

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2011

THESE N°

<p>COMPARAISON DE DEUX METHODES D'ANALYSE POUR L'ETUDE DES REMANIEMENTS SUBTELOMERIQUES : FISH ET MLPA</p>

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance

Du Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Présenté et soutenu publiquement le 28 Octobre 2011

Par

Axel FERAUT

né le 31 Décembre 1979 à Périgueux (24)

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Philippe CARDOT
Mme le Professeur Catherine YARDIN
M le Professeur Jean Louis BENEYTOU
M le Professeur Benoît FUNALOT
Mme le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU

Président
Juge
Juge
Juge
Directeur de thèse

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
DUROUX Jean-Luc INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Phillippe CARDOT, Professeur des Universités de chimie analytique et bromatologie, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour son enseignement délivré avec acrobatie et entropie au cours de mon cursus de pharmacie.

A Madame le Professeur Catherine YARDIN, Professeur des Universités de cytologie et d'histologie, praticien hospitalier, chef de service, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son accueil au sein du service de cytogénétique, pour son enseignement, sa disponibilité, son écoute et sa générosité.

A Monsieur le Professeur Beneytout, Professeur des Universités de Biochimie et Biologie moléculaire, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Funalot, Professeur des Universités de Biochimie et Génétique moléculaire, praticien hospitalier, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de thèse.

A Madame le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU, maitre de conférence des universités, praticien hospitalier, pharmacien biologiste, pour son encadrement attentif au cours de ce travail ainsi que pour la confiance qu'elle m'a accordée. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour ses conseils avisés.

Je tiens par ailleurs à remercier tous ceux qui ont contribué à ma formation et à ceux qui m'ont accompagné avec bienveillance au cours de ces années d'internat :

A tous les membres des laboratoires d'hématologie, de parasitologie, de biochimie, de bactériologie, de PMA.

Je tiens à remercier spécialement l'ensemble de l'équipe du laboratoire de cytogénétique pour son accueil et sa gentillesse. Un remerciement particulier au Dr Esclaire pour son initiation aux ouvrages brillants et superflus.

Je tiens à remercier le service de pédiatrie qui nous a adressé les patients pour cette étude et en particulier le Dr Cécile Laroche.

A Papa,

Qui n'a malheureusement pas pu connaître la fin de cette histoire. Merci mon petit papa chéri, tu me manques.

A Maman,

Qui malgré les moments difficiles m'a toujours soutenu et entouré de son amour. Merci infiniment de m'avoir accompagné dans ces longues études.

A Mémé,

Merci pour ton éducation sur toutes les bonnes choses de la vie. Tu nous manques.

A Pépé,

Merci pour tout.

A toute la famille Rousseau,

Vous êtes trop nombreux pour que je vous cite tous (sinon il faudrait que j'écrive une deuxième thèse !!) mais c'est un grand bonheur de vous avoir tous, je vous embrasse fort.

A toute la famille Feraut,

A Tata Lili pour sa folie et son sourire, pour son soutien lors des révisions du deuxième semestre (« Aaaaxeeel, monte travailler !! »),

A Jérémie pour son sens de l'humour inégalable ainsi que pour ses mises au point bénéfique,

A Pascale la « différente » que j'adore ainsi que ses peintures « sorties du tube »,

A Emmanuelle la plus admirable des cousines,

J'aimerais tous vous voir plus souvent, les Noël et les Pâques endiablés riches en rire, en déguisements et en MOUNA me manquent.

A Eva,

Merci d'être là, merci pour ton écoute, merci pour ta patience, merci pour ta complicité, merci pour ton immense amour. Tu vois, ça y est encore une petite étape de passée, j'espère que notre vie future nous en fera passer plein d'autres.

A la famille tabouret,

Tess, Flo et minette, merci de m'avoir adopté.

A Pierre,

du premier jour de pharma jusqu' à aujourd'hui t'es toujours là. Merci pour ces moments de fous rire et de complicité incroyable. Pour toutes ces soirées passées ensemble à refaire le monde, souvent accompagnés de notre grande amie la Veuve Goudoulin. En effet pour tout ça et bien plus je tiens à te remercier d'être là.

A la famille Poupelain qui m'a accueilli si souvent et particulièrement à Jeannot.

A mes complices de la fac,

Xav le taulier, TeeeeeeF super star et madame caro la patronne.

A mes co-internes de bactériologie, Hénem, Nathanem, Elonem, Pamanem, Aurénem, stephnm, TATATATATATATA. On a passé un moment inoubliable ensemble, merci les filles.

Aux compères du midi et du baby, JB (tonton rilette) et Fabou, aussi à Mathilde et Mehdi et à Laure (un sacré coup de fourchette...)

A Jaubi, qui n'a absolument rien fait pour cette thèse et qui préfère boire des cocktails sur les plages guadeloupéennes (« Non, tu peux pas résumer ça comme ça... »).

A Greg, merci pour ces moments où je dois te quitter précipitamment pour m'enfermer...

A Rico, et gros Steph les loulous de périgueux qui ne veulent jamais venir à Limoges et bien sur Raph (grande saucisse).

A Elise, Anne-laure ma petite bretonne, léa et lydie (les inséparables)

A Tic et Tac (Marco et Nidou) qui a les plus grosses maracas... Ce petit col du Taibit manquait de Dodo non ??

A Mat, le tacleur du 24

A Greg, Juju et Xav qu'est ce que c'est bon de se retrouver !!!

AU BRIVE POWER

1^{er} semestre : Benny, Julie, Elodie, Tiffou, Vincent (Lagren's), Fanny, Papa Ben, Aurélie, Nikki, Jean Jacques (Mista lova-lova), et bien sur la GIRAFE. Un internat+une belle équipe de Foufous pendant six mois= des de soirées, des crises de rire et des moments inoubliables ainsi que des photos pas toujours montrables. Vivement qu'on refête nauwel ensemble.

2^{ème} semestre : Deuxième équipe de loco-loco avec (re)Papa Ben (t'es encore là toi !!), Benjamin (Momo), Emilie, Fanny, Julie (michel), Alex M, Laure Pompier, Pierre-Alain (N'oublies pas mon doigt !!!), Galyto (Captain Spencer), Antoine le Ché, JB (4 motion....), Aurélie et loïc (Bébé et bébé), au Cardi et bien sur encore et toujours la GIRAFE. Une dédicace à la L TEAM que nous, la W TEAM, avons fessé avec plaisir. Je crois sincèrement que pour ce semestre on a fait très très fort au niveau des soirées, il faut qu'on continue !

Au semestre officieux : Guillaume pariscoco, Abdel, Hélène, Alex K. Semestre moins festif mais très agréable.

A l'équipe du MAMBO FC, coachy, tommy, (re-re)Papa Ben, Judy, Duff, yanis

A Youssef et Jo les piliers du foot internat, à Toulouse l'objectif c'était la coupe mais je crois que la veille du match les organismes ont un peu trop souffert, n'est ce pas tommy !

Aux dimanches gastro devenus depuis peu les samedis gastro-dimanches Aspro.... , Julie et Nico, Cissou et Nico, Marie Julie et Mickael and last but not the least Del champagne et Fredurday night fever. Au fait on vous promet qu'un jour on va en organiser un !!

A tous ceux que j'ai oublié désolé...

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE	10
Liste des abreviations	13
Introduction	14
I. Généralités	15
A. Les chromosomes	15
1. Généralités.....	15
2. Structure des chromosomes.....	15
B. Régions terminales des chromosomes.....	17
1. Généralités.....	17
2. Régions télomériques	18
a) Structure et dynamique de l'ADN télomérique	18
b) Fonction des télomères	19
3. Régions subtélomériques	20
a) Généralités	20
b) Remaniements subtélomériques équilibrés.....	21
c) Remaniements subtélomériques déséquilibrés.....	23
C. Méthodes d'analyse des remaniements subtélomériques	27
D. Objectif de travail.....	28
II. Matériel et méthodes	30
A. Cohorte de patients.....	30
B. FISH ou Hybridation <i>In Situ</i> Fluorescente	31
1. Principe de la FISH	31
2. Les sondes utilisées	33
3. Les cibles de la FISH	34
4. Protocole de la FISH	35
a) Obtention des chromosomes métaphasiques.....	36

b) Dénaturation de l'ADN.....	36
c) Hybridation de l'ADN	37
d) Lavages post-hybridation.....	37
e) Contre coloration.....	37
f) Analyse microscopique	38
C. MLPA ou Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	39
1. Principe de la MLPA.....	39
2. Sondes utilisées	41
3. Protocole de la MLPA.....	43
a) Extraction de l'ADN	43
b) Etape d'hybridation.....	43
c) Etape de ligation.....	43
d) Etape d'amplification.....	44
e) Electrophorèse capillaire sur séquenceur.....	44
f) Analyse des données.....	45
III. Résultats	47
A. Résultats de la FISH.....	47
B. Résultats de la MLPA.....	49
C. Synthèse des résultats	52
IV. Discussion	53
A. Comparaison FISH/MLPA.....	53
1. Patients discordants	53
a) Patient 26.....	53
b) Patient 25	53
c) Patient 11.....	53
2. Validation de la méthode MLPA par rapport à la méthode de référence.....	54
a) Critères de validation	54
b) Résultats.....	56
3. Comparaison des techniques	58
a) Pré-analytique	58
b) Analytique.....	59

c) Post-analytique.....	60
d) Synthèse.....	60
4. Intérêts/limites FISH.....	61
5. Intérêts/limites MLPA.....	62
B. Patients.....	63
1. Tétrasomie 22q11 associée à un syndrome de Cat eye.....	63
2. Monosomie 2qter et trisomie 10qter associées à une pseudopseudo-hypoparathyroïdie.....	64
3. Trisomie 8pter et trisomie 16qter associées à des variants du nombre de copies.....	66
V. Conclusion.....	68
Références bibliographiques.....	69
Sites internet.....	73
Annexes.....	74
Table des matières.....	76

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucleique
FISH	Fluorescent in situ hybridization
IME	Institut médico-éducatif
Pb	paires de bases
Kb	kilobases (1000 pb)
Mb	Mégabases (1000 kb)
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
OHA	Ostéodystrophie héréditaire d'Albright
PCR	Polymerase chain reaction
PPHP	Pseudopseudohypoparathyroïdie
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Shorts Fluorescents Fragments
Tris-EDTA	Trishydroxyméthylaminométhane-Ethylène Diamine Tétracétique

INTRODUCTION

Depuis sa création la cytogénétique humaine a eu pour objet la détection d'anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques ou moléculaires afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Pour ce faire, elle étudie l'arrangement des gènes au niveau des chromosomes (recherche de remaniements chromosomiques) et quantifie le nombre de copies des gènes (délétions, duplications). Dans le but d'identifier ces réarrangements chromosomiques, les méthodes de comparaison de génomes se sont considérablement sophistiquées et améliorées depuis la méthode du caryotype (identification du nombre et de la taille des chromosomes) qui présentait l'inconvénient de ne pouvoir détecter les réarrangements d'une taille inférieure à sa résolution c'est à dire 5 Mb. C'est ainsi que ce sont développées des méthodes moléculaires plus résolutive au cours des années comme la Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) dans les années 1980, l'Hybridation Génomique Comparative (CGH) sur métaphases puis sur puce à ADN dans les années 1990 et au début des années 2000 et plus récemment la Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments (QMPSF) et la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

Ce travail a pour objectif de comparer une nouvelle méthode de biologie moléculaire utilisée en cytogénétique, la MLPA, à une méthode de référence utilisée en cytogénétique, la FISH, pour l'identification et la caractérisation de remaniements subtélomériques à travers l'étude de 31 patients.

Dans un premier temps nous réaliserons une revue des différents remaniements pouvant être détectés par ces deux techniques. Dans un second temps nous détaillerons les principes des deux méthodes ainsi que l'étude que nous avons menée et sa validation. Puis nous discuterons enfin des résultats obtenus et des perspectives de cette nouvelle méthode.

I. GENERALITES

A. Les chromosomes

1. Généralités

Les chromosomes sont formés du matériel génétique, support de l'hérédité et de l'organisation de la vie cellulaire. Ils sont constitués d'ADN associé à des protéines formant ainsi la chromatine.

La chromatine est localisée dans le noyau des cellules eucaryotes. Son aspect varie au cours du cycle cellulaire, elle est décondensée en interphase, et durant la division cellulaire (mitose), elle se condense, s'enroule progressivement et s'individualise sous forme de chromosomes. Au stade de métaphase, le chromosome est au maximum de sa condensation et est facilement observable, c'est donc à ce stade que son identification est la plus aisée.

L'ensemble des chromosomes humains comporte approximativement 6.10^9 bases, un chromosome représente 50 à 250 millions de bases. Chacun d'entre eux porte quelques centaines à milliers de gènes dont la taille varie de quelques milliers à deux millions de bases.

Chez l'Homme, le nombre de chromosome dans les cellules somatiques est diploïde (2N), et de 46 chromosomes.

Le caryotype est une méthode qui va permettre l'étude du nombre et de la structure des chromosomes d'une cellule en métaphase de la mitose.

Le caryotype humain normal comporte donc 46 chromosomes (2N) composés de :

- 22 paires d'autosomes, notés de 1 à 22 en fonction de leur taille décroissante
- 1 paire de gonosomes, ou chromosomes sexuels : XX chez le sujet féminin et XY chez le sujet masculin.

2. Structure des chromosomes

Chaque chromosome comporte un centromère, région qui contient le kinétochore, centre d'organisation des microtubules responsable de la fixation des chromosomes au fuseau mitotique lors de la mitose. De part et d'autre du centromère, une chromatide présente 2

bras : le bras court ou bras p, placé au dessus du centromère, et le bras long ou bras q placé en dessous du centromère (figure I-1). Si le bras court est presque aussi long que le bras long, le chromosome est dit métacentrique; s'il est plus court, le chromosome est dit submétacentrique. Quand il est encore plus court, le chromosome est appelé subtélocentrique (le chromosome Y est subtélocentrique). Enfin, si ce bras p est très petit, le chromosome est dit *acrocentrique* (figure I-1), ce sont les chromosomes 13, 14, 15, 21, 22.

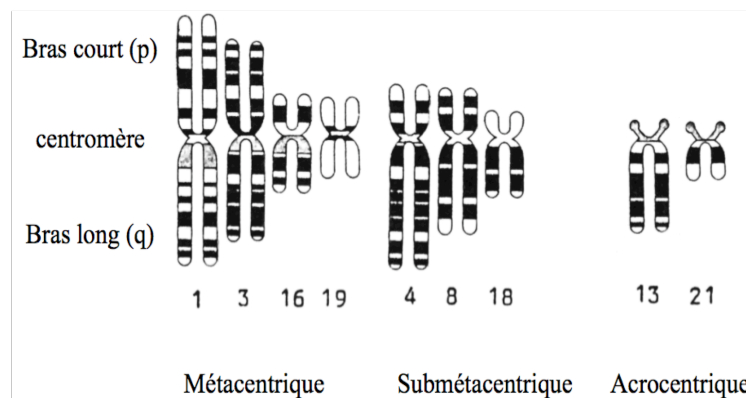


Figure I-1 : Exemples de chromosomes métacentriques, submétacentriques et acrocentriques

Chaque bras est arbitrairement divisé en régions, qui sont notées de 1 jusqu'à 4 (pour certains chromosomes) en partant du centromère. Chaque région est divisée en bandes, entités visibles après usage d'une technique de dénaturation suivie d'une coloration. Chaque bande peut, si nécessaire, être divisée en sous-bandes. Ainsi, un locus sera défini par le numéro du chromosome où se trouve cet emplacement, suivi de la lettre indiquant le bras impliqué, suivie des numéros de région, de bande, voire de sous-bande (figure I-2).

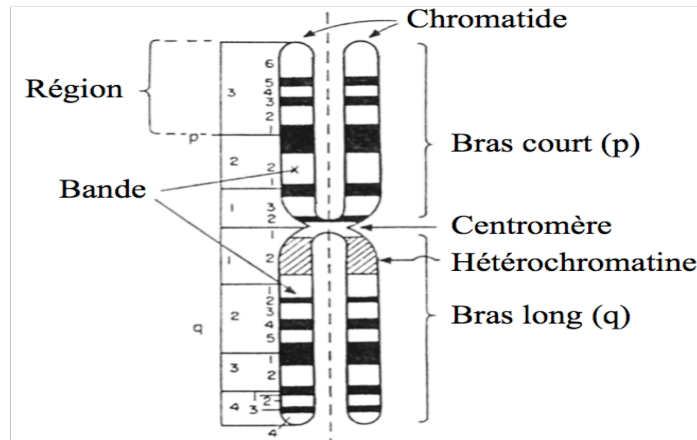


Figure I-2 : Schéma d'un chromosome divisé en région, bande et sous bande

Chaque bras se termine par un télomère (appelé pter pour le bras court et qter pour le bras long), séquence d'ADN répétitive hautement conservée qui empêche les fusions avec d'autres chromosomes. Ces séquences jouent également un rôle dans l'attachement des télomères à l'enveloppe nucléaire, en particulier lors de la méiose, ainsi que dans l'horloge biologique cellulaire.

