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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE NANCY I- HENRI POINCARE
FACULTE DE MEDECINE

N° attribué par la bibliothèque

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE NANCY I

Discipline : Biologie et Santé
Spécialité Génie biologique et Médical

présentée et soutenue publiquement

par Frédérique SLOAN-BENA

le 29 avril 1998

CARTOGRAPHIE PHYSIQUE PAR HYBRIDATION *in situ* EN FLUORESCENCE : APPLICATION A L'ETUDE DE REMANIEMENTS DU CHROMOSOME X ASSOCIES A DES PATHOLOGIES

Directeur de thèse
Docteur Philippe JONVEAUX

JURY

Professeur Simone GILGENKRANTZ	Présidente
Professeur Jean Louis MANDEL	Rapporteur
Professeur Michel VEKEMANS	Rapporteur
Professeur Pierre LEBLOND	Examinateur
Docteur Philippe JONVEAUX	Examinateur

LISTE DES PUBLICATIONS

1- Sloan-Béna F, Philippe C, LeHeup B, Wuilque F, Levy E, Chéry M, Jonveaux P and Monaco A (**1998**) Characterization of an inverted X-chromosome (p11.2q21.3) associated with mental retardation using FISH. Journal of Medical Genetics 35: 146-150.

2- Sala C, Arrigo G, Torri G, Martinazzi F, Riva P, Larizza L, Philippe C, Jonveaux P, Sloan F, Labella T and Toniolo D (**1997**) Eleven X chromosome breakpoints associated with Premature Ovarian Failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. Genomics 40: 123-131.

3- Philippe C , Arnould C, Sloan F, Bokhoven H, Saskia D, van der Velde-Vissier, Chéry M, Ropers H, Gilgenkrantz S, Cremers P and Monaco A (**1995**) A high resolution interval Map of the q21 region of the human X chromosome. Genomics 27: 539-543.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement l'**Association Française du syndrome de Rett** pour son soutien dans la réalisation de ce travail.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une communication sur panneau lors du Xème colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (septembre 1997- Rennes)

Je remercie Monsieur le Professeur Michel VEKEMANS d'avoir accepté de juger cette thèse. Je lui témoigne mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Louis MANDEL d'avoir accepté de juger cette thèse. Je lui témoigne mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre LEBLOND d'avoir accepté de juger cette thèse. Je lui témoigne, par cette thèse, le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A Madame Simone GILGENKRANTZ,
Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans le laboratoire et d'avoir inspiré ce travail. J'ai pu apprécier au cours de ces années votre enthousiasme et votre rigueur. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur Philippe JONVEAUX,
Je vous remercie d'avoir accepté la direction de ce travail, et d'y avoir apporté vos précieux conseils. Recevez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A Michèle CHERY
Merci pour tes précieux conseils, ta gentillesse et ta bonne humeur !

A Christophe PHILIPPE,
Un grand merci pour tout le soutien, l'aide et la compétence que tu as gentiment apporté à mon travail, au cours de toutes ces années de recherche!

A Frédéric WUILQUE
Merci mille fois pour la rigueur et l'interêt que tu prêtes à ce projet de recherche et pour tous les beaux résultats que tu apportes à ce manuscrit.

A Véronique MARTEL pour ses judicieux conseils, et son dynamisme

A Marie José GREGROIRE pour les nombreuses lectures de ce manuscrit

A Nathalie KOEHLER, Renée DEBARD, Alain LEBRET et tout le personnel du laboratoire pour leur précieuse aide

Je tiens à remercier l'équipe de A. MONACO pour m'avoir chaleureusement accueillie au cours d'un stage dans leur laboratoire.

Je remercie Frantz CREMERS, Hans Van BOHKOVEN, et Hans Hilger ROPERS pour les deux mois de stages que j'ai effectué dans leur laboratoire

Je remercie Pierre LEBLOND pour les précieux conseils qu'il m'a apporté.

A mes parents pour le soutien et les encouragements qu'ils ont su m'apporter

A Patrick

A Vincent et Margaux, pour l'immense joie qu'ils me procurent.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE 18

INTRODUCTION 20

I. Mutations et maladies génétiques 22

1. Le génome humain 22
2. les mutations du génome humain 22

II. La cartographie du génome humain 24

1. La génétique moléculaire à l'ère de l'ADN 24
2. Le clonage positionnel 25
   - 2.1 la carte génétique 27
   - 2.2 La carte physique 28
     - 2.2.1 Les banques d'ADN 28
     - 2.2.2 Hybridation *in situ* en fluorescence 30
       - a. Hybridation moléculaire et complexité du génome 30
       - b. Principe de la FISH 34
       - c. Les résolutions de la FISH 37
       - d. Les applications de la FISH 43
   - 2.3 Les remaniements chromosomiques 45
   - 2.4 La carte transcriptionelle 46
   - 2.5 La carte intégrée 47

3. La stratégie du candidat positionnel 48

III. Le chromosome X humain 48

1. Les anomalies de structure du chromosome X 50
   - 1. 1 Les délétions 50
   - 1. 2 Les duplications 50

1. 3 Les inversions 51
1. 4 Les translocations X;Autosome 51
2. Inactivation du chromosome X 52
3. Inactivation préférentielle chez des patientes présentant un remaniement du chromosome X 55
4. Les gènes qui échappent à l'inactivation du chromosome X 56

IV. Objectif de notre étude 58

RESULTATS-DISCUSSION 60

PREMIERE PARTIE : CARACTERISATION MOLECULAIRE DES POINTS DE CASSURE D'UNE INVERSION DU CHROMOSOME X inv(X)(p11.2q21.3)

I. Présentation du cas étudié 63

1. Présentation clinique et cytogénétique du patient GC 63
2. Les fentes palatines liées à l'X 66
3. Développement testiculaire 67
4. Les retards mentaux liés à l'X 67

II. Localisation moléculaire des points de cassure de l'inversion par FISH 68

1. Localisation des YAC au sein des points de cassure de l'inversion 68
2. Le chimérisme des YAC 69
3. Localisation, par FISH, du point de cassure en Xq21.3 70
4. Localisation, par FISH, du point de cassure en Xp11.2 74
4.1 Isolement, par FISH, d'un YAC chevauchant le point de cassure 74
4.2 Réalisation d'une banque de cosmides à partir des YAC ICRFfO501, ICRFcO874 et ICRFcO191 79
4.3 Recherche, par FISH, d'un cosmide chevauchant le point de cassure 82

4.4 Cartographie, par PCR, de 5 EST au sein du YAC ICRFcO191 84
4.5 Isolement d'ADNc par la technique de sélection d'ADNc au sein du cosmide chevauchant E1 84

III. Discussion **85**

DEUXIEME PARTIE : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA TRANSLOCATION (X;22) OBSERVEE DANS UN CAS DE SYNDROME DE RETT

I. Le syndrome de Rett **90**

1. Présentation clinique du syndrome de Rett 90
2. Aspects génétiques du syndrome de Rett 90

II. Description clinique et cytogénétique de la famille L. **93**

1. Description clinique 93
2. Etude cytogénétique familiale 94

III. Cartographie moléculaire du point de cassure sur le chromosome X chez H.L **95**

1. Isolement, par FISH, du YAC chevauchant 95
2. Confirmation par PCR de la localisation du point de cassure 99
3. Réalisation d'une banque de cosmides à partir du YAC UPyWXD2269 101
4. Isolement d'un cosmide chevauchant le point de cassure 102

IV. Discussion **103**

TROISIEME PARTIE : LOCALISATION DE POINTS DE CASSURE DANS LA REGION Xq21 CHEZ DES PATIENTES PRESENTANT UN DYSFONCTIONNEMENT OVARIEN- LA REGION POF

I. La région "Premature Ovarian Failure" (POF) 107

1. Historique de la région critique 107
2. Implication de la région critique dans le POF 107

II. Présentation des cas étudiés 110

III. Cartographie par FISH des points de cassure 111

1. La patiente WD 112
2. La patiente LG 115
3. La patiente FA 117
4. La patiente BC 120

IV- Discussion 121

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 125

PUBLICATIONS 128

MATERIELS ET METHODES 148

I. Cultures cellulaires 149

1. Entretien de lignées lymphoblastoïdes continues 149
2. Entretien d'hybrides somatiques interspécifiques 149
3. Culture de levures 150
   3.1 Conservation des levures dans le glycérol et congélation 150
   3.2 Milieu de propagation des levures 150
   3.3 Préparation des boîtes de Pétri 150

3.4 Repiquage des clones 150

4. Culture de bactéries et amplification des cosmides 151
4.1 Conservation des colonies dans le glycérol et congélation 151
4.2 Milieu de propagation des bactéries 151
4.3 Préparation des boîtes de Pétri 151
4.4 Repiquage des clones 151

II. Techniques de biologie moléculaire 151

1. Extraction d'ADN génomique total 151
2. Extraction d'ADN de levure 152
2.1 Solutions 152
2.2 Protocole 152
2.3 Estimation de la qualité de l'ADN de levure extrait et mesure de la concentration 153
3. Minipréparation d'ADN de cosmide 153
3.1 Protocole d'extraction d'ADN de cosmide 153
3.2 Evaluation de la qualité de l'ADN de cosmide extrait et mesure de la concentration 154
4. Amplification in vitro de séquences d'ADN par PCR 154
4.1 Protocole d'amplification 154
4.2 Marqueurs de type STS étudiés par PCR 155
4.3 Marqueurs de type EST étudiés par PCR 155
5. Sous-clonage des YAC ICRFcO191, UPyWXD2269, ICRFfO501, ICRFcO874 dans le vecteur sCOGH2 155
5.1 Préparation de l'ADN génomique 155
5.1.1 Digestion partielle par SauIIIA
5.1.2 Déphosphorylation de l'ADN partiellement digéré 156
5.2 Préparation du vecteur de clonage 156
5.2.1 Linéarisation du vecteur sCOGH2 par XbaI 156
5.2.2 Déphosphorylation du vecteur linéarisé par XbaI 157
5.2.3 Digestion du vecteur linéarisé déphosphorylé par BamHI 157
5.3 Etape de ligation de l'ADN 158

5.4 Empaquetage des vecteurs recombinants dans des têtes de phages LcI857 158
5.5 Transfection de la bactérie XL1-Blue-MR par les phages LcI857 158
5.5.1 Préparation de la bactérie hôte 159
5.5.2 Titration de la banque de cosmides non amplifiée 159
5.6 Réalisation des membranes répliques des boîtes de culture 159
5.7 Criblage de la banque avec une sonde ADN humain total 160
5.7.1 Pré-hybridation de la membrane 160
5.7.2 Marquage de la sonde 160
5.7.3 Lavage des membranes 161
5.7.4 Localisation de clones positifs et repiquage 161

III. Techniques cytogénétiques 161

1. Préparation de chromosomes métaphasiques 161
2. Préparation de chromosomes en prométaphase 161

IV. Cytogénétique moléculaire 162

1. Hybridation *in situ* en fluorescence 162
1.1 Préparation des lames 162
1.1.1 Pré-traitement des lames 162
1.1.2 Dénaturation des lames 163
1.2 Préparation de la sonde 163
1.2.1 Marquage de la sonde 163
1.2.2 Dénaturation de la sonde 163
1.3 Hybridation 163
1.4 Lavages de post-hybridation 164
1.5 Détection immunologique 164
1.6 Microscopie 165
2. Les sondes utilisées en FISH 165

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 166

ANNEXES

Liste des publications	2
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations	15
Résumé en anglais	182

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Les étapes du clonage positionnel	26
Figure 2	: Courbe de réassociation des différents types de séquences constituant le génome humain	32
Figure 3	: Etape de pré-hybridation et d'hybridation de la sonde	33
Figure 4	: Principe de l'hybridation *in situ*	34
Figure 5 a	: Détection d'une sonde par une méthode indirecte	36
Figure 5b	: Détection d'une sonde par une méthode directe	36
Figure 6	: Spectre d'émission de fluorescence des différents fluorochromes	37
Figure 7	: La résolution apportée par les différentes préparations en FISH	41
Figure 8	: Pathologies récessives liées à l'X observées chez des femmes porteuses de t(X;A)	52
Figure 9	: Les gènes qui échappent à l'inactivation de l'X	58
Figure 10	: Caryotype partiel en bandes GTG et idiogramme en bandes G de l'inversion inv(X)(p11.2q21.3) de la mère de GC (A) et de GC (B)	64
figure 11	: Profil d'inactivation du chromosome X chez la mère de GC	65
Figure 12(a)	: Hybridation d'une sonde totale du chromosome X sur les chromosomes en prométaphase de GC	65
Figure 12(b)	: Hybridation d'une sonde totale du chromosome X sur les chromosomes en prométaphase de la mère de GC	66
Figure 13	: Localisation par FISH du point de cassure du chromosome X inversé à l'aide de YAC de la région Xq21.3	68
Figure 14	: Localisation par FISH du point de cassure du chromosome X inversé à l'aide de YAC de la région Xp11.2	69
Figure 15	: Le YAC CEPH715H4 est hybridé sur des chromosomes normaux en métaphase : le YAC est chimérique	70
Figure 16	: Carte physique en Xq21.3 de la région CPX	71
figure 17	: Le YAC CEPH75A12 est hybridé sur les chromosomes prométaphasiques de GC : le YAC est proximal par rapport au point de cassure	71
Figure 18	: Carte du point de cassure en Xq21.3 dans la région X-Y homologue	72
Figure 19(a)	: Hybridation du YAC ICI25FD6 sur les chromosomes prométaphasiques de GC : le YAC chevauche le point de cassure	73

