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

Année 2014 Thèse N°114/14

CYTOGENETIQUE CLASSIQUE ET MOLECULAIRE A PROPOS DE 568 OBSERVATION :

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 20/10/2014

PAR

Mme. Nassiri Aicha
Née le 01/08/1988 à Meknès

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

Cytogénétique classique- cytogénétique moléculaire- dysmorphie- syndrome de down

JURY

M. HIDA MOSTAPHA..... PRESIDENT
Professeur de Pédiatrie
M.OULDIM KARIM ..... RAPPORTEUR
Professeur de Génétique
M. ATMANI SAMIR.....
Professeur de Pédiatrie
M. BERRAHO MOHAMED..... } JUGES
Professeur d'Epidémiologie
Mme. BENNIS SANAE.....
Professeur de Biologie Cellulaire

PLAN

INTRODUCTION....6
HISTORIQUE....9
BASES FONDAMENTALE....13
I. LE CYCLE CELLULAIRE....14
1. LA MITOSE....14
1.1. LE CYCLE CELLULAIRE....15
1.1.1. INTERPHASE....15
1.1.2. LA PHASE MITOTIQUE....16
2. LA MEIOSE :....17
2.1.1. Description de la méiose....18
3. ACCIDENTS DU CYCLE CELLULAIRE :....20
3.1. Phénomène de non-disjonction :....20
3.2. Délétion, translocation, inversion, duplication chromosomale:....21
II. LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET DU CHROMOSOME....22
1. Le chromosome....23
1.1. Morphologie du chromosome métaphasique....24
1.2. Le centromère....27
1.3. Le télomère....28
1.4. Composition de l'axe protéique du chromosome....28
CYTOGENETIQUE CLASSIQUE....31
I. INTRODUCTION....32
II. LE CARYOTYPE HUMAIN NORMAL....33
1. Principe et technique d'obtention du caryotype métaphasique....33
1.1. Culture cellulaire....33
1.2. Blocage des cellules en métaphase....34
1.3. Choc hypotonique....34
1.4. Fixations/ Etalement....35

1.5. Vieillissement des lames 35
1.6. Dénaturation /Coloration 35
2. Classement des chromosomes métaphasiques : le caryotype 37
2.1. Structure du chromosome métaphasique 37
2.2. Critères de classement des chromosomes 37
2.3. Nomenclature : 39
3. Indications du caryotype métaphasique 40
3.1. Période néonatale : 40
3.2. Le nouveau-né et l'enfant : 41
3.3. L'adulte : 41
III. LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES 41
4. Anomalies de structure 47
4.1. Aberrations portant sur un seul chromosome 48
4.1.1. Délétion 48
4.1.2. Inversion 49
4.1.3. Duplication 50
4.1.4. Isochromosome 51
4.1.5. chromosome en anneau 52
4.1.6. Marqueur chromosomique 53
4.2. Aberrations portant sur deux chromosomes : Les translocations 54
4.2.1. Translocation réciproque 54
4.2.2. translocation robertsonienne 56
4.2.3. Insertion 57
4.3. Anomalies particulières 58
4.3.1. sites fragiles 58
4.3.2. Disomieuniparentale 59

4.3.3. Dicentrique/ Pseudodicentrique 60
4.3.4. Fragments Minus ; HSR 61
4.3.5. Remaniements complexes 61
4.3.6. Polymorphisme 62
CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE 63
I. Introduction 64
II. HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE 65
1. Principe 65
2. Substrats de la FISH 67
3. Sondes utilisées 67
3.1. Les fluorochromes 73
3.2. Multifluorescence 74
4. Dénaturation / Hybridation 76
5. Visualisation et analyse des hybrides 77
6. Nomenclature 77
7. les paramètres influençant la FISH 78
7.1. La taille et la nature de la sonde 78
7.2. La concentration de la sonde 78
7.3. La température de fusion « Tm » 79
7.4. La température et la durée d'incubation 79
7.5. Le pH du milieu 79
7.6. Les lavages post hybridation 79
7.7. Le contenu de l'hybride en CG 79
8. Les indications de la FISH 79
9. les limites de la FISH 81
10. Les dérivés de la FISH 82

10.2. La FISH multicouleurs spécifique des bras chromosomiques 83
10.3. Le bandingmulticouleurs 83
10.4. Le bandingmulticouleur multiple 83
10.5. La FISH 24 couleurs spécifique des centromères 83
10.6. La FISH 24 couleurs subcentromérique 84
10.7. L'acroM-FISH 84
III. HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE 84
MATERIELS ET METHODES 88
RESULTATS 93
1. AGE : 94
2. SEXE : 95
3. ORIGINE : 96
4. COUVERTURE SOCIALE : 96
5. DIFFICULTE D'ACCES : 97
6. MOTIFS DE CONSULTATION : 98
7. SERVICES DE REFERENCES : 99
8. CONSANGUINITE : 100
9. SUIVI DE LA GROSSESSE : 101
10. ACCOUCHEMENT : 102
11. EXAMEN CLINIQUE : 103
12. CARYOTYPE : 108
13. CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE : 109
DISCUSSION : 110
CONCLUSION : 118
RESUMES: 120
BIBLIOGRAPHIE: 124

INTRODUCTION

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

De nombreuses pathologies acquises ou constitutionnelles sont d'origine génétique. La génétique médicale est une discipline mixte qui vise à en faire le diagnostic clinique et biologique. Pour cela, elle a à sa disposition deux grands types d'approche d'exploration du génome : la génétique moléculaire et la cytogénétique. Les outils de génétique moléculaire permettent de lire notre séquence d'ADN avec une très grande précision (à la base près). Elle cherche à identifier de façon ciblée des mutations (modification de la séquence) d'un gène donné, responsables d'un dysfonctionnement expliquant la pathologie. Contrairement à la génétique moléculaire, la cytogénétique permet de réaliser une analyse globale du génome grâce au caryotype.

Cette technique qui permet d'étudier le nombre et la structure des chromosomes contenus dans les noyaux de nos cellules a connu son véritable essor, elle a ensuite rapidement trouvé des applications médicales avec la mise en évidence de la première anomalie chromosomique humaine en 1959 par l'équipe du Pr J. Lejeune (hôpital Necker, Paris) : la trisomie du chromosome 21.

Le caryotype a été le premier examen à permettre une analyse de l'ensemble de notre patrimoine génétique et reste encore l'examen génétique le plus prescrit.

Cependant, cette analyse morphologique demande du temps, est peu automatisable et surtout présente un niveau de résolution limité, seules les anomalies de plus de cinq millions de bases (mégabases, Mb) peuvent être détectées. Pour ces raisons de nombreux efforts ont été réalisés ces dernières années pour dépasser ces limites. C'est le mariage des techniques de génétique moléculaire et de cytogénétique qui ont permis le développement de nouvelles

approches pour l'analyse globale du génome : l'analyse des chromosomes sur puce à ADN.

Avec l'avènement de cette technique, le cytogénéticien devient un « interniste» de la pathologie génomique.

A travers ce travail nous mettrons a jour les dernières actualités scientifiques sur ces techniques ainsi que leur l'intérêt :

En définissant la génétique moléculaire et la cytogénétique

En rappelant les bases fondamentales de la génétique médicale

En citant les principaux syndromes diagnostiqués grâce à ces techniques

En insistant sur le rôle thérapeutique et pronostique de celle-ci.

HISTORIQUE

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

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

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

Puis, il y eu l'émergence des techniques dites de haute résolution améliorant la résolution chromosomique et permettant la mise en évidence de remaniements plus fins. Parallèlement, la mise en place des techniques de biologie moléculaire va permettre de localiser des gènes responsables de maladies, comme la myopathie de Duchenne en Xp21.2, le WAGR en 11p13 (tumeur de Wilms, aniridie, anomalie des

organes génitaux externes et retard mental) tirant avantage d'anomalies chromosomiques présentes chez certains patients. [3]

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

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

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

séquence du génome humain et le développement de la CGH-array ou puce (début des années 2000).[1][5]

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

BASES FONDAMENTALE

I. LE CYCLE CELLULAIRE

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

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

1. LA MITOSE

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

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

Ce processus étant bien régulée, toute dérégulation aboutira à une production anarchique et désordonnée des cellules qui perdent les caractéristiques de la cellule mère productrice et engendrant le développement des tumeurs et des néoplasies. [6][7]

1.1. LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire (d'une division à la suivante) a une durée très variable selon qu'il s'agisse d'une cellule sanguine, hépatique, épithéliale par exemple, de quelques heures à plus d'un an. La seule constante est la durée de la phase M (la mitose proprement dite) qui est d'environ 1 à 2 heures. Le reste du cycle est qualifié d'interphase : c'est la partie du cycle pendant laquelle la cellule ne se divise pas, elle est au repos. Le cycle cellulaire est divisé classiquement en quatre phases, dont la plus importante est la mitose, division du noyau puis de la cellule.[6].

1.1.1. INTERPHASE

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

- **La phase G1 :**

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

C'est l'intervalle de temps qui s'écoule entre la fin de la mitose et le début de la phase suivante ou synthèse. C'est pendant la phase G1 que la cellule contrôle sa taille et son environnement. Une cellule qui ne se divise plus reste en phase G1 jusqu'à sa mort.

- **La phase S :**

Pendant laquelle la cellule réplique son ADN et fabrique les histones qui sont nécessaires pour la confection des nouveaux brins d'ADN.

le matériel génétique sous forme de chromatine sera dédoublé aboutissant à la formation des deux chromatides sœurs de chaque chromosome et qui seront reliées entre elles par le centromère. Cette réplication est qualifiée de semi conservatrice, car chacune des 2 molécules constituées est formée à partir d'un brin de la molécule initiale.

- **La phase G2 :**

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

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

1.1.2. LA PHASE MITOTIQUE

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

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

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

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

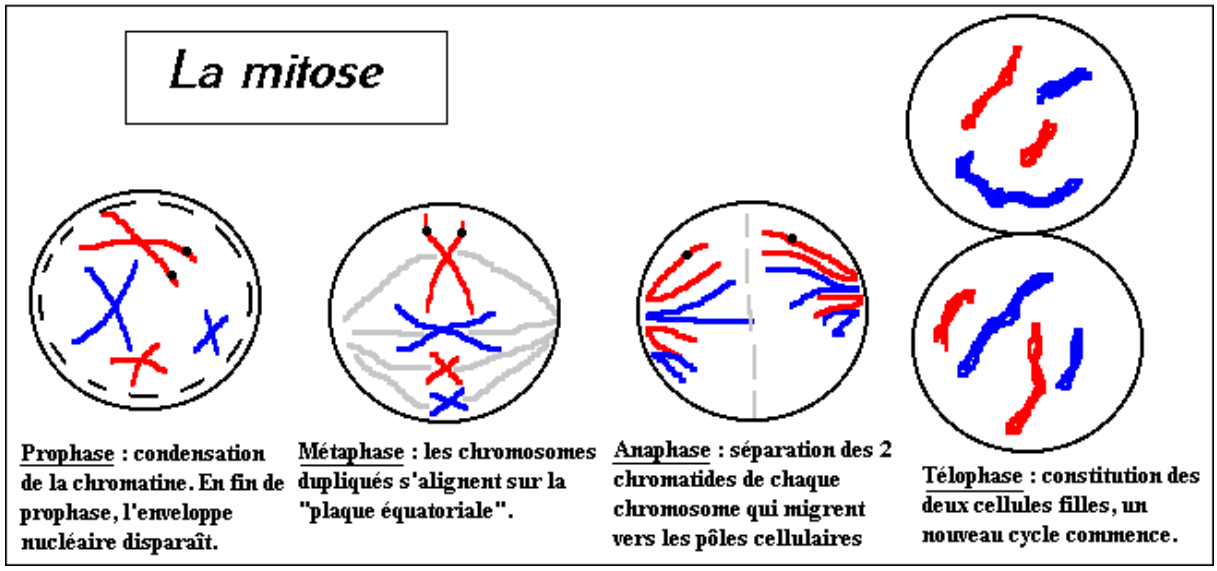


Figure 1 : les phases de la mitose

2. LA MEIOSE :

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

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

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

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

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

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

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

2.1.1. Description de la méiose

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

a. La méiose I ou division réductionnelle

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

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

- **Prophase I :**

La prophase de la méiose est marquée par un phénomène absent au cours de la mitose: les chromosomes répliqués recherchent leurs chromosomes homologues et s'accolent à eux sur toute leur longueur. Comme chaque chromosome est formé

de deux chromatides sœurs, on peut donc observer de petits groupes de quatre chromatides appelés tétrades.

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

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

- <u>Métaphase I</u>

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

- <u>Anaphase I</u>

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

- <u>Télophase et cytodiérèse</u>

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

À la fin de la méiose I, on se trouve donc devant la situation suivante : chaque cellule fille possède deux copies d'un membre de chaque paire de chromosomes homologues (le chromosome maternel ou le chromosome paternel) et aucune copie de l'autre membre. [6][7][9]

b. La méiose II ou division équationnelle

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

Les chromatides présentes dans les deux cellules filles de la méiose I sont simplement partagées entre les quatre cellules grâce à la division des centromères.

Elle se déroule également en quatre étapes :

- Prophase II : identique à la prophase I mais brève car les chromosomes sont restés compactés.
- Métaphase II : alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale
- Anaphase II : clivage des centromères et ségrégation aléatoire des chromatides sœurs
- Télophase II : reconstitution de la membrane nucléaire et cytodiérèse .Au terme de la télophase de la seconde division de méiose, on obtient quatre cellules-filles haploïdes possédant chacune un simple jeu de chromosomes non dupliqués et sont non identiques suite aux recombinaisons génétiques de la méiose I. [6][8][9]

3. ACCIDENTS DU CYCLE CELLULAIRE :

Bien entendu, des erreurs peuvent survenir lors de la formation des nouvelles cellules : le processus peut en effet mal se dérouler. Et lorsque ces erreurs mitotiques ou méiotiques surviennent pendant les premières divisions cellulaires d'un zygote, elles peuvent avoir des conséquences particulièrement néfastes. (Figure 2)

Exemples d'erreurs mitotiques :

3.1. Phénomène de non-disjonction :

Un chromosome ne se sépare pas pendant l'anaphase. Une cellule fille recevra les deux chromosomes homologues et l'autre n'en recevra aucun. Une des cellules

filles aura alors une trisomie et l'autre une monosomie, qui sont des cas d'aneuploïdie.

3.2. Délétion, translocation, inversion, duplication chromosomale:

La mitose est un processus traumatique. La cellule subit des changements importants dans son ultrastructure, ses organites se désintègrent et se reforment plusieurs heures après, et les chromosomes sont constamment déplacés par les microtubules. Occasionnellement, les chromosomes peuvent être endommagés.

Un bras du chromosome peut être cassé et le fragment est alors perdu, causant une délétion. Le fragment peut être incorrectement rattaché à un autre chromosome non homologue, ce qui cause une translocation. Il peut être rattaché au chromosome initial, mais en sens inverse, causant une inversion. Ou encore, il peut être considéré à tort comme un chromosome séparé, causant alors une duplication chromosomale. L'effet de ces anomalies dépend de la nature spécifique de l'erreur.

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

Exemples d'erreurs méiotiques :

- aneuploïdie homogène : accident de ségrégation de la méiose I ou II par non disjonction des chromosomes homologues ou chromatides sœurs Peut intéresser les autosomes ou les gonosomes Non viables sauf quelques cas : trisomies 13,18 et 21 ; tri ou tétra ou pentasomie X ou Y ; monosomie X.
- les anomalies de structures des chromosomes : résultantes d'anomalies de réplication et de réparation d'ADN se déroulant en interphase. Même mécanisme que les anomalies au cours de la mitose.

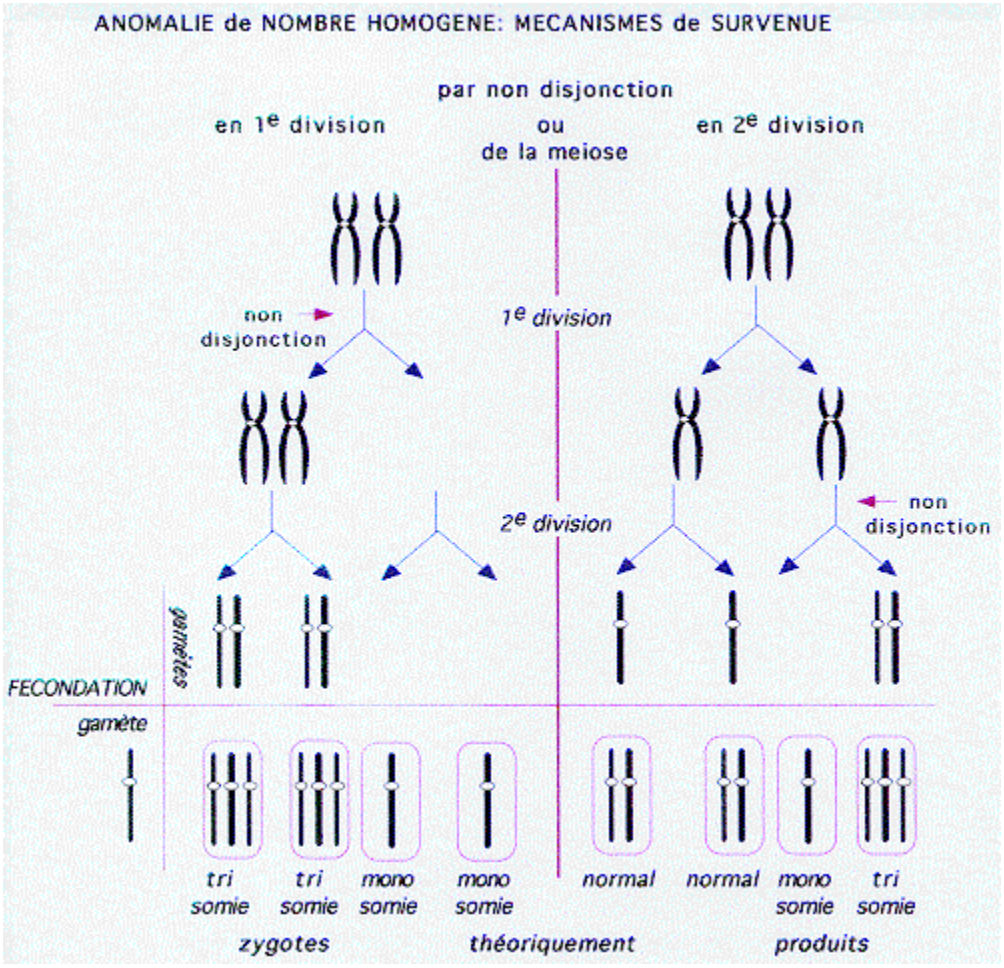


Figure 2 : ANOMALIE DE NOMBRE HOMOGENE : mécanisme et survenu

II. LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET DU CHROMOSOME

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

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

Environ deux mètres d'ADN dans chaque cellule doivent être contenus dans un noyau de quelques µm de diamètre. En plus de cet énorme degré de compaction,

l'ADN doit être rapidement accessible afin de permettre son interaction avec les machineries protéiques régulant les fonctions de la chromatine : la réplication, la réparation et la recombinaison.

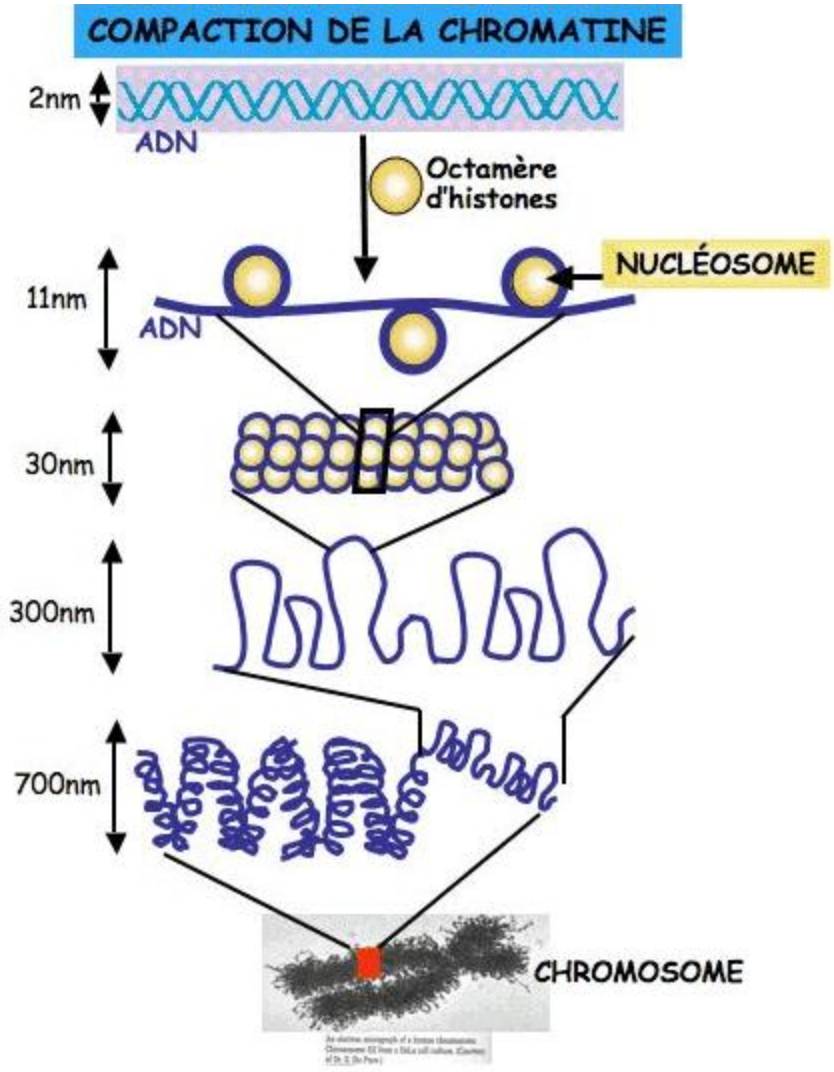


Figure 3 : compaction de la chromatine

1. Le chromosome

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

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

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

1.1. Morphologie du chromosome métaphasique

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

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

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

Les extrémités des bras chromosomiques sont des régions possédant une architecture particulière sur le plan moléculaire et sont appelées télomère. Il y a un télomère pour le bras court et un télomère pour le bras long. (figure4)

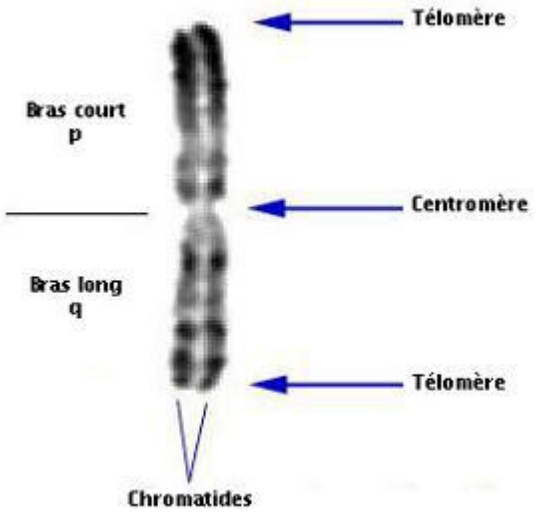


Figure 4 : structure du chromosome métaphasique

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

- Les chromosomes métacentriques, (figure 5) dont les bras courts et longs sont de taille semblable. L'index centromérique (rapport de la taille du bras court sur la taille du bras court + la taille du bras long) est autour de 0,5. Exemples : chromosomes 1, 2, 3, 16, 19, 20, X.