B. Régions terminales des chromosomes

1. Généralités

Les extrémités des chromosomes linéaires des eucaryotes ont été décrites pour la première fois il y a 80 ans par Muller et McClintock respectivement chez la drosophile et le maïs. Muller a montré que les régions terminales interagissent rarement avec les extrémités de cassures radio induites. Il proposa alors que les extrémités des chromosomes possèdent une structure particulière appelée télomères du grec telos (fin) et mere (segment). Cette formule ne désignait pas seulement l'extrémité distale des chromosomes mais plutôt « un gène terminal avec une fonction particulière qui est ancré à l'extrémité ». En parallèle, B. McClintock en étudiant les cassures radio induites démontre que les chromosomes cassés fusionnent régulièrement au niveau des extrémités avec les chromatides sœurs, menant à des cycles de cassures /fusions presque toujours associés à des pertes de séquences au niveau des points de jonction et laissant penser que ces structures terminales protégeraient le matériel génétique.

Les extrémités chromosomiques sont divisées en deux parties, la plus distale composée d'ADN télomérique et une petite partie plus proximale appelée région subtélomérique.

2. Régions télomériques

a) Structure et dynamique de l'ADN télomérique

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques particulières, localisées à l'extrémité de chromosomes linéaires, indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Les séquences télomériques correspondent à une succession de motifs nucléotidiques répétés en tandem. Le nombre de ces répétitions varie selon les espèces, les individus voire les chromosomes (Blackburn, 1984).

Chez les mammifères, les télomères sont constitués de motifs répétés en tandem sous la forme de séquences (TTAGGG)_n dont le nombre de répétitions varie selon les organismes. Ces séquences présentent une taille allant de 5 à 15 kilobases (Kb) chez l'homme jusqu'à 80 Kb dans certaines souches de souris (Moyzis, 1989 ; Morin et al., 1989 ; Hande et al., 1999).

L'ADN télomérique est bicaténaire excepté l'extrémité terminale 3'OH qui est plus longue, et donc sous forme simple brin. La longueur de cette extrémité simple brin peut varier, elle aussi, selon les différentes espèces de mammifères.

La dynamique télomérique veut qu'à chaque division cellulaire la longueur des télomères diminue de plusieurs dizaines de paire de bases (Watson, 1972). Cette diminution de longueur peut être annulée par des enzymes comme la télomérase. Celle-ci est une ribonucléoprotéine dont la fonction primordiale est le maintien de la longueur des télomères par ajout à leur extrémité de séquences répétées TTAGGG. En effet, dans des cellules dépourvues de télomérase, on assiste à un raccourcissement des télomères au cours des divisions cellulaires, en revanche dans des cellules souches ou des cellules tumorales, on note généralement une forte activité de la télomérase. Ceci permettra aux cellules souches ainsi qu'aux cellules tumorales, de se diviser indéfiniment sans perte de matériel génétique.

b) Fonction des télomères

Les télomères participent à de nombreux événements cellulaires tels que le maintien de l'intégrité génétique, la ségrégation des chromosomes, l'organisation du noyau ainsi que l'horloge biologique.

• Protection génomique

De par leur position à l'extrémité distale des chromosomes, ils empêchent la perte de matériel génétique en empêchant l'action d'exonucléases ou de ligases. N'étant pas reconnus comme des cassures de l'ADN par les systèmes de réparation ou de recombinaison, ils empêchent les fusions et les recombinaisons illégitimes entre chromosomes avec perte de matériel évitant la formation de chromosomes dicentriques ou circulaires. En effet, les extrémités des chromosomes endommagées sont instables et ont tendance à fusionner avec d'autres chromosomes. La formation de ponts chromosomiques peut entraver le déroulement de la mitose menant ainsi à un blocage de la division cellulaire. Ils sont donc essentiels pour garantir l'intégrité des chromosomes et ainsi protéger le génome.

• Horloge biologique et sénescence

Pendant la réplication, l'ADN polymérase ne réplique pas complètement l'extrémité 5' terminale des chromosomes, ce qui entraîne la perte d'une petite partie du télomère à chaque cycle (Watson, 1972). Un an plus tard un chercheur, formule alors une théorie présentant le problème du raccourcissement progressif des séquences télomériques, observé *in vitro* au cours des divisions mitotiques ou *in vivo* en fonction de l'âge, comme une horloge biologique qui déterminerait le vieillissement cellulaire (Olovnikov et *al.*, 1973). La taille des télomères permettrait alors d'établir l'historique de la cellule en déterminant le nombre de divisions cellulaires déjà réalisées et de prédire le nombre de divisions qui restent à effectuer. Ce décompte à chaque division cellulaire, constitue alors une horloge dite mitotique.

Le nombre de divisions réalisées par une cellule humaine serait corrélé à la longueur des télomères (Bodnar et *al.*, 1996). Ce modèle assigne alors aux télomères une fonction vitale expliquant que la durée de vie cellulaire est limitée.

En l'absence de mécanisme spécifique de compensation, le raccourcissement des télomères au-dessous d'une taille critique dans les cellules humaines primaires cultivées *in vitro* va conduire à la sénescence (Levy et *al.*, 1992 ; Harley et *al.*, 1992). En effet, la sénescence constituerait un arrêt définitif de la croissance cellulaire après que les cellules aient réalisé un nombre précis de divisions cellulaires (Martens et *al.*, 2000; Vaziri et *al.*, 1996).

Bien que métaboliquement actives, les cellules sénescents se distinguent par leur incapacité à répliquer l'ADN. La perte d'un télomère pourrait être à l'origine d'une instabilité chromosomique au moment de l'anaphase, provoquant l'activation des mécanismes de veille de l'ADN qui constituerait le signal de sénescence (Liu et *al.*, 2008). Ainsi, la perte d'un seul télomère pourrait suffire à déclencher l'arrêt du cycle cellulaire alors que la majorité des séquences télomériques demeurent intactes (Hemann et *al.*, 2001).

- **Immortalisation cellulaire**

L'immortalisation est un événement qui résulte de la perte du programme de sénescence, suivie de l'activation des mécanismes de maintien des télomères. Cette voie de contournement de la sénescence aboutit à l'acquisition d'un nouveau potentiel de divisions cellulaires. Les cellules nécessitent alors l'activation des mécanismes d'élongation des télomères pour continuer à se diviser et permettre aux cellules d'échapper à l'apoptose. La stabilisation et parfois même l'allongement de la longueur des télomères par une télomérase est requise voire essentielle dans le processus d'immortalisation cellulaire et donc de cancérogenèse (Ayouaz, 2008).

3. Régions subtélomériques

a) Généralités

Les régions subtélomériques sont des séquences uniques spécifiques de chaque chromosome situées de manière proximale par rapport aux séquences répétitives télomériques.

Ces régions formées de nombreuses séquences répétées (TTAGGG)_n dégénérées et très riches en gènes, possèderaient une plasticité et un dynamisme au moment des réplifications qui seraient à l'origine de l'adaptation de l'homme à son environnement mais aussi malheureusement à l'origine de nombreuses maladies (Heather et *al.*, 2002).

Les régions subtélomériques sont propices aux réarrangements chromosomiques et aux duplications entraînant ainsi un polymorphisme important du génome mais les mécanismes ne sont pas clairement élucidés (Linardopoulou et *al.*, 2005). Deux hypothèses existent, la première prône une duplication et évolution indépendante des segments subtélomériques, ainsi les différentes copies accumuleraient des variations nucléotidiques de manière indépendante. La deuxième, plus probable, dit qu'il y a une duplication et des échanges inter-chromosomiques constants et ces échanges permanents expliqueraient le fait que beaucoup de subtélomères partagent des séquences d'ADN identiques à quelques variations nucléotidiques près (Linardopoulou et *al.*, 2005, Riethman et *al.*, 2005).

Les séquences télomériques et subtélomériques peuvent être remaniées spontanément ou bien suite à un stress environnemental. Ces remaniements sont la conséquence d'une altération de la structure des télomères, occasionnant divers remaniements parmi lesquels on retrouve des fusions ou associations selon les cas, des pertes ou gains de télomères et des échanges réciproques ou non entre ces séquences. Celles-ci se produisent pendant la gamétogénèse et vont entraîner principalement deux types de remaniements, ceux dits équilibrés et ceux déséquilibrés. Dans la plupart des cas, ces anomalies apparaissent *de novo* mais peuvent aussi plus rarement être transmises à la génération suivante.

b) Remaniements subtélomériques équilibrés

Ces remaniements touchent la structure des chromosomes, sans perte ni gain de segment chromosomique. Elles concernent généralement un ou deux chromosomes mais peuvent être plus complexes en impliquant plusieurs chromosomes. Ces recombinaisons exigent la survenue de cassures chromosomiques et la réassociation des segments isolés. Les

remaniements équilibrés des régions subtélomériques les plus fréquemment rencontrés sont les translocations.

- **Translocations réciproques équilibrées :**

Il s'agit d'un échange réciproque de segments chromosomiques entre deux chromosomes de deux paires différentes (figure I-3), sans perte ni gain. Elles concernent n'importe quel chromosome, les gonosomes, les acrocentriques et les non acrocentriques. Cet échange survient dans la cellule germinale après cassure des chromosomes et recollement des fragments isolés. On parle de translocations réciproques équilibrées car dans la plupart des cas il n'y a aucune perte de matériel dans l'échange.

Si cet échange a lieu dans une cellule germinale et si le gamète formé participe à la formation d'un zygote, alors la translocation sera présente dans toutes les cellules du sujet.

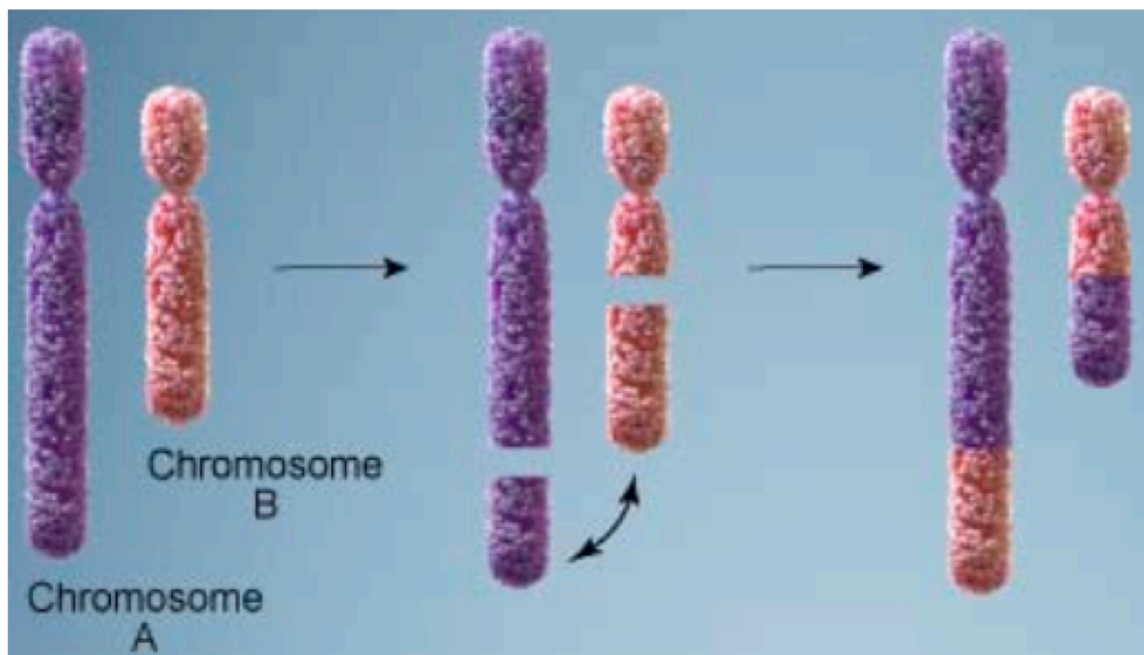


Figure I-3 : Exemple de translocation réciproque équilibrée.

Les remaniements équilibrés n'ont aucune conséquence sur le phénotype du patient, la découverte de l'anomalie génétique se fera, généralement, à partir du moment où le sujet présentera des troubles de la reproduction. En effet la conséquence essentielle de la translocation réciproque équilibrée est le risque de formation de gamètes déséquilibrés

qui peut aboutir, lors de la fécondation, à des zygotes déséquilibrés. Le sujet pourra tout de même avoir une descendance normale car il produit des gamètes normaux et des gamètes avec la translocation équilibrée (figure I-4)

L'existence d'une translocation réciproque équilibrée est estimée à 1 personne sur 500 dans la population générale, elle peut être *de novo* mais il peut s'agir aussi d'une translocation familiale transmise par l'un des deux parents du sujet.

Ainsi la découverte d'une translocation réciproque impose d'étudier le caryotype des parents du sujet. Si l'un des deux parents est porteur il conviendra d'étudier la fratrie afin de définir les sujets porteurs et ainsi pouvoir prévoir et éviter la transmission à la descendance de la translocation de manière déséquilibrée.

c) Remaniements subtélomériques déséquilibrés

• Définition des remaniements déséquilibrés et les conséquences cliniques

Au contraire des remaniements équilibrés, les remaniements déséquilibrés impliquent une perte ou un gain de matériel génétique provoquant alors une monosomie ou une trisomie partielle. Les conséquences cliniques dépendent en règle générale du nombre et de l'importance fonctionnelle des gènes impliqués dans le segment chromosomique en excès ou en défaut.

Ainsi les remaniements déséquilibrés sont à l'origine de nombreux échecs de la reproduction (Trask et *al.*, 2002), ils ont des conséquences sur la fécondation, sur le développement de l'embryon et sur sa viabilité. En effet les anomalies chromosomiques sont retrouvées en général dans environ 50% des fausses couches spontanées du premier trimestre, et dans 29% des malformations fœtales visibles à l'échographie (Eydoux et *al.*, 1989 ; Boulot et *al.*, 1989)).

Lorsque le remaniement est compatible avec la survie du fœtus, il y a un risque de retentissement clinique plus ou moins important à la naissance. Les sujets vont alors présenter à la naissance des dysmorphies faciales associées ou non à des malformations congénitales (cérébrales, cardiaques, osseuses, digestives et/ou génitales) plus ou moins sévères.

Certains sujets ont une absence de dysmorphie et c'est au moment de l'apprentissage (ou plus tardivement parfois) que la famille, ou le pédiatre, s'aperçoivent que le sujet présente un retard d'apprentissage voire un retard mental qui peut être léger à sévère.

Ainsi de nombreuses publications montrent que des remaniements subtélomériques sont retrouvés chez environ 5% à 10% des patients présentant des retards mentaux et/ou des dysmorphies et/ou des malformations congénitales (Flint et *al.*, 1995 ; Knight et *al.*, 1999 ; Vekeman et *al.*, 2000 ; Rossi et *al.*, 2001 ; Baker et *al.*, 2002 ; Faas et *al.*, 2008).

Les remaniements subtélomériques déséquilibrés sont :

- **Déséquilibres de translocations parentales**

Les sujets porteurs de translocations réciproques ne sont pas atteints phénotypiquement, en revanche il est possible qu'ils transmettent un patrimoine génétique déséquilibré au moment de la méiose car celle-ci peut se faire de plusieurs façons différentes et entraîner ainsi la formation de gamètes puis de zygotes déséquilibrés.

Les différents types de ségrégation méiotique aboutissent à la formation d'un zygote à 46 chromosomes mais en fonction des cas le zygote formé présentera une monosomie et/ou une trisomie partielle.

Les différents types des gamètes et zygotes possibles sont résumés dans le schéma ci dessous.