Figure 19(b)	: Hybridation du YAC ICI25FD6 sur les chromosomes prométaphasiques de la mère de GC : le YAC chevauche le point de cassure	73
Figure 20	: Carte physique de la région du point de cassure en Xp11.2	75
Figure 21	: Le YAC CEPH967D4 est hybridé sur les chromosomes prométaphasiques de GC : le YAC est proximal par rapport au point de cassure	74
Figure 22	: Carte de la région Xp11.2/ Xp11.3 incluant les deux pseudogènes OATL1 et OATL2	76
figure 23(a)	: Hybridation du YAC ICRFcO191 sur les chromosomes prométaphasiques de GC	78
figure 23(b)	: Hybridation du YAC ICRFcO191 sur les chromosomes prométaphasiques de la mère de GC	78
figure 24	: Contrôle de digestion partielle de l'ADN total levure et YAC par SauIIIA selon un temps de digestion croissant en seconde	79
figure 25	: Test de déphosphorylation des extrémités du vecteur	81
figure 26	: Migration de quatre clones de cosmides issus de la banque ICRFcO191 digérés par une enzyme de restriction EcoRI	82
figure 27	: Localisation du cosmide E1 chevauchant le point de cassure en Xp11.2 chez GC	83
Figure 28	: Arbre généalogique de la famille L.	94
Figure 29	: Caryotype partiel et idiogramme de la translocation en bandes RBG	95
Figure 30	: Carte physique de la région du point de cassure en Xp11.2	96
Figure 31	: Le YAC ICRFcO191 est hybridé sur les chromosomes prométaphasiques de H.L : il s'hybride sur l'X normal et le der(22): il est distal	97
Figure 32	: Le YAC CEPH649F6 est hybridé sur les chromosomes prométaphasiques de H.L : il s'hybride sur l'X normal et le der(X): il est proximal	97
Figure 33	: Le YAC UPyWXD2269 est hybridé sur les chromosomes métaphasiques de H.L : le YAC chevauche le point de cassure	99
Figure 34	: Hybridation d'une sonde totale de l'X sur les métaphases de l'hybride somatique interspécifique de H.L	100

Figure 35	: Hybridation du cosmide sur les chromosomes métaphasiques de H.L : le cosmide chevauche le point de cassure	102
Figure 36	: t(X;A) et dysfonctionnement ovarien	108
Figure 37	: Caryotypes partiels en bandes GTG chez les quatre patientes	111
Figure 38	: Localisation moléculaire des points de cassure sur l'X	112
Figure 39	: Idiogramme en bandes GTG de la t(X;2)(q21.3;p25)	112
Figure 40	: Carte physique de la région Xq21.31 entre les marqueurs DXS1002 et DXYS42	113
Figure 41	: Hybridation du YAC CEPH926D12 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente WD : le YAC chevauche le point de cassure	115
Figure 42	: Idiogramme en bandes GTG de la t(X;9)(q21.3;q33)	115
Figure 43	: Hybridation du YAC CEPH680D4 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente LG : le YAC est proximal au point de cassure	116
figure 44	: Hybridation du YAC CEPH31HF3 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente LG : le YAC est distal au point de cassure	117
figure 45	: Idiogramme en bandes GTG de la t(X;15)(q21.3;q26)	117
figure 46	: Carte physique de la région Xq21.31 entre les marqueurs DXS1203 et DXS454	118
figure 47	: Hybridation du YAC CEPH748C4 sur les chromosomes métaphasiques de la patiente FA : le YAC chevauche le point de cassure	119
Figure 48	: Idiogramme en bandes GTG de la t(X;12)(q21.3;p13)	121
Figure 49	: Hybridation du YAC CEPH2C11 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente BC : le YAC chevauche le point de cassure	122

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Comparaison des résolutions accessibles en FISH	39
Tableau II	: Cartographie *in situ* à haute résolution	42
Tableau III	: Les applications de la technique de FISH	45
Tableau IV	: Les EST analysés dans la région Xp11.2	84
Tableau V	: Critères diagnostiques internationaux du syndrome de Rett	91
Tableau VI	: Cartographie par PCR du point de cassure chez H.L	101
Tableau VII	: Données cytogénétiques et cliniques des quatre patientes	110
Tableau VIII	: Cartographie des points de cassure sur l'X chez les quatre patientes	122

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
BAC	: chromosome artificiel de bactérie
dNTP	: désoxyribonucléotide triphosphate
der(A)	: derivé d'un autosome sur lequel un fragment d'un autre chromosome a été transloqué (présence du centromère de l'autosome)
der(X)	: dérivé d'un chromosome X sur lequel un fragment d'un autre chromosome a été transloqué (présence du centromère du chromosome X)
BrdU	: 5-bromodésoxyuridine
CEPH	: Centre d'étude du polymorphisme humain
Ci	: Curie
CISS	: Hybridation *in situ* suppressive
CF	: Fibrose Kystique
cM	: centimorgan
Cot	: valeur qui correspond au produit de la concentration en ADN initiale (Co) par le temps d'incubation (t)
CPX	: région en Xq21.3 candidate à l'origine de la fente palatine liée à l'X
DMSO	: diméthyl-sulfoxyde
EDTA	: éthylènediaminetétraacétate
EMBL	: European Molecular Biology Library
EST	: site pour une séquence exprimée amplifiable par PCR
FISH	: hybridation*in situ* en fluorescence
FL	: Fente labiale
FP	: Fente palatine
GDB	: Genome Data Base
GTG	: bandes G, Trypsine, coloration par le giemsa
HAT	: Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine
HIS	: Hybridation *in situ*
HSI	: Hybride Somatique Interspécifique
ICRF	: Imperial Cancer Research Fund
kb	: kilobase
Mb	: mégabase

MIM	: hérédité des maladies mendéliennes chez l'homme
NCBI	: National Center for Biotechnology Informations
PAC	: Chromosome Artificiel de bactériophage P1
PAR	: Région pseudoautosomique
pb	: paire de base
PCR	: réaction d'amplification en chaîne
POF	: région candidate responsable de la fonction gonadique normale en (Xq13-q26)
RBG	: bandes R, BrdU, coloration par le Giemsa
RFLP	: Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RM	: Retard Mental
RMLX	: Retard Mental lié à l'X
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
SLR	: Solution de Lyse des globules rouges
SSC	: Standard Saline Citrate
STS	: Séquence génomique amplifiable par PCR
STS	: Stéroide Sulfatase
SVF	: Sérum de Veau Foetal
TAE	: Tampon Tris-Acétate EDTA
TE	: Tampon Tris-EDTA
TBE	: Tampon Tris-Borate EDTA
t(X;A)	: Translocation réciproque entre le chromosome X et un autosome
UP	: University of Pennsylvania
UTR	: Régions en 3' et 5' du gène non traduites
VNTR	: Variation du nombre de répetition en tandem
Xce	: Element de contrôle de l'inactivation chez la souris
Xcen	: Centromère du chromosome X
Xtel	: Télomère du chromosome X
XIC	: Région dont l'intégrité est nécessaire à l'inactivation
XIST	: gène impliqué dans le mécanisme d'inactivation du chromosome X
Xpter	: Extrémités des bras courts du chromosome X
Xqter	: Extrémités des bras longs du chromosome X
YAC	: Chromosome artificiel de levure
W U	: Washington University

PREAMBULE

L'établissement de la carte du génome humain consiste à positionner et ordonner sur le génome, le plus grand nombre de gènes et de séquences d'ADN anonymes. La carte du génome humain facilite ainsi, l'identification de nouveaux gènes responsables de maladies génétiques. Deux approches cartographiques permettent de progresser dans cette réalisation. La **cartographie génétique** est basée sur des analyses de liaison, au sein de familles atteintes de pathologie. Elle aboutit à l'établissement de liaison entre marqueurs polymorphes et un locus morbide. Cette approche indirecte, définit un intervalle en centimorgan. Une autre démarche complémentaire, la **cartographie physique**, mesurée en kilobases, repose sur des méthodes directes de localisation, en se référant à la molécule d'ADN. Ces méthodes font appel à de nombreuses techniques offrant des pouvoirs de résolution variables. Elles permettent d'appréhender des distances allant de la centaine de mégabases (un chromosome) jusqu'à la paire de bases, résolution ultime offerte par le séquençage.

Les études de cartographie physique bénéficient d'outils précieux, tels que des remaniements chromosomiques lorsqu'ils sont associés à une maladie candidate de transmission mendélienne. Ils permettent de cerner rapidement la région responsable du phénotype. Les régions interrompues par le réarrangement définissent des intervalles, susceptibles de contenir un gène responsable de la pathologie.

Notre travail est basé sur la localisation de points de cassure impliqués dans de tels remaniements chromosomiques, associés chez des patients à un phénotype pathologique. Notre approche est basée sur la technique d'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) afin de localiser les différents points de cassure chromosomiques impliqués dans des remaniements. A cette fin, nous avons utilisé un ensemble de sondes ordonnées, chevauchantes proposé par la carte du génome humain. Les différents points de cassure impliqués sont localisés au sein de certaines sondes.

L'ensemble des remaniements étudiés au cours de cette thèse, implique le chromosome X humain et plus précisément les régions Xp11 et Xq21. Au cours de ce manuscrit, nous développerons en trois parties, l'étude de six réarrangements associés à un phénotype particulier.

INTRODUCTION

<< La vie est inscrite dans les acides nucléiques, et c'est l'instabilité des acides nucléiques qui rend compte de la diversité de la vie. L'eau de mer est fondamentalement partout la même. La surface de la mer est, pourtant, étonnamment changeante du fait des vagues et de l'écume, de même les acides nucléiques sont fondamentalement toujours les mêmes et pourtant changeants, du fait des mutations et des remaniements du génome >>.
(Jean de Grouchy, 1992).

I. MUTATIONS ET MALADIES GÉNÉTIQUES

1. Le génome humain

Le génome humain est l'ensemble de l'information génétique responsable, en interaction avec l'environnement, du développement d'un être humain. L'information génétique est transmise, de génération en génération, par les cellules haploïdes de la lignée germinale, qui comportent $3x10^9$ pb réparties sur 22 autosomes et un chromosome sexuel (X ou Y).
La portion codante du génome humain représente moins de 10% de l'ensemble, et correspond à un nombre de gènes compris entre 50 000 et 100 000.
Un gène est composé de séquences d'acides nucléiques contenant l'information pour la production régulée d'un ARN (ARNr, ou ARNt) (transcription), ou d'une chaîne polypeptidique particulière (transcription-traduction). Certains gènes sont à expression ubiquitaire (gènes dits domestiques) alors que d'autres ne s'expriment que dans certains tissus et/ou à certains stades du développement; à titre d'exemple, la protéine MyoD1 (Myoblast determination number 1) qui est à l'origine de la différenciation de cellules en myoblastes, est retrouvée dans les myoblastes, les myotubes et les muscles squelettiques, mais est absente dans les muscles lisses, le coeur, et dans les tissus non musculaires.

2. les mutations du génome humain

L'information génétique, contenue dans toutes les cellules, peut subir des modifications ou mutations qui sont susceptibles de se produire spontanément, ou d'être induites par divers agents physiques ou chimiques. De tels événements peuvent toucher aussi bien les cellules somatiques que les cellules de la lignée germinale. Dans le premier cas, la mutation se perpétue dans le clone cellulaire dérivé de la cellule modifiée, et ne présente donc pas un caractère héréditaire. Lorsque la mutation touche la lignée germinale, celle-ci peut être transmise à la descendance et être à l'origine d'une maladie héréditaire. Le rétinoblastome est une tumeur maligne se développant, à partir d'un rétinoblaste, à la suite de deux événements mutationels au sein des deux locus du gène suppresseur de tumeur RB1. Dans les formes familiales, le premier événement de mutation est transmis par la lignée germinale. Le deuxième événement se produit, le plus souvent, par une mutation structurale du gène dans les cellules somatiques

de l'individu, dont les rétinoblastes à l'origine de la tumeur (Cavenee et al., 1983).

