°64 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré. La perte en miroir est indiquée par la flèche.

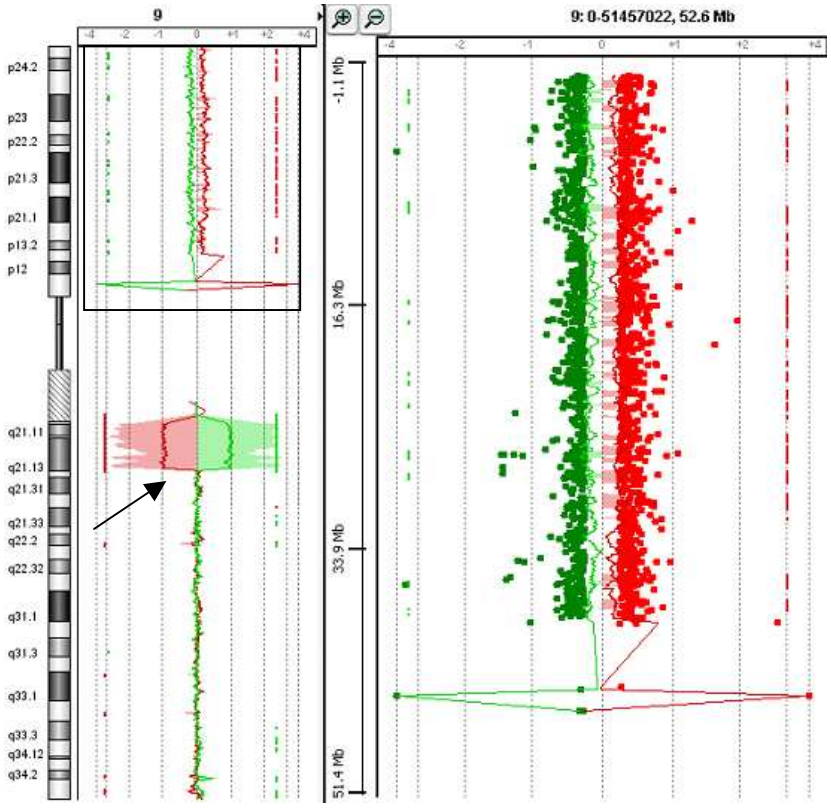


Figure n°65 : Profil en CGH-*array* du chromosome 9 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré. La perte en miroir est indiquée par la flèche.

La confirmation du résultat a été réalisée par FISH. La mise en évidence de la délétion 9q13q21.13 a nécessité l'utilisation de la sonde spécifique RP11-404E6 localisée en 9q21.3 (Figure n°67); la détection du MCS s'est faite à l'aide de la sonde centromérique 9 (D9Z1, AQUARIUS®)(Figure n°66). Etonnement, un MCS autre que l'anneau est mis en évidence avec les sondes 9pter (9ptel30, AQUARIUS®) : un isochromosome 9p (Figure n°67).

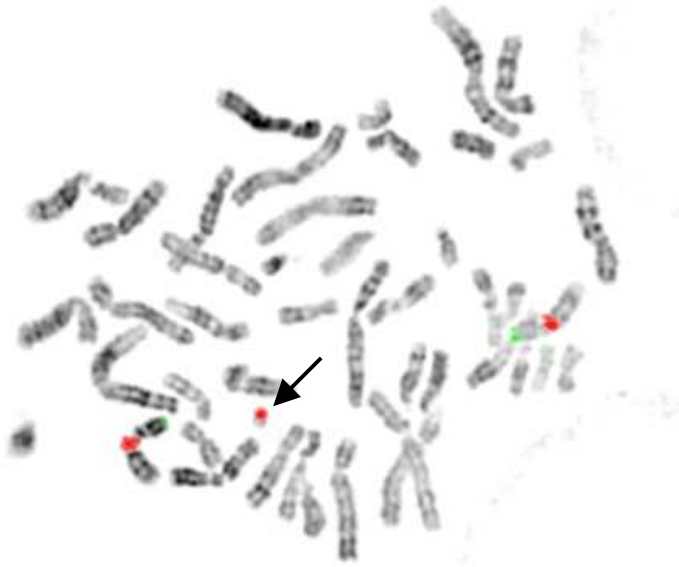


Figure n°66 : Sondes D9Z1 (rouge) et 9ptel30 (rouge) hybridant les chromosomes 9. Le MCS hybride avec la sonde D9Z1.

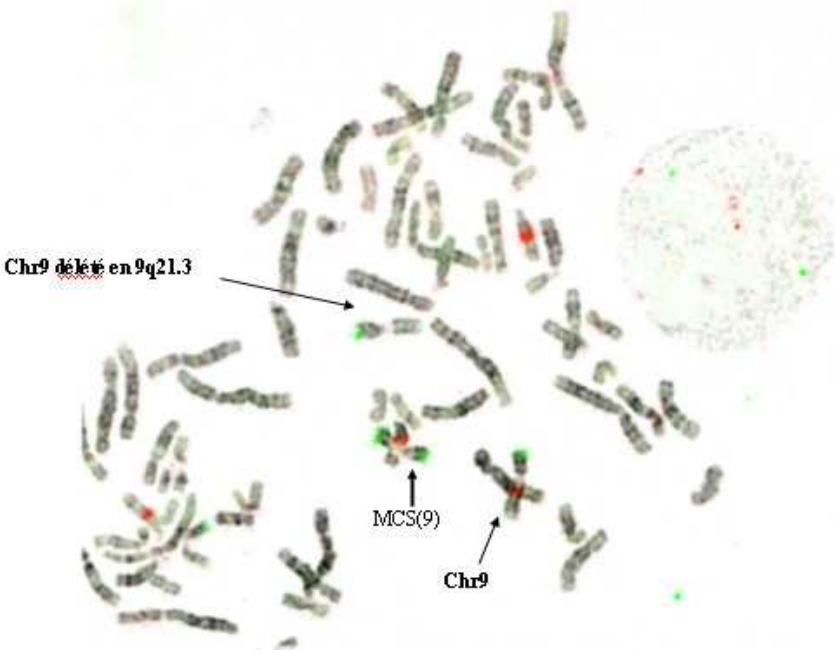


Figure n°67 : Hybridation des sondes RP11-404E6 en 9q21.3 (Orange) et 9pter (V) Contrôle. Le MCS, isochromosome 9p hybride avec la sonde spécifique 9ptel30 (9pter).

Au final, quatre populations cellulaires ont été mises en évidence :

- Une population principale avec une délétion homogène hétérozygote 9q13q21.13,
- Une population avec une délétion 9q13q21.13 sur un chromosome 9 et la présence du dérivé 9 de la translocation (9;21) aboutissant à une trisomie 9p (dans 8% des cellules examinées),
- Une population avec une délétion 9q13q21.13 sur un chromosome 9 et la présence d'un MCS(9) en anneau (dans 36% des cellules examinées).
- Une population avec une délétion 9q13q21.13 sur un chromosome 9 et la présence d'un isochromosome 9p (dans 7% des cellules examinées)

La délétion 9q13q21.13 se révèle être *de novo* après vérification par FISH sur les prélèvements des parents.

Après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, le caryogramme final du patient n°8 peut être décrit par :
mos 47,XX,+r[20]/46,XX,-21,+der(9)t(9;21)[5]/46,XX[25].ish mar(9)(D9Z1+)[43/100].
arr 9p(210,253-45,359,327)x2~3, 9q21(70,174,301-78,739,321)x1 dn

- **Patient n°9 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme féminin avec un MCS en mosaïque (27% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est en anneau et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°68). Le caryogramme des parents est normal.

Figure n°68 : Caryogramme en bandes R du patient n°9 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un profil inhabituel en 1p en faveur d'un gain pour une partie du bras court du chromosome 1. Ce gain, en mosaïque (35% à partir des valeurs des log2ratio), indique que le MCS dérive du chromosome 1. Il correspond à la région 1p13.3-1p11.2, allant de la position génomique 107,492,533 à 121,023,900 (hg18) sur la puce 180K (Figure n°69). Sur la puce 244K personnalisée, la région impliquée est localisée au niveau des bandes 1p13.3p11.2, et va de la position génomique 107, 037, 550 à 121, 013, 236 (hg18) (Figure n°70).