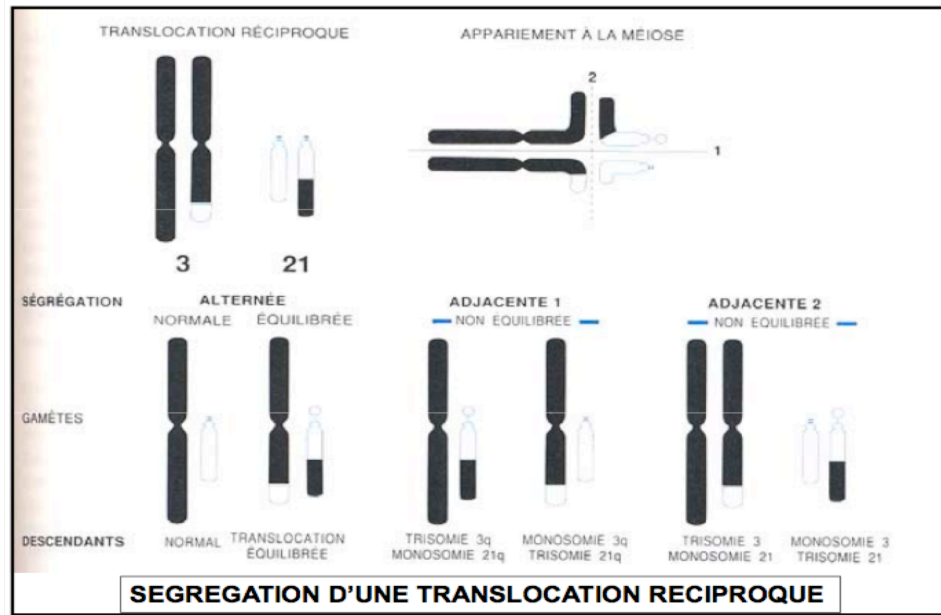


Figure I-4 : Ségrégation méiotique d'une translocation réciproque entre les chromosomes 3 et 21.

- **Translocations par fusion télomérique**

C'est une anomalie rare qui touche n'importe quel chromosome et qui va former deux types de chromosomes. Le premier sera un chromosome circulaire (anneau ou ring) secondaire à une cassure des segments distaux p et q du même chromosome (Figure I-5). Certaines cellules vont perdre l'anneau et présenter une monosomie complète et aboutir à la formation d'une mosaïque.

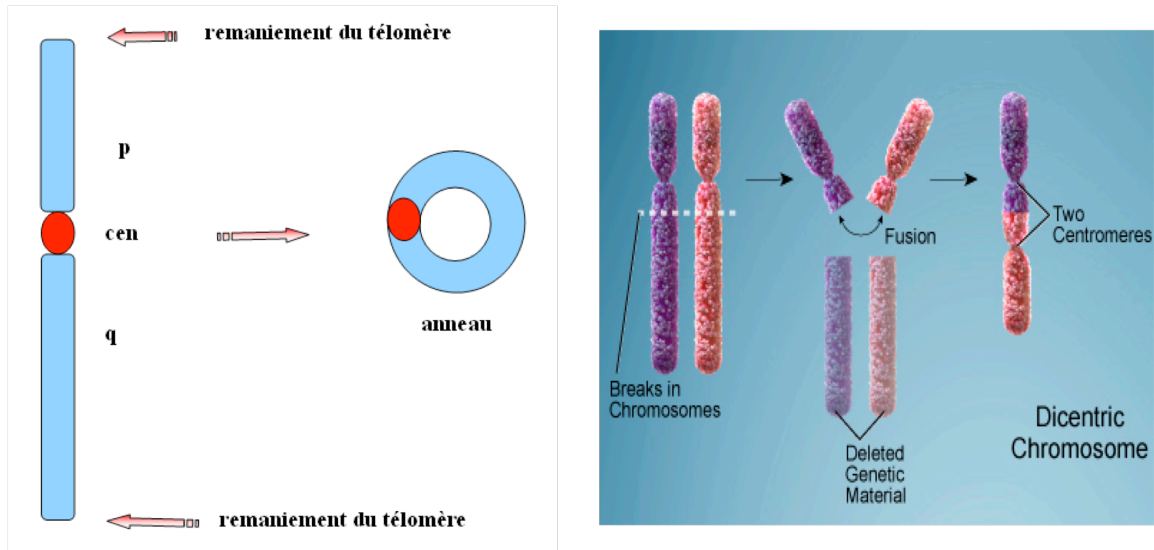


Figure I-5 : Schéma de gauche formation d'un anneau après fusion télomérique . Schéma de droite formation d'un chromosome dicentrique.

Le deuxième type sera un chromosome avec deux centromères, dit dicentrique, si il y a cassure puis fusion des segments distaux de deux chromosomes différents. Le sujet présentera alors une monosomie partielle de chaque chromosome.

- **Délétions terminales**

La délétion partielle est un mécanisme complexe qui va entraîner la perte d'un segment de chromosome.

Le zygote porteur d'un chromosome délété présentera une monosomie partielle, qui peut être viable, et aura des conséquences sur le phénotype et sur le développement de l'enfant à naître. Les conséquences phénotypiques vont dépendre de la taille de la délétion ainsi que des gènes délétés.

Ce mécanisme peut toucher tous les chromosomes et entraîner des délétions de toutes les tailles. Les délétions les plus grandes sont repérables au caryotype standard après marquage, mais certaines délétions de petites tailles inférieure à 1 Mb, non repérables au caryotype, nécessitent des techniques d'investigations de cytogénétique moléculaire.

Certains syndromes sont associés à des microdélétions subtélomériques comme la délétion 5pter retrouvée dans le syndrome du Cri-du-Chat et la délétion 4pter dans le syndrome de Wolf-Hirshhorn.

- **Duplications**

Une duplication se définit comme la répétition une ou plusieurs fois d'un segment de chromosome. Il existe plusieurs types de duplications :

- Duplication dans la même orientation que le segment d'origine, c'est une duplication directe (dite aussi en tandem),
- Duplication inversée à 180° par rapport au segment d'origine, c'est une duplication indirecte (dite en miroir).

C. Méthodes d'analyse des remaniements subtélomériques

De nombreux microremaniements subtélomériques sont non détectables par les techniques de cytogénétique conventionnelle. Le développement des techniques de cytogénétique moléculaire a permis de mieux mettre en évidence ces microréarrangements souvent cryptiques passant ainsi inaperçu au caryotype.

Il existe plusieurs méthodes qui permettent de rechercher les microremaniements qui interviennent sur des fragments courts d'ADN, microdélétions ou duplications. Nous parlerons principalement de la Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), de la Multiplex Ligation-depenant Probe Amplification (MLPA), de la puce d'hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization array ou CGH array), et enfin de la Quantitative Multiplex PCR of Shorts Fluorescents Fragments (QMPSF). Les deux premières étant celles que nous avons choisi d'utiliser et de comparer sur notre cohorte de patients, nous décrirons leur principe dans le paragraphe matériel et méthodes ainsi que leurs avantages et inconvénients dans la discussion.

La CGH array utilise le principe de l'hybridation génomique comparative (CGH) sur un support au niveau duquel sont déposées des séquences d'ADN connues ou cibles. Les sondes correspondent à l'ADN du patient (ADN test) marqué par la Cyanine 3 (Cy3) et l'ADN du témoin par la Cyanine 5 (Cy5). Les deux ADN en quantité équivalente sont dénaturés puis hybridés sur une puce à ADN. Une analyse bioinformatique des signaux fluorescents est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel et après normalisation des intensités de fluorescence, il établit un rapport des intensités de fluorescence (RIF) pour l'ensemble des séquences d'ADN présentes. Pour chacune d'entre elles, un RIF égal à 1 correspond à

un nombre de copies normal c'est-à-dire deux, entre 1,3 et 1,4 à un gain d'une copie et entre 0,6 et 0,7 à la perte d'une copie (Béri-Dexheimer et *al.*, 2006). Cette technique permet théoriquement la détection de déséquilibres génomiques de séquences spécifiques au seuil d'une copie, et donc la détection avec la même sensibilité d'une délétion ou d'une duplication pour des segments d'ADN à partir de 5 à 10 kb. En revanche cette dernière ne permet pas de détecter les remaniements équilibrés comme les translocation réciproques ou les inversions.

La QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Shorts Fluorescents Fragments*) est une méthode semi-quantitative basée sur une PCR multiplex de courts fragments fluorescents. Le principe repose sur des amplicons de petite taille (<300 pb) générés grâce à deux amorces dont l'une est marquée par un fluorochrome et sur une PCR qui est réalisée avec un nombre limité de cycles (en général inférieur ou égal à 21) pour se situer dans la phase exponentielle. L'analyse s'effectue ensuite après séparation des produits de PCR sur séquenceur automatique afin d'obtenir des électrophorégrammes qui permettront une comparaison de hauteur du même pic entre deux échantillons distincts. Cette technique va permettre de détecter les remaniements déséquilibrés mais ne permet pas de détecter les remaniements équilibrés.

D. Objectif de travail

Ce travail a pour but de comparer deux techniques essentielles en cytogénétique dans la détection de microremaniements subtélomériques. Il s'agit, d'une part, de la FISH qui est une méthode de référence utilisée depuis de nombreuses années au laboratoire que ce soit dans le cadre du diagnostic d'une aneuploïdie ou d'un remaniement chromosomique équilibré ou non, et d'autre part la MLPA. Cette dernière plus récente a été décrite en 2002 (Shouten *et al.*), et est utilisée en laboratoire de cytogénétique pour la recherche de microremaniements et notamment ceux des régions subtélomériques. Cette technique émergente est actuellement en cours d'évaluation dans plusieurs laboratoires et notamment au laboratoire de cytogénétique de l'hôpital de la mère et de l'enfant. La

comparaison à la FISH permettrait de déterminer quel est son bénéfice éventuel et de préciser ses indications.

Nous essayerons donc d'évaluer la sensibilité et la spécificité de cette nouvelle technique par rapport à la technique de référence, nous comparerons les avantages et les inconvénients inhérents à celles-ci, et nous essayerons d'aborder le côté économique de ces techniques ainsi que leurs pertinences dans la détection des remaniements subtélomériques.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Cohorte de patients

Dans cette étude, nous avons incorporés deux types de patients, premièrement des nourrissons présentant des signes cliniques et/ou des malformations évoquant une anomalie génétique et deuxièmement des enfants ainsi que des adolescents vus en consultation pédiatrique depuis plusieurs années pour des retards mentaux et/ou de malformations congénitales.

Pour la recherche de remaniements subtélomériques, les sujets devaient présenter au moins trois signes majeurs parmi les signes suivant :

- Retard psychomoteur léger, modéré ou sévère.
- Dysmorphie faciale.
- Retard de croissance prénatal.
- Retard de croissance postnatal.
- Anomalies congénitales touchant les mains, les pieds, le cœur, les organes génitaux ou tout autre organe.
- Antécédent familial de retard mental.

Une exception a tout de même était faite pour ce dernier critère concernant les enfants adoptés car au sein de ce groupe nous avons deux enfants issus de l'adoption dont les antécédents familiaux sont très difficiles à obtenir.

De plus, pour chaque patient de l'étude a été fait un caryotype en bande R, ces derniers n'ont révélé aucune anomalie visible sauf pour un patient, P26, qui présentait un chromosome surnuméraire qui nous semblait à l'époque essentiellement constitué d'hétérochromatine.

L'étude a été réalisée entre 2007 et 2010 à l'hôpital de la mère et de l'enfant à Limoges et les parents ont donné leur accord afin d'effectuer des recherches génétiques sur un échantillon de sang total prélevé sur leur enfant.

Au final, la cohorte pour cette comparaison de méthode est de 31 patients dont les caractéristiques cliniques sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II-1: Récapitulatif des signes cliniques des différents patients.

Patients	dysmorphies facial	malformations	retard mental	cas familiaux	croissance
P1	x	O	+++	Absence	N
P2	x	R	+++	Absence	RCIU
P3	x	M	+++	Absence	N
P4	x	Absence	++	Consanguinité	N
P5	x	Absence	+++	Coté maternel	N
P6	x	Absence	++	Absence	N
P7	x	Ce,R,O	+++	Absence	RCIU
P8	Absence	Ce,O	+++	Absence	RCIU
P9	x	M	++	Adoption	N
P10	x	M	+++	Absence	N
P11	x	Absence	+++	mère+tante+cousin	N
P12	x	Absence	++	Absence	RCIU
P13	x	Absence	+++	Absence	RCIU
P14	x	C	+++	Absence	N
P15	x	Absence	+++	Adoption	N
P16	x	Absence	+++	Sœur	N
P17	x	G	++	Absence	N
P18	x	Absence	+++	Coté maternel	N
P19	x	Absence	+++	Frère	N
P20	x	M	++	Absence	N
P21	x	Absence	++	Absence	RCIU
P22	x	Absence	+++	Absence	RCIU
P23	x	M	+++	Absence	N
P24	x	M	+++	Absence	N
P25	x	M	++	Coté maternel	RC
P26	x	Art, R	Absence	Absence	RC
P27	x	Absence	+++	paternel+frère	RCIU
P28	x	Absence	+++	Frère de P27	N
P29	x	C	+++	Deux parents	N
P30	x	Absence	+++	Absence	RC
P31	x	Absence	+++	Deux frères	RCIU

Légende : x : Présence de dysmorphies ; Art : Artériel ; C : Cardiaque ; G :Génital ; M : Main ;

O :Ophthalmologique ; R : Rénal ; ++ : retard mental modéré ; +++ : retard mental sévère. RC: Retard de croissance ; RCIU : Retard de croissance intra utérin

B. FISH ou Hybridation *In Situ* Fluorescente

1. Principe de la FISH

L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de génétique impliquant la mise en présence d'au moins deux brins simples d'acides nucléiques dans des conditions physico-chimiques précises. Elle désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simple brin de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons

hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U si l'on parle d'ARN) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs : composition en bases, longueur des duplex, pH, température.

Dans le cadre de l'hybridation *in situ*, le brin dont on connaît au moins une partie de la séquence est appelé une sonde, l'autre brin, celui que l'on souhaite déterminer, constitue la cible. La sonde est marquée par couplage chimique avec une molécule pouvant générer un signal et ce marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radio-actifs (sondes dites "chaudes" comme le tritium H³) ou par des produits non radio-actifs fluorescents ou non fluorescents (sondes dites "froides" comme la biotine). Depuis les années 1990, les techniques non isotopiques se sont développées rapidement en laboratoire de diagnostic pour leurs facilités et sécurités d'emploi (Lichter et *al.*, 1990 et 1991).

Le principe général de la FISH est donc celui de l'hybridation moléculaire *in situ* associée à des sondes marquées par des molécules fluorescentes (Pinkel et *al.* 1986) (FigureII-1). Après une étape de culture cellulaire et d'étalement des chromosomes sur lame (ou seulement étalement du prélèvement dans le cas de noyaux interphasiques seuls), le matériel génétique peut être étudié.

La FISH se déroule synthétiquement en 5 étapes :

- Dénaturation de l'ADN et des sondes
- Hybridation des sondes avec leurs séquences complémentaires sur l'ADN cible.
- Lavages
- Contre coloration
- Lecture au microscope à fluorescence.

Cette technique permet de déterminer la position d'un locus dans le génome et de diagnostiquer les réarrangements chromosomiques équilibrés et déséquilibrés comme les duplications et les délétions.

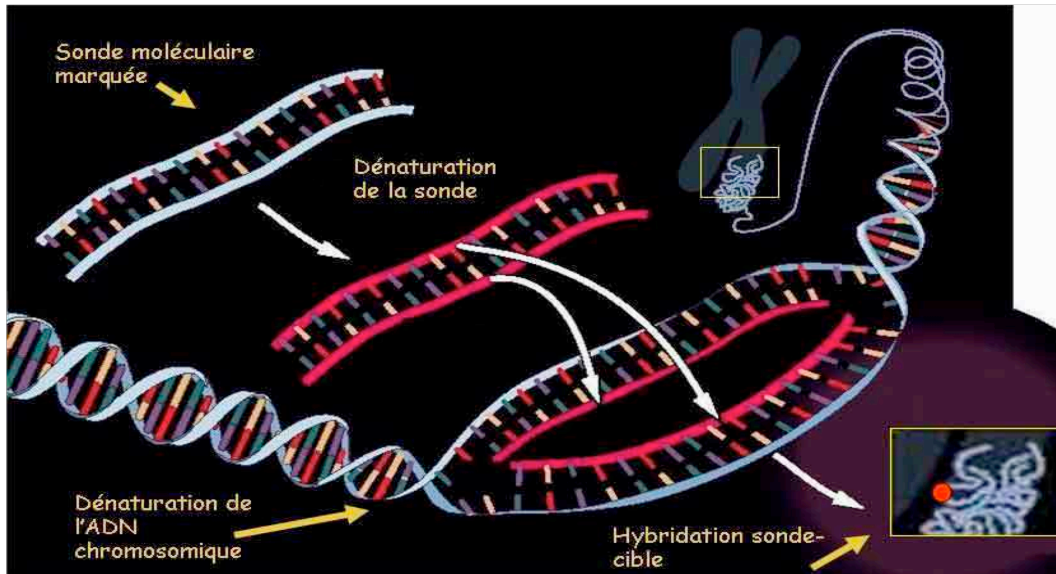


Figure II-1 : Principe général de l'hybridation *in situ*

2. Les sondes utilisées

Pour notre étude nous avons utilisés le kit Totelvysion[®] (Vysis) commercialisé par Abbott molecular[®].