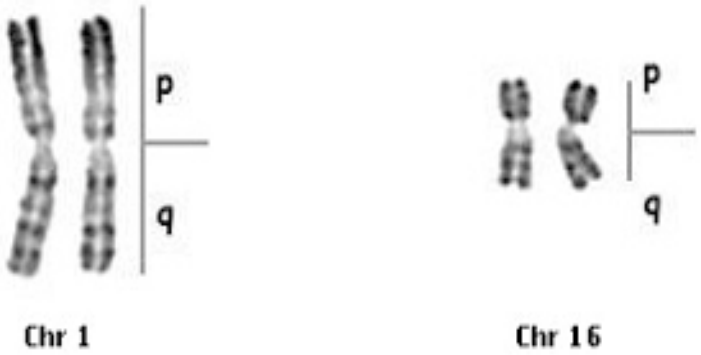


Figure 5

- Les chromosomes submétacentriques, (figure 6) dont les bras courts sont franchement plus courts que les bras long. L'index centromérique est très inférieur à 0,5.

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



Figure 6

- Les chromosomes acrocentriques, (figure 7) dont le bras court est peu ou pas visible. L'index centromérique est proche de 0. La particularité essentielle de ce groupe de chromosomes est qu'ils hébergent les mêmes gènes sur leur bras courts, qui ont tous une structure identique. Il s'agit des gènes responsables de la synthèse des ARN ribosomiques, présents à plusieurs centaines d'exemplaires dans la cellule. Exemple : chromosomes 13, 14, 15, 21, 22.



Figure 7

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

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

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

En dehors de ces zones polymorphes, les régions d'ADN répété non codant qui forment l'hétérochromatine constitutive se retrouvent également au niveau des centromères de tous les chromosomes. (figure 8)

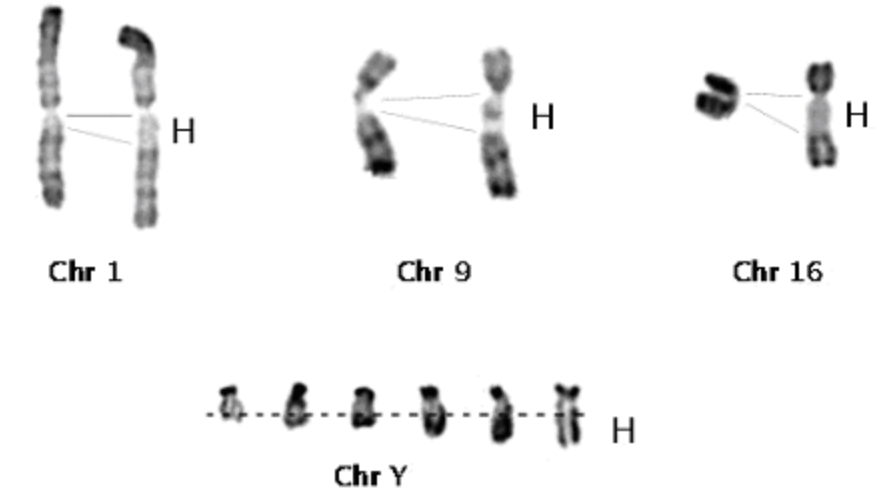


Figure 8

1.2. Le centromère

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

La perte de cette structure aboutit à une instabilité chromosomique.

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

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

1.3. Le télomère

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

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

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

1.4. Composition de l'axe protéique du chromosome

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

❖ **La topoisomérase :**

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

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

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

de l'axe protéique, elle en constitue au contraire un élément dynamique en renouvellement permanent

❖ La condensine

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

Ces protéines sont en fait des complexes multiprotéiques associant 2 sous unités SMC (SMC2 et SMC 4 pour Structural Maintenance of Chromosome) et 3 sous unités non SMC (CAP H/H2, CAP D2/D3, CAP G/G2). Les deux sous unités SMC s'associent pour former un V porteur d'un site de fixation pour l'ATP à l'extrémité de chacune des deux branches. (Figure 9)

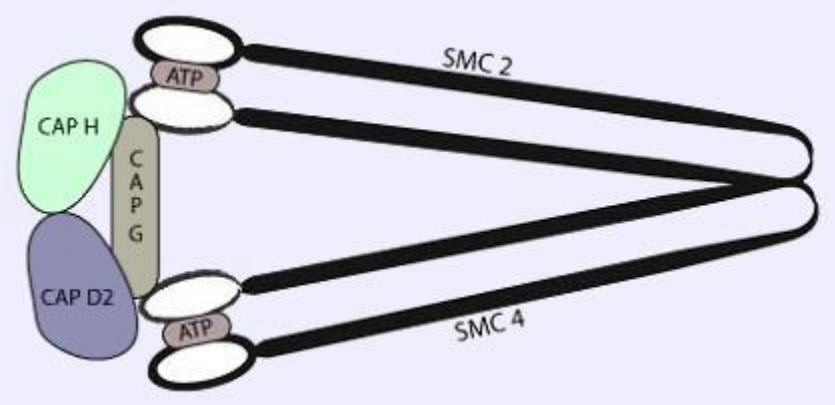


Figure 9 : constituants de la condensine

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

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

Cette compaction imparfaite entraîne cependant une morphologie anomale des chromosomes en raison d'une désorganisation de l'axe protéique des

chromatides, ainsi qu'une ségrégation anormale en raison de masses chromatiniennes persistantes au niveau de la plaque équatoriale en fin d'anaphase. [11][12][13]

CYTOGENETIQUE CLASSIQUE

I. INTRODUCTION

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

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

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

En 1959, a été décrite par Jérôme Lejeune et ses collaborateurs la première anomalie chromosomique liée à une pathologie, la trisomie21. Elle a été suivie, la même année, par la description par Jacobs et Strong de la première anomalie des chromosomes sexuels, avec une formule XXY, dans le syndrome de Klinefelter.

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

Les causes des syndromes malformatifs chromosomiques les plus fréquents ont été découvertes très rapidement ensuite : syndrome de Turner, trisomies 13 et18...

En 1960, a été identifiée aussi, par Nowell et Hungerford, la première anomalie chromosomique dans une affection maligne, donc acquise, le chromosome

Philadelphie, initialement décrit comme un 22 délété, dont Rowley a démontré par la suite qu'il était le résultat d'une translocation t(9;22). [3][5][14]

II. LE CARYOTYPE HUMAIN NORMAL

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

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

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

1. Principe et technique d'obtention du caryotype métaphasique

(Annexe : protocole technique)

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

1.1. Culture cellulaire

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

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

- ❖ les lymphocytes sanguines (cellules les plus utilisées) : le sang total recueilli stérilement sur un tube hépariné est incubé 48 à 72heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (phytohémagglutinine) ainsi que des antibiotiques pour éviter la pullulation microbienne.
- ❖ les fibroblastes : obtenues après biopsie cutanée le plus souvent nécessitant une culture cellulaire de une à trois semaines.
- ❖ Les cellules de la moelle osseuse : une culture de 24 à 48heures en fonction de la pathologie étudiée.
- ❖ Le caryotype fœtal réalisable sur :
  - Cellules amniotiques : culture de 10 à 15jours
  - Cellule du trophoblaste
  - Cellule fœtale en circulation
  - Villosités choriales : ne nécessitant pas de culture.

1.2. Blocage des cellules en métaphase

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division (classiquement c'est la Colchicine qui est utilisée ou son équivalent synthétique la Colcémide) qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des tubulines dans les microtubules.

1.3. Choc hypotonique

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

1.4. Fixations/ Etalement

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

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

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

1.5. Vieillissement des lames

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

1.6. Dénaturation /Coloration

Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur longueur. On ne peut donc les distinguer les uns des autres que par leur taille et leur forme. Cependant, ces critères sont insuffisants pour assurer la reconnaissance et l'interprétation correcte des anomalies chromosomiques.

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration inhomogène des chromosomes par le Giemsa et l'apparition de bandes. C'est la succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez

tous les individus pour un chromosome donné, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un code à barres.

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

Les bandes G, obtenues par digestion trypsinique modérée des chromosomes.

Elles sont les plus utilisées en raison de leur facilité d'obtention

Les bandes R, obtenues par dénaturation thermique ménagée.

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

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

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

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

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

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

2. Classement des chromosomes métaphasiques : le caryotype

2.1. Structure du chromosome métaphasique

Les chromosomes métaphasiques sont constitués d'un bras court (noté p) et d'un bras long (noté q), reliés entre eux par le centromère qui correspond à un étranglement situé à un niveau variable du chromosome et qui sert de point d'attache au fuseau de division pendant la division cellulaire. (Figure 10) [14]

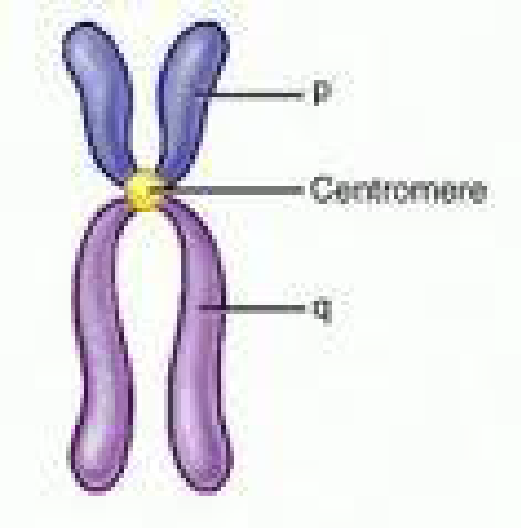


Figure10 : chromosome métaphasique

2.2. Critères de classement des chromosomes

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

- la taille
- Par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit
- l'index centromérique (IC), c'est-à-dire le rapport entre la taille du bras court et la taille totale du chromosome (p/p+q) (figure 11)
- Cet index permet de reconnaître trois familles de chromosomes :
- Les chromosomes métacentriques dont les deux bras ont une taille à peu près équivalente (IC= 1/2) : centromère au milieu (chromosomes 1,3, 16, 19 et 20).

- Les chromosomes submétacentriques qui ont un bras franchement plus petit que le bras long (IC≈ 0) : centromère terminal (13, 14, 15, 21, 22).
- Les chromosomes acrocentriques dont le bras court est quasi inexistant (0<IC< (1/2)) : centromère en position intermédiaire.

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

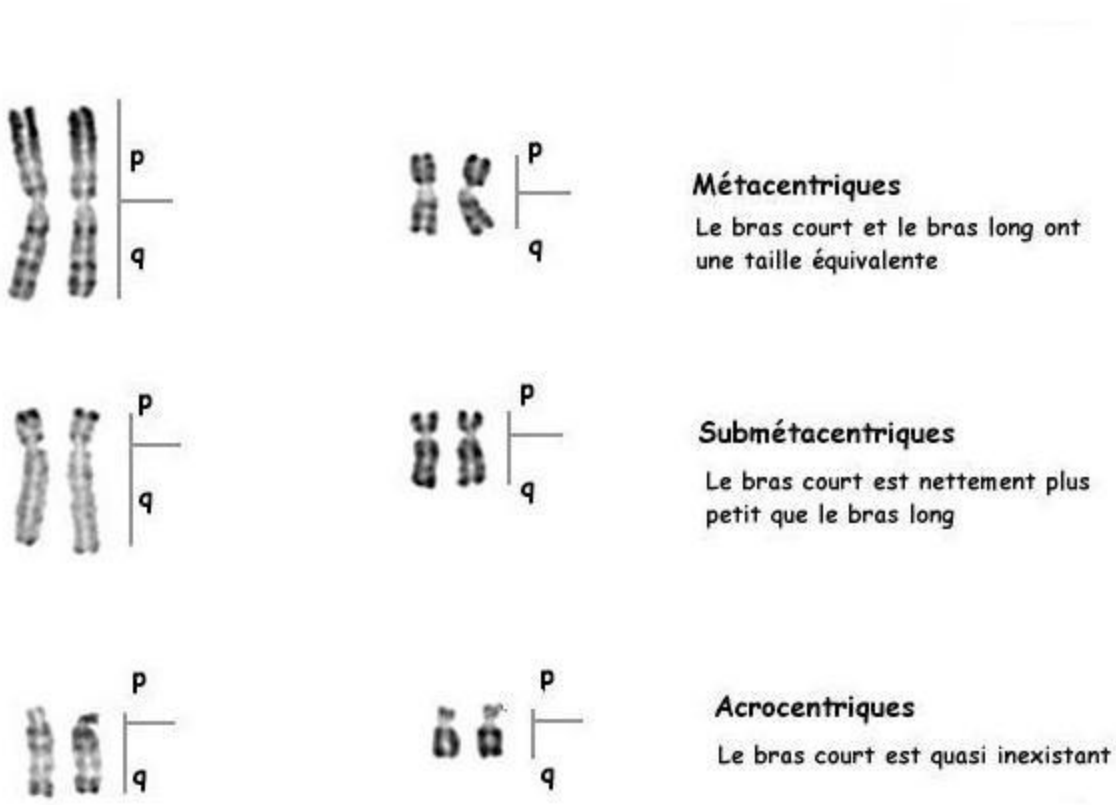


Figure 11: morphologie des chromosomes en fonction de l'index centromérique

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

- Le groupe A : Les grands médians et submédians 1, 2, 3.
- Le groupe B : Les grands distaux 4, 5.

- Le groupe C : Les médians et submédians moyens 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et X.
- Le groupe D : Les grands acrocentriques 13, 14 et 15.
- Le groupe E : Les petits submédians 16, 17 et 18.
- Le groupe F : Les petits médians 19, 20.
- Le groupe G : Les petits acrocentriques 21, 22 et Y.
- Les bandes chromosomiques, qui sont caractéristiques de chacune des paires. Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome. Plus les chromosomes sont condensés, moins on peut observer de bandes et moins l'analyse permet de dépister des anomalies de petite taille.

Le nombre de bandes par lot haploïde (c'est-à-dire pour 23 chromosomes) permet de définir la résolution de l'analyse cytogénétique ; un caryotype standard a une résolution de 300 à 550 bandes ; certaines techniques dites de haute résolution permettent d'augmenter le nombre de bandes

visualisées en bloquant les chromosomes au tout début de leur condensation (en prométaphase) : on peut ainsi obtenir 800 ou même 1000 bandes par lot haploïde.

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

2.3. Nomenclature :

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

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

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

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

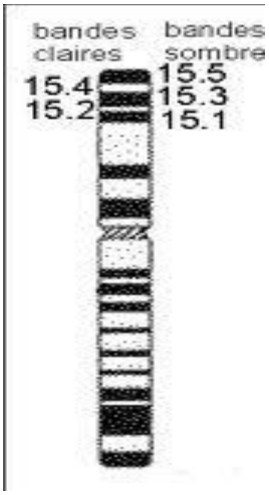


Figure 12: Banding du chromosome 11

3. Indications du caryotype métaphasique

3.1. Période néonatale :

- Antécédents d'anomalies chromosomiques.
- Anomalie chromosomique de structure équilibrée chez un parent.
- Age maternel avancé.
- Signes d'appel échographiques.
- Risque élevé aux tests sériques.
- diagnostic du sexe dans les maladies récessives liées à l'X
- instabilité chromosomique.

3.2. Le nouveau-né et l'enfant :

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

3.3. L'adulte :

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

III. LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

1. Introduction

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

- Ces remaniements peuvent s'observer de manière :

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

❖ acquise : un seul organe est touché, les autres organes sont normaux.

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

- Ils résultent d'un accident survenant soit au cours de la méiose, soit au cours d'une mitose. Ils peuvent impliquer un ou plusieurs chromosomes.
- On reconnaît par ailleurs les anomalies dites homogènes (quand toutes les cellules examinées portent l'anomalie) et les anomalies en mosaïque (quand une fraction seulement des cellules est anormale : notion de clone).
- Leurs conséquences sont variables en fonction du remaniement considéré.

En règle générale, les remaniements dits équilibrés (c'est-à-dire sans perte ni gain de matériel génétique) n'ont habituellement pas de conséquence pour le sujet porteur alors que les remaniements déséquilibrés se traduisent par des manifestations cliniques d'autant plus graves que la perte ou le gain de matériel est plus important.(figure 13) [15]

2.Incidence

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

- 60% des fausses couches spontanées sont dues à des anomalies chromosomiques.
- 5% des fausses couches tardives, morts fœtales in utéro et morts nés.
- 0.6% des naissances vivantes

Dans les hémopathies malignes :

- Leucémie myéloïde chronique : 95%
- Leucémie aigue lymphoïde : 70 à 80%
- Leucémie aigue myéloïde : 50%

3. Anomalies de nombre

3.1. L'aneuploïdie

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

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

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

- ❖ Aneuploïdie homogène : Accident de ségrégation par non disjonction en meiose I ou II, toutes ne sont pas compatibles avec la vie. (figure 13)
  - Une non disjonction en première division produit 4 gamètes déséquilibrés.
  - Une non disjonction en deuxième division produit 2 gamètes déséquilibrés et 2 gamètes normaux.

Après fécondation :

- Les gamètes possédant un autosome en excès produisent un zygote trisomique : de nombreuses trisomies ne sont pas viables et involuent très précocement, ou sous forme de fausses couches spontanées (trisomie 16 par exemple). D'autres sont plus ou moins viables : trisomies21, 13, 18, 8.
- Les gamètes nullosomiques produisent des monosomies. Les monosomies, bien que produites en nombre théoriquement égal aux trisomies, subissent une élimination précoce encore plus stricte.

- Pour les gonosomes, la viabilité des conceptus déséquilibrés est plus grande, et le phénomène de non disjonction apparaît alors, dans la grande variété de ses conséquences : trisomie X et Y, monosomie X, tétra et pentasomie Y sont viables.

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

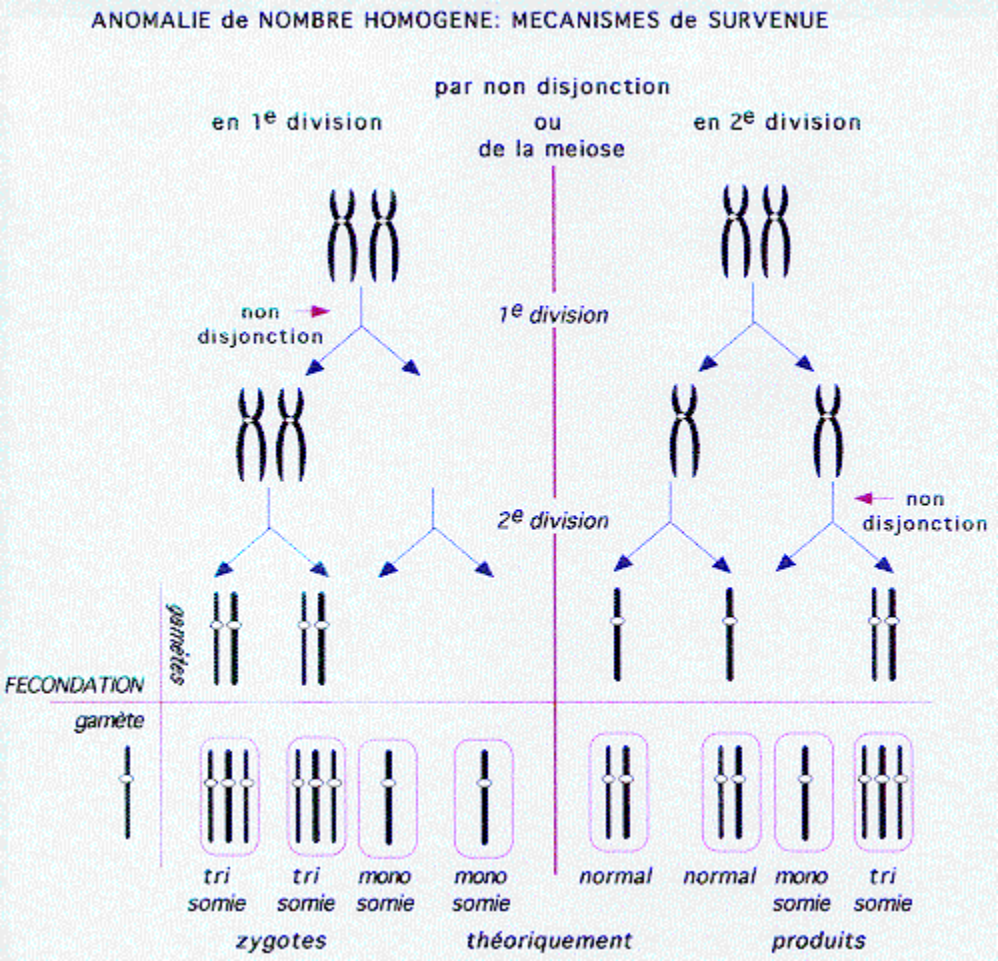


Figure 13 : anomalie de nombre homogène, mécanisme de survenue

- Aneuploïdie en mosaïque : Accident de ségrégation par non disjonction lors des mitoses post zygotique.

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

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

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

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

3.2. La polyploïdie

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

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

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

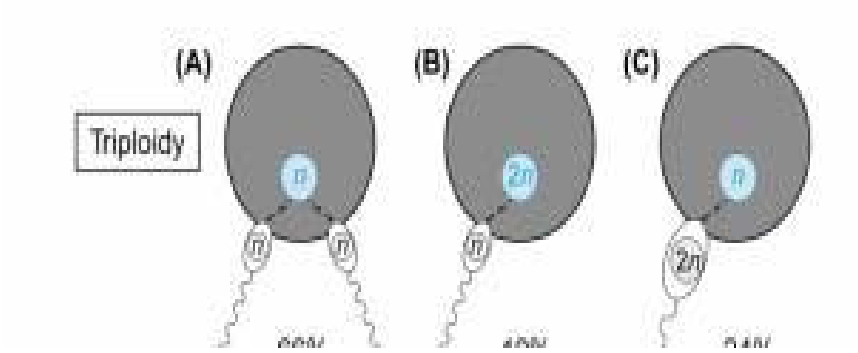
- Triploïdies le plus souvent : 3N = 69 chromosomes 69, XXX ou 69, XXY ou69, XYY. Présentes dans 20 % des fausses couches spontanées, elles peuvent aboutir à la naissance d'enfants vivants, qui meurent cependant très rapidement.

Le mécanisme de formation des triploïdies est double : (figure 14)

1. la digynie(B) : non expulsion du 2ème globule polaire. (Npaternel +2Nmaternel)

2. la diandrie : fécondation d'un ovocyte I par 2 spermatozoïdes normaux dispermie(A) ; ou d'un ovocyte I par un spermatozoïde diploïde : diplospermie(C). (Nmaternel + 2Npaternel).

La diandrie est 4 fois plus fréquente que la digynie.



60% 10% 24%

Figure 14: mécanisme de la triploïdie

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

3.3. Nomenclature

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

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

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

- Quand il s'agit d'une aberration portant sur les chromosomes sexuels, on indique :
- le nombre total de chromosomes (autosomes et gonosomes ou sexuels)
- une virgule
- les chromosomes sexuels

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

- Pour la polyploïdie, on indique :
- le nombre total de chromosomes (autosomes et gonosomes ou sexuels)
- une virgule
- les chromosomes sexuels.