Les modifications que peut subir le génome humain, se manifestent par des anomalies chromosomiques ou géniques. Ces anomalies peuvent entraîner une variété de phénotypes, dont la sémiologie génétique définit certaines entités syndromiques spécifiques d'une anomalie chromosomique ou d'une maladie monogénique.

Les altérations chromosomiques se traduisent par des anomalies de nombre (monosomie, trisomie...) ou de structure. Les remaniements de structure affectent un chromosome (délétion, duplication, inversion), ou plusieurs chromosomes (translocation et insertion). Les syndromes microdélétionnels conduisent à une pathologie des gènes contigus. Ce type de pathologie est caractérisé par un phénotype complexe, qui est la somme de plusieurs maladies monogéniques se développant à la suite d'une microdélétion qui emporte plusieurs gènes : le syndrome WAGR, par exemple, est un syndrome associant une tumeur de Wilms, une Aniridie, des anomalies Génitales, un Retard mental : la microdélétion survient dans la région 11p13 et entraîne tout ou partie des gènes *WT1* et *PAX6* (Mannens et al., 1991) (Narahara et al., 1984) (Roseri et al., 1994).

Les microlésions de l'ADN, les plus fréquemment observées, sont les mutations ponctuelles qui se traduisent par une substitution d'un nucléotide, une insertion ou une délétion d'un ou plusieurs nucléotides. Une mutation ponctuelle peut se produire à différents niveaux dans un gène (exons, sites d'épissage, promoteur,....), et, ainsi, entraîner des modifications quantitative ou qualitative de la protéine correspondante.

Une maladie monogénique est produite par une lésion dans un seul et unique gène, la lésion pouvant être soit monoallélique (drépanocytose) soit polyallélique (β-thalassémie). Son mode de transmission peut être autosomique ou lié au chromosome X, dominant ou récessif. Par opposition, les maladies polygéniques résultent d'anomalies ségrégant simultanément sur plusieurs gènes et concourent au déterminisme pathologique (diabète). Les maladies multifactorielles sont doublées d'une influence de l'environnement.

II. LA CARTOGRAPHIE DU GENOME HUMAIN

1. La génétique moléculaire et l'ère de l'ADN

La mise en évidence de l'ADN comme support de l'hérédité par Avery et McLeod en 1944, puis la découverte de sa structure par Watson et Crick en 1953, ont marqué le début de l'ère de la génétique moléculaire. Néanmoins, la réelle expansion de cette discipline débute dans les années 70 avec les techniques de l'ADN recombinant. Ces techniques permettent d'intégrer des fragments d'ADN dans des vecteurs. Les vecteurs recombinants autorisent l'isolement et la production en grande quantité d'un segment d'ADN pur de quelques kilobases (kb), issu d'un génome complexe. L'isolement de tels segments d'ADN permet leur caractérisation à l'aide de plusieurs outils moléculaires. Parmi eux, les enzymes de restriction ou endonucléases bactériennes clivent spécifiquement les deux brins de l'ADN au niveau d'une séquence, en général palindromique, parfaitement définie. Elles permettent de réduire, de manière reproductible, un génome entier d'une espèce donnée en une série de fragments de taille caractéristique.
En 1975, Southern a développé une technique permettant de visualiser directement un gène donné au sein d'un génome complexe (Southern, 1975). Cette technique fut d'abord appliquée aux gènes de l'hémoglobine (premiers gènes humains clonés en 1977). Le perfectionnement des méthodes et outils du génie génétique vont progressivement donner les moyens d'explorer le génome humain. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique qui, en 1985, révolutionna le monde de la biologie moléculaire. Elle permet l'amplification *in vitro* de façon élective d'un fragment d'ADN, par extension itérative de deux amorces situées de part et d'autre de la région considérée, par l'action d'une ADN polymérase (Saïki et al, 1985).
Ces progrès technologiques furent rythmés par le clonage de plus en plus nombreux de gènes humains à l'origine de maladies héréditaires.

Pendant longtemps, le clonage d'un gène se faisait obligatoirement par l'identification préalable et la caractérisation de son produit, la protéine. A titre d'exemple, la protéine de la stéroïde sulfatase, enzyme du microsome qui catalyse l'hydrolyse des différents sulfates, fut mise en évidence avant d'isoler le gène dont elle était issue. Le criblage d'une banque d'ADNc clonés dans un vecteur d'expression à l'aide d'anticorps spécifiques de la

stéroïde sulfatase permit l'isolement d'un gène localisé en Xp22.3 responsable de l'ichthyose liée à l'X (Bonifas et al.,1987).
Cette démarche de **clonage fonctionnel** dite "classique" a été supplantée par une autre démarche, en raison du manque total d'information sur les protéines impliquées dans la plupart des maladies génétiques répertoriées.
Cette nouvelle stratégie fut appelée initialement génétique "inverse", par opposition à l'approche "classique". En effet, elle permet l'identification d'un gène à l'origine d'une pathologie génétique en l'absence de toute information sur la protéine qui en est issue. Par ailleurs, selon Collins, le terme génétique inverse devrait être réservé aux manipulations génétiques telles que la mutagenèse dirigée qui permettent d'analyser les modifications de la protéine par l'action d'une mutagenèse dirigée sur le gène correspondant (Collins et al., 1992). Le terme de **clonage positionnel** est maintenant utilisé pour décrire ce type d'approche.

2. Le clonage positionnel

Le clonage positionnel se développe vers le milieu des années 80, et le nombre de gènes responsables de pathologies, découverts par cette méthode, n'a cessé d'augmenter depuis. Le premier succès du clonage positionnel revient à l'équipe de Stuart-Orkin qui, en 1986, isola le gène de la granulomatose chronique localisé en Xp21.1. (Royer-Pokora et al., 1986). De la même façon, le gène de la mucoviscidose (CF) en 7q31, maladie autosomique récessive sévère fréquente chez les caucasiens, fut cloné en 1989 (Rommens et al., 1989).
La stratégie du clonage positionnel consiste, en première intention, à mettre en évidence une liaison génétique entre le locus d'une maladie donnée et des marqueurs génétiques dont la localisation chromosomique est connue (cartographie génétique). En parallèle, la localisation d'un locus morbide peut également être approchée par l'identification occasionnelle de remaniements chromosomiques (délétion, translocation..) chez des patients porteurs de la maladie. La localisation de la région d'intérêt est obtenue par l'isolement de clones d'ADN génomiques issus de banques ordonnées de cosmides ou de chromosomes artificiels de levure (YAC) couvrant tout ou partie du génome. La recherche de gènes est alors effectuée sur l'ensemble des clones chevauchants, afin d'isoler une ou plusieurs séquences codantes, de tester le ou les gènes candidats disponibles dans la région, puis de rechercher des mutations de ces gènes dans des familles où ségrège la maladie (figure 1).

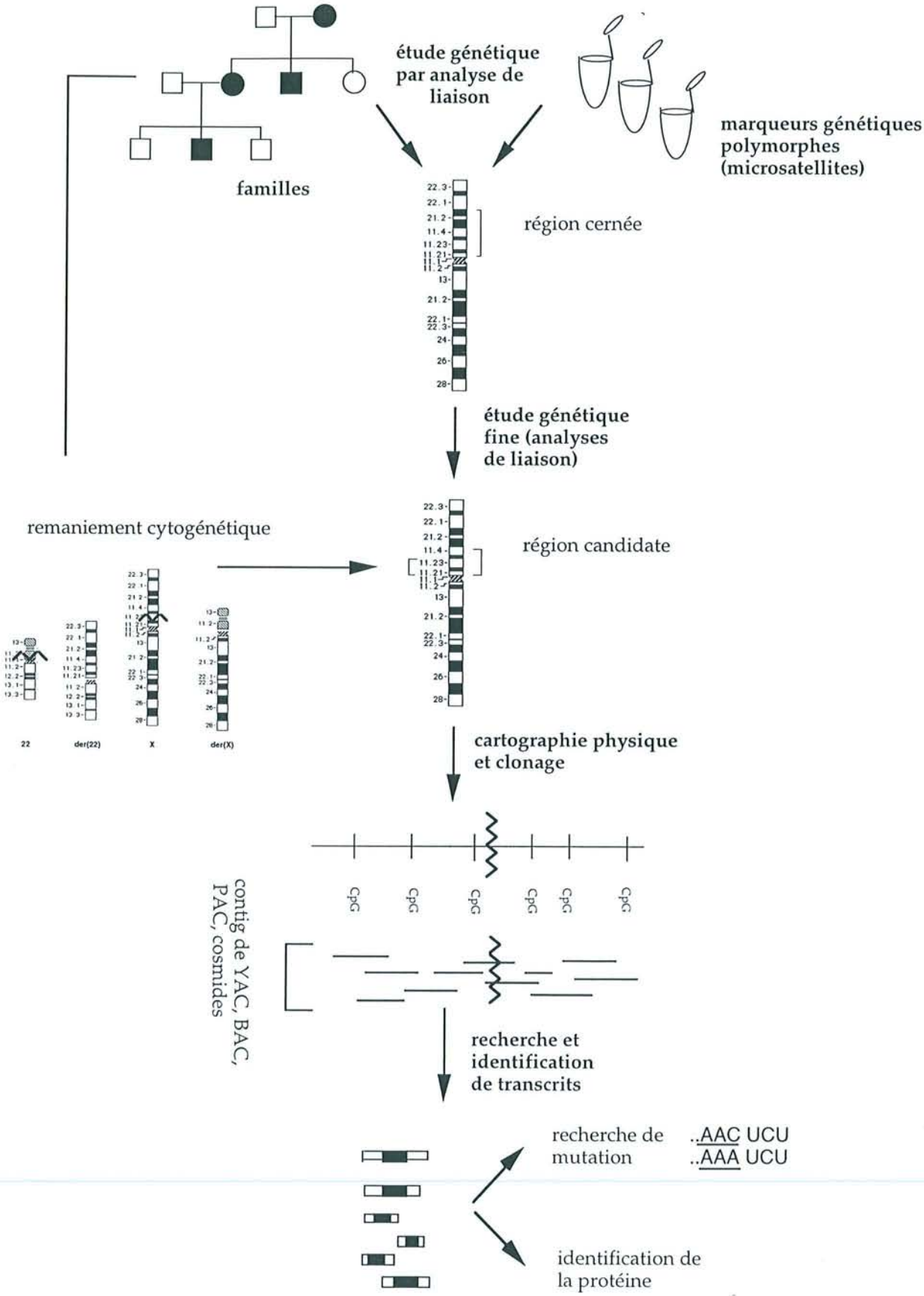


figure 1 : *les étapes du clonage positionnel*

Cette démarche permet ainsi, de circonscrire la région définie pour laquelle doit être recherché le gène candidat. Un ensemble de séquences codantes pour lesquelles aucune pathologie n'est attribuée est positionné sur le génome humain, permettant de retenir un gène candidat lorsque celui-ci appartient à l'intervalle d'étude.

2.1 La carte génétique

Elle est basée sur l'analyse de liaison, qui positionne des marqueurs polymorphes entre eux et par rapport à un locus morbide, en se fondant sur la fréquence des événements de recombinaison. Les recombinaisons sont des événements strictement aléatoires, qui obéissent néanmoins à une loi statistique : la probabilité de recombinaison entre deux locus est proportionnelle à la distance physique qui les sépare. Il faut procéder à une analyse familiale au cours de laquelle, on examine la ségrégation des marqueurs génétiques avec le locus morbide. Cette étude est une approche indirecte, pour laquelle on fait correspondre une fréquence de recombinaison méiotique à une distance physique (longueur d'ADN). L'unité de mesure de la cartographie génétique est le centimorgan (cM) qui équivaut à une recombinaison toutes les 100 méioses et correspond en moyenne à une distance physique de 10^6 paires de base (pb).
Un marqueur génétique est une séquence d'ADN polymorphe, qui présente des variations alléliques permettant de différencier à un locus donné les deux chromosomes homologues. On distingue deux types de polymorphismes :

- les polymorphismes de restriction (RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*) qui sont le résultat de variations ponctuelles touchant un site de restriction. Ce type de polymorphisme est étudié par Southern blot.
- les polymorphismes de répétition se traduisent, eux, par des différences dans le nombre de copies de courtes séquences répétées en tandem. Les minisatellites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) ont un motif répété de 11 à 16 nucléotides, alors que les microsatellites ont un motif répété plus court de l'ordre de 1 à 4 nucléotides. Les microsatellites de type (CA) sont les plus fréquents. L'établissement de la carte génétique est principalement réalisée à l'aide de ces marqueurs.