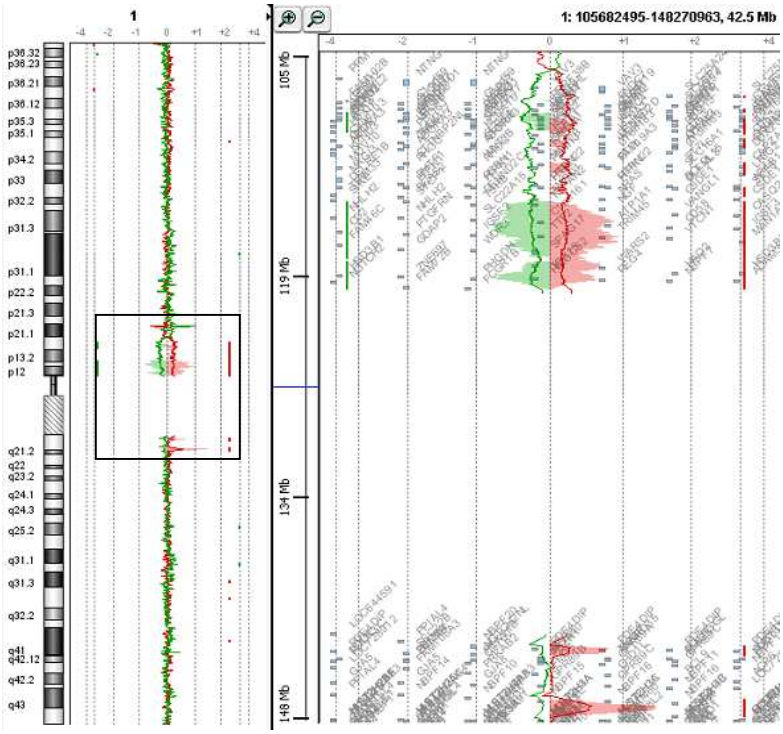


Figure n°69 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

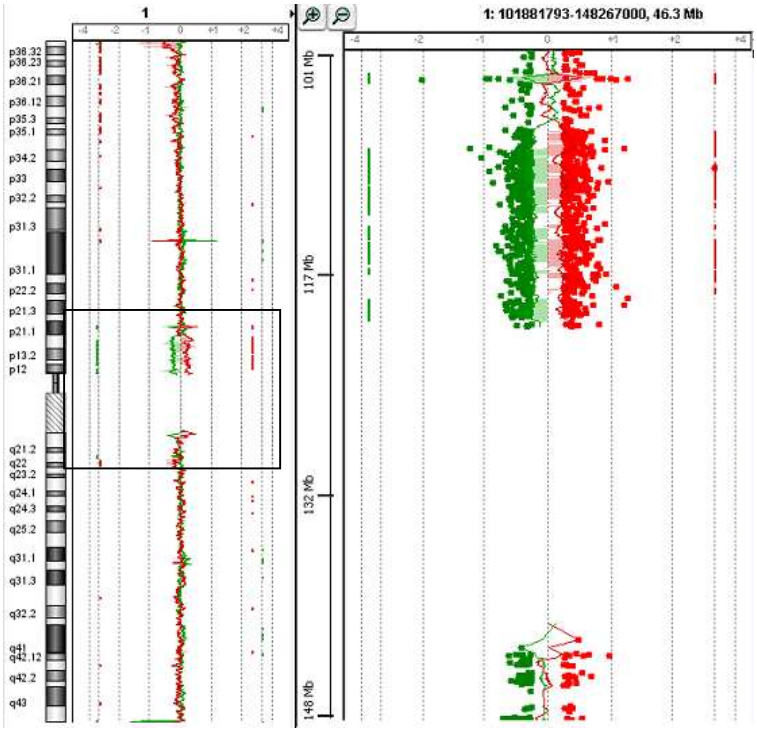


Figure n°70 : Profil en CGH-*array* du chromosome 1 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat a été réalisée par FISH. La mise en évidence du MCS a été possible par l'emploi de la peinture du chromosome 1 (wcp1, AQUARIUS®) (Figure n°71).

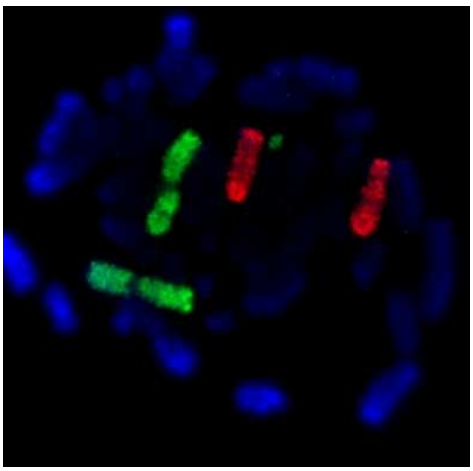


Figure n°71: Sondes wcp1 (vert) hybridant les chromosomes 1 ainsi que le MCS. En rouge la sonde wcp5 hybridant les chromosomes 5.

Le caryogramme final du patient n°9, après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, peut être décrit par :

mos 47,XX,+r.ish r(1)(wcp1+)[22/100].arr 1p13.3p11.2(107,037,550-121,013,236)x2~3 dn

- **Patient n°10 :**

L'analyse en cytogénétique conventionnelle en bandes R et G sur des lymphocytes sanguins périphériques révèle un caryogramme masculin avec un MCS en mosaïque (38% des cellules examinées). Ce MCS observé sur le caryogramme est en anneau et de la taille d'un chromosome du groupe G, donc de petite taille (Figure n°72). Le caryogramme des parents est normal, donc le MCS est *de novo*.

Figure n°72 : Caryogramme en bandes R du patient n°10 montrant le MCS

L'étude en CGH-*array* a permis de détecter un profil inhabituel en 19 en faveur d'un gain pour une partie du bras court et long du chromosome 19, en mosaïque (28% à partir des valeurs des log2ratio), indiquant que le MCS dérive du chromosome 19. Ce gain correspond à l'intervalle allant de la position génomique 18,127,482 à 38,787,392 (hg18) sur la puce 244K personnalisée (Figure n°73). Sur la puce 180K, la région impliquée est localisée au niveau des bandes 19p13.11q13.11, et va de la position génomique 18,097,140 à 38,844,116 (hg18) (Figure n°74).

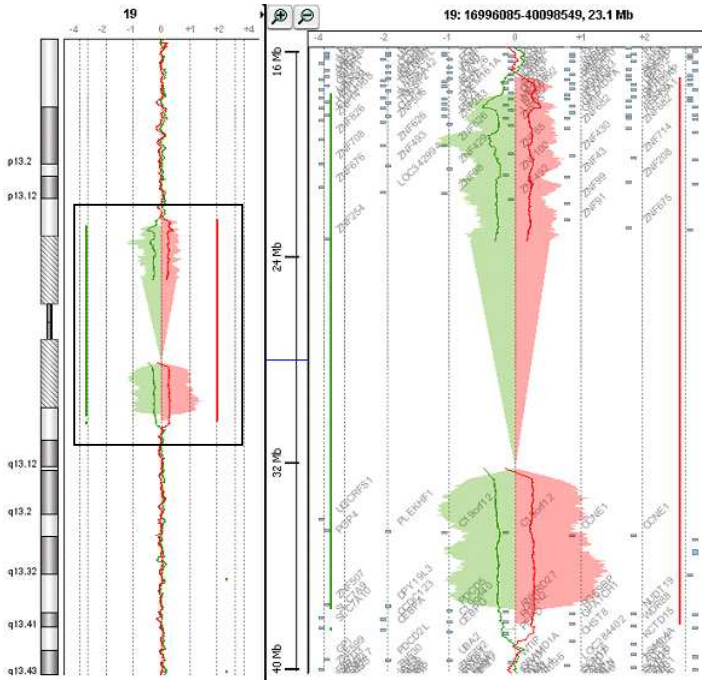


Figure n°73 : Profil en CGH-*array* du chromosome 19 sur puce Agilent® 244K personnalisée. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

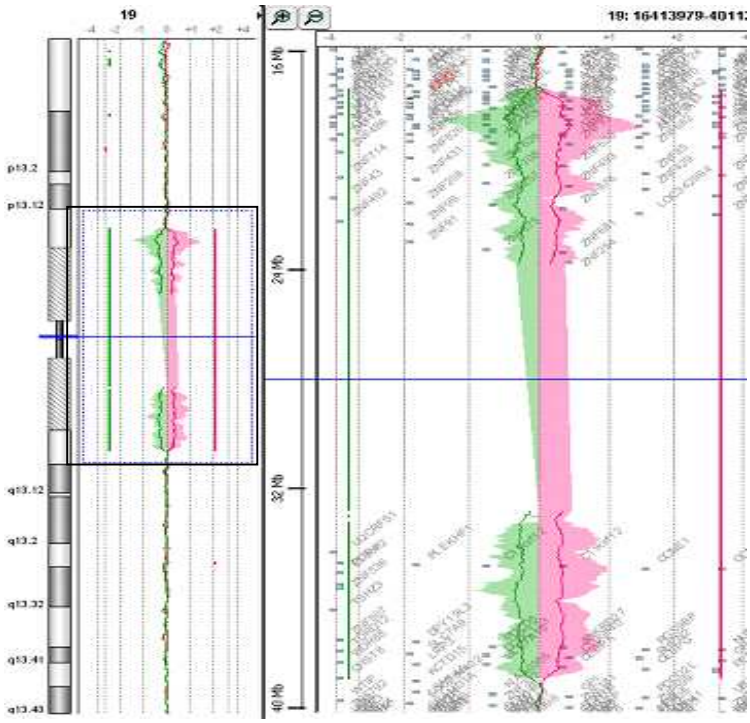


Figure n°74 : Profil en CGH-*array* du chromosome 19 sur puce Agilent® 180K. Le gain en miroir correspondant au MCS est encadré.

La confirmation du résultat a été réalisée par FISH. La mise en évidence du MCS a été possible par l'emploi de la peinture du chromosome 19 (wcp19, ONCOR®) (Figure n°75).

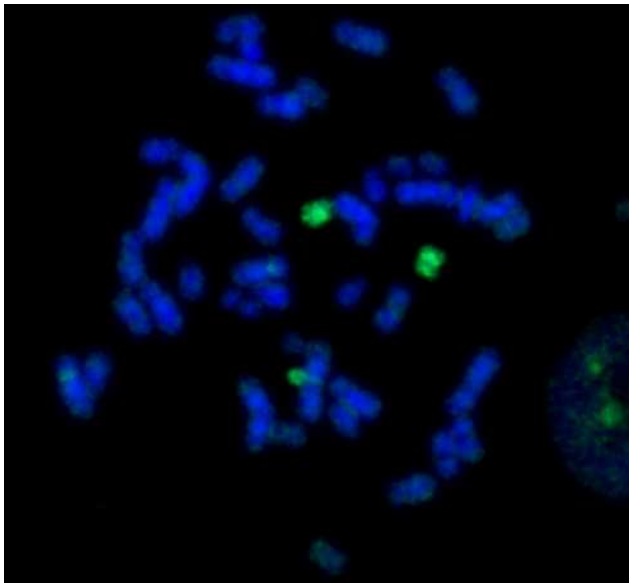


Figure n°75: Sondes wcp19 (vert) hybridant les chromosomes 19 ainsi que le MCS.

Le caryogramme final du patient n°10, après les méthodes de cytogénétiques conventionnelles et moléculaires, peut être décrit par :

mos 47,XY,+r.ish r(19)(wcp19+)[20/40].arr 19p13.1q13.1(18,127,482-38,787,392)x2~3 dn

4. DISCUSSION

La discussion portera tout d'abord sur la corrélation génotype-phénotype des MCS identifiés ou non, patient par patient. Nous aborderons ensuite l'utilité d'une puce personnalisée 244K par rapport à la puce 180K utilisée en routine dans le laboratoire. Un arbre décisionnel sera alors proposé afin d'optimiser la caractérisation d'un MCS, puis les limites de la technique et les applications cliniques de la CGH-*array* seront évoquées. Enfin, nous discuterons de l'éventuelle application de la technique de CGH-*array* en période prénatale.