Ce kit contient un mélange de sondes spécifiques de chaque région subtélomérique p et q des autosomes 1 à 12 et 16 à 20, des régions subtélomériques q pour les chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) et des régions pseudoautosomales p et q des chromosomes X et Y. Au total le kit Abbott[®] contient 41 sondes spécifiques visant des régions riches en gènes qui sont situées entre 100 et 300 kb des télomères selon les différents chromosomes (Meyne et al., 1994). Les sondes du kit Totelvysion Vysis[®] ont été choisies de telle sorte qu'elles s'hybrident sur les séquences contenant les gènes les plus proches des télomères de chaque chromosome (Figure II-2).

Les sondes subtélomériques sont réparties dans un ensemble de 15 mélanges. Dans chaque mélange, les sondes sont marquées par des fluorochromes émettant des couleurs différentes, ceci afin de reconnaître les différentes régions subtélomériques du mélange lors de la lecture au microscope.

Chaque mélange contenant les sondes locus spécifiques ainsi que leurs cibles sont résumés dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : Tableau récapitulatif des sondes du kit totalvysion vysis abbott.

Mélange de sondes	Chromosomes	Locus cible	Sondes
1	1	CEB108/T7	TelVysion 1p
	1	D18S552	TelVysion 1q
	X	DXYS129	TelVysion Xp
	Y	DXYS153	TelVysion Yp
	X	Xp11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP X
2	2	VIJyRM2052	TelVysion 2p
	2	D2S447	TelVysion 2q
	X	EST Cdy 16c07 for SYBL1	TelVysion Xq
	Y	EST Cdy 16c07 for SYBL1	TelVysion Yq
	X	Xp11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP X
3	3	D3S4559	TelVysion 3p
	3	D3S4560	TelVysion 3q
	22	MS607;ACR	TelVysion 22q
	22	LSI BCR 22q11	LSI BCR 22
4	4	GS10K2/T7; 4p02	TelVysion 4p
	4	D4S2930	TelVysion 4q
	21	VIJyRM2029	TelVysion 21q
	21	LSI AML 21q22	LSI AML 21q22
5	5	C84c11/T3	TelVysion 5p
	5	D5S2907	TelVysion 5q
6	6	6PTEL48	TelVysion 6p
	6	VIJyRM2158	TelVysion 6q
	13	D13S327	TelVysion 13q
	13	LSI 13q14	LSI 13q14
7	7	VIJyRM2185	TelVysion 7p
	7	VIJyRM2000	TelVysion 7q
	14	D14S1420	TelVysion 14q
8	8	D8S504	TelVysion 8p
	17	282M16/SP6	TelVysion 17p
	8	VIJyRM2053	TelVysion 8q
	17	17p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP 17
9	9	305J7-T7	TelVysion 9p
	9	D9S325	TelVysion 9q
	17	D17S928	TelVysion 17q
	17	17p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP 17
10	10	10pTEL006	TelVysion 10p
	10	D10S2290	TelVysion 10q
	15	D15S936	TelVysion 15q
	15	LSI PML 15q22	LSI PML 15q22
11	11	D11S2071	TelVysion 11p
	18	D18S552	TelVysion 18p
	11	D11S1037	TelVysion 11q
	18	18p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP 18
12	12	8M16/SP6	TelVysion 12p
	12	VIJyRM2196	TelVysion 12q
	18	VIJyRM2050	TelVysion 18q
	18	18p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	CEP 18
13	16	16pTEL05	TelVysion 16p
	16	16qTEL013	TelVysion 16q
14	19	129F16/SP6	TelVysion 19p
	19	D19S238E	TelVysion 19q
15	20	20pTEL18	TelVysion 20p
	20	20QTEL14	TelVysion 20q

3. Les cibles de la FISH

Les principales cibles des sondes de FISH sont les noyaux interphasiques et les chromosomes métaphasiques :

- Les noyaux interphasiques sont faciles à obtenir à partir d'un prélèvement sanguin, jugal, de liquide amniotique ou de cellules tumorales. Les noyaux peuvent être directement hybridés, permettant ainsi l'obtention d'un résultat rapide. Cette technique est principalement utilisée dans le dépistage rapide d'aneuploïdie (anomalie du nombre de chromosomes) et de délétion.

- Les chromosomes métaphasiques sont la cible de choix en cytogénétique constitutionnelle. Ils sont obtenus de la même façon que pour la réalisation d'un caryotype, c'est à dire à partir d'un prélèvement sanguin hépariné qui va permettre de recueillir les lymphocytes du patient et de les mettre en culture. Cette technique plus longue permet de mettre en évidence des remaniements qu'ils soient équilibrés ou déséquilibrés.

Pour notre étude nous avons donc du travailler sur chromosomes métaphasiques car le mélange de sondes du kit Totalvision Vysis® est difficile à interpréter sur les noyaux interphasiques.

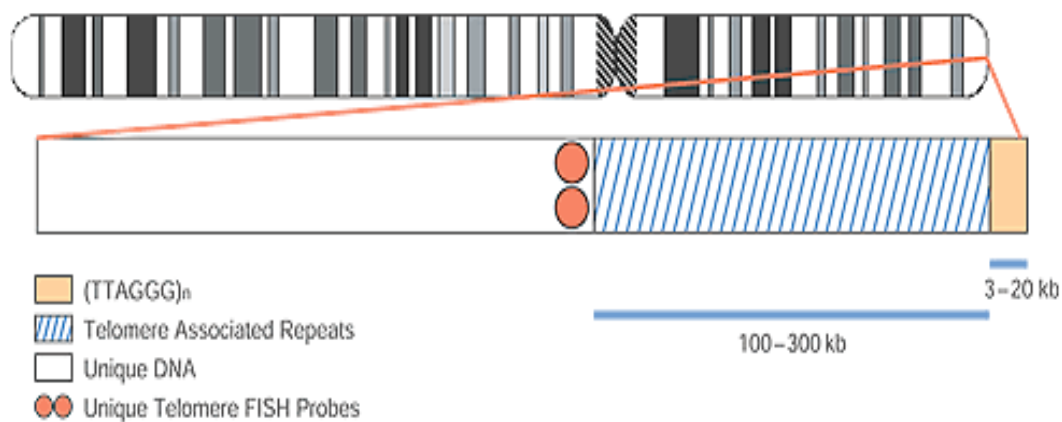


Figure II-2 : cible des sondes subtéломériques du kit Vysis Abbott®

4. Protocole de la FISH

Le protocole de FISH que nous avons utilisé pour l'étude est celui pratiqué en routine au laboratoire de cytogénétique de l'hôpital de la mère et de l'enfant.

a) Obtention des chromosomes métaphasiques

Les chromosomes sont visibles au stade de métaphase de la mitose, les lymphocytes sanguins des patients vont donc être stimulés et mis en culture en présence d'un agent mitogène, la phytohémagglutinine. La culture lymphocytaire est réalisée à 37°C sous CO₂ pendant 72 heures. La division cellulaire est ensuite arrêtée au troisième jour par un agent antimitotique, la colchicine, qui est ajouté à la culture. La réaction d'inhibition s'effectue à 37°C pendant 1h30 min et une fois celle ci terminée, nous réalisons un choc hypotonique afin d'obtenir une dispersion des chromosomes. Ces derniers sont fixés à l'aide du fixateur Carnoy (1 volume d'acide acétique et 3 volumes de méthanol) puis étalés sur des lames propres et dégraissées. Pour l'étude, nous utilisons quatre lames par patient, chacune divisée en quatre zones où sont déposées les mélanges de sondes pour la FISH (figure II-3).

Au final la préparation des chromosomes métaphasique dure 4 jours.

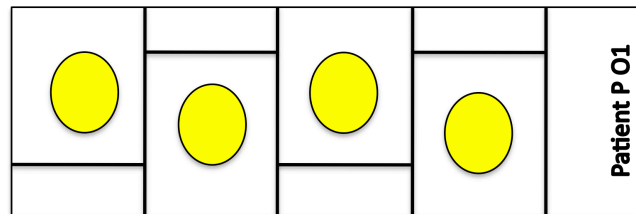


Figure II-3 : Schéma des lames patient utilisées en FISH, en jaune les zones d'étalements chromosomiques.

b) Dénaturation de l'ADN

On dépose 10 µl de chaque mélange de sondes prêt à l'emploi sur les zones où sont étalés les chromosomes en métaphase. Les dépôts sont recouverts par une lamelle qui est ensuite scellée sur la lame à l'aide de rubber ciment.

Les lames sont placées sur une plaque chauffante à 73°C pendant 4 minutes où l'ensemble du dépôt, c'est à dire les sondes et l'ADN cible, sont dénaturés.

c) Hybridation de l'ADN

L'hybridation des sondes avec leurs séquences complémentaires au niveau de l'ADN est effectuée à 37°C dans un incubateur pendant 16 à 24 heures. Les lames sont placées dans une chambre humide afin d'éviter le dessèchement de la préparation.

d) Lavages post-hybridation

Afin d'éliminer les marquages non spécifiques, les lames sont lavées dans deux solutions stringentes. Le premier lavage s'effectue dans une solution saline de citrate (SSC) 0,4X et du NP-40 à 0,3% pendant 2 minutes à 73°C, puis le deuxième dans du SSC 2X et du NP-40 à 0,1% pendant 30 secondes à température ambiante. Les lames sont ensuite séchées.

e) Contre coloration

Elle est effectuée à l'aide du DAPI II (Vysis®) qui contient un agent intercalant de l'ADN, le DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole) et un antifading (1,4-phenylenediamine) qui évite l'extinction rapide de la fluorescence. Le DAPI II est déposé sur la lame au niveau de la préparation cellulaire pour être ensuite recouvert d'une lamelle. Les lames ainsi préparées sont conservées à 4°C jusqu'à la lecture au microscope à épifluorescence.

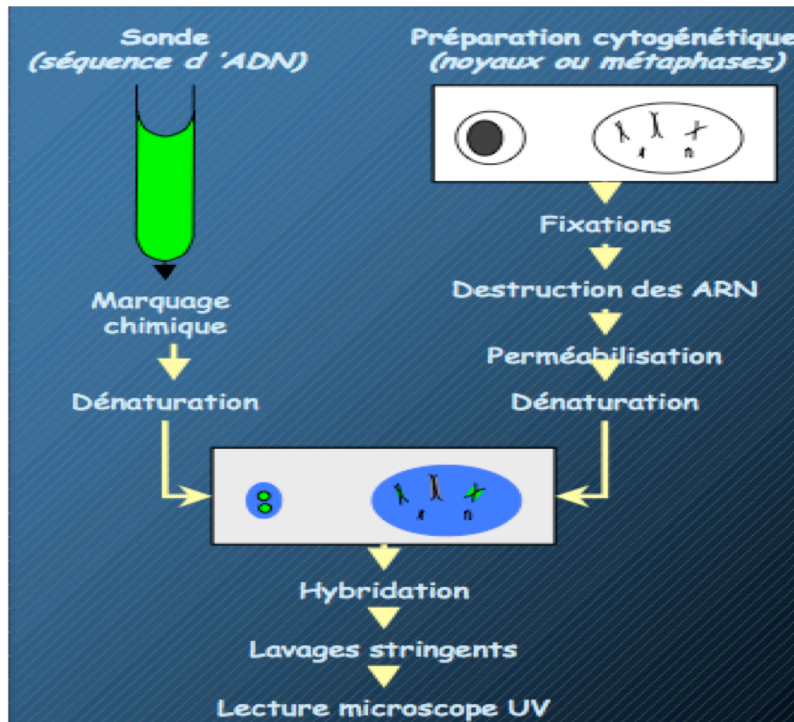


Figure II-4 : Schéma du protocole de FISH d'après le Dr Buchonnet (CHU ROUEN).

f) Analyse microscopique

La lecture s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence (Zeiss®). Un fluorochrome est caractérisé par son spectre d'excitation et son spectre d'émission. La lecture s'effectue d'une part grâce à un rayonnement sélectionné par un filtre d'excitation spécifique du fluorochrome et d'autre part grâce au filtre d'émission spécifique du fluorochrome qui va permettre de visualiser la fluorescence émise.

Pour chaque zone de lecture, nous observons entre 10 et 20 mitoses (figure II-5).

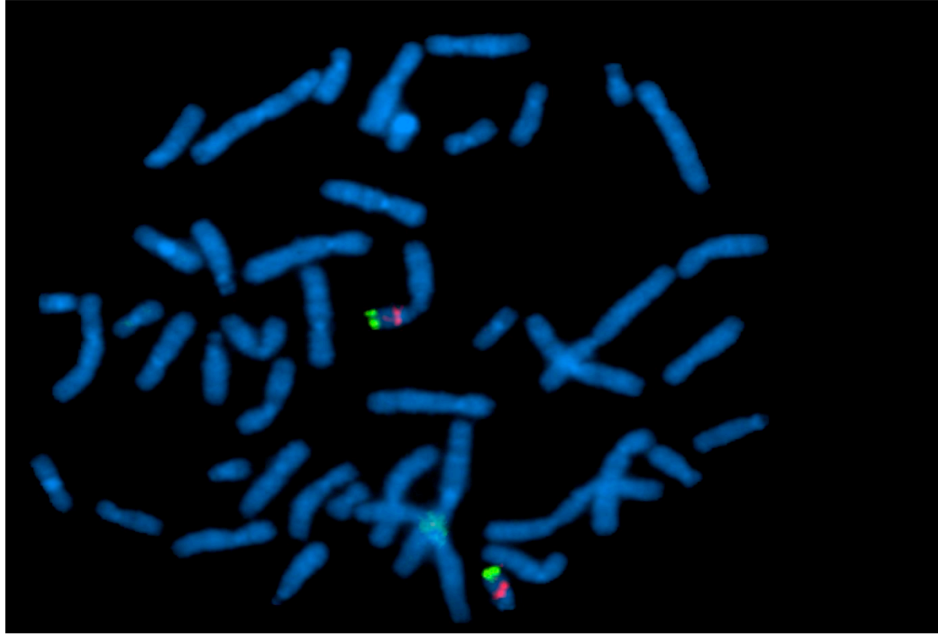


Figure II-5 : Image d'une mitose au microscope à épifluorescence après un marquage du chromosome 22. En rouge le locus TUPLE1 et en vert la sonde subtélomérique de contrôle.

C. MLPA ou Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

1. Principe de la MLPA

La MLPA est une technique décrite en 2002 par Shouten *et al.* C'est une méthode moléculaire de semi quantification génomique en multiplex.

Cette technique, évaluée dans le service de cytogénétique de l'hôpital de la mère et l'enfant, permet d'analyser 46 locus dans une même réaction.

Son principe repose sur l'amplification simultanée par PCR de différentes sondes hybridées aux séquences d'intérêt du génome et ce grâce à une seule paire d'amorces oligonucléotidiques fluorescentes. L'intensité de fluorescence des amplicons (un amplicon = une région subtélomérique amplifiée) après PCR reflète le nombre de séquence présente initialement.

La quantification génomique repose alors sur la comparaison de l'intensité de fluorescence de chacun des amplicons du patient à celles obtenues chez un ou plusieurs individus de contrôle. Elle permet seulement de détecter des remaniements déséquilibrés de type délétions et duplications.

La MLPA se déroule synthétiquement en 5 étapes (figure II-6) :

- Une phase d'hybridation où une paire de sondes marquées s'hybride normalement sur l'ADN complémentaire de manière juxtaposée.
- Une phase de ligation où les sondes complémentaires juxtaposées sont liées par une ligase.
- Une phase d'amplification où les sondes liées servent de matrice pour une amplification par PCR avec des amorces marquées par des fluorochromes.
- une séparation des amplicons par électrophorèse capillaire.
- Une analyse des histogrammes et la détermination d'un rapport d'intensité de fluorescence.