2.2 La carte physique

La cartographie physique est une approche directe localisant une séquence d'ADN clonée, au sein du génome. La localisation physique de cette sonde est réalisée dans un premier temps de façon globale sur un chromosome donné, puis est affinée au cours de l'analyse. L'unité de mesure de la cartographie physique est très variable en fonction des techniques utilisées (de la mégabase (Mb) à la paire de base (pb)). La résolution ultime est obtenue par le séquencage.

2.2.1 Les banques d'ADN

Afin de procéder à la localisation précise des remaniements chromosomiques, un ensemble de sondes est à notre disposition dans les banques d'ADN. Ces banques peuvent être construites à partir d'ADN génomique ou complémentaire. Elles sont réalisées à l'aide de systèmes vecteur/hôte, choisis précisément en fonction de la taille des séquences d'acides nucléiques à insérer.

Les banques d'ADN génomiques sont des sources de sondes d'ADN, chacune localisée précisément sur le génome. Les sondes ont été cartographiées par l'ensemble des méthodes dont dispose la cartographie physique. Certaines sondes sont caractérisées par un ou plusieurs couples d'amorces jouant le rôle de balises cartographiques de l'ADN génomique (STS : *Sequence Tagged Site*) (Berry et al., 1995).

Compte-tenu de la taille du génome des mammifères, les fragments d'ADN génomique clonés doivent être le plus long possible. Depuis les années 80, les méthodes dites "mégabase" ont facilité la construction de cartes physiques précises avec le clonage dans des vecteurs de type YAC (Burke, et al., 1987) et l'électrophorèse en champ pulsé (Carle et al., 1984). Ces deux méthodes sont étroitement liées, elles permettent la manipulation de grands fragments d'ADN (Banque mégaYAC du Centre d'étude du Polymorphisme Humain)(Cohen et al., 1993). A ce jour, 95% du génome humain sont clonés en contigs de YAC (Schuler et al., 1996). Différents types de banques sont actuellement disponibles, et sont utilisées en fonction de l'application envisagée. Le génome humain est partiellement recouvert par des contigs de YAC, dont l'utilisation est fréquente en cartographie physique (Chumakov et al., 1995). Afin de réduire la taille des segments à manipuler, le YAC peut être sous-cloné dans une banque de cosmides. Certaines régions du génome sont représentées par des contigs de PAC (P1 bacteriophage

Artifical Chromosome) (Ioannou et al., 1994) et de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) (Shizuya et al., 1992) vecteurs utilisés pour le clonage de fragments de 150 à 300 kb. Ces deux vecteurs de clonage (PAC et BAC) ont été développés pour pallier les inconvénients liés à la manipulation des YAC. Ces vecteurs ne présentent, en effet, pas de chimérisme et sont facilement isolables du génome de leur hôte.

Les banques d'ADNc (ADN complémentaires) sont spécifiques du tissu dont elles dérivent, puisqu'une cellule donnée possède les ARN messagers qui permettent son fonctionnement. Les ADNc sont, en effet, obtenus par une transcription inverse de l'ensemble des ARNm isolés d'un tissus donné. Ces banques fournissent des informations précieuses sur les séquences exprimées, caractéristiques d'un tissu et d'un stade de développement. Les ADNc clonés dans cette banque sont séquencés puis cartographiés. La séquence partielle de chaque clone d'ADNc correspond à un morceau de gène, et joue le rôle de balise amplifiable *in vitro* par PCR, ces balises ont le sigle EST (*Expressed Sequence Tagged*) par analogie avec les STS. A ce jour, 1 200 000 EST générés au sein de différentes espèces à partir de nombreux tissus représentent un outil biologique précieux pour le clonage de gènes. Les séquences humaines et murines représentent la majorité des EST avec respectivement 883 000 et 237 000 données (Banfi et al., 1998). En 1996, la collection d'EST représentait 50 à 70% des gènes cartographiés. Il est possible d'envisager, sur l'ensemble de ces séquences développé, qu'un même gène puisse être représenté par de multiples EST. A ce propos, le gène de l'albumine sérique est représenté par 1300 EST (Schuler et al., 1996) . Plusieurs projets internationaux de cartographie des EST sont en place, afin de localiser plus de 50 000 EST, avec une résolution de 0,5 Mb. Cette cartographie est réalisée en utilisant des panels d'hybrides irradiés couvrants le génome humain. Les hybrides irradiés sont des cellules somatiques humain/rongeur, dont le complément chromosomique humain (généralement un seul chromosome) a été réduit à quelques fragments par irradiations aux rayons X, qui ségrègent ensuite dans des hybrides somatiques secondaires (Cox et al., 1990). Les EST sont assignés sur une collection de YAC ordonnés sur le génome humain (Collins et al., 1995).

2.2.2 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

a. Hybridation moléculaire et complexité du génome

L'hybridation *in situ* repose sur la complémentarité de séquences existant entre les deux brins de la molécule d'ADN. Cette complémentarité assure, au cours de l'hybridation moléculaire, la formation très spécifique de duplex stables grâce aux liaisons hydrogène entre les paires de bases.
Ainsi, une séquence d'acides nucléiques ou "sonde" sera capable, dans des conditions d'environnement précises, de reconnaître spécifiquement sa séquence complémentaire et de s'y apparier.

* Les sondes d'acides nucléiques

La technique d'hybridation *in situ* permet de localiser des sondes sur des chromosomes ou des noyaux interphasiques. La spécificité et la taille des sondes sont très variables.
La spécificité d'une sonde est définie par le type de séquence pour laquelle elle présente une affinité. Les sondes peuvent être spécifiques de différentes régions du génome. Les sondes utilisées en HIS ont une taille allant de quelques kb à 2 Mb. Les sondes de petite taille correspondent à des séquences clonées dans des vecteurs de type plasmide ou à des produits de PCR. Les grands fragments d'ADN sont insérés dans des vecteurs de type cosmide, BAC, PAC ou YAC et reconnaissent des régions de 30 kb pour les plus grands cosmides, jusqu'à 2 Mb pour les plus grands YAC. La région reconnue par une sonde peut varier de quelques kilobases jusqu'à plusieurs centaines de mégabases (par un ensemble de sondes), c'est-à-dire d'un fragment de gène à un chromosome entier.
Les sondes sont, à l'image du génome humain, composées de différents types de séquences.
La complexité du génome humain fait apparaître **trois types de séquences** :

- les séquences hautement répétées non codantes représentent 10 à 15% du génome. Elles sont constituées de séquences relativement courtes, de 5 et 200 pb, répétées en tandem. Les sondes centromériques sont constituées de telles séquences.
- les séquences moyennement répétées représentent 25 à 40% du génome humain, elles sont plus hétérogènes que les précédentes. Elles sont constituées de motifs plus longs (de 100 à 1000 pb) qui sont dispersés au sein du génome. Certaines de ces séquences correspondent à des gènes répétés plusieurs milliers de fois : les gènes des ARNr, ARNt, ARN 5 S et ARN 7 S.

- les séquences uniques (ou en faible nombre) correspondent aux gènes dont la plupart codent pour des protéines.

Le plus souvent, les sondes de grande taille présentent de nombreuses séquences moyennement et hautement répétées, alors que celles de petite taille sont plus spécifiques d'un locus.

*** Hybridation *in situ* suppressive**

Les trois types de séquences qui constituent le génome humain possèdent une cinétique de réassociation variable. Au cours de l'hybridation, une séquence hautement répétée se réassocie plus rapidement qu'une séquence moyennement répétée. Cette vitesse de réassociation est proportionnelle au nombre de copies, ainsi qu'à la taille du motif répété.

Lors d'expériences de réassociation, les séquences uniques s'apparient en dernier, pour une valeur de Cot plus élevée (figure 2).

Le Cot est défini par une valeur, qui correspond au produit de la concentration d'ADN initiale (Co) par le temps d'incubation (t) .

Afin de permettre l'hybridation spécifique des séquences uniques de la sonde, , il est nécessaire, par une **étape de pré-hybridation,** de supprimer la réassociation rapide des séquences répétées. Pour saturer les séquences répétées de la sonde, un ADN compétiteur humain est ajouté en très large excès. On parle alors d'une **hybridation *in situ* suppressive** (CISS : *Chromosomal In Situ Suppression*). L'ADN génomique total humain compétiteur est pré-hybridé avec la sonde dans des conditions précises.

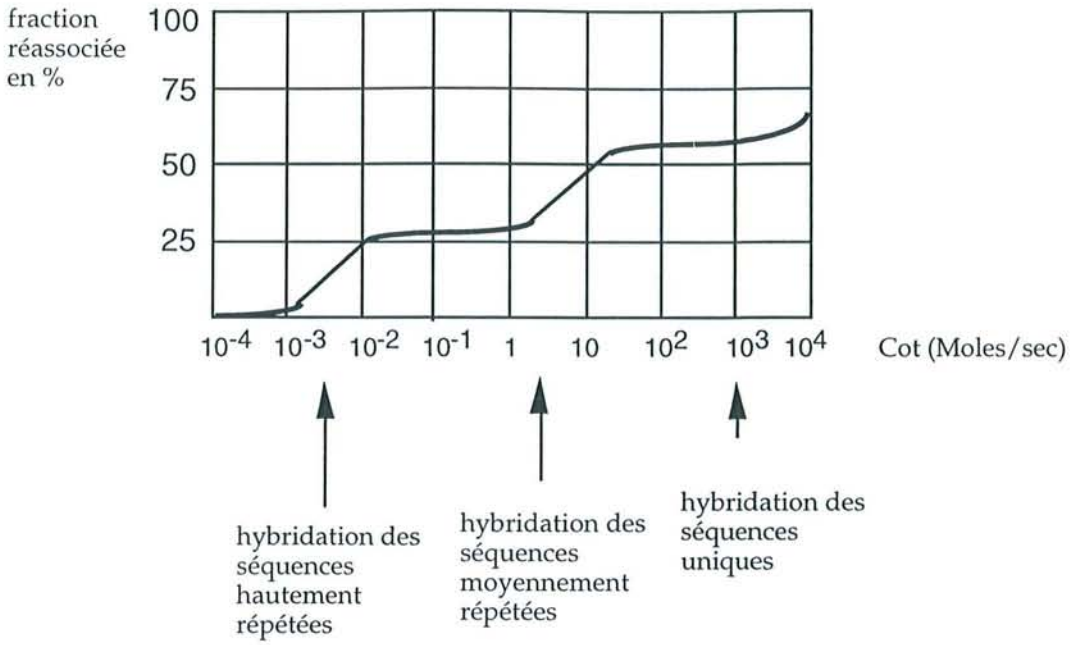


figure 2 : *courbe de réassociation des différents types de séquences constituant le génome humain.*

Au cours de l'étape suivante d'**hybridation**, les séquences uniques de la sonde, les seules accessibles, vont pouvoir s'apparier de manière spécifique à leur séquence complémentaire sur le chromosome (figure 3) (Lichter et al., 1988) .