4.1. Corrélation génotype-phénotype des MCS

Une base de données, mise à jour par le Dr Liehr dès qu'un cas de porteur de MCS est publié dans la littérature, est disponible sur internet (htpp//www.med.uni-jena.de). Cette base répertorie plus de 3300 patients porteurs d'un MCS. Il apparaît que les MCS constitués uniquement de la région centromérique n'ont pas d'incidence sur le phénotype car il s'agit d'une région pauvre en gènes (Manvelyan *et al*., 2008 ; Baldwin *et al*., 2008 ; Starke *et al*., 2003). En revanche, les MCS constitués par des régions euchromatiques (régions riches en gènes) présentent un risque élevé d'être responsables d'un phénotype anormal même lorsqu'ils sont en mosaïque.

Dans notre étude incluant 10 patients avec un MCS, la technique de CGH-*array* a permis l'identification et la caractérisation de 8 MCS.

<u>MCS identifiés par la technique de CGH-*array*</u>

La CGH-*array* a permis d'identifier et de caractériser 8 des 10 MCS de l'étude. Ces MCS dérivent des chromosomes 1(2 cas), 5, 8, 9(2 cas),19 et 22.

<u>MCS dérivant du chromosome 1</u>

Le MCS(1) a été identifié par la CGH-*array* chez les patients n°5 et n°9. Les régions constituant les MCS sont différentes chez les 2 patients puisque l'un est constitué du bras court et l'autre du bras long.

Le MCS(1) du patient n°5 est constitué de la région 1q21.1q24.2. Cette région est incluse dans la région 1p21.1q24.3 décrite dans la littérature comme responsable de signes cliniques. En effet, un patient porteur d'un r(1)(::p13→q23::) en mosaïque (15%) a été rapporté avec retard mental et de multiples anomalies congénitales (Chen *et al.*,1995).

De même, un enfant avec un r(1)(::p1?3→q1?1::) a été rapporté comme présentant un retard de développement, une hypotonie, une dysmorphie faciale (Lanphear *et al*.,1995). Les signes cliniques décrits dans la littérature avec un MCS(1) concordent avec ceux observés chez le patient n°5 (retard mental, dysmorphie).

Le MCS(1) du patient n°9 est constitué de la région 1p13.3p11.2. Cette région comporte une partie rapportée comme pathogène : 1p13.3-1p12. Les signes cliniques observés chez le patient n°9 sont similaires à ceux retrouvés parmi les cas de la littérature (retard mental, trouble du langage, microcéphalie).

Les MCS(1) caractérisés par notre étude corroborent les observations rapportées dans la littérature. Les signes cliniques présentés par les patients n°5 et n°9 sont donc très probablement secondaires à la présence du MCS(1).

Tous les cas de MCS(1) rapportés dans la littérature sont *de novo* ; le taux de cellules affectées varie entre 16 et 100% et un seul tissu a été étudié.

MCS dérivant du chromosome 5

Le MCS(5) identifié chez le patient n°3, d'une taille d'environ 20Mb, comprend la région 5p11p14.1 dans laquelle se situe la région 5p14.1p13.2. Cette région est responsable d'effets délétères et des phénotypes les plus sévères (D'Amato Sizonenko *et al*., 2002 ; Sarri *et al*., 2006 ; Liehr *et al*., 2006 ; Baldwin *et al*., 2008). Les signes cliniques rapportés sont une dysmorphie faciale (épicanthus, hypertélorisme, micrognathie…) et un retard mental. Les signes cliniques observés chez le patient n°3 sont caractéristiques de la trisomie partielle du chromosome 5 et concordent avec les signes décrits dans la littérature pour la région critique 5p13 (D'Amato Sizonenko *et al*., 2002).

Parmi les nombreux gènes localisés sur le MCS, il est intéressant de noter la présence du gène *NIPBL* (*nipped-B like*). En haploinsuffisance (mutation inactivatrice essentiellement), ce gène est responsable du syndrome de Cornelia de Lange. Les signes cliniques associés à ce syndrome sont un aspect caractéristique du visage (synophris, oreilles bas implantées..), des anomalies des membres, un retard de croissance et un retard mental. Les signes observés chez le patient n°3 ne concordent pas avec le tableau clinique du syndrome. La présence de ce gène en trois exemplaires dans 18 % des cellules pourrait contribuer au phénotype. En effet, il a été montré que des gènes responsables d'un phénotype en haploinsuffisance pouvait également être responsable d'un phénotype, parfois voisin, en gain de fonction, comme cela a été décrit pour le gène *TBX1*.

Une corrélation directe entre le MCS(5) du patient n°3 et son phénotype peut donc être établie, cela malgré un mosaïcisme relativement faible (18%).

MCS dérivant du chromosome 8

Le MCS(8) identifié chez le patient n°7 est constitué de la région 8p12q11.21. D'après la littérature, les régions p21.2p11.22 et q11.22q12.1 sont responsables de signes cliniques notamment du retard mental (Batanian JR *et al*., 2000 ; Loeffler J *et al*.,2003 ; Weimer J *et al*.,2006 ; Brecevic L *et al*., 2006).

Au regard de la littérature, le MCS dérivant du chromosome 8 explique probablement le phénotype présenté par notre patient.

MCS dérivant du chromosome 9

Un MCS(9) a été détecté 2 fois dans notre étude (patient n°2 et n°8). Nous notons que seulement 22 patients avec un MCS dérivé du chromosome 9 sont rapportés dans la littérature alors que 2 patients sur 10 présentent un MCS(9) dans notre étude. La région rapportée comme pathogène dans la littérature est la région pter → p13.2. L'un des 2 MCS(9) de notre étude est entièrement constitué de cette région, l'autre ne comprend qu'une partie de cette région critique. Les signes cliniques observés pour nos patients concordent avec les signes cliniques décrits dans la littérature pour la région critique précédemment citée (retard mental et la dysmorphie faciale compatible).

Le MCS(9) du patient n°2 est hérité de la mère qui présente les mêmes signes cliniques que le cas étudié. Il est donc probable qu'il existe une corrélation entre la présence du MCS(9) du patient n°2 et le phénotype observé. De même, la corrélation entre le MCS(9) *de novo* et le phénotype observé chez le patient n°8 est confortée.

Notons que le MCS(9) du patient n°8 possède deux formes : un isochromosome 9p et un anneau 9p, constitué de l'ensemble du bras court et donc de taille importante (45Mb). Ce bras court contient de nombreux gènes, dont un grand nombre sont impliqués dans diverses pathologies. Parmi eux, on peut noter le gène *MRD2* (ou *DOCK8*) rapporté dans la littérature comme étant probablement impliqué dans le retard mental (Griggs *et al*., 2008). Les auteurs rapportent deux patients avec un retard mental : l'un présente une région subtélomérique 9p délété interrompant le gène *MRD2* ; l'autre présente une translocation avec un point de cassure associant une microdélétion au niveau du gène *MRD2*. L'haploinsuffisance de ce gène serait responsable du retard mental observé chez ces deux patients. D'autres études seraient nécessaires pour confirmer cette observation.

Actuellement, aucune publication ne rapporte ce gène en gain, mais comme pour le gène *TBX1*, il est possible que les signes cliniques observés en gain et en perte soient très similaires. Ce gène en gain pourrait donc être responsable du retard mental observé chez le patient n°8. D'autres études seraient nécessaires pour corroborer ces hypothèses.

MCS dérivant du chromosome 19

Le MCS(19) identifié chez le patient n°10 est constitué de la région euchromatique p13.1q13.1 (Dennis *et al*.,2009). D'après la littérature, cette région est responsable, entre autres, d'un retard de développement, sans dysmorphie faciale, tout comme notre patient. Cependant, les patients de la publication ne présentent pas de grande taille, comme observée chez notre patient (+3DS). Par ailleurs, la littérature révèle de nombreux cas d'épilepsies liés à la présence du MCS(19) sans toutefois proposer un gène responsable. Il serait donc utile de reprendre l'interrogatoire et de demander éventuellement un EEG afin de rechercher la présence de crises d'épilepsies infra cliniques.

MCS dérivant du chromosome 22

Le MCS(22) identifié chez le patient n°6 est l'un des marqueurs les plus fréquemment rapporté (base de données de Liehr). Ce MCS(22), d'une taille d'environ 13 Mb, comprend la région d'euchromatine 22q11q12, très riche en gènes. Un grand nombre de ces gènes sont impliqués dans des pathologies et peuvent expliquer le retard mental. Il y a notamment le gène *CEDNIK* impliqué dans la dysgénésie cérébrale et surtout le locus du syndrome de DiGeorge (gènes *COMT* et *TBX1*). Le gène *TBX1* est le gène principal du syndrome de DiGeorge (DGS). Il code pour une protéine jouant un rôle important dans le développement des artères et la migration des cellules de la crête neurale (Théveniau-Ruissy *et al*., 2008). Son haploinsuffisance explique les principaux signes observés chez les patients présentant une microdélétion 22q11.2, à savoir, la cardiopathie conotroncale, la dysmorphie faciale, l'hypoplasie thymique et les anomalies des parathyroïdes. En plus des mutations perte de fonction, des mutations gain de fonction du gène *TBX1* ont été décrites comme responsables d'un phénotype proche de celui des patients porteurs d'une microdélétion 22q11.2 (Zweier *et al*., 2007). La présence du gène *TBX1* au niveau du marqueur peut donc contribuer au phénotype présenté par le patient.

Le patient n°6 présente donc une trisomie 22 proximale partielle qui comprend la région classique du DGS, de 3 Mégabases. Le point de cassure se situe au-delà du LCR22D.