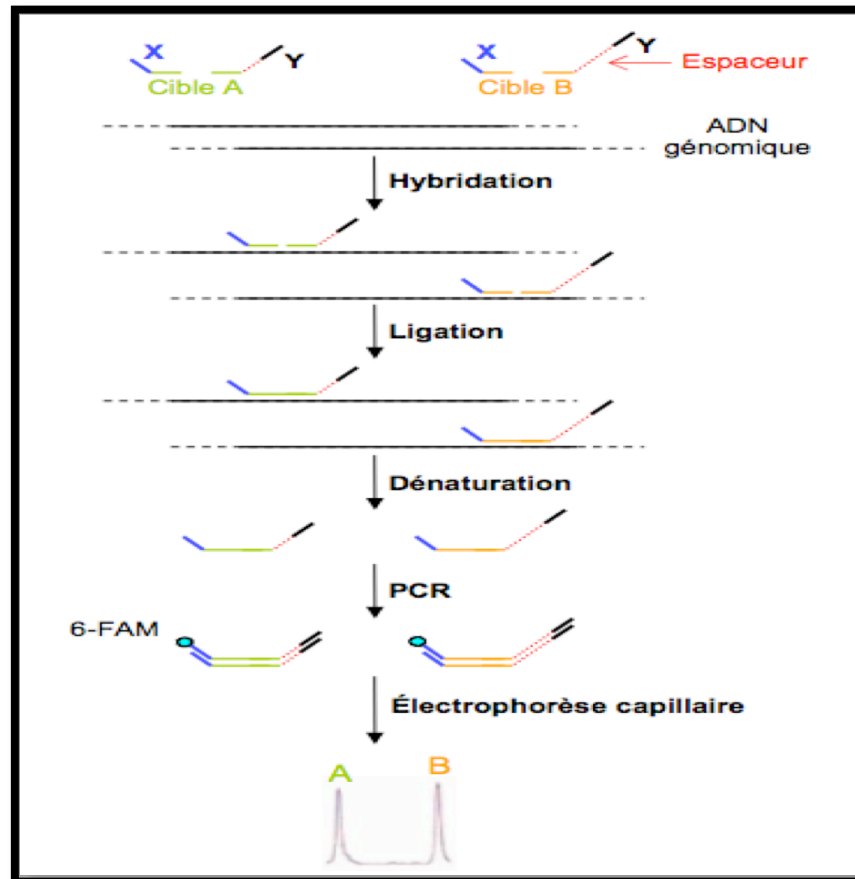


Figure II-6 : Les étapes de la MLPA d'après Tanguy Watrin 2009.

2. Sondes utilisées

Dans cette étude nous avons utilisés deux kits MLPA commercialisés par la société MRC Holland®, le kit SALSA MLPA P036 et le SALSA MLPA P070.

Un kit contient des couples d'amorces qui vont cibler une région subtélomérique spécifique, il y a donc 41 régions subtélomériques qui sont recherchées dans chaque kit. Pour les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22, qui sont dits acrocentriques, il y a une séquence cible subtélomérique et une séquence proximale qui va servir de contrôle pour les trisomies. Au total le kit permet la recherche de 46 remaniements cryptiques (Tableau II-3). L'utilisation des kits P036 et P070 en parallèle va permettre de confirmer un résultat.

Tableau II-3 : Tableau récapitulatif des locus d'intérêts détectés par les kits MLPA P036 et P070 ainsi que de la taille des amplicons.

Position chromosomique	Locus cible		Longueur des amplicons(pb)	
	P036/P070	P036	P070	P036
01p36.33	TNFRSF4	TNFRSF18	130	306
02p25.3	ACP1	ACP1	136	315
03p26.3	CHL1	CHL1	142	323
04p16.3	PIGG	PIGG	151	329
05p15.33	PDCD6	CCDC127	158	337
06p25.3	IRF4	IRF4	166	346
07p22.3	ADAP1	UNC84A	172	355
08p23.3	FBXO25	FBXO25	179	362
09p24.3	DMRT1	DOCK8	186	370
10p15.3	DIP2C	ZMYND11	193	379
11p15.5	RIC8B	BET1L	202	387
12p13.33	SLC6A12	JARID1A	208	393
13q11	PSPC1	PSPC1	219	402
14q11.2	CCNB1IP1	PARP2	227	409
15q11.2	MKRN3	NDN	235	418
16p13.3	POLR3K	DECR2	242	427
17p13.3	RPH3AL	RPH3AL	250	436
18p11.32	USP14	THOC1	258	444
19p13.3	CDC34	PPAP2C	265	450
20p13	SOX12	ZCCHC3	274	459
21q11.2	RBM11	HSPA13	283	466
22q11.21	BID	BID	289	478
Xp22.33PAR	SHOX	SHOX	298	484
01q44	SH3BP5L	SH3BP5L	307	132
02q37.3	CAPN10	ATG4B	313	139
03q29	BDH1	KIAA0226	322	145
04q35.2	TRIML2	FRG1	330	152
05q35.3	GNB2L1	GNB2L1	337	160
06q27	PSMB1	TBP	346	166
07q36.3	VIPR2	VIPR2	355	172
08q24.3	ZC3H3	RECQL4	361	179
09q34.3	EHMT1	EHMT1	372	186
10q26.3	PAOX	ECHS1	379	193
11q25	NCAPD3	IGSF9B	386	202
12q24.33	ZNF10	ZNF10	395	211
13q34	F7	CDC16	402	218
14q32.33	MTA1	MTA1	411	226
15q26.3	ALDH1A3	TM2D3	418	233
16q24.3	GAS8	GAS8	426	241
17q25.3	TBCD	SECTM1	434	250
18q23	C18orf22	CTDP1	441	258
19q13.43	CHMP2A	CHMP2A	450	265
20q13.33	OPRL1	UCKL1	458	274
21q22.3	PRMT2	S100B	466	281
22q13.33	RABL2B	ARSA	475	290
Xq28PAR	VAMP7	VAMP7	483	298

3. Protocole de la MLPA

Le protocole que nous avons suivi est celui préconisé par la société MRC Holland®.

Chaque étape de préparation se faisait sous hôte avec des consommables stériles DNase free et de l'eau distillée stérile. De l'hybridation à l'amplification nous avons utilisés des barrettes de PCR 8 puits et un thermocycler avec couvercle chauffant.

a) Extraction de l'ADN

Tout d'abord nous avons fait une extraction de l'ADN des patients à partir de sang total grâce au kit Flexigene commercialisé par la société QIAGEN®. Ensuite nous avons contrôlé la concentration en ADN de chaque extrait et ajusté celle ci avec du Tris-EDTA afin que la concentration finale de l'extrait d'ADN de tous les patients soit de 20 ng/µl.

b) Etape d'hybridation

- Dénaturation initiale de l'ADN :

Les ADN patients (5 µL) sont disposés dans des tubes à PCR (0,2 mL) puis sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes dans le thermocycler.

- Hybridation :

Une fois l'échantillon redescendu à 25°C, on ajoute à celui ci 3 µl d'un mix composé à moitié par un tampon MLPA et l'autre moitié par le mélange de sondes complémentaires du kit P036 ou P070. Ce mélange subit alors une deuxième dénaturation à 95°C pendant 1 minute, puis l'hybridation des sondes s'effectue à 60°C sur une durée minimum de 16 heures.

c) Etape de ligation

- Préparation du mix de tampon de ligation

On prépare 6 µl de tampon de ligation, 25 µl d'eau stérile et 1 µl de ligase, soit 32 µl de mix pour chaque tube d'ADN patients hybridé.

- Ligation

Elle se déroule en 3 étapes

- Ligation des sondes juxtaposées à 54°C pendant 15 minutes
- Dénaturation à 98°C pendant 5 minutes
- Fin de réaction à 4°C

d) Etape d'amplification

Une fois l'étape de ligation effectuée, l'étape d'amplification par PCR peut être réalisée. Elle commence par le transfert de 10 µl de produits de ligation auxquels on ajoute 30 µl de tampon PCR ainsi que le mix de PCR composé de 2 µl d'amorces de PCR marquées par un fluorochrome (SALSA 6-FAM PCR primer-dNTP), 2 µl de tampon de dilution, 5,5 µl d'eau stérile et 0,5 µl d'une enzyme ADN polymérase.

La réaction d'amplification commence alors et se décompose ainsi :

- 35 cycles de dénaturations à 95°C pendant 30 secondes, puis hybridation à 60°C pendant 30 secondes et élongation à 72°C pendant 60 secondes.
- Elongation finale à 72°C pendant 20 minutes.
- Fin de la réaction à 4°C.

L'amplification terminée nous obtenons 50 µl de produits de PCR qui peut se conserver à 4°C et dans l'obscurité pendant une semaine afin d'effectuer des tests complémentaires si nécessaires.

e) Electrophorèse capillaire sur séquenceur

Les produits de PCR ou amplicons (1 à 1,5 µL) sont dénaturés à 95°C pendant 3 minutes dans un thermocycler en présence de formamide désionisé et d'un marqueur de taille interne, le ROX-500 (Applied Biosystem®). Les amplicons sont alors séparés sur un séquenceur d'ADN par électrophorèse capillaire.

Cette technique dont le principe est de séparer les produits de PCR d'un liquide selon leur rapport taille / charge à l'intérieur d'un petit tube capillaire à l'aide d'un champ électrique va nous permettre de séparer nos amplicons d'une longueur précise (tableau II-3).

A la sortie du capillaire les amplicons sont détectés grâce à leur fluorochrome (6-FAM), le signal du détecteur est envoyé à un ordinateur qui traite ces données. Les produits de PCR séparés apparaissent sur l'électrophorégramme sous forme de pics caractérisés par leur aire et leur hauteur. Leur longueur est déterminée par rapport à l'étalon de contrôle de taille, le ROX-500.

Les séquenceurs que nous avons utilisés au CHU de Limoges sont des Applied Biosystems® (ABI) :

- ABI-3130XL Genetic Analyser (16 capillaires),
- ABI-310 Genetic Analyser (1 capillaire).

f) Analyse des données

Chaque région subtélomérique est caractérisée par un amplicon de longueur déterminée et spécifique.

L'utilisation du logiciel GeneMapper® va permettre d'éditer un électrophorégramme (figure II-7) avec les pics d'intérêts sélectionnés qui seront les amplicons des séquences recherchées.

La sélection des pics d'intérêts permet de leur attribuer une aire et une hauteur.

Les aires et les hauteurs de chaque pic vont être analysées avec Excel (Microsoft®) afin de détecter des délétions ou des duplications.

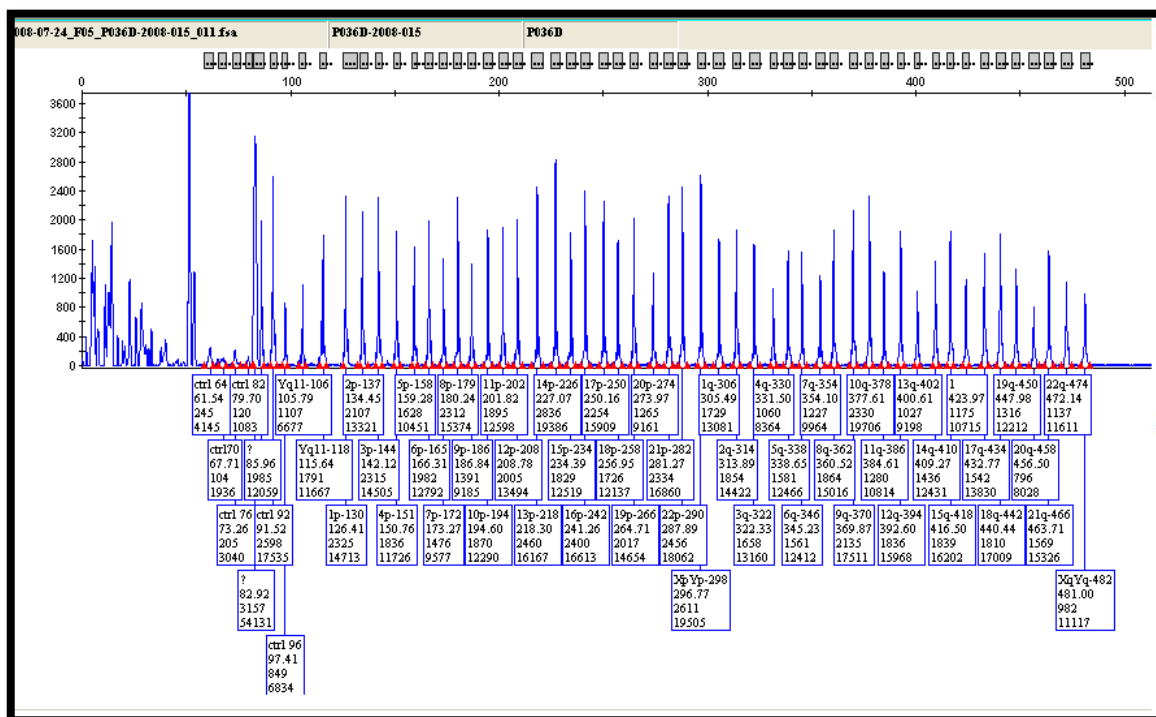


Figure II-7 : Exemple d'électrophorégramme obtenu par la technique MLPA pour un échantillon d'ADN d'un patient normal.

III. RESULTATS

A. Résultats de la FISH

La lecture des lames de FISH va nous permettre de compter les signaux émis par les sondes fluorescentes afin d'établir si nous sommes en présence d'un remaniement ou non.

Nombre de signaux présents :

- Deux signaux : résultat normal, le patient possède deux allèles en bonne position.

- Deux signaux : résultat équilibré, le patient possède deux allèles mais un des deux signaux n'a pas la bonne position et se trouve sur un autre chromosome, le patient présente un remaniement équilibré.

- Un signal : résultat déséquilibré ou anormal, le patient présente une délétion.

- Trois signaux : résultat déséquilibré ou anormal, le patient présente une duplication ou une trisomie.

Pour nos résultats nous avons observés entre 10 et 20 métaphases pour chaque mélange de sondes.

La lecture des lames de chaque patient a permis de découvrir une anomalie chez un seul patient, le patient 25. Au regard des résultats obtenus ce patient présente une délétion 2qter et une duplication 10qter, donnant donc une monosomie 2qter et une trisomie 10qter (Figure III-1 et figure III-2).

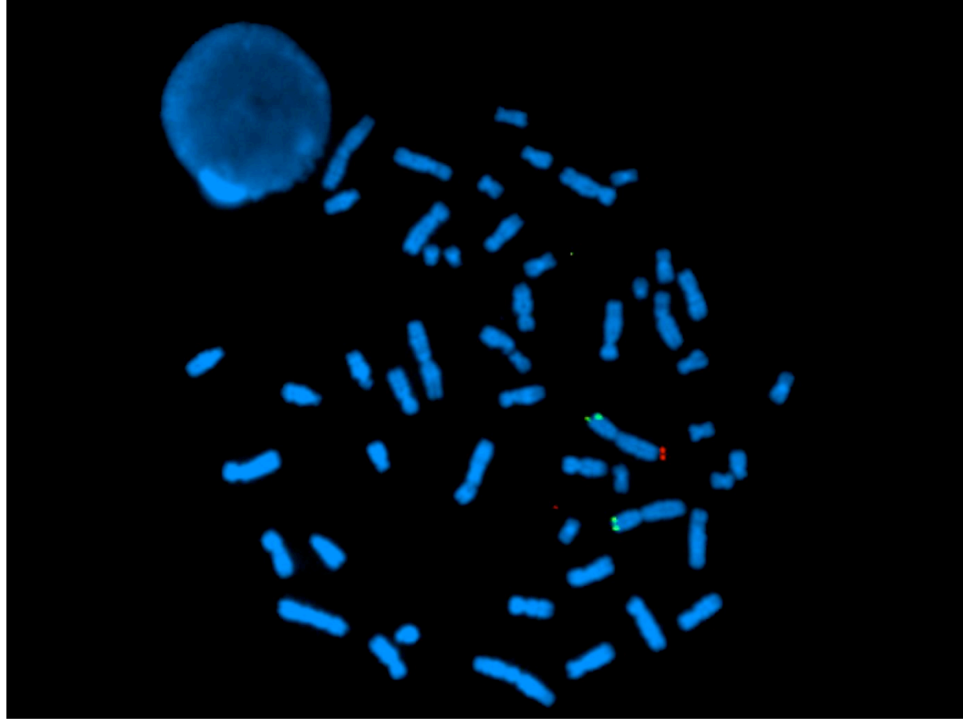


Figure III-1 : FISH du patient 25 : monosomie 2qter du patient 25. Le signal rouge indique le 2qter et le vert les 2pter.

