



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

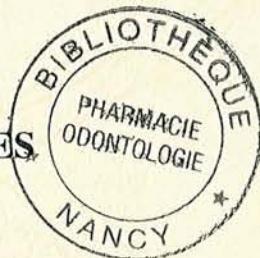
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**



Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 24 octobre 2005

Par Mylène BERI-DEXHEIMER

Née le 04 novembre 1976 à Metz (57)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Hybridation génomique comparative en microréseau : évolutions  
techniques et place dans la stratégie diagnostique  
Expérience dans le cadre du retard mental**

---

Membres du jury

Président : Pr. P. JONVEAUX

Juges : Pr. G. SIEST, Pr. B. LEHEUP, Dr. MJ. GREGOIRE

BU PHARMA-ODONTOL



104 071166 1

D

Université Henri Poincaré – Nancy I

2005

DB 32145

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE



Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 24 octobre 2005

Par Mylène BERI-DEXHEIMER

Née le 04 novembre 1976 à Metz (57)

Conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Hybridation génomique comparative en microréseau : évolutions  
techniques et place dans la stratégie diagnostique  
Expérience dans le cadre du retard mental

Membres du jury

Président : Pr. P. JONVEAUX

Juges : Pr. G. SIEST, Pr. B. LEHEUP, Dr. MJ. GREGOIRE

## Membres du personnel enseignant 2004/2005

**Doyen**

Chantal FINANCE

**Vice Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Directeur des Etudes**

Gérald CATAU

**Responsable de la Filière officine**

Gérald CATAU

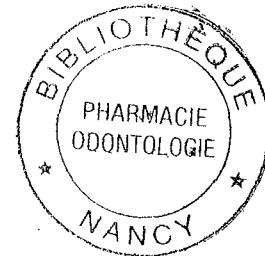
**Responsables de la Filière industrie**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

**Responsable de la Filière hôpital**

Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

M. VIGNERON Claude

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Mme BESSON Suzanne

Mme GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MORTIER François

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

**PROFESSEURS EMERITES**

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mme POCHON Marie-France

Mle IMBS Marie-Andrée

**PROFESSEURS**

M. ASTIER Alain

Pharmacie clinique

M. ATKINSON Jeffrey

Pharmacologie cardiovasculaire

M. AULAGNER Gilles

Pharmacie clinique

M. BAGREL Alain

Biochimie

Mle BATT Anne-Marie

Toxicologie

M. BLOCK Jean-Claude

Santé publique

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Pharmacologie cardiovasculaire

Mme FINANCE Chantal

Virologie, immunologie

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mathématiques, physique, audioprothèse

Mle GALTEAU Marie-Madeleine

Biochimie clinique

M. HENRY Max

Botanique, mycologie

M. JOUZEAU Jean-Yves

Bioanalyse du médicament

M. LABRUDE Pierre

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

Pharmacognosie

M. LALLOZ Lucien

Chimie organique

M. LEROY Pierre

Chimie physique générale

M. MAINCENT Philippe

Pharmacie galénique

M. MARSURA Alain

Chimie thérapeutique

M. MERLIN Jean-Louis

Biologie cellulaire oncologique

M. NICOLAS Alain

Chimie analytique

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

Chimie Thérapeutique

M. RIHN Bertrand (Professeur associé)

Biochimie

Mme SCHWARTZBROD Janine

Bactériologie, parasitologie

M. SIEST Gérard

Biochimie

M. SIMON Jean-Michel

Droit officinal, législation pharmaceutique

M. VIGNERON Claude

Hématologie, physiologie

## MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M.	CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
M.	LAMPRECHT Alf	Pharmacie galénique
Mme	LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
M.	MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire appliquées aux médicaments
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

## PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

## PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

## ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

## SERMENT DES APOTHICAires



**J**e jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



A mes juges,

**Monsieur le professeur P. JONVEAUX**

Professeur à la faculté de Médecine de Nancy

Chef du laboratoire de génétique du CHU de Nancy

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude pour votre disponibilité et la confiance que vous m'avez accordée.

**Monsieur le Professeur G. SIEST**

Professeur à la faculté de pharmacie de Nancy

Vous me faites l'honneur de siéger parmi les membres de ce jury,

Veuillez croire en l'expression de mon plus profond respect.

**Monsieur le Professeur B. LEHEUP**

Professeur à la faculté de médecine de Nancy

Chef du service de médecine infantile 3 et génétique clinique du CHU de Nancy

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury,

Soyez assuré de toute ma considération.

**Madame le Dr. MJ. GREGOIRE**

Praticien hospitalier au laboratoire de génétique du CHU de Nancy

J'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez porté à cette thèse.

Je vous remercie pour votre aide dans la réalisation de ce travail et vous assure de ma très sincère reconnaissance.

Merci à tout le personnel du laboratoire de génétique du CHU de Nancy pour son accueil chaleureux, sa gentillesse et son soutien.

Merci en particulier à Karène Brochet pour ses compétences, sa disponibilité et sa patience à mon égard.

Merci à l'équipe du Professeur J. VERMEESCH, en particulier le D. B. THIENPONT et le Dr. N. MAAS pour leurs précieux conseils lors des mises au point techniques concernant les puces synthétisées dans leur laboratoire.

Je remercie le Pr. F. Martin pour avoir permis l'exploitation des résultats grâce au scanner Genepix Axon de l'INRA.

A Benjamin,

A mes parents,

A ma famille,

A mes amis.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du PHRC régional de 2002 étudiant les microremanierments chromosomiques dans le cadre du retard mental.



# Sommaire

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

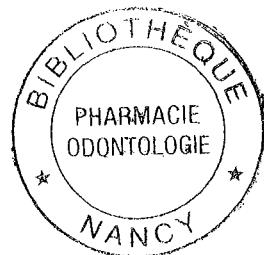
## LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION	7
OBJECTIFS	9
LES CHROMOSOMES ET LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES	10
1 Chromosomes	10
2 Les anomalies chromosomiques	13
2.1 Anomalies de nombre	14
2.1.1 Les polyploidies	14
2.1.2 Les monosomies	14
2.1.3 Les trisomies	14
2.1.4 Les marqueurs chromosomiques	14
2.2 Anomalies de structure ou remaniements chromosomiques	15
2.2.1 Remaniements déséquilibrés	15
2.2.1.1 Les délétions	15
2.2.1.2 Les anneaux	16
2.2.1.3 Les duplications	16
2.2.1.4 Les isochromosomes	16
2.2.2 Remaniements équilibrés	16
2.2.2.1 Les inversions	16
2.2.2.2 Les translocations	17
2.2.2.3 Les insertions	17
TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE	19
1 Caryotype standard	19
1.1 Anomalies détectées	19
1.2 Indications du caryotype	19
1.2.1 Pathologies acquises	19
1.2.2 Pathologies constitutionnelles	20
1.3 Réalisation	21
1.3.1 Prélèvement	21
1.3.2 Culture	21
1.4 Avantages	21
1.5 Limites	22
2 Caryotype en haute résolution	22
2.1 Principe	22
2.2 Indications	22
2.3 Avantages	26
2.4 Limites	26
3 Hybridation in situ en fluorescence (FISH)	26
3.1 Principe de l'hybridation moléculaire	26
3.2 Hybridation in situ en fluorescence : FISH	26
3.2.1 Types de sondes utilisées	27
3.2.2 Cibles	28
3.2.2.1 Noyaux interphasiques	28

3.2.2.2 Chromosomes métaphasiques	28
<b>3.3 Indications</b>	29
3.3.1. Caractérisation d'une anomalie (approche par une orientation cytogénétique)	29
3.3.2 Recherche d'un syndrome microdélétionnel connu (approche par une orientation clinique spécifique)	30
3.3.3 Approche sans orientation clinique dans le cadre du retard mental	30
3.3.4 Cytogénétique constitutionnelle prénatale	30
<b>3.4 Limites</b>	31
<b>4 Hybridation génomique comparative : CGH</b>	31
4.1 Principe et mise en oeuvre	31
4.2 Utilisations	32
4.3 Avantages	32
4.4 Limites	33
<b>HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE EN MICRORESEAU (CGH MICROARRAY) OU PUCE A ADN</b>	34
<b>1 Principe</b>	34
<b>2 Avantages</b>	35
<b>3 Limites de la technique</b>	36
3.1 Réarrangements non visibles	36
3.2 Problème des polymorphismes	36
3.3 Mosaïcisme	37
<b>4 Description de la technique et points techniques déterminant la qualité de celle-ci</b>	37
4.1 Choix des séquences déposées sur la lame	37
4.1.1 Impact sur la résolution	38
4.1.1.1 Taille	38
4.1.1.2 Nombre de clones	38
4.1.1.3 Distance entre les clones	38
4.1.2 Impact sur la qualité de l'hybridation et le bruit de fond	39
4.1.3 Contrôle des positionnements des BACs à fixer sur la lame	39
4.2 Préparation des séquences déposées sur la lame	40
4.2.1. Types	40
4.2.1.1 BACs ou PACs	40
4.2.1.2 ADNc	40
4.2.1.3 Oligonucléotides	41
4.2.2. Amplification des BACs et PACs	41
4.2.3 Purification et dénaturation	41
4.3 Préparation des lames	42
4.3.1 Traitement de la lame	42
4.3.1.1 Lames à groupement aldéhyde	43
4.3.1.2 Lames à groupement poly-L-lysine	43
4.3.1.3 Lames à groupement amine	43
4.3.1.4 Lame réfléchissante	43
4.4 Préparation des ADN à tester	44
4.4.1 Extraction de l'ADN et dosage	44
4.4.2 Fragmentation de l'ADN génomique (étape optionnelle)	44
4.4.3 Marquage de l'ADN à tester par les cyanines	44
4.4.3.1 Principe du marquage	44
4.4.3.2 Choix des fluorophores	45
a) Définition	45
b) Structure chimique	45
4.4.4 Purification de l'ADN marqué	47
4.4.5 Vérification de l'incorporation des cyanines et de la quantité d'ADN à tester	47
4.4.6 Précipitation de l'ADN	48
4.4.7 Blocage des séquences répétées	48
4.4.8 Hybridation	48

4.4.8.1 Pré-hybridation	48
4.4.8.2 Hybridation	49
4.4.9 Lavage	50
<b>5 Analyse des données et critères de qualité</b>	<b>50</b>
5.1 Connaissance des caractéristiques des séquences d'ADN fixées sur la lame	51
5.2 Prise en compte du bruit de fond	51
5.3 Contrôle de la reproductibilité du signal et efficacité	52
5.4 Contrôle positif	53
5.5 Normalisation	53
5.6 Elimination des faux négatifs et faux positifs	53
<b>6 Résultat</b>	<b>54</b>
<b>7 Contrôle des déviations retrouvées</b>	<b>55</b>
7.1 FISH	55
7.1.1 BACs	55
7.1.1.1 Culture bactérienne et extraction des BACs	56
7.1.1.2 Marquage de l'ADN des BACs	56
7.1.1.3 Purification de l'ADN	57
7.1.1.4 Hybridation	57
7.1.1.5 Détection immunochimique	57
7.1.1.6 Cohybridation d'une sonde commerciale comme témoin	58
7.1.1.7 Lecture	58
7.1.1.8 Interprétation des résultats	58
7.2 Biologie moléculaire	59
7.2.1 Microsatellites	59
7.2.2 QMPSF : Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments	60
<b>EXPERIENCE DU LABORATOIRE</b>	<b>61</b>
<b>1 Caractéristiques des puces utilisées au laboratoire</b>	<b>61</b>
1.1 Puces Genosensor Array 300 Vysis (laboratoire Abbott)	61
1.2 Puces Genosystem 1MB (Spectral Genomics)	62
1.3 Puces de l'université de Leuven	62
1.4 Puces Integrachip (Integragen)	62
<b>2 Problèmes rencontrés</b>	<b>63</b>
2.1 Interprétation des résultats et problèmes de polymorphismes	63
2.2 Validation de la qualité de l'hybridation et confirmation de l'anomalie	64
2.3 Intensité de fluorescence non homogène	65
2.4 Bruit de fond	65
2.5 Signal / bruit de fond trop faible	66
2.6 Faible intensité de signal	68
<b>LE RETARD MENTAL</b>	<b>70</b>
<b>1 Définition, fréquence et étiologies possibles</b>	<b>70</b>
1.1 Définition	70
1.2 Fréquence et étiologies	70
<b>2 Approche cytogénétique</b>	<b>74</b>
<b>3 Expérience des puces au laboratoire dans le cadre du retard mental</b>	<b>76</b>
Délétion 1qter	77
Déletion 22q11	79
Délétion 21q22	81
Délétion 2p22	83
Monosomie partielle 10q associée à une trisomie partielle 20q	86
Duplication Xp11	89

Déletion 20qter	91
Marqueur du chromosome 4 : trisomie 4p partielle en mosaïque	93
<b>DISCUSSION</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSION ET DEVELOPPEMENTS FUTURS</b>	<b>103</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>105</b>
Annexe 1 : Protocoles expérimentaux	105
Puces Genosensor Array 300 (Abbott)	105
Puces à ADN Genosystem 1MB (Spectral Genomics)	109
Puces de l'université de Leuven	111
Puces Integrachip (Integragen)	115
Annexe 2 : Liste des clones fixés sur lame dans le système Genosensor Array 300	117
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>119</b>



# Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Cycle cellulaire et aspect des chromosomes	10
Figure 2 : Structure chromatinnienne d'un chromosome	11
Figure 3 : Position du centromère	12
Figure 4 : Subdivision d'un chromosome 21 en bandes et sous-bandes (bandes R)	12
Figure 5 : Représentation des chromosomes humains en bandes G	13
Figure 6 : Aberrations chromosomiques de structure	18
Figure 7 : Caryotype humain en haute résolution en bandes R. Localisation chromosomique des principaux syndromes microdélétionnels connus	24
Figure 8 : Principe de l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence	27
Figure 9 : Principe général de la CGH microarray	35
Figure 10 : Structure chimique des cyanines	46
Figure 11: Valeur maximale de DS pour détecter un clone dupliqué	54
Figure 12: Principe de Nick translation	57
Figure 13 : Système de marquage des BACs	58
Figure 14 : Essai puce Integrachip	68
Figure 15 : FISH (sondes télomériques 1p1q Cytocell)	79
Figure 16 : Cartographie de la région 22q11	81
Figure 17 : Cartographie de la région 21q22	83
Figure 18 : Cartographie de la région 2p22	85
Figure 19 : CGH : visualisation de la délétion en 10q et de la duplication en 20q	88
Figure 20 : FISH : sondes spécifiques de locus 10q Cytocell et 20q Vysis	88
Figure 21: Représentation graphique des ratios d'intensité des cyanines et visualisations des déviations en 10q et 20q	89
Figure 22: CGH : visualisation de la duplication (chromosome X) et visualisation du chromosome X métaphasique (caryotype)	90
Figure 23: Résultat de la puce Genosystem 1 MB : duplication Xp11	91
Figure 24 : cartographie de la région Xp21	91
Figure 25 : Résultat de la puce Genosystem 1MB : délétion 20qter	93
Figure 26 : FISH (sondes subtélomériques Vysis 20q et 20p). Délétion 20qter	93
Figure 27 : Caryotype 48,XX,+2mar	95
Figure 28 : CGH chromosome 4	95
Figure 29 : FISH (sonde totale WCP4): mise en évidence de la nature de deux marqueurs surnuméraires	96
Figure 30 : Résultat de la puce Genosystem 1MB : amplification de matériel chromosomique sur le chromosome 4	96
Figure 31: cartographie de la région dupliquée du chromosome 4	97
Figure 32 : Schéma de la lame et des dépôts	113
 Tableau 1 : Signes cliniques majeurs des principaux syndromes microdélétionnels connus	25
Tableau 2: Paramètres influençant l'hybridation et la stringence	50
Tableau 3 : Causes de retard mental (revue de la littérature)	70
Tableau 4 : Fréquence des anomalies chromosomiques chez des patients avec retard mental	72
Tableau 5 : Anomalies chromosomiques connues et syndromes associés au retard mental	73
Tableau 6: Récapitulatif des puces testées au laboratoire de génétique de Nancy	77
Tableau 7 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 1qter.	78
Tableau 8 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 22q11.	80
Tableau 9: Résultat puce Genosensor : délétion 21q22.	83
Tableau 10 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 2p22.	85
Tableau 11 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 10qtel et duplication 20q.	89
Tableau 12 : Préparation de la solution d'hybridation	115
Tableau 13 : Solution de post-hybridation	116

## Liste des abréviations



- Ac : anticorps
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- BAC : Bacterial Artificial Chromosome
- PAC : P1-derived Artificial Chromosome
- YAC : Yeast Artificial Chromosome (Chromosome artificiel de levure)
- CGH : Comparative genomic hybridization
- Cy3 et Cy5 : cyanine 3 et cyanine 5
- DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- dNTP : désoxynucléotide triphosphate ( dont dCTP : désoxycytosine triphosphate, dATP : désoxyadénosine triphosphate)
- DS : déviation standard
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
- FISH : fluorescence in situ hybridization
- kb : kilobase
- Mb : mégabase
- pb : paire de bases
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- pmol : picomole
- SA : semaine d'aménorrhée
- SSC : saline sodium citrate
- SDS : sodium dodécyl sulfate
- TBE : Tris borate EDTA
- TE : Tris EDTA

## Introduction

Depuis la découverte et la mise au point de la technique du caryotype humain en 1956 (Tjio et al. 1956), les techniques de cytogénétique ont permis de déterminer une origine chromosomique pour un certain nombre de pathologies par la détection de différentes anomalies telles que les aneuploïdies, les translocations, les délétions ou les duplications et d'établir une relation avec un phénotype anormal. Ceci a ainsi conduit à montrer l'implication importante de ces anomalies dans le retard mental : leur détection a pour but d'adapter la prise en charge des patients et de leur famille. L'évolution des connaissances sur la pathologie et les avancées diagnostiques ont été parallèles à l'évolution des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire dans la mesure où les progrès concernant la limite de résolution, c'est-à-dire le degré de détail moléculaire d'une cartographie physique de l'ADN, sont à l'origine de la détection d'anomalies dont la taille était de plus en plus réduite. Dans un premier temps, le caryotype a constitué un outil pour la découverte d'anomalies chromosomiques mais uniquement lorsque leur taille était supérieure à 5 mégabases. Ce défaut a en partie été corrigé par l'apparition du caryotype en haute résolution et des techniques de cytogénétique moléculaire telle que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Ces techniques sont complémentaires et leur mise en œuvre réfléchie en fonction des signes cliniques permet de résoudre un certain nombre de problèmes diagnostiques. Cependant, ces progrès ne sont pas encore suffisants puisque plus de la moitié des retards mentaux sont encore actuellement d'origine inexpliquée : ceci laisse supposer que certaines anomalies sont localisées dans des régions inexplorées car ces techniques n'offrent pas la possibilité d'explorer la totalité du génome avec une résolution suffisante.

C'est pourquoi le développement récent de techniques de cytogénétique permettant l'exploration du génome entier avec une résolution inférieure à un mégabase, en particulier les « puces à ADN » ou hybridation génomique comparative en microréseau (CGH microarray) ouvre de nouveaux horizons au diagnostic de retard mental par la détection de déséquilibres chromosomiques submicroscopiques jusqu'alors méconnus et non décelables avec les techniques classiques.

Différents types de puces à ADN ont été développés et sont disponibles actuellement sur le marché. Leur utilisation varie selon le profil des clones fixés, lui-même choisi en fonction des régions du génome potentiellement impliquées dans la pathologie étudiée.

Cette technique est actuellement en cours d'évaluation et une comparaison aux autres techniques disponibles doit être réalisée afin de déterminer quel est son bénéfice éventuel et de préciser ses indications. L'expérience du laboratoire de génétique de Nancy dans ce

domaine permet de dresser un premier bilan de sa place et de ses apports dans la stratégie diagnostique.

## Objectifs

L'objectif de ce mémoire est de retracer l'expérience du laboratoire quant à l'utilisation des puces à ADN.

Après avoir situé la technique au sein des outils diagnostiques actuellement disponibles et déterminer le principe, les domaines d'application, les avantages et inconvénients de chacune d'elles, la technique de puce à ADN est détaillée afin de mettre en lumière les étapes clés de celle-ci. De leur connaissance découlent les adaptations entreprises dans le but de résoudre les problèmes techniques rencontrés. Des mises au point ont concerné des puces Genosensor Array 300 (Abbott), Genosystem 1MB (Spectral Genomics), Integrachip (Integragen) et des puces développées à l'université de Leuven. Les problèmes rencontrés ont été multiples et ont porté aussi bien sur la technique elle-même que sur la validité des résultats obtenus et leur interprétation.

Dans un deuxième temps, l'expérience du laboratoire de génétique de Nancy quant à l'utilisation des puces à ADN est décrite : celles-ci occupent une place de choix dans la recherche étiologique de retard mental, en complément des autres tests de cytogénétique. Elle est illustrée par des cas cliniques mettant en lumière la stratégie diagnostique retenue.

Cette expérience donne donc lieu à une comparaison aussi bien au niveau des techniques que de l'analyse des résultats afin de déterminer, en fonction du but diagnostique recherché et des résultats attendus, quel serait le choix le plus judicieux.

Même si le domaine d'application étudié est ici restreint, cette technologie offre de nombreuses possibilités d'utilisation aussi bien dans le domaine des pathologies constitutionnelles qu'acquises en approchant le mécanisme physiopathologique des maladies par la recherche de gènes candidats et la mise en évidence de leur implication dans la pathologie du fait de leur altération, mais aussi en suivant le développement des tumeurs cancéreuses, et éventuellement en établissant un rôle pronostique de ces remaniements du génome.

# Les chromosomes et les anomalies chromosomiques

## 1 Chromosomes

Les chromosomes sont le support du matériel génétique, support de l'hérédité et de l'organisation de la vie cellulaire. Ils sont constitués d'ADN associé à des protéines formant la chromatine et sont localisés dans le noyau des cellules eucaryotes. Un chromosome est constitué d'une molécule d'ADN unique. L'ensemble des chromosomes humains comporte approximativement  $6.10^9$  bases, un chromosome représente 50 à 250 millions de bases. Chacun d'entre eux porte quelques centaines à milliers de gènes dont la taille varie de quelques milliers à deux millions de bases.

Leur aspect varie au cours du cycle cellulaire (figure 1): ils sont moins condensés en interphase et donc non visibles individuellement au microscope. Par contre, durant la division cellulaire, ils se condensent et s'individualisent. Leur identification est alors plus aisée en métaphase de la mitose.

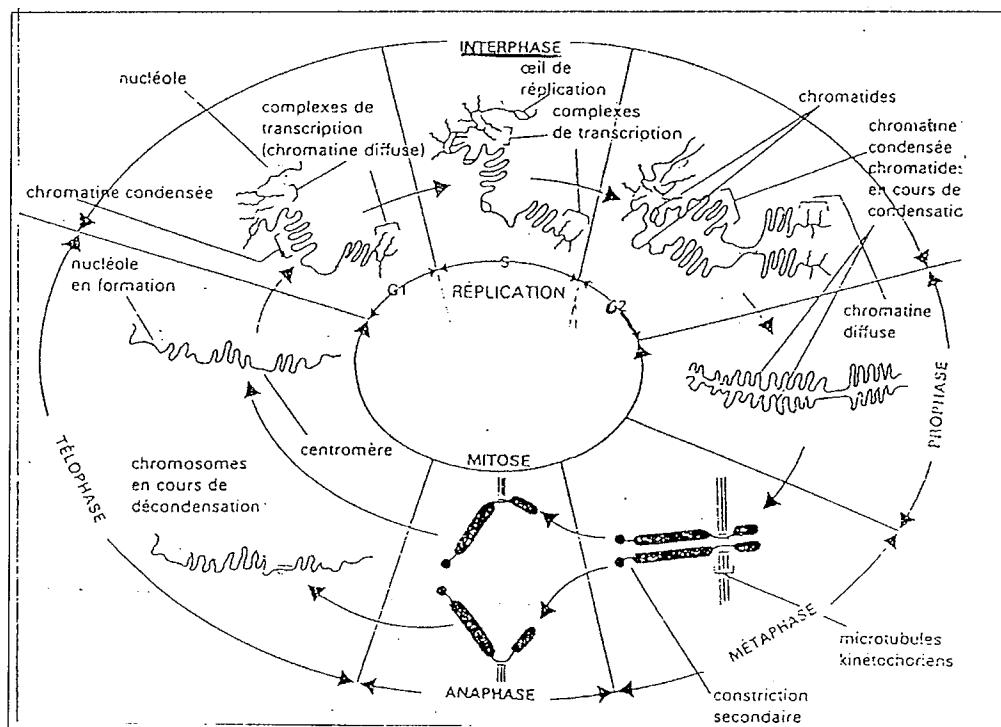


Figure 1 : Cycle cellulaire et aspect des chromosomes

Le caryotype humain normal comporte 46 chromosomes (2n) :

- ❖ 22 paires d'autosomes, notés de 1 à 22 en fonction de leur taille décroissante
- ❖ 1 paire de gono-somes, ou chromosomes sexuels: XX chez le sujet féminin, XY chez le sujet masculin.
- ❖ Chaque chromosome comporte un centromère, région qui contient le kinétochore, centre d'organisation des microtubules responsable de la fixation des chromosomes au fuseau mitotique lors de la mitose. Les deux chromatides soeurs sont unies dans leur zone hétérochromatique de chaque côté du centromère (figure 2).
- ❖ Chaque bras se termine par un télomère (en pter et qter), séquence ADN répétitive hautement conservée qui empêche les fusions avec d'autres chromosomes. Ces séquences jouent également un rôle dans l'attachement des télomères à l'enveloppe nucléaire, en particulier lors de la méiose. Le raccourcissement des télomères est un phénomène connu, et qui paraît associé au vieillissement cellulaire.
- ❖ De part et d'autre du centromère, une chromatide présente 2 bras: le bras court ou bras p, placé en haut sur un caryotype, et le bras long (bras q) placé en dessous du centromère (figure 4).
- ❖ Si le bras court est presque aussi long que le bras long, le chromosome est dit *métacentrique*; s'il est nettement plus court, le chromosome est dit *sub-métacentrique*. Quand il est encore plus court, le chromosome est appelé *sub-télocentrique* (le Y est sub-télocentrique). Enfin, si ce bras p est très petit, le chromosome est dit *acrocentrique* (figure 3). Les acrocentriques sont les chromosomes 13, 14, 15, 21, 22. Les acrocentriques, portent sur leurs bras courts de l'hétérochromatine et des régions impliquées dans l'organisation nucléolaire (NOR) et codant pour l'ARN ribosomal.

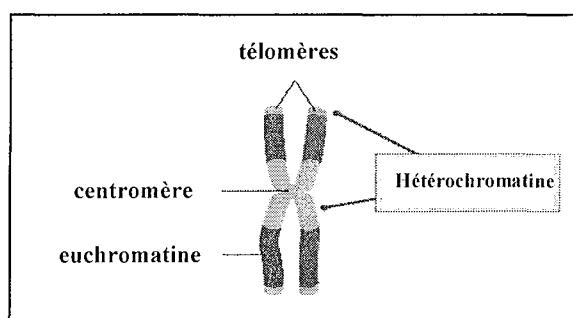


Figure 2 : Structure chromatinnienne d'un chromosome

- ❖



métacentrique submétacentrique acrocentrique télocentrique

Figure 3 : Position du centromère

- Chaque bras est arbitrairement divisé en régions, notées de 1 jusqu'à 4 (pour certains chromosomes) en partant du centromère. Chaque région est divisée en bandes, entités visibles -pâles ou foncées- après usage d'une technique de dénaturation. Chaque bande peut, si nécessaire, être divisée en sous-bandes (chromosomes en prophase, moins condensés, et donc montrant plus de détails). Ainsi, un emplacement sera défini par le numéro du chromosome où se trouve cet emplacement, suivi de la lettre indiquant le bras impliqué, suivie des numéros de région, de bande, voire de sous-bande (figure 4 et 5).

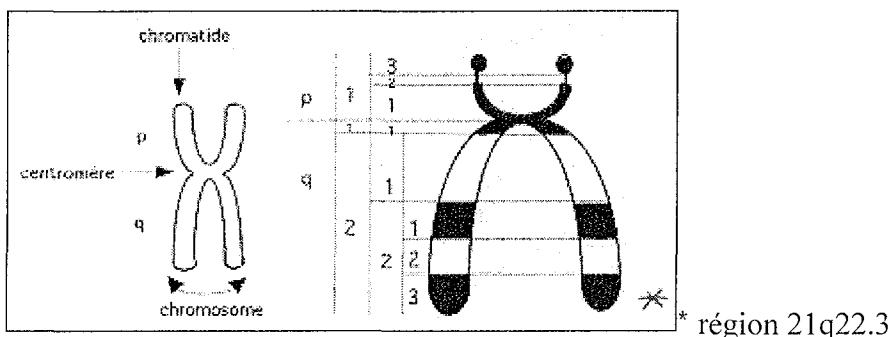


Figure 4 : Subdivision d'un chromosome 21 en bandes et sous-bandes (bandes R)

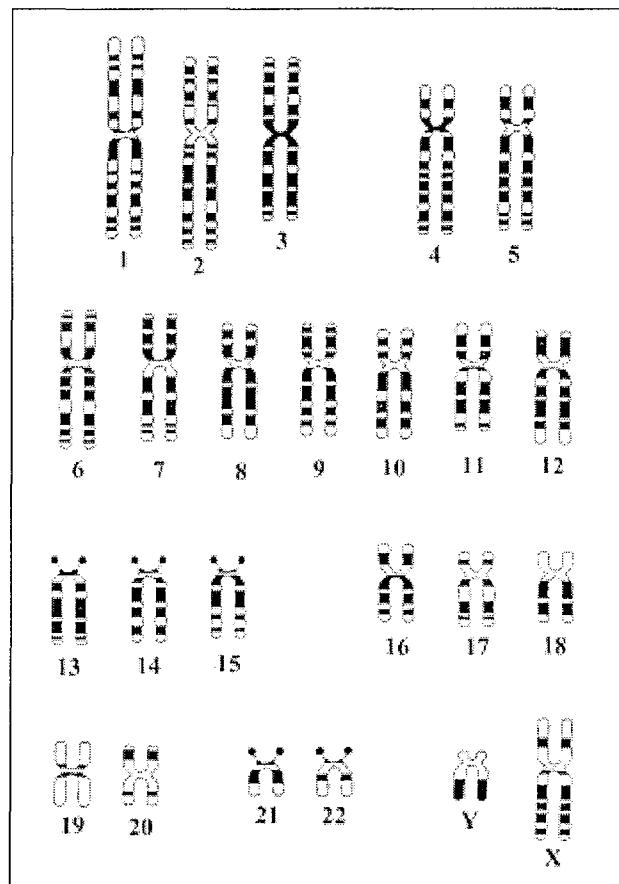


Figure 5 : Représentation des chromosomes humains en bandes G

## 2 Les anomalies chromosomiques

Elles sont soit constitutionnelles soit acquises au cours d'un processus de cancérisation (un seul organe touché). Ne seront évoquées ici que les premières.

Les anomalies constitutionnelles surviennent soit dès la conception aboutissant alors à une aberration homogène touchant toutes les cellules de l'organisme, soit au cours des premières divisions du zygote se traduisant par une anomalie en mosaïque, c'est-à-dire présente dans une partie des cellules de l'individu.

On distingue les anomalies de nombre et de structure. Elles touchent de 0,9 à 1 % des naissances avec ou sans conséquences phénotypiques et sont responsables de fausses couches spontanées.

## 2.1 Anomalies de nombre

Il s'agit d'anomalies du nombre des chromosomes par excès ou par défaut. Elles résultent d'une non disjonction des chromosomes homologues au cours de la méiose lorsque l'anomalie est homogène ou de la mitose lors des premières divisions du zygote quand il s'agit d'une anomalie en mosaïque. Elles conduisent à un avortement dans 35% des cas.

### 2.1.1 Les polyploïdies

La triploïdie correspond à la présence de trois chromosomes homologues, soit au total 69 chromosomes. C'est une anomalie qui survient à la suite de la fécondation d'un ovule par deux spermatozoïdes ou suite à la non éjection d'un globule polaire de l'ovule. La naissance d'enfants présentant cette anomalie est exceptionnelle et s'accompagne d'un phénotype anormal, les formes viables sont le plus souvent des mosaïques chromosomiques avec une proportion importante de cellules diploïdes.

### 2.1.2 Les monosomies

Il s'agit d'une perte de la totalité d'un chromosome. Elles sont létales *in utero* lorsqu'elles touchent un autosome.

### 2.1.3 Les trisomies

Elles correspondent à un gain de chromosome entier. La formule chromosomique est  $2n+1$ , soit 47 chromosomes. Les trisomies autosomiques homogènes sont létales *in utero* à l'exception des trisomies 13 et 18 (survie à 1 an de 1 à 5 %) et de la trisomie 21. Les trisomies 8 et 9 n'existent pratiquement que sous forme de mosaïque.

### 2.1.4 Les marqueurs chromosomiques

Ce sont des éléments chromosomiques non reconnaissables, noté mar;

- ¶ soit petit élément supplémentaire au caryotype constitutionnel, avec ou sans retentissement phénotypique (problème sur la conduite à tenir en diagnostic prénatal),

¶ soit élément de taille variable, souvent importante, présent dans un processus cancéreux. Les techniques de FISH ont montré que ce sont des chromosomes hautement remaniés, comportant des segments de chromosomes variés.

## 2.2 Anomalies de structure ou remaniements chromosomiques

Elles s'expliquent par des recombinaisons illégitimes de fragments d'ADN après cassure et recollement de fragments non homologues. Le remaniement est intra-chromosomique s'il intéresse un seul chromosome ou inter-chromosomique (translocation) lorsque deux chromosomes ou plus sont en cause. Une anomalie chromosomique déséquilibrée correspond à la perte ou au gain de matériel génétique, altérant le phénotype de l'individu et s'accompagnant souvent de retard mental. Une anomalie équilibrée n'occasionne ni perte ni gain de matériel chromosomique et ne se traduit généralement pas par un phénotype anormal, sauf dans le cas de pathologie du point de cassure : dans ce cas, la cassure chromosomique conduit à une modification de la structure ou de la régulation d'un gène. Lorsque celui-ci intervient dans le développement embryonnaire, son altération engendre un retard mental ou des malformations.

Ces anomalies sont résumées dans la figure 6.

### 2.2.1 Remaniements déséquilibrés

#### 2.2.1.1 Les délétions

C'est la perte d'une partie d'un chromosome, soit terminale, soit interstitielle (deux points de cassure et re-soudure). La perte de matériel est très variable, pouvant aller de quelques dizaines à plusieurs millions de paires de bases, d'où l'importance d'avoir à disposition des techniques de cytogénétique adaptées à la taille du déséquilibre recherché.

On peut citer comme exemple de délétion le syndrome 5p- ou syndrome du cri du chat (retard mental, malformations cardiaques et du larynx), le syndrome de Di George dû à une microdélétion du bras long du chromosome 22, non détectable au caryotype mais par FISH spécifique.

### 2.2.1.2 Les anneaux

Ce sont des délétions plus ou moins étendues (souvent peu importantes) aux deux extrémités d'un chromosome, suivies du recollement du segment intermédiaire (par absence de télomères), ce qui aboutit à une structure annulaire (il existe également des anneaux acentriques, mais ceux ci sont rapidement perdus, comme tout fragment ne possédant pas de centromère).

Ils sont rarement transmis à la descendance car un anneau est particulièrement instable et surviennent donc le plus souvent de novo. Ils se trouvent fréquemment en mosaïque.

Phénotypiquement, le retentissement peut donc être celui d'une délétion, mais aussi d'une duplication (anneau dupliqué). Le plus fréquemment rencontré est l'anneau du 13.

### 2.2.1.3 Les duplications

Il s'agit de la répétition d'un fragment chromosomique de taille variable avec un gain de matériel génétique. Elles entraînent généralement des anomalies morphologiques et/ou un retard mental.

### 2.2.1.4 Les isochromosomes

Ils résultent d'une anomalie de division du centromère au cours de la mitose, conduisant à un chromosome médiocentrique portant deux fois les mêmes gènes. Un individu porteur d'un isochromosome est donc trisomique pour l'un des bras du chromosome et monosomique pour l'autre bras.

## 2.2.2 Remaniements équilibrés

### 2.2.2.1 Les inversions

Elles impliquent la cassure d'un chromosome en deux points avec inversion du segment intermédiaire entre ces points et re-soudure. Le changement dans l'ordre des gènes ne provoque pas en général d'anomalie phénotypique mais elles peuvent aboutir à la formation de gamètes déséquilibrés, d'où un risque non négligeable de descendance anormale.

### 2.2.2.2 Les translocations

Elles sont souvent réciproques et n'aboutissent pas nécessairement à l'apparition d'un phénotype anormal mais peuvent conduire à la production de gamètes non équilibrés, d'où un risque pour la descendance.

On peut noter le cas particulier des translocations robertsoniennes caractérisées par des cassures au niveau des centromères des chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) et des échanges portant sur des bras chromosomiques entiers.

### 2.2.2.3 Les insertions

Un fragment de chromosome se casse, les régions flanquant ce fragment se recollent (comme dans une délétion), et le fragment se réinsère à un autre endroit, soit sur le même chromosome, soit sur un autre chromosome. C'est un remaniement équilibré.

Une insertion peut être directe (dir ins) si le fragment garde son orientation par rapport au centromère (la bande la plus proximale restant la plus proche du centromère).

Une insertion peut être inversée (inv ins) si la bande la plus proximale du fragment se retrouve la plus éloignée du centromère.

Cette aberration peut rester équilibrée et stable dans les cellules somatiques au cours des générations cellulaires. Mais elle est très instable en méiose; dans beaucoup de cas, le segment inséré est trop petit pour induire la formation d'un tétravalent. Même ainsi, la ségrégation en première division de méiose implique que la moitié des gamètes soit déséquilibrée. Si au contraire ce segment est assez large pour permettre la formation occasionnelle d'un tétravalent, alors 25% des gamètes seront normaux si l'insertion est directe, 0% si elle est inversée.

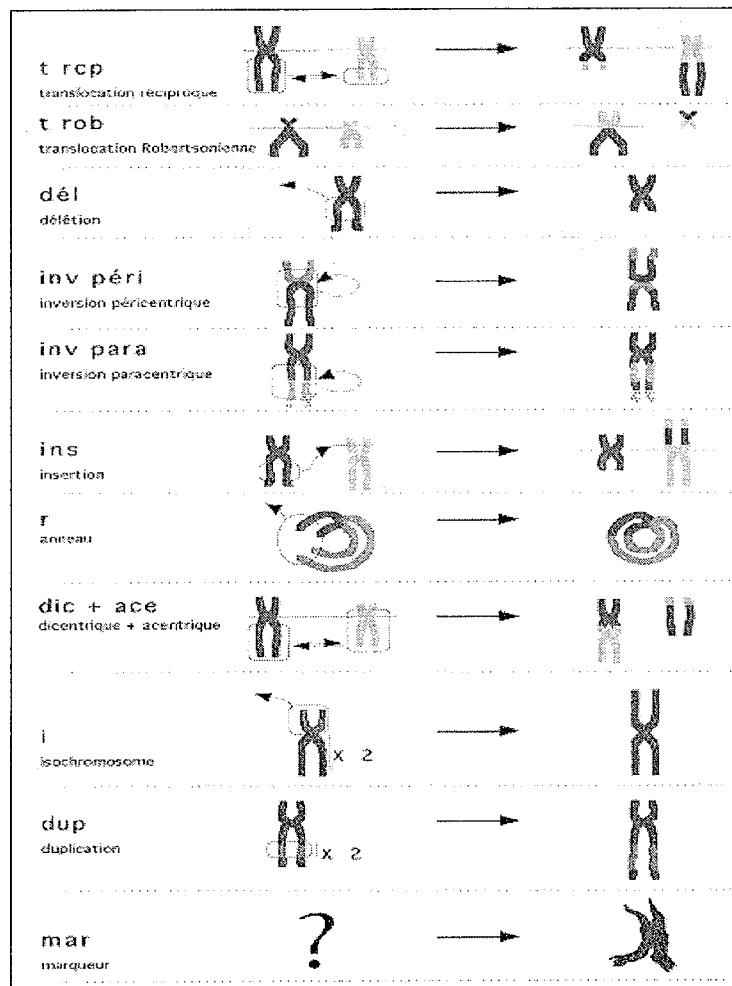


Figure 6 : Aberrations chromosomiques de structure

Ces anomalies chromosomiques sont donc multiples et variées et s'accompagnent ou non d'un phénotype anormal, d'où l'importance de mettre en œuvre les techniques de cytogénétique adéquates à leur caractérisation.