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

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

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

4. Anomalies de structure

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

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

Une délétion, une duplication ou la formation d'un isochromosome se traduiront par un phénotype anormal, il s'agit d'anomalies déséquilibrées tandis que

l'insertion, l'inversion, ainsi que la translocation peuvent être équilibrées. Ceci signifie que les porteurs de ces anomalies de structures sont phénotypiquement sains, car la totalité du matériel génétique est présente.

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

4.1. Aberrations portant sur un seul chromosome

4.1.1. Délétion

Une délétion résulte d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminal) ou de deux cassures sur le même bras avec perte du segment intercalaire (délétion interstitielle ou intercalaire). (Figure 15)

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

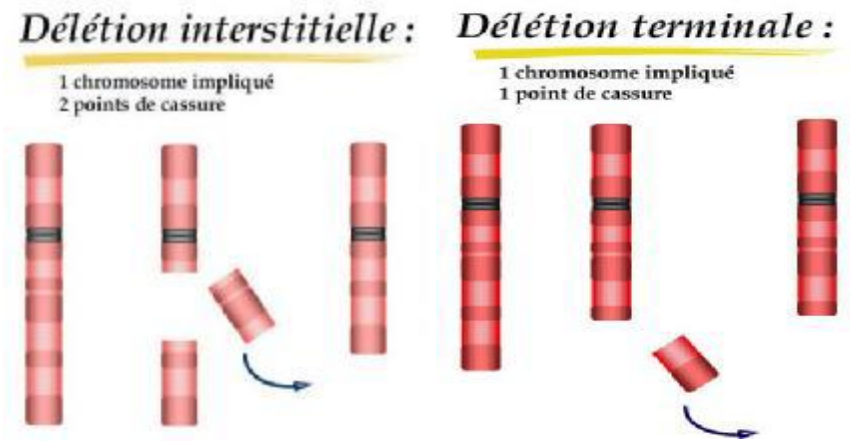


Figure 15 : Types de délétions

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

Cas particuliers : les microdélétions

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

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

4.1.2. Inversion

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

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

L'inversion est péricentrique si les points de cassure sont localisés de part et d'autres du centromère. (Figure 16)

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

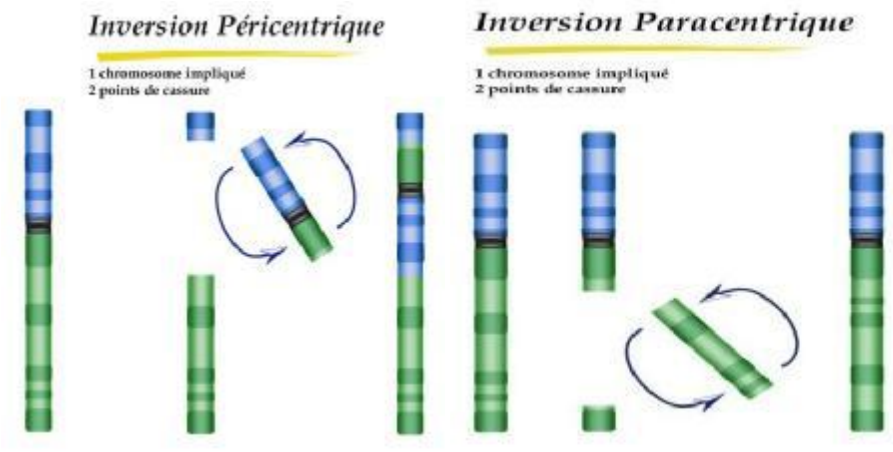


Figure 16 : types d'inversions

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

4.1.3. Duplication

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

Le segment dupliqué peut être :

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

Inversé à 180° par rapport au segment d'origine, c'est une duplication indirecte « en miroir » (figure17)

La duplication est une anomalie chromosomique déséquilibrée. [12]

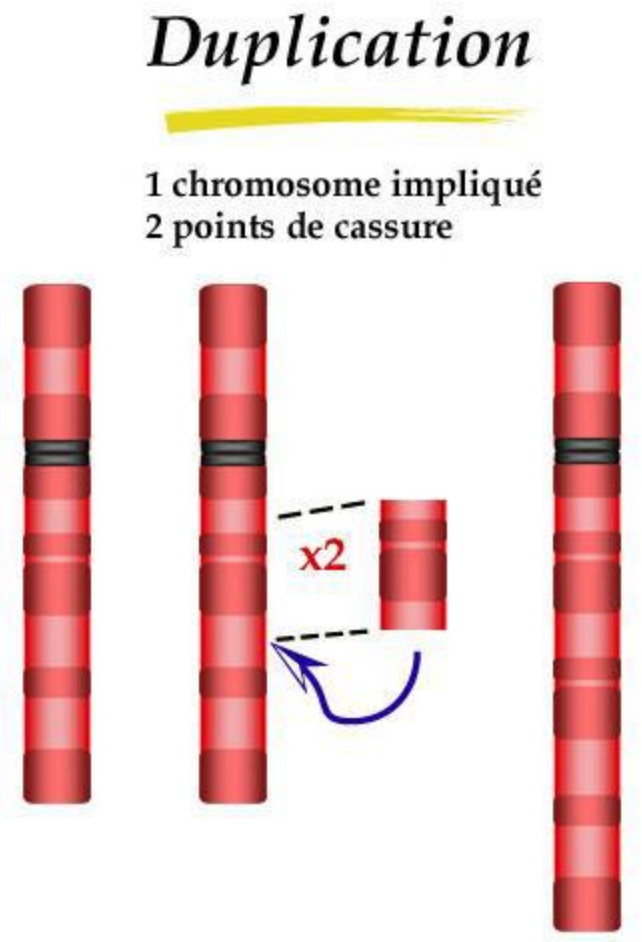
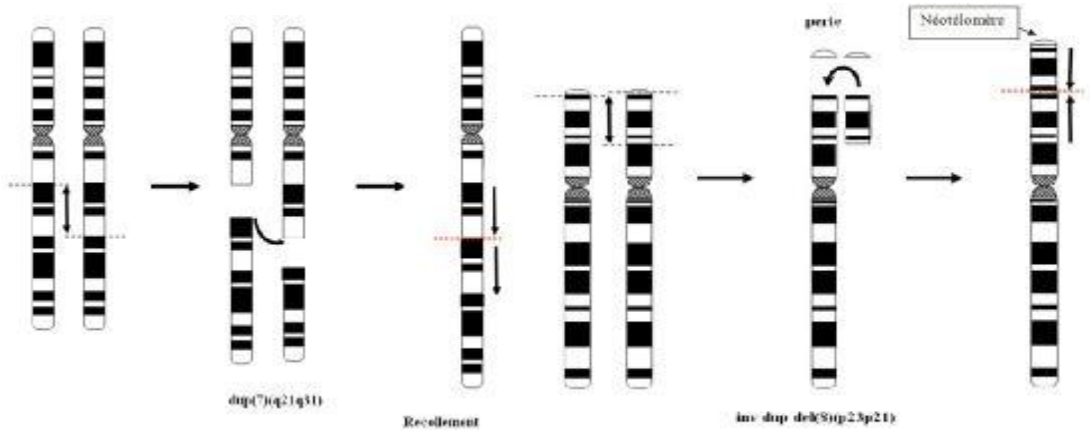


Figure 17 : mécanismes de laDuplication



Duplication en tandem **Duplication en miroir**

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

4.1.4. Isochromosome

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

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

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

Il peut avoir un centromère (monocentrique) ou deux cetromères (dicentrique) selon le mécanisme de formation.(figure 18) [12]

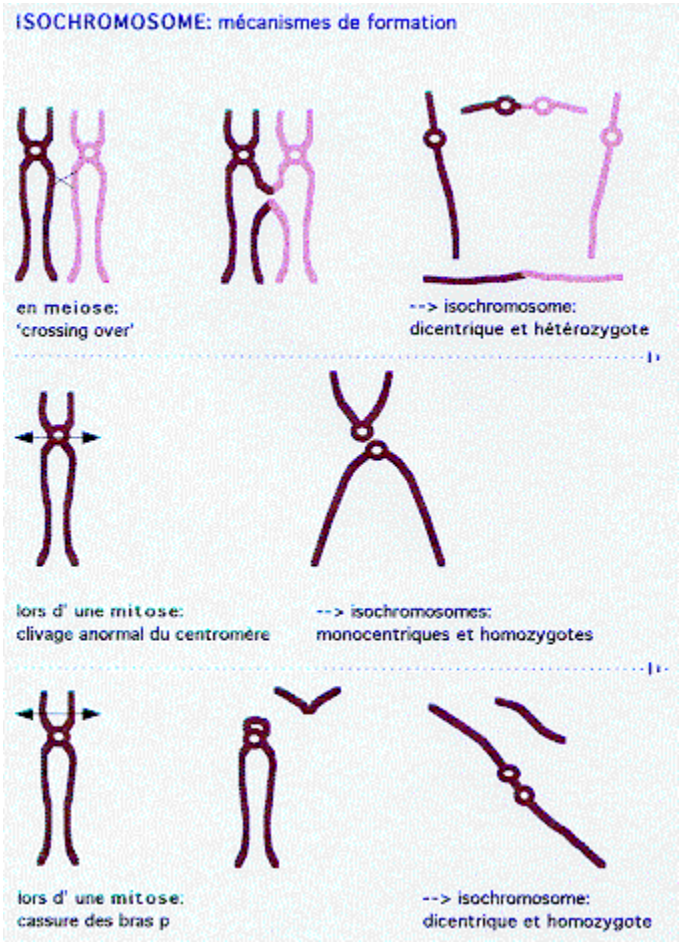


Figure18 : isochromosome, mécanisme de formation

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

4.1.5. chromosome en anneau

Un chromosome en anneau correspond à des délétions plus ou moins étendues (souvent peu importantes) aux deux extrémités d'un chromosome et recollement du segment intermédiaire (par absence de télomères), ce qui aboutit à une structure annulaire. (figure19)

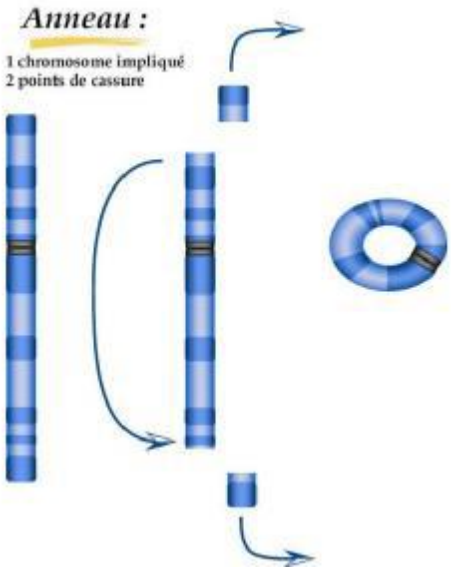


Figure 19 : mécanisme du chromosome en anneau

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

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

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

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

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

4.1.6. Marqueur chromosomique

Elément chromosomique surnuméraire non reconnaissable.

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

Ses conséquences phénotypiques dépendent de son origine et de sa constitution génique. [13] (ANNEXE II)

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

4.2. Aberrations portant sur deux chromosomes : Les translocations

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

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

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

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

4.2.1. Translocation réciproque

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

Dans la majorité des cas, une translocation réciproque est apparemment équilibrée et l'individu est phénotypiquement normal. Mais, si cet échange s'accompagne d'une perte de matériel génétique, elle est déséquilibrée. (Figure 20)

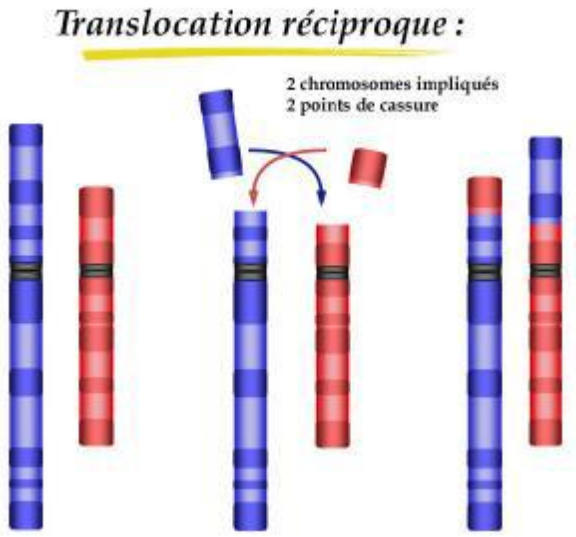


Figure 20: mécanisme de la translocation réciproque impliquant deux chromosomes

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

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

Au moment de la méiose, lors de l'appariement des chromosomes, les chromosomes transloqués vont former un tétravalent ce qui entraîne des difficultés de ségrégation. (Figure 21)

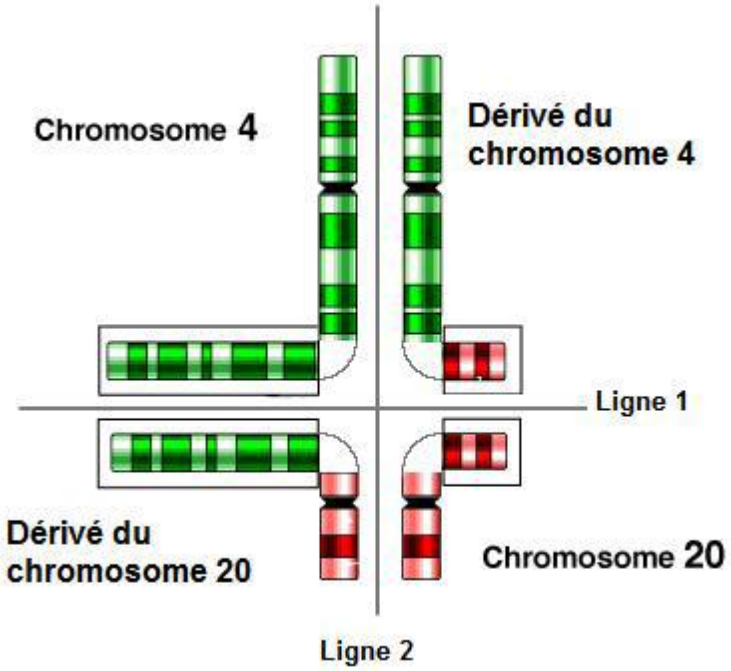


Figure 21 : exemple d'un tétravalent

4.2.2. translocation robertsonienne

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

La translocation consiste en une fusion des chromosomes avec perte des bras courts, sans aucune conséquence clinique directe pour le sujet porteur. (Figure 22)

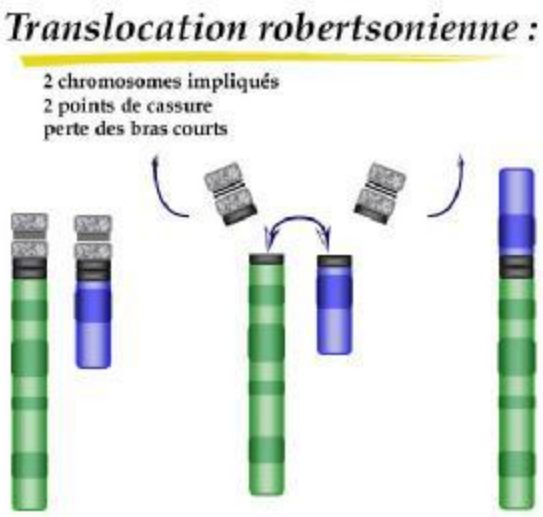


Figure 22 : mécanisme d'une translocation réciproque

Les deux chromosomes impliqués :

- ❖ soit ils fusionnent par leurs centromères (fusion centromérique) formant un chromosome monocentrique.
- ❖ soit par cassures dans les régions juxtacentriques des bras courts, puis fusion entre ces deux bras courts formant ainsi un chromosome dicentrique (95%des cas).

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

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

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

4.2.3. Insertion

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

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

Le chromosome donneur peut être aussi le chromosome receveur, dans ce cas là, il s'agit d'un déplacement d'un fragment chromosomique d'un site à un autre sur le même chromosome, le fragment peut garder la même orientation « insertion directe » ou une orientation inverse « insertion inversion » (figure 23).

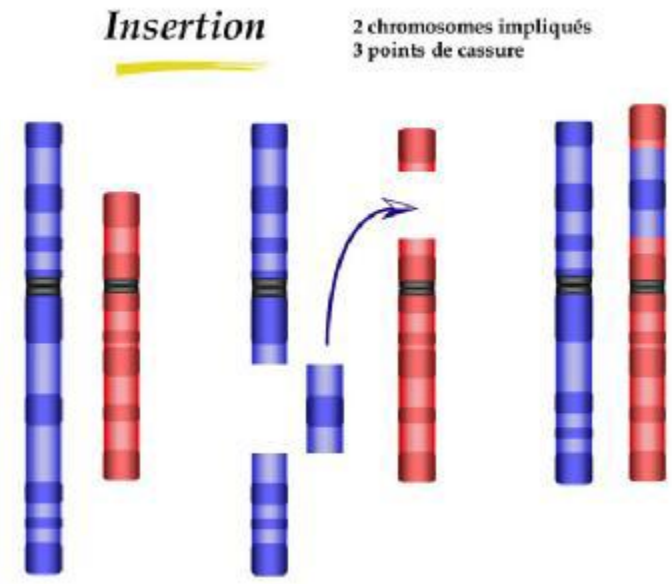


Figure 23 : mécanisme d'une insertion

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

Selon l'ISCN, une insertion est notée ins, suivi d'une parenthèse indiquant le numéro du chromosome qui reçoit l'insertion, suivie éventuellement d'un point virgule indiquant le numéro du chromosome donneur du segment (si ce chromosome n'est pas le même que celui qui reçoit), suivi d'une deuxième parenthèse indiquant le point d'insertion suivi d'un point virgule seulement si le chromosome donneur est différent, suivi des points de cassure du fragment. [10][13].

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

4.3. Anomalies particulières

4.3.1. sites fragiles

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

Se transmet comme un caractère dominant.

L'anomalie la plus connue est la fragilité du site q27.3 sur le chromosome X responsable du syndrome de l'X fragile, une des causes majeurs du retard mental chez le garçon. (Figure 24)

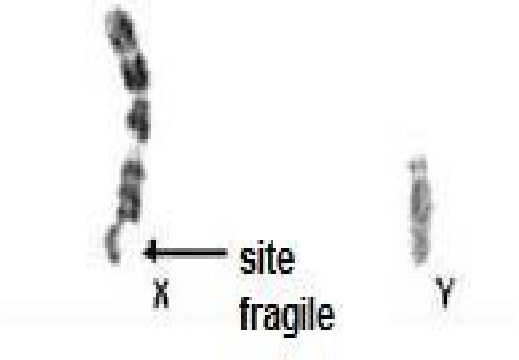


Figure 24 : exemple d'un site fragile sur le chromosome X

4.3.2. Disomie uniparentale (DUP)

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

Une DUP peut être observée pour presque toutes les paires chromosomiques, mais seules certaines disomies sont associées à des manifestations cliniques en révélant une maladie récessive rare (cas d'iso disomie) ou une pathologie liée à l'empreinte parentale (syndrome de Prader-willi/ Angelman). (Figure 25) [12]



Figure 25 : exemple d'une disomie uniparentale

4.3.3. Dicentrique/ Pseudodicentrique

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

Lorsque les deux centromères sont suffisamment éloignés, l'un d'entre eux devient non fonctionnel, d'où le nom de chromosomes pseudodicentriques. (Figure 26).

Remaniement déséquilibré.

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

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

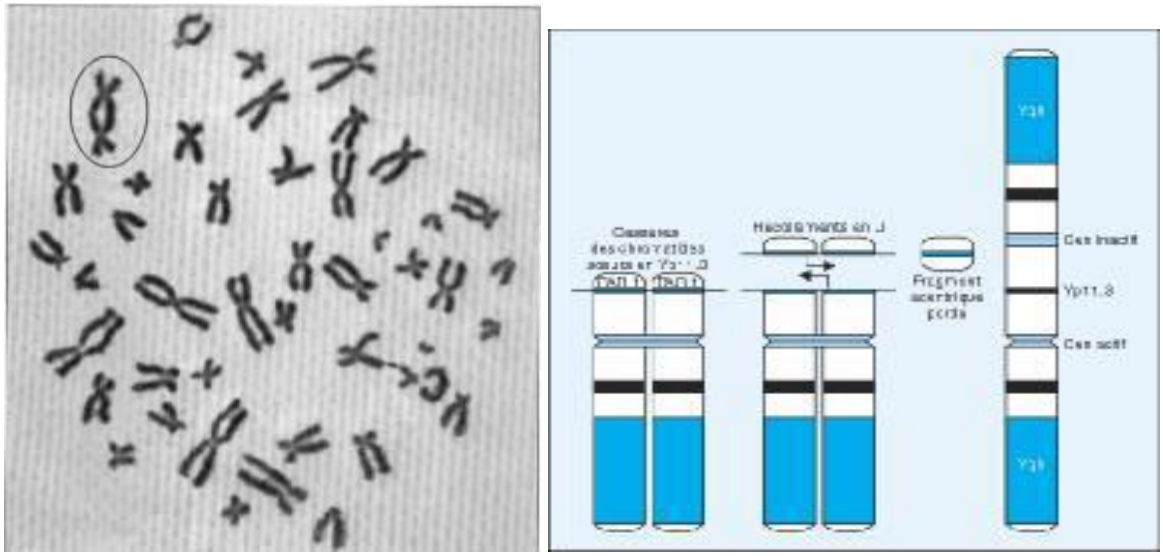


Figure 26 : a-chromosome dicentrique sur une mitose

4.3.4. Fragments Minus ; HSR

Fragments minus (notés DM : double minute) ; très petit(s) élément(s) supplémentaire(s), souvent par 2, acentriques ; généralement très nombreux. (Figure 27)



Figure 27 : plusieurs doubles minute sur mitose

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

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

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

4.3.5. Remaniements complexes

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

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

4.3.6. Polymorphisme

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

La transmission est familiale comme un trait autosomique dominant

Les plus connus sont :

L'inversion péricentrique du chromosome 9

La longueur du bras long du chromosome Y

La longueur et la morphologie des bras court des chromosomes acrocentriques.