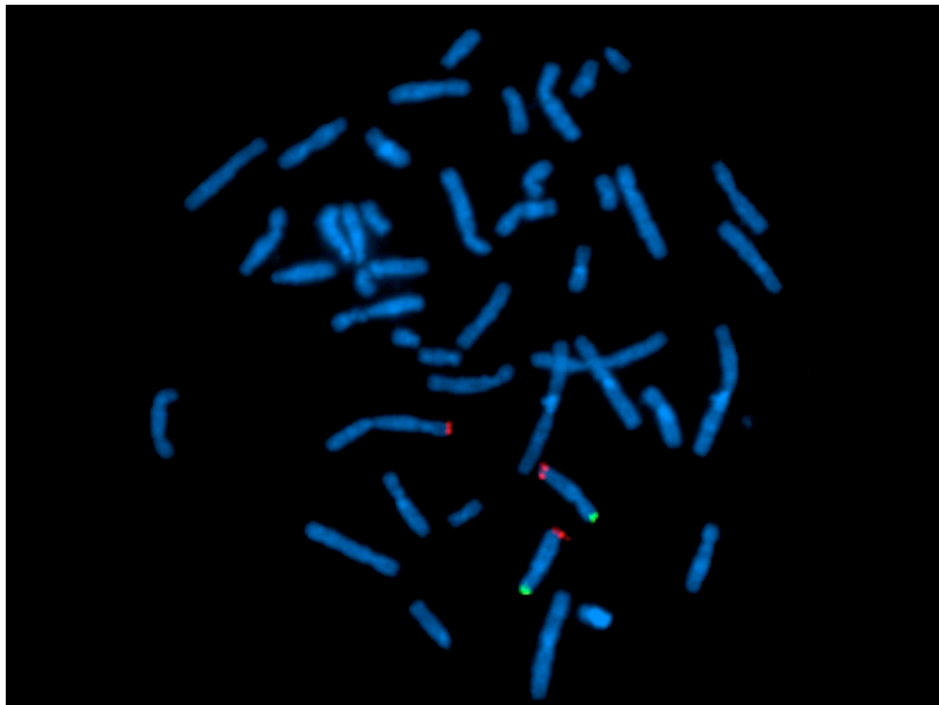


Figure III-2 : FISH du patient 25 : trisomie 10qter. Les signaux rouge indique les 10qter et les vert les 10pter.

B. Résultats de la MLPA

Dans un premier temps, la validation technique permet de contrôler si la réaction de PCR multiplex a bien marché en vérifiant que les contrôles qualitatifs et quantitatifs d'ADN sont bien présents sur l'électrophorégramme (annexe 1).

Dans un deuxième temps, la validation biologique des échantillons se fera sur tableau Excel par comparaison des aires des pics de 10 patients en même temps. Afin de les comparer entre elles, les aires des différents pics de l'électrophorégramme de chaque patient doivent être normalisées.

Enfin pour chaque pic est déterminé le rapport $R = \text{aire d'un pic donné du patient} / \text{moyenne des aires des pics correspondants des autres patients en excluant le pic de l'échantillon analysé}$.

$$R = \text{Aire}_x \text{ patient} / \text{Moy Aire}_x \text{ (9 patients)}$$

Nous obtenons des ratios théoriques :

- Résultat normal ou réarrangement équilibré, soit 2 copies de la région étudiée (une d'origine paternelle et une d'origine maternelle) : ratio = 1
- Délétion ou monosomie partielle, soit 1 seule copie : ratio = 0,50
- Duplication ou trisomie partielle, soit 3 copies : ratio = 1,50

Mais en pratique l'interprétation des rapports diffère et l'on considère donc :

- Résultat normal ou réarrangement équilibré : $0,70 < \text{ratio} < 1,30$
- Délétion ou monosomie partielle, soit 1 seule copie : ratio $\leq 0,70$
- Duplication ou trisomie partielle, soit 3 copies : ratio $\geq 1,30$

Au final nous avons eu 3 patients présentant des remaniements subtélomériques déséquilibrés et 28 patients ne présentant pas de remaniements détectables par la technique MLPA. Les deux kits de MLPA nous ont permis d'obtenir les mêmes résultats, ce qui tient lieu de confirmation.

Les anomalies découvertes chez ces patients sont :

- Patient 11 (P11) : Une duplication 8pter en 8p23.3 du locus FBXO25 et une duplication 16qter en 16q24.3 du locus GAS8 pour chaque kit (figure III-3).
- Patient 25 (P25) :
 - o Pour le kit P036 : une délétion 2qter en 2q37.3 du locus CAPN10, une duplication 10qter en 10q26.3 du locus PAOX, ainsi qu'une duplication 3pter en 3p26.3 du locus CHL1.
 - o Pour le kit P070 : une délétion 2qter en 2q37.3 du locus ATG4B, une duplication 10qter en 10q26.3 du locus ECHS1, ainsi qu'une duplication 3pter en 3p26.3 du locus CHL1 (figure III-4).
- Patient 26 (P26) : Une tétrasomie en 22q11 du locus BID pour P036 et P070 (figure III-5).

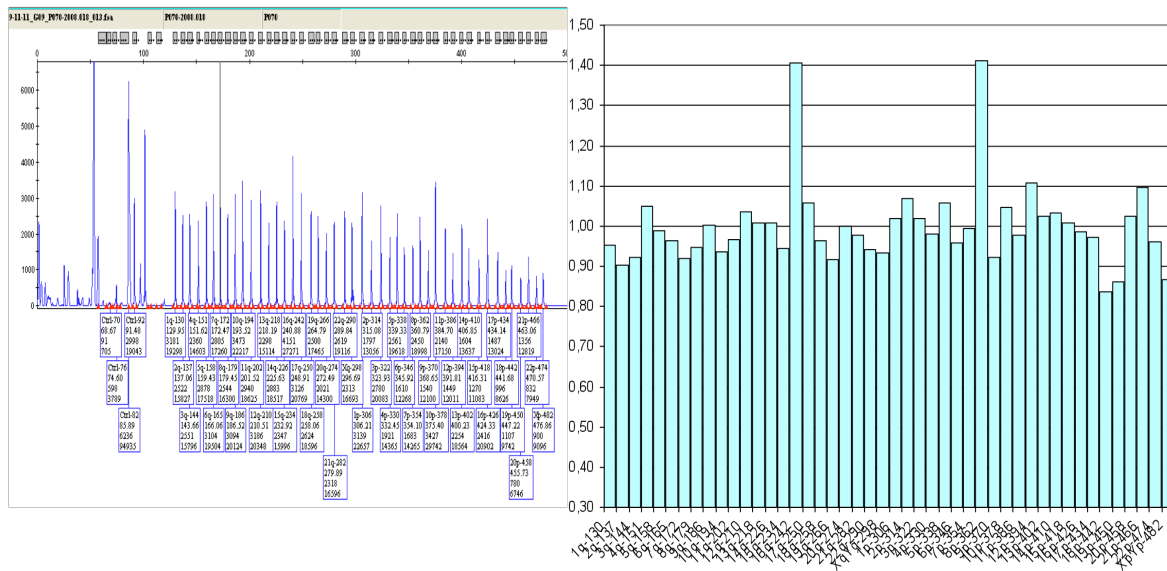
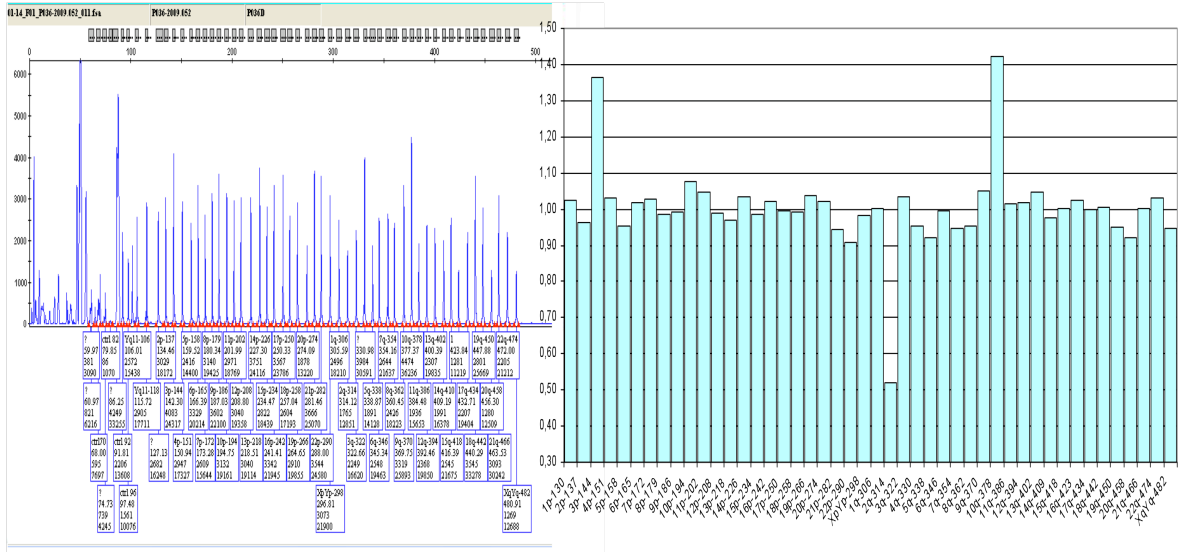


Figure III-3 :Electrophorogramme et tableau Excel de validation de P11



C. Synthèse des résultats

Voici un tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les deux méthodes.

Tableau III-1 : Tableau récapitulatif des résultats FISH et MLPA.

numéro patients	FISH TTV	MLPA P036	MLPA P070
P1	Négative	Négative	Négative
P2	Négative	Négative	Négative
P3	Négative	Négative	Négative
P4	Négative	Négative	Négative
P5	Négative	Négative	Négative
P6	Négative	Négative	Négative
P7	Négative	Négative	Négative
P8	Négative	Négative	Négative
P9	Négative	Négative	Négative
P10	Négative	Négative	Négative
P11	Négative	trisomie 8pter trisomie 16qter	trisomie 8pter trisomie 16qter
P12	Négative	Négative	Négative
P13	Négative	Négative	Négative
P14	Négative	Négative	Négative
P15	Négative	Négative	Négative
P16	Négative	Négative	Négative
P17	Négative	Négative	Négative
P18	Négative	Négative	Négative
P19	Négative	Négative	Négative
P20	Négative	Négative	Négative
P21	Négative	Négative	Négative
P22	Négative	Négative	Négative
P23	Négative	Négative	Négative
P24	Négative	Négative	Négative
P25	monosomie 2qter trisomie 10 qter	monosomie 2qter trisomie 10 qter trisomie 3pter	monosomie 2qter trisomie 10 qter trisomie 3pter
P26	négative	tétrasomie 22q11.21	tétrasomie 22q11.21
P27	Négative	Négative	Négative
P28	Négative	Négative	Négative
P29	Négative	Négative	Négative
P30	Négative	Négative	Négative
P31	Négative	Négative	Négative

Au regard de ce tableau nous pouvons constater plusieurs discordances entre les deux techniques que nous développerons dans la discussion. Nous constatons également que les résultats des deux kits MLPA sont concordants.

IV. DISCUSSION

A. Comparaison FISH/MLPA

La synthèse des résultats (tableau III-1) obtenus nous permet de voir qu'il y a plusieurs discordances entre les deux techniques. En effet certains patients présentant des remaniements déséquilibrés découverts par la technique MLPA présentent un résultat normal par la méthode de référence.

1. Patients discordants

a) Patient 26

Le résultat du P26 était assez inattendu, en effet nous retrouvons chez ce dernier une tétrasomie 22 du locus BID en 22q11.21. Ce locus étant proximal, car la sonde utilisée est une sonde de contrôle, et non une sonde subtélomérique. Ce locus contrôle en MLPA n'est pas recherché en FISH. Donc nous considérons que dans le cadre de notre étude des remaniements subtélomériques, il n'y a pas de discordance entre la FISH et la MLPA pour ce patient.

b) Patient 25

Pour P25, la monosomie 2qter et la trisomie 10pter ont été retrouvées par les deux techniques. En revanche la MLPA a retrouvé une trisomie 3pter là où la FISH ne trouve rien. Afin de confirmer nous avons fait une FISH ciblée de la région du locus CHL1 en 3p, celle ci s'est révélée normale. Le fait que la FISH ciblée ne retrouve pas cette trisomie impose des examens complémentaires avec une autre technique car nous ne pouvons être certains de son absence en raison des difficultés qu'à la FISH à détecter des duplications.

c) Patient 11

Pour le patient P11, la FISH rend un résultat normal alors que la MLPA rend un remaniement déséquilibré. En Effet pour la MLPA, le patient présente une duplication en 8pter associée à une autre duplication en 16qter. Ce patient présente alors une double trisomie 8pter et 16qter. Ces résultats méritent une investigation par une autre méthode,

ainsi qu'une enquête familiale, afin de déterminer si l'une de ces trisomies est pathogène ou si les deux trisomies sont responsables du phénotype du patient.

2. Validation de la méthode MLPA par rapport à la méthode de référence

Pour valider la technique MLPA nous avons utilisé le « protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence » publié par l'Association française de normalisation (AFNOR).

Ce protocole définit la validation d'une méthode alternative par « la fourniture de preuves tangibles que la méthode alternative satisfait à des exigences spécifiées, à savoir des résultats comparables aux résultats obtenus avec la méthode de référence, en prenant en compte toute incertitude de mesure et que ces exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé ».

Afin de comprendre les critères de validation de la méthode alternative, dans notre cas la MLPA, nous allons définir ceux ci dans les paragraphes suivants.

a) Critères de validation

Les différentes situations d'accord et de déviation entre les deux méthodes sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau IV-1 : Types d'accord et déviation de résultats entre les méthodes de référence et alternative.

	FISH pos	FISH neg	Total
MLPA pos	Accord positif +/+ (PA)	Déviations positives -/+ (PD)	A+
MLPA neg	Déviations négatives +/- (ND)	Accord négatif -/- (NA)	A-
Total	N+=PA+ND	N-=NA+PD	N

- **Déviatiion positive (PD)**

La méthode alternative présente une déviation positive si elle donne un résultat positif lorsque la méthode de référence donne un résultat négatif. Une déviation positive devient un faux résultat positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est négatif. Une déviation positive est considérée comme vrai positif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.

- **Déviatiion négative (NA)**

La méthode alternative présente une déviation négative si elle donne un résultat négatif lorsque la méthode de référence donne un résultat positif. Une déviation négative devient un faux résultat négatif lorsqu'il peut être démontré que le vrai résultat est positif.

- **Sensibilité relative (SE)**

C'est la capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte, dans notre cas la duplication ou la délétion, lorsque la méthode de référence le détecte. Elle est décrite par la formule suivante :

$$SE=100*(PA/N+)$$

- **Exactitude relative (AC)**

Elle est définie par le degré de correspondance entre les résultats obtenus par la méthode de référence et la méthode alternative à partir d'échantillons identiques.

$$AC=100*(PA+NA)/N$$

- **Spécificité relative (SP)**

Elle est définie par la capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte lorsque la méthode de référence ne le détecte pas.

$$SP=100*(NA/N-)$$

b) Résultats

Chaque méthode a analysé 41 locus chez 31 patients, soit 1271 locus. Nous avons volontairement écarté de l'analyse les sondes proximales des chromosomes acrocentrique de la méthode MLPA car elles ne sont pas recherchées par la méthode FISH et surtout ce ne sont pas des sondes subtélomériques. Donc dans nos résultats la découverte de la tétrasomie du patient 22 n'est pas considérée.

Nos résultats sont résumés dans le tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Accord et déviation entre la FISH et la MLPA par locus.