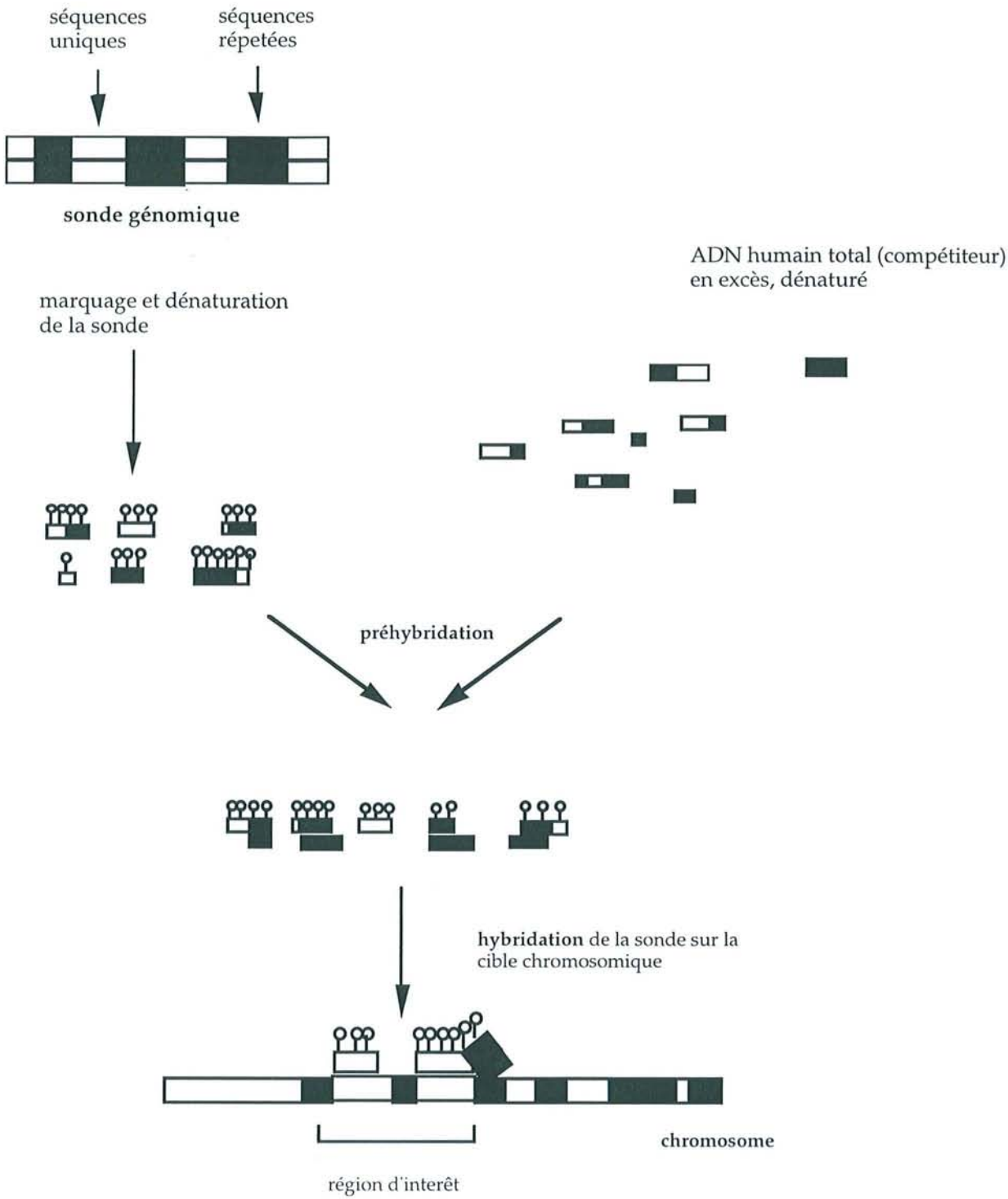


figure 3 : *étape de préhybridation et d'hybridation de la sonde*

b. Principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Basés sur le travail de Gall et Pardue en 1969, les protocoles d'hybridation *in situ* furent mis au point dans les années 1970 (Gall et al., 1969). La technique comporte trois étapes principales (figure 4) :

- une dénaturation de la sonde d'ADN ainsi que de la cible chromosomique,
- une hybridation de la sonde, dans des conditions d'environnement précises,
- d'une étape de détection de la sonde.

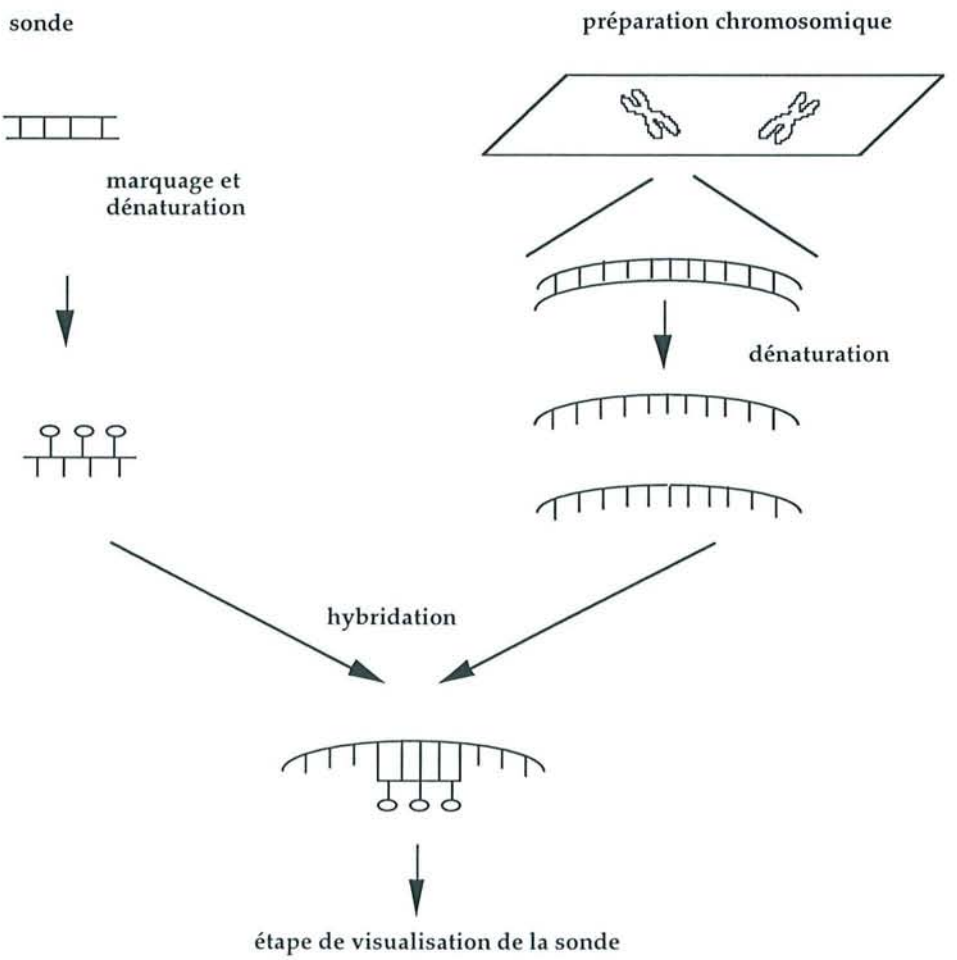


figure 4 : *principe de l'hybridation in situ.*

*** Marquage et détection des sondes**

Initialement, les sondes d'acides nucléiques étaient marquées par un isotope radioactif (^{3}H) et détectées par autoradiographie.

Cependant, la préparation de la sonde et le marquage de celle-ci restaient des étapes difficiles du fait de l'utilisation d'isotopes radioactifs. De plus, la détection se faisait après un temps d'exposition très long et l'interprétation des résultats nécessitait un comptage statistique.

L'hybridation *in situ* dite "chaude" a été remplacée dans les années 80 par une méthode non isotopique, qualifiée par opposition de "froide". L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) repose sur l'incorporation dans la sonde, pendant le marquage, de désoxyribonucléotides (dNTP) modifiés permettant une détection fluorescente de cette sonde. Plusieurs fluorochromes sont disponibles, rendant possible l'hybridation simultanée de différentes sondes.

Deux marquages sont couramment utilisés, ils font intervenir deux types de molécule : la biotine et la digoxygénine. Dans les deux cas, chacune des molécules sert d'haptène au cours d'une réaction immunochimique, avec utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes révélant la présence de la sonde. Ce système offre, en outre, la possibilité d'amplifier le signal. La détection est dite indirecte (figure 5a), très sensible, elle visualise des séquences de 1 à 5 kb. (Pinkel et al., 1986).

Au cours de la détection, les conditions sont optimisées pour réduire l'hybridation aspécifique des anticorps sur la lame entraînant parfois un bruit de fond et donc une interprétation délicate.

Pour pallier ce phénomène, il est possible, au cours du marquage, d'incorporer directement des nucléotides modifiés par des fluorochromes dans la sonde (Wiegant et al., 1991)(Wiegant et al., 1993). Une visualisation directe de la sonde sans détection immunochimique est alors possible. Le système ne présente donc aucun bruit de fond lié à l'utilisation d'anticorps.

Cependant, ce procédé est limité par une perte de sensibilité. La fluorescence est indétectable en deçà d'un certain seuil. Ceci limite à 50-100 kb, la taille minimale de la sonde visualisable par ce procédé direct. L'amplification du signal peut être envisagée mais conduit au problème de bruit de fond lié à l'utilisation des anticorps (figure 5b).

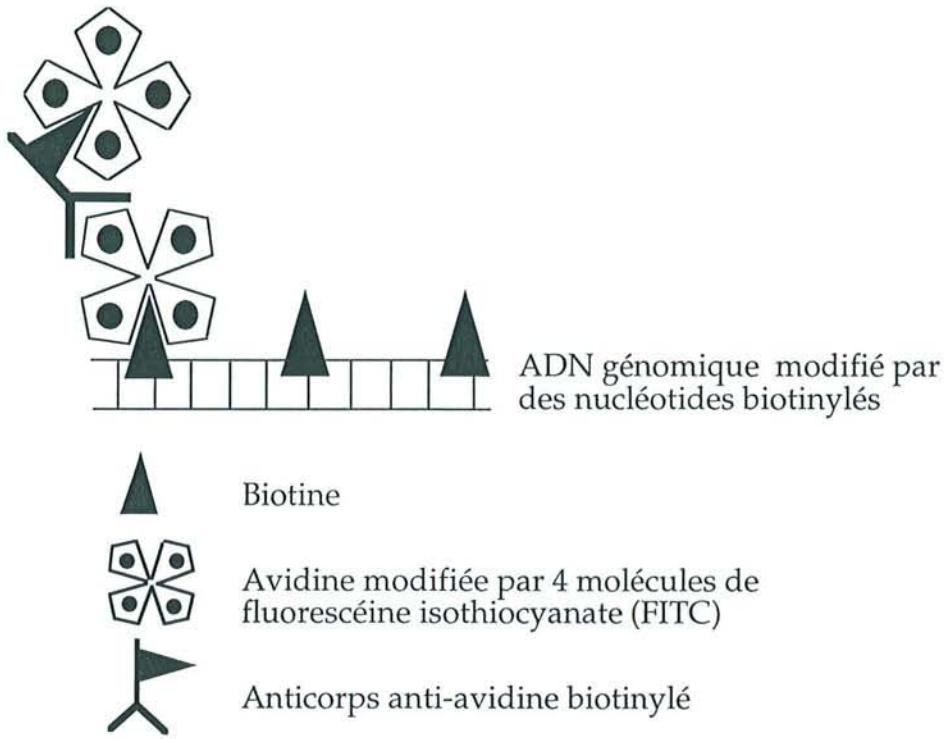


figure a : *détection d'une sonde par une* ***méthode indirecte*** *:*
le système biotine-avidine couplé au fluorochrome FITC

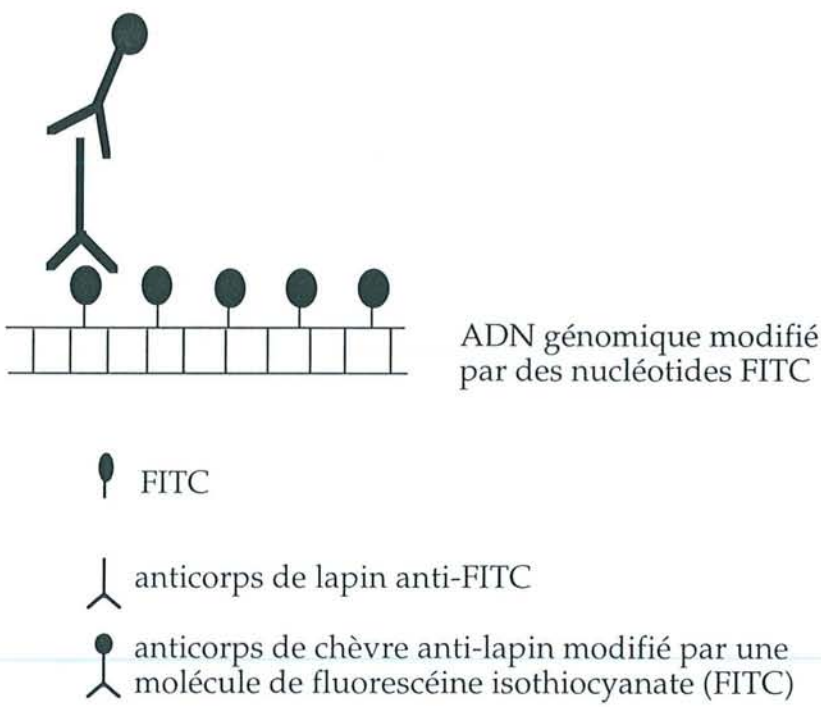


figure b : *détection par une* ***méthode directe*** *avec*
une possibilité d'amplification du signal

figure 5 : *détection d'une sonde en FISH*

La préparation chromosomique est contre-colorée par une molécule fluorescente DAPI (4'-6-diamino-2-phénylindole-2-HCl). Cette molécule présente une affinité pour les régions riches en Adénine-Thymine, et après traitement du signal, montre un profil chromosomique identique à celui obtenu en bandes G.