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

CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

I. Introduction

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

Depuis la fin des années 80, les cytogénéticiens ont à leur disposition de nouvelles techniques alliant l'établissement du caryotype et la biologie moléculaire dont le niveau de résolution se situe à une échelle intermédiaire : la cytogénétique moléculaire. (Figure 28)

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

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

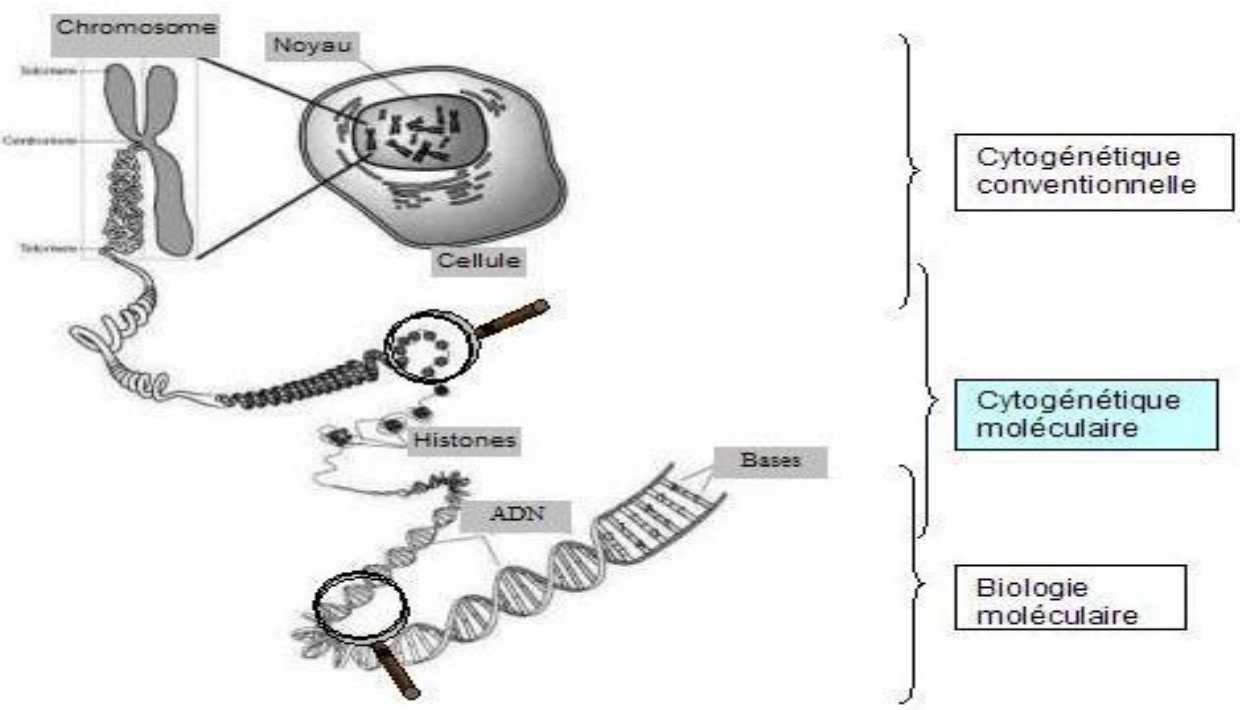


Figure 28: Représentation schématique du génome humain à différentes échelles.

II. HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)

1. Principe

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

- La complémentarité obligatoire des bases azotées (Adénine—Thymine ;
- Cytosine—Guanine).
- Les liaisons hydrogènes faibles (covalente) qui assurent la cohésion des deux brins de la double hélice.
- Les liaisons phosphodiester (40 fois plus fortes que les liaisons hydrogènes) qui assurent la stabilité de l'enchainement des nucléotides de chaque brin d'ADN.

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

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

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

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

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

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

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

2. Substrats de la FISH

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

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

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

3. Sondes utilisées

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

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

On distingue deux grandes catégories de sondes :

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

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

- Types de sondes

Les différents types de sondes commercialisées sont :

Les sondes centromériques, locus spécifiques, télomériques et subtélomériques et les sondes de peinture chromosomique. (Figure29)

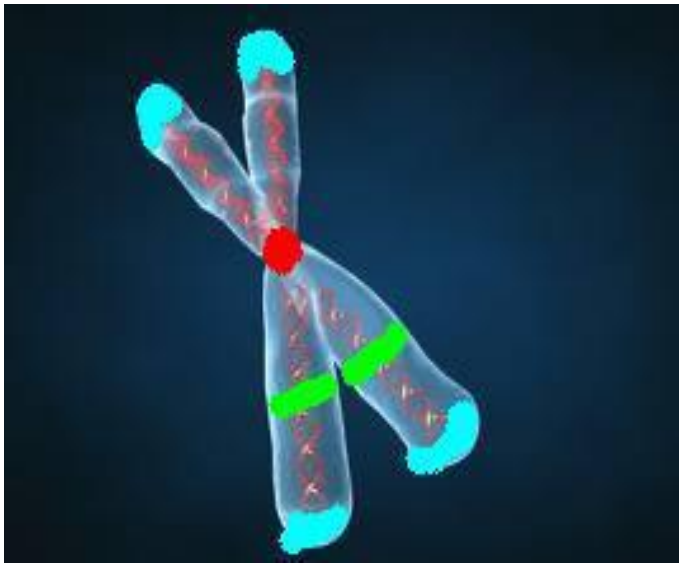


Figure 29 : Emplacement des sondes CEP, LSI et Télomérique

- Les sondes CEP (Chromosome Enumeration Probe)(Figure 30) ; elles s'hybrident au niveau des centromères des chromosomes. Les séquences dont elles sont complémentaires sont naturellement présentes en un grand nombre d'exemplaires au niveau des centromères ; le signal obtenu est donc en général intense car la sonde s'hybride sur chacune des séquences complémentaires présentes. Ces sondes sont surtout utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase et pour identifier l'origine de chromosomes marqueurs.

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

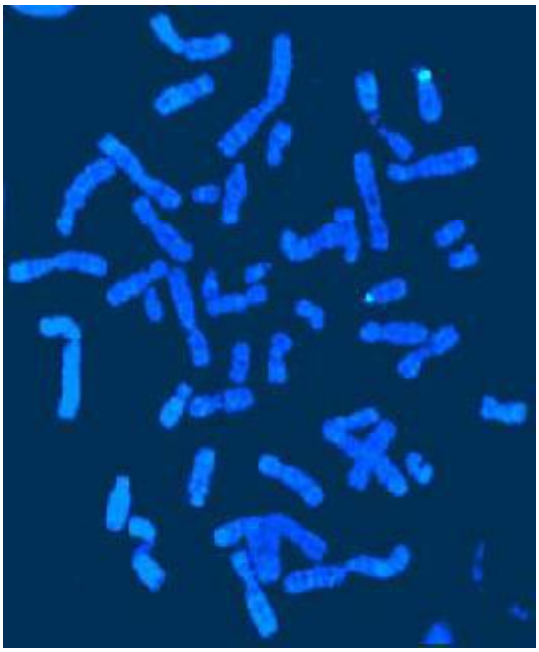


Figure 30 : Sonde centromérique (α-satellite) des chromosomes 15(Vysis®) sur une métaphase normale ;

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

Les sondes LSI (Locus Specific Identifier) (Figure 31) ; comme leur nom l'indique, ces sondes de petite taille permettent d'identifier une région très précise du génome.

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

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

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

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

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

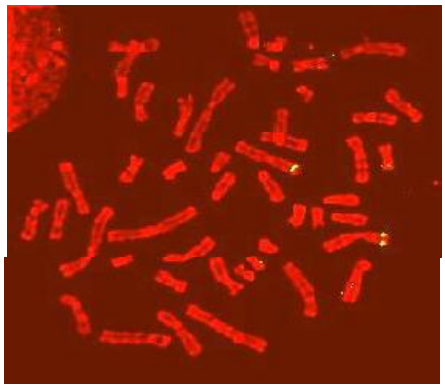


Figure 31 :

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

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

- Les sondes télomériques et subtélomériques (Figure 31)

Le télomère localisé à chacune des deux extrémités d'une chromatide maintient l'intégrité du chromosome, il est constitué d'une répétition en tandem de6 paires de base 5'TTAGGG3' d'une longueur jusqu'à 30kb. Ces sondes peuvent alors détecter tous les télomères.

Les régions subtélomériques sont constituées aussi d'une répétition de séquences mais avec une périodicité et longueur spécifiques de chaque

chromosome. L'utilisation de sondes spécifiques permettra de mettre en évidence des anomalies cryptiques à ce niveau.

- Les sondes WCP (Whole Chromosome Painting) (Figure 32), sonde peinture chromosomique ; elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome.

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

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

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

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

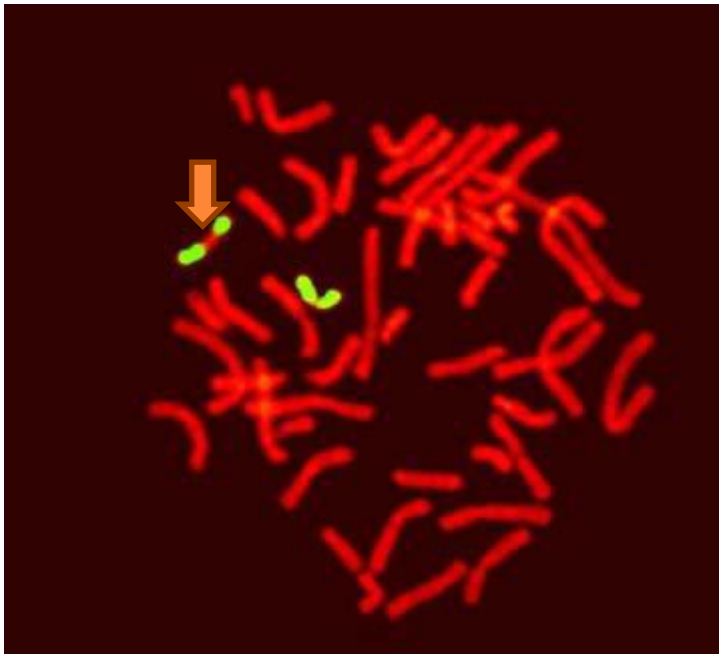


Figure 32 : Peinture chromosomique sur métaphase normale du chromosome 16(Biosys®),

- ❖ sonde marquée à la biotine détectée par immunofluorescence indirecte par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC),
- ❖ contre colorant rouge : Iodure de Propidium (IP).

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

- Les sondes ''réarrangements chromosomiques spécifiques'' ; permettent de détecter des réarrangements connus dans certaines pathologies. Ex : t(9;22) ou t(15;17)

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

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

Les sondes utilisées en FISH > 35kb.

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

- Marquage des sondes

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

Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides.

Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connues sont le Random-priming et la Nick-translation. [20][21]

3.1. Les fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation (λexc) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λem). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission.

Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- Le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.

- Le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (exc 495nm – λem 519nm)fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) (λexc 495nm – λem 519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red (λexc 589nm – λem 615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 (λexc 650nm – λem670nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5.5 (λexc 675nm – λem 694nm) fluoresce dans le rouge

3.2. Multifluorescence

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

Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes.

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

En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes de peinture, chacune spécifique d'une paire chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multifluorescence (figure 33). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère. (Figure 34)(Figure 35) [22][23].

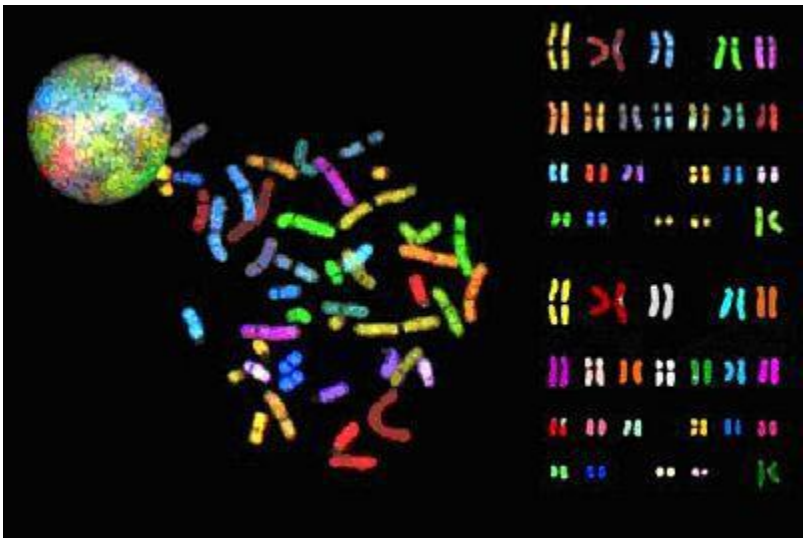


Figure33 : hybridation de 24 sondes de peinture chromosomique réalisant un Caryotype en multi fluorescence

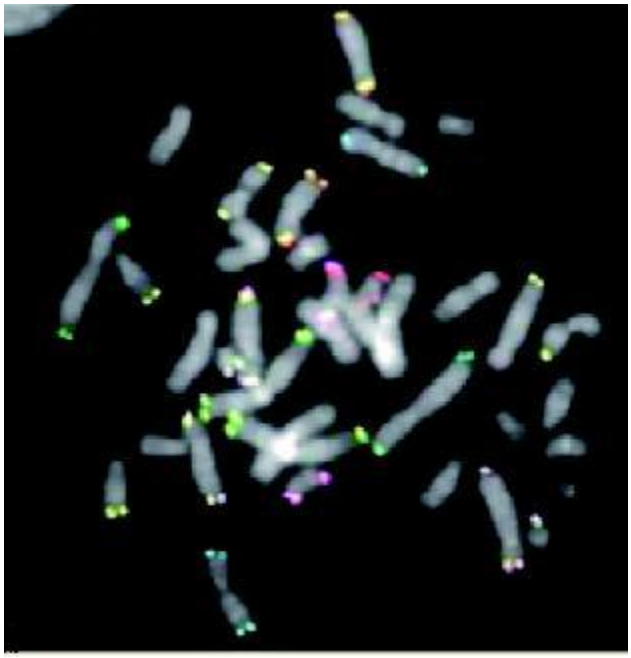


Figure 34: hybridation de 12 sondes spécifiques des régions subtélomériques de 12 chromosomes

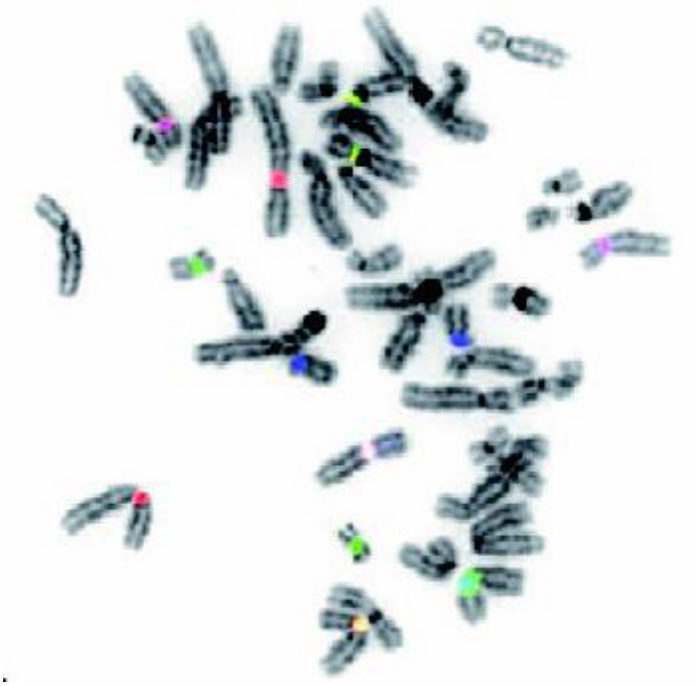


Figure 35: Hybridation d'un des lots du système M-centromère

4. Dénaturation / Hybridation

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

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

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

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

5. Visualisation et analyse des hybrides

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

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

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

6. Nomenclature

Du fait de la pratique actuelle courante de la FISH et son implication dans

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

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

Quelques exemples de nomenclature :

- Quand le caryotype a été fait, .ish suit la formule.
- Quand il y a plusieurs anomalies, la formule FISH est tout à la fin après le nombre de mitoses étudiés et non plus après l'anomalie étudiée.

- Si le caryotype n'a pas été fait, on écrit directement ish.
- Quand la FISH est faite sur les noyaux, on met nuc devant ish.
- Quand la FISH est faite sur métaphases et noyaux, les 2 formules doivent être écrites sur des lignes différentes :

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

nucish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[50]

7. les paramètres influençant la FISH

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

7.1. La taille et la nature de la sonde

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

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

7.2. La concentration de la sonde

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

7.3. La température de fusion « Tm »

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

7.4. La température et la durée d'incubation

La température d'incubation détermine la vitesse de réassociation des séquences complémentaires de l'ADN de la sonde avec la cible. Ce paramètre est très dépendant de la Tm.

7.5. Le pH du milieu

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

7.6. Les lavages post hybridation

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

7.7. Le contenu de l'hybride en CG

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

8. Les indications de la FISH

- EN POSTNATAL

1. Caractérisation d'un remaniement de novo et/ou complexe faisant intervenir plusieurs chromosomes
2. Précision des points de cassure d'une anomalie de structure révélée par caryotype standard
3. Diagnostic des microremaniements (microdélétion, microduplications,…..)

4. Déterminations de l'origine des marqueurs chromosomiques
5. Etude des translocations cryptiques et semi-cryptiques
6. La recherche des remaniements subtélomériques (surtout en cas de retard mental)
7. Evaluation et exploration d'un mosaïcisme
8. Explorations d'anomalies de nombre ou de structure des gonosomes (nombre des chromosomes X, présence du chromosome Y chez la femme,…)

- EN PRENATAL ET PREIMPLANTATOIRE

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

- Recherche d'une aneuploïdie : de routine pour les chromosomes 13,18, 21, X et Y
- Recherche des microdélétions
- Détermination du sexe (maladies récessives liées à l'X)
- EN HEMATOLOGIE
- Détection des aneuploïdies et leur origine vu leur fréquence dans les hémopathies malignes avec évaluation du mosaïcisme.

Ex : trisomie 12 dans la leucémie lymphoïde chronique, trisomie 8 dans la leucémie aigue myéloïde et les syndromes myélodysplasiques, monosomie 7 dans les syndromes myélodysplasiques.

- Caractérisation des anomalies complexes : devant un caryotype complexe, le recours aux techniques de peinture chromosomique et l'usage des sondes centromériques permet l'identification des chromosomes impliqués dans les remaniements structuraux ainsi que l'origine des chromosomes transloqués.

- Détection des anomalies spécifiques ; Ex : t(9;22) dans la leucémie myéloïde chronique surtout si elle est cryptique.
- Suivi du chimérisme post greffe de la moelle osseuse : après greffe de la moelle allogénique avec mismatch de sexe (donneur et receveur de sexe différent), le suivi par FISH (sondes spécifiques pour les chromosomes X et Y) est parfaitement adapté pour évaluer le degré de chimérisme et l'identification précoce des rechutes.
- EN ONCOGENETIQUE TISSULAIRE
- Au niveau des tumeurs solides, il existe souvent des remaniements complexes : gains, pertes de chromosomes entiers ou partiellement, délétions ou amplifications chromosomiques. La FISH est un moyen adapté pour le diagnostic et le suivi de l'évolution spontanée ou sous traitement de ces anomalies découvertes.

9. les limites de la FISH

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

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

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

10. Les dérivés de la FISH

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

10.1. La FISH multicouleurs

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

10.2. La FISH multicouleurs spécifique des bras chromosomiques(arm-specificmulticolour FISH ou armFISH)

Elle dérive de la FISH multi couleurs

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

10.3. Le bandingmulticouleurs (M-Band ou MCB ou m-banding)

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

10.4. Le bandingmulticouleur multiple(Multitude MCB)

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

10.5. La FISH 24 couleurs spécifique des centromères(cenM-FISH)

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

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

10.6. La FISH 24 couleurs subcentromérique

(subcenM-FISH) Starke et al. Ont développé cette technique en utilisant un ensemble de sondes

BacterialArtificial Chromosomes (BACs) et YeastArtificial Chromosomes (YACs), localisées dans la région péricentromérique de chaque chromosome. Cette une méthode concurrente des précédentes pour l'étude des aberrations subtélomériques surtout en cas de retard mental.

10.7. L'acroM-FISH

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

III. HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE

La CGH array

Compte tenu des limites de résolution de la CGH (5-10 Mb), tous les microremaniements ne peuvent être détectés par cette technique. Ceci est en particulier le cas pour les syndromes microdélétionnels connus qui sont générés par des microremaniements génomiques de l'ordre de1-5 Mb.

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

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

- PRINCIPE :

A la fin des années 90, ces auteurs démontrent qu'il est possible d'effectuer une CGH sur des fragments d'ADN fixés sur des lames de verre. Très rapidement,

avec le séquençage du génome, il fut possible de fixer sur ces lames, des séquences génomiques, appelées ≪sondes ≫, représentant une partie plus ou moins importante du génome. Ces lames furent appelées ≪puce à ADN ≫ou microarray. (Figure 36)



Figure 36 : Puce à ADN

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

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

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

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

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

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

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

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

Ces données ont été reprises au sein de banques de données que l'on peut consulter sur internet. Il est ainsi possible, en se connectant sur le site de l'université de Californie (http://genome.ucsc.edu/) ou du Sanger Institute (http://www.ensembl.org/), de connaître la séquence nucléotidique d'une région donnée du génome ainsi que son contenu en gènes. [30][33]

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

La CGH array permet la détection de déséquilibres chromosomiques dont la taille varie avec la résolution de la puce utilisée. Parce que la CGH est une comparaison de nombre de molécules d'ADN d'un individu par rapport à un autre,

un déséquilibre génomique de plus de 1 kb détecté par cette technique a été appelé CNV pour « Copy Number Variant » ou en français « Variation de Nombre de Copies ». [28][34]

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS :

1. Nature de l'étude :

Etude rétrospective s'étendant sur une période de 28 mois allant du septembre 2009 a janvier 2012 au sein du service de génétique du CHU HASSAN II de FES.

2. La population de l'étude :

Tous les patients ayant bénéficié d'une consultation au sein du service de génétique durant cette période.

3. ANALYSE STATISTIQUE :

L'ensemble des données étaient saisie sur une base de données sur Excel et analysé à l'aide du logiciel SPSS V20.



II. METHODES :

Une fiche d'exploitation réalisée à cet effet a permis le recueil des différentes données épidémiologiques, cliniques, paracliniques, et évolutives, afin de comparer nos résultats avec ceux de la littérature. Nous avons procédé à une recherche bibliographique au moyen du Médline, l'analyse de thèses et l'étude des ouvrages de génétique médicale disponibles aux facultés de médecine et de pharmacie de Fès et de Rabat.

FICHE D'EXPLOITATION :

N° de fiche :

N° du dossier :

NOM :

PRENOM :

AGE A LA CONSULTATION :

SEXE :

MASCULIN ☐ FEMININ ☐ INDETERMINE ☐

Origine :

COUVERTURE SOCIALE :

MOTIF DE CONSULTATION :……

SERVICE DE REFERENCE :……

CONSANGUINITE :

OUI ☐ NON ☐

Cas sporadique/familial :

Cas sporadique ☐ cas familial ☐

GROSSESSE :

NORMAL ☐ ANORMAL ☐ …….

ACCOUCHEMENT :

VB ☐ VH ☐

Période néonatale :

NORMAL ☐ ANORMAL☐ …….