# Techniques de cytogénétique

Les techniques de cytogénétique constituent l'outil indispensable à la caractérisation d'une anomalie chromosomique dans le cadre d'une pathologie constitutionnelle ou acquise. Il existe tout un éventail de techniques mises à la disposition du cytogénéticien, qui vont du caryotype standard puis haute résolution à la cytogénétique moléculaire regroupant l'hybridation *in situ* en fluorescence, l'hybridation génomique comparative et son évolution représentée par l'hybridation génomique comparative en microréseau. Chacune d'entre elles présente des avantages et des limites, en fonction desquels sont définies les indications.

## 1 Caryotype standard

Son utilisation date de la fin des années 1950. Il s'agit de l'ensemble des chromosomes d'une cellule somatique classés selon des critères définis (taille, position du centromère, bandes chromosomiques). Cette technique a été la première capable d'identifier les anomalies chromosomiques à l'origine de pathologies acquises ou constitutionnelles.

### 1.1 Anomalies détectées

Il décèle des aneuploïdies telles que les monosomies et les trisomies, la présence de marqueurs chromosomiques, les délétions et duplications mais aussi les anomalies de structure telles que les translocations, les insertions ou les inversions, les chromosomes en anneau. Ces anomalies de nombre ou de structure identifiées par le caryotype sont estimées à 0,9 à 1 %.

### 1.2 Indications du caryotype

#### 1.2.1 Pathologies acquises

Il est utilisé dans la recherche d'anomalies acquises survenant au décours des processus tumoraux, tumeurs solides ou hématopoïétiques, dans un but diagnostique et pronostique. Il a abouti à faire ressortir des anomalies récurrentes voire spécifiques d'un type de tumeur. Il se révèle ainsi être un outil indispensable dans la caractérisation et la classification des hémopathies malignes pour lesquelles la présence de remaniements donnés constitue un

élément pronostique important influençant la stratégie thérapeutique à adopter. Ce domaine d'application ne sera pas abordé avec plus de détails dans cet exposé.

### **1.2.2 Pathologies constitutionnelles**

C'est l'examen de première intention lors de la suspicion d'une anomalie chromosomique :

->en période pré-natale en cas de signes d'appel biologiques ou échographiques, d'âge maternel supérieur à 38 ans, d'antécédent d'enfant porteur d'une anomalie chromosomique, de caryotype parental remanié ou pour un diagnostic de sexe pour les maladies liées à l'X,

->en période post-natale afin de rechercher une origine génétique à une pathologie donnée, comme par exemple un syndrome polymalformatif, un retard mental, une dysmorphie faciale, un retard de croissance, un retard d'acquisitions psychomotrices, un retard de langage. Il peut être réalisé à l'adolescence devant un défaut de développement pubertaire afin de rechercher une anomalie des gonosomes tels qu'un syndrome de Turner (45,X) ou un syndrome de Klinefelter (47,XXY). Chez l'adulte, il est demandé au cours d'un bilan de stérilité, de fausses couches à répétition laissant supposer la présence d'une translocation équilibrée conduisant à une anomalie déséquilibrée chez le fœtus ou au cours d'enquête familiale.

Il a ainsi contribué à la caractérisation d'aneuploïdies telles que la trisomie 21. Cette anomalie est la première cause de retard mental non héréditaire chez l'enfant. Elle touche une naissance sur 700, résultant d'une non disjonction, le plus souvent lors de la première division méiotique maternelle (95% des cas). Un diagnostic pré-natal sur cellules de liquide amniotique est indiqué chez les femmes enceintes de plus de 38 ans (la non disjonction des chromosomes augmente avec l'âge) ou en présence de signes d'appel échographiques (nuque épaisse, absence des os propres du nez, sténose duodénale, malformation cardiaque) ou d'augmentation des marqueurs sériques (alpha foeto-protéine, bêta HCG, oestriol libre non conjugué). L'étude du caryotype a été à la base de la découverte de l'origine chromosomique de la pathologie et conduit à un diagnostic aisément de cette aneuploïdie.

Un autre exemple d'anomalie chromosomique plus fine à l'origine de retard mental, possiblement identifiable au caryotype, est la délétion de l'extrémité du bras court du chromosome 4 responsable du syndrome de Wolf Hirschhorn (Coffin et al. 1971). Il se traduit par des anomalies crano-faciales, un hypertélorisme, une hypotonie, un retard de croissance, une microcéphalie, une dysgénésie du corps calleux, une épilepsie et des troubles du langage, un retard mental sévère. Sa fréquence est de une sur 50 000 naissances.

## 1.3 Réalisation

### 1.3.1 Prélèvement

Il s'agit le plus souvent d'un prélèvement sanguin sur tube hépariné. D'autres prélèvements sont possibles : les cultures de fibroblastes après prélèvement de peau, voire un frottis buccal, sont utiles lorsque l'anomalie n'est pas présente dans les cellules sanguines mais seulement dans les fibroblastes (tétrasomie 12p ou syndrome de Pallister-Kilian). En période prénatale, l'étude du caryotype foetal est réalisée à partir d'un prélèvement de liquide amniotique ou plus précocement sur villosités choriales.

### 1.3.2 Culture

A partir d'un prélèvement sanguin, quelques gouttes de sang sont mises en culture pendant 72 heures à 37°C dans un milieu riche supplémenté en sérum. Les lymphocytes T sont stimulés par un mitogène, la phytohémagglutinine (PHA) qui provoque leur division cellulaire. Les mitoses sont bloquées en métaphase par la colchicine qui inhibe le fuseau mitotique afin de visualiser les chromosomes sous leur forme la plus condensée. Après un choc hypotonique (KCl 0,075 M) pour provoquer un gonflement des cellules et une dispersion des chromosomes, une fixation à l'éthanol et l'acide acétique (trois volumes d'éthanol pour un volume d'acide acétique), l'étalement sur lame et la coloration sont réalisés.

Les chromosomes sont identifiés par une technique de bandes après coloration spécifique. Les bandes G sont obtenues par un traitement dénaturant enzymatique par la trypsine et une coloration au Giemsa (GTG) alors que la technique en bandes R inclut un traitement par la chaleur (heat) et coloration au Giemsa, montrant une image en bandes inversée (RHG).

## 1.4 Avantages

La réalisation du caryotype présente l'intérêt d'explorer la totalité des quarante six chromosomes humains.

## 1.5 Limites

Il est cependant limité à la détection d'aneuploïdies et d'anomalies de structure de grande taille (10 Mb) du fait de sa limite de résolution : un caryotype standard a une résolution de 400 bandes pour un génome haploïde (soit environ 50 gènes en moyenne par bande). Si les remaniements concernent des régions qui ont la même affinité tinctoriale, les translocations ne sont pas vues au caryotype standard et nécessitent une technique de FISH.

Lors des remaniements chromosomiques complexes, il peut parfois être pris en défaut et ne permet pas toujours de déterminer l'origine chromosomique d'un marqueur surnuméraire, d'où son association à une technique de cytogénétique moléculaire telle que la FISH.

## 2 Caryotype en haute résolution

### 2.1 Principe

Les techniques de haute résolution (Yunis 1976) ont permis d'atteindre 850 à 1000 bandes. Elles incluent une étape de synchronisation du cycle cellulaire et un blocage des cellules en prophase. L'arrêt des divisions en phase S est obtenu par un traitement au méthotrexate. Le cycle est relancé de façon synchrone dans toutes les cellules en division par ajout de thymidine ou de bromodéoxyuridine (BrDu). Les mitoses sont alors bloquées au stade de la prophase, après ajout, pendant un temps court, de colchicine, 5h15 précisément après la relance. Les chromosomes sont alors moins condensés, rendant possible la visualisation d'un plus grand nombre de bandes.

### 2.2 Indications

C'est un examen de deuxième intention, réalisé après un caryotype standard pour préciser les points de cassure lorsqu'un remaniement a été dépisté ou pour rechercher un microremaniement quand la clinique évoque très fortement l'existence d'une anomalie alors que le caryotype standard est normal.

Il a ainsi révélé des microdélétions dans le cadre des syndromes de gènes contigus ou syndromes microdélétionnels définis comme la perte de fragment chromosomique de petite taille (< 3 mégabases) décelable uniquement par l'utilisation des techniques de haute résolution ou de cytogénétique moléculaire. La notion théorique de syndrome des gènes

contigus a été introduite par Schmickel (1986) pour définir l'ensemble de ces syndromes : le phénotype serait attribué à la perte de différents gènes physiquement proches sur la région chromosomique délétée (figure 7). Cette notion est démontrée pour certains syndromes : le syndrome W.A.G.R (tumeurs de Wilms, Aniridie, anomalies Génitales, Retard mental) et le syndrome de Williams.

Une dizaine de syndromes microdélétionnels sont maintenant reconnus et bien décrits (tableau1) : on peut citer les syndromes de Prader-Willi et Angelman (15q11.2), Smith Magenis (17p11.2), le syndrome de WAGR (11p13) dont les anomalies chromosomiques sont parfois visibles sur un caryotype en haute résolution et les syndromes de Miller-Dieker (17p13.3), Di George et velo cardio facial (22q11.2) dont les délétions qui sont à l'origine de la pathologie ne peuvent être révélées que par FISH.

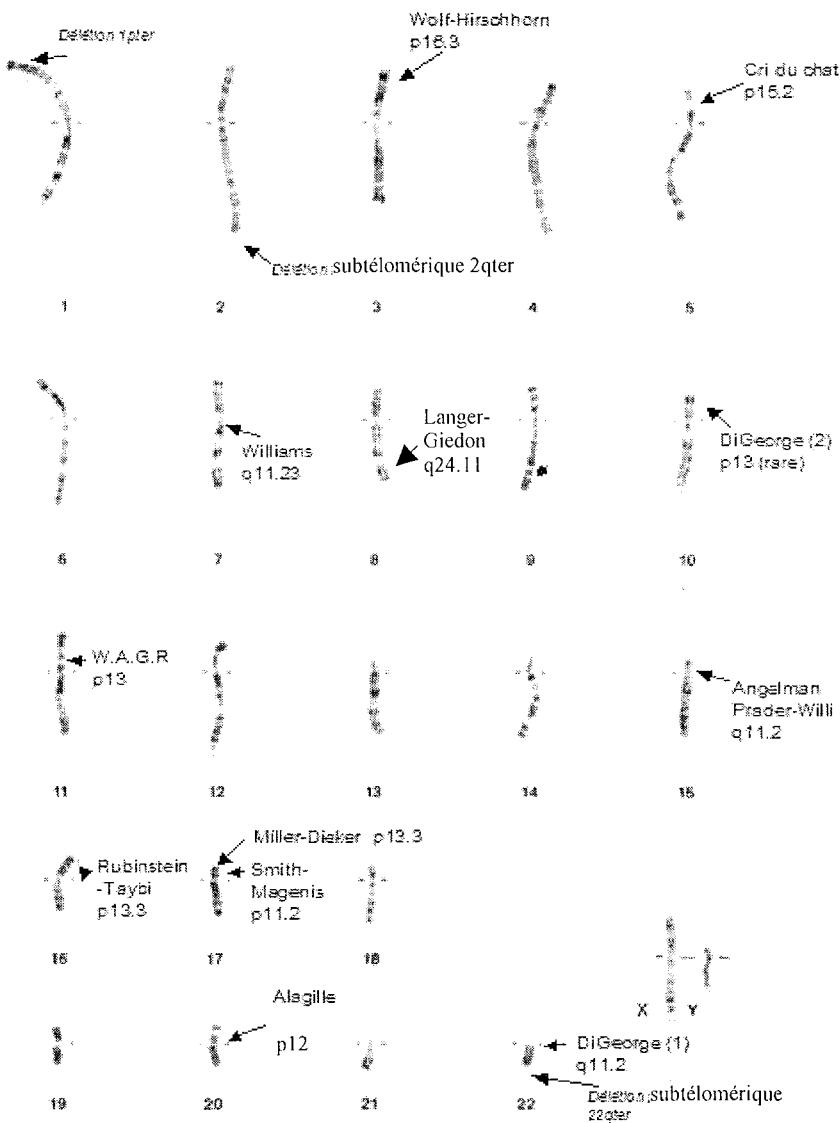


Figure 7 : Caryotype humain en haute résolution en bandes R. Localisation chromosomique des principaux syndromes microdélétionnels connus. (<http://college-genetique.igh.cnrs.fr/Enseignement/genchrom/Figure4.JPG>)

Locus	Syndrome Description clinique	Clinique	Remarques
7q11.2	Williams et Beuren	Sténose supraventriculaire, hypercalcémie néonatale, dysmorphie faciale caractéristique, troubles du comportement spécifiques	
8q24.1	Langer-Giedion-trichorhino-phalangien type II	Cheveux rares, nez en poire, épiphyses en cônes, exostoses multiples, retard mental inconstant	
17p13.3	Miller-Diecker	Lissencéphalie type I (agyrie, pachygryie), souffrance neurologique néonatale, épilepsie, dysmorphie faciale, déficience psychomotrice sévère	90% microdélétions mais risque de microtranslocations parentales
17p11.2	Smith-Magenis	Retard mental modéré, troubles du comportement (colères, auto et hétéroagressivité), polyembolokoïamanie, troubles du sommeil, dysmorphie discrète...	
22q11.2	DiGeorge/Velo Cardio Facial	Cardiopathie conotroncale, hypocalcémie par hypoplasie des parathyroïdes, hypoplasie thymique, dysmorphie faciale, fente palatine...	Grande variabilité phénotypique. 10 à 15% des parents porteurs de la microdélétion
15q11-q13	Prader-Willi	Hypotonie néonatale, hypogénitalisme, obésité par hyperphagie, retard mental modéré, troubles du comportement, dysmorphie faciale modérée	Microdélétion paternelle (70 %) ou disomie uniparentale (30 %). Anomalie de l'empreinte
15q11-q13	Angelman	Retard mental sévère, langage quasi inexistant, rires et sourires immotivés, épilepsie, ataxie, dysmorphie discrète	Microdélétion maternelle (70 %) ou disomie uniparentale (4-5 %) ou mutation UBE3A (20 %) ou du centre de l'empreinte
16p13.3	Rubinstein Taybi	Retard mental sévère, dysmorphie faciale : sourcils épais, fentes palpébrales anti mongoloïdes, cils longs, nez crochu, anomalies des extrémités avec pouces et orteils larges	20 % délétions. Mutations du gène CBP
20p12.1	Alagille	Hypoplasie des canaux biliaires intrahépatiques, cholestase néonatale, sténose périphérique des artères pulmonaires, embryotoxon postérieur, vertèbres en aile de papillon, dysmorphie caractéristique	Microdélétion rare. Mutations du gène JAG, transmission dominante

Tableau 1 : Signes cliniques majeurs des principaux syndromes microdélétionnels connus (<http://college-genetique.igh.cnrs.fr/Enseignement/genchrom/Tableau3.JPG>)

## 2.3 Avantages

Il présente l'avantage de fournir une approche globale, étudiant la structure de l'ensemble des vingt trois paires de chromosomes, contrairement à la FISH.

## 2.4 Limites

Elles sont dues à la réalisation et aux difficultés de lecture du caryotype : les chromosomes sont plus longs et parfois enchevêtrés, d'où une plus grande difficulté de classement.

Il faut au moins deux mitoses analysables pour chaque paire chromosomique à un seuil de résolution de plus de 550 bandes.

# 3 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

## 3.1 Principe de l'hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simple brin de séquences complémentaires et qui conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Cette association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et la thymine (T) (ou l'uracile U) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). La formation et la stabilité des duplex dépendent de nombreux facteurs : composition en bases, longueur des duplex.

L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire impliquant la mise en présence d'au moins deux brins simples d'acides nucléiques dans des conditions physico-chimiques précises. Le brin dont on connaît au moins une partie de la séquence est une **sonde**, l'autre brin, celui que l'on souhaite caractériser, constitue la **cible**. L'un des deux brins est marqué par couplage chimique avec une molécule pouvant générer un signal.

Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radio-actifs ("sondes chaudes" : tritium H3) ou par des produits non radio-actifs (sondes dites "froides") fluorescents.

## 3.2 Hybridation *in situ* en fluorescence : FISH (figure 8)

La FISH (Fluorescence *in Situ* Hybridization) repose sur la capacité d'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires. La région à étudier (située sur un chromosome métaphasique

ou au sein d'un noyau en interphase), après dénaturation préalable par un traitement chimique pour dissocier les deux brins d'ADN, est repérée grâce à une sonde d'ADN de séquence complémentaire et antiparallèle du fragment recherché.

Le principe général est celui de l'hybridation moléculaire, les marqueurs utilisés sont des molécules fluorescentes (Pinkel et al. 1986).

Après une étape de culture cellulaire et d'étalement des chromosomes sur lame (ou seulement étalement du prélèvement dans le cas de noyaux interphasiques seuls), les sondes spécifiques de la région à étudier, commerciales ou fabriquées au laboratoire à partir de clones de séquence connue (BACs), marquées par un fluorophore, sont dénaturées et hybridées sur les chromosomes, les deux partenaires de l'hybridation ayant été rendus monocaténaires. La lecture se fait au microscope à fluorescence en utilisant le DAPI comme contre colorant.

Cette technique détermine la position d'un fragment d'ADN dans le génome ; le repérage se fait par rapport au bras du chromosome (p : bras court et q : bras long), en utilisant une sonde témoin cohybridée parallèlement à la sonde d'intérêt.

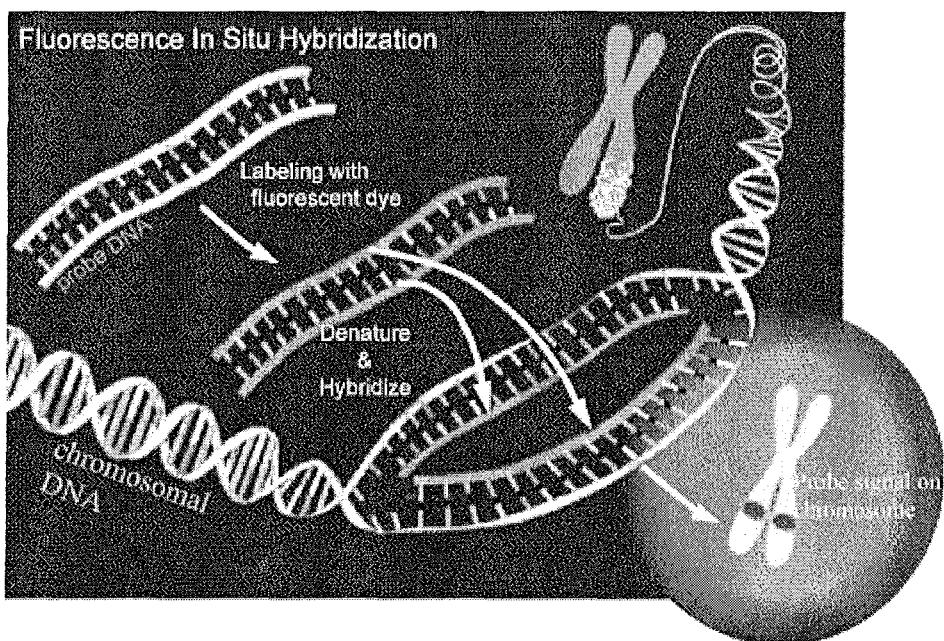


Figure 8 : Principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence

### 3.2.1 Types de sondes utilisées

Il existe différents types de sondes :

- les sondes de peinture marquent un chromosome dans sa totalité. Elles sont utiles pour déterminer l'origine d'un marqueur chromosomique ou pour connaître la nature d'un réarrangement complexe impliquant plus de deux chromosomes.

- les sondes centromériques marquent le centromère des chromosomes et sont très utiles pour évaluer une mosaïque en cas d'aneuploïdie.

- les sondes spécifiques de locus sont utilisées en particulier pour déceler des syndromes microdélétionnels.

La résolution est égale à la taille de la sonde, soit 35 à 200 kb.

Parmi ces sondes, on distingue les sondes subtélomériques : elles explorent spécifiquement les régions subtélomériques des chromosomes, régions riches en gènes dont on connaît l'implication dans les retards mentaux.

On peut citer l'exemple du système ToTelvision (Vysis) dont le but est de repérer en 15 hybridations simultanées les régions subtélomériques situés à 300 kb des séquences télomériques de chaque bras chromosomique et ainsi de révéler les anomalies de ces régions.

La multi-FISH (Gray et *al.* 1991) et le caryotype spectral (SKY) (Schrock et *al.* 1996) constituent un autre exemple de l'utilisation de ces sondes : ces techniques qui, par l'utilisation d'une combinaison de fluorophores différents, conduisent au marquage simultané et spécifique de tous les chromosomes (Speicher et *al.* 1996). Elles présentent un intérêt dans la mise en évidence d'anomalies complexes impliquant plusieurs chromosomes (Seidel et *al.* 2003), la caractérisation de marqueurs, l'identification des chromosomes impliqués dans les translocations lorsque le caryotype a atteint ses limites (Uhrig et *al.* 1999).

### **3.2.2 Cibles**

#### **3.2.2.1 Noyaux interphasiques**

Un frottis cellulaire est réalisé à partir de sang frais afin d'obtenir un étalement des noyaux cellulaires interphasiques. Il n'y a donc pas d'étape de culture cellulaire et le résultat peut être obtenu rapidement. Cependant, il n'est pas possible de connaître la localisation chromosomique de la séquence mise en évidence. Ils sont surtout utilisés pour déceler une anomalie dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle au cours des hémopathies malignes ou pour apprécier rapidement une éventuelle mosaïque constitutionnelle.

#### **3.2.2.2 Chromosomes métaphasiques**

C'est la cible de choix en cytogénétique constitutionnelle. Ils sont obtenus de la même façon que pour la réalisation d'un caryotype.

### 3.3 Indications

Son développement a été initié au début des années 1980. C'est un complément indispensable aux techniques de cytogénétique conventionnelles dans la mesure où cette technique permet de préciser une anomalie détectée ou suspectée lors d'un caryotype standard. Elle peut être mise en œuvre en première intention lorsque la clinique est évocatrice d'un syndrome microdélétionnel, compte tenu de son pouvoir de résolution.

#### 3.3.1. Caractérisation d'une anomalie (approche par une orientation cytogénétique)

L'étude des anomalies chromosomiques structurales découvertes de façon fortuite ou orientée est l'une des applications majeures de la FISH. La caractérisation d'une anomalie de structure chromosomique peut être effectuée le plus souvent grâce à la cytogénétique conventionnelle. C'est le cas notamment des aneusomies de recombinaison dues au déséquilibre d'une aberration chromosomique parentale (malségrégation d'une translocation, remaniement d'une inversion...). Cependant, dans un certain nombre de cas cette technique n'est pas suffisante. La découverte d'une anomalie apparue *de novo* et/ou complexe nécessite parfois le recours à la cytogénétique moléculaire quand l'observation des bandes chromosomiques n'est pas déterminante pour en connaître avec certitude l'origine. Le choix des sondes s'effectue grâce à l'orientation donnée par l'aspect chromosomique obtenu par différentes techniques classiques (bandes G, R, Q...) et parfois grâce aux données cliniques évocatrices. Sans aucune orientation, l'application de techniques récentes peut être d'un apport précieux : CGH, Multi-FISH. Mais la mise au point difficile, la lourdeur et le coût de ces dernières doivent les faire réserver à une utilisation de dernier recours. L'origine de certains anneaux, de petits chromosomes surnuméraires, d'un deuxième chromosome impliqué dans une translocation de petite taille, d'une translocation ou d'une insertion apparue *de novo* sont autant d'indications de l'utilisation de la FISH dans ce cadre. La vérification d'une délétion, d'une duplication, la précision des points de cassures de certains remaniements conduit par ailleurs à un affinement du diagnostic.

### **3.3.2 Recherche d'un syndrome microdélétionnel connu (approche par une orientation clinique spécifique)**

L'apparition des techniques de haute résolution chromosomique dans les années 1980 a été à l'origine de la découverte des microremanierments dans des syndromes individualisés dans les années 60. Néanmoins, dans la grande majorité des syndromes, un chromosome candidat avait été identifié grâce aux techniques standard, par la découverte de translocations intéressant la région correspondante. Quand ces nouveaux syndromes sont décrits et reconnus cliniquement, la cytogénétique moléculaire peut remplacer ou compléter la technique de haute résolution, d'autant plus que des délétions inframicroscopiques ont été décrites.

De nombreuses entités cliniques bien reconnues peuvent être associées de manière sporadique à une microdélétion. Il s'agit de maladies de transmission autosomique dominante ou liée à l'X, retrouvées isolées ou associées dans le cadre des syndromes des gènes contigus. Le mécanisme dans ces cas est lié à une haploinsuffisance (gènes en simple dose par monosomie accidentelle). C'est le cas du piebaldisme et de la délétion en 4q13, de l'holoprosencéphalie et des délétions en 2p21, 7q36, 21q22.3... Certains cas ont fourni un raccourci pour la découverte de la localisation et du clonage de gènes impliqués dans des pathologies humaines. Pour les syndromes les plus fréquemment associés à une microdélétion, la bonne connaissance de l'expression phénotypique de ces pathologies est nécessaire pour prescrire à bon escient la recherche spécifique d'un microremanierment.

### **3.3.3 Approche sans orientation clinique dans le cadre du retard mental**

La recherche de la cause d'un retard mental inexplicable après épuisement des moyens cliniques et paracliniques classiques peut amener à l'utilisation de techniques spécialisées : étude de l'ensemble des régions subtélomériques, FISH multicolore, CGH, biopuces à ADN.

### **3.3.4 Cytogénétique constitutionnelle pré natale**

En dehors de la caractérisation des aberrations de structure et de la détection de délétions inframicroscopiques sur certains signes d'appel échographiques, la FISH dans le domaine du diagnostic prénatal, aboutit à la détection rapide des principales aneuploïdies (chromosomes 13, 18, 21, X, Y) correspondant à la majorité des anomalies découvertes à ce stade d'évolution. La FISH sur noyaux interphasiques ne nécessite pas de mise en culture (culture de 10-15 jours en moyenne pour le liquide amniotique), une réponse peut être donnée en 24 à

48h après le prélèvement. Une confirmation reste nécessaire par la cytogénétique conventionnelle après culture pour étude du caryotype complet qui reste la référence. Cette technique semble particulièrement intéressante lorsque le risque d'aneuploïdie est important : âge maternel avancé, signes d'appel échographiques évocateurs, taux de risque calculé élevé des marqueurs sériques maternels, ou en cas d'anomalie du développement détectée en fin de grossesse. De plus la FISH interphasique peut être un complément précieux en cas de faible nombre de métaphases analysables ou d'un examen conventionnel de qualité insuffisante. Cette même technique de FISH interphasique est exploitée depuis peu dans le cadre du diagnostic préimplantatoire : diagnostic de sexe dans les affections liées à l'X, détection des aneuploïdies, mise en évidence des déséquilibres éventuels d'un remaniement chromosomal parental (translocation, insertion). La mise au point (difficile) de la sélection de cellules fœtales permettra peut-être, dans l'avenir, l'utilisation de la FISH interphasique pour la détection des principales aneuploïdies directement dans le sang maternel.

### 3.4 Limites

Si l'apparition de la FISH a constitué un progrès remarquable dans la mise en évidence d'anomalies chromosomiques submicroscopiques, utilisée en complément de l'étude du caryotype, la spécificité des sondes utilisées conduit à une répétition de manipulations : c'est donc une technique longue et non automatisable. De plus, les sondes sont en nombre limité et ne permettent donc pas d'étudier le génome dans sa globalité. C'est pourquoi s'est développée en parallèle une technique dont le principe dérive de la FISH : l'hybridation génomique comparative.

## 4 Hybridation génomique comparative : CGH

### 4.1 Principe et mise en oeuvre

La CGH est une technique développée entre 1989 et 1992 par Kallioniemi et *al.* Son principe repose sur la cohybridation équimoléculaire et compétitive de deux ADN, celui du patient et celui d'un témoin normal, marqués par un fluorophore différent (SpectrumGreen ou FITC et SpectrumRed) sur des chromosomes métaphasiques normaux sur lame. Ceux-ci sont obtenus à partir de lymphocytes T stimulés par la phytohemagglutinine, mis en culture 72 heures à 37°C. La résolution obtenue doit être de 400 à 550 bandes. Un microgramme d'ADN du

patient et du témoin sont extraits à partir de leucocytes sanguins circulants et marqués par un fluorophore différent au cours d'une étape de nick translation. Après ajout d'ADN Cot-1 bloquant les séquences répétées de l'ADN, ils sont réunis et purifiés par précipitation à l'éthanol en présence d'acétate de sodium 3 M (1/10 volume). Après dénaturation des sondes et des chromosomes à 73°C, l'hybridation est réalisée pendant 72 heures à 37°C. Les lames sont ensuite lavées (SSC) à deux températures différentes pour éliminer les hybridations aspécifiques qui correspondent à l'hybridation de l'ADN sur des séquences non complémentaires. La présence de fluorophores différents en quantité équimoléculaire pour les deux ADN conduit à l'obtention d'un ratio de fluorescence égal à un. Après classement des mitoses choisies, l'analyse des images microscopiques grâce à un logiciel adapté aboutit au calcul d'un ratio de fluorescence normalisé. Une délétion ou une amplification de matériel génique se manifeste par un excès de fluorescence d'un des deux fluorophores par rapport à l'autre. Ceci se matérialise sous la forme d'une déviation du ratio de fluorescence dans la région chromosomique correspondant au déséquilibre.

## 4.2 Utilisations

Elle dépiste les variations quantitatives (perte ou gain) de tout ou partie de chromosomes sur l'ensemble du génome. Peuvent ainsi être découvertes des délétions ou amplifications interstitielles, les déséquilibres résultant d'une transmission d'un seul des deux partenaires d'une translocation. La CGH présente un intérêt comme technique de deuxième intention, en complément du caryotype.

## 4.3 Avantages

Tout comme le caryotype, cette technique cible la quasi-totalité du génome. Elle présente l'avantage d'être plus sensible que le caryotype standard et révèle des pertes ou gains de matériel chromosomique, tout en précisant la localisation sur le chromosome.

Elle détermine rapidement l'origine de matériel chromosomique additionnel ou d'un marqueur, contrairement à la FISH qui peut néanmoins être utilisée en parallèle pour une localisation chromosomique précise de l'anomalie détectée.

Elle ne nécessite pas d'étape de culture cellulaire.

## 4.4 Limites

Sa limite de résolution est de 5 Mb : elle ne peut donc pas détecter des réarrangements intragéniques mais donne une indication sur la région chromosomique en cause.

Les modifications affectant les régions péricentromériques et l'hétérochromatine ne sont pas visibles. De même, les anomalies subtélomériques ne sont pas identifables en raison de la diminution de fluorescence vers les extrémités des chromosomes.

Les altérations présentes dans une petite subpopulation de cellules ne sont pas retrouvées : la CGH ne détecte pas en effet les déséquilibres génomiques si la population anormale constitue moins de 50% de l'échantillon analysé.

Les anomalies équilibrées ne sont pas décelées.

# Hybridation génomique comparative en microréseau (CGH microarray) ou puce à ADN

## 1 Principe (figure 9)

A partir de 1997, s'est développée la CGH microarray (Solinas-Toldo et *al.*, 1997, Pinkel et *al.*, 1998) : elle constitue une évolution de la technique précédente dans la mesure où les chromosomes métaphasiques sont remplacés par des séquences d'ADN génomique issues de clones de séquence connue et vérifiée, fixées sur une lame de verre. La résolution de la technique est fonction du nombre de clones et de la distance entre ces clones répartis sur l'ensemble du génome humain.

Le principe est identique à celui de la CGH sur chromosomes métaphasiques. Toutefois, les molécules fluorescentes nécessaires au marquage sont ici des cyanines (Cy3 et Cy5) incorporées à l'ADN au cours d'une réaction de random priming. La détection se fait par excitation de ces cyanines fluorescentes par des lasers émettant à leurs longueurs d'onde d'excitation. L'émission d'un signal à des longueurs d'onde différentes engendre la détection de deux signaux différents dus à la présence des deux ADN. Ils sont alors quantifiés (calcul du ratio d'intensité du signal aux deux longueurs d'onde d'émission) afin de réaliser une analyse comparative du matériel génétique du patient par rapport au témoin. Ceci se traduit par la présence de signaux fluorescents de couleur variable sur la lame.

L'analyse statistique des données fournies par le scanner permet de valider la technique par l'analyse des réplicats pour un même clone et une normalisation des données en tenant compte du bruit de fond.

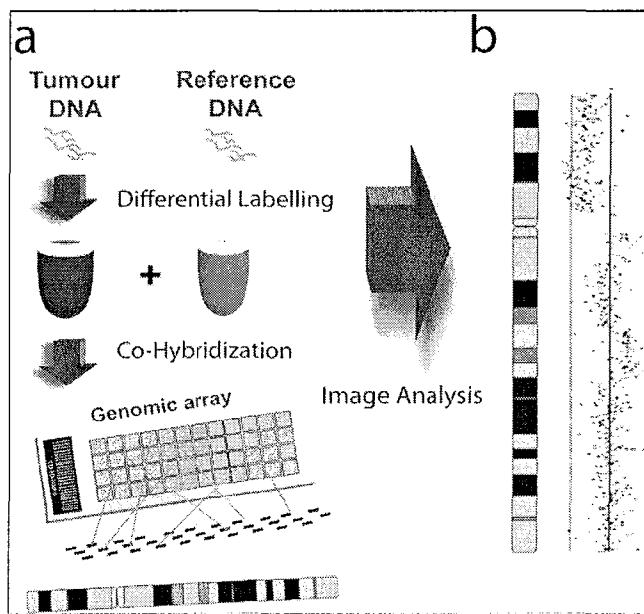


Figure 9 : Principe général de la CGH microarray : a) les ADN du patient et du témoin sont marqués avec Cy3 et Cy5 respectivement, rassemblés et cohybridés de façon compétitive sur des clones de séquences connues fixés sur une lame de verre. b) L'analyse des images se fait par un scanner couplé à un logiciel d'interprétation.

## 2 Avantages

L'intérêt de la technologie de CGH sur puce est lié :

- à une localisation précise de l'anomalie sur le chromosome du fait de la connaissance de la séquence des clones et de leur localisation,
- à la possibilité de pouvoir réaliser des centaines d'analyses ciblées en un seul test,
- au fait de s'affranchir entièrement des contraintes de culture cellulaire,
- à la possibilité d'automatiser l'interprétation des résultats,
- à la possibilité d'augmenter la fiabilité des résultats par la présence sur la lame des clones en plusieurs exemplaires, non adjacents : de ce fait, la reproductibilité du signal est un critère de validation des résultats.

## 3 Limites de la technique

### 3.1 Réarrangements non visibles

Les réarrangements sans modification quantitative du matériel génétique (translocations réciproques, inversions) ne peuvent pas être mis en évidence par cette technique.

### 3.2 Problème des polymorphismes

Des polymorphismes de nombre de copies sont détectés par cette technique : ils peuvent être à l'origine d'un problème d'interprétation des résultats obtenus. Il est en effet nécessaire de déterminer dans quelle mesure la délétion ou l'amplification est à l'origine de la pathologie. Il peut être d'autre part intéressant d'étudier ces polymorphismes afin d'établir s'ils constituent des facteurs de risque de pathologies comme le sont les « single nucleotide polymorphism (SNP) ». Il sera donc nécessaire de constituer une base de données regroupant les polymorphismes répertoriés dans différentes ethnies.

Ces polymorphismes s'expliquent par la présence de blocs de duplications segmentaires correspondant à des blocs de séquences fortement homologues répartis sur l'ensemble du génome humain. Ceci conduit à de fréquentes recombinaisons et des réarrangements chromosomiques récurrents. Ces régions sont donc le siège de polymorphismes de nombre de copies : 119 régions polymorphes (dont 73 inconnues jusqu'alors) ont été mises en évidence à partir d'un panel de 47 témoins des quatre continents à l'aide d'une technique de CGH microarray comprenant des BACs sélectionnés dans les points chauds de recombinaison (Sharp *et al.* 2005).

Sebat *et al.* (2004) et Iafrate *et al.* (2004) ont par ailleurs identifié respectivement 76 et 255 loci sur l'ensemble du génome grâce à la CGH microarray, Buckley *et al.* (2005) ont quant à eux ciblé leur recherche sur le chromosome 22. Bejjani *et al.* (2005) ont également localisé des régions polymorphes sur les régions chromosomiques 2p, 5q, 6p, 7q et 14q (soit 3,4% des loci étudiés) à partir d'une étude de 50 sujets sains issus de quatre ethnies différentes. Il ressort de la comparaison de ces études que la mise en évidence de ces polymorphismes dépend de la résolution de la technique, de la taille de la population étudiée et que de nombreuses variations de séquences sont encore à identifier. Ainsi, il apparaît nécessaire de tester les lames commercialisées dans un but de diagnostic sur un panel d'ADN témoins.

### 3.3 Mosaïcisme

La présence de deux populations cellulaires avec des compositions chromosomiques différentes peut conduire à un problème d'interprétation des résultats : en effet, selon la proportion de cellules avec un nombre de copies normal, il peut se produire une compétition d'hybridation sur les clones, conduisant à une déviation moins importante qu'attendue du rapport de fluorescence. C'est le cas par exemple lors de la recherche d'anomalies chromosomiques dans les tissus tumoraux : la présence de tissu sain peut conduire à une sous estimation de la délétion ou duplication. Hodgson et *al.* (2001) ont évalué l'influence d'une population de cellules normales sur la capacité à détecter une anomalie et ont ainsi révélé la nécessité d'avoir au moins 40 % d'ADN présentant une altération pour révéler une variation d'une copie. Par ailleurs, Schaeffer et *al.* (2004) ont décelé une trisomie 20 associée à une trisomie 21 en mosaïque : une analyse par FISH a établi le taux de mosaïcisme à 30 %. La détection d'une population cellulaire en mosaïque peut actuellement aller jusqu'à 20 % (Vermeesch et *al.* 2005).

## 4 Description de la technique et points techniques déterminant la qualité de celle-ci

Il s'agit ici de décrire les différentes étapes de la technique de CGH microarray en précisant leur impact sur la qualité des résultats obtenus : le choix des clones, leur préparation, le traitement du support sont autant d'éléments en amont de la technique elle-même mais qui sont déterminants pour la qualité de la technique. D'autre part, la préparation des ADN du patient et du témoin conditionne l'hybridation aspécifique et le bruit de fond. Elle comporte une étape d'extraction de l'ADN suivie d'un marquage par les cyanines fluorescentes, d'une purification, d'une vérification de l'incorporation de celles-ci, d'une précipitation des ADN et d'un traitement destiné à bloquer les séquences répétées avant les étapes d'hybridation et de lavage des lames.