MCS non identifiés par la technique de CGH-*array*

Pour deux des patients (patients n°1 et n°4), le MCS n'a pas pu être identifié malgré une lecture attentive des profils de CGH-*array* obtenus avec les deux puces utilisées. Même la puce 244K personnalisée, pourtant renforcée au niveau des régions péricentromériques des différents chromosomes, ne détecte pas de gain correspondant à la taille du MCS retrouvé sur le caryotype.

L'utilisation de la technique Multi-FISH sur les prélèvements de ces deux patients a permis d'identifier le MCS du patient n°1 mais pas celui du patient n°4. Le patient n°1 est porteur d'un MCS dérivé du chromosome 7. Ce MCS(7) est très probablement constitué d'un néocentromère et d'euchromatine. A ce jour, seulement 2 cas de MCS(7) avec un néocentromère sont rapportés dans la littérature, dont un avec des signes cliniques similaires à notre patient (retard mental, dysmorphie faciale) (Lamb *et al*., 1998).

Peu de publications rapportent des cas de MCS avec un néocentromère. Selon Liehr seulement 97 cas ont été rapportés dans la littérature. Les marqueurs avec un néocentromère sont souvent secondaires à des inversions duplications télomèriques comme cela a été démontré par Giglio *et al*, pour le chromosome 8 (Giglio *et al*., 2001). Vu la morphologie du MCS du patient n°1, un anneau de très petite taille, il est très peu probable qu'il s'agisse d'une inversion duplication télomèrique, mécanisme engendrant un MCS de plus grande taille.

Les MCS avec un néocentromère sont très difficilement identifiables par les techniques de cytogénétique conventionnelle et la FISH centromérique. En effet, le néocentromère est un centromère fonctionnel, localisé dans une région euchromatique, mais qui ne contient pas de séquence alpha satellite. Il ne s'hybride donc pas avec les sondes centromériques spécifiques. Afin de confirmer la présence d'un néocentromère, il serait nécessaire de réaliser des techniques d'immunofluorescence utilisant des anticorps spécifiques de protéines centromériques (CENPs) comme CENP-A et CENP-C. Le néocentromère est capable de fixer 40 protéines et de former un kinétochore fonctionnel nécessaire pour l'attachement des microtubules au chromosome.

D'une façon générale, la technique de CGH-*array* est capable de détecter les MCS avec un néocentromère mais leur détection dépend de leur taille et de leur taux de mosaïque.

Pour le patient n°4, en revanche, ni la CGH-*array* ni la Multi-FISH n'ont permis l'identification de ce marqueur.

L'absence d'identification du MCS par la technique de CGH-*array* peut s'expliquer par le faible taux de mosaïque présent dans le sang circulant du patient n°4. En effet, le MCS est présent dans 8% des cellules examinées (caryotype) alors que la résolution minimale actuellement rapportée dans la littérature est une mosaïque de 10% (Ballif *et al*., 2006).

L'échec de l'identification du MCS chez le patient n°1 par la technique de CGH-*array* ne peut s'expliquer par le taux de mosaïque dans le sang puisque le MCS est retrouvé dans 28% des cellules examinées sur le caryotype. L'absence de détection du MCS pourrait être liée à sa petite taille.

Pour ces deux patients, un nouveau prélèvement sanguin sera demandé. Cependant, un nouvel échec ne peut être écarté considérant que le MCS peut disparaître de la circulation veineuse périphérique avec le temps. On pourrait proposer l'étude d'un autre tissu (par exemple, une biopsie de peau), qui pourrait nous révéler un pourcentage différent.

CNV identifiés par la technique de CGH-*array*

Une délétion homogène hétérozygote 9q13q21.13 a été mise en évidence chez le patient n°8 porteur d'un MCS(9p). La présence de cette délétion *de novo* en 9q13q21.13, de 8,56 mégabases, ne semblerait pas expliquer le phénotype observé. Cette région comprend un grand nombre de gènes impliqués dans diverses pathologies (*TMC1, DFNB7, TRPM6*…) mais aucun n'est connu pour être responsable de retard mental. Surtout, cette délétion 9q13q21.13 est rapportée comme un possible polymorphisme de grande taille chez plusieurs patients présentant un phénotype normal (Willatt *et al.*, 2007).

Ainsi, le phénotype anormal du patient serait plutôt lié à la présence du MCS qu'à la délétion *de novo* 9q13q21.13.

Par ailleurs, un certain nombre de CNV ont pu être identifiés pour chaque patient. En moyenne 5 CNV ont été mis en évidence sur la puce 244K contre 8 CNV sur la puce 180K. Tous ces CNV ont été interprétés en CNP et sont donc à priori sans effet sur le phénotype. En revanche, la délétion *de novo* 9q13q21.13 détectée chez le patient n°8 pourrait moduler le phénotype.

En somme, à la vue de ces 10 cas de MCS, notre étude confirme les hypothèses rapportées dans la littérature concernant la corrélation génotype-phénotype des MCS :

- les MCS contenant de l'euchromatine (régions riches en gènes) ont un risque élevé d'être responsable d'un phénotype anormal malgré leur présence en mosaïque,
- le MCS caractérisé par la technique de CGH-*array* a toujours inclus la région décrite dans la littérature comme pathogène pour le MCS concerné.

De même cette étude montre que la technique de CGH-*array*, permet d'identifier et de caractériser avec précision la majorité des MCS « atypiques » en un seul temps.

Les MCS identifiés sont de tailles importantes, entre 13,9 et 45,15 Mégabases, incluant de très nombreux gènes, il n'est donc pas évident d'établir une corrélation directe entre un gène particulier et un ou plusieurs signes cliniques.

Afin de conclure avec certitude sur le caractère pathogène du marqueur, il serait nécessaire de réaliser une étude sur plusieurs tissus spécifiques (tissus concernés par le signe clinique) compte tenu du mosaïcisme des MCS. Elle n'est cependant pas toujours réalisable *in vivo* (exemple : tissus cérébral pour un retard mental).

Pour les MCS présents en mosaïque faible (<10%), la méthode de CGH-*array* n'est pas suffisante. La M-FISH peut être une alternative, comme nous l'avons vu chez le patient n°1, mais la région génomique incluse dans le marqueur ne peut-être caractérisée avec précision. Une alternative serait l'utilisation de la technique de microdissection qui, couplée à la CGH-*array* (sur la base de la technique d' « *array* painting »), permettrait d'identifier et de caractériser le MCS. Sans cette caractérisation, la corrélation génotype-phénotype est difficile (Kozma *et al*., 1998 ; Avansino *et al*., 1999).

Par ailleurs, il est nécessaire de rechercher une DUP pour les chromosomes soumis à empreinte, afin de déterminer précisément la cause du phénotype observé. En effet, au moins 1,3% des MCS répertoriés présentent une DUP (Liehr, 2010). De plus, parmi les cas de DUP, un MCS est présent dans 4% des cas. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs confirmé que la présence d'un MCS favoriserait l'existence d'une DUP des chromosomes homologues pour lesquels le MCS dérive. Une étude moléculaire pour rechercher une DUP devrait donc être proposée pour les chromosomes soumis à empreinte.

Enfin, il ne faut pas exclure le fait que le retard mental puisse être lié à une anomalie génétique autre qu'un MCS. Le retard peut effectivement faire suite à une mutation génique, voire être lié à des phénomènes épigénétiques ou avoir une cause exogène.

4.2. Comparaison des deux puces utilisées

Ballif *et al*. (2007) ont montré l'intérêt de développer des puces de CGH-*array* personnalisées, notamment pour l'identification des MCS. Nous avons donc développé une puce 244K personnalisée destinée à couvrir, avec un grand nombre d'oligonucléotides, les régions péricentromériques. Afin d'évaluer l'intérêt d'une puce dédiée pour l'exploration des MCS, les ADN des patients ont été analysés, en parallèle, avec la puce 180K, utilisée en routine au laboratoire de Cytogénétique de Lyon.

Les résultats obtenus par les 2 puces lors de notre étude sont sensiblement identiques. En effet, les MCS ont été détectés de la même façon sur la puce 180K et la puce 244K personnalisée. Pour les patients n°1 et n°4 aucune puce n'a permis l'identification du MCS ce qui suppose un niveau de sensibilité équivalent pour ces deux puces. Par ailleurs, les régions chromosomiques identifiées en gain par les deux puces sont similaires (Tableau IX). En revanche, les positions génomiques caractérisant le MCS diffèrent très sensiblement mais cela est lié à l'utilisation d'oligonucléotides différents entre les deux puces. De ce fait, la taille des MCS détectés par chaque puce est très proche.

Ainsi, au regard des 10 patients étudiés, l'utilisation de la puce 244K personnalisée n'améliore pas la détection d'un MCS par rapport à la puce 180K. De plus, la sensibilité et le niveau d'interprétation sont identiques avec les deux puces. L'intérêt d'une puce dédiée n'apparaît pas évidente au vu des résultats de cette étude.

4.3. Place de la CGH-*array* dans d'identification d'un MCS

Les MCS sont le plus souvent mis en évidence pour la première fois sur le caryotype avec les techniques standard de cytogénétique, en bandes G ou en bandes R.

Cette technique permet d'orienter la stratégie d'identification, car dans les deux tiers des cas, le MCS dérive d'un chromosome acrocentrique et peut être identifié par des techniques de FISH ciblée (sondes centromériques ou peintures des différents chromosomes acrocentriques). Dans le tiers restant, le MCS n'est pas un acrocentrique. Différentes stratégies sont donc employées pour identifier la présence d'euchromatine d'un MCS. Les techniques les plus utilisées sont les méthodes multicouleurs (cenM-FISH ou la subcenM-FISH), la CGH-*array* et la microdissection chromosomique suivie de la FISH inverse.

Lorsqu'un MCS est en faible mosaïque, les méthodes de FISH multicouleurs ou la microdissection chromosomique semblent les plus appropriées. En effet, le seuil de sensibilité de la CGH-*array* est estimé à 10% (Ballif *et al.*, 2006). Cependant, la technique de CGH-*array* possède la meilleure résolution ; au vu des publications récentes, elle est donc la méthode de choix pour identifier et surtout pour caractériser les MCS.