DPM :

NORMAL☐ RPM☐

RETARD PONDERAL :

OUI☐ NON☐

RETARD STATURAL :

OUI☐ NON☐

RPC :

OUI ☐ NON☐

DYSMORPHIE :

OUI ☐ NON☐

ANOMALIE FACIALE :

OUI ☐ NON☐

ANOMALIE DU TRONC :

OUI ☐ NON☐

ANOMALIE DES EXTREMITES :

OUI☐ NON☐

AMBIGUITE SEXUELLE :

OUI☐ NON☐

CARYOTYPE :

NORMAL ☐ ANORMAL☐ ……

SI ANORMAL :

ANOMALIE DE STRUCTURE ☐ ANOMALIE DE NOMBRE☐

CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE :

NORMAL ☐ ANORMAL☐ ……

RESULTATS

I. Données épidémiologique :

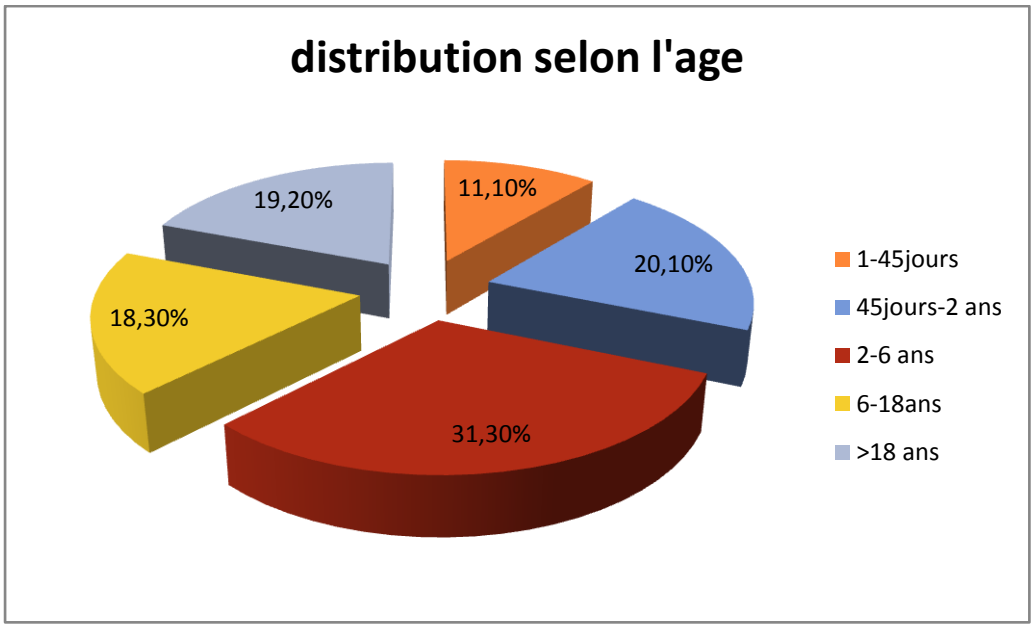
1.AGE :

Nos patients (N=568) étaient dans la majorité des cas des enfants avec un minimum d'âge de 1 jour, un maximum de 53ans.

Une distribution selon des tranches d'âge émane du fait que chaque catégorie qu'on a distingué présente des particularités qui peuvent influencer la prise en charge.

Tableau1 : répartition de la population selon les tranches d'âge

Age	Nombre de malade	pourcentage
1-45 jours	63	11,1%%
45jours-2 ans	114	20,1%%
2-6ans	178	31,3%
6-17ans	104	18,3%
>18ans	109	19,2%
TOTAL	568	100%

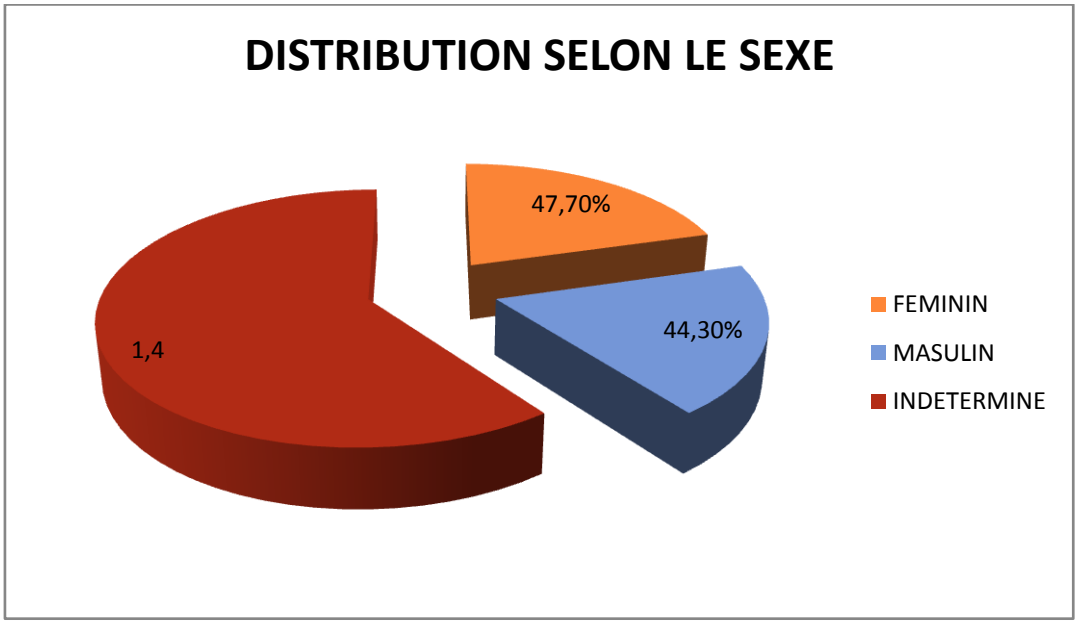


2.SEXE :



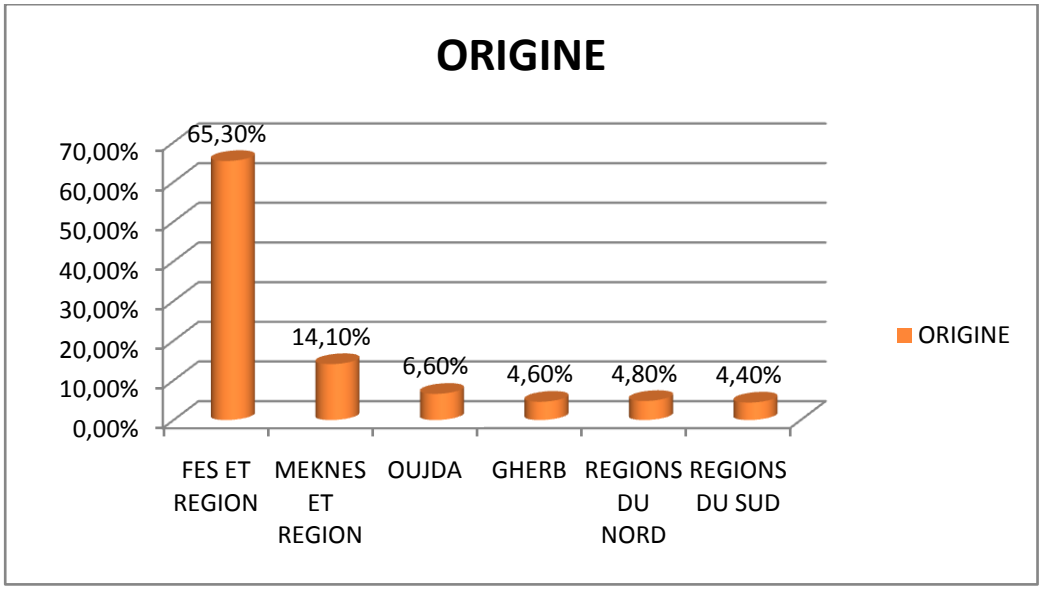
Dans notre étude on note une légère prédominance masculine avec un pourcentage non négligeable de sexe indéterminés.

SEXE	NOMBRE DE PATIENT	POURCENTAGE
MASCULIN	271	47,7%
FEMININ	252	44,3%
INDETERMINE	45	8%
TOTAL	568	100%



3.ORIGINE :

Les malades qu'on a recrutés habitaient FES dans 65,30% des cas. En plus, on draine également et essentiellement des malades de la région de MEKNES.



4. COUVERTURE SOCIALE :



Uniquement 30 % de nos patients bénéficiaient d'une couverture médicale, le reste des malades utilisaient un certificat d'indigence qui prend en charge uniquement le patient au cours de son hospitalisation, après sa sortie la prise en charge médicale (bilans, consultations, traitements) est au dépend du malade lui-même.

Ce graphique décrit les différentes assurances auxquelles nos malades sont affiliés.

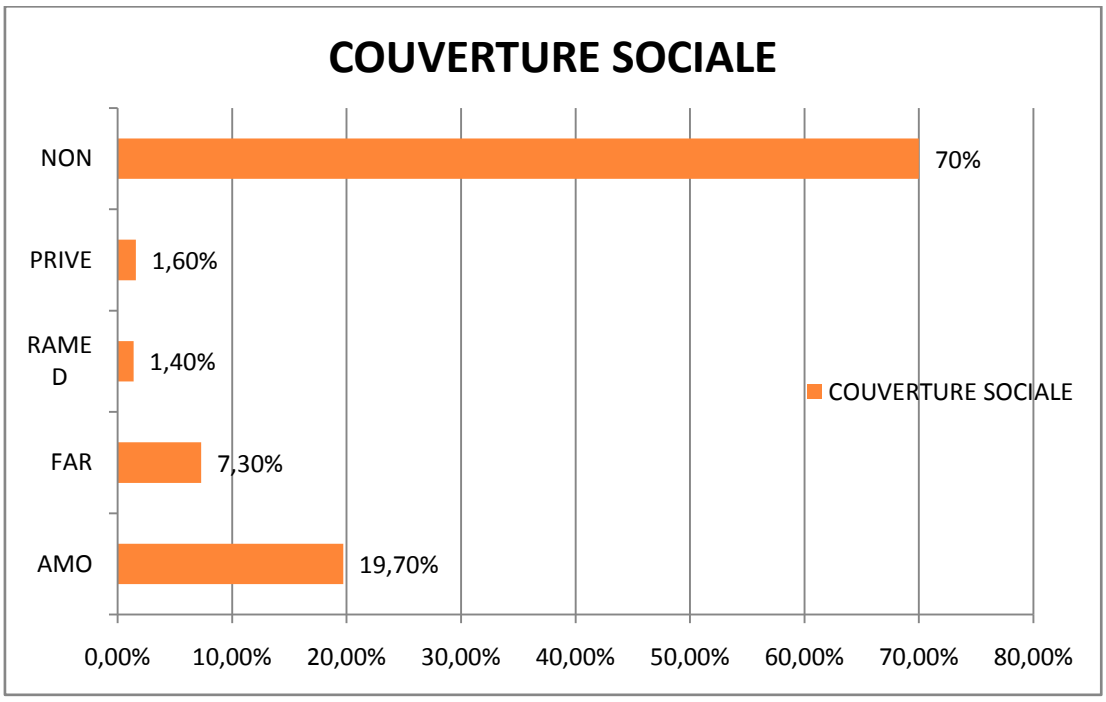


Figure 1

5. DIFFICULTE D'ACCES :

On a recueilli chez nos patients les difficultés d'accès à la consultation. Les causes citées étaient en premier lieu le coût du déplacement et même la difficulté de trouver un moyen de transport surtout pour les malades qui habitent les environs de FES. Puis en second lieu, l'éloignement du centre hospitalier de l'habitat de certains patients qu'on recrute qui vivent dans d'autres villes et même des malades qui résident à Fès.

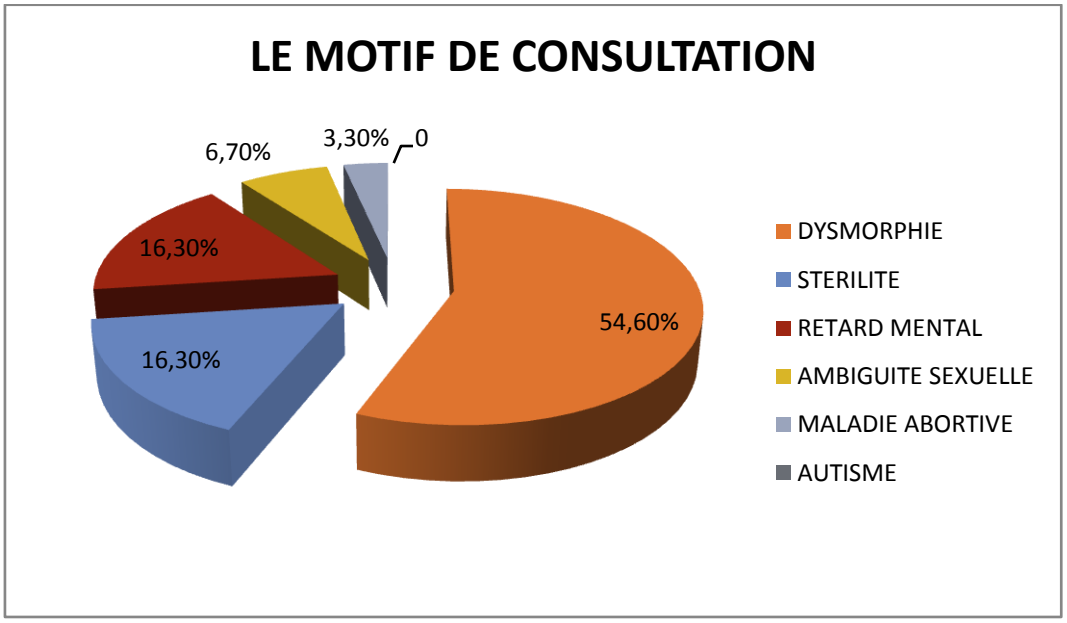


6. MOTIFS DE CONSULTATION :

Dans ce tableau sont listés, les différents motifs de consultation des patients qu'on a recrutés et qu'on a regroupés par catégories pour faciliter l'analyse.

Les motifs de consultations les plus retrouvés sont les dysmorphies, les retards mentaux et la stérilité.

Motifs de consultation	Nombre de patients	POURCENTAGE
Dysmorphie	310	54,6%
Stérilité	93	16,3%
Retard mental	93	16,3%
Ambiguïté sexuelle	38	6,7%
Maladie abortive	18	3,3%
Autisme	16	2,8%
total	568	



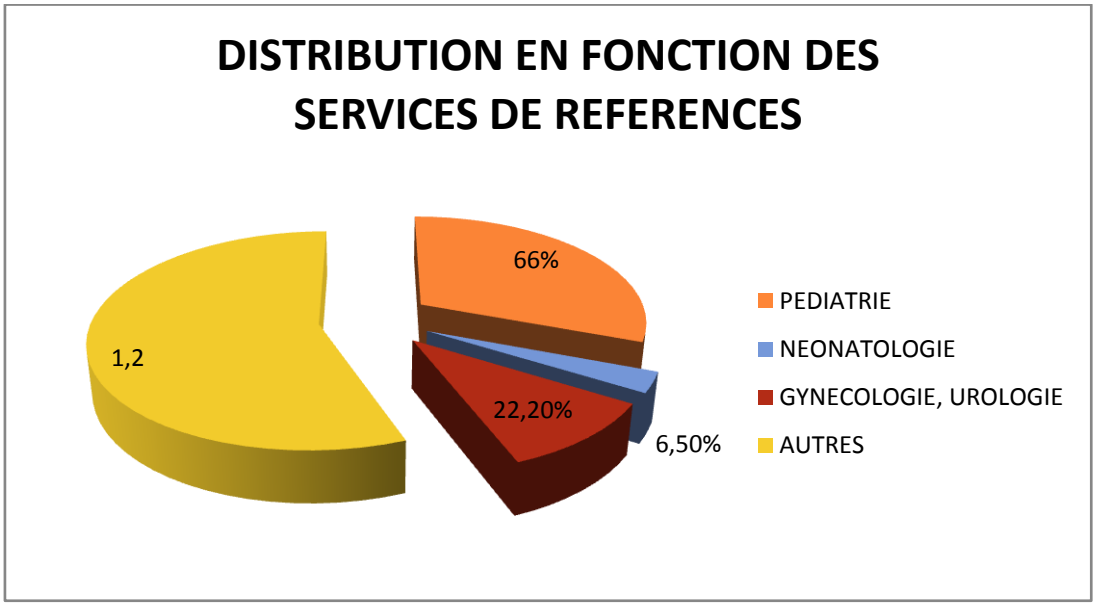
7.SERVICES DE REFERENCES :

Les malades inclus dans notre étude étaient référé de différents services du CHU HASSAN II de FES, d'autres centres hospitaliers des différentes régions et également de certains médecins privés.

Le tableau suivant expose les différents services de références des patients.

Les services qui nous referaient le plus de patients étaient la pédiatrie, la néonatologie et la chirurgie pédiatrique, le reste des patients étaient référés de la gynécologie, l'urologie et bien d'autres services comme l'endocrinologie.

Services de références	Nombres de patients	pourcentage
Pédiatrie	375	66%
néonatologie	37	6,5%
Gynécologie, urologie	126	22,2%
Autres	30	5,3%
total	568	100%

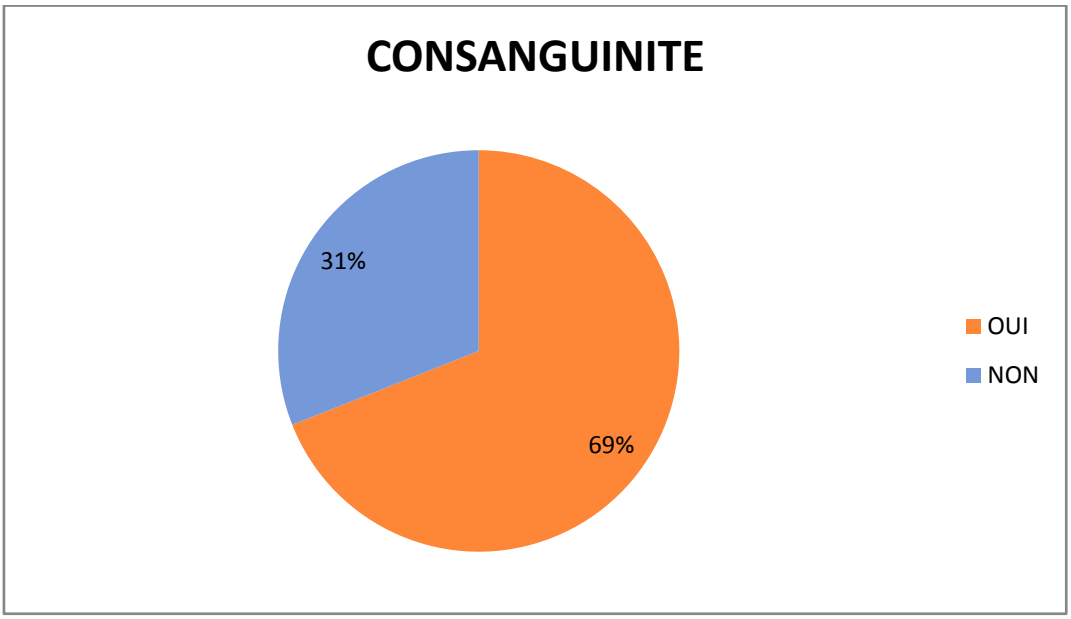


8. CONSANGUINITE :

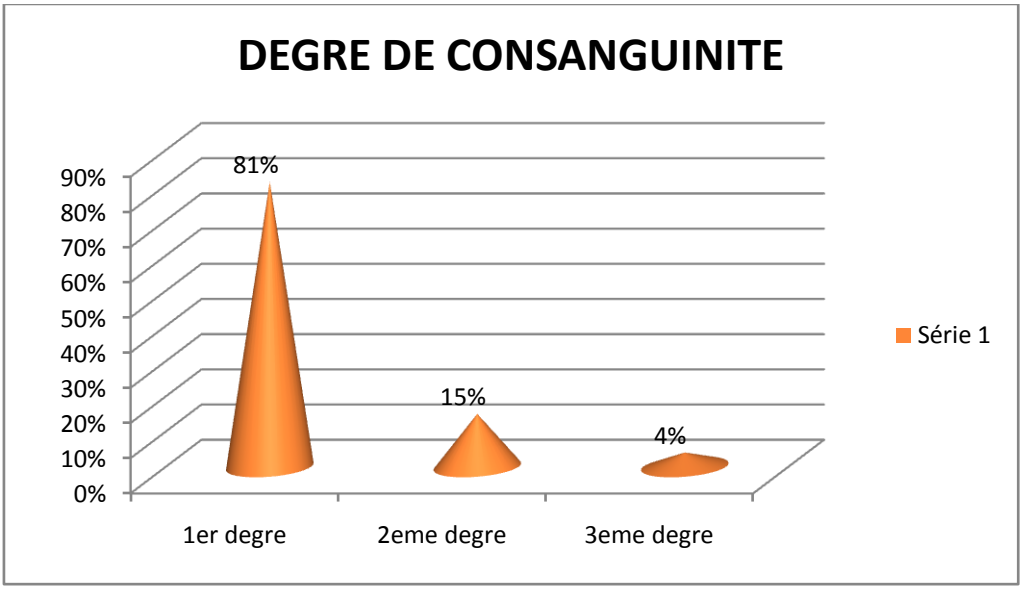
La consanguinité est un paramètre très important dans les maladies génétiques et constitue une maille primordiale dans la prise en charge des patients.

Ce graphique démontre la notion de consanguinité chez les différents patients.

La majorité des patients étaient issu d'un mariage consanguin



Ce graphique présente les différents degrés de consanguinité chez les patients issus d'un mariage consanguin.



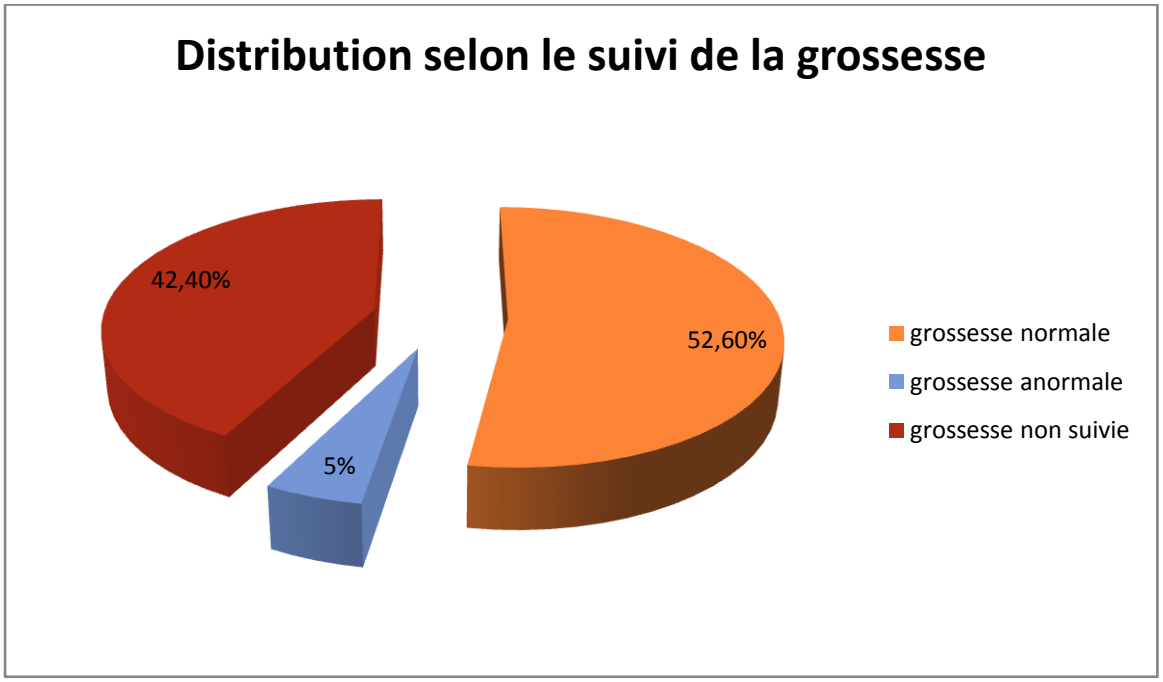
9.SUIVI DE LA GROSSESSE :

Le suivi de la grossesse constitue une étape très importante dans le diagnostic prénatale de certaines maladies génétiques par l'intermédiaire de diagnostic pré natal. Seulement une grande partie de nos patients découlaient de grossesses non suivies.