### 4.1 Choix des séquences déposées sur la lame

Les séquences d'ADN clonées peuvent avoir des origines différentes, et par conséquent des tailles différentes.

Le choix est crucial dans la mesure où :

- il détermine la résolution de la technique
- il conditionne les problèmes liés au bruit de fond
- il dépend du but recherché.

#### 4.1.1 Impact sur la résolution

La taille des clones fixés sur la lame, le nombre de clones présents ainsi que la distance séparant deux clones sont des paramètres à choisir avec soin en fonction de la résolution souhaitée.

##### 4.1.1.1 Taille

Les YACs (Yeast artificial chromosome, issus de levure) ont une taille de 0,2 à 2 Mb, les BACs d'origine bactérienne vont jusqu'à 300 kb, les PACs (plasmides) de 130 à 150 kb, les cosmides de 30 à 45 kb.

##### 4.1.1.2 Nombre de clones

Une comparaison entre des lames avec 1000 ou 2500 BACs (permettant de couvrir une plus grande partie du génome) a montré la supériorité de ces dernières en ce qui concerne la détection de délétions d'un mégabase (Schoumans et *al.* 2004). La première lame regroupant des BACs régulièrement distribués sur l'ensemble des chromosomes comportait 2460 BACs (Snijders et *al.* 2001). Ishkanian et *al.* (2004) ont construit une lame pangénomique comportant 32 433 clones.

##### 4.1.1.3 Distance entre les clones

Deux stratégies différentes peuvent être adoptées en ce qui concerne le choix des clones.

a) La première consiste à sélectionner des clones proches les uns des autres, voire chevauchants dans les régions d'intérêt, c'est-à-dire présumées être le lieu de délétions ou d'amplifications de gènes, pour augmenter la résolution de la technique dans ces zones : ceci a été réalisé pour le chromosome 22 par exemple, la résolution atteinte est alors de 75 kb (Buckley et *al.* 2002). Cette approche ne peut pas être utilisée pour couvrir l'intégralité du génome car elle nécessiterait un nombre trop important de clones à fixer sur une lame.

L'utilisation de clones chevauchants a pour objectif la localisation précise des points de cassure des réarrangements (Shaw et *al.* 2004). Il est alors possible d'obtenir une résolution de l'ordre de 5 à 20 kb. A partir de la localisation de la région délétée par CGH microarray et

contrôle par FISH, les BACs correspondants à cette région sont fragmentés (12 ou 13 fragments) et déposés sur une nouvelle lame. Ceci a notamment abouti à la localisation des points de cassure dans une région limitée à 5 kb chez un patient présentant une duplication partielle du chromosome 16 et dans une région limitée à 6 kb chez un patient avec une délétion partielle du chromosome 5 (Ren et *al.* 2005).

b) La seconde stratégie est utilisée dans le domaine de la recherche : elle consiste à couvrir la totalité du génome dans le but de trouver des anomalies récurrentes chez des patients atteints du même type de pathologie ou de caractériser une anomalie lorsque aucune orientation n'est donnée par la clinique.

#### **4.1.2 Impact sur la qualité de l'hybridation et le bruit de fond**

Les clones doivent être choisis de façon à ne pas contenir de séquences répétées : la présence de séquences répétées telles que les séquences Alu, les séquences redondantes telles que les LCR (Low copy repeat), les duplications segmentaires, les régions centromériques et télomériques conduisent à un défaut d'hybridation spécifique dû à l'appariement de séquences non homologues. Ce phénomène génère un bruit de fond qui gêne l'interprétation en réduisant le rapport signal / bruit de fond.

#### **4.1.3 Contrôle des positionnements des BACs à fixer sur la lame**

La position des BACs sur le génome doit être vérifiée avec soin avant toute utilisation par comparaison des données disponibles dans les différentes banques et par une technique de FISH afin d'éliminer toute erreur de localisation. Bejjani et *al.* (2005) ont ainsi montré que sur 906 BACs testés, seuls 65% étaient utilisables après contrôle par FISH, les autres sont mal localisés (58 sur un chromosome différent, 3 sur le même chromosome), présentent des hybridations non spécifiques (16%) ou ne s'hybrident pas ou peu en FISH (12%).

## 4.2 Préparation des séquences déposées sur la lame

### 4.2.1. Types

#### 4.2.1.1 BACs ou PACs

Ce sont des vecteurs de clonage (molécule d'ADN) dans lesquels il est possible d'insérer des fragments d'acide nucléique étranger (ADN humain). Le vecteur est ensuite intégré dans une cellule hôte où il assurera le maintien et la réplication du fragment d'ADN qu'il porte. Un BAC est un chromosome artificiel bactérien, capable de se maintenir de façon stable à une ou deux copies par cellule dans *Escherichia coli*. Ce vecteur de clonage peut accepter jusqu'à 300 kb.

Un PAC est issu du bactériophage P1. Il peut contenir des fragments d'ADN de 100 à 300 kb (150 kb en moyenne).

Les PACs et les BACs sont des vecteurs simple brin qui fournissent de faibles quantités d'ADN, d'où la nécessité de procéder à une étape d'amplification de ces clones.

#### 4.2.1.2 ADNc

Il est également possible d'utiliser de l'ADNc (ADN simple brin artificiellement synthétisé à partir d'ARN par une réaction de transcription inverse : il représente ainsi la copie de l'ARN messager) dans le but de couvrir la quasi totalité du génome (Pollack et *al.* 1999), soit environ 30 000 gènes.

Cependant, il n'est possible d'étudier que les régions qui sont transcris en ARN messager ; la résolution est donc meilleure lorsque la région étudiée est riche en gènes, alors que les régions dépourvues de gènes, les promoteurs, les introns, les séquences non codantes impliquées dans la régulation génique ne sont pas étudiés.

De plus, l'utilisation d'ADNc amplifié par PCR et purifié a été comparée à la préparation de lames contenant des BACs et montre une résolution inférieure (respectivement 8,5 Mb et 1 Mb) (Schoumans et *al.* 2004), une sensibilité et une spécificité moindres (Pollack et *al.* 1999).

#### 4.2.1.3 Oligonucléotides

Leur taille varie de 50 à 70 nucléotides. Ils sont soit déposés sur la lame, après synthèse sur un support solide à l'aide d'une pointe soit synthétisés directement sur celle-ci à l'aide d'un système laser (Lucito et *al.* 2003).

Du fait de leur taille et de la possibilité de choisir leur séquence, ils contribuent à l'étude, de façon indépendante, de différentes parties d'un même gène, et ce de manière très spécifique.

Il est possible d'éliminer les séquences répétées, réduisant ainsi les problèmes de bruit de fond et d'aspécificité du signal.

#### 4.2.2. Amplification des BACs et PACs

Il existe trois façons différentes de procéder.

- La PCR ligation : elle est basée sur la digestion de l'ADN par une endonucléase de restriction conduisant à l'obtention de fragments de 200 à 2000 paires de bases. Un oligonucléotide universel est ensuite lié, servant de site d'amorçage pour l'amplification par PCR.

- La DOP-PCR utilise des oligonucléotides dont la séquence est dégénérée, qui amplifient de manière aléatoire l'ADN des BACs. Une amélioration de la technique consiste à utiliser trois amoreses différentes afin d'amplifier préférentiellement les séquences humaines et non pas celles d'*Escherichia coli*, augmentant ainsi la sensibilité et la reproductibilité par rapport à l'amplification avec les amoreses standard décrites par Telenius et *al.* (1992) et diminuant la contamination par l'ADN d'*Escherichia coli* (Fiegler et *al.* 2003).

- L'amplification par « rolling circle » à partir de très faibles quantités d'ADN de grande taille (circulaire ou linéaire) est réalisée grâce à l'enzyme  $\phi$ -29 DNA polymérase issue du phage  $\phi$ -29 de *Bacillus subtilis* (Buckley et *al.* 2002, Smirnov et *al.* 2004).

#### 4.2.3 Purification et dénaturation

La purification est réalisée par chromatographie sur colonne.

Elle est nécessaire afin d'éliminer les dNTP, les amorces, l'ADN polymérase, les sels du tampon qui ont servi à la préparation des ADN à fixer par PCR.

La pureté de ceux-ci conditionne l'efficacité de leur attachement sur la lame et leur disponibilité pour l'hybridation.

Seules les séquences simple brin sont accessibles à l'hybridation, d'où la nécessité de lier les ADN sur la lame dans des conditions dénaturantes par utilisation de solution à forte concentration saline (3X SSC) ou de solvant dénaturant (DMSO).

## 4.3 Préparation des lames

De la préparation des lames dépendent la qualité de fixation de l'ADN, l'aspect des signaux fluorescents et le bruit de fond.

Les acides nucléiques purifiés sont déposés sur une lame de verre pour microscope (25 X 75 mm), une réaction chimique les fixe sur la lame de façon covalente ou par interactions ioniques. Ce support présente l'avantage d'être faiblement fluorescent, transparent, non poreux, résistant aux températures élevées, rigide et susceptible de subir des modifications chimiques.

### 4.3.1 Traitement de la lame

Un traitement par un revêtement chimique a pour objectif de fixer et d'immobiliser l'ADN après purification mais détermine aussi la densité de molécules qui peuvent s'attacher par unité de surface. L'uniformité et l'épaisseur de ce revêtement conditionnent la qualité du résultat obtenu, l'uniformité et la morphologie des signaux, la liaison de l'ADN et le bruit de fond. Des variations de ce revêtement conduisent donc à des variations du signal et diminuent la résolution de l'expérience dans la mesure où il génère une faible liaison de l'ADN déposé qui peut même être perdu au cours de l'hybridation.

Les modifications chimiques des lames incluent un groupement aldéhyde, poly-L-lysine ou amino-silane (Gamma amino propyl silane pour les lames Corning GAPS) (Zammateo *et al.* 2000). Ce dernier présente l'avantage de fournir des données plus cohérentes et reproductibles ainsi qu'une valeur de rapport signal/bruit de fond plus élevé.

#### 4.3.1.1 Lames à groupement aldéhyde

L'ADN porteur d'un groupement amine (introduit au cours de la PCR par l'utilisation d'oligonucléotides modifiés) se fixe de façon covalente au carbone de l'aldéhyde. Les groupements aldéhydes qui n'ont pas réagi sont réduits par traitement par le borohydride de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ).

#### 4.3.1.2 Lames à groupement poly-L-lysine

Le traitement de la lame par une poly-L-lysine crée une surface chargée positivement sur laquelle l'ADN non modifié peut se fixer par des interactions ioniques.

#### 4.3.1.3 Lames à groupement amine

Le groupement amine est apporté par traitement de la lame par un amino-silane comme le 3-aminopropyltriméthoxylane. L'ADN non modifié est fixé sur la lame par des interactions électrostatiques entre les groupements phosphate de l'ADN, chargés négativement, et les groupements amine de la lame, chargés positivement. Ces interactions facilitent la dénaturation de l'ADN et augmentent l'affinité de liaison à la surface de la lame. Un traitement par des rayonnements UV peut être utilisé pour immobiliser l'ADN sur la lame.

Le choix dépend du type de liaison souhaitée selon la nature et la taille de la séquence à déposer : les molécules de grande taille (ADNc ou BACs) sont fixées par liaisons ioniques alors que les oligonucléotides nécessitent des liaisons covalentes.

#### 4.3.1.4 Lame réfléchissante

La présence d'une surface réfléchissante (couche d'aluminium) sous la surface de dépôt réduit la dispersion de la lumière, la dirige vers le détecteur, augmentant ainsi l'intensité du signal détecté. Une couche de dioxyde de silicium augmente d'avantage le signal fluorescent.

Remarque : Dans certains cas, l'ADN fixé sur la lame peut subir une modification par voie chimique alors que le support n'est pas traité afin d'augmenter l'efficacité de liaison et réduire le bruit de fond : un groupement époxyde est fixé de façon covalente à l'ADN et va permettre

la fixation spécifique de celui-ci à la surface de verre (Cai et *al.* 2002). Cette stratégie est utilisée pour la préparation des lames de Spectral Genomics.

Vermesch et *al.* (2005) ont testé trois types de lames et trois fixations différentes de l'ADN (lame à groupement amino-silane sur laquelle l'ADN est fixé par lumière UV, lame non traitée fixant l'ADN porteur d'un groupement amine de façon covalente, lame à surface réfléchissante) et ont montré des différences de rapport signal / bruit de fond : celui-ci est plus important avec le premier système (20 et 30 pour Cy3 et Cy5 respectivement).

## 4.4 Préparation des ADN à tester

### 4.4.1 Extraction de l'ADN et dosage

A partir de sang veineux prélevé sur EDTA, l'ADN des leucocytes est extrait par précipitation après lyse des globules rouges et élimination des membranes cellulaires. Il est ensuite dosé par spectrophotométrie (Nanodrop NP1000, Nanodrop technologies, Rockland, DE) par la mesure de l'absorbance à 260 nm (une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin).

### 4.4.2 Fragmentation de l'ADN génomique (étape optionnelle)

Afin de réduire l'hybridation aspécifique, une étape de digestion enzymatique par Eco RI ou Dpn II peut être réalisée (Protocole Spectral Genomics).

La sonication de l'ADN peut également être utilisée dans le même but (obtention de fragments de 300 à 2000 pb).

La vérification de la taille des fragments obtenus est réalisée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,8 % à 110 V pendant 30 minutes.

### 4.4.3 Marquage de l'ADN à tester par les cyanines

#### 4.4.3.1 Principe du marquage

Trois cent nanogrammes d'ADN à tester sont marqués par Cy3 ou Cy5 incorporés dans des d-CTP (Amersham Pharmacia) au cours d'une réaction de random priming (kit BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System, Invitrogen). Des activités spécifiques plus élevées

sont ainsi obtenues : elles sont nécessaires pour détecter un gène à partir de quelques microgrammes d'ADN génomique.

Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit  $4^6 = 4096$  nucléotides). Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec l'ADN. Ils vont alors servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I qui va reconstituer l'intégrité des deux brins en présence de désoxynucléosides triphosphate (d-CTP) marqués par un fluorophore.

#### 4.4.3.2 Choix des fluorophores

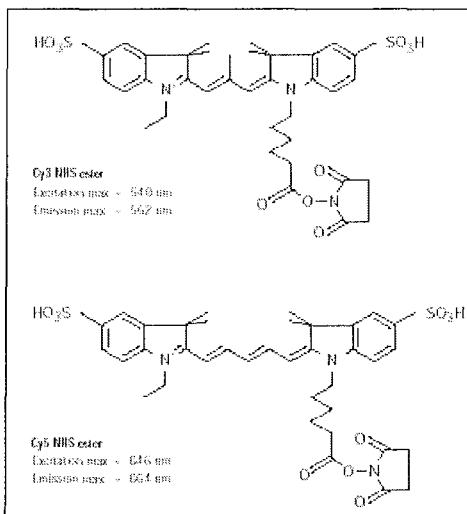
##### a) Définition

Les molécules fluorescentes sont capables d'absorber l'énergie lumineuse (photons) à une longueur d'onde d'excitation bien déterminée, de passer à un état excité puis de réémettre à une longueur d'émission différente de la précédente.

##### b) Structure chimique

Les cyanines sont constituées de deux noyaux hétérocycliques indocyanine reliés par un pont polyméthine (figure 10). Elles se différencient par la structure de ce pont. L'ajout d'atomes de carbone conjugués à cette chaîne polyméthine conduit à un déplacement de longueur d'onde d'émission de 100 nm (soit 550 nm pour Cy3 et 650 nm pour Cy5). La présence de groupements sulfonate acides augmente la solubilité et réduit leur agrégation, diminuant ainsi le phénomène de «quenching» (diminution du signal de fluorescence lorsque les molécules fluorescentes sont trop proches).

L'introduction d'un cycle benzénique supplémentaire (Cy3.5 et Cy5.5) déplace leur spectre d'absorption et d'émission, augmentant les possibilités de les utiliser dans un système multiplex.



**Figure 10 : Structure chimique des cyanines**

### c) Avantages

Le choix des cyanines est intéressant à plusieurs titres.

- Elles sont peu sensibles au phénomène de « photobleaching » (atténuation ou perte de signal de fluorescence dues à une exposition à une lumière intense ou répétée, par perte des propriétés fluorescentes) et peuvent ainsi être excitées à plusieurs reprises.
  - L'intensité de fluorescence est élevée.
  - Malgré des caractéristiques physico-chimiques différentes, elles donnent un signal d'intensité comparable.
  - Elles émettent à des longueurs d'onde de la lumière visible, d'où une détection plus aisée.
  - Leur spectre d'excitation et d'émission sont suffisamment distincts pour permettre l'excitation à des longueurs d'onde différentes, une bonne séparation des signaux d'émission (détectés séparément), une sensibilité élevée et un faible bruit de fond dû au chevauchement des spectres, conduisant ainsi à une détection et une analyse simultanée de deux ADN marqués par Cy3 et Cy5.
  - Elles peuvent être incorporées directement à l'ADN par le biais de dNTP marqués.

- Leur fluorescence est peu affectée par le pH ou la présence de traces de DMSO issues des étapes de préparation des lames et elles résistent aux températures rencontrées dans les applications de biologie moléculaire.

Elles nécessitent cependant des précautions de manipulation : il convient de limiter l'exposition à la lumière au cours de leur manipulation pour conserver leurs propriétés fluorescentes, de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité, de ne pas les conserver dans des solutions à forte concentration en amines.

#### **4.4.4 Purification de l'ADN marqué**

Cette étape élimine les nucléotides marqués non incorporés (source de bruit de fond important) après passage de l'échantillon sur une colonne de résine et élution par des tampons de purification (kit BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System, Invitrogen ou Kit DNA Clean and concentrator®, Zymo Research's ou colonne Sephadex®, Sigma Aldrich). La précipitation à l'éthanol en tant que technique de purification n'est pas possible à ce stade du fait du risque de la formation d'agrégats de fluorophores conduisant à un bruit de fond important sous forme de points.

#### **4.4.5 Vérification de l'incorporation des cyanines et de la quantité d'ADN à tester**

Cette étape contrôle la qualité du marquage et élimine les artefacts techniques qui conduiraient à une mauvaise interprétation des résultats en raison d'un taux d'incorporation variable d'une cyanine à l'autre.

La mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde d'absorption maximale des cyanines (550 pour Cy3 et 650 nm pour Cy5) au Nanodrop et la connaissance du coefficient d'extinction permettent de déterminer respectivement la concentration de cyanine 3 et cyanine 5 incorporée (Y en pmol/μl). En parallèle, la concentration d'ADN est calculée (X en ng/μl). La qualité du marquage est appréciée par la densité de marquage, c'est-à-dire la distance moyenne entre les molécules fluorescentes sur la cible. Elle est estimée par le calcul  $X \times 10^3 / (\text{poids moléculaire des nucléotides} \times Y)$  : celui-ci doit être inférieur à 80. L'aspect du spectre d'absorption est également un indicateur de qualité : on observe deux pics dont le premier indique la présence d'interactions intermoléculaires entre les différentes molécules fluorescentes, s'il est d'intensité similaire au second, cela signifiera une perte de l'intensité du

signal de fluorescence car l'énergie lumineuse est perdue dans ces interactions. Ce phénomène est généralement associé à un marquage trop important de l'ADN.

La quantité d'ADN à hybrider est soit fixée (3,5 µg par exemple) soit calculée pour apporter une quantité de cyanines fluorescentes incorporées fixe afin d'obtenir une intensité de signal moins fluctuante d'une lame à l'autre.

#### **4.4.6 Précipitation de l'ADN**

L'ADN du patient et celui du témoin marqués chacun avec un fluorophore différent sont ensuite mélangés et précipités dans l'éthanol en présence de 10 % d'acétate de sodium 3 M pH 5,6 afin de les purifier et surtout de les concentrer.

#### **4.4.7 Blocage des séquences répétées**

L'ajout d'ADN Cot-1 (issu de placenta humain) a pour but de bloquer, après dénaturation par la chaleur (10 minutes à 75°C), les séquences répétées des ADN à tester, source d'hybridation aspécifique et génératrices de bruit de fond. Ceci est réalisé au cours d'une incubation d'une heure à 37°C. La quantité optimale correspond à quarante fois la quantité d'ADN à hybrider.

Selon la technique de préparation des lames et la fixation des BACs, il peut être nécessaire de pré-hybrider ces derniers avec de l'ADN Cot-1 sur la lame elle-même afin de bloquer les séquences répétées des clones fixés.

L'ADN de sperme de saumon et l'ARN t de levure sont ajoutés dans le même objectif, soit dans la solution d'hybridation soit dans celle de pré-hybridation.

#### **4.4.8 Hybridation**

Les clones d'intérêt de séquence connue sont fixés sur la lame, les ADN que l'on cherche à caractériser, marqués par un fluorophore, sont apportés dans le tampon d'hybridation. Ces séquences sont mises en contact entre lame et lamelle pendant 16 à 72 heures à 37 ou 42°C en milieu humide afin de limiter l'évaporation du tampon.

##### **4.4.8.1 Pré-hybridation**

Elle consiste à incuber les séquences fixées sur la lame dans un tampon contenant des substances capables de bloquer les séquences répétées (ARNt de levure, ADN de sperme de

saumon, ADN Cot-1), en l'absence de l'ADN à tester. Cette étape a pour but de réduire l'hybridation aspécifique des ADN du patient et du témoin et donc de réduire le bruit de fond. Elle dépend de la préparation des lames et peut ne pas être nécessaire.

#### 4.4.8.2 Hybridation

La solution d'hybridation contient différents constituants en vue d'optimiser les conditions nécessaires à l'obtention d'un signal de bonne qualité.

- Un tampon a pour but de stabiliser le pH et de limiter ses variations.
- Un détergent diminue les tensions de surface et augmente la fluidité de la solution d'hybridation pour une répartition homogène entre lame et lamelle afin d'obtenir un signal homogène de fluorescence.
- Des constituants ont pour rôle d'accélérer l'hybridation et diminuer la température de fusion (température à laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé). Celle-ci est influencée par la taille et la composition en G-C des ADN. L'optimisation de la composition en sels limite cette action. De plus, la formamide, agent dénaturant, est utilisée pour diminuer cette température de fusion et donc la température d'hybridation : en effet, la température d'hybridation dans un tampon aqueux serait de 65 à 75°C, entraînant alors une évaporation du tampon, séchant la lame et dégradant la sonde. L'addition de 1% de formamide diminue la température de fusion de 0,65°C, ainsi, l'addition de 50 % de formamide conduit à une température d'hybridation de 42°C et réduit le temps d'hybridation à 16 heures (Casey et al. 1977).

La solution d'hybridation est choisie de sorte à obtenir une stringence suffisante pour l'appariement des bases d'ADN pendant cette étape.

La stringence correspond aux conditions expérimentales de température, de PH et de force ionique rendant possible l'hybridation moléculaire. La stringence est proportionnelle à la température et à l'inverse de la concentration en cations monovalents (sodium par exemple). Des conditions très stringentes (température élevée, concentration en sodium faible) rendent l'hybridation moléculaire plus difficile mais engendrent une hybridation spécifique tandis que des conditions peu stringentes (température plus basse, concentration en sodium plus élevée) aboutissent à une hybridation moins spécifique. Les paramètres qu'il convient de contrôler au cours de cette étape et leur influence sur l'hybridation et la stringence sont résumés dans le tableau 2.

Paramètre	Hybridation	Stringence
Elévation de température	diminue	augmente
Concentration en sels (SSC)	augmente	diminue
Formamide	diminue	augmente
Dextran macromolécule	augmente	diminue

Tableau 2: paramètres influençant l'hybridation et la stringence

Le dépôt homogène de la solution d'hybridation va déterminer l'hybridation homogène des ADN à tester sur les séquences complémentaires de la lame.

#### 4.4.9 Lavage

L'objectif est d'éliminer, d'une part les séquences des ADN à tester non fixées sur leurs séquences complémentaires pour éviter les faux positifs, et d'autre part les constituants du tampon d'hybridation, notamment les sels responsables de bruit de fond.

La stringence des lavages doit être déterminée avec soin afin d'éliminer les hybridations aspécifiques sans altérer l'hybridation spécifique.

Le premier lavage réalisé à la température d'hybridation a pour but d'éliminer les constituants du tampon d'hybridation. Il se fait avec une solution à forte concentration en sels. Les suivants, dans une solution avec une concentration plus faible en sels, éliminent l'hybridation aspécifique et les restes de sels du lavage précédent. Il s'agit de trouver un juste équilibre entre l'obtention d'un signal suffisamment intense et un bruit de fond réduit. Un séchage rapide est ensuite nécessaire pour empêcher la formation de traces dues aux sels sur la lame. Il est important au cours de cette étape de conserver les lames à l'abri de la lumière pour ne pas atténuer le signal de fluorescence des cyanines.

## 5 Analyse des données et critères de qualité

L'acquisition des images se fait grâce à un scanner GenePix 4000B (Axon Instruments Union City CA) mis à disposition par le professeur F. Martin à l'INRA. L'excitation des cyanines se fait par des lasers à la longueur d'onde d'excitation spécifique à chacune d'elles. La lumière

émise est ensuite collectée, filtrée avant d'être détectée et quantifiée par un photomultiplicateur. Ce scanner réalise l'acquisition des données simultanément à deux longueurs d'onde : 532 nm pour Cy3 et 635 nm pour Cy5. Leur analyse est effectuée avec le logiciel GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments) : il règle le gain du photomultiplicateur afin d'obtenir une intensité de signal équivalente pour les deux cyanines et fournit un ratio des intensités de fluorescence des cyanines pour chaque signal. Il est par ailleurs capable de déterminer le bruit de fond et d'effectuer une normalisation du signal.

L'exploitation statistique des résultats produit ensuite un ensemble d'informations nécessaires à leur interprétation et à la validation de l'expérience. Cependant, les renseignements accessibles par les différents fabriquants sont variables : la société Spectral Genomics met à disposition un logiciel d'exploitation (SpectralWare), la société Integragen analyse les CD envoyés par le laboratoire et ne transmet qu'une représentation graphique de la dispersion des ratios des signaux de fluorescence de chaque dépôt, ne donnant pas accès aux données statistiques comme la déviation standard entre les réplicats, le nombre de clones analysés. Ces paramètres sont en effet importants pour contrôler l'efficacité de l'hybridation ainsi que la reproductibilité.

Un certain nombre de paramètres sont ainsi à prendre en compte :

- pour une bonne interprétation des résultats
- pour vérifier la qualité de l'hybridation,
- pour éliminer les faux positifs et faux négatifs,

## **5.1 Connaissance des caractéristiques des séquences d'ADN fixées sur la lame**

Le nombre de clones, la distance entre deux clones adjacents déterminent la résolution de la technique et leur localisation chromosomique délimite les régions étudiées.

En outre, la connaissance des séquences, en particulier les régions polymorphes, est déterminante pour une bonne interprétation des résultats obtenus.

## **5.2 Prise en compte du bruit de fond**

Le scanner mesurant l'intensité de fluorescence de tous les pixels de l'image, il est nécessaire de délimiter précisément les signaux fluorescents correspondant aux BACs à l'aide d'une

grille (ensemble de cercles superposables aux dépôts de la lame) pour que le scanner puisse faire la différence entre le signal correspondant à la localisation des BACs et le bruit de fond (à l'extérieur des cercles). Le bruit de fond local est dans un premier temps soustrait au signal obtenu, c'est cette intensité de fluorescence corrigée qui est prise en compte pour le calcul du ratio d'intensité des cyanines.

Remarques : a) les variations du bruit de fond pouvant influencer le ratio Cy5/Cy3, il est préférable de tenir compte du bruit de fond **local** et de le soustraire au signal obtenu ; c'est ce qui est réalisé par le logiciel d'Axon.

b) lorsque les clones sont trop rapprochés pour pouvoir déterminer un bruit de fond local, il est possible de prendre en compte la moyenne des contrôles négatifs présents sur la lame (par exemple des séquences chromosomiques de *Drosophila*).

Le rapport signal / bruit de fond doit être supérieur à deux pour pouvoir valider la technique et être sûr de la spécificité de l'hybridation.

### 5.3 Contrôle de la reproductibilité du signal et efficacité

a) Toutes les séquences fixées sur la lame sont représentées en plusieurs exemplaires (de deux à quatre). Pour valider l'hybridation, la déviation standard (DS) du rapport signal / bruit de fond entre les réplicats ne doit pas excéder 10 %. Si cela n'est pas le cas, les clones sont exclus de l'analyse. Ce critère est pris en compte pour définir l'efficacité d'hybridation, c'est-à-dire le nombre de BACs pour lesquels le rapport signal / bruit est supérieur à deux et la DS n'excède pas 10 %.

b) Réalisation d'un flip-flop : le principe repose sur la cohybridation de l'ADN du patient et celui du témoin sur deux lames différentes en inversant le marquage par les cyanines (l'ADN du patient est marqué par Cy3 sur la première lame et par Cy5 sur la deuxième et inversement pour l'ADN du témoin). Il a pour but de s'assurer qu'une déviation observée avec un marquage se retrouve de façon reproductible avec le second marquage et d'éliminer ainsi un artefact dû à un défaut ponctuel d'hybridation de l'un des deux ADN.

## 5.4 Contrôle positif

Il consiste à cohybrider sur la lame des ADN issus de personnes de sexe différent, afin de voir une déviation au niveau des gènes des chromosomes X et Y et de contrôler l'efficacité de l'hybridation.

Il permet en outre d'établir un seuil au-delà duquel une déviation est considérée comme étant le reflet d'une amplification ou d'une délétion.

## 5.5 Normalisation

Elle a pour objectif d'éliminer les variations systématiques des expériences et de pouvoir ainsi comparer des expériences différentes.

Les variations observées sont liées à divers facteurs :

- les caractéristiques physiques et chimiques des cyanines
- les différences d'efficacité de marquage entre Cy3 et Cy5
- les différences de pouvoir des deux lasers conditionnant l'efficacité de détection des cyanines
- les différences de quantité d'ADN marqués mis en compétition
- l'hétérogénéité spatiale des conditions d'hybridation entraînant des biais spatiaux dans les ratios (variation selon la position sur la lame).

La normalisation linéaire utilisée pour l'analyse des données consiste à diviser le ratio d'intensité de fluorescence des cyanines (Cy5 / Cy3) de chaque dépôt par la moyenne des ratios des autosomes. On aboutit alors à un ratio moyen de 1 (moyenne géométrique) ou de 0 (transformation en  $\log_2$ , moyenne arithmétique). Cette transformation en  $\log_2$  présente l'avantage d'avoir un ratio Cy5 / Cy3 qui suit une distribution gaussienne autour d'une valeur normale égale à zéro. La difficulté réside dans la détection des duplications : en effet, une délétion se traduira par une valeur de -1 ( $\log_2 (1/2) = -1$ ) alors qu'une duplication par une valeur de 0,58 qui correspond à  $\log_2 (3/2)$ , avec un risque plus élevé de faux négatifs.

## 5.6 Elimination des faux négatifs et faux positifs

Le ratio d'intensité de fluorescence des cyanines est théoriquement de 0 lorsqu'aucun déséquilibre n'est observé.

En pratique, il fluctue autour de cette valeur. Il est alors important de déterminer quelles sont les limites fixées, au-delà desquelles une déviation est considérée comme le reflet d'un déséquilibre chromosomique. Ce seuil est fixé à 4 DS des ratios d'intensité de fluorescence pour les puces de l'université de Leuven (variation du seuil en fonction du nombre de clones fixés sur la lame): sont ainsi considérés comme normaux 99,9936% des clones dont les ratios sont situés entre  $\pm 4$  DS (Vermeesch et al. 2005). Le ratio théorique d'une duplication est  $\log_2 (3/2)$  ; l'intervalle de valeur dans lequel le ratio de fluorescence fluctue dans le cas d'une duplication est  $\log_2 (3/2) \pm 2$  DS. Si les deux intervalles se chevauchent, à l'intersection entre les deux se retrouveront des résultats considérés faussement comme normaux (faux négatifs) ou contrôlés en excès car considérés faussement comme anormaux (faux positifs). Afin d'éliminer les faux positifs et faux négatifs, il ne doit pas y avoir de valeurs de ratio se chevauchant entre les valeurs considérées comme normales et dupliquées, soit  $\pm 4$  DS  $\leq \log_2 (3/2) - 2$  DS, ce qui conduit à **DS  $\leq 0,096$**  (figure 11). Ceci n'est obtenu que si la qualité de l'hybridation est irreprochable.

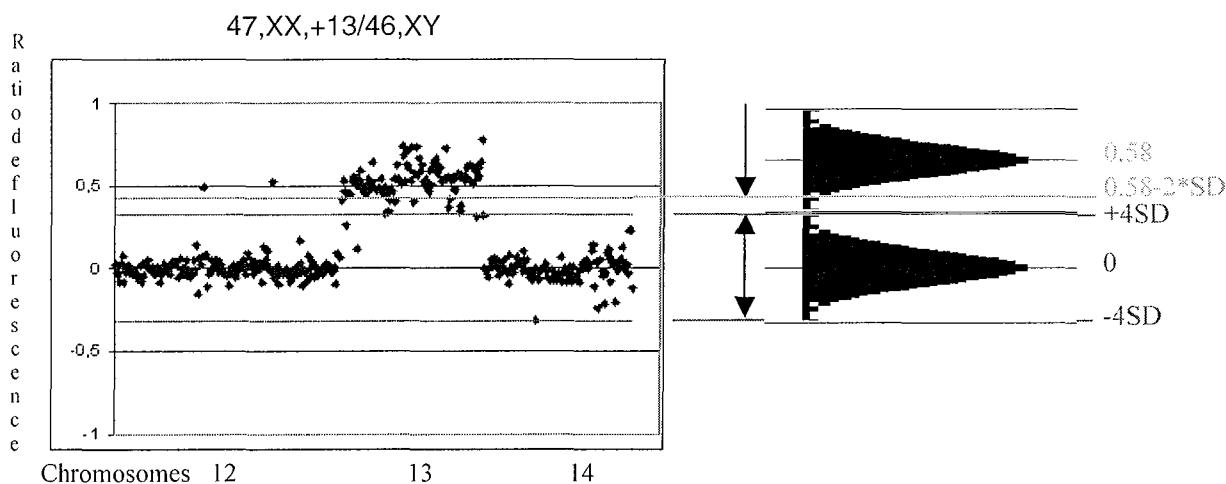


Figure 11 : Valeur maximale de DS pour détecter un clone dupliqué

## 6 Résultat

Une duplication se traduit par un ratio supérieur à 1,2 (ou 0,5 : moyenne arithmétique), une délétion par un ratio environ inférieur à 0,8 (ou -1 : moyenne arithmétique) pour les puces Genosensor Array 300, Genosystem 1MB et Integrachip. Par contre, pour les puces de l'université de Leuven, le seuil de 4 DS est pris en compte.

Valeurs à prendre en compte pour les puces Genosensor Array 300 :

En plus du ratio de fluorescence normalisé (mass ratio mean) et du coefficient de variation (déviation standard / moyenne), le logiciel fournit un calcul pour déterminer la probabilité qu'un ratio de fluorescence est en dessous de la distribution des ratios des cibles modales : c'est la « p-value ». Ainsi, un clone pour lequel cette valeur est très faible (inférieure à 0,001) a une forte probabilité de présenter une variation du nombre de copies de matériel chromosomique (délétion ou duplication).

Remarque : le ratio modal se définit comme le ratio de fluorescence de la majorité des clones de la lame. Ainsi, pour les autosomes, il est de 1.

Tout résultat faisant suspecter une anomalie doit être contrôlé.

Il faut tout d'abord s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme d'insertion délétion sans conséquence clinique : certains fabricants de lames fournissent une liste de polymorphismes déjà connus ou qui a été établie à la suite de l'expérience des utilisateurs.

## 7 Contrôle des déviations retrouvées

Lorsqu'une anomalie est détectée par la technique de puce à ADN, le contrôle de la spécificité de l'hybridation et une confirmation de la délétion ou de l'amplification par FISH sont nécessaires. Dans un premier temps, il consiste à hybrider le BAC pour lequel une déviation du ratio de fluorescence est observée sur des chromosomes métaphasiques du patient et / ou sur noyaux interphasiques, surtout si l'on suspecte une duplication. Cependant, cette technique peut être prise en défaut en raison d'un problème de bruit de fond lié à une aspécificité du marquage fluorescent qui gêne la lecture et l'interprétation des résultats. Il est alors possible de faire appel à des techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification de l'ADN et une évaluation semi quantitative de la quantité de matériel génétique présent chez le patient.

### 7.1 FISH

#### 7.1.1 BACs

Rarement, les BACs déposés sur la lame peuvent correspondre à des sondes commerciales, simples d'utilisation, ou contenir un gène connu et pour lequel il existe une sonde

commerciale (il est alors possible de l'utiliser afin de déterminer si ce gène peut être un gène candidat à la pathologie présentée par le patient).

Il faut donc, dans la majorité des cas, se procurer le BAC à partir de banques de données.

A partir de la référence du BAC, ces dernières fournissent des informations concernant leur localisation chromosomique, les gènes connus qu'ils renferment, les BACs chevauchants ou présents dans la région. Les sites UCSC Genome Browser Home (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) ou NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>) sont utiles pour vérifier que le BAC en question s'hybride bien de façon spécifique dans la région en cause. Pour ce faire, ils indiquent la technique qui a été mise en œuvre pour positionner le BAC (FISH ou séquençage) : si la FISH a été utilisée, cela garantit une hybridation spécifique. Ils fournissent une cartographie de la région considérée afin d'élargir la recherche aux BACs environnants, à tester dans le but de borner l'anomalie.

Les BACs sont ensuite commandés à l'Institut Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>) ou à l'université de Bari (<http://www.biologia.uniba.it/rmc>) voire au CHORI (Children's hospital Oakland research institute).

#### 7.1.1.1 Culture bactérienne et extraction des BACs

Les BACs sont intégrés dans un plasmide et transfectés dans des bactéries (*Escherichia coli*) résistantes à un antibiotique donné. Celles-ci sont reçues en culture dans une gélose et ensemencées sur un milieu stérile LB Broth Miller (Difco) (Bactotryptone 1 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 0,5 %) additionné de Bacto agar (Difco) contenant un antibiotique (chloramphénicol à 12,5 ou 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Après une incubation de 8 heures à 37°C, une colonie bactérienne isolée est mise en culture en milieu liquide pendant une nuit, l'ADN du BAC est alors extrait du culot bactérien (Wisard plus SV Minipreps DNA purification system®, Promega). En parallèle, des bactéries sont conservées à -80°C dans du glycérol (stock glycérol) pour une éventuelle utilisation ultérieure.

#### 7.1.1.2 Marquage de l'ADN des BACs

L'incorporation de dNTP marqués est réalisée par nick translation (kit Bionick labeling system®, Invitrogen) : une DNase I coupe l'ADN à l'extrémité 3', l'ADN polymérase I par son activité 5'->3' exonucléase élimine un nucléotide et incorpore à la place un nucléotide (dATP) biotinylé (figure 12). Le contrôle de la digestion de l'ADN par migration

électrophorétique sur gel d'agarose et révélation par le bromure d'éthidium montre une traînée entre 200 et 1000 paires de bases.