Nous proposons dans la figure n°76 un arbre décisionnel pour identifier un MCS. Cette identification est nécessaire pour établir une corrélation génotype-phénotype et faciliter le conseil génétique. Il convient d'utiliser les techniques appropriées permettant une identification du MCS tout en optimisant les coûts et le temps d'analyse.

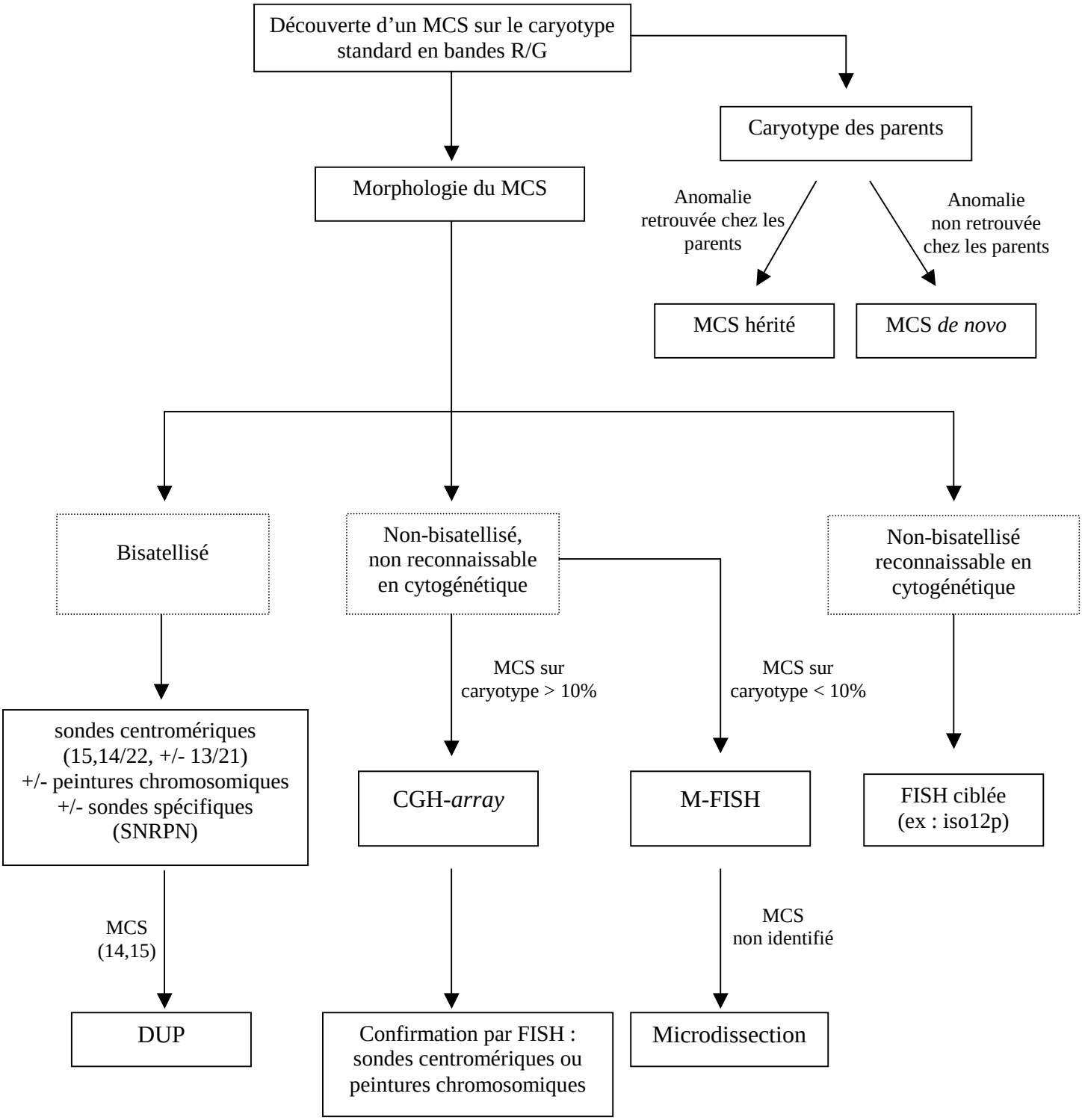


Figure n°76 : Arbre décisionnel d'identification d'un MCS.

4.4. Apports et limites de la CGH-*array*

Par rapport aux techniques de cytogénétique conventionnelle, la technique de CGH-*array* permet de caractériser précisément les remaniements chromosomiques déséquilibrés. En cela elle permet la caractérisation des MCS (taille, origine chromosomique et contenu en gènes des régions impliqués) révélés sur le caryotype. La technique de CGH-*array* permet uniquement la détection de CNV. En effet, il s'agit d'une technique d'approche quantitative. Cette technique ne permet par contre pas l'identification de remaniements de structures équilibrés tels que les translocations, les inversions et les insertions. De même, les remaniements de structures équilibrés à l'origine d'une pathologie de point de cassure, par interruption de la structure d'un gène ou de sa régulation par effet de position ne sont pas mis en évidence par la CGH-*array*. Pour être révélées de telles anomalies demandent la pratique d'un caryotype et d'une FISH sur métaphases à l'aide de sondes spécifiques.

La technique de CGH-*array* a permis de démontrer que certains CNV sont des polymorphismes sans conséquence pathologique. L'interprétation de certains *CNV* est donc difficile. Seule la collecte des données clinicobiologiques sur de grandes séries nationales et internationales permettront d'éclairer sur le caractère pathogène de certains *CNV* (Beri-Dexheimer *et al*., 2007). C'est pourquoi des bases de données spécifiques ont été mises en place (Wellcome Trust Sanger Institute - base DECIPHER - https://decipher.sanger.ac.uk/application et European Cytogenetics Association - ECARUCA - http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp) dont le but est de rassembler les données de cytogénétique moléculaire corrélées aux informations cliniques. Ainsi, ces bases de données permettront de comprendre le rôle des variations génomiques de grande taille et leur rôle dans la pathologie constitutionnelle.

Le MCS est fréquemment retrouvé en mosaïque et sa détection peut s'avérer difficile lorsque le taux de mosaïque est faible. La CGH-*array* s'avère être la technique la plus sensible pour détecter une anomalie en mosaïque faible, comparée aux autres techniques de cytogénétique telle que la technique en bandes G (Cheung *et al*., 2007).

Dans le cadre du syndrome de Pallister-Killian, la technique de CGH-*array* est la seule technique permettant la détection du marqueur dans les lymphocytes. En effet, ce syndrome, associé à des anomalies congénitales et un retard mental, est secondaire à l'existence d'une tétrasomie 12p en mosaïque trouvée uniquement sur fibroblastes. La culture sélectionne très probablement les cellules sans l'isochromosome12p, rendant le

marqueur indétectable sur le caryogramme. Cependant, cette tétrasomie 12p peut être détectée au niveau du sang périphérique non cultivé par la technique de CGH-*array*. Ballif *et al*. (Ballif *et al*., 2006) et plus récemment Theisen *et al*.(Theisen *et al.*, 2009) ont montré qu'il existait un profil anormal sur de l'ADN extrait de lymphocytes avec un log2ratio d'environ 0,3 (gain en simple copie) alors qu'au niveau de la biopsie de peau, ce log2ratio est d'environ 0,6 (gain en double copie). Donc la technique de CGH-*array* a montré que l'isochromosome 12p était présent dans la circulation périphérique et qu'il était possible d'éviter un prélèvement invasif comme la biopsie de peau.

La technique de CGH-*array* permettrait donc de détecter plus de MCS que les méthodes de cytogénétiques standard, surtout lorsqu'ils sont en mosaïque faible (Menten *et al.*, 2006).

L'étude menée par Ballif *et al* (Ballif *et al.*, 2006) afin de déterminer la sensibilité de la technique de CGH-*array* a défini un seuil de 10%. Toutefois, Menten *et al* (Menten *et al*.,2006) ont pu détecter une anomalie avec une mosaïque à 8%. Ce seuil varie en fonction de plusieurs paramètres tels que la qualité de l'ADN du patient, la qualité de l'expérience (bruit de fond le plus faible possible) et surtout la taille du MCS. Une mosaïque inférieure au seuil de 10% risque donc de ne pas être visible par la technique de CGH-*array*.

Enfin, la technique de CGH-*array* est automatisable et permet l'obtention de résultats dans de courts délais.

4.5. Les applications cliniques de la CGH-*array*

Dans notre étude incluant 10 MCS, la technique de CGH-*array* s'est révélée être une bonne technique dans l'identification et la caractérisation des MCS. Compte tenu que la très grande majorité des anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises conduisent à un déséquilibre quantitatif, la technique de CGH-*array* serait un outil de référence pour détecter ce gain ou perte de partie de chromosome. Les puces à ADN ont en effet été utilisées avec succès dans la détection de ces anomalies de structures déséquilibrées.

La CGH-*array* est donc une technique avec des possibilités d'applications cliniques multiples (Shinawi *et al*., 2008) :

<u>En pathologie constitutionnelle</u> :

- Retard mental : le taux de détection par CGH-*array* des anomalies cytogénétiques à l'origine des retards mentaux idiopathiques est augmenté par rapport aux techniques conventionnelles (3,7% pour le marquage bandes G, 2,5-7% pour la FISH et 15% environ en CGH-*array*).
- Identification de gènes : par exemple, la mise en évidence d'une microdélétion en 8q12 chez deux patients atteints de syndrome CHARGE a conduit à déterminer le gène *CHD7* comme responsable de cette affection (Visser *et al*., 2004).
- Mise en évidence de syndromes avec microduplication, tel que la duplication 17p11.2 responsable du syndrome de Potocki-Lupski (Potocki *et al*., 2007).
- Caractérisation de syndromes connus : une région critique de 5Mb a été identifiée en 18q22.3-18q23 pour l'atrésie congénitale des conduits auditifs externes (Veltman *et al*., 2003).
- Identification de nouveaux syndromes tels que les syndromes microdélétionnels 15q24, 17q21.31, Xq28…
- Diagnostic prénatal lorsque l'échographie révèle une anomalie.
- Comportement autistique pour lesquels des déséquilibres chromosomiques ont été rapportés (Jacquemont *et al*., 2006) .
- Caractérisation des marqueurs chromosomiques surnuméraires.
- Anomalies congénitales telles que les anomalies congénitales multiples (MCA).