Le tableau suivant présente les différentes grossesses.

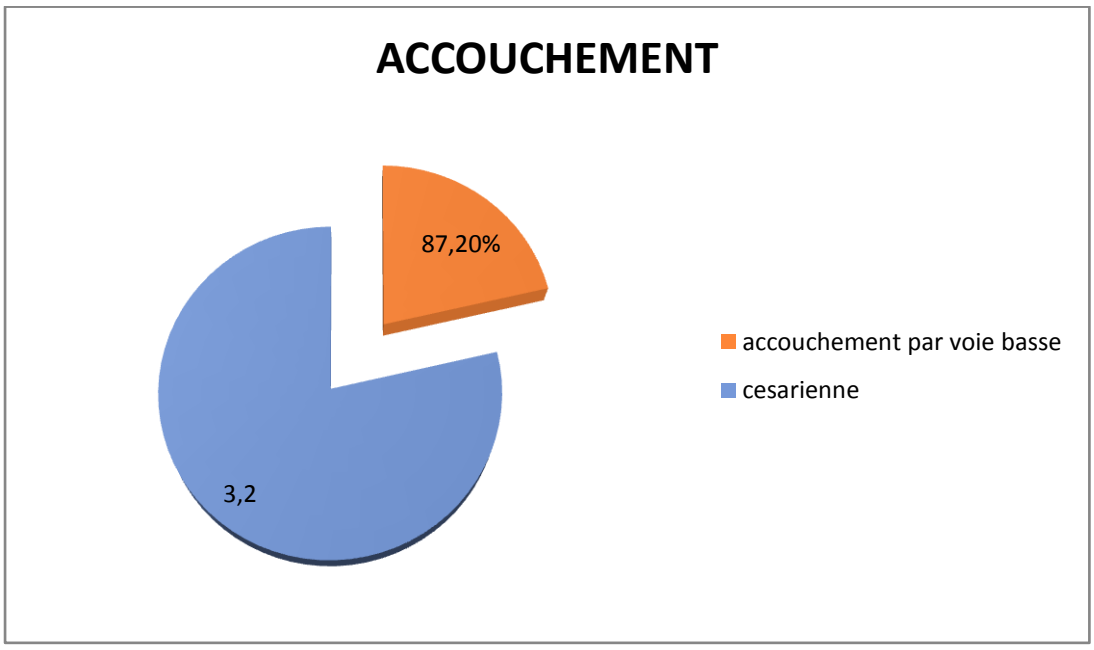
Grossesse	Nombre de patients	pourcentage
Normal	299	52,6%
Anormal	28	5%
Non suivie	241	42,4%
TOTAL	568	100%

La plus part des patients étaient issu d'une grossesse de déroulement normal toutefois certains patients étaient issu de grossesse a risque notamment des preeclampsie, diabète gestationnel, MAP, …..



10. ACCOUCHEMENT :

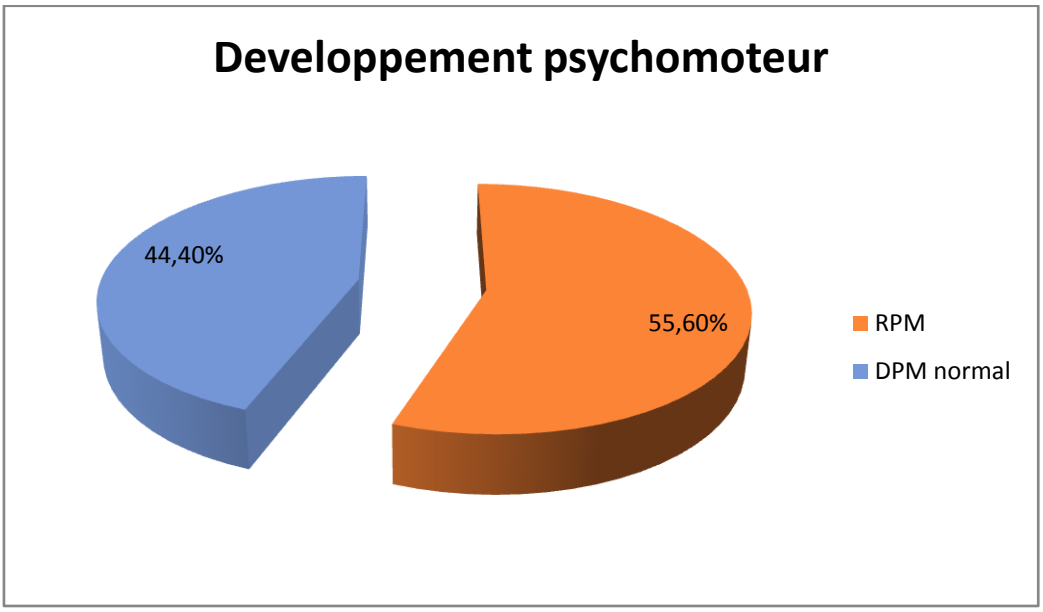
L'accouchement de nos patients était dans une grande partie par voie basse non dystocique avec un pourcentage non négligeable d'accouchement par césarienne.



11. EXAMEN CLINIQUE :

- Développement psychomoteur :

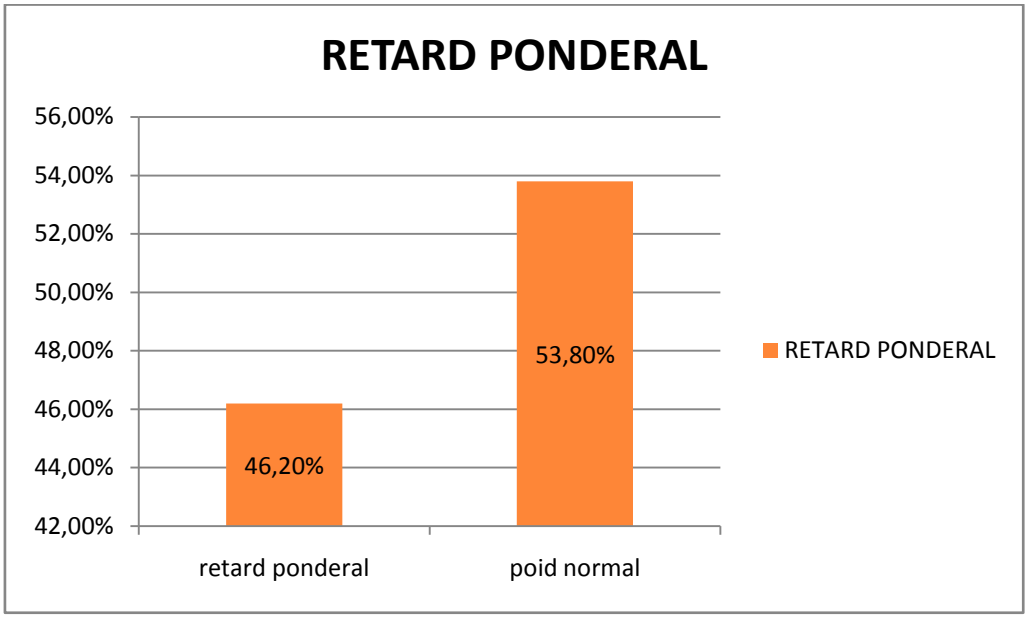
Environs la moitie de nos patients avaient un retard psycho moteur qui se manifestait par l'hypotonie, l'hyper réactivité, spasticité, retard de langage,….



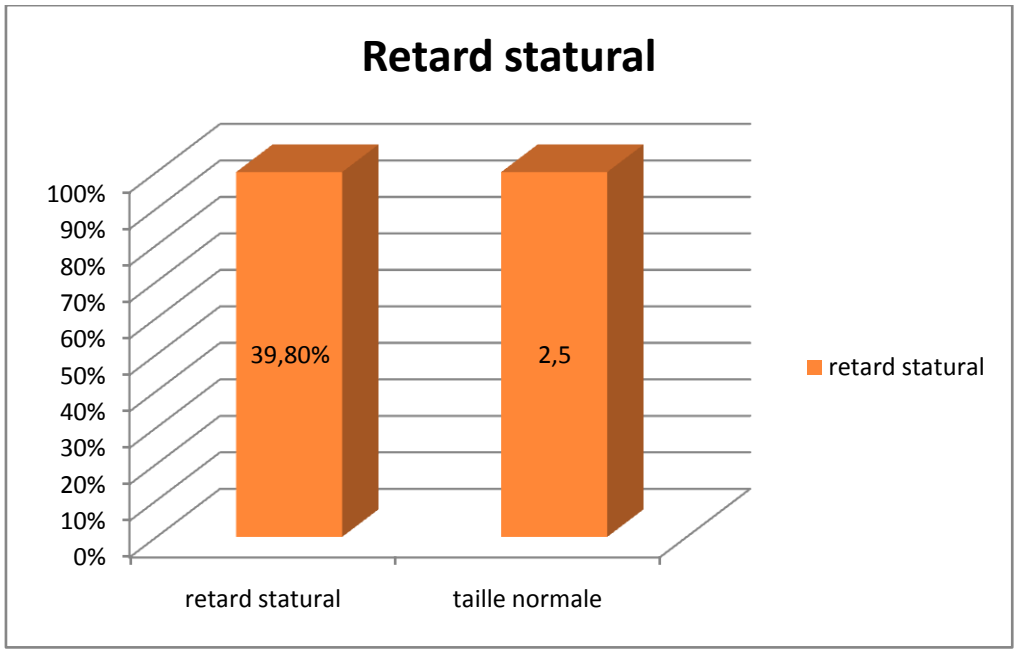
- RETARD PONDERAL :

Le retard staturo-pondéral est une manifestation clinique présente chez la plupart des patients présentant différents symptômes.

Les graphiques suivant décrivent la distribution des patients en fonction du retard statural et le retard pondéral



- Retard statural :

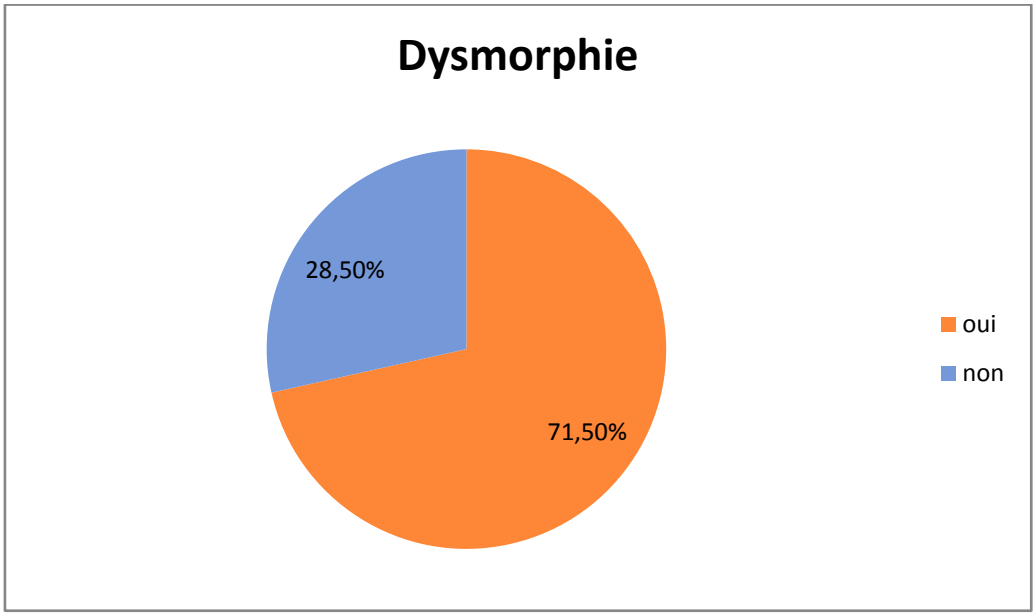


- DYSMORPHIE :

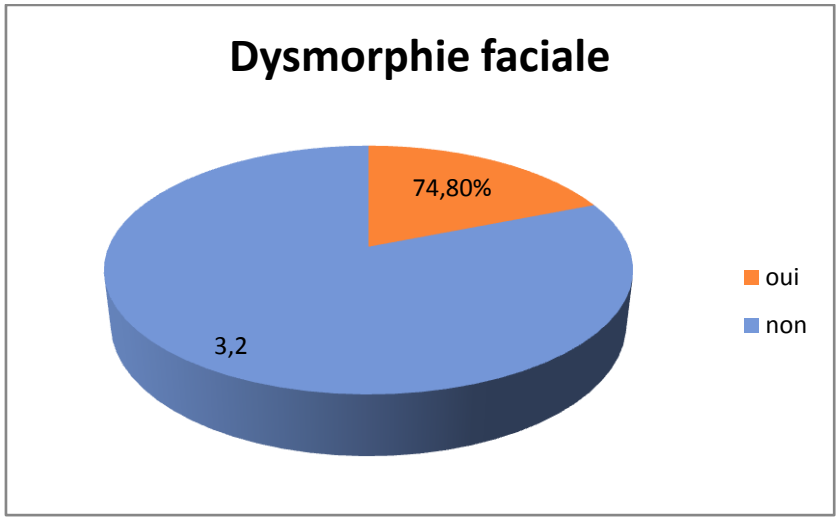
L'objet de la majorité des consultations était les dysmorphies qui constituent une manifestation clinique majeur dans la majorité des maladies génétiques.

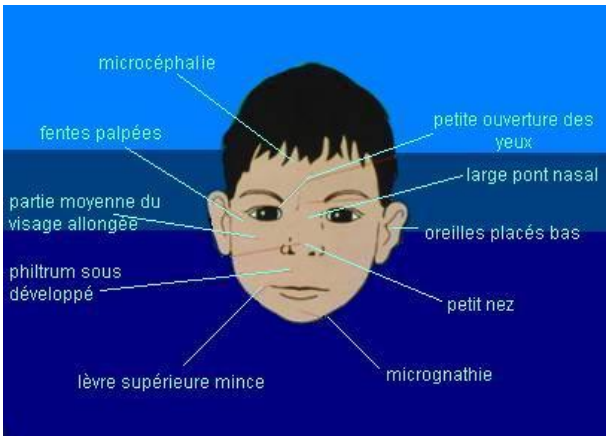
Cette dysmorphie peut se manifester au niveau des différentes parties du corps : face, tronc, extrémités, ……

Les graphiques suivant présentent la répartition des patients en fonction des dysmorphies.

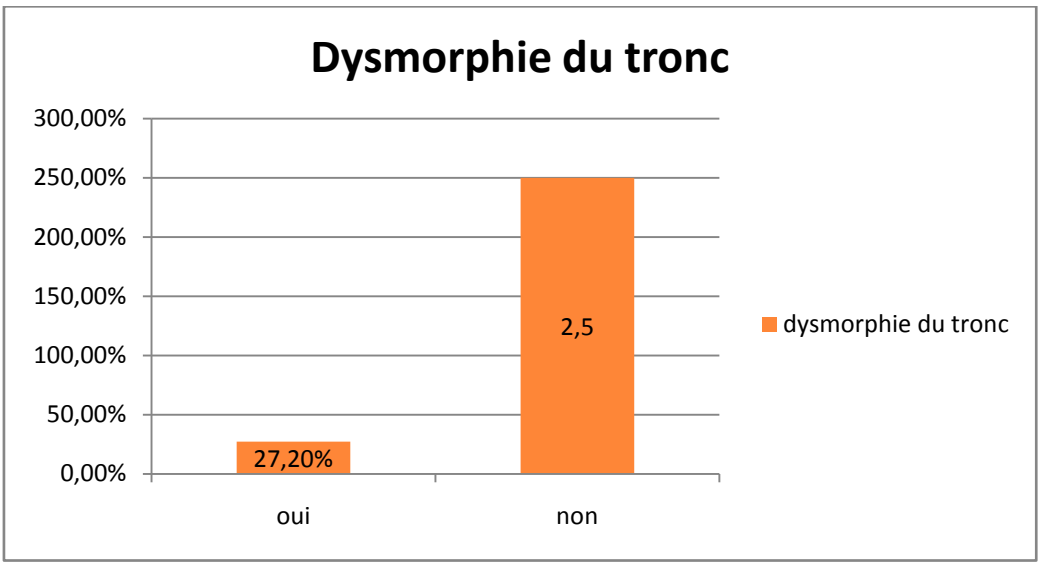


- Dysmorphie faciale :

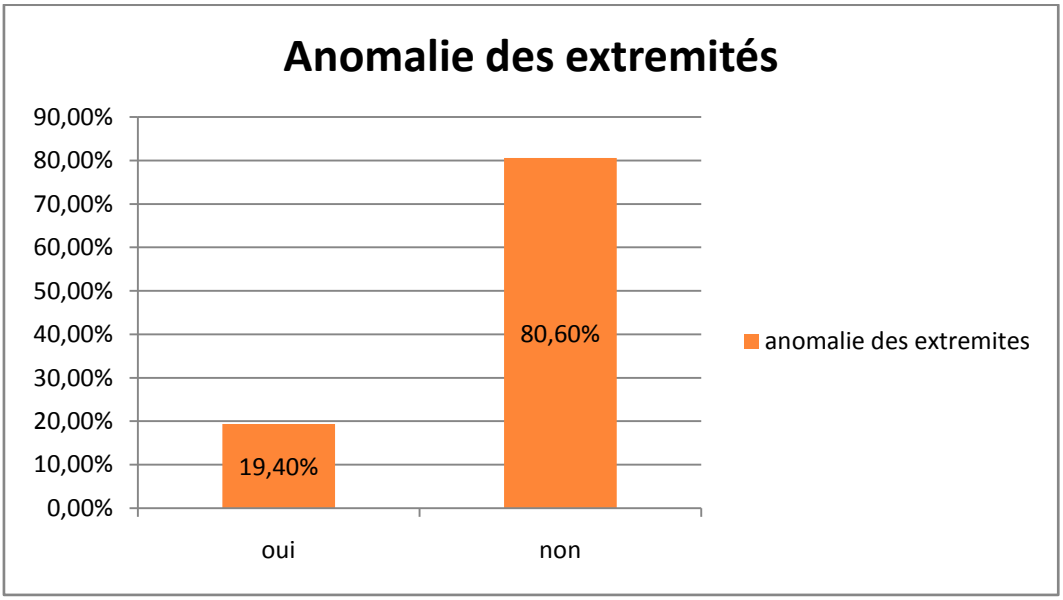




- Dysmorphie du tronc :



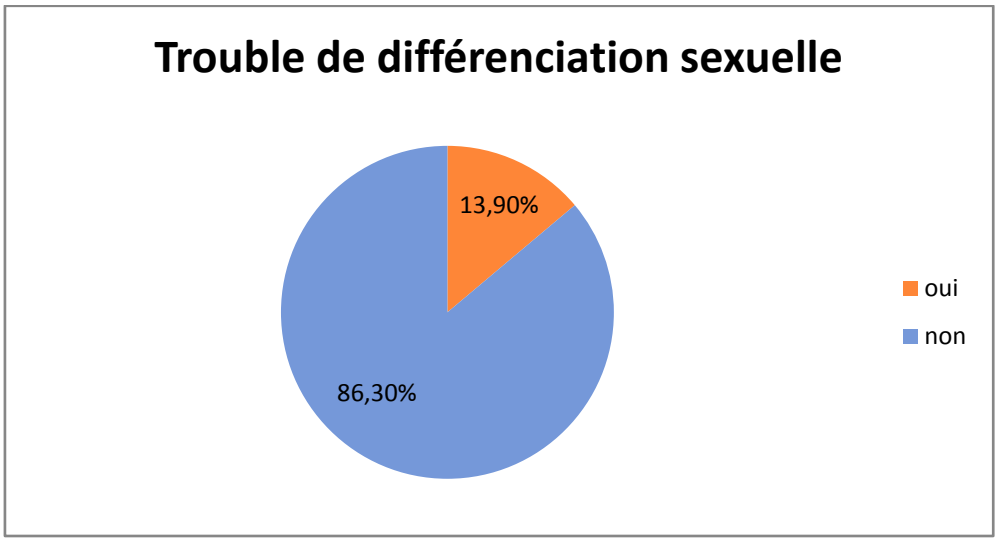
- Anomalies des extrémités:



- **Trouble de différentiation sexuelle :**

Parmi les motifs de consultation les plus fréquents qu'on rencontrait aux consultations étaient les ambiguïtés sexuelles.

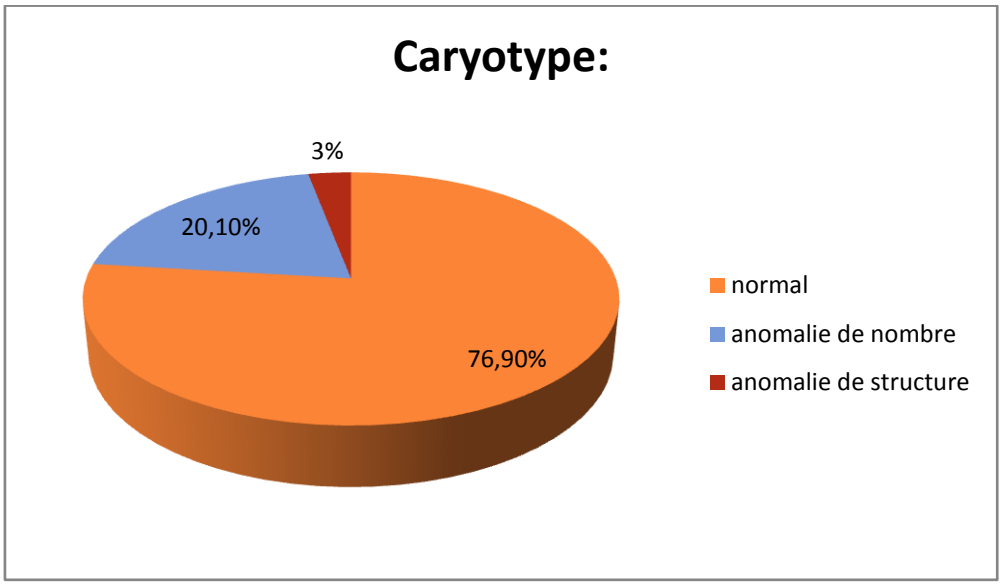
Ce graphique représente la distribution des patients en fonction de la présence ou non de l'ambiguïté sexuelle.



12. CARYOTYPE :

L'examen paraclinique fondamental de première intention à faire devant toute manifestation clinique évoquant une anomalie génétique afin de préciser celle-ci.

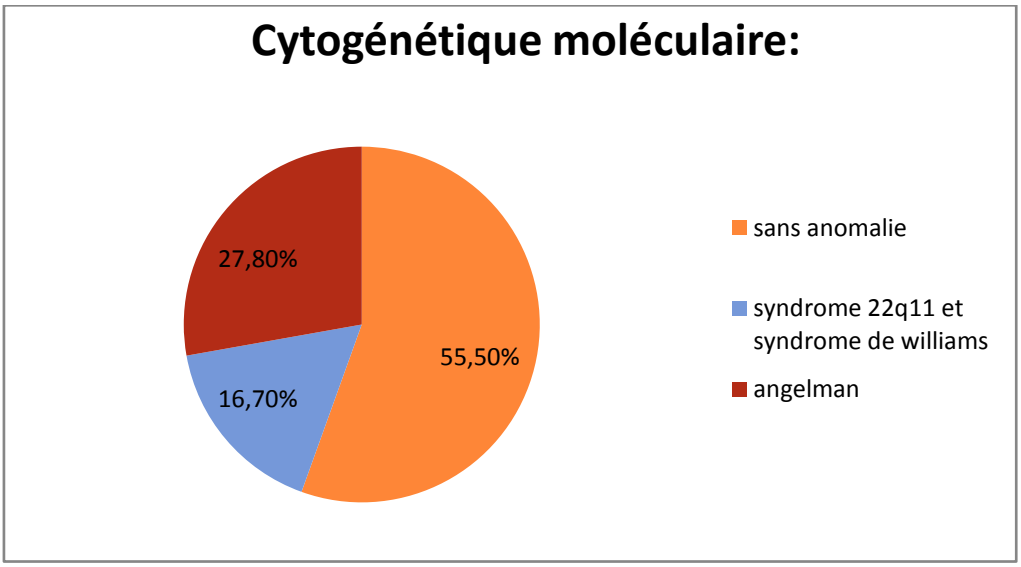
Plus de 70% des caryotypes réalisés étaient normaux.



13. CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE :

La technique de cytogénétique utilise dans notre service est la FISH. (hybridation in situ en fluorescence).

Environs la moitié de nos patients ne présentaient aucune anomalie génétique, le reste présentait différentes maladies dominées par le syndrome de williams et 22q11.



DISCUSSION :



Dans notre série, nous avons pu diagnostiquer 131 patients soit un taux d'anomalies chromosomiques de 23,1%sur un total de 568 cas. des fréquences similaire sont été signalés auparavant dans d'autres études, 31,7%(Al-Awadiet al.,1985), 29,3%(Duarte et al., 2004), 28,6% (Stanoset al., 2000), et28,3%(Goudet al., 2005), bien que d'autres taux inférieurs au notre ont été rapportés 21% (Aboussair et al.2012), 17,5% (Kim et al., 1999) et3,8% (Kumar, et al.2001).

Cette large variation de fréquence des aberrations chromosomiques (tableau1) (Singh, 1977; VermaetDosik, 1980;Navsariaet al, 1993. Mokhtar, 1997;Kimet al.1999; Duarteet al., 2004; Goudet al., 2005; Balkanset al., 2010)pourrait refléter des variations dans les critères d'inclusion et les indications du caryotype postnatal constitutionnel et des méthodes de cytogénétique utilisées.

Tableau I : Comparaison de la fréquence des anomalies chromosomiques de notre série avec d'autres études similaires

Autres etudes	Pays	nombre des patients	% des anomalies chromosomiques trouvées.
Aboussair et al.	Maroc	5572	27%
Mokhtar (1997)	Egypte	137	38.7%
Verma and Dosik (1980)	Etats unis	357	27.2%
Singh (1977)	Etats unis	451	28.8%
Duarte et al. (2004)	Brésil	916	29.3%
Navsania (1993)	Etats unis	1000	16.6%
Goudet al. (2005)	Sultanat d'oman	1800	28.3%
Kim et al. (1999)	Corée	4117	17.5%
Balkan et al. (2010)	Turquie	4216	32.2%
Notre étude	Maroc	568	23,1%

Dans les séries de cytogénétique de patients référés pour des anomalies phénotypiques (dysmorphie, retard mental, trouble de différenciation sexuelle, retard statural…), les anomalies autosomiques (notre série : 22,13%) sont beaucoup plus fréquentes que ceux des anomalies des gonosomes (3,95%), ce pourcentage est en accord avec d'autres séries. Cette constatation est principalement due au fait qu'un gonosome déséquilibre (chromosome X et/ou Y) a un effet phénotypique plus explicite que les aneuploïdies autosomiques (chromosome 1 au chromosome 22) (Mokhtar, 1997).

Le syndrome de Down représente les premières anomalies chromosomiques dans notre série avec prédominance à 59,4 %

Ce pourcentage est similaire à celui des autres séries (Mokhtar, 1997).(ANNEXE III).

Ceci pourrait être attribué au diagnostic clinique facile. Seul1,42% du syndrome de Down dans notre étude avait une mosaïque.

Nous avons trouvé deux cas avec double trisomie en mosaïque impliquant le chromosome 21et un gonosome. Le premier a une double trisomie, Down-Klinefelter mos 47, XY, +21[9]/48, XYY, +21[13.] et le second patient avait une mosaïque : mos47, XY, +21[15]/48, XXY, +21[7]). L'occurrence de deux anomalies chromosomiques numériques chez le même individu(le double aneuploïdie) est relativement rare et la présentation clinique est variable en fonction de l'aneuploïdie prédominante ou l'effet de combinaison des deux (Zakiet coll., 2005) (Ratbiet al. 2006).

Les Trisomie 18(14 cas) et la trisomie13 (4 cas) ont constitué la deuxième et le troisième groupe de trisomie dans notre étude3 ,6%. (ANNEXES I).
Le syndrome de Turner est une anomalie chromosomique du chromosome X totale ou partielle. Elle touche une sur2500 naissances vivantes de sexe féminin. Notre étude a montré que la monosomie homogène45, X était la plus fréquente (16 cas). (ANNEXE V)

D'autres anomalies ont été soit en mosaïques soit des anomalies structurelles de X, y compris l'iso chromosome à bras long (4 cas), délétion a bras court(2 cas), délétion a bras long(1 cas), et le chromosome X en anneau(3 cas).

Ces résultats sont conformes à ceux rapportés dans des études similaires (SybertetMcCauley, 2004).

Nous avons identifié des translocations pour une fréquence de3,1%, ce pourcentage est similaire à l'étude réalisée au Sultanat d'Oman (Goudet al.,2005)et inferieur à d'autres séries (Wright et al, 1967;Mikkelsenet al., 1990; Mokhtar, 1997.

Pour les anomalies chromosomiques autosomiques de structure, la translocation (22 cas dont 6 équilibrées et 16 non équilibrées) comprenant des translocations réciproques (8 cas) et robertsoniennes 14 cas (ANNEXE II). Puis par ordre de fréquence : les instabilités chromosomiques (8 cas), l'iso chromosome (4

cas) et un 5p-(1), marqueur chromosomique (1 cas) (ANNEXE II) et chromosome en anneau (2 cas).

L'identification d'une anomalie de structure contribue non seulement dans le diagnostic et le conseil génétique mais aussi dans la cartographie des gènes, comme le cas rapporté dans une Famille marocaine avec une translocation équilibré t(3, 10) (p24; q32) co-ségrégation avec microcéphalie autosomique récessive, micropolygyrie, et agénésie du corps calleux(Baalaet al., 2007).

En outre, certaines anomalies chromosomiques ont un intérêt scientifique comme dans le cas de fécondité inattendue chez un homme marocain avec der(22, 22) (q10; 10q), qui a permis l'identification d'un nouveau cas de disomie uniparentale paternelle 22(Ouldimet al.2004). [51]

Les chromosomes surnuméraires (SMC :supernumerary marker chromosome) sont connus pour être les provenant du chromosome15, sous la forme d'invdup(15)(inversion duplication), constituant environ la moitié des cas dans les populations étudiées (Bucktonet al, 1985;. Wooet al.2003, Ouldim et al 2007. [51]

Outre l'identification de chromosomes marqueurs, la corrélation clinique, l'étude des parents, et bien d'autres moyens sont importants pour le conseil génétique chez les patients porteurs d'un marqueur chromosomique (Samri et al 2013).[69]

Dans cette série quatre marqueurs chromosomiques (de novo) ont été retrouvés mais sans pouvoir identifier leurs origines.

Cette étude indique également que le caryotype joue encore un rôle important dans l'identification du sexe des nourrissons atteints de trouble de différenciation sexuelle.

La combinaison de haute résolution des bandes de pro métaphase et la FISH, ont montré qu'un nombre croissant de syndromes est due à des micro délétions.

Certaines de ces micro délétions sont impliquées dans la perte de seulement quelques gènes étroitement adjacent à des loci, résultant de ce qui est connu en tant que syndromes de gènes contigus (Mueller etYoung,1995). Dans cette étude, nous avons trouvé 7 cas de syndrome deWilliamset5 cas de syndrome de la délétion 22q11.

ANOMALIES CHROMOSOMIQUES SEXUELLES CHEZ LES PATIENTS REFERES POUR ANALYSE CYTOGENETIQUE :

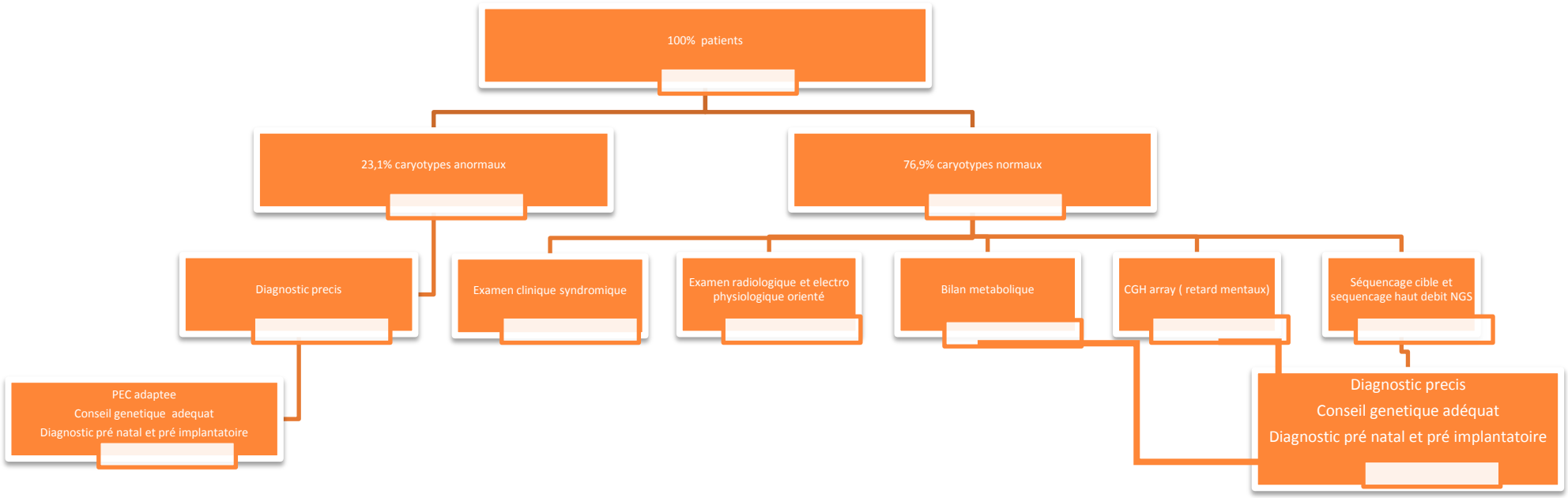
Caryotype	Nombre de cas	pourcentage
Syndrome de Turner	54	9 ,5
Homogène 45,X	23	
i(Xq)	15	
45,XMosaique	13	
r(X)	2	
Xp-	0	
Xq-	1	
Syndrome de Klinfelter	41	7,2
47,XXY	38	
Mosaique	2	
48,XXXY	1	
49,XXXXY	0	
Trouble de différenciation sexuelle	62	10,9
masculin 46,XX	33	
Féminin 46,XY	31	
mosaicisme (46,XX/46,XY)	2	0.35
X Fragile syndrome	0	0
47,XYY	2	0.35
47,XXX	2	0.35
48,XXXX	0	0
Xp+	1	0.17
r(Y)	0	0
Total	166	29 ,2

Dans notre étude, sur 568 cas, environs 77% des patients référés pour exploration chromosomique avaient des caryotypes tout a faits normaux. Ces résultats qui concordent avec d'autres études (Aboussair et al.,Vermaetal and

Dosik) devraient mettre en question la prise en charge de ces patients passant par un examen clinique syndromique , des examens radiologiques et électro physiologiques et un bilan métabolique.

L'exploration cytogénétique ne vient qu'à la fin de cet arsenal diagnostic, grâce à la CGH array en matière de retard mentaux syndromiques mais également grâce aux techniques de séquençage ciblé et séquençage à haut débit (NGS) pour établir un diagnostic génétique précis, un conseil génétique et même identifier les différentes mutations sur tout un génome.

SITUATION DE LA CYTOGENETIQUE POST NATAL AU LABORATOIRE DE GENETIQUE MEDICALE AU CHU HASSAN II DE FES



CONCLUSION :



Le résultat de notre étude rejoint la littérature internationale mettant les anomalies chromosomiques de nombre en première position suivies des anomalies de structure permettant de poser le diagnostic précis et un conseil génétique adéquat dans 23,1%. Cependant, 76,9% des caryotypes normaux nécéssitent d'autres moyens d'exploration .En premiere intention la CGH array et particulièrement les retards mentaux syndromiques et lestroubles d'envahissement du developpement. En deuxième intention, une recherche syndromologique poussée clinique, radiologique et biochimique qui permettera de nous orienter vers une exploration moléculaire en l'occurence le séquencage à haut débit ,qui est actuellement accessible pour les pays developpés.

Cette approche permet de poser un diagnostic précis et un conseil génétique adéquat aux couples porteurs de maladies héreditaires, leur donnant la possibilité d'un diagnostic anténatal (invasif ou non invasif) voire un dignostic pré implantatoire.

RESUMES:

RESUME

Le but de cette étude est d'identifier le profil des patients référés pour analyse cytogénétique dans l'unité de génétique médicale et oncogénétique de l'hôpital universitaire Hassan II de FES, afin de déterminer la prévalence et le type d'anomalies chromosomiques dans les différents groupes, de comparer les résultats avec ceux d'études similaires fait dans d'autres pays.

Nous avons examiné les études cytogénétiques effectuées sur568 patients qui ont été renvoyés à l'unité de génétique médicale et oncogénétique de Fès, entre Septembre2009 et Janvier2012

Les cas ont été regroupés en fonction du motif de consultation. Les fréquences des différents types d'anomalies structurelles et numériques sont été déterminées, et la fréquence relative des cas avec des caryotypes anormaux ont été calculés pour chaque groupe.

Pour obtenir des résultats préliminaires (568 patients):

70,4% des cas ont été renvoyés de service de pédiatrie et 54, 4%sont âgés de moins de 5 ans.

La raison la plus commune pour demander des tests de cytogénétique est la dysmorphie (25,6%), le retard mentale (16%), le syndrome de Down (14%), le retard de croissance (13,8%) et les fausses couches à répétition (12, 6%).

Parmi les casétudiés80% avaient un caryotype normal et 20% ont des anomalies chromosomiques. L'anomalie chromosomique la plus fréquente était la trisomie 21(11,7%), suivie par le syndrome de Turner (2,1%) et le syndrome de Klinefelter (1,5%).

L'analyse et la comparaison des résultats de cette étude cytogénétique portant sur les anomalies chromosomiques avec d'autres centres de recherche, aidera les cliniciens marocains à déterminer les indications de demande d'une analyse cytogénétique chez les patients et témoignera de l'importance de l'évaluation cytogénétique chez les patients qui présentent des anomalies cliniques ainsi qu'un conseil génétique adéquat aux familles.

MOTS CLES : test cytogénétique, anomalies chromosomiques, caryotypes, dysmorphie, syndrome de DOWN.

ABSTRACT:

The aim of this study is to identify the profile of patients being referred for cytogenetic analysis in the medical genetics and oncogenetics unit of FEZ Hassan II University Hospital, to determine the prevalence and type of chromosomal abnormalities in the different groups, to compare the results with those of similar studies done in other countries.

We reviewed cytogenetic studies performed on 568 patients who were referred to the medical genetics and oncogenetics unit of FEZ, between September 2009 and January 2012. The cases were grouped according to the reason of referral for cytogenetic analysis. The frequencies of the different types of numerical and structural abnormalities were determined, and the relative frequency of cases with abnormal karyotypes was calculated in each group.

For premilinary results (568 patients):

70,4% cases were referred from pediatric department and 54,4% are aged under 5 years old.

The most common reason for requesting cytogenetic testing was referral for Dysmorphism (25,6%), Mental Retardation (16%), Down syndrome (14%), girls' growth retardation (13,8%) and for recurrent miscarriage (12,6%).

Of the 618 cases studied, 80% had a normal karyotype and 20% had chromosomal abnormalities. The most common chromosomal abnormality was trisomy 21 (11, 7%) followed by Turner syndrome (2, 1%) and Klinefelter syndrome (1,5%). Chromosomes' structural abnormalities rate was 3,12%.

By analyzing and comparing the results of this cytogenetic study of chromosomal abnormalities with other countries and research centers, this will help Moroccan clinicians to determine the indications of a cytogenetic analysis in individual cases and will demonstrates the importance of cytogenetic evaluation in patients who show clinical abnormalities, and genetic counseling.

Keywords :cytogenetic testing, chromosomal abnormalities, karyotype, Dysmorphism, Down syndrome.

ملخص

الهدف من هذا البحث هو تحديد هوية المرضى الحالين إلى مختبر الوراثة الطبية من أجل تحليل وراثي حتى نتمكن من معرفة مدى انتشار التشوهات ا لصبغية وأنواعها، ثم مقارنتها مع نتائج أبحاث مشابهة من دول أخرى لقد فحصنا الخزانة الصبغية لـــ 568 مريض الذين أحيلت حالتهم من أجل الخريطة الصبغية بمختبر فاس بالمركز الجامعي الحسن الثاني بفاس ما بين شتنبر 2009 و يناير 2012.

جمعت الحالات حسب سبب الإحالة الطبية ، حدد تردد مختلف أنواع التشوهات الصبغية البنيوية والرقمية ، وكذلك التردد النسبي للخزانة الصبغية الغير الطبيعية.

حيث خلصت النتائج إلى:

70,4% من الحالات أرسلت من طرف أطباء الأطفال وكان سن 54,4% من الحالات أقل من 5 سنوات.

سبب الإحالة للتحاليل الصبغية هي التشوهات الخلقية (25,6%)، التخلف العقلي 16% متلازمة داون (14%) تأخر النمو (13,8%) الإجهاض المتكرر (12 ,6%).

من بين الحالات المدروسة 80%خريطة صبغية طبيعية بينما 20%حاملة للخلل الصبغي.

التشوه الصبغي الأكثر شيوعا كان هو التثلث الصبغي 21 (11,7%)، متبوعا بمتلازمة ترنر(2,1%) ومتلازمة كيلنفلتر (1,5%) .

تحليل ومقارنة نتائج هذا البحث مع نتائج أبحاث أخرى سيمكن الأطباء المغاربة من تحديد دواعي طلب التحليل الصبغي عند المرضى وسيبرهن على أهمية هذه التحاليل في التشخيص الدقيق وكذلك من إسداء النصح الوراثي للأسرة.

BIBLIOGRAPHIE:

1. A. Vigouroux, N. Chassaing, Évolution des techniques de diagnostic en génétique Archives de Pédiatrie, Volume 16, Issue 6, June 2009, Pages 915-917
2. R. Berger, Cytogénétique humaine. De 1956 à 2006 Pathologie Biologie, Volume 55, Issue 1, February 2007, Pages 1-12
3. P. Vago, Un demi-siècle de cytogénétique humaine et médicale Morphologie, Volume 93, Issue 301, August-September 2009, Pages 42-50 l'équipe de cytogénétique médicale de Clermont-Ferrand
4. Jean-Claude Mounolou, Françoise Frindlansky, La génétique fondamentale : Gérard Seguin Que sais-je ? Puf, Paris, 2000, 127 p. Nature Sciences Sociétés, Volume 10, Issue 1, 2002, Pages 97-98
5. J.-P. Siffroi, S. Chantot-Bastaraud, L'avenir de la cytogénétique après le séquencage du génome humain Morphologie, Volume 88, Issue 280, April 2004, Pages 19-23
6. Pascal Hallouët, Anne Borry,11 - Multiplication cellulaire Mémo-guide de biologie et de physiologie humaines, 2009, Pages 48-52
7. Pascal Hallouët, La cellule Mémo-guide infirmier (2e édition), 2010, Pages 6-9
8. J.F. Viallard, F. Lacombe, F. Belloc, J.L. Pellegrin, J. Reiffers, Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie Cancer/Radiothérapie, Volume 5, Issue 2, April 2001, Pages 109-129
9. Véronique Marck, Chapitre 1 - Bases biologiques, anatomiques et physiologiques Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie, 2010, Pages 1-19

10. Dictionnaire de Médecine Flammarion. Médecine- Sciences Flammarion 4e édition 1991.
11. Dupont JM. Ultrastructure du chromosome. Atlas Genet CytogenetOncolHaematol. June 2008
12. Aly Abbara, Lexique de la Médecine foetale et de la morphologie humaine
Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology
Principes de génétique humaine Biofutur, Volume 1998, Issue 183, November 1998, Page 53
13. V. Malan, S. Romana, Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention Archives de Pédiatrie, Volume 19, Issue 4, April 2012, Pages 437-442
14. J. Lespinasse, G. Nadeau, Apport de la génétique chromosomique moléculaire au diagnostic prénatal et périnatal des anomalies chromosomiques et des maladies géniques La Presse Médicale, Volume 34, Issue 17, October 2005, Pages 1257-1263
15. L. Bott, C. Thumerelle, J.C. Cuvellier, A. Deschildre, L. Vallée, A. Sardet, Ataxie- télangiectasie : de la clinique à la physiopathologie Archives de Pédiatrie, Volume 13, Issue 3, March 2006, Pages 293-298
16. J. Lamoril, N. Ameziane, J.-C. Deybach, P. Bouizegarène, M. Bogard, Notions de génétique moléculaire pour comprendre l'hérédité Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 23, Issue 6, December 2008, Pages 331-352
17. D. Rabineau et JM. Dupont, Cytogénétique Humaine, Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique, Faculté de Médecine Cochin-Port Royal, Université PARIS V,2011

18. M.C. Boffa, Hybridation in situ La Revue de Médecine Interne, Volume 17, Issue 6, June 1996, Pages 505-507

19. Nicolas Chevassus-au-Louis, FISH, la renaissance de la cytogénétique Biofutur, Volume 2000, Issue 200, May 2000, Page 18

20. P. Rochaix, FISH, applications en anatomie pathologique Annales de Pathologie, Volume 24, Supplement 1, November 2004, Pages 68-73

21. P. Brousset, Techniques d'hybridation in situ fluorescente (FISH) Annales de Pathologie, Volume 24, Supplement 1, November 2004, Pages 66-67

22. N. Douet-Guilbert, A. Basinko, M.-J. Le Bris, A. Herry, F. Morel, M. De Braekeleer, Stratégies d'identification des marqueurs chromosomiques surnuméraires en cytogénétique constitutionnelle Pathologie Biologie, Volume 56, Issue 6, September 2008, Pages 362-367

23. J-M Dupont, Apports de l'hybridation in situ interphasique au diagnostic prénatal cytogénétique Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 14, Issue 2, March-April 1999, Pages 98-102

24. G Tachdjian, V Cacheux, S Romana, Techniques nouvelles en cytogénétique Archives de Pédiatrie, Volume 3, Supplement 1, 1996, Pages S351-S352

25. L. Gouas, T. Roucaute, C. Goumy, C. Benier, A. Buvat, L. Veronese, A. Tchirkov, P. Vago, Intérêt des techniques moléculaires de la cytogénétique en reproduction humaine Morphologie, Volume 91, Issue 293, July 2007, Page 116

26. B. Keren, C. Schluth-Bolard, G. Egea, D.Sanlaville, Nouvelles méthodes d'analyse globale du génome humain , Archives de Pédiatrie, Volume 17, Issue