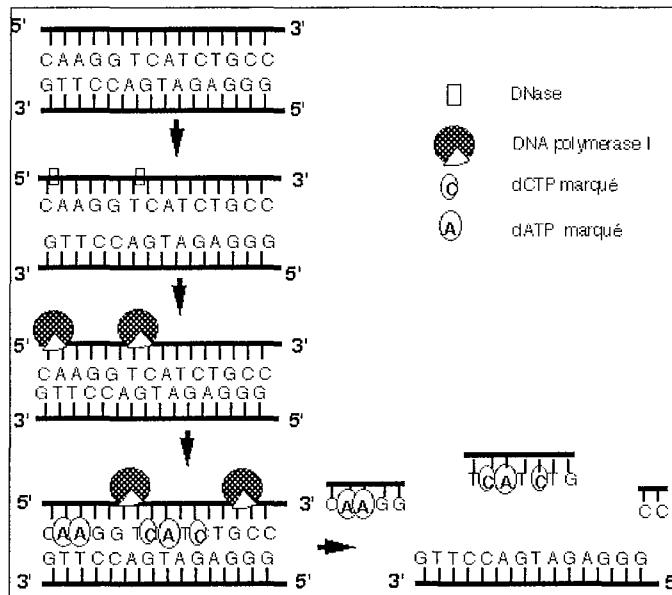


Figure 12 : Principe de Nick translation

#### 7.1.1.3 Purification de l'ADN

L'ADN du BAC et l'ADN Cot-1 sont précipités à l'éthanol afin d'éliminer les dNTP non incorporés et les enzymes.

#### 7.1.1.4 Hybridation

Les lames traitées à la pepsine subissent un traitement par la chaleur (73°C) afin de dénaturer les cibles chromosomiques (métaphases du patient) puis sont mises en contact avec les sondes préalablement dénaturées pour hybridation 24 heures à 37°C en chambre humide.

#### 7.1.1.5 Détection immunochimique

Après lavage, la révélation des sondes marquées à la biotine se fait par ajout des réactifs nécessaires au système biotine-streptavidine. La streptavidine marquée par la fluorescéine se fixe spontanément à la biotine. Deux anticorps anti-avidine marqués à la fluorescéine se lient à la streptavidine, d'où une amplification du signal (figure 13).

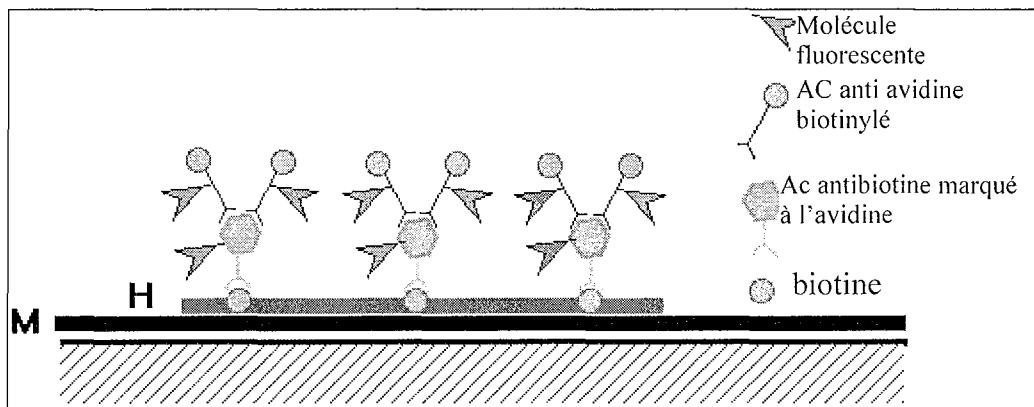


Figure 13 : Système de marquage des BACs

#### 7.1.1.6 Cohybridation d'une sonde commerciale comme témoin

En parallèle, une sonde commerciale est utilisée comme témoin de l'efficacité de l'hybridation : il s'agit d'une sonde localisée sur le même chromosome, le plus souvent subtélomérique (extrémité du bras du chromosome opposé à celui marqué par le BAC).

#### 7.1.1.7 Lecture

La lecture se fait au microscope à épifluorescence en utilisant le DAPI comme contre colorant.

La présence d'une délétion est visible sur chromosomes métaphasiques.

Par contre, une duplication est vérifiée sur des noyaux interphasiques. En effet, dans ce cas, l'hybridation *in situ* en fluorescence montre théoriquement deux signaux. Cependant, il est parfois plus difficile de les distinguer lorsque l'observation est réalisée sur des chromosomes plutôt que sur des noyaux interphasiques. Ceci s'explique par une différence de compaction de la chromatine selon l'étape du cycle cellulaire : elle est en effet plus relâchée en interphase, d'où une meilleure résolution pour visualiser deux signaux distincts mais proches correspondant à une duplication.

#### 7.1.1.8 Interprétation des résultats

Il s'agit tout d'abord de s'assurer de la spécificité de la sonde. Le BAC peut en effet être imparfaitement localisé et s'hybrider sur un chromosome différent de celui attendu. Il peut également s'hybrider de façon aspécifique, ce qui se traduit par la présence de signaux

fluorescents parasites responsables du bruit de fond, au lieu d'un signal fluorescent attendu sur chaque chromatide.

Dans ce cas, il est impossible de confirmer l'anomalie chromosomique détectée par la technique de puce à ADN, il faut faire appel à d'autres contrôles.

Si aucune anomalie n'est détectée par FISH, on peut penser que la déviation observée par la technique de puce à ADN correspond en fait à un polymorphisme.

Si l'anomalie est confirmée par FISH, il convient alors de tester la sonde sur des chromosomes métaphasiques des parents afin de savoir si elle est transmise par l'un des parents et lequel ou si elle est apparue *de novo*. Dans le premier cas de figure, on peut considérer dans la majorité des cas que l'anomalie détectée correspond à un polymorphisme sans relation avec le phénotype pathologique observé puisqu'un individu sain est porteur. Cependant, il convient de vérifier, lorsque l'on est en présence d'une délétion, que la taille de celle-ci est la même chez le parent et l'enfant par une cartographie précise de la région chez les deux individus : si ce n'est pas le cas et que la région altérée est de plus grande taille chez l'enfant, elle peut être en cause dans la pathologie de ce dernier.

## 7.2 Biologie moléculaire

Il s'agit, lorsque les techniques précédentes ne conduisent pas à une conclusion quant à la duplication ou à la délétion, de réaliser une amplification par PCR d'un fragment déterminé, présumé être dans la région altérée, et de réaliser une quantification relative par rapport à un témoin.

### 7.2.1 Microsatellites

La présence de marqueurs polymorphes caractérisés par un nombre variable de répétitions de un à six nucléotides de type microsatellites dans la région délétée ou dupliquée peut présenter un intérêt pour le contrôle indirect de l'anomalie.

Une comparaison entre les parents et le patient est effectuée. Dans un premier temps, il convient de trouver un marqueur informatif, c'est-à-dire pour lequel le nombre de répétitions de nucléotides est différent entre les deux parents et qui est hétérozygote au locus considéré.

Une PCR utilisant une amorce fluorescente amplifie le fragment d'intérêt, la détection se fait ensuite par électrophorèse capillaire : on observe un pic de taille variable en fonction du nombre de répétitions et dont la surface est proportionnelle à la quantité de matériel génétique présent. Le profil électrophorétique de l'enfant atteint est comparé à ceux des parents : il est

ainsi possible de savoir quelle est l'origine parentale de l'allèle porteur de l'anomalie en comparant les tailles des pics. Une délétion se traduira par un pic dont la surface est en théorie la moitié de l'aire celle du parent, une duplication par un pic d'aire double par rapport à celle du pic du parent qui a transmis l'allèle.

### **7.2.2 QMPSF : Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments**

Cette technique est utile une fois l'anomalie bornée, lorsqu'un ou plusieurs gènes candidats ont été identifiés car elle ne peut être utilisée que sur des fragments de petite taille. Il s'agit de réaliser une amplification de la région à étudier par PCR multiplex avec amorce fluorescente. Après électrophorèse capillaire et analyse de fragments grâce au logiciel Genescan, les surfaces des pics fluorescents du patient sont comparées à celles d'un témoin : une délétion se traduit par une surface de pic correspondant à 50% de celle du témoin, une duplication par une surface augmentée de 50% par rapport au témoin pour la région analysée. Il est ainsi possible de réaliser une analyse semi quantitative et de mettre en relation directement un déséquilibre du nombre d'allèles d'un gène donné avec la pathologie observée.

# Expérience du laboratoire

## 1 Caractéristiques des puces utilisées au laboratoire

### 1.1 Puces Genosensor Array 300 Vysis (laboratoire Abbott)

La lame possède 287 clones, en majorité des BACs avec quelques PACs et P1s. Les BACs et PACs contiennent des régions d'ADN humain de 100 à 200 kb en moyenne, les clones P1s de 50 à 95 kb. Ils sont déposés sur la lame traitée au chromium en triple exemplaire. Le diamètre des dépôts est de 120 µm. Leur localisation chromosomique et les pathologies dans lesquelles des anomalies sont connues sont en annexe 2. Les séquences représentées sur la lame correspondent à des oncogènes (68 clones) ou des gènes suppresseurs de tumeur (26 clones) présumés ou connus, à des régions de perte d'hétérozygotie (40 clones) et présentent donc un intérêt dans le diagnostic et le suivi des pathologies tumorales. Des régions subtélomériques ou interstitielles connues comme étant le siège de microdélétions (comme par exemple la région 22q11 liée au syndrome de Di George) ou duplications (comme le syndrome de Down) sont également présentes et permettent ainsi une utilisation dans le cadre de la recherche de pathologies constitutionnelles dont les retards mentaux : Soisante quatorze loci subtélomériques et vingt neuf loci correspondant à des régions sujettes à des microdélétions ou duplications sont ainsi représentés. Cinquante clones témoins sont également présents. Les régions « critiques » sont représentées par deux clones contigus (régions subtélomériques et soumises à des microdélétions), on dénombre au minimum 3 clones par bras chromosomique pour une couverture moyenne de 40 Mb par chromosome.

La validation des clones utilisés s'effectue par l'utilisation d'amorces gène-spécifiques et par cohybridation avec une sonde centromérique ou une sonde marquant le chromosome entier. Chaque lot est revalidé avant impression sur la lame.

La technique se présente sous la forme d'un kit prêt à l'emploi.

La détection se fait par une caméra CCD (charge coupled device) à 1,3 millions de pixels après illumination au Xenon, en utilisant le DAPI comme contre-colorant. Un logiciel GenoSensor 300 identifie chaque dépôt et calcule le ratio de fluorescence patient / témoin des cyanines.

## 1.2 Puces Genosystem 1MB (Spectral Genomics)

Les sondes sont constituées par 2632 BACs issus de RPCI BAC library (Roswell Park Cancer Institut), librairie constituée à partir d'ADN d'un donneur digéré par des enzymes de restriction puis cloné dans des vecteurs bactériens pour obtenir 543 797 clones (Osoegawa et al. 1998 et 2001). Ces BACs sont non chevauchants, leurs séquences, séparées par une distance de un mégabase, sont représentatives de l'ensemble des chromosomes. Soixante picogrammes de chaque clone sont déposés sur la lame, la liaison à la surface de verre se fait par modification chimique de l'ADN et du verre (fixation de groupements amino-silane). Ces clones sont représentés en double exemplaire sur la lame, les dépôts sont distants de 250 µm (300 µm entre les centres des dépôts). La vérification de la séquence de chaque clone a été réalisée par séquençage de leurs extrémités, puis par FISH à l'aide de sondes recouvrant un tiers du clone. Les lames prétraitées ne nécessitent pas d'étape de blocage des séquences répétées des clones et sont directement accessibles à l'hybridation. Tous les tampons nécessaires à l'hybridation sont fournis dans un kit, leur composition n'est donc pas connue avec précision.

L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel SpectralWare.

Du fait des séquences des clones, elles peuvent être utilisées pour la recherche de microremanierments chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles et acquises.

## 1.3 Puces de l'université de Leuven

Les clones fixés sur la lame sont représentés par 3527 BACs et PACs de localisation génomique connue et vérifiée. L'ADN des BACs et des PACs est isolé et purifié à partir de culture bactérienne avant de subir une étape d'amplification par DOP PCR. Cet ADN est modifié chimiquement par introduction de groupement amine en utilisant des amorces modifiées par ce groupement. Les produits de PCR sont purifiés et fixés sur des lames en double exemplaire.

## 1.4 Puces Integrachip (Integragen)

Elles comportent 3172 clones qui sont déposés en quatre exemplaires sur la lame. Un prétraitement à la BSA (bovine serum albumine) est effectué pour limiter les phénomènes d'hybridation aspécifique. La résolution est de 0,85 Mb. Leur position et leur spécificité

chromosomique ont été testées par FISH, la recherche de STS (Sequence Tag Site) après amplification et le séquençage de leurs extrémités constituent deux critères de validation supplémentaires. L'uniformité des dépôts a été testée par l'utilisation de sybrgreen (intercalant fluorescent de l'ADN).

## 2 Problèmes rencontrés

### 2.1 Interprétation des résultats et problèmes de polymorphismes

Des problèmes ont été rencontrés avec les **puces GenoSensor Array 300** : aucune donnée n'était en effet disponible sur les éventuels polymorphismes susceptibles d'être détectés par les clones présents sur la lame. Il s'agit en fait de séquences répétées présentes dans les séquences des clones fixés sur la lame. Ces polymorphismes de nombre de copies font en sorte qu'au cours de l'hybridation compétitive de l'ADN du patient et du témoin, l'un des deux s'hybridera de façon préférentielle en fonction de la longueur de la répétition, d'où un ratio de fluorescence anormal. Lors du contrôle de l'anomalie présumée par FISH en utilisant le BAC en cause, cette compétition n'ayant plus lieu, l'image observée ne montre pas d'anomalie.

Le premier cas rencontré a été la mise en évidence d'une « délétion » en 9p11.2 correspondant au locus RASSF1 (ratio : 0,85 et p value : 0,001). Le contrôle par FISH en utilisant comme sonde le BAC en cause dans la délétion n'a pas retrouvé d'anomalie à ce niveau, montrant ainsi qu'il s'agissait bien d'une séquence polymorphe.

Par la suite, une délétion en 14qtel (locus IGH) a également été contrôlée par FISH à l'aide de sondes commerciales Telvysion (Vysis) et Cytocell : aucune des deux n'a retrouvé la délétion. La multiplication des expériences a montré que certaines déviations étaient retrouvées de façon récurrente, affirmant la nature polymorphe de celles-ci et donc leur exclusion comme cause de la pathologie observée.

Le fabricant a également fourni *a posteriori* une liste des polymorphismes correspondant aux BACs utilisés (4 polymorphismes) dont l'un d'eux (14qter) a été identifié suite à l'expérience du laboratoire de génétique de Nancy. Au total, 13 BACs sont actuellement considérés comme responsables de l'obtention d'une déviation non liée à un phénotype pathologique, d'après l'expérience du laboratoire.

## 2.2 Validation de la qualité de l'hybridation et confirmation de l'anomalie

L'un des paramètres important pour l'interprétation des résultats est la détermination d'un seuil, c'est-à-dire le ratio à partir duquel la déviation observée est considérée comme le signe d'une délétion ou d'une amplification. Ce seuil est fixé à 1,2 pour les amplifications et 0,8 pour les délétions avec les **puces Genosensor Array 300**. Cependant, il est nécessaire d'avoir un témoin positif interne pour confirmer, d'une part la qualité de l'hybridation, et d'autre part ce seuil.

Au cours des premières expériences, deux ADN issus de personnes de même sexe étaient cohybridés, ceci dans le but de détecter les anomalies portées par les chromosomes sexuels. Cependant, ce système ne fournissait pas de témoin interne. Par la suite, la cohybridation de deux personnes de sexe différent montrait une déviation pour les clones correspondants aux chromosomes sexuels. Dans ce cas, les anomalies portées par les chromosomes sexuels ne pouvaient plus être détectées de façon optimale.

Pour les **puces Genosystem 1MB**, toute déviation observée sur une lame doit être confirmée par l'hybridation d'une seconde lame en inversant le marquage (système de flip-flop) afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un marquage préférentiel et d'une différence d'intensité du signal fluorescent d'une cyanine par rapport à l'autre : la confirmation de l'anomalie se traduit par une image « en miroir ».

Finalement la stratégie adoptée pour toutes les analyses par puces à ADN a été celle de **l'hybridation en triangle préconisée par l'équipe de Leuven** (Vermeesch et coll.) : il s'agit d'un système d'hybridation de trois lames pour l'étude de trois patients dont l'un de sexe différent des deux autres.

Les marquages sont effectués comme suit : Lame 1 : patient 1 Cy3 + patient 2 Cy5  
Lame 2 : patient 1 Cy5 + patient 3 Cy3  
Lame 3 : patient 2 Cy3 + patient 3 Cy5

Les avantages de cette méthode sont :

- d'hybrider chaque patient deux fois avec un marquage différent et donc d'éliminer les problèmes liés à des différences d'intensité des cyanines,
- d'hybrider chaque patient contre deux autres patients et donc de limiter les problèmes d'interprétation liés aux polymorphismes,
- d'avoir un patient de sexe différent : les BACs correspondants aux séquences de l'X et de l'Y servent alors de témoins internes positifs.

## 2.3 Intensité de fluorescence non homogène

Ce problème a été rencontré avec les **puces Genosystem 1MB**.

Environ 50 % des lames n'ont pas pu être interprétées à cause d'un problème d'atténuation du signal de fluorescence sur les bords de la lame. Ce phénomène se présentait de façon aléatoire au fil des expériences, conduisant à un rapport signal / bruit de fond trop faible dans ces zones et à une déviation standard trop importante entre les réplicats, conduisant à l'exclusion d'un nombre trop élevé de clones pour une analyse statistique correcte.

La première hypothèse émise quant à l'origine de ce problème a été celle d'un problème de lavage des lames. En effet, une stringence trop élevée peut conduire à un affaiblissement du signal de fluorescence par décrochement des ADN à tester. Le protocole de lavage fourni par le fabricant a été remplacé par celui utilisé pour les puces Genosensor Array 300 sans toutefois remédier au problème de façon régulière. Une seconde hypothèse envisagée a été une hybridation non homogène liée éventuellement à une évaporation du tampon d'hybridation : au départ, les lames étaient mises à l'étuve à 37°C dans une boîte contenant du papier absorbant imbibé de tampon, une mauvaise humidification de la chambre d'hybridation aurait pu provoquer un séchage des lames. Il a donc été décidé de réaliser l'hybridation dans une chambre de Corning étanche plongée dans un bain marie sous agitation afin de conserver un taux d'humidité constant et de favoriser l'homogénéité de la réaction d'hybridation.

En fait, il s'est avéré que ce problème était dû à un défaut de fixation des BACs sur les lames qui peut notamment être lié à une quantité trop faible de produit de PCR déposé ou à des pointes bouchées lors du dépôt. **Ce problème relève d'un défaut de contrôle de qualité des puces fournies par le fabricant.**

## 2.4 Bruit de fond

Il constitue le principal problème rencontré lors des mises au point réalisées au laboratoire.

La présence de **poussière** sur les lamelles utilisées pour les **puces Genosensor Array 300** a conduit à des taches fluorescentes sur la lame au moment de la lecture et de l'analyse des données. L'utilisation d'une bombe d'air comprimé pour nettoyer les lamelles a résolu ce problème.

La présence de sels sur les lames après séchage par centrifugation se traduit par une traînée verte sur la lame vue lors du passage des lames au scanner. Ceci peut se produire quelque soit le type de lames utilisées et est dû à un **séchage trop lent**. Il est possible de remédier à ce problème en effectuant un passage rapide de la lame dans de l'eau après le

dernier lavage (cas des puces de l'université de Leuven) ou dans l'isopropanol (protocole de lavage des puces Genosensor Array 300) et de la sécher le plus rapidement possible par centrifugation à vitesse suffisante (1200 tours par minute) à 20°C (pour éviter la cristallisation des sels). Si cela ne s'avère pas suffisant, il est possible de relaver les lames par passage dans la dernière solution du protocole de lavage : ceci présente néanmoins l'inconvénient de réduire l'intensité du signal par décrochement des ADN testés de la lame.

On peut observer la présence de petits points fluorescents sur la lame : ils sont dûs à la présence de cyanines non incorporées à l'ADN à tester, qui se sont fixées sur la lame au cours de l'hybridation, à la suite d'une **mauvaise purification**. Ce phénomène est parfois rencontré au cours de l'utilisation des puces au laboratoire mais n'a pas constitué de gêne occasionnant des résultats ininterprétables.

Un bruit de fond rouge couvrant tout ou partie de la lame peut être dû à un **défaut de pré-hybridation des lames** à la BSA (Bovine Serum Albumine) lors de l'utilisation de lames à surface amino-silane (cas des lames Corning utilisées pour la fabrication des puces Integrachip). En effet, la BSA est une macromolécule qui bloque les sites responsables de la liaison non spécifique des clones de la lame. Ceci s'est produit avec une **puce Integrachip**. Aucun remède n'est alors envisageable (essai de lavage supplémentaire inefficace).

## 2.5 Signal / bruit de fond trop faible

Il a été rencontré essentiellement avec les **puces Integrachip** (figure 14). Huit lames ont été testées. Les problèmes rencontrés ont été essentiellement dus à un bruit de fond trop intense par rapport au signal fluorescent engendré par les cyanines incorporées.

La première expérience a montré une faible intensité de signal malgré une bonne incorporation des cyanines à l'ADN à tester (contrôle effectué par dosage au Nanodrop). La quantité d'ADN du patient à hybrider était fixée à 500 ng selon l'expérience du fabricant, sans tenir compte du rendement d'incorporation des cyanines, celui-ci étant supposé rester constant. Cependant, étant donné que des modifications dans le protocole initial de marquage et de purification de l'ADN ont été apportées au laboratoire dans le but d'homogénéiser les différents protocoles, il se peut que le rendement d'incorporation des cyanines varie par rapport à la technique fournie. C'est pourquoi, il a été décidé de **tenir compte directement de la quantité de cyanines incorporées** déterminée par le dosage au Nanodrop : 300 pmol de cyanines ont été incorporés par la suite.

Dans ce cas, le signal obtenu était très intense, posant le problème de l'aspécificité de l'hybridation, avec un bruit de fond restant très important. Ceci se traduit, après analyse des

images obtenues au scanner, par une dispersion trop importante des ratios de fluorescence et donc une déviation standard de ceux-ci trop élevée, empêchant de fixer avec certitude la limite entre les signaux considérés comme normaux et ceux correspondant à une éventuelle déletion ou duplication.

Il a alors été décidé de **diminuer la quantité de cyanines incorporées** en la fixant à 150 pmol. Malgré tout, le problème de bruit de fond persistait, conduisant à une impossibilité d'interprétation des résultats du fait d'un rapport signal / bruit de fond insuffisant. Plusieurs causes sont alors invoquées : les conditions d'hybridation ne sont pas optimales, notamment en ce qui concerne le blocage des séquences répétées à la fois de l'ADN à tester et des BACs fixées sur la lame ou bien les conditions de lavages se sont pas adéquates pour éliminer les signaux aspécifiques.

En ce qui concerne le **blocage des séquences répétées**, l'incubation de l'ADN à tester en présence d'ADN Cot-1 avant l'hybridation sur lame aboutit à la neutralisation des séquences répétées de celui-ci. Il est admis qu'une proportion de 40 fois la quantité d'ADN à tester conduit à un résultat satisfaisant. Les séquences répétées des BACs fixés sur la lame sont quant à elles bloquées par l'ADN de sperme de saumon et l'ARNt de levure ajoutés à la solution d'hybridation. La quantité optimale à utiliser et la qualité de l'ADN de sperme de saumon sont alors à prendre en compte. En effet, la comparaison des différents protocoles montre que ces quantités sont très variables d'une puce à l'autre. Il est alors important de déterminer l'impact de ces variations sur l'hybridation. La quantité d'ADN de sperme de saumon a donc été augmentée (de 500 ng/μl à 750 ng/μl) mais sans montrer d'amélioration significative. La qualité de celui-ci peut également avoir une influence sur la qualité de l'hybridation : des fragments de petite taille s'hybrident avec plus de spécificité sur les séquences répétées des BACs. En comparant l'ADN utilisé au laboratoire et celui du kit de marquage Invitrogen par migration électrophorétique sur gel d'agarose, il apparaît que le second est d'avantage fragmenté. Il a donc été utilisé pour la préparation de la solution d'hybridation sans toutefois montrer de différence par rapport aux expériences précédentes. De plus, le premier était préalablement utilisé dans le protocole des puces de l'université de Leuven et donnait des résultats satisfaisants.

Les **conditions de lavages** doivent être optimisées dans le but de réduire le bruit de fond en supprimant l'hybridation aspécifique sans toutefois altérer l'hybridation de l'ADN à tester sur ses séquences complémentaires. Une augmentation de la température de lavage a été testée : elle est passée de 42 à 49°C. Cependant, ceci a conduit à une perte de signal trop importante sans augmenter le ratio signal / bruit de fond. Un essai a été réalisé avec le

protocole de lavage des puces de l'université de Leuven, sans toutefois montrer de résultats satisfaisants : la perte de signal s'est avérée être trop importante.

Des adaptations du protocole, concernant notamment les conditions de lavage en modifiant éventuellement la composition des solutions de lavage, sont donc encore à prévoir afin de tenter de résoudre les problèmes rencontrés.

On peut également envisager une sonication ou une digestion enzymatique de l'ADN génomique afin de réduire l'hybridation aspécifique grâce à cette fragmentation (voir protocole des puces Genosystem 1MB).

Enfin, un défaut de dépôt des clones sur les lames n'est là encore pas à exclure, le fabricant étant lui aussi encore dans une phase d'essai.

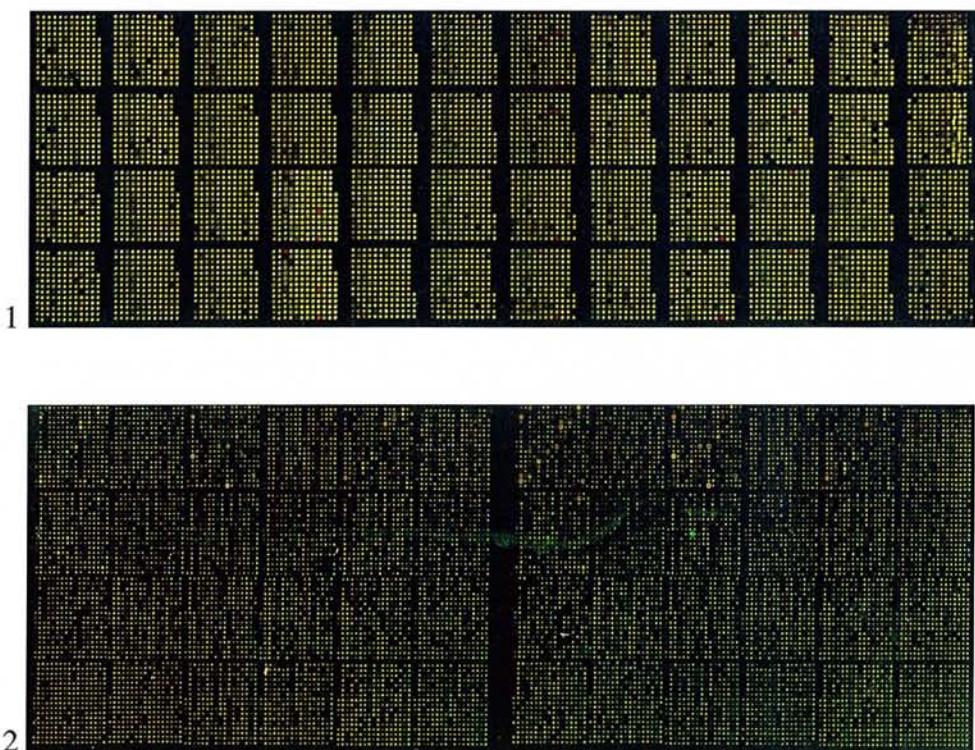


Figure 14 : Essai puce Integrachip : 1) Image attendue, 2) Image obtenue au laboratoire

## 2.6 Faible intensité de signal

L'intensité du signal de fluorescence dépend de la quantité d'ADN déposée ainsi que de la qualité du marquage par les cyanines. Il est donc impératif de doser l'ADN à tester après l'étape de random priming et de purification et de contrôler l'incorporation des cyanines. Tout échantillon d'ADN pour lequel le ratio de la quantité d'ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )  $\times 10^3$  / (poids moléculaire des nucléotides X pmol de cyanine incorporés) est supérieur à 80 doit être rejeté.

De plus, il est impératif de protéger les lames de la lumière après hybridation afin de ne pas provoquer de phénomène de « photobleaching ».

La qualité des cyanines commerciales influe sur la qualité du marquage.

L'utilisation de d-CTP marqués par des **cyanines Amersham** conduit à un meilleur rendement d'incorporation et des signaux d'intensité plus élevée par rapport aux d-CTP marqués par des cyanines de la société Perkin à concentration égale.

# Le retard mental

## 1 Définition, fréquence et étiologies possibles

### 1.1 Définition

Le retard mental a été défini par l'American Association on Mental Retardation (1992) comme une altération des fonctions cognitives et adaptatives observée chez l'enfant.

### 1.2 Fréquence et étiologies

Il touche 3 % de la population générale (Cans et al. 1999, des Portes et al. 2002) : le retard mental léger (QI de 50 à 70) qui survient avec une incidence de 2 à 3 % est 7 à 10 fois plus fréquent que le retard mental modéré (QI de 35 à 50) ou sévère (QI de 25 à 35) retrouvés avec une fréquence de 3 à 4 pour mille (Schaefer et al. 1992). Etant donnée sa prévalence, la recherche de l'étiologie est importante : elle est d'une part demandée par la famille du patient et d'autre part la connaissance de la cause permet d'établir le risque de récurrence dans la famille, de prédire dans certains cas le pronostic, d'orienter les explorations paracliniques complémentaires et d'adapter la prise en charge thérapeutique du patient et le soutien de la famille (Curry et al. 1997).

	%
Chromosome abnormalities	4-28
Recognizable syndromes	3-7
Known monogenic conditions	3-9
Structural central nervous system abnormalities	7-17
Complications of prematurity	2-10
Environmental/teratogenic causes	5-13
"Cultural-familial" mental retardation	3-12
Provisionally unique, monogenic syndromes	1-5
Metabolic/endocrine causes	1-5
Unknown	30-50

<sup>a</sup>Laxova et al. [1977], Opitz et al. [1982], Fryns et al. [1983], McQueen et al. [1988], Wellensley et al. [1999], Schaefer and Bodensteiner [1992], Curry et al. [1995], and Majnemer and Shevell [1995].

<sup>b</sup>Anderson et al. [1996].

Tableau 3 : causes de retard mental (revue de la littérature) (Curry et al. 1997)

Les causes de retard mental sont multiples (tableau 3). La démarche diagnostique utilise les données de l'anamnèse du cas probant et les données familiales, elle s'appuie sur des données cliniques (en autre une dysmorphie crânio-faciale, des anomalies de la croissance, des malformations d'organes) et des examens paracliniques parmi lesquels les études

cytogénétiques (Battaglia et *al.* 2003). Ainsi, la cause d'un retard mental est retrouvée dans 50 % des formes modérées à sévères et dans 20 à 25 % des formes légères (Majnemer et *al.* 1995, Battaglia et *al.* 1999). Parmi les étiologies retrouvées, il faut citer la part importante des anomalies chromosomiques : celle-ci est estimée entre 4 et 34 % (en moyenne 16,1 % soit 3906 / 24245 individus) (Xu et *al.* 2003, tableau 4). La nature de ces anomalies est résumée dans le tableau 5. La cause génétique la plus fréquente est la trisomie 21, responsable de 5 à 16 % des cas, suivie du syndrome de l'X fragile retrouvé dans 1 à 3 % des cas (Leonard et *al.* 2002). Ceci montre toute l'importance d'adopter une stratégie d'étude où la cytogénétique occupe une place de choix. Cependant, il est difficile, lorsque l'on n'est pas en présence d'un syndrome clinique caractéristique d'une anomalie chromosomique connue, de déterminer l'origine génétique des signes observés, ce qui implique la mise en œuvre de techniques complémentaires telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence, la CGH et éventuellement les puces à ADN.

Référence	Nombre de patients	Patient type	Pays	Nombre (%) d'anomalies chromosomiques
Bourgeois and Benezech [[1977]]	600	Retard mental (hôpital psychiatrique)	France	54 (9)
Kodama [[1982]]	197	Retard mental sévère	Japon	8 (4)
Opitz et al. [[1982]]	168	Retard mental sévère	Etats Unis	42 (25)
Rasmussen et al. [[1982]]	1 905	Retard mental	Danemark	359 (18,8)
Wuu et al. [[1984]]	470	Retard mental	Taiwan	38 (8,1)
Gustavson et al. [[1987]]	171	Retard mental léger	Suède	20 (11,9)
Srsen et al. [[1989]]	324	Retard mental	Tchécoslovaquie	92 (28,4)
Wuu et al. [[1991]]	1 323	Retard mental	Taiwan	
			IQ 50-75	104 (7,87)
			IQ <50	231 (17,5)
Curry et al. [[1997]]	1 314	Retard mental	Inde	311 (23,7)
Schwartz [[1988]]	350	Retard mental / retard de développement	Etats Unis	42 (11,9)
Phelan et al. [[1996]]	4 485	Retard mental	Etats Unis	538 (12)
Hou et al. [[1998]]	11 892	Enfants à handicap intellectuel	Taiwan	1 889 (15,9)
Felix et al. [[1998]]	202	Retard mental	Brésil	69 (34,1)
Hong et al. [[1999]]	604	Patients d'hôpital psychiatrique	Corée	69 (11,4)
Battaglia et al. [[1999]]	120	Retard mental / retard de développement	Italie	18 (15,0)
Cora et al. [[2000]]	120	Retard mental	Turquie	23 (19)
Total	24 245			3 906 (16,1) limites 4-34,1%

Tableau 4 : Fréquence des anomalies chromosomiques chez des patients avec retard mental (Xu et al. 2003)

Trisomy 21/Down syndrome	
	Fragile X syndrome
	Unbalanced translocations
	Duplications
	Deletions (interstitial, terminal)
	Extra structurally abnormal chromosomes (markers)
	Diploid/triploid mosaicism
	Submicroscopic aberrations at breakpoints in apparently balanced rearrangements
	Subtelomere rearrangements
	Cryptic deletions
del(1)(p36.3)	Monosomy 1p
del(4)(p16)	Wolf-Hirschhorn
del(5)(p15)	Cri du chat
del(7)(q11.23q11.23)	William syndrome
del(8)(q24.1q24.1)	Langer-Giedion syndrome
del(11)(p13p13)	WAGR <sup>b</sup> syndrome
del(15)(q11q13)pat	Prader-Willi syndrome
del(15)(q11q13)mat	Angelman syndrome
del(16)(p13.3)	Rubinstein-Taybi syndrome
del(17)(p11.2p11.2)	Smith-Magenis syndrome
del(17)(p13.3)	Miller-Dicker syndrome
del(20)(p11.23p11.23)	Alagille syndrome
del(22)(q11.2q11.2)	VCF <sup>b</sup> /DiGeorge
	Uniparental disomy
UPD(14)mat	IUGR <sup>b</sup> , developmental delay, precocious puberty, short stature, small hands and feet
UPD(14)pat	Polyhydramnios, facial anomalies, severe neurologic involvement, skeletal anomalies and growth retardation
UPD(15)mat	Prader-Willi syndrome
UPD(15)pat	Angelman syndrome

Tableau 5 : anomalies chromosomiques connues et syndromes associés au retard mental (Xu et al. 2003)

<sup>b</sup> WAGR: Wilm's tumor, aniridia, genitourinary malformations and retardation of growth and development;  
 VCF: velocardiofacial; IUGR: intrauterine growth retardation. UPD : uniparental disomy

## 2 Approche cytogénétique

L'examen de première intention reste le caryotype : il donne lieu à une approche globale de l'ensemble des chromosomes, visualisant les anomalies de structure sans perte ni gain de matériel telles que les inversions et les translocations réciproques mais aussi les aneuploïdies, les duplications ou délétions à condition que la taille en soit suffisante. Cependant, compte tenu des limites de résolution, il est souvent nécessaire de mettre en œuvre des techniques de cytogénétique moléculaire telle que l'hybridation *in situ* fluorescente. Elles ont contribué aux avancées importantes réalisées dans l'étude des retards mentaux, à la fois pour caractériser précisément une anomalie détectée au caryotype standard et pour mettre en lumière des anomalies cryptiques chez des patients à caryotype apparemment normal. La technique de FISH a confirmé le diagnostic chromosomique dans des cas d'anomalies de structure déséquilibrées (13q, 14q, 3p) (Reddy et al. 2001). A titre d'exemple, Gersh et al. (1997) ont, grâce à l'utilisation de sondes spécifiques, différencié deux délétions très proches au niveau du bras court du chromosome 5, conduisant au diagnostic différentiel entre le syndrome du cri du chat (5p15.2) se traduisant par un retard mental sévère et le cri du chat like (délétion en 5p15.3) de meilleur pronostic, montrant ainsi l'importance d'une technique fine pour établir un pronostic.

Les régions subtelomériques étant des régions riches en gènes et souvent impliquées dans les réarrangements chromosomiques (Saccone et al. 1992), une technique de FISH utilisant des sondes localisées dans ces zones a été mise au point. Elle aboutit à un diagnostic chromosomique et à la détection d'une aneusomie, c'est-à-dire la perte ou le gain de matériel, dans les régions subtelomériques dans 5 à 7 % des cas de retard mental inexpliqué avec des variations allant de 0 à 29 %, ceci s'expliquant par les biais de recrutement des patients : la prévalence est plus élevée lorsque le retard mental est modéré à sévère (6,3 %) que lorsqu'il est léger (1 %) en raison d'une origine unique dans le premier cas et de l'influence de facteurs environnementaux dans le second cas (22 études regroupant 2585 patients, Flint et al. 2003). Ces anomalies sont soit des translocations déséquilibrées (54 %), soit des délétions (39 %) soit des duplications (6 %). Il faut noter en outre que dans 50 % des cas, ces anomalies sont le résultat d'un déséquilibre d'une anomalie parentale équilibrée méconnue, soulignant ici l'importance de l'étude cytogénétique des parents et éventuellement de leur fratrie dans le cadre d'un conseil génétique afin d'établir un diagnostic prénatal.

La FISH des régions subtelomériques ne peut cependant pas détecter les autres délétions interstitielles.

Dans ce cas, la CGH et notamment la CGH haute résolution (3 Mb) est une alternative intéressante : Kirchhoff et *al.* (2004) ont comparé ces deux techniques chez 94 patients atteints de retard mental et ont ainsi montré la supériorité de la CGH par rapport à la FISH subtélomérique (respectivement 8,5 % et 3,2 % d'anomalies détectées), ce qui s'explique par le fait que la majorité des aberrations chromosomiques sont interstitielles.

La CGH est utilisée en seconde intention chez des patients présentant un retard mental et une dysmorphie lorsque le caryotype est normal. Elle retrouve une étiologie chromosomique dans un certain nombre de cas. La proportion d'anomalies détectées dépend de la taille de l'échantillon et varie de 60 % (3 / 5) (Ghaffari et *al.* 1998) à 29 % (5 / 17) (Joly et *al.* 2001) pour les petites séries et représente 11 % (16 / 144) des cas pour les séries plus importantes (Kirchhoff et *al.* 2001). Cette dernière étude a mis en évidence des délétions ou duplications interstitielles (11) ne pouvant pas être détectées par une autre technique (caryotype et FISH) et a en outre retrouvé une délétion chez 25 patients présentant une translocation apparemment équilibrée vue au caryotype, conduisant ainsi à la caractérisation précise de l'anomalie à l'origine du retard mental. La principale limite reste la résolution.

La CGH microarray qui représente une évolution de cette technique pallie à cet inconvénient et s'est donc développée ces dernières années. La CGH microarray a également été comparée à la FISH des régions subtélomériques : non seulement elle détecte toutes les anomalies précédemment trouvées par FISH mais affine le diagnostic cytogénétique (Veltman et *al.* 2002).