En pathologie oncohématologique :

- Cancérologie : diagnostic des tumeurs et des leucémies telle que la leucémie lymphoïde chronique.

4.6. Le Prénatal

L'utilisation de la technique de CGH-*array* en période prénatale suscite beaucoup d'intérêt chez les cliniciens. En effet, c'est actuellement la technique de pointe en cytogénétique pour la détection d'anomalies chromosomiques déséquilibrées.

Il est possible de réaliser cette technique dans des délais relativement courts (5 jours) permettant d'envisager le transfert de cette technique en période prénatale. L'identification d'un MCS en période prénatale soulève la question des conséquences phénotypiques de ce marqueur. Pour certains MCS « facilement » identifiables, un syndrome clinique particulier est rapporté comme par exemple pour le syndrome de Pallister-Killian lorsque le MCS est un isochromosome 12p, le syndrome d'invdup (15q) lorsque le MCS contient la région PWS/AS, le syndrome de l'isochromosome 18p ou le syndrome du « cat-eye » lorsque le MCS est une invdup(22q). Pour d'autres MCS, il est important d'identifier et de caractériser le MCS avant de donner un conseil génétique. Dans ce cadre, la technique de CGH-*array* offre une bonne opportunité pour une identification rapide. La présence d'euchromatine sera un élément péjoratif bien qu'il ne soit pas toujours possible de conclure quant au caractère pathogène du déséquilibre. Ainsi, une très bonne caractérisation des MCS en CGH-*array* permettrait de déterminer des régions du génome dont la présence en triploïdie ou tétraploïdie n'a aucune conséquence phénotypique.

Outre, la caractérisation des MCS, les indications de la CGH-*array* en période prénatale pourraient être étendues à l'avenir. En particulier pour les fœtus présentant un syndrome malformatif avec un caryotype apparemment équilibré, les déséquilibres génomiques pourraient être caractérisés permettant d'établir une relation génotype-phénotype et guider le conseil génétique. Il est probable que, comme en période postnatale dans l'exploration des retards mentaux syndromiques, cette technique permette de dépister environ 10 % de déséquilibres chromosomiques pathogènes non décelés sur caryotype.

Ainsi, dans un avenir proche, la CGH-*array* sera vraisemblablement la technique de cytogénétique de choix en période prénatale pour l'exploration des syndromes malformatifs.

Cependant, le problème majeur de l'utilisation de la technique CGH-*array* en période prénatale est l'interprétation des résultats.

En effet, cette technique peut permettre la mise en évidence de perte ou de gain dans une région du génome comportant, par exemple, des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Par ailleurs, de nombreuses publications comme celle de Mefford *et al*. (Mefford *et al.*, 2008) discutent le rôle pathogène potentiel ou le rôle prédisposant à des pathologies constitutionnelles comme l'autisme ou le retard mental de certains CNV. Que faire lors de la mise en évidence de tels remaniements ?

Il serait nécessaire de mener une étude au niveau national, sur un grand nombre de cas, avec un suivi prospectif en prénatal, afin de mieux définir les intérêts et les limites de la technique de CGH-*array* en période prénatale.

CONCLUSION

La fréquence dans la population générale des Marqueurs Chromosomiques Surnuméraires (MCS) est de 0,044%. Les techniques de cytogénétique standard sont parfois insuffisantes pour les identifier, en raison de leur petite taille. Dans deux tiers des cas, le MCS dérive d'un chromosome acrocentrique et peut être identifié par des techniques de FISH ciblée (sondes des chromosomes 15 et 22, par exemple). Pour le tiers restant, l'identification des MCS est plus complexe et doit faire appel à différentes techniques de cytogénétique moléculaire. Ces techniques, si elles permettent l'identification du MCS, restent toutefois peu informatives sur la portion du chromosome impliqué, la corrélation génotype-phénotype est alors difficile à établir. De plus, il est souvent nécessaire de réaliser plusieurs examens pour cette identification.

L'avantage de la technique de CGH-*array*, par rapport aux techniques standard, est de permettre la caractérisation précise du MCS (taille, origine chromosomique et contenu en gènes des régions impliquées) mis en évidence sur le caryotype. L'identification précise des régions chromosomiques du MCS facilite la corrélation génotype-phénotype et permet de proposer un diagnostic plus précis et une prise en charge plus adaptée.

L'étude présentée dans ce mémoire, réalisée sur 10 patients présentant un retard mental et porteurs d'un MCS révélé sur leur caryotype mais non identifié en FISH, a eu pour objectif d'évaluer l'utilité de la CGH-*array* dans l'identification des MCS. Cette technique a permis de caractériser précisément le MCS dans 8 cas sur 10. Ces 8 MCS étaient constitués d'euchromatine, et avec l'aide de la littérature, une corrélation génotype-phénotype a pu être établie.

La technique de CGH-*array* se révèle donc être une technique de premier choix pour identifier et caractériser les MCS en un seul temps. Cependant, lorsque le MCS est en mosaïque faible (cas 1 et 4), il peut échapper à la détection en CGH-*array*. Une alternative consiste alors à l'utilisation de la technique de microdissection chromosomique.

Une perspective prochaine est le transfert en diagnostic prénatal de la technique de CGH-*array*. Pour la caractérisation d'un MCS, en dehors des syndromes déjà décrits, il n'est pas toujours possible de conclure sur le caractère délétère de l'anomalie.

Afin de permettre son utilisation en prénatal, la constitution d'une base de donnée rapportant les corrélations génotype-phénotype observée en période postnatale serait utile.

Les MCS identifiés pourraient alors être corrélés à un phénotype particulier.

BIBLIOGRAPHIE

Publications:

1. Anderlid, B. M. et al. Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. Am J Med Genet 99, 223-33 (2001).

2. Arrighi, F. E. & Hsu, T. C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10, 81-6 (1971).

3. Avansino, J. R., Dennis, T. R., Spallone, P., Stock, A. D. & Levin, M. L. Proximal 5p trisomy resulting from a marker chromosome implicates band 5p13 in 5p trisomy syndrome. Am J Med Genet 87, 6-11 (1999).

4. Baldwin, E. L., May, L. F., Justice, A. N., Martin, C. L. & Ledbetter, D. H. Mechanisms and consequences of small supernumerary marker chromosomes: from Barbara McClintock to modern genetic-counseling issues. Am J Hum Genet 82, 398-410 (2008).

5. Ballif, B. C. et al. Development of a high-density pericentromeric region BAC clone set for the detection and characterization of small supernumerary marker chromosomes by array CGH. Genet Med 9, 150-62 (2007).

6. Ballif, B. C. et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. Am J Med Genet A 140, 2757-67 (2006).

7. Bartels, I. et al. Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism of trisomy 22: trisomy rescue due to marker chromosome formation. Cytogenet Genome Res 101, 103-5 (2003).

8. Bartsch, O., Rasi, S., Hoffmann, K. & Blin, N. FISH of supernumerary marker chromosomes (SMCs) identifies six diagnostically relevant intervals on chromosome 22q and a novel type of bisatellited SMC(22). Eur J Hum Genet 13, 592-8 (2005).

9. Batanian, J. R., Huang, Y., Gottesman, G. S., Grange, D. K. & Blasingame, A. V. Preferential involvement of the short arm in chromosome 8-derived supernumerary markers and ring as identified by chromosome arm painting. Am J Med Genet 90, 276-82 (2000).

10. Battaglia, A. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). Orphanet J Rare Dis 3, 30 (2008).

11. Belien, V. et al. Partial trisomy of chromosome 22 resulting from a supernumerary marker chromosome 22 in a child with features of cat eye syndrome. Am J Med Genet A 146A, 1871-4 (2008).

12. Belloso, J. M. et al. Characterization of six marker chromosomes by comparative genomic hybridization. Am J Med Genet A 136, 169-74 (2005).

13. Beri-Dexheimer, M. et al. [Microarray-based comparative genomic hybridization in the study of constitutional chromosomal abnormalities]. Pathol Biol (Paris) 55, 13-8 (2007).

14. Bettio, D. et al. Isochromosome 15q of maternal origin in a Prader-Willi patient with pituitary adenoma. Acta Genet Med Gemellol (Roma) 45, 213-6 (1996).

15. Bloom, S. E. & Goodpasture, C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum Genet 34, 199-206 (1976).

16. Brecevic, L. et al. Multicolor FISH used for the characterization of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in commercially available immortalized cell lines. Cytogenet Genome Res 114, 319-24 (2006).

17. Breen, C. J. et al. Applications of comparative genomic hybridisation in constitutional chromosome studies. J Med Genet 36, 511-7 (1999).

18. Buckton, K. E., Spowart, G., Newton, M. S. & Evans, H. J. Forty four probands with an additional "marker" chromosome. Hum Genet 69, 353-70 (1985).

19. Buhler, E. M., Mehes, K., Muller, H. & Stalder, G. R. Cat-eye syndrome, a partial trisomy 22. Humangenetik 15, 150-62 (1972).

20. Caspersson, T., Simonsson, E. & Zech, L. UV-absorption and quinacrine mustard fluorescence patterns for chromosome aberration study in Chinese hamster. Exp Cell Res 63, 243-4 (1970).

21. Chen, H., Tuck-Muller, C. M., Batista, D. A. & Wertelecki, W. Identification of supernumerary ring chromosome 1 mosaicism using fluorescence in situ hybridization. Am J Med Genet 56, 219-33 (1995).

22. Cheng, S. D., Spinner, N. B., Zackai, E. H. & Knoll, J. H. Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosomes 15 from 11 patients. Am J Hum Genet 55, 753-9 (1994).

23. Cheung, S. W. et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. Am J Med Genet A 143A, 1679-86 (2007).

24. Choo, K. H. Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. Am J Hum Genet 61, 1225-33 (1997).

25. Christian, S. L., Fantes, J. A., Mewborn, S. K., Huang, B. & Ledbetter, D. H. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). Hum Mol Genet 8, 1025-37 (1999).