11, November 2010, Pages 1605-1608,

27. Philippe Planchon, L'hybridation génomique comparative Biofutur, Volume 1997, Issue 165, March 1997, Page 10A
28. D. Sanlaville, J.M. Lapierre, A. Coquin, C. Turleau, J. Vermeesch, L. Colleaux, G. Borck, M. Vekemans, A. Aurias, S.P. Romana, La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle Archives de Pédiatrie, Volume 12, Issue 10, October 2005, Pages 1515-1520
29. Serge Romana, Valerie Malan, Cytogénétique moléculaire, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Service d'Histo-Embryo- Cytogenetique, Hopital Necker Enfants Malades, Paris,2010
30. G.LEFORT, Génétique, reproduction et développement, Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, 2010
31. F. Vialard, D. Molina Gomes, Les nouvelles technologies d'analyse du génome : quelles utilisations en diagnostic prénatal Gynécologie Obstétrique &Fertilité, Volume 39, Issue 1, January 2011, Pages 32-41
32. P. Jonveaux, Technique d'hybridation génomique comparative sur microréseaud'ADN et foetopathologieArchives de Pédiatrie, Volume 17, Issue 7, July 2010, Pages 1119-1123
33. M Lafage-Pochitaloff, Notions de base en cytogénétique conventionnelle et moléculaire : application au diagnostic des hémopathies malignes Pathologie Biologie, Volume 51, Issue 6, 1 August 2003, Pages 307-311
34. C. Goumy, C. Benier, M. Giollant, M.N. Bonnet-Dupeyron, J.Y. Jaffray, P. Vago, Apport des techniques de CGH et CGH ARRAY en cytogénétique constitutionnelle pré et post-natale Morphologie, Volume 90, Issue 289, June 2006, Page 80

35. M. Béri-Dexheimer, C. Bonnet, P. Chambon, K. Brochet, M.-J. Grégoire, P. Jonveaux, L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (puces à ADN) en pathologie chromosomique constitutionnelle Pathologie Biologie, Volume 55, Issue 1, February 2007, Pages 13-18

36. C. Nemos, A.-C. Bursztejn, P. Jonveaux,, Gestion des variations du nombre de séquences génomiques (CNV) en génétique humaine constitutionnelle utilisant l'hybridation génomique comparative en microréseau d'ADN (HGCM) Pathologie Biologie, Volume 56, Issue 6, September 2008, Pages 354-361

37. Jérôme Hinfray,Puces à ADN et autres systèmes d'analyse génomique Biofutur, Volume 2000, Issue 206, December 2000, Pages E1-E14

38. D. Baron, M. Raharijaona, R. Houlgatte, Puces à ADN IRBM, Volume 28, Issues 5-6, November-December 2007, Pages 210-215

39. J. Andrieux, Puces à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques Pathologie Biologie, Volume 56, Issue 6, September 2008, Pages 368-374

40. E Mornet,ADN, les 50 ans de la double hélice : du concept d'hybridation moléculaire aux biopucesGynécologie Obstétrique &Fertilité, Volume 31, Issue 11, November2003, Pages 895-899

41. A. Goldenberg, P. Saugier-Veber, Retards mentaux d'origine génétique Pathologie Biologie, Volume 58, Issue 5, October 2010, Pages 331-342

42. M Rio, L Colleaux, D Sanlaville, G Borck, F Molinari, A Munnich, Approche diagnostique du sujet présentant un retard mental sévère et syndromique Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 6, June 2004, Pages 566-568

43. E. Excoffier, A. Verloes, P. Eydoux, D. Lacombe, M. Bouvard, M.C. Mouren-Siméoni, Phénotypes psycho-comportementaux de l'enfant et de l'adolescent dans les syndromes microdélétionnelsAnnales Médico-psychologiques, revue psychiatrique, Volume 161, Issue 1, 1 February 2003, Pages 54-58

44. J.C Cuvellier, F Pandit, S Casalis, M.P Lemaître, J.M Cuisset, A Platof, L Vallée, Analyse d'une population de 100 enfants adressés pour troubles d'apprentissage scolaire Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 3, March 2004, Pages 201-206

Orphanetdatabase

45. F. Minier, D. Carles, F. Pelluard, E.M. Alberti, L. Stern, R. Saura, Syndrome de Di George, étude rétrospective de 52 cas Archives de Pédiatrie, Volume 12, Issue

3, March 2005, Pages 254-257

46. A Levy-Mozziconacci, D Lacombe, B Leheup, F Wernert, F Rouault, N Philip, La microdélétion du chromosome 22q11 chez l'enfant: à propos d'une série de49 patients Archives de Pédiatrie, Volume 3, Issue 8, August 1996, Pages 761-768

47. Siham ChafaiElalaoui, Ilham Ratbi, Souad CherkaouiDeqaqi, Karim Ouldim, Abdelaziz Sefiani, Microdélétion 22q11.2 révélée par une hypocalcémie néonatale avec une dysmorphie faciale mineure Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2009, Issue 409, February2009, Pages 83-85

48. Ouldim K, Bouguenouch L, Samri I, El Otmani I, Hamdaoui H, Bennis S, Lakhdar MI, Chaouki S, Atmani S, Hida M. Microdeletion syndromes (Williams syndrome and deletion syndrome 22q11) at CHU Hassan II of Fez: report of 3 observations, Pan Afr Med J. 2012;11:3. Epub 2012 Jan 12

49. D Lacombe, Phénotype extra cardiaque associé à la microdélétion 22q11 Archives de Pédiatrie, Volume 9, Supplement 2, May 2002, Pages 100-101

50. G. Viot, cardiopathies congénitales : quel risque pour la fratrie ? Journal de Pédiatrie et de Puériculture, Volume 15, Issue 5, July 2002, Pages 259-264

51. E Robert-Gnansia, C Francannet, A Bozio, P Bouvagnet, Épidémiologie, étiologie et génétique des cardiopathies congénitales EMC - Cardiologie-Angéiologie, Volume 1, Issue 2, May 2004, Pages 140-160

52. Lacroix, M. Pezet, A. Capel, D. Bonnet, M. Hennequin, M.-P. Jacob, G. Bricca, D. Couet, G. Faury, J. Bernicot, B. Gilbert-Dussardier, Le syndrome de Williams-Beuren : une approche pluridisciplinaire Archives de Pédiatrie, Volume 16, Issue 3, March 2009, Pages 273-282, A.

53. N. Philip, Génétique moléculaire du syndrome de Williams Archives de Pédiatrie, Volume 8, Supplement 2, May 2001, Pages 353-354

54. T. Baubet, Le syndrome de Williams importance d'une prise en charge pluridisciplinaire précoce Journal de Pédiatrie et de Puériculture, Volume 12, Issue 4, June 1999, Pages225-230

55. G. Diene, A. Postel-Vinay, G. Pinto, M. Polak, M. Tauber, Le syndrome de Prader-WilliAnnales d'Endocrinologie, Volume 68, Issues 2-3, June 2007, Pages 129-137

56. JM Dupont, L Cuisset, Bases génétiques des syndromes de Prader-Willi et d'Angelman implications pour la conduite du diagnostic biologique Archives de Pédiatrie, Volume 5, Issue 4, April 1998, Pages 418-424

57. MO Livet, A Moncla, B Delobel, MF Croquette, N Philip, L Vallée, Le syndrome de Smith-MagenisArchives de Pédiatrie, Volume 4, Issue 12, December 1997, Pages 1231-1237

58. B Delobel, JC Cuvellier, L Vallée, F Boiddein, JF Lemaître, C Bernard, GA Loeville, O Fovet, MC Francannet, O Boute, MF Croquette, Syndrome de Smith-Magenis, àpropos de huit observations: un phénotype comportemental, JP Nuyts HôpitalSaint-Antoine, Lille; services de neuropédiatrie, Lille, Clermont-Ferrand:services de pédiatrie, Dunkerque, Seclin et CHR LilleArchives de Pédiatrie, Volume 4, Issue 10, October 1997, Page 1056

59. N El Hafidi, Z Ghanimi, A Gaouzi, B Benhamou, F Alaoui-M'sseffer, Syndrome de Rubinstein-Taybi : à propos d'une forme familiale Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 8, August 2004, Pages 978-979

60. P. Labrune, Le conseil génétique Journal de Pédiatrie et de Puériculture, Volume 6, Issue 8, December1993, Pages 475-479

61. P. Pellerin, Au-delà du diagnostic d'une maladie génétique, la question de l'information de la parentèleAnnales Pharmaceutiques Françaises, Volume 67, Issue 1, January 2009, Pages 20-24

62. Sireteanu A, Covic M, Gorduza EV. Array CGH: technicalconsiderations and applications. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2012 Apr-Jun;116(2):545-51.

63. Shao XY, Zhang R, Hu C, Wang CR, Lu JY, Qin W, Yu HY, Bao YQ, Cheng XB, Jia WP Precisemicrodeletiondetection of Prader-Willi Syndrome witharraycomparative genomehybridization. Biomed Environ Sci. 2010 Jun;23(3):194-8.

64. Xiang B, Zhu H, Shen Y, Miller DT, Lu K, Hu X, Andersson HC, Narumanchi TM, Wang Y, Martinez JE, Wu BL, Li P, Li MM, Chen TJ, Fan YS. Genome-wideoligonucleotidearray comparative genomichybridization for etiologicaldiagnosis of mental retardation: amulticenterexperience of 1499 clinical cases. J Mol Diagn. 2010 Mar;12(2):204-12.

65. 68. Nisrine Aboussair GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS Volume 16, Number 6, 2012 Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 569–573
DOI: 10.1089/gtmb.2011.0265

66. **Imane Samri1,&, Laila Bouguenouch1, Hasna Hamdaoui1, Ihsan El Otmani1, Nissrine El Omairi2, Sana Chaouki2, Moustapha Hida2, Karim Ouldim1**
Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique. Laboratoire Central d'Analyses Médicales, CHU Hassan II, Fès, MAROC, 2Service de Pédiatrie CHU Hassan II, Fès, Maroc

67. Karim Ouldim1, Imane Samri1, Laila Bouguenouch1, Hasna Hamdaoui1, Ihsan El Otmani1, Mohamed Hbibi2, Sana Chaouki2,
Moustapha Hida2

ANNEXES :

Observations

Laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique

ANNEXE I :

Anomalies chromosomiques de nombre

Trisomie 21libre :



CarTrisomie18 libre :



Trisomie 13libre :



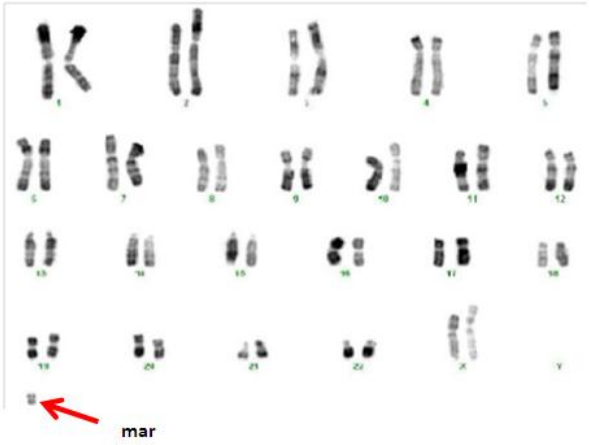
ANNEXE II :

Anomalies chromosomiques de structure

Marqueur chromosomique



Phénotype de la patiente

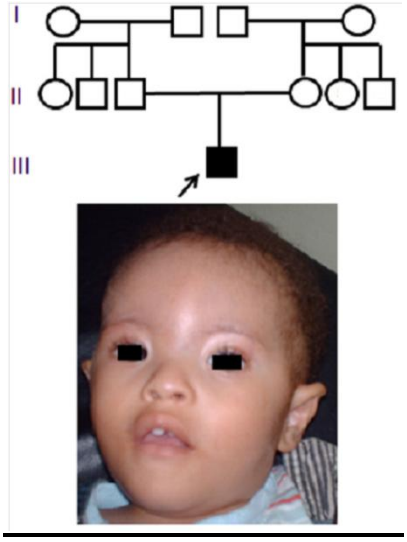


Caryotype métaphasique en bandes R

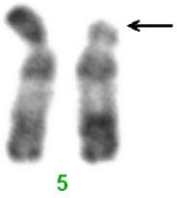
47,XX,+mar

Syndrome du « Cri de chat » :

Une seule cassure chromosomique
La délétion terminal : Délétion 5p-



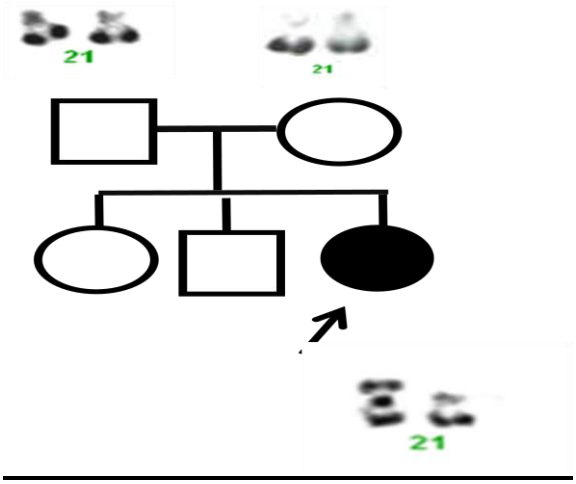
Arbre généalogique et aspect facial de notre patient présentant de Le syndrome du Cri du Chat



Le caryotype partiel métaphasique en bandes R de notre patient a mis en évidence la délétion 5p- :46,XY,del(5)(p13) (La flèche indique le niveau de la délétion)

Translocations robertsonienne

Fusions centromèriques entre 2 chromosomes acrocentriques



Trisomie 21 par translocation de *novo*

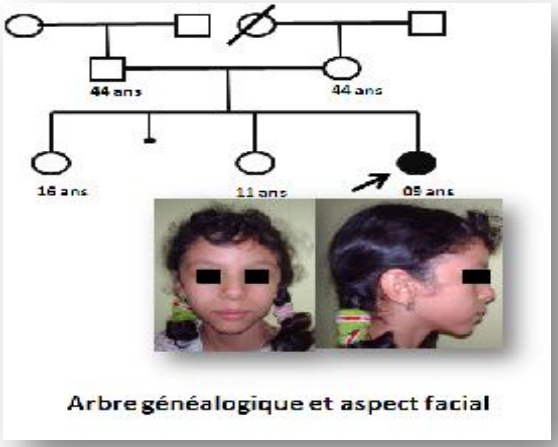
'Fusions centromèriques entre 2chromosomes acrocentriques : Chromosomes 21'

ANNEXE III :

Syndromes microdélétionnels

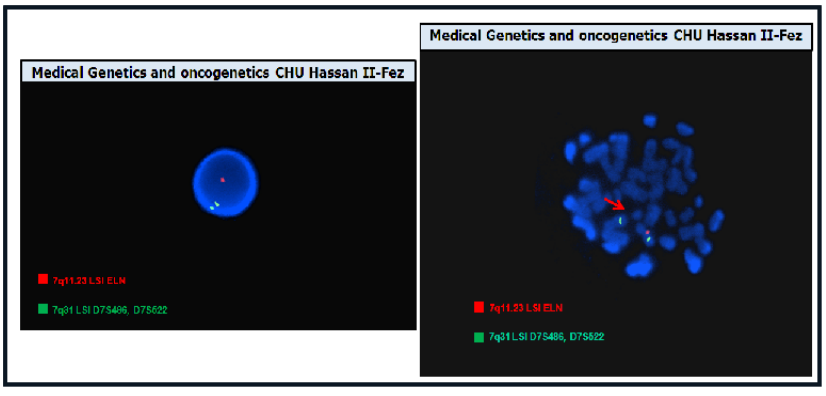
Observation 1 :

Syndrome de Williams



Arbre généalogique et aspect facial

Manifestations cliniques			
Dysmorphie du visage : Racine du nez aplatie avec extrémité bulbeuse, grande bouche avec lèvre inferieure large et éversée, long philtrum	**Retard psycho-moteur**	**Retard staturo-pondérale**	**HTA :** PAS : 18mmHg PAD :11mmHg
Profil cognitif et comportemental : •Hypersociabilité •Hypersensibilité au bruit •Des dispositions pour la musique •Retard cognitif modere •Langage préserve •Troubles du sommeil	**Vommisssement chroniques Constipation**	**Hypertrophie ventriculaire gauche (Complication d'une HTA sans sténose de l'artére rénale)**	**Echographie abdomino-rénale :** normale

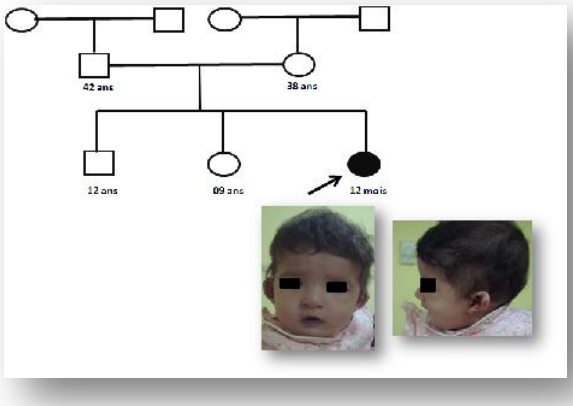


46,XX.ish del(7)(q11.23q11.23)(ELN-)[11]
nuc ish(ELN×1)(D7S522×2)[80]

'Microdélétion hémizygote de la région 7q11.23 sur le chromosome 7'

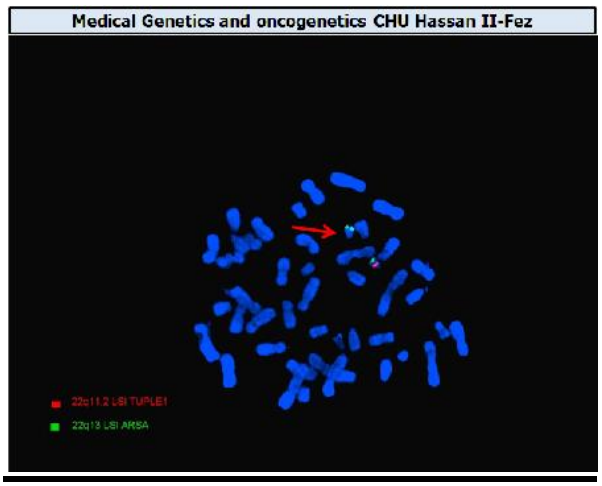
Observation 2 :

Syndrome de la délétion 22q11



Arbre généalogique et aspect facial

Système atteint	Observation 2
Aspect facial + Arbre généalogique	Figure.
Cardiopathie congénitale de type conotroncal	Tétralogie de Fallot + Atrésie pulmonaire
Fente palatine **Dysfonction du voile du palais**	Fente palatine
Croissance	Retard de croissance et mauvaise prise pondérale
Neurologie	Hypotonie musculaire
Squelette et anomalies des extrémités	-
Reins, hypocalcémie, Hernies, Hypocalcémie, atteinte oculaire	Hernie ombilicale



46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE1-)[5]
nuc ish(TUPLE1×1)(ARSA×2)[50]

'Microdélétion hémizygote de la région 22q11.2 sur le Chromosome 22'

ANNEXE IV :

Cytogénétique classique et moléculaire des dysgonosomies



Observation 3



Observation 4

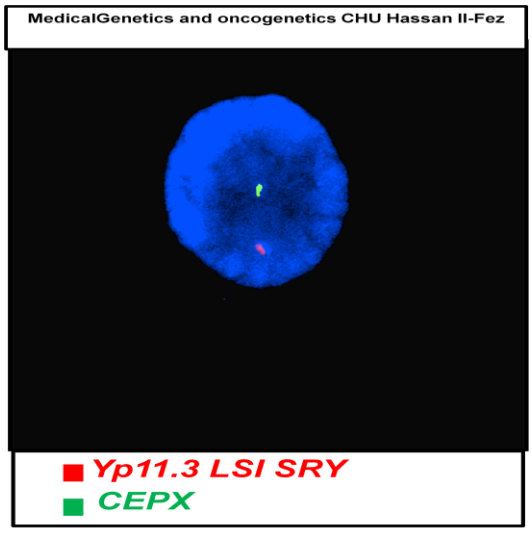
Observations	Cytogénétique classique et moléculaire		Diagnostic
	Caryotype métaphasique en bandes R	FISH SRY/CEP X	
1	47,XXY	-	Syndrome de Klinefelter
2	45,X	-	Syndrome de Turner
3	mos 45,X[19]/46,X,i(X)(q10)[22]	-	Syndrome de Turner
4	46,X,i(X)(q10)	-	Syndrome de Turner
5	mos 45,X[37]/46,XX[4]/46,XY[2] nuc ish(SRY×1),(CEPX×1)[10]/(CEPX×2)[20]/(CEPX×1)[100]		Syndrome Turnérien avec chromosome Y
6	47,XY,mar nuc ish(SRY×2),(CEPX×1)[100]		Le double Y



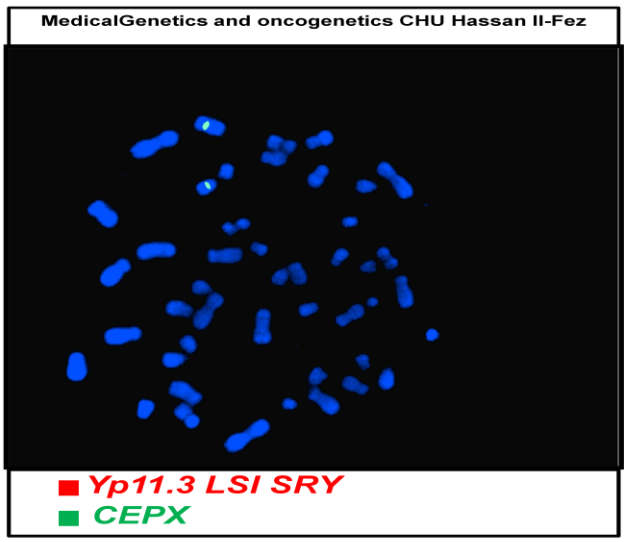
Caryotype partiel 46,X,i(X)(q10)



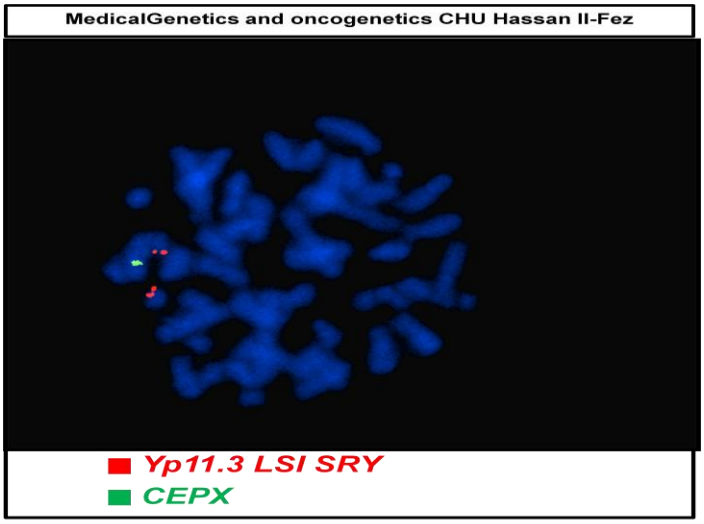
Caryotype partiel 47,XXY



Observation 5



Observation 5



Observation 6