Shaw-Smith et *al.* (2004) ont montré au cours d'une étude portant sur 50 patients présentant un retard mental associé à une dysmorphie, chez lesquels le caryotype en bandes G ne montrait aucune anomalie visible et ne présentant pas d'anomalie subtélomérique par la technique de FISH, que la CGH microarray détectait une délétion ou une duplication dans 24% des cas. En excluant les anomalies héritées d'un des deux parents, un gain ou une perte de matériel génétique inférieurs à 10 Mb (voire 3 Mb) est donc retrouvé chez 14 % des patients. Des résultats similaires ont été par ailleurs retrouvés à l'aide de BACs correspondants aux régions subtélomériques : Harada et *al.* (2004) détectent une délétion ou une duplication chez 5,8 % des patients atteints de retard mental (4 / 69), Vissers et *al.* (2003) chez 7 patients sur 20 (puces 1 Mb). **Cependant, il semble encore difficile de comparer ces résultats entre eux du fait de la différence des BACs utilisés, de leur localisation chromosomique, de la résolution des puces en fonction de la stratégie adoptée (recherche des anomalies subtélomériques ou sur l'ensemble du génome).**

La CGH microarray a également montré sa supériorité par rapport à la technique de CGH sur chromosomes métaphasiques pour l'identification d'une délétion en 7q31 chez un patient présentant des troubles du langage et un retard mental modéré, dans une région connue pour être impliquée dans ce type de pathologies (Tyson *et al.* 2004).

Elle peut également localiser précisément et rapidement un point de cassure dans une région connue pour être le siège de délétions entraînant un retard mental : les délétions terminales en 1p36 sont une cause de retard mental mais les points de cassure sont multiples. Leur caractérisation par analyse des microsatellites puis par FISH conduit à tester un nombre important de BACs, multipliant ainsi les expériences, alors que la CGH microarray peut déterminer le point de cassure en une seule manipulation avec une précision de 100 à 300 kb (Yu *et al.* 2003).

### **3 Expérience des puces au laboratoire dans le cadre du retard mental**

Quatre types de puces ont été utilisés au laboratoire dans le but de déterminer une éventuelle origine chromosomique d'un retard mental (tableau 6).

Les puces **GenoSensor Array 300** sont celles qui ont la plus large utilisation. Soixante quatorze lames ont été hybridées, un résultat a pu être rendu pour cinquante trois patients. Sept lames ont été ininterprétables en raison de problèmes techniques (présence de poussière ou bruit de fond trop important) En raison des problèmes d'interprétation du fait du manque de recul et du problème des polymorphismes non identifiés au départ et de l'absence de contrôle interne positif, dix déviations ont été contrôlées par une deuxième hybridation confirmant ainsi la présence de polymorphismes. Cinq délétions ont été mises en évidence ou confirmées à l'aide de ces puces.

Quinze lames des puces **Genosystem 1MB** ont été hybridées dont seules sept ont conduit à un résultat interprétable du fait des problèmes techniques rencontrés. Elles sont à l'origine de l'identification de trois anomalies (une duplication, une délétion et la caractérisation d'un marqueur surnuméraire).

Les **puces de l'université de Leuven** ont été testées. Quinze lames ont été hybridées dont 12 ont donné des résultats exploitables, tous normaux.

L'utilisation des **puces Integrachip** n'a pas conduit à l'obtention de résultats interprétables du fait des problèmes techniques rencontrés. Huit lames ont été hybridées.

	Puces Genosensor Array 300	Puces Genosystem 1MB	Puces de l'université de Leuven	Puces Integrachip
Nombre de lames hybridées	74	15	15	8
Nombre de patients testés	53	7	8	4
Nombre d'anomalies détectées	5	3	0	0

Tableau 6 : Récapitulatif des puces testées au laboratoire de génétique de Nancy

## Anomalies décelées

### Délétion 1qter (patiente suivie par le Pr. Leheup)

Il s'agit d'EH., 29 mois. En période prénatale, l'échographie montrait un retard de croissance *in utero* sévère. A la naissance (38 semaines d'aménorrhée), la taille était de 37 cm pour un poids de 2100 g et un périmètre crânien de 27 cm (microcéphalie). A l'âge de 4 mois, elle présentait une microcéphalie très sévère (périmètre crânien : 30 cm), des anomalies de croissance post-natale avec une absence complète de ratrapage statural (taille : 47 cm, poids : 2960 g), associé à un retard d'acquisitions motrices très sévère, des problèmes alimentaires, un opisthotonus, un pouce adductus bilatéral. L'IRM montrait un arrêt de maturation de la substance blanche, un corps calleux fin, pas de pachygyrie ni polygyrie. Il n'y avait pas de cardiopathie. Une étude cytogénétique a été réalisée à cette occasion. Le caryotype de la patiente n'a pas montré d'anomalie décelable (résolution : 600 bandes). En raison du retard de croissance *in utero* sévère, une disomie uniparentale portant sur les chromosomes 7 et 14 à l'aide de marqueurs polymorphes de type microsatellites a été recherchée ; l'analyse a montré une contribution maternelle et paternelle aux loci étudiés, excluant donc cette étiologie. Une technique de puce à ADN a alors été mise en œuvre : une microdélétion a été retrouvée à l'aide de la puce GenoSensor Array 300 dans la région 1qtel (tableau 7). La délétion en 1qtel se traduit par un « p-value » < 0,001 (0,0005 pour le clone SHGC-18290, 0,0001 pour le clone 1QTEL10). En parallèle, l'analyse par FISH à l'aide de sondes multitelomériques

(exploration simultanée de toutes les régions subtélomériques) Vysis a été réalisée : cette technique montre un signal fluorescent plus faible sur l'un des chromosomes 1 dans la région 1qtel au locus VIJyRM2123 (1QTEL10) (sonde TelVysion). Le contrôle à l'aide des sondes subtélomériques 1p et 1q Cytocell confirme ce résultat : un signal plus faible a été observé en 1qtel sur l'un des chromosomes 1 par rapport au chromosome homologue sur 15 mitoses, traduisant une hybridation partielle de la sonde sur l'un des chromosomes 1 à ce niveau en raison de la délétion (figure 15). La CGH réalisée *a posteriori* sur chromosomes métaphasiques n'a pas montré d'anomalie dans ce cas du fait de la petite taille de la microdélétion et de la faible résolution de la technique.

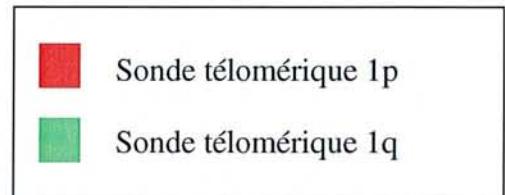
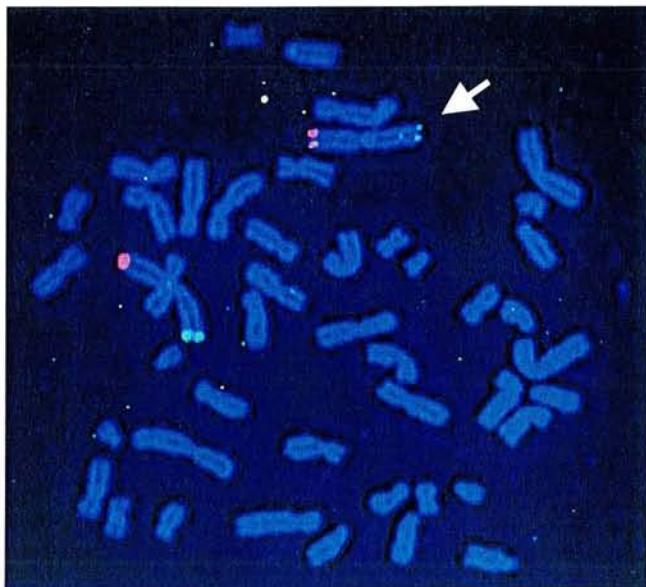
Par ailleurs, les caryotypes parentaux ont été réalisés et n'ont pas révélé d'anomalies (résolution : 550 bandes chez le père et 500 bandes chez la mère). Une fois la délétion mise en évidence chez la patiente, il convenait de vérifier le caractère acquis ou hérité de celle-ci : une FISH subtélomérique 1p1q Cytocell a été réalisée chez les deux parents, montrant une perte d'intensité du signal en 1qtel analogue chez le père et la fille. Il convient maintenant d'étudier la taille de la délétion chez ces deux sujets par la comparaison de l'hybridation de BACs sélectionnés dans cette région afin de savoir si les troubles observés sont dus à une délétion de plus grande taille chez l'enfant ou s'il s'agit d'un simple polymorphisme hérité.

Genosensor Report (12 of 287 targets)									
		Location		#	Mass Ratio		Mean Ref	NonModal	Mod
Tgt	Name				Mean	CV(%)	(c/s)	(nh p<%)	
22	SHGC-18290	1q tel		3	0.84	2.2	903.1	0.0005	
23	1QTEL10	1q tel		3	0.83	1.2	705.5	0.0001	
28	REL	2p13-p12		3	0.85	0.4	530.9	0.0001	
148	FGF4,FGF3	11q13		3	1.14	0.8	981.7	0.005	
265	D22S543	22q11		3	0.88	2.1	453.4	0.01	
276	STS 3'	Xp22.3		3	1.16	2.0	608.5	0.005	
277	STS 5'	Xp22.3		3	1.18	1.7	740.5	0.001	
278	KAL	Xp22.3		3	1.19	2.7	621.2	0.002	
279	DMD exon 45-51	Xp21.1		3	1.26	0.8	418.0	0.0001	
282	AR 3'	Xq11-q12		3	1.19	1.5	434.8	0.0005	
283	XIST	Xq13.2		3	1.15	1.8	863.2	0.005	
284	OCRL1	Xq25		3	1.36	0.8	463.4	0.0001	

Tableau 7 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 1qter.

Hybridation ADN EH contre un témoin masculin (déviation du ratio de fluorescence des clones de l'X).

Les déviations en 2p13-p12 et 11q13 sont dues à des séquences polymorphes.



**Figure 15 : FISH (sondes télomériques CytoCell).** La sonde télomérique 1p (rouge) sert de contrôle de l'hybridation. La flèche indique la délétion en 1qtel (signal vert plus faible en raison d'une hybridation partielle de la sonde).

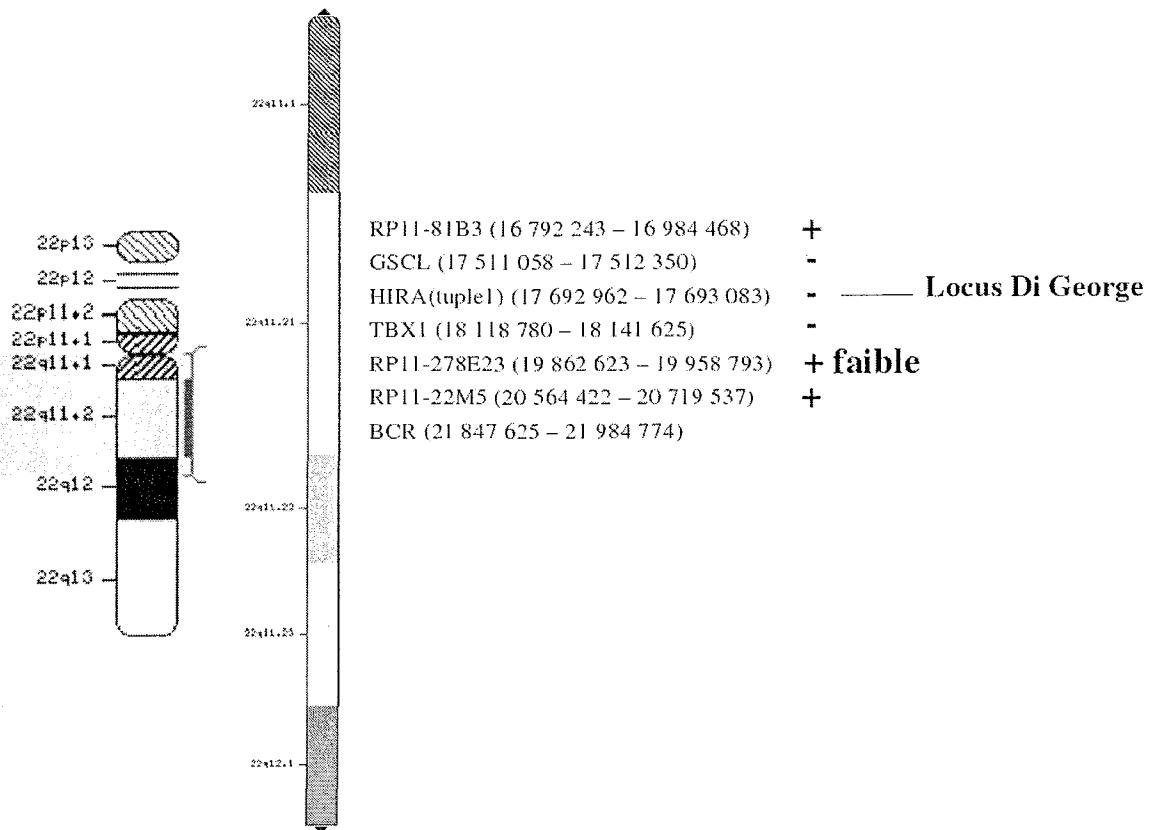
### Déletion 22q11 (patient suivi par le Dr. Vigneron)

LH., 23 mois. En période prénatale, des signes d'appel échographiques (mouvements d'enroulement des membres supérieurs) un hygroma avec une nuque épaisse ( $> 6$  mm) ont conduit à un prélèvement de villosités choriales et à l'établissement d'un caryotype foetal qui s'est révélé normal (46,XY). L'enfant, né à 41 SA, pèse 3100 g pour une taille de 47 cm et un périmètre crânien de 32,5 cm. Ont été notés un stridor intermittent, des difficultés alimentaires et des pleurs faisant évoquer un reflux gastro-oesophagien. A sept mois, cet enfant présente un petit périmètre crânien (-3 DS), un retard statural (taille -2 DS) et une fermeture précoce de la fontanelle. On note également une dysmorphie faciale avec des fentes palpébrales à orientation antimongoloïde, des oreilles à pavillon décollé, un cou court, un pli palmaire unique droit, des plis profonds et des doigts boudinés. L'IRM montre une atrophie corticale gauche prédominante. A un an, on note une petite bouche et un retard des acquisitions et du langage : l'enfant ne tient pas assis et ne parle pas, il présente une tétraparésie spastique, toujours une microcéphalie (périmètre crânien : -3 DS), un front bombant, une rétractation bitemporale. Une étude cytogénétique est réalisée : le caryotype ne montre pas d'anomalie, la recherche d'un syndrome d'Angelman par analyse du profil de méthylation de la région 15q11-q13 afin de rechercher une éventuelle délétion d'un allèle parental s'est révélée négative. Une analyse est alors entreprise par puce à ADN Genosensor Array 300 afin de mettre en évidence une anomalie submicroscopique. Une délétion dans la région 22q11 est

ainsi retrouvée : trois clones montrent la délétion : 266, 267 et 268 correspondants aux loci GSCL, TUPLE1 et TBX1. La délétion se traduit par un ratio de fluorescence moyen de 0,67, 0,66 et 0,62 et une « p-value » de 0,0001 (tableau 8). Ce résultat est confirmé par FISH à l'aide d'une sonde Cytocell (LSI 22q11) spécifique de la région : la délétion est retrouvée sur 50 noyaux et 15 mitoses au locus TUPLE 1 (22q11). La CGH *a posteriori* confirme ce résultat. Une cartographie de la région et l'hybridation de BACs localisés à ce niveau a borné la délétion (figure 16). Un retard mental est également décrit chez l'un des cousins paternels ; cependant, le caryotype chez les parents ne montre pas d'anomalies (résolution 550 bandes). Cette anomalie n'est pas retrouvée chez la mère par FISH, l'étude chez le père est actuellement en cours. La CGH microarray est intéressante ici car elle explore, entre autres régions, la région 22q11 chez un patient pour lequel le tableau clinique n'était pas évocateur d'une délétion en 22q11 : malgré un nez un peu rond, on ne retrouve pas de racine haute du nez, pas de cardiopathie qui pourraient être en faveur d'une telle anomalie mais seulement une hernie sus diaphragmatique. Cet exemple montre donc les limites de la FISH qui ne permet qu'une recherche ciblée en fonction d'une orientation clinique précise.

Genosensor Report (6 of 287 targets)								
only targets whose p <= 0.01								
Tgt	Name	Location	#	Mass Ratio		Mean Ref (c/s)	NonModal (nh p <>)	Mod
				Mean	CV(%)			
24 U32389		2p tel	3	0.83	1.4	55.0	0.0002	
26 MYCN(N-myc)		2p24.1	3	1.18	2.8	98.1	0.005	
215 PPARBP(PBP)		17q12	3	1.16	1.0	129.7	0.002	
266 GSCL		22q11.21	3	0.67	0.4	411.7	0.0001	
267 HIRA(TUPLE1)		22q11.21	3	0.66	1.0	307.6	0.0001	
268 TBX1		22q11.2	3	0.62	1.2	517.1	0.0001	

Tableau 8 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 22q11.  
Hybridation de l'ADN de LH contre un ADN témoin de même sexe.



**Figure 16 : Cartographie de la région 22q11. - : BACs ne s'hybridant pas par FISH (région chromosomique délétée), + : BACs s'hybridant par FISH (bornant la délétion) (distance en pb à partir de l'extrémité du bras court)**

### Délétion 21q22 (patiente suivie par le Pr. Leheup)

LA., 10ans. En période prénatale, à 32 semaines d'aménorrhée, un retard de croissance *in utero* a été détecté ainsi qu'une dysplasie multikystique du rein gauche et ont conduit à la réalisation d'un caryotype fœtal sur cellules de liquide amniotique qui s'est révélé normal (46,XX). A la naissance, l'enfant mesure 45 cm pour un poids de 2140 g, présente une microcéphalie (périmètre crânien : -2,5 DS) associée à une coarctation intra auriculaire, une oreillette unique, une dysplasie rénale multikystique gauche et un reflux vésico-rénal droit. Elle s'est tenue assise à 15 mois. A neuf ans, cette enfant présente un retard de langage majeur et pas d'autonomie à la marche. On note une dysmorphie faciale avec une enophtalmie et un front bombant, une hypoplasie de l'étage moyen. Elle présente une fossette présacrée borgne et une hypoplasie des grandes lèvres. Devant une hémiplégie gauche, une IRM cérébrale est réalisée et montre un défaut de giration frontale droite. Devant ce tableau, une étude cytogénétique à la recherche d'un syndrome microdélétionnel est entreprise. Après la

réalisation du caryotype qui s'est révélé normal, la technique CGH microarray (puce Genosensor Array 300) a identifié une délétion interstitielle du locus AML1 en 21q22.3 (ratio moyen de 0,58 et « p-value » de 0,0001 (tableau 9) contrôlé par CGH microarray avec un marquage inversé. Par la suite, la CGH sur chromosomes métaphasiques n'a pas révélé cette délétion, montrant ainsi les limites de résolution de cette technique. Cette anomalie a été vérifiée par FISH à l'aide de la sonde locus spécifique TEL-AML1 (Vysis). Cette sonde est utilisée en hématologie pour le diagnostic et le suivi de patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques : elle détecte le transcrit de fusion résultant de la translocation (12;21). Une seconde sonde possède également le locus AML1, la sonde AML1-ETO. La sonde couvrant AML1 présentant une séquence plus courte dans cette dernière, la sonde TEL-AML1 a été choisie de façon à couvrir l'intégralité du gène AML1 (sonde de 500 kb) afin de détecter une éventuelle délétion partielle. La technique de FISH avec comme sondes des BACs localisés au niveau de la région délétée a borné la délétion avec plus de précision, apportant une preuve supplémentaire de la délétion du gène AML1. Deux des BACs montrant la délétion comprennent dans leur séquence le gène AML1, confirmant ainsi l'implication de ce dernier dans la pathologie (figure 17). AML1 est un facteur de transcription qui active l'expression de gènes nécessaires au développement normal des cellules hématopoïétiques. Ce gène est impliqué dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant (présence d'un transcrit de fusion TEL-AML1, t(12;21)), les syndromes myélodysplasiques, les leucémies aiguës myéloblastiques de type M2 (transcrit de fusion AML1-ETO, t(8;21)). D'autre part, une haploinsuffisance de ce gène a été mise en relation avec une thrombopénie familiale liée à une prédisposition au développement de leucémie aiguë myéloblastique (Song et al. 1999). La découverte de cette délétion chez la patiente qui présente par ailleurs une thrombopénie avec microcytose (volume plaquettaire moyen : 6,4 fl. Normale : 7,2 à 11,1 fl), a donc un impact important sur le plan du suivi hématologique de cette dernière. Jusqu'alors, ce gène n'a pas été impliqué dans des retards mentaux ou des troubles du développement psychomoteur, ce qui laisse supposer que d'autres gènes localisés dans cette région sont délétés et en cause dans les troubles observés.

Genosensor Report (12 of 287 targets)								
only targets whose $p < 0.01$								
Tgt	Name	Location	#	Mass Ratio		Mean Ref (c/s)	NonModal (inh p < x)	Mod
				Mean	CV(%)			
118	AFM137XA11	9p11.2	3	1.14	0.6	479.4	0.01	
260	RUNX1(AML1)	21q22.3	3	0.58	2.8	142.5	0.0001	
276	STS 3'	Xp22.3	3	1.28	1.9	124.3	0.0001	
277	STS 5'	Xp22.3	3	1.40	3.2	190.5	0.0001	
278	KAL	Xp22.3	3	1.26	1.9	219.0	0.0001	
279	DMD exon 45-51	Xp21.1	3	1.49	1.0	125.8	0.0001	
280	DX8580	Xp11.2	3	1.18	1.5	176.9	0.005	
282	AR 3'	Xq11-q12	3	1.29	2.2	189.9	0.0001	
283	XIST	Xq13.2	3	1.28	1.9	163.2	0.0001	
284	OCRL1	Xq25	3	1.47	3.6	108.6	0.0001	
286	SRY	Yp11.3	3	0.56	2.7	134.4	0.0001	
287	AZFa region	Yq11	3	0.79	1.5	178.2	0.0001	

Tableau 9 : Résultat puce Genosensor : délétion 21q22. Hybridation de l'ADN de LA contre un ADN de témoin de sexe masculin (déviation des ratios de fluorescence des clones de l'X et de l'Y)

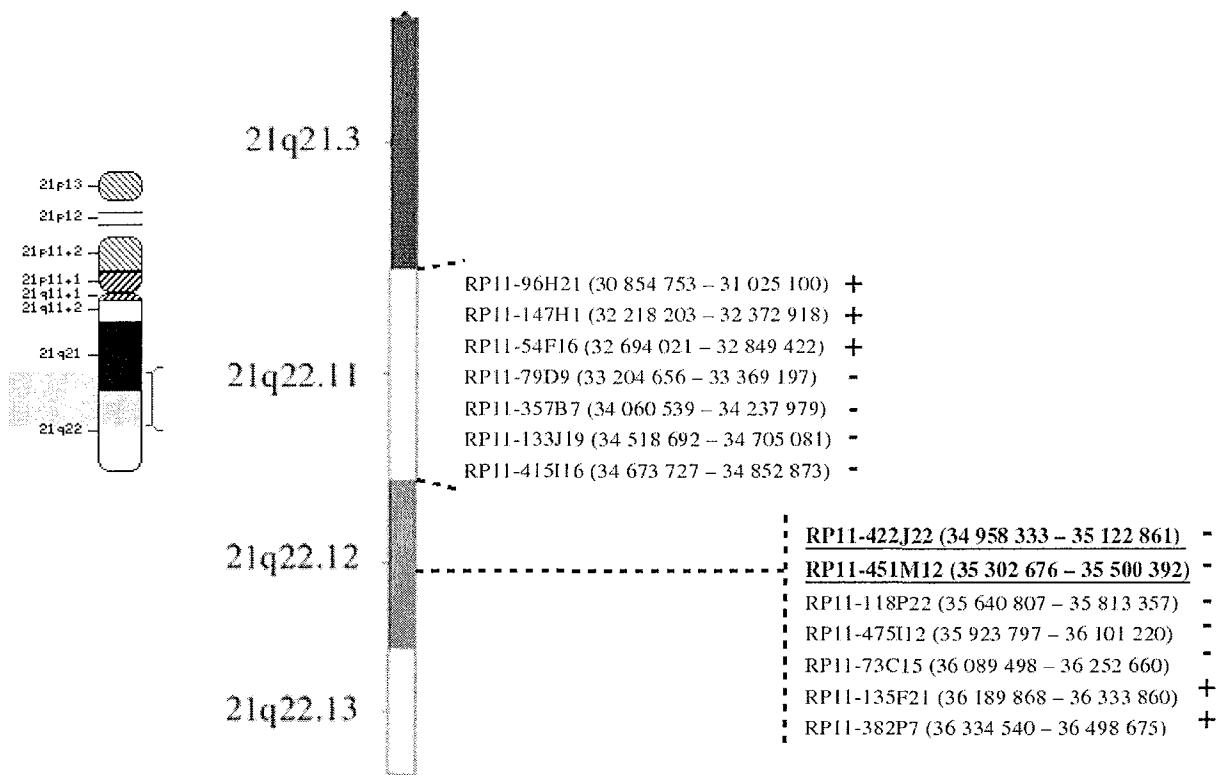


Figure 17 : Cartographie de la région 21q22 : - : BACs ne s'hybridant pas par FISH (région chromosomique déletée), + : BACs s'hybridant par FISH (bornant la délétion). Les BACs en gras soulignés comportent le gène AML1 (35 115 443-35 182 857) (distance en pb à partir de l'extrémité du bras court)

## Délétion 2p22 (patient suivi par le Dr. Vigneron)

MS., 3 ans. Né à 38 SA, il pèse à la naissance 2650 g pour une taille de 46,5 cm et présente une microcéphalie (périmètre crânien : 32 cm, -3 DS). A 20 mois, un retard sévère du

développement psychomoteur, sans acquisition de la marche ni du langage ainsi que des traits autistiques sont présents. Une dysmorphie faciale est observée : il présente un micrognathisme, un aspect joufflu, une lèvre inférieure épaisse et éversée et un nez court, des plis palmaires capitonnés. Il a d'autre part présenté une épilepsie avec des troubles respiratoires à type d'hyperventilation. L'IRM s'est révélée normale. L'étude du caryotype sur sang et sur fibroblastes n'a pas montré d'anomalie décelable (résolution : respectivement 550 et 400 bandes). Aucune étiologie n'étant évoquée de façon précise, la recherche étiologique a compris le diagnostic moléculaire de myotonie de Steinert, du syndrome de l'X fragile, la recherche d'un syndrome de Prader Willi-Angelman, de la duplication du gène ARX impliqué dans les retards mentaux liés au chromosome X. Ces investigations se sont révélées infructueuses, d'où l'exploration à l'aide de la technique de CGH microarray (puce Genosensor Array 300). Celle-ci a montré une délétion dans la région 2p22.1-2p22.3 (ratio moyen de 0,68 et p-value de 0,0001) contenant les loci MSH2 et KCNK12 (tableau 10), confirmée par CGH et contrôlée par l'hybridation des BACs correspondants à cette région : (figure 18), localisant ainsi précisément la délétion. KCNK12 appartient à la famille des canaux potassiques et a une expression ubiquitaire chez l'homme (Girard et al. 2001). Chez le rat, l'expression est particulièrement importante dans le cerveau (Rajan et al. 2001). La fonction n'est pas encore élucidée, cependant, des protéines de la même famille ont été impliquées dans les fonctions neuronales et dans l'épilepsie pouvant laisser supposer une éventuelle mise en cause d'une altération du gène codant pour KCNK12 dans les signes observés chez cet enfant.

La mise en évidence de l'anomalie a été suivie de la réalisation d'un caryotype parental qui ne montre pas d'anomalie (résolution : 550 bandes). La FISH chez les parents ne montre pas d'anomalie submicroscopique à ce locus.

Genosensor Report (12 of 287 targets)								
only targets whose p <= 0.01								
Tgt	Name	Location	#	Mass Ratio		Mean Ref (c/s)	NonModal (nh p<x)	Mod
				Mean	CV(%)			
27	MSH2,KCNK12	2p22.3-2p22.1	3	0.68	3.2	264.0	0.0001	
70	D5S2064	5p15.2	3	1.40	8.3	149.3	0.001	
276	STS 3'	Xp22.3	3	0.71	4.9	253.1	0.0001	
277	STS 5'	Xp22.3	3	0.71	2.0	325.4	0.0001	
278	KAL	Xp22.3	3	0.75	0.9	265.9	0.0001	
279	DMD exon 45-51	Xp21.1	3	0.70	10.0	257.4	0.0005	
280	DXS580	Xp11.2	3	0.78	4.5	275.7	0.001	
282	AR 3'	Xq11-q12	3	0.69	4.9	347.1	0.0001	×
283	XIST	Xq13.2	3	0.80	1.4	338.2	0.0005	×
284	DCRL1	Xq25	3	0.63	4.4	193.3	0.0001	
286	SRY	Yp11.3	3	1.48	2.2	107.2	0.0001	
287	A2Fa region	Yq11	3	1.38	1.9	175.1	0.0001	

Tableau 10 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 2p22. Hybridation de l'ADN de MS contre un ADN témoin de sexe féminin.

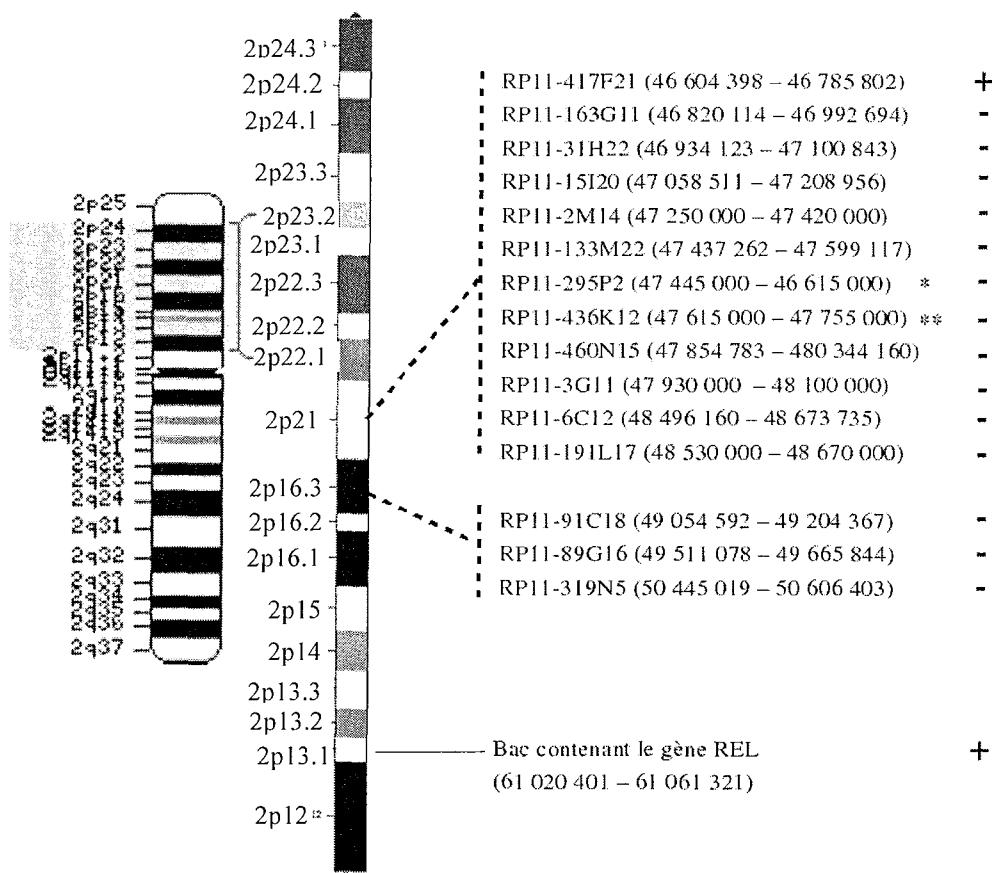


Figure 18 : Cartographie de la région 2p22. - : BACs ne s'hybridant pas par FISH (région chromosomique délétée), + : BACs s'hybridant par FISH (bornant la délétion). (distance en pb à partir de l'extrémité du bras court)

- \*BAC incluant le gène MSH2 (47 541 913-47 622 011 pb)
- \*\*BAC incluant le gène KCNK12 (47 659 567-47 709 121 pb)

## Monosomie partielle 10q associée à une trisomie partielle 20q

(patiente suivie par le Pr. Leheup)

AR. 11 ans, née au terme d'une grossesse de 41 semaines sans problèmes particuliers. A la naissance le poids est de 2850 g pour une taille de 48 cm et un périmètre crânien de 33 cm. Elle présente un retard psychomoteur sévère avec un retard marqué de langage, un retard d'acquisitions motrices (marche à 4 ans et demi) et un retard intellectuel. L'IRM réalisée à 5 ans s'est révélée normale. Sur le plan morphologique, on note une enophthalmie, un visage allongé, des sourcils épais, un périmètre crânien de 51 cm (-2,5 DS). A huit ans, elle a présenté un lymphoedème transitoire, qui est global cinq mois plus tard. Neuf mois plus tard, elle a un lymphoedème majeur du membre inférieur droit. Le bilan lymphatique ne montre pas d'anomalie ; elle présente cependant une hypoalbuminémie transitoire. La recherche de maladie de l'X fragile par évaluation du nombre de triplets CGG au locus FMR1 (PCR fluorescente et électrophorèse capillaire) ne montre pas d'amplification de ces triplets. Les diagnostics évoqués sont un syndrome de Milroy (lymphoedème héréditaire congénital) (Schroeder et *al.* 1950) ou un syndrome de Hennekam sans lymphangiectasie. Ce syndrome se caractérise en effet par une lymphangiectasie intestinale (absente dans le cas présent) avec hypoprotéinémie, hypogammaglobulinémie et lymphocytopenie associée à un lymphoedème des bras, des organes génitaux et de la face et un retard mental (Hennekam et *al.* 1989). Le caryotype ne montre pas d'anomalie décelable (résolution 400 et 600 bandes). Une technique d'hybridation génomique comparative est alors entreprise : elle montre une amplification de la région terminale du bras long du chromosome 20 et fait suspecter une petite délétion terminale des bras longs du chromosome 10 (figure 19). Devant ce résultat, une technique de FISH est mise en œuvre avec les sondes subtelomériques 10q (Cytocell) et subtelomériques 20q (Vysis) au locus 20QTEL14 (140 kb), confirmant l'anomalie décelée (figure 20). L'utilisation à ce stade de puce à ADN Genosensor Array 300 a précisé la position de l'anomalie et sa taille : les clones stSG27915 et 10qtel24 dans la région 10qtel montrent une délétion (ratios de fluorescence de 0,67 et 0,76 respectivement, « p value » : 0,0001), STK6 et TNFRSF6B en 20q13, TPD52L2, TOM et 20QTEL14 en 20qtel révèlent une duplication (« p value » : 0,0001) (figure 21 et tableau 11). L'étude des caryotypes des parents détecte une translocation équilibrée des régions subtelomériques 10q et 20q chez le père. Elle a été contrôlée par FISH avec les sondes subtelomériques 10q (Vysis) d'une taille de 75 kb, au locus 10QTEL24 (D10S2490, GDB : 6244631) et 20q (Cytocell). Le chromosome 10 paternel dérivé de cette translocation a été transmis à AR.

Un cas de délétion 10qter associée à une duplication 20qter a été décrit par Ghaffari et *al.* (1998) chez une femme présentant un retard mental profond associé à une petite taille, une microcéphalie et une dysmorphie faciale non spécifique. Si le retard mental est commun aux deux patientes, le lymphoedème n'est pas retrouvé dans le cas décrit par Ghaffari.

Dix cas de trisomie du bras long du chromosome 20 ont été rapportés dans la littérature (Plotner et *al.* 2002, Grange et *al.* 2005) : hormis le fait que dans tous les cas il n'y a pas eu d'incidents pendant la grossesse et que l'anomalie chromosomique est le résultat d'une translocation parentale et est associé à une délétion, les phénotypes observés présentent de nombreuses différences dans la mesure où la taille de la région dupliquée est très variable et la région déletée d'origine diverse.

La recherche de gènes candidats en relation avec la pathologie observée chez cette patiente a conduit à supposer l'implication du gène SOX18, en 20q13.3, codant pour un facteur de transcription intervenant dans la trans-activation de l'expression des gènes chez la souris (Hosking et *al.* 1995). Chez l'homme, pendant la période embryonnaire, son expression est importante dans le cerveau et dans le développement du système nerveux central, ainsi qu'au niveau de la moelle épinière, du thymus, du poumon, du cœur, du foie et des surrénales. Il est également exprimé chez l'adulte dans différents tissus dont le cerveau (Stanojcic et *al.* 2000). De plus, une mutation dans ce gène a été décrite comme étant responsable de lymphoedème associé à une hypotrichose et une télangiectasie dans trois familles (Irrthum et *al.* 2003). Cependant, ces mutations conduisent soit à une protéine anormale soit à une protéine tronquée, altérant sa fonction, alors que dans le cas probant, il s'agit d'une duplication du gène : se pose alors la question du mécanisme par lequel cette protéine intervient dans l'apparition du lymphoedème.

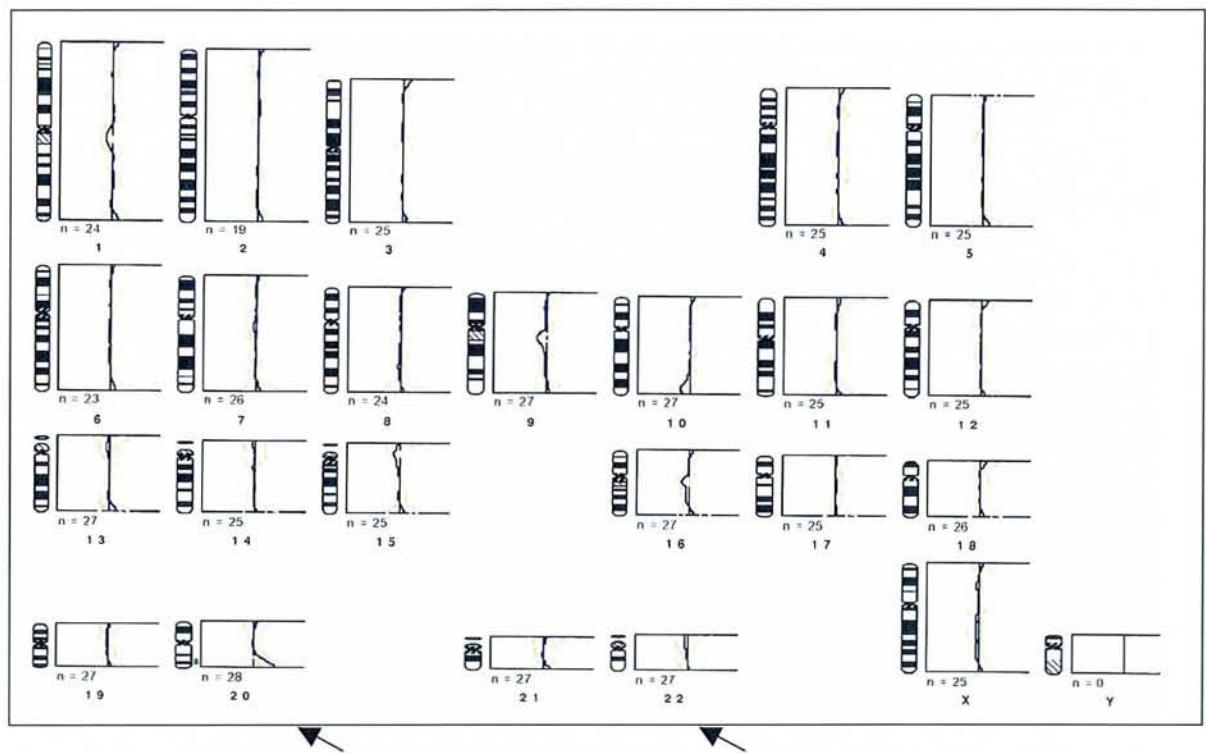


Figure 19 : CGH : visualisation de la délétion en 10q et de la duplication en 20q (indiqués par les flèches)



Figure 20 : FISH : sondes spécifiques de locus 10q Cytocell (vert) et 20q Vysis (rouge) montrant la délétion 10q (un signal sur un seul chromosome 10 en vert) et la duplication 20q (trois signaux rouges dont l'un sur le chromosome 10 transloqué, en haut à droite)



Figure 21: Représentation graphique des ratios d'intensité des cyanines et visualisations des déviations en 10q (rouge) et 20q (vert).