26. Chudoba, I. et al. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation. Eur J Hum Genet 7, 533-40 (1999).

27. Cotter, P. D. et al. Prenatal diagnosis of minute supernumerary marker chromosomes. Gynecol Obstet Invest 60, 27-38 (2005).

28. Crolla, J. A. FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. Am J Med Genet 75, 367-81 (1998).

29. Crolla, J. A., Long, F., Rivera, H. & Dennis, N. R. FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosomes 15 and 22: I. Results of 26 new cases. Am J Med Genet 75, 355-66 (1998).

30. D'Amato Sizonenko, L., Ng, D., Oei, P. & Winship, I. Supernumerary marker chromosomes 5: confirmation of a critical region and resultant phenotype. Am J Med Genet 111, 19-26 (2002).

31. Dennis, T. R. et al. Molecular cytogenetic characterization of two small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 19. Am J Med Genet A 149A, 262-5 (2009).

32. Donlon, T. A., Lalande, M., Wyman, A., Bruns, G. & Latt, S. A. Isolation of molecular probes associated with the chromosome 15 instability in the Prader-Willi syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 4408-12 (1986).

33. Eggermann, K. et al. Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. Clin Genet 62, 89-93 (2002).

34. Finelli, P. et al. FISH characterization of a supernumerary r(1)(cen-->q22:q22-->sq21) chromosome associated with multiple anomalies and bilateral cataracts. Am J Med Genet 104, 157-64 (2001).

35. Flint, J. & Knight, S. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. Curr Opin Genet Dev 13, 310-6 (2003).

36. Froland, A., Holst, G. & Terslev, E. Multiple Anomalies Associated With An Extra Small Autosome. Cytogenetics 85, 99-106 (1963).

37. Giglio, S. et al. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. Am J Hum Genet 68, 874-83 (2001).

38. Gribble, S. M., Ng, B. L., Prigmore, E., Fitzgerald, T. & Carter, N. P. Array painting: a protocol for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. Nat Protoc 4, 1722-36 (2009).

39. Griggs, B. L., Ladd, S., Saul, R. A., DuPont, B. R. & Srivastava, A. K. Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. Genomics 91, 195-202 (2008).

40. Grimbacher, B. et al. Analphoid marker chromosome in a patient with hyper-IgE syndrome, autism, and mild mental retardation. Genet Med 1, 213-8 (1999).

41. Hastings, R. J., Nisbet, D. L., Waters, K., Spencer, T. & Chitty, L. S. Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): new cases and a review of the literature. Prenat Diagn 19, 436-45 (1999).

42. Iafrate, A. J. et al. Detection of large-scale variation in the human genome. Nat Genet 36, 949-51 (2004).

43. Ilbery, P. L., Lee, C. W. & Winn, S. M. Incomplete trisomy in a mongoloid child exhibiting minimal stigmata. Med J Aust 48(2), 182-4 (1961).

44. Ishkanian, A. S. et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. Nat Genet 36, 299-303 (2004).

45. Jacquemont, M. L. et al. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. J Med Genet 43, 843-9 (2006).

46. James, R. S., Temple, I. K., Dennis, N. R. & Crolla, J. A. A search for uniparental disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. Eur J Hum Genet 3, 21-6 (1995).

47. Kallioniemi, A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258, 818-21 (1992).

48. Karhu, R. et al. Chromosome arm-specific multicolor FISH. Genes Chromosomes Cancer 30, 105-9 (2001).

49. Knegt, A. C., Li, S., Engelen, J. J., Bijlsma, E. K. & Warburton, P. E. Prenatal diagnosis of a karyotypically normal pregnancy in a mother with a supernumerary neocentric 13q21 -->13q22 chromosome and balancing reciprocal deletion. Prenat Diagn 23, 215-20 (2003).

50. Kotzot, D. Review and meta-analysis of systematic searches for uniparental disomy (UPD) other than UPD 15. Am J Med Genet 111, 366-75 (2002).

51. Kozma, C., Blancato, J., Meck, J. & Jiang, Y. Characterization of a supernumerary marker derived from chromosome 17 by microdissection in an adult with MR/MCA. Am J Med Genet 77, 19-22 (1998).

52. Langer, S., Fauth, C., Rocchi, M., Murken, J. & Speicher, M. R. AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes. Hum Genet 109, 152-8 (2001).

53. Lanphear, N., Lamb, A., Oppenheimer, S. & Soukup, S. Supernumerary chromosome marker (1) in a developmentally delayed child. Am J Med Genet 57, 400-2 (1995).

54. Ledbetter, D. H. & Engel, E. Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. Hum Mol Genet 4 Spec No, 1757-64 (1995).

55. Ledbetter DH, B. A. Molecular cytgenetics of contiguous gene syndromes: mechanisms and consequences of gene dosage imbalances (New York, 1995).

56. Liehr, T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). Mol Cytogenet 3, 8.

57. Liehr, T., Claussen, U. & Starke, H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. Cytogenet Genome Res 107, 55-67 (2004).

58. Liehr, T. et al. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans; are there B chromosomes hidden among them. Mol Cytogenet 1, 12 (2008).

59. Liehr, T. et al. Small supernumerary marker chromosomes--progress towards a genotype-phenotype correlation. Cytogenet Genome Res 112, 23-34 (2006).

60. Liehr, T. & Weise, A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. Int J Mol Med 19, 719-31 (2007).

61. Lockhart, D. J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol 14, 1675-80 (1996).

62. Lockwood, W. W., Chari, R., Chi, B. & Lam, W. L. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. Eur J Hum Genet 14, 139-48 (2006).

63. Loeffler, J. et al. Muellerian aplasia associated with ring chromosome 8p12q12 mosaicism. Am J Med Genet A 116A, 290-4 (2003).

64. Manvelyan, M. et al. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. Int J Mol Med 21, 705-14 (2008).

65. Martin, R. H. et al. The meiotic segregation of human sperm chromosomes in two men with accessory marker chromosomes. Am J Med Genet 25, 381-8 (1986).

66. Mefford, H. et al. Recurrent Rearrangements of Chromosome 1q21.1 and Variable Pediatric Phenotype. N Engl J Med, 359:1685-99 (2008).

67. Menten, B. et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. J Med Genet 43, 625-33 (2006).

68. Mignon, C. et al. Clinical heterogeneity in 16 patients with inv dup 15 chromosome: cytogenetic and molecular studies, search for an imprinting effect. Eur J Hum Genet 4, 88-100 (1996).

69. Miyoshi, O. et al. 47,XX,UPD(7)mat,+r(7)pat/46,XX,UPD(7)mat mosaicism in a girl with Silver-Russell syndrome (SRS): possible exclusion of the putative SRS gene from a 7p13-q11 region. J Med Genet 36, 326-9 (1999).

70. Nemos, C., Bursztejn, A. C. & Jonveaux, P. [Management of the CNVs in constitutional human genetics using array CGH]. Pathol Biol (Paris) 56, 354-61 (2008).

71. Nietzel, A. et al. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). Hum Genet 108, 199-204 (2001).

72. Pandiyan, N. & Jequier, A. M. Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. Hum Reprod 11, 2604-8 (1996).

73. Pietrzak, J. et al. Molecular cytogenetic characterization of eight small supernumerary marker chromosomes originating from chromosomes 2, 4, 8, 18, and 21 in three patients. J Appl Genet 48, 167-75 (2007).

74. Pinkel, D. et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet 20, 207-11 (1998).

75. Potocki, L. et al. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. Am J Hum Genet 80, 633-49 (2007).

76. Roberts, S., Maggouta, F., Thompson, R., Price, S. & Thomas, S. A patient with a supernumerary marker chromosome (15), Angelman syndrome, and uniparental disomy resulting from paternal meiosis II non-disjunction. J Med Genet 39, E9 (2002).

77. Robinson, W. P. et al. Uniparental disomy explains the occurrence of the Angelman or Prader-Willi syndrome in patients with an additional small inv dup(15) chromosome. J Med Genet 30, 756-60 (1993).

78. Rosias, P. R. et al. Phenotypic variability of the cat eye syndrome. Case report and review of the literature. Genet Couns 12, 273-82 (2001).

79. Rothlisberger, B. et al. Supernumerary marker chromosome (1) of paternal origin and maternal uniparental disomy 1 in a developmentally delayed child. J Med Genet 38, 885-8 (2001).

80. Sarri, C. et al. Supernumerary marker chromosome 5 diagnosed by M-FISH in a child with congenital heart defect and unusual face. Cytogenet Genome Res 114, 330-7 (2006).

81. Schachenmann, G. et al. Chromosomes In Coloboma And Anal Atresia. Lancet 2, 290 (1965).

82. Schlegel, M., Baumer, A., Riegel, M., Wiedemann, U. & Schinzel, A. Maternal uniparental isodisomy 10 and mosaicism for an additional marker chromosome derived from the paternal chromosome 10 in a fetus. Prenat Diagn 22, 418-21 (2002).

83. Schreck, R. R., Breg, W. R., Erlanger, B. F. & Miller, O. J. Preferential derivation of abnormal human G-group-like chromosomes from chromosome 15. Hum Genet 36, 1-12 (1977).

84. Schrock, E. et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 273, 494-7 (1996).

85. Schuffenhauer, S. et al. Interstitial deletion 5p accompanied by dicentric ring formation of the deleted segment resulting in trisomy 5p13-cen. Am J Med Genet 65, 56-9 (1996).

86. Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2, 971-2 (1971).

87. Shaffer, L. G. et al. American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. Genet Med 3, 206-11 (2001).

88. Shaffer LG, T. N. an international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger (2005).

89. Shinawi, M. & Cheung, S. W. The array CGH and its clinical applications. Drug Discov Today 13, 760-70 (2008).

90. Slater, H. R. et al. Neocentromere formation in a stable ring 1p32-p36.1 chromosome. J Med Genet 36, 914-8 (1999).

91. Solinas-Toldo, S. et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer 20, 399-407 (1997).

92. Speicher, M. R., Gwyn Ballard, S. & Ward, D. C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet 12, 368-75 (1996).