La fluorescence, émise par l'ensemble des fluorochromes, est visualisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé de filtres. Ces filtres correspondent à des plages de longueurs d'ondes variables, et sélectionnent individuellement ou simultanément, la fluorescence émise par chacun des fluorochromes (figure 6).

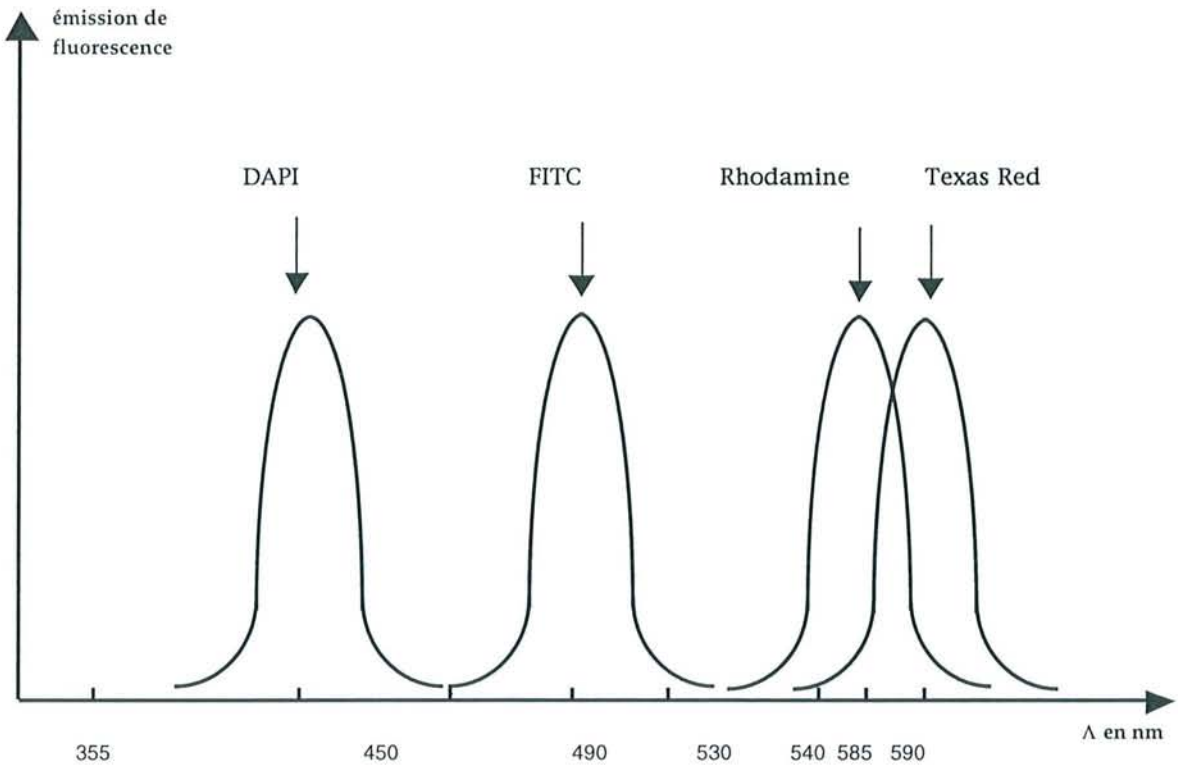


Figure 6 : *spectre d'émission de fluorescence des différents fluorochromes*

c. Les résolutions de la FISH

La résolution est la distance physique minimale (en kb) nécessaire pour individualiser, par hybridation *in situ* , deux sondes le long de la fibre d'ADN. La résolution dépend non seulement du degré de condensation de l'ADN, mais également des caractéristiques du système optique utilisé pour acquérir l'image. En effet, selon le degré de la décondensation obtenu ; 1 kb est représenté par 0,014 à 0,5 µm. Elle a considérablement été améliorée au cours de ces dernières années, par la mise au point de préparations chromosomiques dont le degré de condensation est de plus en plus faible.

Les microscopes à épifluorescence offrent une résolution spatiale de l'ordre de 0,2 µm dans le plan perpendiculaire à l'axe optique. Deux signaux situés à moins de 0,2 µm, l'un de l'autre, ne peuvent pas être discriminés et apparaissent plus ou moins confondus. L'optimisation de ces paramètres distingue des sondes de plus en plus proches.

*** FISH sur chromosomes métaphasiques**

La localisation directe de segments d'ADN par FISH, sur des préparations cytogénétiques classiques de chromosomes métaphasiques se fait avec une résolution de l'ordre d'une mégabase (Mb). Cependant, elle est insuffisante pour la cartographie fine de régions du génome (tableau I).

De nouvelles approches ont été développées par la modification de la préparation de chromosomes (prométaphases ou étirement mécanique des chromosomes) ou de l'ADN (fiber FISH) permettant d'obtenir un degré de compaction moindre. Ceci améliore la résolution de la FISH, en offrant un éventail de résolution allant de la mégabase à quelques kilobases (tableau 1).

*** FISH sur chromosomes prométaphasiques**

La synchronisation de la culture cellulaire offre la possibilité de bloquer un maximum de cellules en prométaphase, et d'obtenir ainsi, des chromosomes plus longs avec une chromatine moins condensée.
Les séquences sont alors localisées dans des régions chromosomiques précises, avec une résolution inférieure à la Mb, mais là encore elle est insuffisante pour la cartographie fine du génome (tableau I).

*** FISH sur chromosomes étirés**

L'étirement mécanique des chromosomes métaphasiques, basée sur la cytocentrifugation des chromosomes ayant subi un choc hypotonique, permet d'atteindre une résolution de l'ordre de 200 kb (Heiskanen et al., 1996). Suite à cette préparation, l'inconvénient majeur de cette méthode est la variabilité de la taille des chromosomes. L'hétérogénéité de la taille des chromosomes, ne permet pas d'estimer de façon reproductible, les distances physiques qui séparent les sondes (tableau I).

type de préparation	résolution	applications	avantages/ inconvénients
chromosomes métaphasiques chromosomes prométaphasiques	2-3 Mb 1 Mb	• localisation chromosomique • détection d'aneuploïdie • détection d'homologie • détection de chimérisme • détection d'anomalies	• localisation sur une bande chromosomique
chromosomes métaphasiques mécaniquement étirés	>200 kb	• localisation chromosomique • détection d'anomalies • ordonner des sondes	• détermination distances inter-sondes non réalisable
noyaux interphasiques	50 kb-1 Mb	• détection d'aneuploïdie • ordonner des sondes	• pas de visualisation par rapport à la structure globale du chromosome
fibres d'ADN	1 kb-500 kb	• ordonner des sondes	• détermination de distances précises • pas d'orientation des sondes par rapport au centromère et/ou au télomère

tableau I : *comparaison des résolutions accessibles en FISH*

***FISH sur noyaux de cellules en interphase**

Pour pallier l'impossibilité d'évaluer les distances physiques entre les sondes, et pour améliorer la résolution existante, la chromatine moins condensée des noyaux de cellules en interphase offre une analyse plus résolutive. On a pu montrer expérimentalement que, dans le noyau interphasique, le carré de la distance en µm qui sépare deux signaux d'hybridation est proportionnel à la distance physique en kb qui sépare les deux sondes sur la fibre d'ADN. Cette relation est valable pour une distance allant de 50-100 kb jusqu'à 2 Mb. Cependant, il est n'est pas possible, par FISH sur noyau interphasique, de discriminer un signal spécifique d'un non spécifique.

*** FISH sur fibres décondensées**

La mise au point de la FISH sur fibres d'ADN décondensées confère à cette technique une haute résolution. Le relâchement de l'organisation de la chromatine interphasique donne des structures en forme de fuseau très allongées.

. Les préparations halo

Ces fibres sont obtenues en traitant des préparations cellulaires par des détergents et des traitements salins. Ces préparations sont dites en "halo" car les fibres de l'ADN "déployées" forment des boucles autour de la matrice nucléaire. Elles sont utilisées comme support pour une FISH dont la résolution varie de 10 à 200 kb.

La préparation de l'ADN en halo rend possible l'analyse cellule par cellule, ce qui permet de discerner le nombre et la structure des allèles. Cependant les fibres d'ADN préparées par cette méthode sont souvent enchevêtrées et elles ne sont pas parfaitement linéaires ; il peut, ainsi, être difficile de mesurer la taille des signaux d'hybridation (Wiegant et al., 1992).

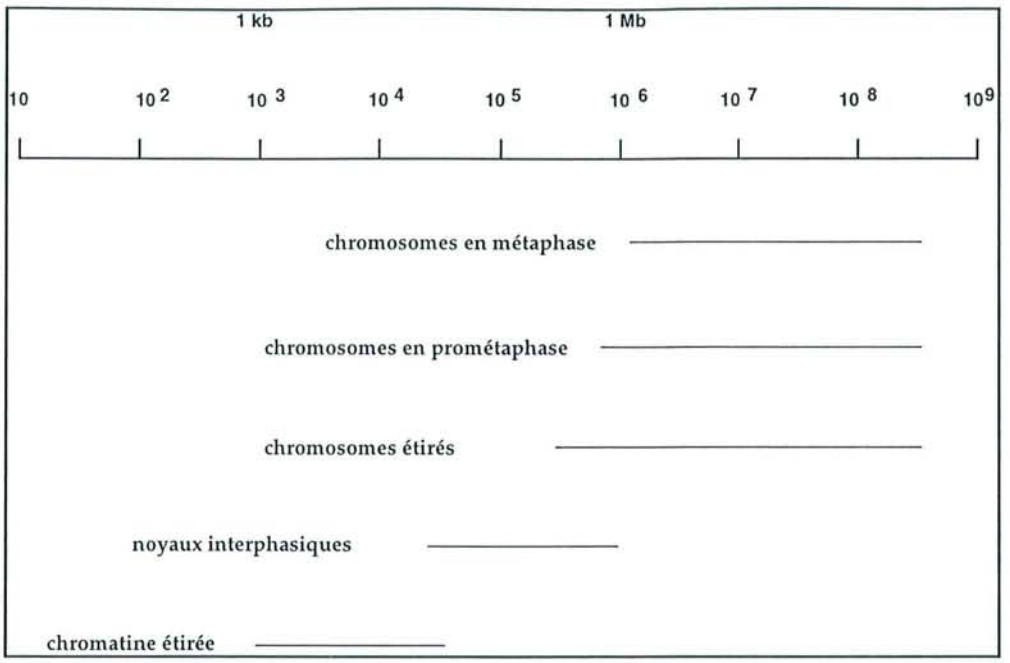


figure 7 : *la résolution apportée par les différentes préparations en FISH*

. La chromatine étirée

Une autre méthode consiste à inclure les cellules dans des blocs d'agarose avant de procéder à l'extraction d'ADN, et ce afin de préserver la structure de l'ADN intacte. Les blocs sont chauffés au four micro-ondes, puis les fibres d'ADN sont étendues mécaniquement sur une lame recouverte de poly-L lysine (Parra et al., 1993). Par cette méthode, il est possible de visualiser des segments intacts de chromatine d'environ 500 kb, dont l'orientation est imposée par l'étirement mécanique. La décondensation de l'ADN, obtenue par ces différentes approches, n'est pas homogène sur toute la longueur de la fibre. Cette hétérogénéité de décondensation engendre des signaux d'hybridation de taille variable d'une fibre à l'autre. Il est surtout difficile, de corréler la taille des signaux à une distance physique en paires de bases.

. Le peignage moléculaire

La peignage moléculaire permet d'obtenir une décondensation de l'ADN homogène (Bensimon et al., 1994). Une lame en verre, traitée au silane de façon à accrocher spécifiquement l'extrémité 5' des molécules d'ADN, est immergée dans une solution contenant les fragments d'ADN. Le retrait progressif, à vitesse constante, de cette lame oriente parallèlement des molécules d'ADN double brin par rapport à la surface de la lame. Des fibres d'ADN de plus de 1 Mb peuvent ainsi être étirées sans être fragmentées.