Genosensor Report (8 of 287 targets)								
only targets whose $p \leq 0.01$								
Tgt	Name	Location	#	Mass Ratio		Mean Ref (c/s)	NonModal (nh p < x)	Mod
				Mean	CV(%)			
121	DBCCR1	9q33.2	3	0.86	0.4	246.9	0.01	
137	stSG27915	10q tel	3	0.67	5.2	88.1	0.0001	
138	10QTEL24	10q tel	3	0.76	1.1	257.0	0.0001	
156	AF240622	11q tel	3	0.84	0.3	408.6	0.005	
253	STK6(STK15)	20q13.2-q13.3	3	1.33	1.4	256.8	0.0001	
256	TNFRSF6B(DCR3)	20q13	3	1.43	1.0	286.3	0.0001	
257	TPD52L2,TOM	20q tel	3	1.38	1.6	469.2	0.0001	
258	20QTEL14	20q tel	3	1.34	0.4	404.6	0.0001	

Tableau 11 : Résultat puce Genosensor Array 300 : délétion 10qtel et duplication 20q. Hybridation de l'ADN de AR contre un ADN témoin de même sexe

### Duplication Xp11 (patient suivi par le Pr. Leheup)

JL., 16 ans et demi. Il est né au terme de 35 semaines de gestation. La croissance intra-utérine a été normale, à la naissance le poids est de 3500 g. Cet enfant a présenté un retard des acquisitions motrices (marche à 20 mois) et un retard de langage marqué (début d'acquisition à plus de deux ans et demi). Sur le plan morphologique, il présente un synophrys, une plicature de l'hélix, une hypertrichose, une implantation basse des cheveux, une racine du nez haute, un prognathisme relatif. Après une puberté anticipée, il présente une petite taille relative (164 cm soit -1 DS avec une taille parentale proche de + 2 DS) et une brachymélie relative. L'IRM montre une atrophie cérébrale prédominante en fronto-pariétale. Au total, ce patient présente une déficience modérée à sévère. Un caryotype sanguin effectué à l'âge de 10 ans n'a pas montré d'anomalie décelable (résolution 600 bandes) (figure 22 : visualisation du chromosome 20). Les investigations cytogénétiques ont été orientées vers la recherche d'un syndrome microdélétionnel : à l'âge de 14 ans, l'exploration des régions 5p et 17q (sondes subtélomériques 5p5q et 17p17q) puis la recherche d'un remaniement subtélomérique par

FISH à l'aide du système Totelvysis (Vysis) n'ont pas montré d'anomalie. Une analyse globale du génome est alors entreprise par la mise en œuvre d'une technique de CGH contre un témoin de sexe masculin : on observe une amplification dans la région Xp11 (figure 22). L'utilisation d'une sonde WCP X (sonde totale du chromosome X) ne montre pas d'insertion de l'X dans l'un des autosomes, au seuil de sensibilité de cette technique. La réalisation d'une puce à ADN Genosystem 1MB a alors été entreprise dans le but de préciser l'étendue de la duplication : elle décèle une amplification de quatre clones en Xp11.2 (RP11-58H17, RP11-637B23, RP11-107A19 et RP11-363G10) (figure 23). Ces deux derniers ont alors été testés en FISH métaphasique et interphasique, confirmant le résultat obtenu. D'autre part, après cartographie de la région chromosomique, six autres BACs encadrant l'amplification ont été utilisés comme sondes de FISH afin de fixer les limites de cette amplification (figure 24). Une duplication de 5,5 mégabases est donc présente, englobant plusieurs gènes connus. Le gène CCNB3 est en particulier présent dans cette région. Il code pour la cycline B3 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, dans la réorganisation du fuseau mitotique et la restauration du noyau en interphase. La surexpression de ce gène bloque le cycle cellulaire en anaphase et interfère avec la progression du cycle cellulaire entre la phase G1 et S. Au vu de cette anomalie, une étude cytogénétique a été entreprise chez la mère afin de déterminer l'origine de l'anomalie, à savoir si elle a été transmise par la mère ou si elle est apparue *de novo* : un caryotype maternel a donc été réalisé et n'a pas montré d'anomalie (résolution : 500 bandes). De plus, une étude du profil d'inactivation du chromosome X, par PCR pré et post digestion par HpaII (enzyme sensible à la méthylation) au niveau de la répétition de CAG du gène codant le récepteur aux androgènes (HUMARA), a été réalisée dans le but de rechercher une inactivation préférentielle de l'X, qui aurait pu se produire en cas de duplication Xp11 chez la mère, expliquant alors la présence de la pathologie chez le fils alors que la mère est saine. Cet examen a montré un profil dans les normes de l'inactivation aléatoire (73-27%). Parallèlement, la recherche d'une éventuelle duplication d'une partie du chromosome X est menée par CGH : cet examen ne révèle pas de déséquilibre chez la mère du patient.

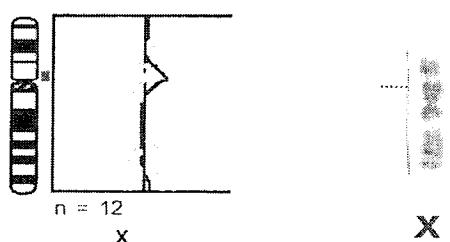


Figure 22 : CGH : visualisation de la duplication (chromosome X) et visualisation du chromosome X métaphasique (caryotype)

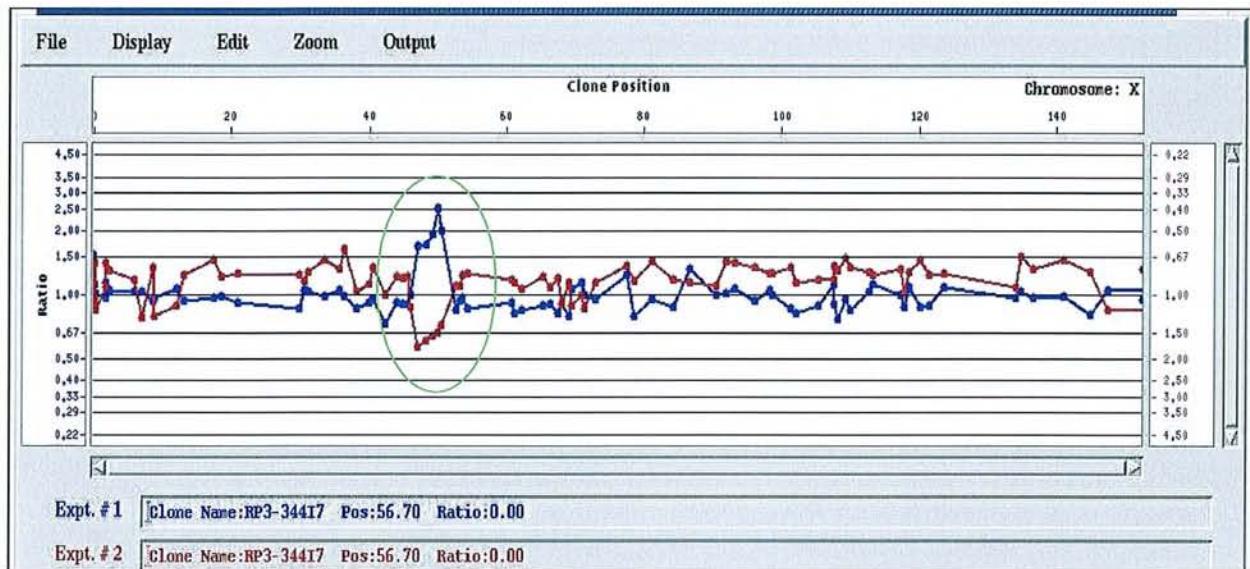


Figure 23 : Résultat de la puce Genosystem 1 MB : duplication Xp11 entourée en vert (réalisation d'un flip-flop : déviation du ratio de fluorescence positif ou négatif selon le marquage des ADN)

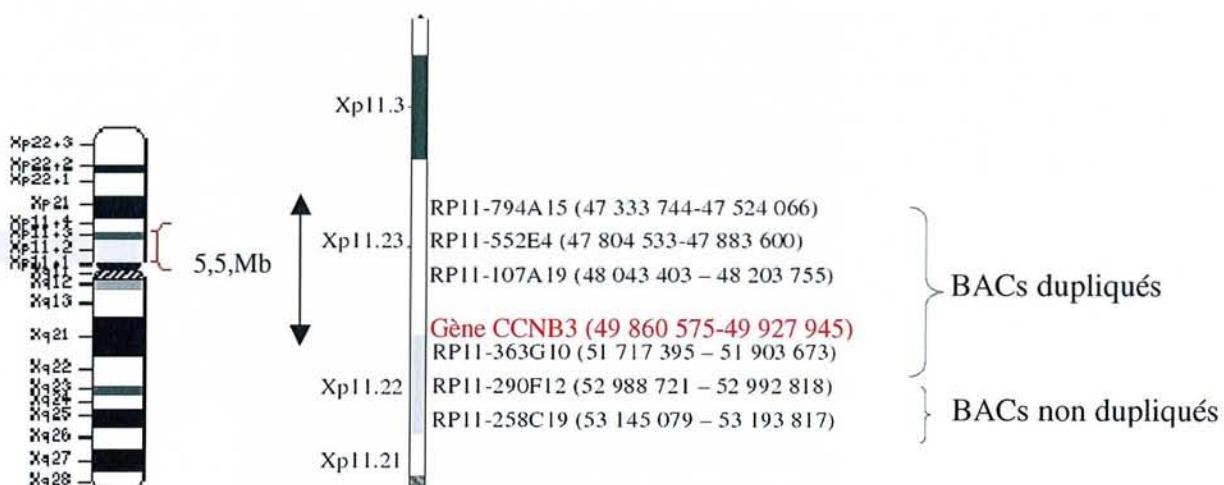


Figure 24 : Cartographie de la région Xp11. Borne de la duplication en Xp11.2

## Délétion 20qter (patiente suivie par le Pr. Leheup)

MB., 6 ans, née à 38 SA. Il n'y a pas de données sur la croissance intra-utérine. A la naissance, la taille est normale, on note un périmètre crânien à -1,3 DS. Après une adaptation néonatale médiocre, elle a présenté une détresse respiratoire qui a nécessité une intubation. Par ailleurs, elle a présenté des convulsions à deux mois de vie, et ce durant une courte période (électroencéphalogramme normal et scanner montrant des signes d'anoxie). L'échographie cardiaque a alors montré une transposition des gros vaisseaux et une petite communication inter-ventriculaire. Ces anomalies cardiaques ont fait suspecté un syndrome de Di George et un caryotype ainsi que la recherche de la microdélétion en 22q11 ont été

réalisés : le caryotype n'a pas montré d'anomalie (résolution : 400 bandes) et la FISH à l'aide des sondes Vysis LSI DiGeorge/VCFS Region dual Color probe n'a pas mis en évidence de délétion au locus 22q11 (TUPLE1) (sonde témoin 22q13 LSI ARSA). Elle a été revue en consultation à 3 ans : le bilan morphologique montre une trigonocéphalie, une rétraction bitemporale, un épicanthus gauche. Elle présente une absence de langage et un retard de développement psychomoteur : incapable de tenir un objet à 8 mois, tenue assise à 21 mois et absence de marche à 28 mois. Un second caryotype réalisé avec une meilleure résolution (500 bandes) n'a pas montré d'anomalie. Devant le retard de croissance observé, la recherche d'une microdélétion 4p en relation avec le syndrome de Wolf-Hirschhorn a été entreprise par FISH à l'aide de la sonde Vysis LSI WHS au locus 4p16.3 et de la sonde CEP 4 (alpha satellite) comme sonde témoin du chromosome 4. Différentes causes chromosomiques ciblées ont été recherchées : un syndrome de Smith Magenis a été exclu par la recherche de délétion en 17p11 par FISH (sonde LSI SMS au locus 17p11.2, sonde RARA utilisée comme marqueur du chromosome 17), le diagnostic moléculaire du syndrome d'Angelman par étude du profil de méthylation dans la région 15q11-q13 montre un profil de méthylation normal avec présence de l'allèle maternel, la recherche d'un syndrome de Rett par recherche de mutation du gène MECP2 par DHPLC s'est révélée négative. L'exploration de l'ensemble du génome a alors été entreprise à l'aide d'une technique de CGH microarray avec la puce Genosystem 1MB. Elle a mis en évidence une délétion dans la région 20qter (figure 25). Cette anomalie a été confirmée par la mise en œuvre d'une technique de FISH avec les sondes subtélomériques telvysion (Vysis) 20p (locus 20PTEL18) et 20q (locus 20QTEL14) : cette dernière confirme la délétion vue par CGH microarray (figure 26). Devant cette anomalie, il convient d'en déterminer l'origine acquise ou transmise par l'un des parents. L'étude des caryotypes parentaux ainsi que la mise en œuvre d'une hybridation in situ ont montré qu'il s'agit d'une délétion apparue *de novo*, ce qui conduit à penser que les signes cliniques observés sont bien en rapport avec cette anomalie chromosomique.

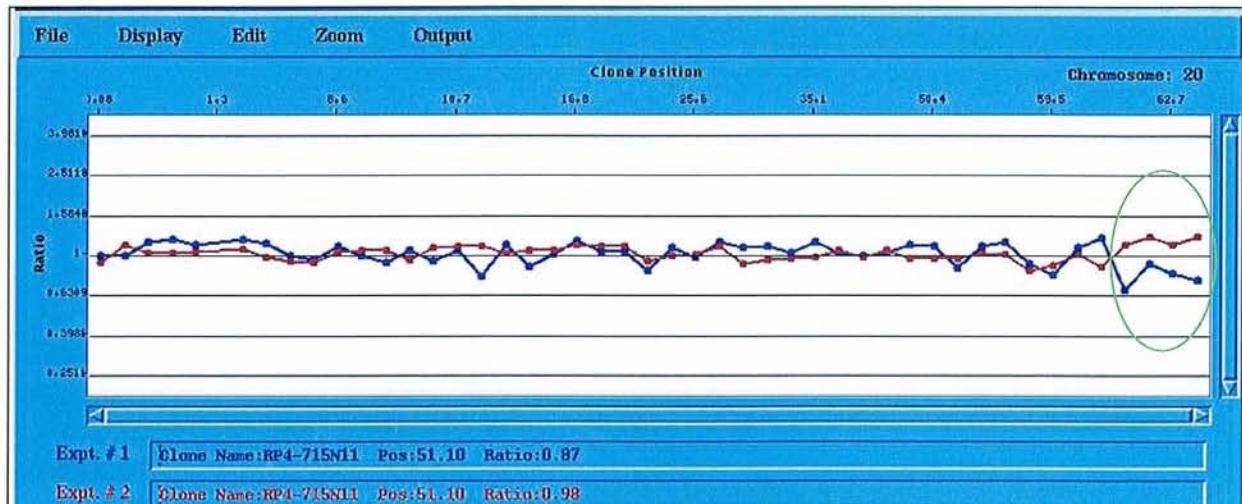


Figure 25 : Résultat de la puce Genosystem 1MB : délétion 20qter (entourée en vert)

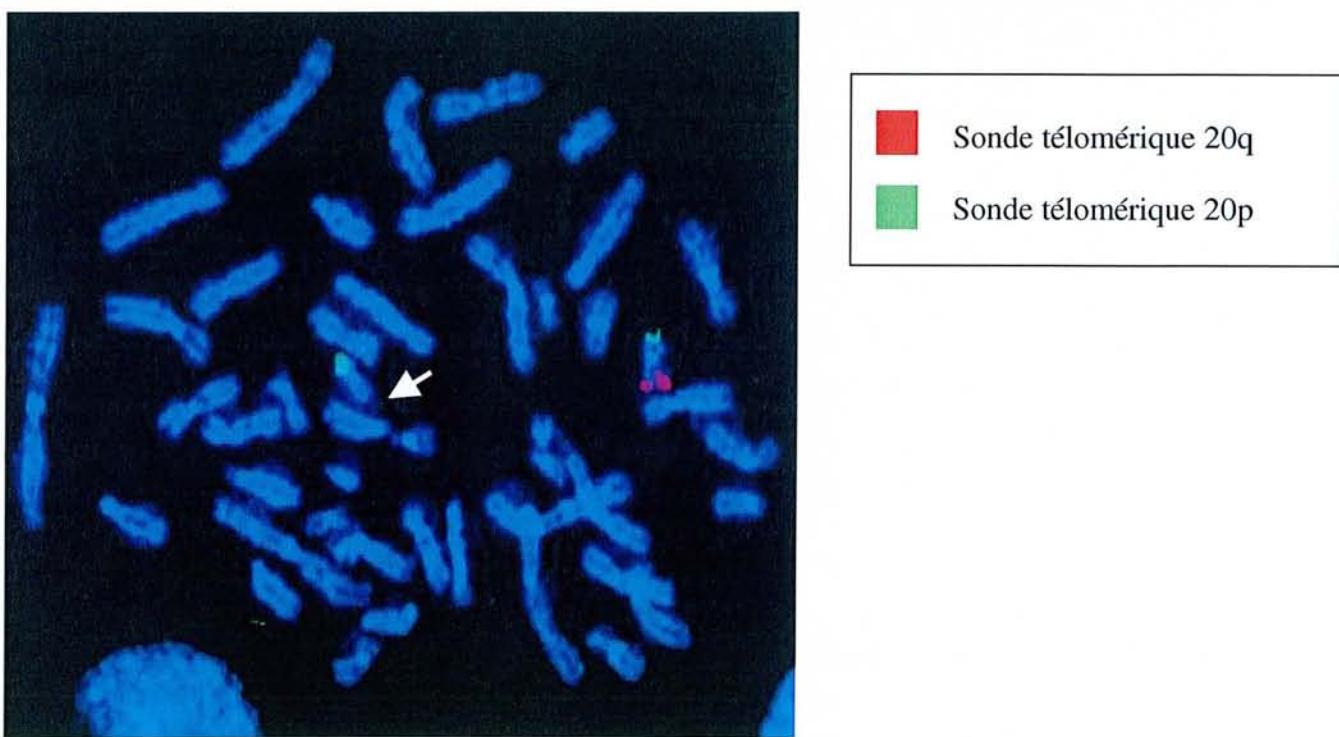


Figure 26 : FISH (sondes subtélomériques Vysis 20q et 20p). Délétion 20qter (absence d'hybridation de la sonde 20qtel rouge sur l'un des chromosomes 20 (flèche). La sonde 20p présente sur les deux chromosomes 20 (vert) sert de témoin de l'hybridation

### Marqueur du chromosome 4 : trisomie 4p partielle en mosaïque (patiente suivie par le Dr. Zix)

SB. 8 ans. Cette enfant présente un retard mental (QI global de 56 avec une échelle de performance à 58 et une échelle verbale à 61 (d'après le test du WPPSI-R : Wechsler Preschool & Primary Scale of Intelligence\_Revised par Lizette Campbell, destiné aux enfants

de 3 à 7 ans). A l'âge de 6 ans, elle montre une obésité avec un indice de corpulence à 20,4 (32,4 kg pour une taille d'1 m 27). Le périmètre crânien est à 49,5 cm soit -1 DS. Dans ses antécédents, on retrouve un reflux vésico-urétéral bilatéral traité. Sur le plan morphologique, on note une discrète dysmorphie faciale avec une pointe de nez carrée. Les cheveux sont abondants. Au niveau du tronc, elle présente un pectus excavatum et une scoliose discrète avec gibbosité. Il existe une myopie banale. Devant ce tableau clinique qui associe un retard mental à une obésité, une anomalie au locus 15q11-q13 (SNRPN) est exclue par FISH à l'aide de la sonde locus spécifique LSI Prader-Willi/Angelman (Vysis). Un caryotype est également réalisé et montre alors la présence de marqueurs surnuméraires (de 1 à 3 par mitose) dans 41 mitoses sur 50 observées (résolution : 500 bandes) (figure 27). Une étude par CGH a alors été entreprise. Elle a montré une amplification partielle des bras longs du chromosome 4 dans la région comprise entre le centromère et la bande q21 (figure 28). Le contrôle par FISH à l'aide d'une sonde totale (WCP4, Vysis) (figure 29) et d'une sonde centromérique (CEP4, Vysis) du chromosome 4 montre le marquage par ces sondes de petits chromosomes marqueurs présents dans les métaphases de la patiente. La mise en oeuvre d'une puce à ADN GenoSystem 1MB a également permis de confirmer cette anomalie (figure 30). Elle a été suivie d'un contrôle par FISH (BAC RP11-738E22). Une fois la duplication détectée, une cartographie de la région en cause a permis de sélectionner les BACs couvrant cette région. Ils ont été utilisés comme sondes pour l'hybridation *in situ* et ont permis de déterminer la taille de l'amplification à 16 mégabases (11 BACs se sont hybridés sur les marqueurs chromosomiques : RP11-651C2, RP11-571I18, RP11-89B16, RP11-80L11, RP11-7J22, RP11319E12, RP11-91C3, RP11-24I7, RP11-63E13, RP11-89M12, RP11-642E20) et les points de cassure. Le point de cassure distal se situe entre RP11-642E20 en 4q13.2 (69 000 842 pb) et RP11-529K3 en 4q13.3 (71 004 349 pb), le point de cassure proximal entre RP11-651C2 en 4q11 (52 869 114 pb) et RP11-89N6 en 4p12 (48 424 747 pb) (figure 31). L'étude familiale ne montre pas de marqueurs décelables au caryotype sur 36 et 29 mitoses analysées respectivement pour la mère et le père : cette anomalie est donc apparue *de novo* et peut être en cause dans la pathologie observée.

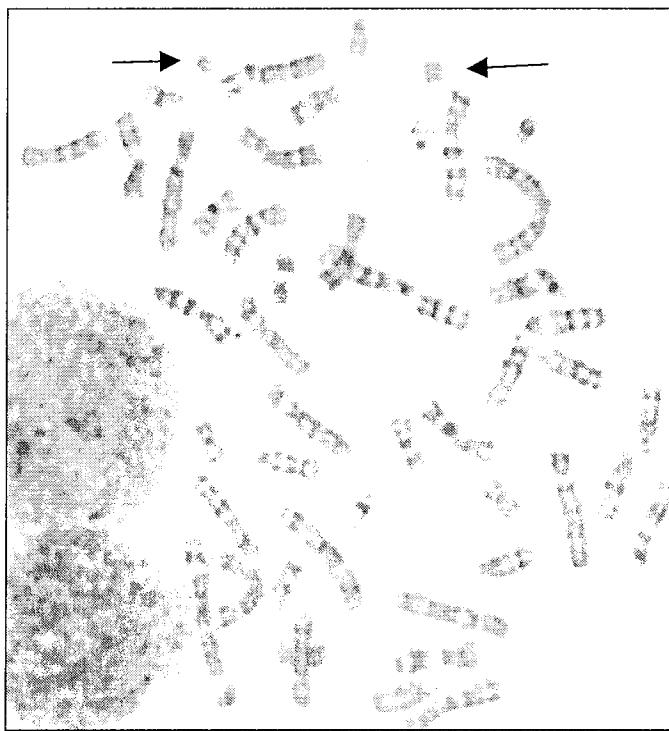


Figure 27 : Caryotype 48,XX,+2mar (marqueurs indiqués par les flèches)

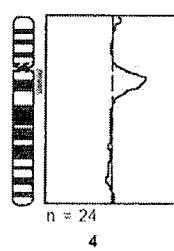


Figure 28 : CGH chromosome 4 : 46,XX [5] / 47- 49,XX,+1-3mar.rev ish enh(4q10q21) [15] de novo

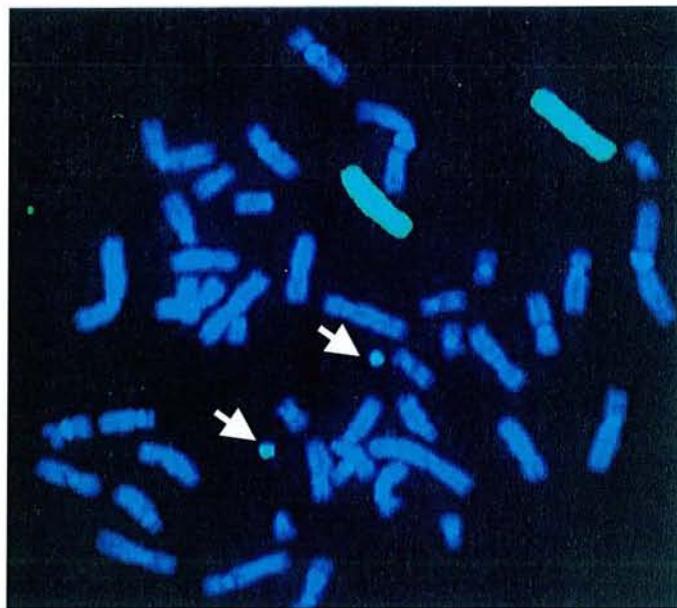


Figure 29 : FISH (sonde totale WCP4) : mise en évidence de la nature de deux marqueurs surnuméraires (flèches)

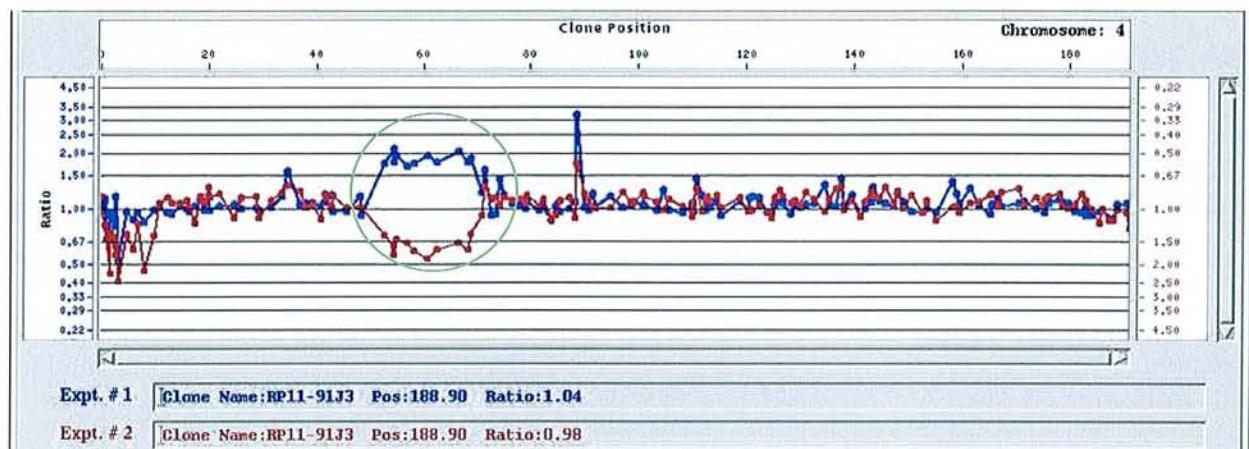


Figure 30 : Résultat de la puce Genosystem 1MB : amplification de matériel chromosomique sur le chromosome 4

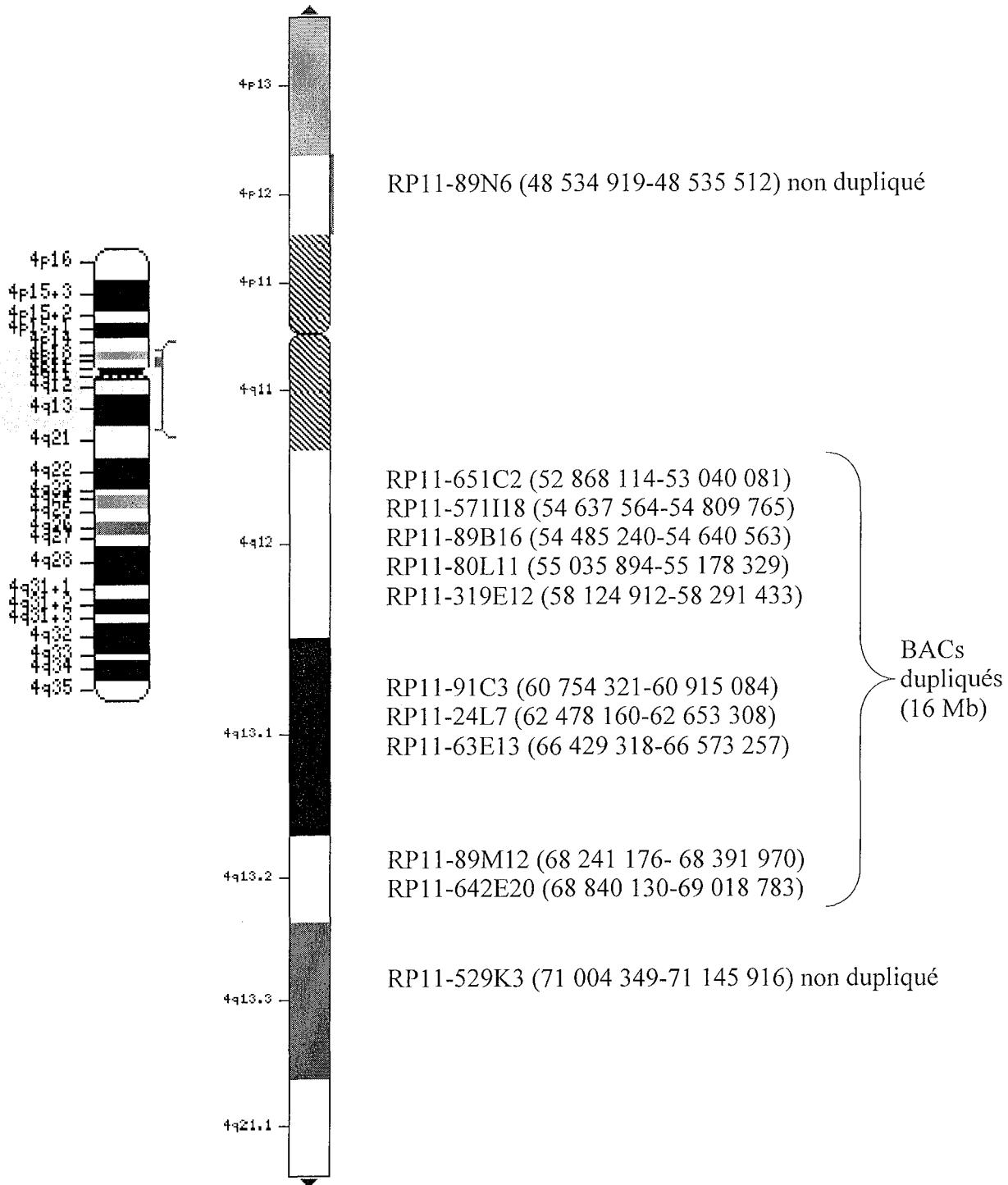


Figure 31: cartographie de la région dupliquée du chromosome 4

# Discussion

## Problèmes rencontrés

**Les problèmes techniques** rencontrés sont liés aux spécificités et aux caractéristiques techniques de chaque puce, c'est pourquoi des mises au point sont nécessaires avant toute utilisation à visée diagnostique. Ainsi, des difficultés avec les lames de la puce Genosystem 1MB (dont l'origine était inexpliquée mais finalement due à un lot de lames défectueux) ont conduit à un pourcentage de lames interprétables de 46 % (7 / 15). Ceci montre bien la nécessité de déterminer un ensemble de critères de validation de la technique afin de pouvoir exclure les résultats non interprétables.

**L'interprétation des résultats** obtenus peut également être délicate en raison de la présence de polymorphismes de délétion-duplication dans les séquences de certains clones fixés sur la lame et dont il convient de vérifier la signification clinique. C'est pourquoi, dans un premier temps, le contrôle de toute déviation doit être effectué par FISH. De plus, la technique d'hybridation en triangle résout en partie ce problème mais entraîne néanmoins une perte d'information pour ces BACs, d'où la nécessité de surcroître à ce problème par des améliorations concernant la sélection de ceux-ci.

D'autre part, il est important, lorsqu'une telle anomalie est retrouvée chez un individu malade, de pouvoir étudier en parallèle les parents afin de confirmer le caractère délétère de l'anomalie. Si celle-ci est retrouvée chez l'un des deux parents sain, elle évoque *a priori* un polymorphisme sans incidence clinique.

Des polymorphismes ont ainsi été mis en évidence pour la puce Genosensor Array 300 : ils ont constitué un barrage à l'interprétation des résultats dans la mesure où ils ne sont découverts qu'au fil de l'utilisation des lames, aucune donnée n'étant fournie par le fabricant. Une période d'observation est ainsi nécessaire au début de l'utilisation de toute nouvelle lame afin d'identifier ces séquences polymorphes.

Par ailleurs, cette détection de polymorphismes, inconnus jusqu'alors, permet de mieux appréhender la complexité du génome humain et certains d'entre eux pourraient constituer des facteurs de risque de certaines pathologies.

## Améliorations techniques

Les problèmes de bruit de fond qui gênent encore l'interprétation des signaux obtenus peuvent être en partie résolus par le développement de fluorophores, présentant une meilleure incorporation mais aussi par l'utilisation de surfaces limitant les hybridations aspécifiques. Une meilleure sélection des séquences des clones déposés par l'utilisation des bases de données disponibles et un contrôle fiable de la spécificité chromosomique des BACs par les fabricants limiterait également ce phénomène.

L'étendue des domaines d'utilisation potentiels rend par ailleurs nécessaire la fabrication de puces adaptées à chacun d'eux, avec notamment la possibilité de représenter une région chromosomique connue ou suspectée pour être le siège de microdéséquilibres, avec une résolution suffisante.

Les avancées techniques ont conduit à une amélioration de la résolution de la CGH microarray. Les performances de la robotique vont permettre de fixer un nombre sans cesse croissant de séquences sur des surfaces de plus en plus petites, améliorant ainsi la résolution en réduisant la distance entre les clones.

L'utilisation d'oligonucléotides (50 à 100 pb) va dans ce sens. Lucito et *al.* (2003) ont construit un modèle comportant 85 000 sondes d'une taille de 70 pb de séquence parfaitement connue. La résolution atteint dans ce cas 30 kb et peut en théorie aller jusqu'à 15 kb. Cette technique (ROMA : representational oligonucleotide microarray analysis) diminue en outre les problèmes de bruit de fond par une sélection des séquences sondes réduisant la complexité des séquences utilisées et donc limite la présence de séquences répétées ou non spécifiques.

La sélection de BACs chevauchants élimine les zones non explorées au sein d'une région chromosomique d'intérêt : Lapuk et *al.* (2004) ont développé un programme informatique pour assembler des clones chevauchants présentant des séquences chevauchantes de taille minimale. Il fournit des contigs couvrant environ 90 % de la région sélectionnée avec une représentation moyenne de 1,3 fois le génome, une densité de BACs de 7 à 8 clones par mégabase et un recouvrement de 20 % de leur longueur. Les auteurs ont testé ce système dans des régions d'intérêt pour certains cancers. Ceci contribue à une meilleure détermination des gènes candidats dans la mesure où le déséquilibre est borné de façon plus précise et plus rapide et limite le nombre de gènes à étudier potentiellement en cause.

Des BACs chevauchants ont également été testés dans la région 17p (Shaw et *al.* 2004) afin de localiser précisément les points de cassure de différents réarrangements déséquilibrés.

Dans le cadre des retards mentaux, la fabrication d'une puce couvrant la totalité du chromosome X a été mise au point pour la détection de nouveaux gènes impliqués dans la

pathologie (Bauters et *al.* 2005). De même, la région 1p36 étant connue pour être le siège de délétions responsables de retard mental (Shapira et *al.* 1997), une puce comportant 97 clones dans cette région a été mise au point (Yu et *al.* 2003) dans le but de caractériser les différents points de cassure en cause et donc de mieux comprendre les relations génotype-phénotype.

### **Expérience dans le cadre du retard mental**

L'expérience du laboratoire de génétique de Nancy repose sur l'utilisation de quatre puces différentes dont l'une est utilisée actuellement à but diagnostique.

Ces puces à ADN ont été testées afin d'établir une comparaison des différentes techniques cytogénétiques à notre disposition et leur possible utilisation à visée diagnostique. Cette technique est toujours utilisée en seconde intention, lorsque les techniques de cytogénétique conventionnelle ont atteint leurs limites du fait de leur faible résolution ou l'absence de couverture de la totalité du génome et n'ont pas permis d'aboutir à un diagnostic étiologique. La technique de CGH et notamment la CGH microarray, du fait de sa haute résolution détecte alors des microdélétions ou des microduplications jusqu'alors méconnues chez des patients pour lesquels une forte suspicion de déséquilibre chromosomique est évoquée, après élimination de toute autre cause.

La première expérience a concerné la **puce GenoSensor Array 300** (Abbott) : elle a été choisie comme alternative à la FISH multitélomérique. Elle permet en outre de détecter des anomalies interstitielles grâce aux autres BACs déposés sur la lame. Leurs caractéristiques et les séquences des clones expliquent le choix de cette puce dans le cadre de l'activité du laboratoire.

Actuellement, cette technique est utilisée à titre diagnostique chez des patients qui présentent un retard mental d'étiologie inconnue associé ou non à une dysmorphie, et qui sont donc des indications de recherche d'une cause chromosomique. Cinquante trois patients ont ainsi été testés dont cinq (9,4 %) présentent une anomalie chromosomique quantitative non décelée avec les techniques de cytogénétique conventionnelles (caryotype en haute résolution et FISH) mises en oeuvre. Deux délétions subtélomériques ont été décelées grâce à ces puces, soit 3,8%. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Il serait, en théorie, possible d'améliorer ce pourcentage par une sélection rigoureuse de patients à tester : Walter et *al.* (2004) ont ainsi établi une liste de critères d'inclusion des patients atteints de retard mental pour lesquels l'indication d'exploration des régions subtélomériques serait retenue. Elle comporte, entre autre, la sévérité du retard mental, des critères de dysmorphie, de retard de croissance, la présence d'antécédents familiaux. Cette présélection de patients a conduit à

une détection d'anomalies de l'ordre de 20%. Par contre, de Vries et *al.* (2001) avaient appliqué un mode de sélection similaire sans toutefois retrouver un pourcentage de déséquilibres subtélomériques plus important que la population contrôle constituée de sujets atteints de retard mental mais ne présentant pas les critères de sélection précédents. Ces différences illustrent donc bien toute l'importance du choix des patients qui pourront bénéficier de cette technique diagnostique encore lourde à mettre en oeuvre et coûteuse.

La **puce Genosystem 1MB** (Spectral Genomics) a été testée en second lieu : la présence d'un nombre plus important de clones déposés sur la lame a pour conséquence de couvrir le génome humain avec une meilleure résolution, laissant supposer la possibilité de déceler une proportion plus importantes d'anomalies chromosomiques à la fois interstitielles et subtélomériques. Son utilisation a abouti à découverte d'une délétion subtélomérique (20qter) représentant 14 % (1/7) des cas de retards mentaux explorés. Dans deux cas, elle a été utilisée pour préciser une anomalie détectée par une autre technique : confirmation d'une duplication partielle de l'Xp vue par CGH, détermination de l'origine de matériel chromosomique surnuméraire observé au caryotype. Le nombre de cas étudié est cependant trop faible pour conclure quant au bénéfice réel de l'utilisation de ces puces par rapport à la puce Genosensor Array 300.