	FISH pos	FISH neg	T
MLPA pos	PA = 2	PD = 3	A+=5
MLPA neg	ND = 0	NA = 1266	A-=1266
T	N+=2	N-=1269	N=1271

• Déviation positive (PD)

Dans notre comparaison il apparaît que la PD=3, au regard de ses résultats et en tenant compte des analyses complémentaires qui ont été faites sur les prélèvements. Nous verrons ci dessous (paragraphe comparaison des techniques) que ce résultat ne doit pas être interprété comme la présence de 3 faux positifs mais comme des microduplications non détectées par la technique de référence (FISH). En effet ces microduplications ont une taille inférieure à la résolution limite de la FISH qui est de 100 Kb Ces microduplications sont dues à la présence d'une variation du nombre de copies de segment d'ADN (communément appelés CNV pour copy number variation) qui sont à l'origine d'un polymorphisme génétique (Heather et *al.* 2002). Un CNV est défini comme un segment d'ADN de 1 Kb ou plus, avec un nombre de copies variant par rapport à une référence génomique. Ces variations peuvent être une monosomie, une trisomie ou plus, voir une nullosomie et peuvent avoir des tailles variables pouvant atteindre jusqu'à 8 Mb (Redon et *al.*, 2006).

La découverte des CNV pose des problèmes d'interprétations car on ne connaît pas encore leurs fonctions réelles et donc certains auteurs ont décidé de les classer comme CNV pathogènes, CNV bénins et CNV à définir (Nemos et *al.* 2008). La mise en évidence d'un CNV d'une région chromosomique n'est donc aujourd'hui plus synonyme d'anomalie chromosomique associée à un phénotype anormal. Néanmoins, le caractère *de novo* d'une anomalie, associé à une taille supérieure à 1 Mb est très suspecte d'être à l'origine d'une expression clinique (Miller et *al.*, 2010).

Des banques de données ont d'ailleurs été mises en place afin de répertorier les CNV existants et ainsi aider à la connaissance et l'interprétation de ces CNV (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

- **Déviatiion négative (ND)**

La déviatiion négative obtenue est égale à zéro, ce qui permet de conclure à une absence de faux négatif.

- **Sensibilité relative (SE)**

$$SE=100*(PA/N+)= 100\%$$

La MLPA détecte alors 100% des anomalies lorsque celles ci sont détectées par la FISH.

- **Exactitude relative (AC)**

$$AC= 100*(PA+NA)/N= 99,76\%$$

La MLPA possède une bonne exactitude relative car il y a correspondance des résultats dans 99,76% des cas.

- **Spécificité relative (SP)**

$$SP= 100*NA/N-= 99,76\%$$

La MLPA possède une bonne spécificité relative c'est à dire que dans 99,76% des cas elle ne détecte pas d'anomalies quand la FISH n'en détecte pas.

Nos résultats montrent que la MLPA possède une grande sensibilité ainsi qu'une grande spécificité, des résultats équivalents ont été publiés en juillet 2008 dans la revue de la Société des Obstétriciens et Gynécologues du Canada (www.sogc.org/guidelines/documents/gui210TU0807f.pdf).

En effet cette revue publiait une sensibilité égale à 100% et une spécificité égale à 99,8%.

3. Comparaison des techniques

Nous avons décidé de comparer ces deux techniques sur les plans pré-analytiques, analytiques et post-analytiques. En effet nous avons mis en parallèle les aspects pratiques et les critères qui aident à la décision lors de la mise en place d'une nouvelle technique au laboratoire.

Chaque étape d'analyse est synthétisée dans un tableau.

a) Pré-analytique

Tableau IV-3 : Comparaison pré-analytique.

Pré-analytique	MLPA	FISH
Prélevement	5 ml de sang EDTA	5 ml de sang hépariné
Documents	Prescription médicale + consentement	Prescription médicale + consentement
Conservation prélèvement	10 j avant extraction	Mise en culture rapide

b) Analytique

Tableau IV-4 : Comparaison analytique.

Analytique	MLPA		FISH	
Technique préalable	Extraction d'ADN		Culture lymphocytaire, étalement chromosomique sur lame	
Conservation échantillons	ADN à -20°C		Conservation des lames non marquée à -20°C	
Étapes d'analyse	5	Hybridation des sondes	5	Déنتuration
		Ligation		Hybridation des sondes
		Amplification		Lavage
		Séquençage		contre coloration
		Analyse des histogrammes		Lecture
Matériel technique	Hotte		Hotte	
	Thermocycler		Etuve et plaque chauffante	
	Séquençeur		Microscope à fluorescence	
Compétences	Biologie moléculaire		Cytogénétique	
Coût du kit	1100 Euros		3000 Euros	
Nombre de patients théorique	100		10	
taille des sondes	40 pb		100 à 300 Kb	
Anomalies détectées	Réarrangements déséquilibrés (duplications, délétions)		Réarrangements équilibrés et déséquilibrés (duplications, délétions)	
Anomalies non détectées	Réarrangements équilibrés (translocations réciproque, inversions)		Microduplications intrachromosomiques	
			Délétions inférieures à 80-100 Kb	
Réactifs non fournis	Kit d'extraction (1025 Euros pour 380 réactions)		Milieu de culture cellulaire	
	Formamide		Phytohémagglutinine	
	Rox 500		Solutions de lavage SSC	
	Eluant séquenceur		Contre colorant DAPI	
Temps technicien	2 à 3 j		6 J	

c) Post-analytique

Tableau IV-5 : Comparaison post-analytique.

Post-analytique	MLPA	FISH
Validation	Validation technique avec analyse de l'électrophorégramme	Validation technique avec lecture des mitoses en FISH
	Validation biologique et interprétation	Validation biologique et interprétation
Temps validation	1 j pour une série de 8 à 24 patients	1 J par patient
Conservation	Les produits de PCR sont conservés pendant 7 jours à 4°C puis indéfiniment à -20°C	Les lames hybridées sont conservées à -20°C dans l'obscurité.

d) Synthèse

Tableau IV-6 : Tableau de synthèse.

Synthèse	MLPA	FISH
Coût du kit	1100 Euros	3000 Euros
Nombre de patients théorique	100	10
Compétences	Biologie moléculaire	Cytogénétique
Anomalies détectées	Réarrangements déséquilibrés (Duplications, délétions)	Réarrangements équilibrés et déséquilibrés (duplication, délétions)
Anomalies non détectées	Réarrangements équilibrés (translocations réciproque, inversions)	Microduplications intrachromosomiques Délétions inférieure à 80-100 kb
Temps total d'analyse	3 à 4 j	6 à 7 j
Cotation	BHN 1000	B 1000 + BHN 1500
Coût final approximatif par patient hors coût technicien	16 Euros	330 Euros

En synthèse de ces tableaux comparatifs, nous avons mis en exergue deux points qui nous paraissent important en termes d'économie de santé. Nous pouvons constater que la technique MLPA possède un temps de rendu de résultat de 3-4 jours ce qui fait minimum

3 jours de moins que la FISH. De plus le coût du kit seul est presque trente fois moins cher et le coût du kit ajouté des réactifs et consommables nécessaires rend un prix de réaction par patient d'environ 16 Euros soit vingt fois moins cher que pour la FISH. En ajoutant à ces prix le coût du temps technicien qui est double pour la FISH, nous pouvons dire que la MLPA est une technique très économique avec un rendu de résultat rapide permettant une prise en charge précoce du patient par les cliniciens.

L'intérêt économique de la MLPA a été démontré dans une publication brésilienne montrant l'efficacité de cette méthode dans le diagnostic des réarrangements chromosomiques associée à un coût de revient faible pouvant être ainsi une solution de choix pour les laboratoires de cytogénétique dans les pays en voie de développement (Jehee *et al.*, 2011).

4. Intérêts/limites FISH

L'apparition de la FISH, utilisée en complément de l'étude du caryotype, a constitué un progrès remarquable dans la mise en évidence de remaniements subtélomériques mais la méthode présente néanmoins de nombreux inconvénients pour notre étude.

Les avantages sont :

- Localisation de l'anomalie sur le chromosome métaphasique,
- Mise en évidence de remaniements équilibrés et déséquilibrés,
- Technique possédant la certification européenne CE.

Les inconvénients sont :

- La culture cellulaire longue (3j),
- Technique non automatisable,
- 3 cibles maximum par test,
- Problème de lecture : limite de détections des microduplications et microdélétions de petite taille (sondes de 100 à 300 Kb),
- Résultat en 6 jours incompressibles (4 jours de culture et étalement + 1 jour d'hybridation + 1jour de lecture) par patient,
- La lecture de lame longue et éprouvante nécessitant une grande concentration ainsi que des pauses régulières de la part des opérateurs.

5. Intérêts/limites MLPA

La MLPA est une méthode récemment commercialisée qui présente plusieurs avantages dans la détection de délétions et duplications, en revanche comme toute méthode, elle présente aussi quelques inconvénients.

Les avantages sont :

- Besoin de faibles quantités d'ADN (20 ng/µl suffit),
- Toutes sources d'ADN peuvent être utilisées (sang, liquide amniotique, villosités choriales, tissus en paraffine...),
- Résolution élevée grâce à deux amorces de sondes dont la longueur fait 40 pb,
- Recherche de 41 locus en une seule réaction,
- Possibilité de faire des séries de 8 patients voire plus en une seule fois,
- Résultat en 3 à 4 jours (1 jour d'extraction d'ADN + 1 jour de PCR + 1 jour de validation technique et biologique),
- Nécessité de peu de matériel technique (une hotte, un thermocycler, un séquenceur).

Les inconvénients sont :

- L'incapacité à détecter les remaniements équilibrés,
- Technique sensible aux contaminations et aux inhibiteurs de PCR nécessitant parfois plusieurs réactions,
- Nécessite de réaliser des séries de 8 patients minimum pour être rentable,
- Difficultés d'interprétation des CNV,
- La cotation hors nomenclature donc non remboursée,
- Ne possède pas la certification européenne CE.

B. Patients

1. Tétrasonie 22q11 associée à un syndrome de Cat eye

Le patient P26 est né en Février 2009 à 38 semaines d'aménorrhée dans la vienne. La grossesse s'est déroulée sans particularités mais à la naissance les pédiatres ont mis en évidence un retour veineux pulmonaire partiel gauche, une bicuspidie aortique ainsi qu'une dilatation pyelo-calicielle. En Avril 2009, ce patient est pris en charge aux urgences pédiatriques de limoges car sa mère est extrêmement inquiète du retard de prise de poids de son enfant. Sur le plan cardiaque, les pédiatres lui font faire une échographie qui va révéler une communication inter auriculaire nécessitant une prise en charge chirurgicale à l'hôpital Necker. Sur le plan général ils ont une forte suspicion de délétion du chromosome 22 (syndrome de DiGeorge) car ajoutée aux malformations cardiaques, le patient présente des dysmorphies faciales comme des oreilles basses, des fibrochondromes prétragien ainsi qu'un palais ogival. Le laboratoire a donc effectué un caryotype et une FISH avec la recherche des régions principalement incriminées dans le syndrome de DiGeorge (TUPLE1 et N25). Cette recherche s'étant révélée négative, et le caryotype a montré la présence d'un marqueur surnuméraire à priori constitué essentiellement d'hétérochromatine. Une recherche de remaniements subtélomérique a été réalisée par FISH et MLPA. Il n'a pas été retrouvé de remaniements subtélomérique par les deux méthodes mais la MLPA a retrouvé une tétrasomie du locus BID situé sur le chromosome 22 (22q11), locus contrôle proximal du chromosome 22. Des investigations complémentaires ont montré que le marqueur surnuméraire était un chromosome 22 dicentrique formé de deux satellites p, de deux centromères et apparemment d'un petit fragment d'euchromatine aboutissant à une tétrasomie de la région située entre le centromère et le point de cassure proximal survenu entre le locus BID et le locus N25. Cette région tétrasomique comporte les locus CECR1 et CECR2 responsable du syndrome de « cat-eye » ou CES.

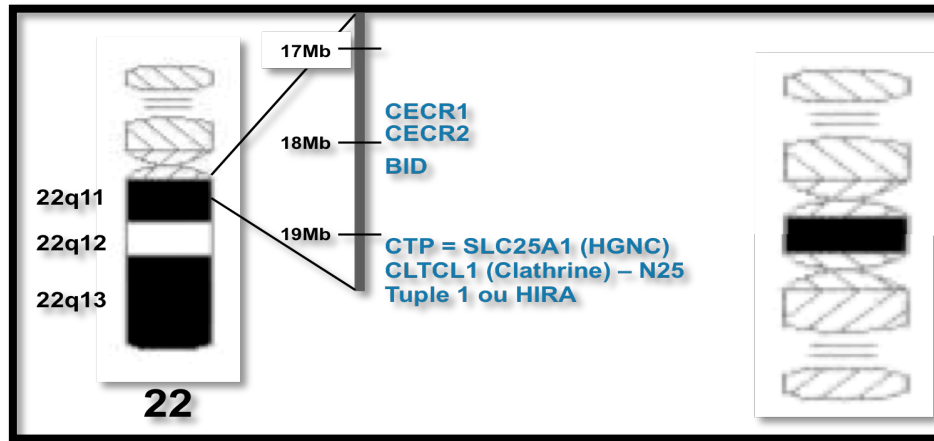


Figure IV-1 : Schéma d'un chromosome 22 normal et du chromosome dicentrique idic(22)(q11.2) de P26.

Le syndrome du « cat-eye » (Orphanet) est caractérisé par une association variable de malformations congénitales dont les plus connues sont une atrésie anale et un colobome de l'iris, ces dernières étaient absentes du sujet P26. Le colobome, dont l'aspect rappelle la forme de la pupille du chat, a donné son nom au syndrome. L'hétérogénéité clinique qui caractérise ce syndrome est importante, en effet 41% des patients présentent la triade classique : anomalie anale, colobome irien et anomalies pré-auriculaires (sinus ou tubercules prétragien). On peut aussi observer une cardiopathie ainsi que des anomalies du tractus urinaire, ces dernières étaient présentes chez P26. Chez 32% des patients, on peut observer un déficit intellectuel qui est le plus souvent modéré. On estime sa prévalence à 1/74 000 et 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 correspond à la duplication inversée de la partie proximale d'un chromosome 22. Cette inversion duplication du 22 est le meilleur critère diagnostique du syndrome.

2. Monosomie 2qter et trisomie 10qter associées à une pseudopseudo-hypoparathyroïdie

P25 est né au terme de 38 SA, en janvier 1994, par césarienne pour anomalie du rythme cardiaque fœtal, après une grossesse sans événement particulier. P25 est le seul enfant

d'un couple caucasien non consanguin sans antécédents médicaux personnels particuliers, si ce n'est des antécédents familiaux marqués par plusieurs cas de retard mental du côté maternel. A l'âge de 4 mois, il bénéficie d'une consultation en génétique à Tours pour syndrome dysmorphique avec un front vertical et large, des narines antéversées et un décollement important des pavillons auriculaires.

Un caryotype standard réalisé à l'époque et ce dernier est interprété comme normal. P25 est revu vers l'âge de 21 mois en consultation neuropédiatrie pour un retard psychomoteur avec retard staturo-pondéral, les examens complémentaires (imagerie et biologie) sont normaux et P25 est pris en charge par en orthophonie et en psychomotricité. Il sera suivi en chirurgie pédiatrique pour une cyphose mais le suivi neuropédiatrique est interrompu.

Ce n'est que vers l'âge de 15 ans que P25 est revu en consultation pédiatrique pour obésité et retard pubertaire chez un enfant scolarisé en institut médico éducatif. Des examens biologiques sont effectués avec une suspicion de syndrome de Prader-Willi mais ils se sont révélés négatifs. En parallèle des investigations cliniques et biologiques, une recherche de remaniements subtélomérique a été réalisée par MLPA et FISH. Ces deux méthodes retrouvent une monosomie 2qter et une trisomie 10pter. En outre la MLPA a révélée une trisomie 3pter discordante avec la FISH. Des analyses complémentaires ont donc été effectuées chez les parents de P25 ainsi que sur P25. Le caryotype des deux parents révélera une translocation équilibrée (46, XX t(2;10)(q37;q26)) d'origine maternelle et a également retrouvé la trisomie 3pter en MLPA chez la mère.

Dans notre cas nous avons considéré que la duplication 3pter découverte est un CNV bénin car cette région est très documentée dans la base de donnée des CNV (<http://projects.tcag.ca/variation>) comme étant une zone propice à la variation du nombre de copies mais n'ayant généralement aucune conséquence phénotypique. De plus certains auteurs ont trouvé des duplications et des délétions CHL1 chez des patients sains (Kok et *al.*, 2005, Willatt et *al.* 2005, Bodmer et *al.* 2002) ce qui va dans le sens de l'hypothèse d'un CNV bénin. Des analyses complémentaires en CGH-array ont montré que la duplication 10q faisait 3,32 Megabases (Mb) alors que la délétion 2q faisait 10 Mb.