93. Stankiewicz, P. et al. Clinical and molecular-cytogenetic studies in seven patients with ring chromosome 18. Am J Med Genet 101, 226-39 (2001).

94. Starke, H. et al. First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(p11 --> q11) plus partial uniparental disomy 4p15-16. Am J Med Genet A 116A, 26-30 (2003).

95. Tavanti, A., Gow, N. A., Maiden, M. C., Odds, F. C. & Shaw, D. J. Genetic evidence for recombination in Candida albicans based on haplotype analysis. Fungal Genet Biol 41, 553-62 (2004).

96. Testart, J. et al. Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. Hum Reprod 11, 2609-12 (1996).

97. Theisen, A. et al. aCGH detects partial tetrasomy of 12p in blood from Pallister-Killian syndrome cases without invasive skin biopsy. Am J Med Genet A 149A, 914-8 (2009).

98. Theveniau-Ruissy, M. et al. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. Circ Res 103, 142-8 (2008).

99. Tonnies, H., Neumann, L. M., Gruneberg, B. & Neitzel, H. Characterization of a supernumerary ring chromosome 1 mosaicism in two cell systems by molecular cytogenetic techniques and review of the literature. Am J Med Genet A 121A, 163-7 (2003).

100. Uhrig, S. et al. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. Am J Hum Genet 65, 448-62 (1999).

101. Veltman, J. A. et al. Definition of a critical region on chromosome 18 for congenital aural atresia by arrayCGH. Am J Hum Genet 72, 1578-84 (2003).

102. Vissers, L. E. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. Nat Genet 36, 955-7 (2004).

103. Von Eggeling, F. et al. Maternal uniparental disomy 12 in a healthy girl with a 47,XX,+der(12)(p11-->q11)/46,XX karyotype. J Med Genet 39, 519-21 (2002).

104. Voullaire, L. et al. Mosaic inv dup(8p) marker chromosome with stable neocentromere suggests neocentromerization is a post-zygotic event. Am J Med Genet 102, 86-94 (2001).

105. Wang, W. et al. A case of an infertile male with a small supernumerary marker chromosome negative for M-FISH and containing only heterochromatin. J Assist Reprod Genet 26, 291-5 (2009).

106. Warburton, D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. Am J Hum Genet 49, 995-1013 (1991).

107. Welborn, J. L. & Lewis, J. P. Analysis of mosaic states in amniotic fluid using the in-situ colony technique. Clin Genet 38, 14-20 (1990).

108. Willatt, L. R. et al. Novel deletion variants of 9q13-q21.12 and classical euchromatic variants of 9q12/qh involve deletion, duplication and triplication of large tracts of segmentally duplicated pericentromeric euchromatin. Eur J Hum Genet 15, 45-52 (2007).

109. Wolstenholme, J., Cross, I. & Goodship, J. Early confirmation of trisomy 18 in newborn babies. Lancet 339, 1416 (1992).

110. Xu, J., Fong, C. T., Cedrone, E., Sullivan, J. & Wang, N. Prenatal identification of de novo marker chromosomes using micro-FISH approach. Clin Genet 53, 490-6 (1998).

111. Yunis, J. J. High resolution of human chromosomes. Science 191, 1268-70 (1976).

112. Zweier, C., Sticht, H., Aydin-Yaylagul, I., Campbell, C. E. & Rauch, A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. Am J Hum Genet 80, 510-7 (2007).

Sites Internet :

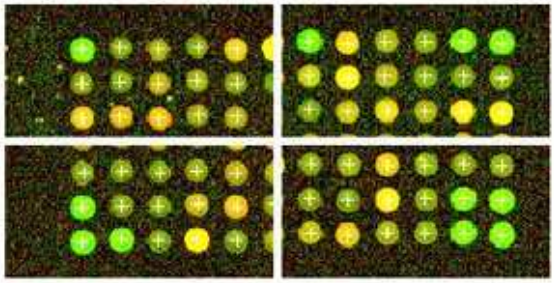
- http://genome.ucsc.edu-mai 2010
- http://projects.tcag.ca/variation-mai 2010
- http://ncbi.nlm.nih.gov/omim-mai 2010
- http://agserver01.azn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp-mai 2010
- https://decipher.sanger.ac.uk/application-mai 2010

ANNEXE 1

QC Report - Agilent Technologies : 2 Color Gene Expression

Date:	Tuesday, October 11, 2005 - 19:15	BG Method:	No Background
Image:	Human_22K_expression	Spatial Detrend:	On
Protocol:	GE2_22k_1005 (Read Only)	Global Adjust:	Off
User Name:	Uniform	Dye Norm:	Linear Lowess
Grid:	012097_D_20050902	Linear DyeNorm Factor:	7.6 (Red) 23.3(Green)
FE Version:	8.5.1.1	Additive Error:	52(Red)149(Green)

Spot Finding of the Four Corners of the Array



	Feature		Local Background	
	Red	Green	Red	Green
Non Uniform	78	54	0	0
Population	47	26	49	0

Net Signal Statistics

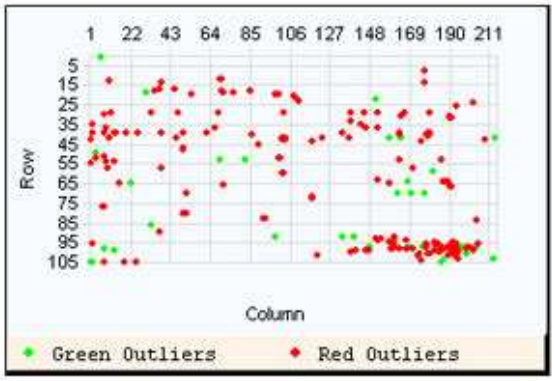
Agilent SpikeIns:

	Red	Green
NumSat	0	0
99%	24913	11899
50%	2351	750
1%	160	112

Non-Control probes:

	Red	Green
NumSat	16	1
99%	6850	1750
50%	82	64
1%	40	48

Spatial Distribution of All Outliers on the Array

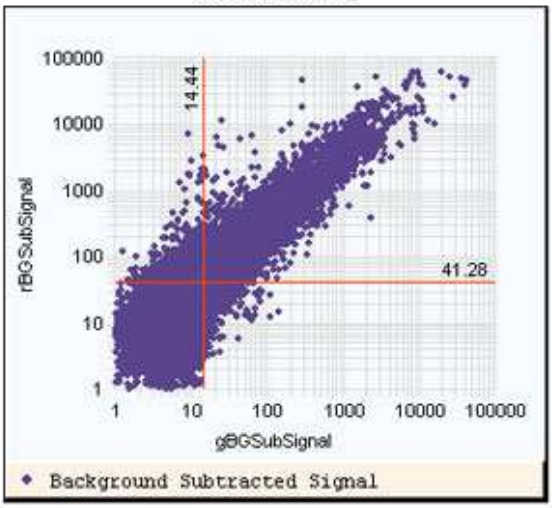


FeatNonUnif (Red or Green) = 101(0.46%)

Negative Controls Stats

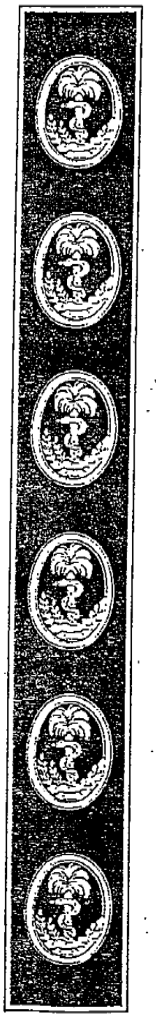
	Red	Green
Average Net Signals	42.32	53.24
StdDev Net Signals	2.19	3.59
Average BG Sub Signal	1.86	3.46
StdDev BG Sub Signal	1.79	2.95

Red and Green Background Corrected Signals (Non-Control Inliers)



Features (NonCtrl) with BGSubSignals < 0: 237 (Red); 361 (Green)

Serment des Apothicaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

THESE PRESENTEE PAR

Grégory EGEA, né le 12 janvier 1981,

SOUTENUE le 22 Juin 2010

CARACTERISATION DE 10 MARQUEURS CHROMOSOMIQUES SURNUMERAIRES (MCS) : APPORT DE L'HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE SUR MICRORESEAU (CGH-ARRAY)

Lors de la réalisation d'un caryotype, la présence d'un fragment chromosomique surnuméraire dont on ne sait pas déterminer l'origine parfois mis en évidence. Il s'agit d'un Marqueur Chromosomique Surnuméraire (MCS). Ces chromosomes additionnels de structure indéterminée font l'objet d'études approfondies car ils peuvent être associés à des phénotypes anormaux. La difficulté réside en l'identification et la caractérisation de ce MCS afin d'établir une corrélation génotype-phénotype.

L'étude présentée dans ce travail, réalisée sur 10 patients présentant un retard mental et porteurs d'un MCS révélé sur leur caryotype mais non identifié en FISH, a eu pour objectif d'évaluer l'utilité de la CGH-*array* dans l'identification et la caractérisation des MCS. Cette technique a permis de caractériser précisément le MCS dans 8 cas sur 10. Ces 8 MCS étaient constitués d'euchromatine, et avec l'aide de la littérature, une corrélation génotype-phénotype a pu être établie. En revanche, lorsque le MCS est en mosaïque faible (cas 1 et 4), il peut échapper à la détection en CGH-*array*. Des techniques alternatives doivent alors être utilisées.

MOTS-CLES: MCS - Retard mental – Mosaïcisme – CGH-*array* – FISH

JURY :

Président du jury :
Monsieur Patrice FAURE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Grenoble
Directeur de thèse :
Monsieur Damien SANLAVILLE, Maître de conférence à la Faculté de Médecine de Lyon
Membres
Monsieur Joël LUNARDI, Professeur à la Faculté de Médecine de Grenoble
Madame Florence AMBLARD, Praticien Hospitalier au CHU de Grenoble
Madame Caroline SCHLUTH-BOLARD, Assistante Hospitalière de Recherche à Lyon