D'autre part, sur l'ensemble des déséquilibres observés, il est à noter que, pour le moment, pour les patients étudiés au laboratoire de génétique de Nancy, les délétions sont plus fréquemment retrouvées (6/8 soit 75%) que les duplications ou la présence de matériel additionnel dans les retards mentaux. Ceci pourrait être dû au fait que les puces utilisées comportent plus de clones dont les séquences correspondent à des régions connues ou supposées être le siège de microdélétions (cas notamment de la puce Genosensor Array 300). L'expérience avec la **puce de l'université de Leuven** n'a pas décelé d'anomalies, malgré une résolution équivalente aux précédentes, ceci pouvant s'expliquer par la faible taille de l'échantillon.

### Place des puces à ADN dans la stratégie diagnostique

Le bénéfice lié à l'utilisation de la technique de puces à ADN dans le cadre de la recherche étiologique du retard mental est essentiellement dû au fait qu'elle explore l'ensemble du génome avec une bonne résolution (qui est encore amenée à être améliorée) : elle combine donc les avantages du caryotype et de la FISH.

Les puces à ADN conduisent à une localisation chromosomique de l'anomalie mais une cartographie de la région chromosomique est toutefois nécessaire à l'aide de BACs situés

dans la région d'intérêt. Ceci va conduire à préciser la taille de la délétion ou de l'amplification afin de restreindre la région étudiée jusqu'à borner précisément l'anomalie dans le but de sélectionner les gènes candidats et de les relier à la pathologie observée. Une analyse par CGH sur chromosomes métaphasiques est aussi réalisée *a posteriori* actuellement. Elle a pour but soit de confirmer l'anomalie lorsque la taille est suffisante pour être détectée au seuil de résolution de la technique soit de mieux apprécier la taille de l'anomalie et la limite de résolution de la CGH dans un but d'évaluation de la technique. Par la suite, la stratégie diagnostique à adopter consisterait à réaliser, après mise en œuvre du caryotype, éventuellement en haute résolution et de la FISH spécifique de locus, si ceux-ci ne sont pas informatifs, une technique de CGH sur chromosomes. Si cette étude se révèle négative, il serait alors envisagé de tester l'ADN du patient à l'aide d'une puce à ADN afin de visualiser une anomalie dont la taille serait inférieure à la résolution de la CGH.

Dans tous les cas, l'étude du caryotype parental conserve sa place dans les examens complémentaires car, parfois, le déséquilibre en cause dans le phénotype pathologique du patient est le résultat de la transmission d'une anomalie de structure équilibrée plus facilement identifiable.

D'autre part, les puces à ADN ne pourront en aucun cas se substituer au caryotype conventionnel en raison de son impossibilité de déceler les translocations équilibrées et les variations de ploïdie.

## Conclusion et développements futurs

Le développement de cette technologie nouvelle a été un pas important dans la compréhension des anomalies génétiques en cause et à l'origine d'un phénotype clinique particulier, aussi bien dans le domaine des pathologies acquises comme les cancers que constitutionnelles. Pour ces dernières, la connaissance de l'anomalie conduit à la fois à un diagnostic postnatal mais offre aussi la possibilité de réaliser un diagnostic prénatal et d'établir un conseil génétique approprié.

Dans le cadre du diagnostic prénatal, son utilisation a été testée sur liquides amniotiques (Larrabee et *al.* 2004). Elle pourrait également faire partie de l'arsenal mis à disposition du généticien pour la recherche de l'étiologie de fausses couches spontanées à répétition pour lesquelles il est important de déterminer la cause afin d'évaluer le risque pour les grossesses ultérieures et mettre en place d'éventuelles stratégies de diagnostic pour ces couples dans le cadre d'un conseil génétique (Schaeffer et *al.* 2004).

Elle est à l'origine d'une meilleure compréhension du mécanisme physiopathologique de l'apparition et du développement de tumeurs : l'identification de gènes impliqués dans le processus tumoral (initiation et progression de la tumeur) conduisent en effet à une meilleure prévention, un diagnostic plus précoce et une prise en charge appropriée (Onyango, 2002). Elle est en particulier un outil de choix pour la mise en évidence d'anomalies chromosomiques dans le cancer de la prostate et pour établir leur rôle pronostique (Pettus et *al.* 2004). Elle a identifié des délétions et amplifications chez des patients souffrant d'ostéosarcome, conduisant ainsi à l'identification de gènes candidats dans les régions en cause en vue de découvrir le mécanisme physiopathologique à l'origine de ces tumeurs (Man et *al.* 2004).

Une fois ce « dosage génomique » effectué, il est important de mettre en relation les anomalies quantitatives de l'ADN et l'expression des gènes et donc de cerner dans quelle mesure les délétions ou amplifications de gènes sont liées à l'expression d'oncogènes ou à la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur intervenant dans le phénomène de prolifération cellulaire et de cancérisation : ceci a par exemple été réalisé sur une lignée cellulaire issue de leucémie myéloïde aiguë (Ulger et *al.* 2003). De même, dans le cancer de la prostate, des altérations transcriptionnelles ont été mises en relation avec des anomalies du nombre de copies d'ADN et semblent déterminer la sensibilité aux androgènes des cellules tumorales, constituant un facteur pronostique déterminant la stratégie thérapeutique (Zhao et *al.* 2005).

Cette technologie nouvelle est amenée à se développer et ses domaines d'application deviennent de plus en plus larges et concernent tous les domaines où la cytogénétique est utilisée.

## **ANNEXES**

## Annexes

### Annexe 1 : Protocoles expérimentaux

Remarque : les étapes d'extraction d'ADN et de quantification sont communes aux quatre protocoles.

#### Puces Genosensor Array 300 (Abbott)

##### EXTRACTION DE L'ADN

A partir de sang veineux, l'extraction est réalisée avec le kit Nucleon BACC3 (Amersham Biosciences).

##### QUANTIFICATION DES ADN

Dosage des ADN à tester au Nanodrop.

Amener la concentration des ADN à 250 ng/µl avec une solution de TE pH 8

##### PREPARATION DES ADN A TESTER ET MARQUAGE PAR RANDOM PRIMING

Dans des tubes de 1,5 ml mélanger :

	Mix A(Cy3)	Mix B(Cy5)
ADN Patient A (250 ng/µl)	4 µl	/
ADN Patient B (250 ng/µl)	/	4 µl
TE (kit)	41,6 µl	41,6 µl
2.5X random priming mix (kit)	40 µl	40 µl

Dénaturer 10 min à 100°C.

Placer les tubes 10 minutes dans la glace.

Centrifuger brièvement.

Garder les tubes sur la glace et ajouter les réactifs suivants du kit :

	Mix A(Cy3)	Mix B(Cy5)
GenoSensorArray300 Nucleotide Mix	10 µl	10 µl
Cy3 dCTP (1 mM)	2,4 µl	/
Cy5 dCTP (1 mM)	/	2,4 µl
Enzyme Klenow	2 µl	2 µl

Vortexer doucement et centrifuger brièvement.

Incuber 2 heures à 37°C à l'abri de la lumière.

Placer les tubes dans la glace.

#### DIGESTION DES PRODUITS DE MARQUAGE

Dans la glace, diluer la DNase Amp Grade du kit au 1/20<sup>ème</sup> avec le DNase dilution buffer fourni.

Ajouter :

	Mix A(Cy3)	Mix B(Cy5)
DNase dilution buffer	17 µl	17 µl
DNase Amp Grade diluée	3 µl	3 µl

Vortexer et centrifuger brièvement.

Incuber 1 heure à 15 °C à l'abri de la lumière.

Placer les tubes dans la glace après la digestion et stopper la réaction avec 6 µl de stop Buffer.

Vortexer.

#### PURIFICATION SUR COLONNE

Kit MicroSpin S-200 HR Columns (Amersham Biosciences)

Vortexer pour resuspendre la résine Sephacryl® dans la colonne.

Dévisser le bouchon d'un quart de tour et casser l'extrémité inférieure.

Placer la colonne sur un tube collecteur et centrifuger 1 minute à 3000 tours par minute.

Placer la colonne sur un tube Eppendorf propre, déposer 126 µl de produit de marquage au centre de la colonne et centrifuger 2 minutes à 3000 tours par minute.

### VERIFICATION DU MARQUAGE

Préparation d'un gel d'agarose à 2 % : 1g d'agarose + 50 ml de TBE 1X. Chauffer 1 minute aux micro-ondes. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium.

Faire migrer : 0,5 µl d'échantillon + 1 µl d'alourdisseur + 8 µl d'eau à côté d'un marqueur de taille.

Une traînée d'ADN au dessus de 200 pb doit être visible, sinon ne pas utiliser l'échantillon.

### PRECIPITATION DES PRODUITS PURIFIES

Ajouter 1/10 du volume d'acétate de sodium 3M (12 µl).

Ajouter 1 µl de réactif de précipitation et vortexer brièvement.

Ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100% froid (-20°C) soit 350 µl et vortexer brièvement.

Incuber 1 heure à -20°C.

Centrifuger à 16 000 g pendant 30 minutes à 4°C.

Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot.

Resuspendre le culot dans 4 µl de tampon Tris 10M pH 8. Vortexer pour faciliter la resuspension.

Incuber à température ambiante 30 minutes.

Centrifuger rapidement pour collecter l'échantillon au fond du tube.

Remarque : possibilité de conserver l'échantillon à -20°C à cette étape.

### HYBRIDATION

Réchauffer le tampon d'hybridation à 37°C pendant 30 minutes, vortexer et centrifuger pour s'assurer de l'homogénéité de la solution.

Centrifuger les échantillons d'ADN à 12 000 à 16 000 g 2 minutes avant de le mélanger au tampon d'hybridation.

Mélanger dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, 25 µl de tampon d'hybridation à 2,5 µl d'ADN du patient A (Cy3) et 2,5 µl d'ADN du patient B (Cy5).

Dénaturer l'ADN à 80°C au bain marie pendant 10 minutes.

Centrifuger à 12 000 à 16 000g pendant 5 secondes.

Incuber à 37°C à l'abri de la lumière pendant 1 heure.

Placer les lames à 37°C, en atmosphère sèche, 30 minutes avant utilisation.

Placer un papier essuie-tout imbibé de d'une solution de 50% formamide/SSC 2X (14-16 ml) dans la boite d'incubation et incuber à 37°C 30 minutes à 1 heure.

Retirer la lamelle de protection de la lame et déposer la totalité de la solution d'hybridation dans un coin de la lame.

Eliminer les poussières de la lamelle à l'aide d'une bouteille d'air comprimé et recouvrir la lame sans introduire de bulles d'air.

Hybrider pendant 60 à 72 heures à 37°C.

## LAVAGES

Précautions : -Travailler à l'abri de la lumière.

-Ne pas laisser sécher les lames entre deux étapes de lavage.

Solution de SSC 2X/50% formamide : 3 fois 10 minutes à 40°C.

Solution de SSC 1X : 4 fois 5 minutes à température ambiante.

Tremper rapidement dans l'eau distillée.

Centrifuger 2 minutes à 1200 tours par minute.

## Puces à ADN Genosystem 1MB (Spectral Genomics)

### PRETRAITEMENT DE L'ADN : DIGESTION ENZYMATIQUE

ADN	2 µg
Tampon de l'enzyme Eco RI	10 µl
Eco RI	80U
Eau	qsp 100 µl

Incuber 16 heures à 37°C.

Contrôle de la digestion :

Gel d'agarose 1 % dans TE 1X.

Migration à 118V 30 minutes.

Résultat attendu : traînée homogène de 20 kb à 600 pb.

Si la digestion est correcte, stopper la réaction à 72°C pendant 10minutes.

### PURIFICATION DE L'ADN

Kit Zymo Research's DNA Clean and concentrator

Ajouter 2 fois le volume (190 µl) de tampon (DNA binding buffer) aux 95 µl d'ADN digérés.

Transférer ces 300 µl sur une colonne.

Centrifuger à 13 000 tours par minute pendant 10 à 15 secondes.

Déposer 200 µl de wash buffer sur la colonne (lavage des sels et enzyme).

Centrifuger à 13 000 tours par minute pendant 15 secondes.

Ajouter 200 µl d'éthanol.

Centrifuger à 13 000 tours par minute pendant 30secondes.

Eluer : 26 µl de l'eau du kit, laisser à température ambiante 30 secondes à 1 minute, centrifuger à 13 000 tours par minute pendant 20 à 30 secondes.

Recommencer une élution avec 26 µl d'eau.

### MARQUAGE

Kit BioPrime labeling kit, Gibco

Ajouter 20 µl de random primer.

Incuber 5 minutes à 100°C à sec puis 5 minutes dans la glace.

Dans la glace, ajouter 2,5 µl de tampon et 1,5 µl de Cy3 ou Cy5 (1 mM) dans chaque tube.

Ajouter 1 µl d'enzyme exow klenow.

Incuber à 37°C pendant 1 h 30 à 2 heures.

Stopper la digestion en ajoutant 5 µl d'EDTA 0,5 M pH 8.

Centrifuger brièvement et placer les échantillons dans la glace.

### VERIFICATION DU MARQUAGE

Vérifier le random priming par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % à 160 V pendant 45 minutes : taille entre 100 et 500 pb, traînée homogène entre 200 et 300 pb.

### HYBRIDATION

Dénaturer 10 minutes à 72°C.

Placer les tubes dans la glace.

Mélanger l'ADN du témoin Cy5 + ADN du patient Cy3

l'ADN du témoin Cy3 + ADN du patient Cy5.

Ajouter 45 µl de spectral hybridization buffer I.

Ajouter 110 µl d'isopropanol + 11,3 µl de NaCl 5M.

Incuber à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 minutes.

Centrifuger à 13 000 tours par minute pendant 20 minutes à 20°C.

Renverser le surnageant. Rincer avec 500 µl d'éthanol à 70 %.

Sécher 5 minutes.

Ajouter 10 µl d'eau et laisser 5 minutes à température ambiante.

Ajouter 30 µl de tampon II (50 % formamide, 10% dextran sulfate dans SSC 2X) et resuspendre le culot.

Dénaturer 10 minutes à 72°C.

Cinq minutes dans la glace.

Incuber 30 minutes à 37°C.

Centrifuger brièvement les tubes.

Déposer sur lame, recouvrir d'une lamelle, attendre 5 minutes et incuber 16 heures à 37°C dans une chambre d'hybridation Corning.

### LAVAGES

Le protocole de lavage est identique que celui utilisé pour les puces Genosensor Array 300.

## Puces de l'université de Leuven

### MARQUAGE DE L'ADN

Kit Bioprime® Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen)

300 ng d'ADN dans 21 µl.

Ajouter 20 µl de random primer 2,5X.

Dénaturer 10 minutes à 92°C.

Cinq minutes dans la glace.

Ajouter 5 µl de dCTP mix + 3 µl de dCTP-Cy3 (1 mM) ou de dCTP-Cy5 (1 mM) (Amersham Pharmacia) respectivement pour l'ADN patient 1 et l'ADN patient 2.

Ajouter 1 µl de Klenow Fragment.

Incuber une nuit à 37°C au bain marie.

Arrêter la réaction en ajoutant 5 µl du tampon Stop.

### PURIFICATION

Module de purification du kit Bioprime® Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen)

Ajouter 45 µl de TE pH 8 aux tubes contenant les produits de marquage.

Ajouter 400 µl de tampon A et vortexer 30 secondes.

Centrifuger sur colonne à 11 000 g pendant une minute à température ambiante.

Ajouter 600 µl de tampon B.

Centrifuger à 11000g pendant une minute à température ambiante.

Ajouter 200 µl de tampon B.

Centrifuger à 11 000 g pendant une minute à température ambiante.

Centrifuger les colonnes à vide à 11 000 g 30 secondes.

Eluer avec deux fois 50 µl d'eau stérile : centrifuger deux fois à 11 000 g pendant une minute.

### VERIFICATION DE L'INCORPORATION DES CYANINES

Vérifier l'incorporation des cyanines à l'aide du Nanodrop.

X ng/µl d'ADN

Y pmol/µl Cy3 (ou Cy5)

Calcul pour apprécier la qualité du marquage :

**(X/Y) x 3,08**

## PRECIPITATION DES PRODUITS DE MARQUAGE

Mélanger 3,5 µg d'ADN marqué en Cy5 et en Cy3.

Ajouter 100 µl de COT-1 (1µg/µl).

Précipiter à l'éthanol :

Ajouter 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,6 + 2,5 fois le volume d'éthanol conservé à -20°C.

Placer le mélange à -20°C durant la nuit ou à -80°C durant une heure.

Centrifuger 30 minutes à 13 200 tours par minute à +4°C.

Enlever l'éthanol par retournement.

Ajouter 500 µl d'éthanol à 70%.

Centrifuger 5 minutes à 13 200 tours par minute.

Enlever l'éthanol par retournement.

Laisser sécher le culot à l'air durant 5 à 10 minutes.

## PREPARATION DE LA SOLUTION DE « BLOCAGE »

Cette solution bloque les séquences répétées des clones déposés sur la lame.

30 µl d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml)

50 µl de Cot-1 (1 µg/µl)

Précipiter à l'éthanol :

Ajouter 1/10V d'acétate de sodium 3 M pH 5,6.

2,5 fois le volume d'éthanol 100 % conservé à -20°C (c'est-à-dire 220 µl).

Placer le mélange à -20°C durant la nuit ou à -80°C durant une heure.

Centrifuger 30 minutes à 13 200 tours par minute à 4°C.

Enlever l'éthanol par retournement.

Ajouter 500 µl d'éthanol à 70 %

Centrifuger 5 minutes à 13 200 tours par minute.

Enlever l'éthanol par retournement.

Laisser sécher le culot à l'air durant 5 à 10 minutes.

Ajouter 60 µl de tampon d'hybridation.

Placer à 37°C afin de bien reprendre le culot durant 5 à 10 minutes.

## HYBRIDATION

Ajouter 4 µl de tRNA (100 µg/µl), 55 µl de tampon d'hybridation (50 % formamide, SSC 2X, 10 % dextran sulfate, 0,1 % Tween20, 10 mM Tris HCl pH 7,5) au culot obtenu après précipitation des ADN à tester.

Placer à 37°C au bain-marie environ 10 minutes afin de bien resuspendre le culot.

Dénaturer les ADN à tester et la solution de "blocage" 10 minutes dans un bain marie à 75°C (ou 15 minutes à 73°C). Placer les tubes dans la glace 5 minutes.

Préhybrider la sonde à 37°C durant 1 heure avec l'ADN Cot-1.

En parallèle, bloquer la lame avec la solution de "blocage" durant 1 heure : ajouter 60 µl de la solution "bloquante" sur la lame à 37°C (sur bloc chauffant) (figure 32).

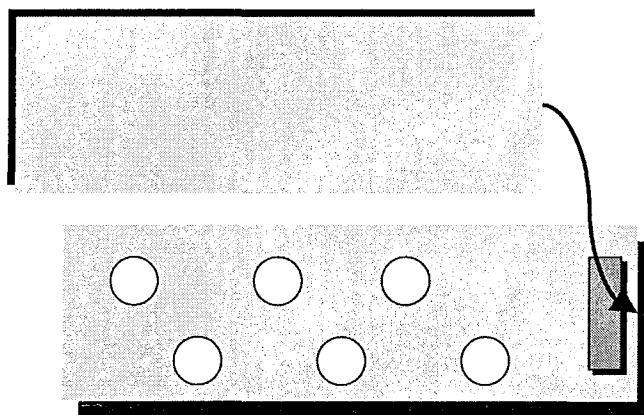


Figure 32 : Schéma de la lame et des dépôts

Placer les lames dans une chambre d'hybridation humide à 37°C, durant une heure dans une étuve.

Hybridation de la sonde :

Centrifuger 2 minutes la solution contenant la sonde bloquée par l'ADN Cot-1.

Retirer la lamelle de la lame et la placer sur le bloc chauffant à 37°C.

Déposer 45 µl de sonde (4 dépôts au milieu de la lame).

Recouvrir délicatement d'une lamelle

Hybrider durant 2 nuits à 37°C.

## LAVAGES

Oter la lamelle dans une solution de PBS/0,05 % Tween20, pH 7,0 à température ambiante et sous agitation durant quelques minutes.

Laver dans une solution de PBS/0,05 % Tween20 à température ambiante durant 10 minutes sous agitation.

Transvaser dans une solution 50 % formamide/SSC 2X, pH 7,0 +/- 0,2 préchauffé à 42°C durant 30 minutes.

Laver les lames dans une solution de PBS/0,05 % Tween20 à température ambiante durant 10 minutes sous agitation.

Centrifuger immédiatement les lames à 1 200 tours par minute durant 1 minute.

Remarque : si le bruit de fond est trop important, relaver la lame environ 10 secondes dans une solution SSC 2X à température ambiante, rincer la lame 1 à 2 fois rapidement dans l'eau et centrifuger.

## **Puces Integrachip (Integragen)**

Les étapes de marquage de l'ADN par les cyanines, de purification et de vérification d'incorporation des cyanines sont communes au protocole de la puce de l'université de Leuven.

### **PRECIPITATION A L'ETHANOL**

Mélanger l'équivalent de 150 pmol de chaque cyanine.

En déduire la quantité d'ADN nécessaire (concentration ADN après marquage X volume d'ADN).

A partir de la solution d'ADN Cot-1 à 1 µg/µl (Invitrogen n°15279-011), prélever 40 fois la quantité d'ADN sonde (Cy3 + Cy5).

Ajouter 1/10 volume (ADN Cy3 + ADN Cy5 + ADN Cot-1) d'acétate d'ammonium 3M.

Ajouter 2,5 volume (ADN Cy3 + ADN Cy5 + ADN Cot + acétate d'ammonium) d'éthanol froid (conservation à -20°C).

Placer à -80°C pendant une heure les ADN des patients et l'ADN Cot-1 (ou à -20°C pour une nuit) à l'abri de la lumière.

Centrifuger 30 minutes à 13 200 tours par minute à 4°C.

Eliminer l'éthanol par retournement.

Ajouter 500 µl d'éthanol à 70%.

Centrifuger 5 minutes à 13 200 tours par minute.

Eliminer l'éthanol par retournement.

Laisser sécher le culot à l'air durant 5 à 10 minutes.

### **HYBRIDATION**

Solution tampon de phosphate de sodium (NaP) 500 mM pH 7,4 :

Mélanger 29,10 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (141,96 g.M<sup>-1</sup>) et 7,02g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (156,01 g.M<sup>-1</sup>) dans 500 ml d'eau distillée.

Produits	concentration solution stock	Volume d'eau	Pesée ou volume solution initiale	concentration finale	Facteur de dilution	Volume de solution stock
sodium dextran sulfate	20 %	1 ml	0,2 g	5 %	4	11,55 µl
TE pH 8						7,05 µl
t-RNA	100 µg/µl			1,1 µg/µl	91	0,51 µl
ADN sperme de saumon	10 µg/µl			500 ng/µl	20	2,13 µl
SDS	5 %	20 ml	1 g	0,1 %	50	0,92 µl
formamide	100 %			40 %	2,5	18,5 µl
NaP	500 mM			50 mM	10	4,62 µl
EDTA	500 mM	4,9 ml	100 µl de solution à 500 mM	0,2 mM	50	0,92 µl

**Tableau 12 : Préparation de la solution d'hybridation**

Resuspendre les ADN à tester dans 42 µl de solution d'hybridation.

Chauffer 5 minutes au bain marie à 37°C pour dissoudre le culot.

Chauffer 10 minutes à 70°C (dénaturation de l'ADN).

Laisser hybrider l'ADN Cot-1 1 heure au bain marie à 37°C.

Déposer la solution d'hybridation sur la lame à température ambiante.

Mettre au bain-marie à 42°C pendant 3 nuits dans une chambre d'hybridation Corning.

## LAVAGES

Produits	Concentration solution stock	volume	Pesée ou volume de la solution initiale	Concentration finale	Facteur de dilution	Volume solution stock
Formamide	100%			20 %	5	7,6 ml
NaCl	5 M			470 mM	8,5	3,57 ml
NaP	500 mM			50 mM	10	3,8 ml
EDTA	500 mM ->10 mM	5 ml	100 µl de solution à 500 mM	0,2 mM	50	0,76 ml
SDS	5 %			2 %	2,5	15,2 ml
eau						7,07 ml

**Tableau 13 : Solution de post-hybridation**

Placer la lame dans 38 ml de solution de post-hybridation dans un tube Falcon de 50 ml à température ambiante pour décoller la lamelle.

Incuber dans la solution de lavage (SSC 0,1X / SDS 0,1%) à 42°C pendant 10 minutes.

Incuber 5 minutes à température ambiante dans une solution SSC 0,1X / SDS 0,1%.

Répéter cette incubation.

Incuber 10 fois 1 minute à température ambiante dans une solution SSC 0,1X.

Tremper la lame pendant 10secondes dans une solution SSC 0,01X.

Faire 20 passages dans l'isopropanol pour éliminer les traces de sels.

Centrifuger à 1200 tours par minute pendant 2 minutes.

**Annexe 2 : Liste des clones fixés sur lame dans le système  
Genosensor Array 300**

Utility Abbreviations

<input checked="" type="checkbox"/>	AMP	Cancer amplicon not previously placed on AmpliOnc1 Chip
<input checked="" type="checkbox"/>	AMP(1)	Cancer amplicon previously placed on AmpliOnc1 Chip
<input checked="" type="checkbox"/>	Del	Deletion region
<input checked="" type="checkbox"/>	gain	Region gained
<input checked="" type="checkbox"/>	gain/loss (Ca)	Region gained or lost in cancer
<input checked="" type="checkbox"/>	LOH	Region of loss of heterozygosity

<input type="checkbox"/>	M	Marker added to reduce genomic gaps
<input type="checkbox"/>	ONC	Oncogene
<input type="checkbox"/>	pTSG	putative Tumor Suppressor Gene
<input type="checkbox"/>	Sub Tel	Single copy sequence near the telomere
<input type="checkbox"/>	TSG	Tumor Suppressor Gene
<input type="checkbox"/>	uDEL	Region lost in microdeletion syndrome

Other Cancer Abbreviations

<input checked="" type="checkbox"/>	Ba	Barrett's esophagus
<input checked="" type="checkbox"/>	BCNS	Basal cell nevus syndrome
<input checked="" type="checkbox"/>	C	Cervical
<input checked="" type="checkbox"/>	E	Esophageal
<input checked="" type="checkbox"/>	G	Gastric
<input checked="" type="checkbox"/>	GI	Glioma
<input checked="" type="checkbox"/>	H	Head & neck
<input checked="" type="checkbox"/>	He	Hepatocellular
<input checked="" type="checkbox"/>	M	Melanoma
<input checked="" type="checkbox"/>	MEN	Multiple endocrine neoplasia type 1

<input type="checkbox"/>	N	Neuroblastoma
<input type="checkbox"/>	O	Ovarian
<input type="checkbox"/>	P	Pancreatic
<input type="checkbox"/>	R	Renal
<input type="checkbox"/>	Re	Retinoblastoma
<input type="checkbox"/>	S	Sarcoma
<input type="checkbox"/>	Sq	Squamous
<input type="checkbox"/>	T	Testis
<input type="checkbox"/>	Th	Thyroid
<input type="checkbox"/>	Ts	Tuberous sclerosis
<input type="checkbox"/>	U	Urinary bladder

Congenital Disorder Abbreviations

<input type="checkbox"/>	1p36 del	1p36 deletion syndrome
<input type="checkbox"/>	ALGS	Alagille syndrome
<input type="checkbox"/>	AZF	Azoospermia Factor
<input type="checkbox"/>	BW	Beckwith-Wiedemann syndrome
<input type="checkbox"/>	CDC	Cri-du-Chat syndrome
<input type="checkbox"/>	CMT1A	Charcot-Marie-Tooth syndrome
<input type="checkbox"/>	CY	Cylindromatosis
<input type="checkbox"/>	DGS	DiGeorge syndrome
<input type="checkbox"/>	DGS-II	DiGeorge syndrome II
<input type="checkbox"/>	DMD	Muscular dystrophy
<input type="checkbox"/>	DS	Down syndrome
<input type="checkbox"/>	HDR	Hypoparathyroidism,sensorineural deafness & renal dysplasia syndrome

<input type="checkbox"/>	KAL	Kallmann syndrome
<input type="checkbox"/>	LGS	Langer-Giedion syndrome
<input type="checkbox"/>	MDS	Miller-Dieker syndrome
<input type="checkbox"/>	NF1	Neurofibromatosis type 1
<input type="checkbox"/>	NF2	Neurofibromatosis type 2
<input type="checkbox"/>	PWS/AS	Prader-Willi/Angelman syndrome
<input type="checkbox"/>	RTS	Rubenstein-Taybi Syndrome
<input type="checkbox"/>	SCA	Sex chromosome abnormality
<input type="checkbox"/>	SMS	Smith-Magenis syndrome
<input type="checkbox"/>	STS	Steroid sulfatase deficiency
<input type="checkbox"/>	Sub Tel	Subtelomere abnormality
<input type="checkbox"/>	WHS	Wolf-Hirschorn syndrome
<input type="checkbox"/>	WS	Williams syndrome

Misc. Abbreviation

<input checked="" type="checkbox"/>	c	Cell line
-------------------------------------	---	-----------

Vysis FISH Probes

Order # (\*) Blue bars indicate the Vysis FISH probe and order number which correspond exactly to the clone on the array. (An order number followed by an \*\*\* indicates the probe of interest is part of a set)

Clone Availability

<b>Clone Prefix</b>	<b>Clone Availability</b>
RPCI	Roswell Park Cancer Institute clones are available from Invitrogen™ (www.invitrogen.com) and Pieter De Jong's BACPAC Resource at Children's Hospital of Oakland Research Institute (bacpac.chori.org)
CTB, CTC or CTD	California Institute of Technology clones are available from Invitrogen™

Invitrogen™ is a trademark of Invitrogen Corporation (www.invitrogen.com)



	Clone Name - Standard	Alternate Names	Cytogenetic Locus (Source: NCBI)	Utility	Clone/Disease Associations							Vysis FISH Probe Order #	Clone Library Coordinates	GenBank® Accession Number-Complete Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence
					Breast Cancer	Lung Cancer	Colon Cancer	Prostate Cancer	Hematologic Cancer	Other Cancer	Congenital Disorder					
1	CEB108/T7	1p tel; CEB108/T7	1p tel	Sub Tel								Sub Tel	33-252001	GS1-232823	NA	
2	1PTEL06	1PTEL06;1p tel-2	1p tel	Sub Tel								Sub Tel		RP1-62L8	NA	
3	CDC2L1(p58)	p58; CDC2L1	1p36	DEL								1p36 del		GS1-254B24	NA	
4	PRKCZ	DIS243(AMF214y97), PRKCZ	1p36.33	LOH								1p36 del		RP11-290B2	AC068198	
5	TP73	TP73	1p36.33	LOH							N	1p36 del		CTB-124M18	NA	
6	DIS2660	DIS2660(AMFa203yc1)	1p36.32	LOH								1p36 del		RP11-319a11	AL391808	
7	D1S214	D1S214	1p36.31	LOH							N	1p36 del		RP11-312b8	AL590128	
8	DIS1635	DIS1635(CHLC.ATA9B08)	1p36.22	LOH							N	1p36 del		RP11-340B24	AL358492	
9	DIS199	DIS199	1p36.13	LOH										RP11-296a20	AL359199	
10	FGR(SRC2)	FGR(SRC2)	1p36.2-p36.1	ONC										unavailable	NA	
11	MYCL1(LMYC)	MYCL1(LMYC)	1p34.3	AMP(1)		c					G			unavailable	NA	
12	D1S427,FAF1	D1S427,FAF1	1p32.3	LOH										RP11-220m1	AC091610	
13	DIS500	DIS500(AMF343v9)	1p31.1	LOH							N			RP11-574n2	AC093431	
14	D1S418	D1S418(AMF197y91)	1p13.1	LOH										RP1-1160j2	AL450407	
15	NRAS	NRAS	1p13.2	AMP(1)	c									unavailable	NA	
16	D1S2465,D1S3402	D1S2465,D1S3402	1p12	M										RP11-418j17	AL359915	
17	WI-5663,WI-13414	WI-5663,WI-13414	1q21	M										RP4-791M13	AL138796	
18	LAGC2	LAGC2	1q25-q31	AMP(1)	c									GS1-229941	AL162401	
19	PTGS2(COX2)	PTGS2(COX2)	1q31.1	M										RP5-973m2	AL033533	
20	TGFb2	TGFb2	1q41	M										RP11-224o19	AL365213	
21	AKT3	AKT3	1q44	ONC										RP11-370K11	AC021126	
22	SHGC-18290	SHGC-18290; 1q tel-2	1q tel	Sub Tel								Sub Tel		RP11-407H12	AL358874	
23	1QTEL10	1q tel; 1QTEL10	1q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260001	GS1-167K11	NA	
24	U32389	U32389	2p tel	Sub Tel								Sub Tel	33-252002	GS1-8L3	NA	
25	2PTEL27	D252983(2PTEL27)	2p tel	Sub Tel								Sub Tel		RP1-892G20	NA	
26	MYCN(N-myc)	MYCN(N-myc)	2p24.1	AMP(1)							G,N			RP1-254n16	NA	
27	MSH2,CNK12	MSH2,CNK12	2p22.3-2p22.1	LOH										RP11-436k12	AC009600	
28	REL	REL	2p13-p12	AMP(1)										GS1-274P9	NA	
29	GNLY	GNLY	2p12-q11	M										RP11-439L14	AC012454	
30	SGC34236	SGC34236	2q paracentric	2q13	M									RP1-209e2	NA	
31	BIN1	BIN1	2q14	pTSG										RP11-521o16	AC012508	
32	LRP1B	LRP1B	2q21.2	pTSG										RP11-532L9	AC068287	
33	TBR1	TBR1	2q23-q37	M										RP11-334e15	AC009487	
34	ITGA4	ITGA4	2q31-q32	M										RP11-358m9	AC020595	
35	CASP8	CASP8	2q33-q34	LOH							N			RP11-5756s	AC007256	
36	ERBB4(HER-4)	ERB4(HER-4)	2q33.3-q34	ONC										RP11-384k20	AC03823	
37	WI-6310	WI-6310; 2q tel-2	2q tel	Sub Tel								Sub Tel		GS1-244D13	NA	
38	D2S447	D2S447	2q tel;D2S447	Sub Tel								Sub Tel	33-260002	RP11-172I13	AC0413498	
39	3PTEL25	D3S4559(3PTEL25)	3p tel	Sub Tel								Sub Tel	33-252003	CTC-228K22	NA	
40	3PTEL01,CHL1	CHL1, 3PTEL01, 3PTEL02;3tel-2	3p tel	Sub Tel								Sub Tel		RP11-114K9	AC021997	
41	VHL	VHL	3p25-p26	TSG							R			CTB-110j24	NA	
42	RAF1	RAF1	3p25	AMP(1)										GS1-98L2	NA	
43	THR8	THR8	3p24.3	LOH										RP11-489c3	AC027387	
44	MLH1	MLH1	3p21.3-p23	Def										RP11-491d6	AC006583	
45	RASSF1	RASSF1	3p21.3	pTSG										CTD-316M115	NA	AQ769651
46	FHIT	FHIT	3p14.2	pTSG							R			CTB-1c12	NA	
47	p44S10	p44S10	3p14.1								M			RP11-129H12	AC063925	
48	D3S1274, ROBO1	D3S1274,ROBO1(DUTT1)	3p12-3p13	LOH							O,R			RP11-30h24	AC022664	
49	RBP1,RBP2	RBP1,RBP2	3q21-q22	M										RP11-34d24	AC013379	
50	TERC	TERC(hTR)	3q26	AMP(1)							C			GS1-115H3	NA	
51	EIF5A2	EIF5A2	3q26.2								O			RP11-654k19	AC051708	
52	PIK3CA	PIK3CA	3q26.3	AMP(1)							H			RP1-97b16	NA	
53	TP63	TP63	3q27-q29	pTSG/AMP										RP11-373i6	AC063939	
54	MF12	sts-M12154; 3q tel-2	3q tel	Sub Tel								Sub Tel		RP11-432D10	AC068302	
55	3QTEL05	D3S4560(3QTEL05)	3q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260003	GS-56H22	NA	