La délétion du chromosome 2 dans la région 2q37 associée à l'examen clinique montrant une brachymetacarpie, les pédiatres vont poser le diagnostic d'ostéodystrophie héréditaire d'Albright (OHA) associée à une pseudopseudohypoparathyroïdie (PPHP).

L'OHA (Orphanet) est une maladie héréditaire caractérisée sur le plan clinique par une brachymétacarpie et/ou une brachymétatarsie essentiellement des 4^{ème} et 5^{ème} rayons, un faciès lunaire, une obésité, un retard de croissance et des calcifications extra-squelettiques. Un retard mental modéré est parfois associé. Le phénotype de l'OHA associée à une PPHP est identique à l'OHA à la différence que cette dernière possède un bilan phosphocalcique perturbé avec une hormone parathyroïdienne élevée, une hypocalcémie et une hyperphosphatémie.

Le patient présente aussi une duplication 10qter qui donne un phénotype avec des dysmorphies et des anomalies ophtalmologiques mais ces dernières ne sont pas retrouvées chez notre patient.

3. Trisomie 8pter et trisomie 16qter associées à des variants du nombre de copies

La patiente P11, née le 15 octobre 1997, est adressée aux pédiatres de l'HME pour évaluation neuropédiatrique à l'âge de 10 ans et 3 mois. P11 présente un retard mental, des problèmes ophtalmologiques et est scolarisée dans un institut médico-éducatif (IME). Au niveau des antécédents familiaux, P11 a une grande sœur scolarisée en IME et l'on retrouve un retard mental chez le père, chez la mère, chez deux tantes coté maternel, ainsi qu'une possible déficience mentale de deux cousins germains du coté maternel également.

L'étude des remaniements subtélomériques de la patiente P11 ont permis de retrouver une trisomie 8pter et une trisomie 16qter en MLPA alors qu'elles n'ont pas été retrouvées par la technique FISH. Dans le cadre de l'enquête familiale, un prélèvement sanguin est réalisé seulement chez la mère, le père ne s'étant pas présenté, pour une exploration en MLPA. La MLPA ne retrouve que la duplication 16qter chez la mère. L'absence de trisomie 8pter chez la mère nous a conduit faire une CGH array dont nous attendons les résultats.

A ce jour la taille de ces remaniements n'est pas connue, et le caractère déficient des parents ne nous permettent pas de conclure sur la pathogénicité de ces duplications : CNV bénin, CNV pathogène et microduplication responsable du phénotype.

Plusieurs hypothèses sont envisageables :

- Concernant la duplication 8pter
 - La trisomie 8pter serait en fait un CNV bénin. car la base de données des CNV est documentée sur le locus FBXO25.
 - Le gène FBXO25 coderait pour un facteurs transcription cardiaque important pour le développement des cardiomyocytes (Jang et *al.*, 2011), cependant notre patiente ne présente pas d'anomalies cardiaques.
- Concernant la duplication 16qter
 - La trisomie 16qter est un CNV dont la responsabilité dans les retards mentaux serait à définir car GAS8 est documenté dans la base de données des CNV.
 - La trisomie 16qter, retrouvée également chez la mère, pourrait être responsable des retards mentaux du côté maternel. Une revue de la littérature montre que les trisomies 16qter seraient responsables de nombreux avortements du premier trimestre, de mortalité précoce et de retards mentaux avec dysmorphies et/ou anomalies congénitales (Eiben et *al.*, 1990). Environ 30 cas de trisomie 16qter ont été rapportés (Puhl et *al.*, 2004), deux publications montrent des cas avec des duplications comparable à celle de P26, c'est à dire dans les régions 16q24 et 16q24.1 jusqu'au régions terminales (Maher et *al.* 1991 ; Brisset et *al.*, 2002). La première rapporte le cas d'un patient de 19 ans avec un retard mental sans dysmorphies ni anomalies congénitales et le deuxième rapporte le cas d'une enfant ayant des anomalies palpébrales et cardiaque à la naissance associé à l'apparition d'un retard mental.

L'enquête familiale associée à la revue de littérature nous oriente vers la responsabilité de la trisomie 16qter dans l'affection de P26, mais à ce jour nous attendons encore les résultats de la CGH array qui permettraient de connaître la taille réelle de chaque fragment dupliqué confirmant ou non nos hypothèses.

V. CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'évaluer la méthode MLPA pour la recherche de remaniements subtélomériques sur un groupe de patients atteints de retard mentaux en la comparant à la technique de référence, la FISH. Nous avons donc retrouvé 2 patients atteints sur 31, soit 6,45%, résultats en accord avec ceux publiés dans la littérature. De plus cette étude nous a permis de mettre en valeur les avantages de la MLPA par rapport à la technique de référence, la FISH. En effet elle permet d'obtenir un résultat rapide et fiable tout en permettant des économies de santé grâce à un coût de revient plus faible. En revanche elle nous montre aussi ses limites concernant l'interprétation des résultats, en particulier des CNV. La grande sensibilité ainsi que la résolution de cette technique nous amène à faire des analyses complémentaires en cas de résultat positif afin de pouvoir conclure sur la pathogénicité des microremaniements observés.

Cette technique reste prometteuse et mériterait d'être évaluée dans le diagnostic des syndromes microdélétionnels comme le syndrome de Prader-Willi/Angelman ou le syndrome de DiGeorges. L'étude des remaniements subtélomériques en prénatal sur liquide amniotique pourrait être également envisagée, en complément du caryotype, pour des fœtus présentant des anomalies échographiques au regard des résultats obtenus en post-natal sur notre cohorte de patients.

Références bibliographiques

Ayouaz, A. Implication des mécanismes de la réparation de l'ADN dans la maintenance des télomères et l'instabilité chromosomique dans les cellules humaines. Thèse de doctorat d'université. Paris: Université Paris 11, 2008, 215p.

Baker, E. et al. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, 2002, 107, 4, p.285-293.

Beridexheimer, M. et al. L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (puces à ADN) en pathologie chromosomique constitutionnelle. *Pathologie Biologie*, 2007, 55, p.13-18.

Blackburn, E.H. Telomeres: Do the ends justify the means? *Cell*, 1984, 37, p.7-8.

Bodmer, D. Molecular cytogenetic analysis of clustered sporadic and familial renal cell carcinoma-associated 3q13~q22 breakpoints. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2002, 136, p.95-100.

Bodnar, A. Mechanism of Telomerase Induction during T Cell Activation. *Experimental Cell Research*, 1996, 228, p.58-64.

Boulot, P. et al. Fetal blood sampling for karyotype using echoguided puncture of the cord. Study of 103 pregnancies. *Journal De Gynécologie, Obstétrique Et Biologie De La Reproduction*, 1989, 18, 8, p.1007-1015.

Brisset, S. et al. Molecular characterization of partial trisomy 16q24.1-qter: Clinical report and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*, 2002, 113, p.339-345.

Drets, M.E. & Mendizábal, M. The underlying structure of the subtelomeric region detected by microphotometrical scanning and chromosome graphic image analysis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, 404, p.13-16.

Eiben, B. et al. Rapid cytogenetic diagnosis of early spontaneous abortions. *The Lancet*, 1986, 327, p.1273-1274.

Eydoux, P. et al. Chromosomal prenatal diagnosis: study of 936 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment. *Prenatal Diagnosis*, 1989, 9,4, p.255-269.

- Faas, B.H.W. et al. Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *European Journal of Medical Genetics*, 2008, 51, 6, p.511-519.
- Flint, J et al. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genetics*, 1995, 9, 2, p.132-140.
- Hande, P. et al. Elongated Telomeres in Mice. *Genomics*, 1999, 56, p.221-223.
- Harley, C.B. et al. The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental Gerontology*, 1992, 27, p.375-382.
- Hemann, M.T. et al. The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell*, 2001, 107, p.67-77.
- Jang, J.-W. et al. A novel Fbxo25 acts as an E3 ligase for destructing cardiac specific transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 410, 2, p.183-188.
- Jehee, F.S. et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *European Journal of Medical Genetics*, 2011, 54, p.425-432.
- Knight, S.J. et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *The Lancet*, 1999, 354, p.1676-1681.
- Kok, K et al. Application of a comprehensive subtelomere array in clinical diagnosis of mental retardation. *European Journal of Medical Genetics*, 2005, 48, p.250-262.
- Levy, M. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 225, p.951-960.
- Lichter, P & Ward, D C, Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature*, 1990, 345, 6270, p.93-94.
- Lichter, Peter et al. Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Genetic Analysis. Biomolecular Engineering*, 1991, 8, p.24-35.
- Linardopoulou, E.V. et al. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature*, 2005, 437, 7055, p.94-100.
- Liu, Y., Bohr, V.A. & Lansdorp, P. Telomere, telomerase and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008, 129, p.1-2.
- Maher, E.R. et al. Three cases of 16q duplication. *Journal of Medical Genetics*, 1991, 28, 11, p.801-802.

- Martens, U. Accumulation of Short Telomeres in Human Fibroblasts Prior to Replicative Senescence. *Experimental Cell Research*, 2000, 256, p.291-299.
- Mefford, H.C. & Trask, B.J. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nature Reviews. Genetics*, 2002, 3, 2, p.91-102.
- Meyne, J. & Moyzis, R.K. In situ hybridization using synthetic oligomers as probes for centromere and telomere repeats. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1994, 33, p.63-74.
- Miller, D.T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American Journal of Human Genetics*, 2010, 86, 5, p.749-764.
- Morin, G.B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 1989, 59, p.521-529.
- Moyzis, R. Repetitive Sequences in the Human Genome. *Dans Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier, 1989, p. 329-330.
- Nemos, C., Bursztejn, A.-C. & Jonveaux, P. Management of the CNVs in constitutional human genetics using array CGH. *Pathologie-Biologie*, 2008, 56, 6, p.354-361.
- Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology*, 1973, 41, p.181-190.
- Pinkel, D. et al. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, 51 Pt 1, p.151-157.
- Puhl, A.G. et al. Unbalanced translocation 6p/16q (partial monosomy 6p and trisomy 16q): prenatal diagnosis and cytogenetics. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2010, 150, p.119-125.
- Redon, R. et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 2006, 444, 7118, p.444-454.
- Riethman, H., Ambrosini, A. & Paul, S. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 2005, 13, 5, p.505-515.
- Rossi, E. et al. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *Journal of Medical Genetics*, 2001, 38(6), p.417-420.

Schouten, J.P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30, 2, p.57.

Trask, B.J. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3, p.769-778.

Vaziri, H. & Benchimol, S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Experimental Gerontology*, 1996, 31, p.295-301.

Watrin, T. Etude génétique du développement normal et pathologique des canaux de Müller. Thèse de doctorat d'université. Rennes 1: Université de Rennes 1, 2009, 170p.

Watson, J. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biology*, 1972, 239, p.197-201.

Willatt, Lionel et al. 3q29 Microdeletion Syndrome: Clinical and Molecular Characterization of a New Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 2005, 77, p.154-160.

Sites internet

- **Abbott molecular**

<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagents/fish/Telomere-probe-Vysis-TotelVysion.html>

- **Association des cytogénéticiens de langue française**

<http://www.eaclf.org/>

- **Atlas génétique d'oncologie et hématologie**

<http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/PolyMecaFr.html>

- **Collège national des praticiens et enseignants de génétique médicale**

<http://college-genetique.igh.cnrs.fr/enseign.html>

- **Data base of génomique variants**

<http://projects.tcag.ca/variation/>

- **MRC Holland**

<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx>

- **Orphanet : le portail des maladies rares et des médicaments orphelins**

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=FR>

- **Société des Obstétriciens et Gynécologues du Canada**

<http://www.sogc.org/guidelines/documents/gui210TU0807f.pdf>

Annexes

Annexe 1 : Fiche de validation analytique et biologique

MLPA - VALIDATIONS ANALYTIQUE et BIOLOGIQUE		
IDENTITE PATIENT		
<p>NOM – Prénom :</p> <p>Date de naissance : _____ Sexe : _____</p> <p>N° de prélèvement : _____ N° de dossier : _____</p> <p>Indication : _____</p>		
ECHANTILLON d'ADN		
<p>Type de prélèvement : _____ Date de prélèvement : _____</p> <p>Méthode d'extraction : _____ Date d'extraction : _____</p> <p>N° d'ADN : _____</p> <p>Concentration (ng/µl) : _____ Rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ : _____</p>		
VALIDATION ANALYTIQUE		
N° ADN : _____	KIT : _____	DATE MLPA : _____
<ul style="list-style-type: none"> • Contrôles internes DQ : contrôle de la quantité d'ADN indépendamment de la ligation Kit P036D : fragments 64, 70 76 et 82 pb - Kit P070 : fragments 62, 68, 74 et 80 pb <input type="checkbox"/> DQ < 50%DD <input type="checkbox"/> Autres : • Contrôles internes DD : contrôle de la dénaturation de l'ADN et de la ligation Kit P036D : fragments 88, 92 et 96 pb - Kit P070 : fragment 92 pb <input type="checkbox"/> DD ≈ pics MLPA <input type="checkbox"/> Présence DD92 <input type="checkbox"/> Absence DD92 <input type="checkbox"/> 40%DD92 < DD88-DD96 < DD92 <input type="checkbox"/> Autres : • Pics MLPA <input type="checkbox"/> 1000 < Hauteur < 8000 <input type="checkbox"/> Autres : Intensité du pic le plus haut Intensité du pic le plus bas Multiple entre le pic le plus haut et le plus bas : 		

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE	10
Liste des abreviations	13
Introduction	14
I. Généralités	15
A. Les chromosomes	15
1. Généralités.....	15
2. Structure des chromosomes.....	15
B. Régions terminales des chromosomes.....	17
1. Généralités.....	17
2. Régions télomériques	18
a) Structure et dynamique de l'ADN télomérique	18
b) Fonction des télomères	19
3. Régions subtélomériques	20
a) Généralités	20
b) Remaniements subtélomériques équilibrés.....	21
c) Remaniements subtélomériques déséquilibrés.....	23
C. Méthodes d'analyse des remaniements subtélomériques	27
D. Objectif de travail.....	28
II. Matériel et méthodes	30
A. Cohorte de patients.....	30
B. FISH ou Hybridation <i>In Situ</i> Fluorescente	31
1. Principe de la FISH	31
2. Les sondes utilisées	33
3. Les cibles de la FISH	34
4. Protocole de la FISH	35
a) Obtention des chromosomes métaphasiques.....	36
b) Dénaturation de l'ADN.....	36
c) Hybridation de l'ADN	37
d) Lavages post-hybridation.....	37

e) Contre coloration.....	37
f) Analyse microscopique	38
C. MLPA ou Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	39
1. Principe de la MLPA.....	39
2. Sondes utilisées	41
3. Protocole de la MLPA.....	43
a) Extraction de l'ADN	43
b) Etape d'hybridation.....	43
c) Etape de ligation.....	43
d) Etape d'amplification.....	44
e) Electrophorèse capillaire sur séquenceur	44
f) Analyse des données.....	45
III. Résultats	47
A. Résultats de la FISH.....	47
B. Résultats de la MLPA.....	49
C. Synthèse des résultats	52
IV. Discussion	53
A. Comparaison FISH/MLPA.....	53
1. Patients discordants	53
a) Patient 26.....	53
b) Patient 25	53
c) Patient 11.....	53
2. Validation de la méthode MLPA par rapport à la méthode de référence.....	54
a) Critères de validation	54
b) Résultats.....	56
3. Comparaison des techniques	58
a) Pré-analytique	58
b) Analytique.....	59
c) Post-analytique.....	60
d) Synthèse	60
4. Intérêts/limites FISH	61

5. Intérêts/limites MLPA.....	62
B. Patients	63
1. Tétrasomie 22q11 associée à un syndrome de Cat eye	63
2. Monosomie 2qter et trisomie 10qter associées à une pseudopseudo-hypoparathyroïdie	64
3. Trisomie 8pter et trisomie 16qter associées à des variants du nombre de copies	66
V. Conclusion.....	68
Références bibliographiques	69
Sites internet.....	73
Annexes.....	74
Table des matières.....	76

SERMENT DE GALIEN

*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, de respecter le secret professionnel.*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état
pour corrompre les mœurs 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.