Le degré d'étirement de la chromatine peut être ajusté en fonction de la résolution désirée, par une modification des traitements appliqués à la fibre. Selon l'étirement réalisé, la résolution varie entre 10 kb et 1 Mb, mais le degré de décondensation de l'ADN reste homogène (Haaf et al., 1994). Les techniques de FISH sur chromatine peignée permettent de cartographier des séquences adjacentes séparées de l'ordre de 5 kb en tenant compte de la résolution offerte par le microscope, par des distances .
L'ensemble des données citées précédemment, pour chacune des méthodes de FISH à haute résolution sont regroupés sur le tableau II.

	Fibres déployées Halo	**Fibres orientées**	**Fibres linéaires**
Résolution	0,34 µm/kb(1)	0,34 µm/kb(1)	0,5 µm/kb(2)
Avantages	• analyse cellule à cellule • nombre et structure des allèles	• fibres plus longues • mesure des distances possible	• régularité de l'étirement • décondensation homogène • analyse quantitative des distances
Inconvénients	• mesure des distances difficiles	• fréquence des cassures de la molécule d'ADN • pas d'analyse cellule à cellule	

(1) ne permet pas de séparer des sondes distantes de moins de 6 kb
(2) ne permet pas de séparer des sondes distantes de moins de 4 kb

tableau II : *cartographie in situ à haute résolution*

Afin d'approcher les limites de résolution qu'offrent chacune de ces méthodes, il est indispensable d'utiliser un microscope à épifluorescence couplé à un système de numérisation des images. Ce système améliore la qualité de l'image et facilite les mesures de distance entre signaux.

d. Les applications de la FISH

L'hybridation *in situ* non isotopique est une technique dont les domaines d'application se sont considérablement étendus. A ce jour, elle est utilisée pour le diagnostic cytogénétique mais aussi, pour la réalisation de la cartographie physique du génome humain. **Dans un but diagnostique,** elle offre la possibilité d'analyser finement des caryotypes quand l'étude cytogénétique conventionnelle ne détecte pas de remaniements.
Les données cliniques et cytogénétiques fournissent des indications sur le type d'anomalie à rechercher, et donc sur les sondes à utiliser. Ces sondes, sont spécifiques d'un chromosome entier, d'un bras de chromosome, d'un centromère (séquence répétée de type satellite), ou d'un locus (tableau III). Il est possible de générer une sonde spécifique d'un bras de chromosome ou d'un chromosome entier. Ce type de sonde peut être obtenu par amplification du chromosome isolé selon la technique d'Alu-PCR. Le chromosome peut être isolé par cytométrie de flux, microdissection ou par un hybride somatique interspécifique.
Cette analyse fine des caryotypes décèle et identifie des remaniements de structure ou de nombre. Les remaniements cryptiques, translocations ou délétions, sont décelés grâce à l'utilisation de sondes spécifiques de locus (tableau III) (Lichter et al., 1988)(Wu et al., 1993)(Pinkel et al., 1988) (Mattéi et al., 1985).
A titre d'exemple, le diagnostic du syndrome de Di George est confirmé par la mise en évidence de la délétion d'un cosmide spécifique de la région 22q11.2. Il est également possible de réaliser une hybridation simultanée de plusieurs sondes, étude indispensable pour les remaniements chromosomiques complexes (Lengauer et al., 1993).

En l'absence complète d'indication, les réarrangements complexes peuvent être identifiés de manière rapide et univoque par FISH en couleurs multiples, au cours de laquelle 24 sondes spécifiques des 22 autosomes et des chromosomes sexuels sont hybridées simultanément. Ces sondes sont marquées par des combinaisons des cinq fluorochromes différents. L'émission de fluorescence de chaque sonde est analysée individuellement

ou globalement, selon le système utilisé, par une caméra refroidie. L'analyse de la fluorescence par un logiciel permet d'obtenir une image globale, attribuant des couleurs artificielles différentes à chacun des chromosomes (Speicher, et al., 1996) (Schröck, et al., 1996).

L'hybridation *in situ* en fluorescence est une technique qui contribue également à l'**établissement de la carte du génome humain**, il s'agit d'une méthode visuelle pour localiser et d'ordonner entre elles des séquences d'ADN génomique. La caractérisation d'un fragment d'ADN cloné passe par une étape de FISH. Il est possible, par cette approche de s'assurer de la spécificité de la sonde pour sa région. Cette technique permet d'éliminer les clones chimériques (résultat de la coligation dans un même YAC de deux fragments d'ADN non contigus ou de la présence simultanée de deux YAC dans une même souche de levure) (tableau III) (Slim et al., 1995).
L'utilisation des techniques de FISH hautement résolutives permet d'obtenir rapidement, des informations visuelles sur l'ordre et les distances physiques qui séparent des clones. Ces techniques, contribuent à la construction de la carte physique du génome humain, pré-requis indispensable pour le clonage (positionnel) de gènes à l'origine de pathologies (tableau III).
La cartographie d'une région couvrant plusieurs Mb ne nécessite pas un degré d'étirement de la fibre chromatinienne très important. Cette cartographie est réalisée pour caractériser des contigs de YAC, afin de visualiser les régions de chevauchement ainsi que les zones qui ne sont pas recouvertes. Pour une résolution moyenne de l'ordre de 50-100 kb/µm, une sonde de type YAC de 1 Mb produit un signal entre 10-20 µm. L'analyse par FISH, sur fibres étirées, de sondes de type cosmide produit un signal de quelques micromètres de long, cette haute résolution étant suffisante pour visualiser le chevauchement de cosmides (Bentley et al., 1992). Sur ces fibres étirées, il est possible de discerner deux séquences distantes de 21 kb (Heng et al., 1992)
Cette technique peut fournir des informations sur l'orientation d'un gène, lorsque celui-ci, est caractérisé par des sondes pour ses extrémités 5' et 3'. Par co-hybridation de ces sondes, il devient alors possible de déterminer le sens de transcription du gène, par rapport à des zones flanquantes, à des gènes voisins et définir son orientation centromère-télomère (tableau III).

Applications	Type de préparation	Sonde utilisée
- diagnostic cytogénétique : recherche d'aneuploïdie	• chromosomes métaphasiques • noyaux interphasiques	• sonde centromérique
-diagnostic cytogénétique : recherche d'anomalies de structure	• chromosomes métaphasiques • chromosomes prométaphasiques •noyaux interphasiques	• sonde spécifique d'un chromosome entier • sonde spécifique d'un locus
localisation de YAC chimérisme localisation de cosmides	• chromosomes métaphasiques • chromosomes prométaphasiques	• YAC • cosmide
localisation de gènes	chromosomes prométaphasiques	sonde spécifique d'un locus
sens de transcription d'un gène	chromatine génomique étirée	sondes d'extrémités 5' et 3' du gène
construction de contig de YAC, PAC, BAC, cosmides	• chromosomes métaphasiques • chromosomes prométaphasiques •chromatine génomique étirée	YAC, PAC, BAC, cosmide

tableau III : *les applications de la technique de FISH*

2.3 Les remaniements chromosomiques

Environ 60% des gènes isolés par clonage positionnel, ont été dans un premier temps, précisément cartographiés à l'aide de remaniements chromosomiques. L'analyse cytogénétique des cellules somatiques, chez des sujets atteints d'une pathologie, décèle d'éventuelles anomalies chromosomiques, de nombre (monosomie, trisomie) ou de structure (translocation, délétion, duplication). La fréquence des anomalies

chromosomiques *de novo* est de l'ordre de 1:3000 nouveaux nés, et 6% de ces réarrangements sont associés à une pathologie. (Warburton et al., 1991). L'association phénotype pathologique-remaniement chromosomique d'une région du génome, laisse penser, que la lésion produite par le remaniement touche un gène dans sa région codante ou dans sa région régulatrice : on parle alors, de pathologie du point de cassure. L'utilisation de tels remaniements, pour la localisation d'un gène impliqué dans une pathologie, minimise les études d'analyses familiales de ségrégation, analyses longues et souvent limitées par la taille et le nombre des familles étudiées.

Les techniques cytogénétiques hautement résolutives, (Yunis et al, 1976), permettent d'observer des microréarrangements (microdéletion et micro-duplication) sur des chromosomes prométaphasiques dont le degré de condensation est moindre. Dans le cas de maladies monogéniques, les anomalies chromosomiques donnent une indication précieuse sur la localisation de locus morbide. Les gènes de la granulomatose chronique (*CGD*), du rétinoblastome (*RB*), et de la myopathie de Duchenne (*DMD*) sont quelques exemples de gènes clonés grâce à de remaniements chromosomiques chez des patients atteints par ces pathologies.

2.4 La carte transcriptionnelle

La caractérisation d'une région candidate conduit, après des études de cartographie génétique et physique, à l'isolement d'un ou de plusieurs clones d'ADN génomiques, susceptibles de contenir tout ou partie du gène responsable de la maladie génétique étudiée. Ces clones sont analysés en vue d'isoler des séquences codantes, qui témoignent de la présence d'un gène. Les méthodes d'isolement de gènes sont basées sur la recherche de la présence d'exons dans la séquence clonée. Plusieurs méthodes sont utilisées pour repérer une séquence codante dans un clone d'ADN.

*** Le zoo Blot**

Cette méthode consiste en une hybridation croisée du clone étudié, avec l'ADN de différentes espèces animales, sachant qu'au cours de l'évolution les séquences exoniques présentent un haut degré de conservation.

*** Les îlots CpG**

Les îlots CpG sont indicateurs de la présence des séquences uniques dans l'ADN. Ce sont des régions riches en dinucléotides 5'CpG3', longues de 0,5 à 2 kb. Les îlots CpG, situés dans la partie 5' non transcrite en amont des gènes exprimés, sont hypométhylés. La recherche de ces séquences peut être

détectée à l'aide d'enzyme sensibles à la méthylation de type HpaII. La méthylation protège l'ADN de la digestion, ces enzymes ne couperont que les séquences d'ADN non méthylé, indice de la présence d'un gène actif .

*** le criblage de banques d'ADNc**

Cette méthode est basée sur une sélection de séquences exprimées par hybridation du clone étudié sur une banque d'ADNc de tissu approprié.

*** La sélection d'ADNc**

La sélection d'ADN complémentaires, repose sur une hybridation moléculaire entre une source d'ADN génomique immobilisée sur une membrane et une banque d'ADNc. Le ou les transcrits retenus sont ensuite amplifiés. Cette méthode présente l'avantage, par rapport au criblage de banque d'ADNc, de détecter des transcrits faiblement exprimés au sein d'une cellule.

*** Amplification d'exon ou piège à exon**

La technique de piège à exon permet le clonage d'exon(s) présent au sein d'un fragment d'ADN génomique. Le fragment d'ADN génomique, après sous-clonage dans un vecteur d'expression contenant deux exons encadrant le site de clonage, est transféré dans une cellule de mammifère par électroporation où il y a expression transitoire du gène porté par le vecteur. La présence d'exon (encadré par un site A et D d'épissage) dans le fragment d'ADN génomique étudié, sera caractérisé après synthèse des ADNc et amplification des produits obtenus à l'aide d'amorces spécifiques du vecteur d'expression.

*** Le séquençage**

Une stratégie d'identification de séquences transcrites, consiste en un séquençage des segments d'ADN clonés. Les séquences, sont analysées par des programmes informatiques, afin de repérer des phases ouvertes de lecture .

Toutes ces analyses, peuvent conduire à l'isolement d'un gène candidat, qui doit être validé par la mise en évidence de mutations dans ce gène au sein de familles où ségrège la maladie génétique.

2.5 La carte intégrée

La carte intégrée rassemble l'ensemble des informations des cartes génétique, physique et de transcrits. Cette carte regroupe donc, les marqueurs polymorphes, les STS, les gènes de maladies génétiques, les gènes candidats, les ADNc complets ou partiels (EST), le tout positionné sur les contigs de YAC, PAC, BAC et de cosmides. Pour l'établissement de cette

carte, l'informatique joue un rôle prépondérant. En effet, de nombreux organismes officiels tels que GDB, NCBI, EMBL, ou GENATLAS sont très facilement accessibles sur Internet et regroupent un grand nombre d'informations sur le génome humain. Les mutations connues, les sites fragiles, ainsi que les points de cassure (translocations, délétions) sont répertoriés et positionnés à l'aide des méthodes décrites précédemment. Dans ces bases de données, est rapporté un atlas clinique des maladies génétiques humaines établi par Mc Kusick (OMIM : On-line Mendelian Inheritance in Man). Cette collection de données sert de base pour des études contribuant à l'établissement de la carte du génome humain.