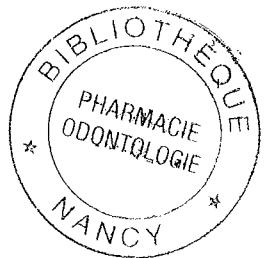
	Clone Name - Standard	Alternate Names	Cytogenetic Locus (Source: NCBI)	Utility	Clone/Disease Associations							Vysis FISH Probe Order #	Clone Library Coordinates	GenBank® Accession Number-Complete Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	
					Breast Cancer	Lung Cancer	Colon Cancer	Prostate Cancer	Hematologic Cancer	Other Cancer	Congenital Disorder						
56	GS10K2/77	4p tel	4p tel	Sub Tel							Sub Tel	33-252004	GS1-116B13	NA			
57	SHGC4-207	4p tel-2	4p tel	Sub Tel							Sub Tel		RP11-203E23	AQ415592			
58	D4S114	Wolf-Hirschhorn clone #2	4p16.3	uDEL							WHS		RP11-21N18	NA	AQ008957	B66059	
59	WHS1	WHS1(WHSC1)	4p16.3	uDEL							WHS	32-190074	GS1-24p11	NA			
60	DDX15	DDX15	4p15.3	M										RP11-192p23	AC027517		
61	KIT	c-KIT	4q11-q12	ONC							G			RP11-124E15	AQ346768		
62	PDGFRA	PDGFRA	4q11-q13	AMP(1)							G			GS-61984	NA		
63	EIF4E	EIF4E (by ucsc)	4q24 (by ucsc)	AMP							H			RP11-42B54	AC093836		
64	PGRMC2	PGRMC2	4q26	M										RP11-208k18	AC069265		
65	PDZ-GEF1	PDZ-GEF1(KIAA0313)	4q32.1	M										RP11-594115	AC079451		
66	4QTEL11	4QTEL11; 4q tel-2	4q tel	Sub Tel							Sub Tel			RP5-963K6	NA		
67	D4S2930	4q tel	4q tel	Sub Tel							Sub Tel	33-260004	GS1-31J3	NA			
68	C84C11/T3	5p tel	5p tel	Sub Tel							Sub Tel	33-252005	RP1-24H19	NA			
69	D5S23	D5S23	5p15.2	uDEL/gain							CDC			RP1-305D17	NA		
70	D5S2064	D5S2064 2nd Criduchat	5p15.2	uDEL/gain							CDC			RP1-144E22	NA		
71	DAB2	DAB2 (DOC-2)	5p13	pTSG							O			CTD-2006D4	AC069179		
72	DHFR,MSH3	DHFR,MSH3	5q11.2-q13.2	gain/loss,Ca										RP11-53B623	AC022223		
73	APC	APC	5q21-q22	Del							Ba			CTC-31716	NA		
74	EGR1	EGR1	5q31.1	Del										RP1-98c22	AC004821		
75	CSF1R	CSF1R	5q33-q35	Del										RP1-141L3	NA		
76	NIB1408	NIB1408; 5q tel-2	5q tel	Sub Tel							Sub Tel			RP11-14E9J	NA	AQ375871	AQ375869
77	5QTEL70	5q tel	5q tel	Sub Tel							Sub Tel	33-260005	RP1-240g13	NA			
78	6PTEL48	6p tel	6p tel	Sub Tel							Sub Tel	33-252006	GS1-196iS	NA			
79	PIM1	PIM1	6p21.2	M										RP3-355M6	AL353579		
80	CCND3	CCND3	6p21	AMP							G			RP5-97N23	AL160163		
81	D6S414	D6S414	6p12.1-p21.1	M										RP3-445N2	AL031779		
82	HTR1B	HTR1B	6q13	M										RP11-369L7	AL390124		
83	D6S434	D6S434	6q16.3	Del										CTD-3017N15	NA	AQ101948	AQ092100
84	D6S268	D6S268	6q16.3-q21	LOH										RP1-67a8	AL121957		
85	MYB	MYB	6q22-q23	AMP(1)							M			CTC-26B4	NA		
86	D6S311	D6S311	6q23-24	LOH							He			RP11-40P17	AL513164		
87	ESR1	ESR(ER)	6q25.1	AMP(1)										GS1-59B4	NA		
88	6QTEL54	6q tel	6q tel	Sub Tel							Sub Tel	33-260006	RP1-57H24	NA			
89	G31341	7p tel	7p tel	Sub Tel							Sub Tel	33-252007	RP1-164D18	AC093614			
90	IL6	IL6	7p21	M							Sub Tel			RP11-240H8	AC073072		
91	EGFR	EGFR(ERBB1)	7p12.3-p12.1	AMP(1)/gain							G,H,G			GS1-246M20	NA		
92	ELN	ELN(Elastin)	7q11.23	uDEL										RP1-117G9	NA		
93	RFC2,CYLN2	WBSCR5,RFC2,CYLN2	7q11.23	uDEL										GS1-166C5	AC095015		
94	ABC1(MDR1)	PGY1(MDR1, ABC20)	7q21.1	AMP(1)										GS1-93m10	NA		
95	CDK6	CDK6	7q21-q22	AMP							G			RP5-850g1	AC004128		
96	SERpine1	PLANH1(PAI-1)	7q21.3-q22	pTSG							O			RP4-747g18	AC004876		
97	MET	MET	7q31	AMP(1)/Del							G			CTB-54J7	NA		
98	TIF1	TIF1	7q32-q34	M										RP11-199L18	AC013423		
99	stSG48460	stSG48460;7qtel-2	7q tel	Sub Tel							Sub Tel			CTD-315m5	NA	AQ897338	AQ858297
100	7QTEL20	7q tel	7q tel	Sub Tel							Sub Tel	33-260007	RP1-3k23	NA			
101	D8S504	8p tel	8p tel	Sub Tel							Sub Tel	33-252008	GS1-77L23	NA			
102	D8S596	D8S596;8ptel-2	8p tel	Sub Tel							Sub Tel			RP11-555E9	AC026950		
103	CTSB	CTSB	8p22	AMP(1)										RP11-262g7	AC049063		
104	PDGRL	PRLTS	8p22-p21.3	Del										GS1-194o16	AF165145		
105	LPL	LPL	8p22	Del										RP11-67o21	AO201622		
106	FGFR1	FGFR1(FLG)	8p11.2-p11.1	AMP(1)										GS1-568k20	NA		
107	MOS	MOS	8q11	AMP(1)										RP11-2214	NA	AQ009368	B66258
108	E2F5	E2F5	8p22-q21.3	AMP										RP11-219p4	AC011773		
109	EXT1	EXT1	8q24.11-q24.13	uDEL										RP11-24c23	B66577		
110	MYC	MYC(c-myc)	8q24.12-q24.13	AMP(1)							G,H,U,O			unavailable	NA		
111	PTK2	FAK	8q24-qter	AMP							Sq			RP11-642a1	AC067931		
112	SHGC-31110	SHGC-31110;8qtel-2	8q tel	Sub Tel							Sub Tel			RP4-686b16	AF235103		
113	U11829	8q tel	8q tel	Sub Tel							Sub Tel	33-260008	RP1-489d14	NA			

	Clone Name - Standard	Alternate Names	Cytogenetic Locus (Source: NCBI)	Utility	Clone/Disease Associations							Vysis FISH Probe Order #	Clone Library Coordinates	GenBank® Accession Number-Complete Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence		
					Breast Cancer	Lung Cancer	Colon Cancer	Prostate Cancer	Hematologic Cancer	Other Cancer	Congenital Disorder							
114	AF170276	9p tel	9p tel	Sub Tel							Sub Tel	33-252009	CTB-41L13	NA	BS1084	BS1083		
115	D9S913	D9S913,SHGC-140396; 9p tel-2	9p tel	Sub Tel							Sub Tel		RP11-106n6	NA	AQ318836	AQ318834		
116	MTAP	MTAP	9p21.3	LOH										RP11-70L8	AL359922			
117	CDKN2A(p16),MTAP	CDKN2A(INK4A,p16),CDKN2B(INK4B,p16),MTAP	9p21	TSG						U, U.M.E.P.		30-161070*	CTB-65d18	NA				
118	AFM137XA11	AFM137XA11	9p11.2	M										RP11-366n18	AL445584			
119	D9S166	D9S166	9p12-q21	LOH						G				RP1-126i5	NA			
120	PTCH	PTCH	9q22.3	TSG						BCNS				CTD-2105o17	NA	AQ606414	AQ666849	
121	DBCCR1	DBCCR1	9q33.2	TSG						U				RP11-440n22	NA	AQ584807	AQ584805	
122	TSC1	TSC1	9q34	TSG						Ts,U				CTD-3145b15	NA	AQ124468	AQ210100	
123	ABL1	ABL1(ABL)	9q34.1	AMP(1)										RP1-763a4	NA			
124	H18962	emb1-H18962; 9q tel-2	9q tel	Sub Tel										RP11-417a4	AL161451			
125	D9S325	9q tel	9q tel	Sub Tel										Sub Tel	33-260009	GS1-135L17	NA	
126	10PTEL006	10p tel	10p tel	Sub Tel										Sub Tel	33-252010	GS1-235c11	NA	
127	SHGC-44253	SHGC-44253;10p tel-2	10p tel	Sub Tel										Sub Tel		RP11-62o22	AL359957	
128	D10S249,D10S533	D10S249,D10S533	10p15	LOH											RP11-177o21	AQ415486		
129	GATA3	GATA3	10p15												HDR	RP11-379r12	AL390294	
130	WI-2389,D10S1260	WI-2389,D10S1260 (DiGeorge region2)	10p14-p13	uDEL										DGS-II	RP1-287o21	AL136319		
131	BM1	BM1	10p13	M											RP11-573b6	NA		
132	D10S167	D10S167	10p11-10q11	M											RP1-28n9	NA		
133	EGR2	EGR2,SHGC-145038	10q21.3	M											RP11-293d12	AL357125		
134	PTEN	PTEN(MMAC1)	10q23.3	TSG											CTD-2044m21	NA		
135	FGFR2	FGFR2(BEK, K-SAM)	10q26	AMP(1)											GS1-126b28	NA		
136	DMBT1	FLJ46361	10q25.3-q28.1	pTSG											RP11-318e4	AC069022		
137	stSG27915	stSG27915;10q tel-2	10q tel	Sub Tel											CTD-2545L15	NA	AQ390296	AQ390294
138	100TEL24	10q tel	10q tel	Sub Tel										Sub Tel	33-260010	GS1-261b16	NA	
139	11PTEL03	11p tel	11p tel	Sub Tel										Sub Tel	33-252011	RP1-44h16	NA	
140	INS	INS, WIAF-1245;11p tel-2	11p tel	Sub Tel											RP3-416j11	AC006408		
141	HRAS	HRAS	11p15.5	AMP(1)											GS1-137c7	NA		
142	CDKN1C(p57)	p57,KIP2	11p15.5	TSG											RP4-693L23	NA		
143	WT1	WT1	11p13	TSG											CTD-2208j5	NA	AQ88468	AQ294117
144	KA11	KA11	11p11.2	LOH											CTD-2337c7	AC043591		
145	D11S461	D11S461	11q12.2	M											RP4-606g6	NA		
146	MEN1	MEN1	11q13	pTSG											CTD-2200i9	NA	AQ087527	AQ068037
147	CCND1	CCND1(BCL1)	11q13	AMP(1)											RP1-128i8	NA		
148	FGF4,FGF3	FGF4(HSTF1),FGF3(INT2)	11q13	AMP(1)											CTB-36115	NA		
149	EMS1	EMS1	11q13	AMP(1)											CTC-437h15	NA		
150	GARP	GARP(D11S833E)	11q13.5-q14	AMP(1)											CTC-352e23	NA		
151	PAK1	PAK1	11q13-q14	AMP(1)											GS1-7n12	NA		
152	RDX	RDX	11q22.3	LOH											RP11-686g14	AP000901		
153	ATM	ATM	11q22.3	LOH											RP11-964m3	NA	AQ590466	
154	MLL	MLL	11q23	AMP(1)											GS1-416o24	NA		
155	WI-6509	WI-6509;11q tel-2	11q tel	Sub Tel											RP11-217L21	AP003025		
156	AF240622	11q tel,VLU-YRM2072	11q tel	Sub Tel										Sub Tel	33-260011	RP1-25n8	NA	
157	8M16/SP6	12p tel	12p tel	Sub Tel										Sub Tel	33-252012	GS1-124k20	NA	
158	SHGC-5557	SHGC-5557;12p tel-2	12p tel	Sub Tel											RP11-350L7	AC005844		
159	CCND2	CCND2	12p13	AMP(1)											CTC-298g6	NA		
160	CDKN1B(p27)	CDKN1B,(p27,KIP1)	12p13.1-p12	TSG											RP11-59n1	AC007215		
161	KRAS2	KRAS2	12p11.2	AMP(1)											GS1-490c21	NA		
162	WNT1(INT1)	WNT1(INT1)	12q12-q13	AMP(1)											GS1-400h17	NA		
163	CDK2,ERBB3	CDK2,HER-3	12q13	AMP											RP11-973d8	AC025162		
164	GLI	GLI	12q13.2-q13.3	AMP(1)											unavailable	NA		
165	SAS,CDK4	SAS,CDK4	12q13-q14	AMP(1)											GS1-561n1	NA		
166	MDM2	MDM2	12q14.3-q15	AMP(1)											CTB-82n15	NA		
167	DRIM,ARL1	DRIM,ARL1	12q23	M											RP11-321f8	AC063948		
168	stSG8935	stSG8935; 12q tel-2	12q tel	Sub Tel											RP11-46h11	AC023047		
169	U11638	U11638	12q tel	Sub Tel										Sub Tel	33-260012	RP1-221k18	NA	

	Clone Name - Standard	Alternate Names	Cytogenetic Locus (Source: NCBI)	Utility	Clone/Disease Associations							Vysis FISH Probe Order #	Clone Library Coordinates	GenBank® Accession Number: Complete Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence		
					Breast Cancer	Lung Cancer	Colon Cancer	Prostate Cancer	Hematologic Cancer	Other Cancer	Congenital Disorder							
170	BRCA2	BRCA2	13q12-q13	TSG						O			RP1-214K23		Z74739			
171	RB1	RB1,TGFBR1	13q14	TSG						Re					RP1-58d13	NA		
172	D13S319	D13S319	13q14.2	LOH											RP1-208p23	NA		
173	D13S25	D13S25	13q14.3	LOH											RP1-269i22	NA		
174	D13S327	13q tel	13q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260013	RP1-01L16	NA			
175	PNN(DRS)	PNN(Pinin,DRS,memA)	14q13	pTSG						R					RP1-407N17	AL132639		
176	TCL1A	TCL1(D14S62)	14q32.1	gain/loss											RP1-298p23	AL117186		
177	AKT1	AKT1	14q32.32	AMP(1)						G					GS2-466a19	NA		
178	IGH(D14S308)	14q tel-2	14q tel	Sub Tel								Sub Tel		RP11-51J13	NA	AQ052325	AQ052324	
179	IGH(SHGC-36156)	14q tel	14q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260014	RP11-47p23	NA	AZ579057	AQ202909	
180	D15S11	D15S11	15q11-q13	uDEL								PWS/AS	32-190014*	GS-350-d11	NA			
181	SNRPN	SNRPN	15q12	uDEL								PWS/AS		unavailable	NA			
182	UBE3A,D15S10	UBE3A,D15S10	15q11-q13	uDEL								PWS/AS		RP1-1412	AC004259			
183	GABRB3	GABRB3	15q11.2-q12	uDEL								PWS/AS	32-190015*	GS-24b3	NA			
184	MAP2K5	MAP2K5	15q23	M										RP11-34f13	AC009292			
185	FES	FES	15q26.1	AMP(1)										unavailable	NA			
186	IGF1R	IGF1R	15q25-q26	AMP(1)										GS-251P4	NA			
187	PACE4C	PACE4C;15q tel-2	15q tel	Sub Tel								Sub Tel		CTD-235N321	NA	AQ263469	AQ076172	
188	WI-5214	15q tel	15q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260015	RP1-154P1	NA			
189	16PTEL03	16p tel	16p tel	Sub Tel								Sub Tel	33-252016	CTD-2371A5	NA	AQ111176	AQ111174	
190	stSG48414	stSG48414;16p tel-2	16p tel	Sub Tel								Sub Tel		RP11-26D18	NA	B68834	B66533	
191	CREBBP	CREB	16p13.3	uDEL								RTS		RP11-37p23	NA			
192	EMP2	EMP2(SHGC-147579)	16p13.3	LOH										RP11-27m24	AC027277			
193	ABCC1(MRP1)	ABCC1(MRP,MRP,ABC29)	16p13.1	AMP(1)	c									GS-127c11	NA			
194	CYLD	CYLD1	16q12-q13	TSG								CY		RP11-327p22	AC007728			
195	CDH1	CDH1	16q22.1	LOH										GS-205f7	NA			
196	FRA16D	FRA16D	16q23.2	LOH										RP8-200H22	NA			
197	CDH13	CDH13	16q24.2-q24.3	LOH								O,G,W		RP11-43L5	AC087189			
198	LZ16	LZ16(D16S3026)	16q24.2	Del, M										RP11-781H20	AC023256			
199	FANCA	FANCA	16q24.3	LOH										RP11-368f17	AC010538			
200	stSG30213	stSG30213;16q tel-2	16q tel	Sub Tel								Sub Tel		RP11-133L7	NA	AQ385562	AQ350275	
201	16QTEL013	16q tel	16q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260016	RP1-191p24	NA			
202	282M15/SP6	17p tel	17p tel	Sub Tel								Sub Tel	33-252017	GS-68f18	NA			
203	WI-14673	WI-14673;17p tel-2	17p tel	Sub Tel								Sub Tel		RP5-102961	AC015853			
204	HIC1	HIC1	17p13.3	uDEL/LOH								O	MDS	RP4-766c5	AL137038			
205	D17S379,MNT	D17S379,MNT	17p13.3	uDEL/LOH									MDS	GS-64g5	NA			
206	PAFAH1B1(LIS1)	LIS1	17p13.3	uDEL										32-190008*	RP1-95H6	NA		
207	TP53(p53)	TP53(p53)	17p13.1	TSG										32-190008	CTD-250P16	NA	AQ264234	AQ241965
208	D17S125,D17S61	D17S125,D17S61	17p12-p11.2	uDel/uDup								CMT1A		RP11-99F8	AC005900			
209	D17S1296,D17S1523	D17S1296,D17S1523	17p12-p11.2	uDel/uDup								CMT1A		RP11-924A14	AC005772			
210	LLGL1	LLGL1	17p12-17p11.2	uDEL								SMS		RP11-189d22	AC020567			
211	FLITOP3A	FLITOP3A	17p12-17p11.2	uDEL								SMS	32-191003	RP1-172n16	NA			
212	NF1'5	NF1'5	17q11.2									NF1		RP11-1107g21	NA	AQ731162	AQ696545	
213	NF1'3'	NF1'3'	17q11.2									NF1		CTD-253h15	NA	AQ626154	AQ355793	
214	BRCA1	BRCA1	17q21	TSG										CTD-319g23	NA	AQ173853	AQ189347	
215	PPARBP(FBP)	FBP	17q12	AMP										RP11-390P24	AC009283			
216	ERBB2(HER-2)	ERBB2(HER-2/neu, EGFR2)	17q11.2-17q12	AMP(1)								O,G,U,T		unavailable	NA			
217	THRA	THRA	17q11.2	AMP										RP11-283i23	NA			
218	TOP2A	TOP2A	17q21-q22	AMP(1)										32-190095*	RP11-58e9	AC018629		
219	NME1(NME23)	NME1(NME2, NM23)	17q21.3	LOH										RP11-481c4	AC005639			
220	RPS6KB1(STK14A)	RPS6KB1(STK14A)	17q23	AMP(1)										RP11-178c3	AC005702			
221	D17S1670	D17S1670,WI-6857	17q23	AMP(1)										RP5-1081p3	AC005207			
222	TK1	TK1	17q23.2-q25.3	pTSG										RP11-219G17	AC087645			
223	SHGC-103396	17q tel-2	17q tel	Sub Tel								Sub Tel		CTD-253i13	NA	AQ357495	AQ310084	
224	AFM217YD10	17q tel	17q tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260017	GS-50c4	NA			

			Clone Name - Standard	Alternate Names	Cytogenetic Locus (Source: NCBI)	Utility	Clone/Disease Associations							Vysis FISH Probe Order #	Clone Library Coordinates	GenBank® Accession Number-Complete Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	GenBank® Accession Number-End Sequence	
							Breast Cancer	Lung Cancer	Colon Cancer	Prostate Cancer	Hematologic Cancer	Other Cancer	Congenital Disorder						
225	D18S552		18p tel, VIJ-YRM2102	18p tel	Sub Tel									Sub Tel	33-252018	GS-74G18	NA		
226	SHG17327		18p tel-2	18p tel	Sub Tel									Sub Tel		RP11-431c11	NA	AQ585064	AQ554245
227	YES1		YES1	18p11.31-p11.21	AMP(1)								G			GS-8P19	NA		
228	TYMS(TS)		TS	18p11.32	AMP											RP11-145B19	AC020697		
229	LAMA3		LAMA3	18q11.2	M											RP11-666o22	AC090366		
230	FRA18A(D18S978)		FRA18A,D18S978	18q12.3	LOH											RP11-673d22	AP001639		
231	DCC		DCC	18q21.3	Del								H,Ba			GS-185o2	NA		
232	MADH4(DPC4)		DPC4,SMAD4	18q21.1	TSG								P			GS-568A15	NA		
233	BCL2 3'		BCL2-3'	18q21.3	AMP											GS-385n22	NA		
234	CTDP1,SHGC-145820		CTDP1,SHGC-145820;18qtel-2(formerlyR4)	18q tel	Sub Tel									Sub Tel		RP11-676O1	AP001641		
235	18QTEL11		18q tel	18q tel	Sub Tel									Sub Tel	33-260018	RP11-507P3	AC018747		
236	129F16,SP6		19p tel	19p tel	Sub Tel									Sub Tel	33-252019	CTB-129F16	NA		
237	stSG42796		stSG42796;19p tel-2	19p tel	Sub Tel									Sub Tel		CTD-2006C1	AC008770		
238	INSR		INSR	19p13.2	AMP(1)											GS-337s24	NA		
239	JUNB		JUNB	19p13.2	AMP(1)								Cc			GS-104C10	NA		
240	CCNE1		CCNE1	19q12	AMP(1)								U,O,E			CTB-25622	NA		
241	AKT2		AKT2	19q13.1-q13.2	AMP								P			CTB-166E20	AC011486		
242	GLTSCR2,SULT2A1		WI-11704,D19S902	19q13.32	pTSG								G			CTD-2571L23	AC008745		
243	D19S238E		19q tel	19 q tel	Sub Tel									Sub Tel	33-260019	GS-325l23	NA		
244	20PTEL18		20p tel	20p tel	Sub Tel									Sub Tel	33-252020	RP1-82o2	AZ303380		
245	SOX22		Sox-22,WI-14697,WI-15102; 20p tel-2	20p tel	Sub Tel									Sub Tel		RP5-1103g7	AL034548		
246	JAG1		JAG1	20p12.1-p11.23	ΔDel								ALGS		CTC-334g22	NA			
247	MKKS, SHGC-79896		SHGC-79896 2nd Alagille	20p12.1-p11.23	ΔDel								ALGS		CTC-19h8	NA			
248	TOP1		TOP1	20q12-q13.1	AMP(1)											RP11-112o1	NA	AQ342764	AQ311601
249	NCOA3(AIB1)		NCOA3(AIB1, RAC3, TRAM-1)	20q12	AMP(1)								O,G			CTC-432h16	NA		
250	MYBL2		MYBL2	20q13.1	AMP(1)								O			GS1-108b23	NA		
251	CSE1L(CAS)		CSE1L(CAS)	20q13	AMP(1)											GS1-2b19	NA		
252	PTPN1		PTPN1	20q13.1-q13.2	AMP(1)								O			GS1-236d3	NA		
253	STK6(STK15)		STK6(STK15, BTKA, aurora 2)	20q13.2-q13.3	AMP(1)								O			GS1-3219	NA		
254	ZNF217(ZABC1)		ZNF217(ZABC1)	20q13.2	AMP(1)								O			unavailable	NA		
255	CYP24		CYP24	20q13.2	AMP											CTC-10624	NA		
256	TNFRSF6B(DCR3)		DCR3	20q13	AMP											RP4-583p15	AL121845		
257	TPD52L2,TOM		RH-74935;20q tel-2	20q tel	Sub Tel									Sub Tel		RP11-465d20	NA	AQ581900	AQ581899
258	20QTEL14		20q tel	20q tel	Sub Tel									Sub Tel	33-260020	RP1-81112	NA		
259	D21S378		D21S378(LSI 21q11.2)	21q11.2	M											RP1-98L15	AL078615		
260	RUNX1(AML1)		AML1	21q22.3	AMP(1)											CTC-337K2	NA		
261	DYRK1A		DYRK1	21q22	gain									DS		RP11-119A10	NA	AQ349890	AQ349887
262	D21S341,D21S342		D21S341,D21S342	21q22.3	gain									DS		RP1-304J23	NA		
263	PCNT2(KEN)		KEN(PCN);21q tel-2	21q tel	Sub Tel									Sub Tel		RP11-746N23	AQ618375		
264	21QTEL08		21q tel	21q tel	Sub Tel									Sub Tel	33-260021	RP11-135B17	NA	AQ380317	AQ380315
265	D22S543		D22S543	22q11	M											RP1-15J16	AC005301		
266	GSCL		GSCL	22q11.21	ΔDEL								DGS		RP1-157e19	NA			
267	HIRA(TUPLE1)		HIRA(TUPLE 1, TUP1, DGCR1)	22q11.21	ΔDEL								DGS	32-191028	RP1-238C15	NA			
268	TBX1		TBX1(GNB1L)	22q11.2	ΔDEL								DGS		RP11-316L10	NA	AQ541289	AQ507809	
269	BCR		BCR(CML, PHL, BCR1, D22S11, D22S66)	22q11.23	AMP(1)											unavailable	NA		
270	NF2		NF2	22q12.2	TSG											unavailable	NA		
271	PDGFB(SIS)		PDGFB(SIS)	22q13.1	AMP(1)								S,G		unavailable	NA			
272	ARHGP8		ARHGP8	22q13.3	LOH								O,H			RP1-127B20	Z83838		
273	ARSA		ARSA; 22q tel-2nd	22q tel	Sub Tel									Sub Tel		RP1-104e13	NA	AQ316205	AQ316199
274	22QTEL31		22q tel	22q tel	Sub Tel									Sub Tel	33-260022	CTA-799F10	Z82245		
275	DXYS129		X/Y p tel	X/Y tel	Sub Tel									Sub Tel	33-252023	RP11-839D20	NA		
276	STS 3'		STS	Xp22.3	ΔDEL								STS		GS-118K5	NA			
277	STS 5'		STS 2nd STSclone	Xp22.3	ΔDEL								STS		GS-385B19	NA			
278	KAL		KAL	Xp22.3	ΔDEL								KAL		RP4-677N1	NA			
279	DMD exon 45-51		DMD exon 45-51	Xp21.1									DMD		RP11-607K23	AC093193			
280	DXS580		DXS580	Xp11.2	M										RP3-453-a3	z83745			
281	DXS7132		DXS7132	Xq12	M										RP3-323-b6	Z83841			
282	AR 3'		AR 3'	Xq11-q12	AMP(1)										GS-9H19	NA			
283	XIST		XIST	Xq13.2									SCA		RP PAC-92E23	U80460			
284	OCRL1		OCRL1	Xq25	M										RP3-454m7	AL022162			
285	EST CDY16c07		X/Yq tel	X/Yq tel	Sub Tel								Sub Tel	33-260023	GS-225F6	NA			
286	SRY		SRY	Yp11.3									SCA	32-190079	RP1-32g10	NA			
287	AZFa region		AZFa region	Yq11									AZF		CTC-484o7	AC006565			

## **BIBLIOGRAPHIE**



## Bibliographie

Battaglia A., Bianchini E., Carey JC.

Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry.

Am. J. Med. Genet, 1999, 82(1), 60-66.

Battaglia A. et Carey JC.

Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation : An overview..

Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet., 2003, 117(1), 3-14

Bauters M., Van Esc H., Marynen P. et al.

X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. .

Eur. J. Med. Genet., 2005, 48(3), 263-275.

Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, et al.

Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more?

Am. J. Med. Genet., 2005, 134A(3), 259-267.

Buckley PG., Mantripragada KK., Benetkiewicz M. et al.

A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications.

Hum. Mol. Genet., 2002, 11(25), 3221-3229.

Buckley PG., Mantripragada KK., Piotrowski A. et al.

Copy-number polymorphisms: mining the tip of an iceberg.

Trends in Genetics, 2005, 21(6), 315-317.

Cai WW., Mao JH, Chow CW. et al.

Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays.

Nature Biotech., 2002, 20(4), 393-396.

Cans C., Wilhelm L., Baille MF. et *al.*  
Aetiological findings and associated factors in children with severe mental retardation.  
Dev Med Child Neurol., 1999, 41(4), 233-239.

Casey J., Davidson N.  
Rates of formation and thermal stabilities of RNA: DNA and DNA: DNA duplexes at high concentrations of formamide.  
Nucleic Acids Res., 1977, 4(5), 1539-1551.

Coffin GS., Wilson MG.  
Wolf-Hirschhorn syndrome.  
Am. J. Dis. Child., 1971, 121(3), 265.

Curry CJ., Stevenson RE., Aughton D. et *al.*  
Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference.  
Am. J. Med. Genet., 1997, 72(4), 468-477.

Des Portes V., Livet MO., Vallee L.  
A practical diagnostic approach to mental deficiency in 2002.  
Arch Pediatr., 2002, 9(7), 709-725.

De Vries BBA., White SM, Knight SJL. et *al.*  
Clinical studies on subtelomeric rearrangements : a checklist..  
J. Med. Genet., 2001, 38, 145-150.

Fiegler H., Carr P., Douglas EJ. et *al.*  
DNA microarrays for comparative genomique hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones.  
Genes Chrom. Cancer., 2003, 36(4), 361-374.

Flint J., Knight S.  
The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation.  
Curr. Opin. Genet. Dev., 2003, 13(3), 310-316.

Gersh M; Grady D., Rojas K. et al.  
Development of diagnostic tools for the analysis of 5p deletions using interphase FISH.  
Cytogenet Cell Genet., 1997, 77(3), 246-251.

Ghaffari SR, Boyd E, Tolmie JL et al.  
A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation.  
J. Med. Genet., 1998, 35(3), 225-233.

Girard C., Duprat F., Terrenoire C. et al.  
Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels.  
Biochem Biophys Res Commun., 2001, 282(1), 249-256.

Grange DK., Garcia-Heras J., Kilani RA. et al.  
Trisomy 20q13 -> 20qter in a girl with multiple congenital malformations and a recombinant chromosome 20 inherited from a paternal inversion (20)(p13q13.1) : clinical report and review of the trisomy 20q phenotype.  
Am. J. Med. Genet. A., 2005, 137(3), 308-312.

Gray JW., Lucas J., Kallioniemi O. et al.  
Applications of fluorescence in situ hybridization in biological dosimetry and detection of disease-specific chromosome aberrations.  
Prog Clin Biol Res., 1991, 372, 399-411.

Harada N., Hatchwell E., Okamoto N. et al.  
Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation : a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation.  
J. Med. Genet., 2004, 41(2), 130-136.

Hennekam, RCM., Geerdink, RA., Hamel BCJ. et al.  
Autosomal recessive intestinal lymphangiectasia and lymphedema, with facial anomalies and mental retardation.  
Am. J. Med. Genet., 1989, 34(4), 593-600.

Hodgson G., Hager JH., Volik S. et *al.*

Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas.  
Nat. Genet., 2001, 29(4), 459-464.

Hosking BM., Muscat GE., Koopman DH. et *al.*

Trans-activation and DNA-binding properties of the transcription factor, Sox-18.  
Nucleic Acids Res., 1995, 23(14), 2626-2628.

Iafrate AJ., Feuk L., Rivera MN. et *al.*

Detection of a large-scale variation in the human genome.  
Nat. Genet., 2004, 36(9), 949-951.

Irrthum A., Devriendt K., Chitayat D. et *al.*

Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia.

Am. J. Hum. Genet., 2003, 72(6), 1470-1478.

Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK et *al.*

A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome.  
Nat Genet., 2004, 36(3), 299-303.

Joly G., Lapierre JM., Ozilou C. et *al.*

Comparative genomic hybridization in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype.

Clin. Genet., 2001, 60(3), 212-219.

Kallioniemi AH., Kallioniemi OP., Sudar D. et *al.*

Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetics analysis of solid tumors.  
Science, 1992, 258, 818-821.

Kirchhoff M., Rose H., Lundsteen C.

High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics.  
J Med Genet., 2001, 38(11), 740-744.

Kirchhoff M., Pedersen S., Kjeldsen E. et al.

Prospective study comparing HR-CGH and subtelomeric FISH for investigation of individuals with mental retardation and dysmorphic features and an update of a study using only HR-CGH.

Am. J. Med. Genet. A, 2004, 127(2), 111-117.

Lapuk A., Volik S., Vincent R. et al.

Computational BAC clone contig assembly for comprehensive genome analysis.

Genes Chrom. Cancer., 2004, 40(1), 66-71.

Larrabee PB., Johnson KL., Pestova E. et al.

Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype.

Am. J. Hum. Genet., 2004, 75(3), 485-491.

Lucito R., Healy J., Alexander J. et al.

Representational Oligonucleotide Microarray Analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation.

Genome research, 2003, 13(10), 2291-2305.

Leonard H., Wen X.

The epidemiology of mental retardation : challenges and opportunities in the new millennium.

Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev., 2002, 8(3), 117-134.

Majnemer A., Shevell ML.

Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child.

J. Pediatr., 1995, 127(2), 193-199.

Man TK., Lu XY., Jaeweon K. et al.

Genome-wide array comparative genomic hybridization analysis reveals distinct amplifications in osteosarcoma.

BMC Cancer, 2004, 4, 45-55.

Onyango P.

Genomics and cancer.

Curr. Opin. Oncol., 2002, 14(1), 79-85.

Osoegawa K., Woon PY., Zhao B. et *al.*  
An Improved Approach for Construction of Bacterial Artificial Chromosome Libraries.  
Genomics, 1998, 52 (1), 1-8.

Osoegawa K., Mammoser AG., Wu C. et *al.*  
A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing the Complete Human Genome.  
Genome research, 2001, 11 (3), 483-496.

Pinkel D., Straume T., Gray JW.  
Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.  
Genetics, 1986, 83(9), 2934-2938.

Pinkel D., Segraves R., Sudar D. et *al.*  
High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays.  
Nat Genet., 1998, 20(2), 207-211.

Plotner PL., Smith JL., Northrup H.  
Trisomy 20q caused by der(4)t(4;20)(q35;q13.1) : report of a new patient and review of the literature.  
Am. J. Med. Genet., 2002, 111(1), 71-75.

Pollack JR., Perou CM., Alizadeh AA. et *al.*  
Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays.  
Nat Genet., 1999, 23(1), 41-46.

Rajan S., Wischmeyer E., Karschin C. et *al.*  
THIK-1 and TFIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K<sup>+</sup> channels.  
J Biol Chem., 2001, 276(10), 7302-7311.

Reddy KS., Mak L.  
Mosaic unbalanced structural abnormalities confirmed using FISH on buccal mucosal cells.  
Ann Genet., 2001, 44(1), 37-40.

Ren H., Francis W., Boys A. et *al.*

BAC-based PCR fragment microarray : high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints.

Hum. Mutation, 2005, 25(5), 476-482.

Saccone S., De Sario A., Della Valle G. et *al.*

The highest gene concentrations in the human genome are in the telomeric bands of metaphase chromosomes.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1992, 89(11), 4913-4917.

Schaefer GB., Bodensteiner JB.

Evaluation of the child with idiopathic mental retardation.

Pediatr Clin North Am., 1992, 39(4), 929-943.

Schaeffer AJ., Chung J., Heretis K. et *al.*

Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages.

Am. J. Hum. Genet., 2004, 74(6), 1168-1174.

Shapira SK., McCaskill C., Northrup H. et *al.*

Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome.

Am J Hum Genet., 1997, 61(3), 642-650.

Shaw CJ., Yu W., Stankiewicz P. et *al.*

Comparative genomic hybridization using a proximal 17p BAC/PAC array detected rearrangements responsible for four genomic disorders.

J. Med. Genet., 2004, 41, 113-119.

Schoumans J., Anderlid BM., Blennow E. et *al.*

The performance of CGH array for the detection of cryptic constitutional chromosome imbalances.

J. Med. Genet., 2004, 41(2), 198-202.

Schrock E., du Manoir S., Veldman T. et al.  
Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes.  
Science, 1996, 273(5274), 494-497.

Sebat J., Lakshmi B., Troge J. et al.  
Large-scale copy number polymorphism in the human genome.  
Science, 2004, 305(5683), 525-528.

Seidel J., Heller A., Senger G. et al.  
A multiple translocation event in a patient with hexadactyly, facial dysmorphism, mental retardation and behaviour disorder characterised comprehensively by molecular cytogenetics.  
Case report and review of the literature.  
Eur J Pediatr., 2003, 162(9), 582-588.

Sharp AJ., Locke DP., McGrath SD. et al.  
Segmental duplications and copy-number variations in the human genome.  
Am. J. Hum. Genet., 2005, 77 (1), 78-88.

Shaw CJ., Shaw CA., Yu W. et al.  
Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders.  
J. Med. Genet., 2004, 41, 113-119.

Shaw-Smith C., Redon R., Rickman L. et al.  
Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features.  
J. Med. Genet., 2004, 41(4), 241-248.

Schmickel RD.  
Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes.  
J Pediatr., 1986, 109(2), 231-241.

Schroeder E., Helweg-Larsen HF.  
Chronic hereditary lymphedema (Nonne-Milroy-Meige's Disease).  
Acta Med Scand., 1950, 137(3), 198-216.

Smirnov DA., Burdick JT., Morley M. et *al.*  
Method for manufacturing whole-genome microarrays by rolling circle amplification.  
Genes Chrom. Cancer, 2004, 40(1), 72-77.

Snijders AM., Nowak N., Segraves R. et *al.*  
Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number.  
Nat. Genet., 2001, 29(3), 263-264.

Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S. et *al.*  
Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances.  
Genes Chrom. Cancer, 1997, 20(4), 399-407.

Song WJ., Sullivan MG., Legare RD. et *al.* Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia.  
Nat Genet., 1999, 23(2), 166-175.

Speicher MR., Gwyn Ballard S., Ward DC.  
Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH.  
Nat Genet., 1996, 12(4), 368-375.

Stanojcic S., Stevanovic M.  
The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping.  
Bioch. Biophys. Acta, 2000, 1492(1), 237-241.

Telenius H., Carter NP., Bebb CE. et *al.*  
Degenerate oligonucléotide-primed PCR : general amplification of target DNA by a single degenerate primer.  
Genomics, 1992, 13(3), 718-725.

Tjio JH., Levan A.

The chromosome number in man.

Heritas, 1956, 42, 1-6.

Tyson C., McGillivray B., Chijiwa C. et *al.*

Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH.

Am. J. Med. Genet. A, 2004, 129(3), 254-260.

Uhrig S., Schuffenhauer S., Fauth C. et *al.*

Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications.

Am J Hum Genet., 1999, 65(2), 448-462.

Ulger C., Toruner GA., Alkan M. et *al.*

Comprehensive genome-wide comparison of DNA and RNA level scan using microarray technology for identification of candidate cancer-related genes in HL-60 cell line.

Cancer Genet. Cytogenet., 2003, 147(1), 28-35.

Veltman JA., Schoenmakers E., Eussen B. et *al.*

High throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization.

Am. J. Hum. Genet., 2002, 70(5), 1269-1276.

Vermeesch JR., Melotte C., Froyen G. et *al.*

Molecular karyotyping : array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis.

J. Histochem. Cytochem., 2005, 53(3), 413-422.

Vissers L., De vries B., Osoegawa K. et *al.*

Array-based comparative hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities.

Am. J. Hum. Genet., 2003, 73(6), 1261-1270.

Walter S., Sandig K., Hinkel GK. et al.

Subtelomere FISH in 50 children with minor anomalies, identified by a check list, detects 10 rearrangements including a *de novo* balanced translocation of chromosomes 17p13.3 and 20q13.33.

Am. J. Med. Genet. A, 2004, 128(4), 364-373.

Xu J., Chen Z.

Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation.

Am. J. Med. Genet. C, 2003, 117(1), 15-24.

Yu W., Ballif BC., Kashork CD. et al.

Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions.

Hum. Mol. Genet., 2003, 12 (17), 2145-2152.



Yunis JJ.

High resolution of human chromosomes.

Science, 1976, 191(4233), 1268-1270.

Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S. et al.

Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces build DNA microarrays.

Anal. Biochem., 2000, 280(1), 143-150.

Zhao H., Kim Y., Wang P. et al.

Genome-wide characterization of gene expression variations and DNA copy number changes in prostate cancer cell lines.

Prostate, 2005, 63(2), 187-197.

N° d'identification : PH Nancy 05 n° 205

**TITRE :**

**Hybridation génomique comparative en microréseau : évolutions techniques et place dans la stratégie diagnostique. Expérience dans le cadre du retard mental**

**Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale tenant lieu de de thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie**

Soutenu le 24 octobre 2005

Par **Mylène BERI-DEXHEIMER**

**RESUME :**

L'hybridation génomique comparative en microréseau ou puce à ADN est une technique de cytogénétique moléculaire apparue à la fin des années quatre vingt dix. Elle constitue une évolution considérable dans l'exploration du génome humain et de ses anomalies : elle offre la possibilité d'étudier rapidement la totalité du matériel chromosomique humain avec une résolution importante. Les évolutions techniques qu'elle connaît ainsi que l'élargissement de ses domaines d'application aussi bien en génétique constitutionnelle que dans les pathologies cancéreuses conduisent à une large diffusion de cette technique. L'expérience du laboratoire de génétique de Nancy concerne essentiellement son utilisation dans le cadre du diagnostic étiologique de retard mental. Elle complète les techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype et hybridation *in situ* en fluorescence) lorsque celles-ci ont atteint leurs limites. Une cause chromosomique a ainsi été retrouvée chez huit patients sur soixante patients étudiés, soit 13%, alors que le caryotype et la FISH ne détectaient pas d'anomalie. Cette expérience contribue à mieux définir la place des puces à ADN dans la stratégie diagnostique.

**MOTS CLES :** Cytogénétique, déséquilibre chromosomique, puces à ADN, retard mental.

Directeur de mémoire	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Philippe JONVEAUX	Laboratoire de génétique CHU de Nancy	Expérimentale Thème : biologie