3. La stratégie du candidat positionnel

Une nouvelle stratégie, l'approche par candidat positionnel, prend le pas sur le clonage positionnel. Il s'agit d'une combinaison des clonages positionnel et fonctionnel. Cette méthode, consiste à cerner le locus du gène dans un intervalle de 0,5 à 5 Mb (le plus souvent par analyse de liaison et à l'aide de remaniements chromosomiques), puis de sonder cette région à la recherche de gènes candidats. Le degré de résolution, correspond à celui obtenu par la carte de transcrits. Cette approche est facilitée par l'existence de cartes de transcrits denses, dans lesquelles des ADNc partiels (EST) sont localisés plus ou moins précisément. A titre d'exemple, le locus du syndrome de Marfan, pathologie autosomique dominante du tissu conjonctif, fut situé sur le chromosome 15q par analyse de liaison. En parallèle, le gène de la fibrilline était cloné et localisé en 15q21.1 (Lee et al., 1991). La mise en évidence, de mutations dans le gène de la fibrilline chez des patients présentant le syndrome de Marfan, a confirmé l'implication de ce gène dans cette affection (Dietz et al., 1991).

III. LE CHROMOSOME X HUMAIN

Le chromosome X représente, dans l'espèce humaine comme chez la plupart des mammifères placentaires, environ 6% du génome haploïde total, soit quelques 160 Mb. Il forme, avec le chromosome Y, la paire de chromosomes sexuels. Les deux chromosomes sexuels possèdent des zones d'homologies, appelées régions pseudoautosomiques (PAR). Ces régions d'homologie sont situées au niveau des régions télomériques du chromosome X. L'hypothèse, expliquant l'origine de ces régions, repose sur l'existence d'une paire ancestrale de chromosomes sexuels identiques.

L'évolution a entraîné la réduction graduelle d'un des deux chromosomes en chromosome Y accompagnée d'une série de réarrangements (Rappold, 1993). La région PAR1 est située à l'extrémité des bras courts (p) et s'étend sur 2,6 Mb dans la bande cytogénétique Xp22.3 (Mandel et al., 1989). La région PAR2 est située en Xq28 et s'étend sur 320 kb (de Freije et al., 1992). Les régions homologues, sur le chromosome Y se situent de la même façon dans les régions les plus distales des bras p et q. Les régions PAR1 et PAR2 assurent l'appariement, entre les deux chromosomes sexuels pendant la méiose chez le sujet de sexe masculin, avec échange possible de matériel génétique entre les chromosomes X et Y (Gabriel-Robez et al., 1990). Dans la région PAR1, au moins une recombinaison se produit à chaque méiose pour les marqueurs les plus distaux de la région. Cette valeur diminue sous forme de gradient décroissant du télomère vers le centromère (Cooke et al., 1985). La région PAR2 s'apparie, inconstamment, avec sa région homologue sur le chromosome Y, et des échanges peuvent avoir lieu avec une fréquence de l'ordre de 1 à 2% (Li et al., 1995). Une autre région de l'X (Xq21.3), possède une homologie de séquence avec le bras court du chromosome Y, mais ces régions ne présentent pas de recombinaison.

La notion de pathologie génétique liée à l'X est très ancienne. En effet, ces pathologies sont facilement repérables par un mode de transmission caractéristique, dans les arbres généalogiques. L'exemple type, est la transmission de l'hémophilie dans la famille de la reine Victoria. L'expression d'une pathologie récessive, liée à l'X, se manifeste toujours chez les sujets de sexe masculin qui ne possèdent qu'un seul chromosome X (état hémizygote), alors que la mutation doit être à l'état homozygote chez les sujets de sexe féminin, pour que la maladie s'exprime. Les femmes hétérozygotes sont vectrices de la pathologie.

Les gènes et les maladies, actuellement connus, ne sont pas répartis de façon uniforme sur le chromosome X. Ces différences, sont sensibles sur le bras long où la région q28 très riche en gènes fait contraste avec la vacuité de la région q23. En 1996, on répertoriait 270 gènes localisés sur le chromosome X, dont les trois quarts étaient clonés, ainsi que 200 locus de maladies dont plus du quart ont été clonés (Frézal, 1996). La carte intégrée du chromosome X comportait alors 30 000 STS (Schuler et al., 1996).

1. les anomalies de structure du chromosome X

L'analyse cytogénétique, met en évidence principalement, cinq types de remaniements impliquant le chromosome X :

- les délétions
- les duplications
- les inversions para- et péricentriques
- les translocations X;Autosome (t(X;A)).

Les délétions chez les hommes et les t(X;A) chez les femmes sont les deux types de remaniement chromosomique les plus fréquemment associés à des maladies génétiques récessives liées à l'X.

1.1 Les délétions

Seules quelques régions du chromosome X ont été décrites pour être le siège de délétions de grande taille viables chez le sujet masculin XY : Xp22.3, Xp21, Xq21 et Xq25. Ces délétions sont associées à un syndrome des gènes contigus avec une combinaison de pathologies variables, suivant l'étendue de la délétion. Les délétions, qui ne touchent que tout ou partie d'un gène, sont responsables d'une maladie monogénique, et peuvent se produire contrairement aux précédentes sur n'importe quelle partie du chromosome X.

Un des premiers succès de la stratégie de clonage positionnel, orienté par la cytogénétique, fut le clonage du gène de la myopathie de Duchenne (locus DMD). Pour cette étude, deux types de remaniement du chromosome X ont été utilisés. Un sujet de sexe masculin, était atteint de myopathie de Duchenne, de granulomatose chronique, de rétinite pigmentaire, et de syndrome de Mc Leod. L'analyse cytogénétique, chez ce garçon, révélait une délétion visible (5 Mb) de la région Xp21. Le clonage de séquences délétées par la technique pERT (phenol Enhanced Reassociation Technique) a permis d'isoler le gène de la myopathie de Duchenne (Kunkel et al., 1986).

1.2 Les duplications

Les duplications du chromosome X peuvent se produire au sein d'un bras chromosomique et être totales ou qualifiées de partielles (Hu et al., 1988) ces dernières aboutissant à la formation d'un isochromosome Xp ou Xq (Scherer et al., 1989). Les isochromosomes Xq dont l'incidence est de l'ordre de 1 : 50 000 sont responsables de 15 à 20 % des syndromes de Turner. Très peu de cas de vrais isochromosomes Xp ont été décrits dans la littérature,

probablement car ceux-ci ne sont habituellement pas viables (Jalal et al., 1996).

1.3 Les inversions

Les inversions sont le résultat d'un événement, produisant deux cassures simultanées sur le chromosome, suivi d'une rotation à 180° du segment intercalaire, puis d'un recollement de celui-ci. Lorsque ces cassures se produisent sur le même bras, l'inversion est dite paracentrique, alors que l'inversion est dite péricentrique lorsque les cassures se produisent de part et d'autre du centromère. Parmi ces inversions, les péricentriques sont les plus fréquemment décrites (Groupe des Cytogénéticiens, 1986). La plupart des inversions n'entraînent aucun phénotype particulier.

1.4 Les translocations X;Autosome

Les translocations X;Autosome, décrites dans la littérature, impliquent l'ensemble des 22 autosomes. Cependant, les translocations entre le chromosome X et les chromosomes 1, 21 et 22 constituent 1/3 des cas. Les points de cassure, sur le chromosome X, se produisent indifféremment sur tout le chromosome (Carpenter, 1983). De nombreux cas de t(X;A), chez des femmes porteuses d'une maladie récessive liée à l'X, ont permis un positionnement précis des gènes à l'origine de ces pathologies (figure 8).

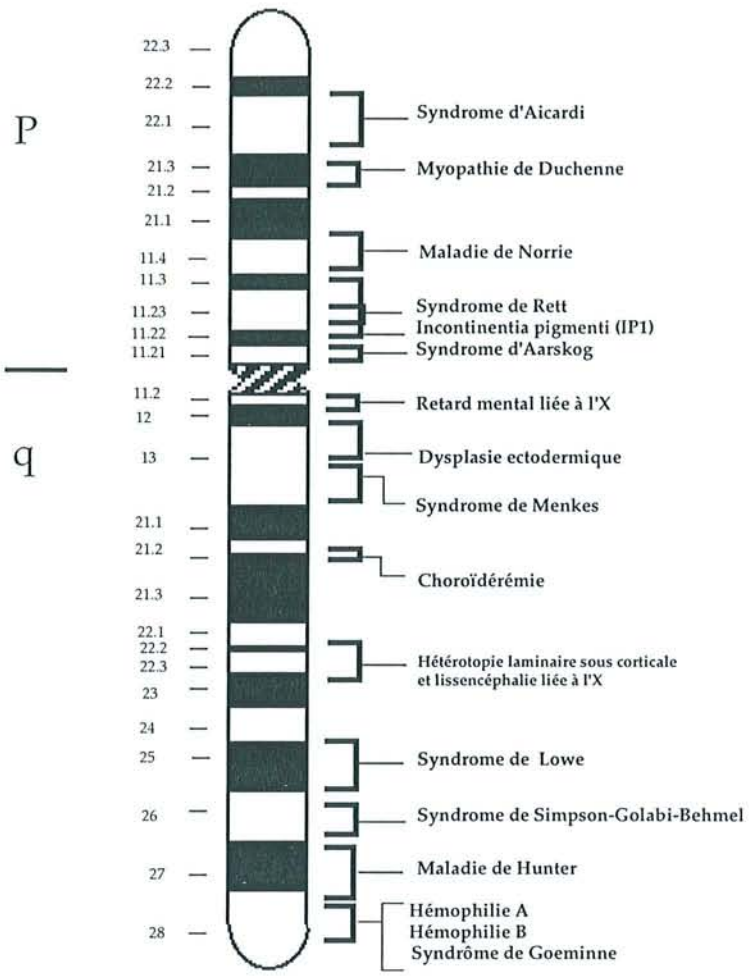


figure 8 : *pathologies récessives liées à l'X observées chez des femmes porteuses de t(X;A) équilibrées*

2. Inactivation du chromosome X

Pour pallier l'hemizygotie du chromosome X chez l'homme, 46XY, le phénomène d'inactivation d'un des deux chromosome X, chez la femme, maintient constant, entre les deux sexes, le dosage des produits des gènes portés par l'X.

Deux découvertes majeures ont conduit à l'hypothèse d'un phénomène d'inactivation du chromosome X. En 1949, un corpuscule intranucléaire,

et fortement coloré était mis en évidence par Barr et Bertram, (Barr et al., 1949) dans les neurones des cellules épiphysaires de chats femelles et pas dans ceux des chats mâles. Vingt années plus tard, Ohno et ses collaborateurs (Ohno et al., 1969) établissent une relation entre ce corpuscule chromatinien et le chromosome condensé, fortement coloré, qu'ils identifient dans les cellules de rat femelle au stade prométaphasique. Mary Lyon s'appuyant sur ces constatations propose, en 1961, une théorie d'inactivation du chromosome X basée sur trois points (Lyon, 1961).

- Dans les cellules somatiques des femelles de mammifères, un seul X est actif, l'autre étant inactivé.
- L'inactivation se produit au hasard, c'est à dire qu'elle affecte avec la même probabilité les chromosomes d'origine maternelle et paternelle.
- L'inactivation survient à un stade précoce du développement embryonnaire et se transmet au cours des générations cellulaires.

Le chromosome X inactif se réactivera uniquement dans les ovogonies avant leur entrée en méiose.

L'inactivation du chromosome X chez la femme, est associée une méthylation différentielle au niveau des dinucléotides CpG entre le chromosome actif (Xa) et inactif (Xi). A l'exception de quelques locus (par exemple le locus DXS255), l'Xa est hypométhylé alors que l'Xi est hyperméthylé. Plusieurs locus échappent à l'inactivation, et sont donc exprimés par les deux chromosomes X (Davies et al., 1991).

Par des études réalisées sur des chromosomes X structuralement anormaux, le centre responsable de l'inactivation appelée XIC (X Inactivation Center) fut localisé en Xq13.2 (Brown et al., 1991). L'absence de centre inactivateur est accompagné de l'expression des gènes du chromosome délété. Cette région semble être à l'origine **d'un mécanisme de comptage,** du nombre de chromosomes, et de **l'initiation** d'un signal d'inactivation. La région XIC n'est pas indispensable au maintien de l'inactivation, son absence ne modifie pas le silence des gènes soumis à l'inactivation (Brown et al., 1994).

Le **comptage des chromosomes** précède l'initiation de l'inactivation, dans la cellule embryonnaire . Ce phénomène est observé dans les polysomies X, où le nombre de corpuscule de Barr est toujours égal au nombre de chromosome X moins un (celui restant actif). Alors que dans les cellules triploïdes X, deux chromosomes X demeurent actifs.

Au cours de l'initiation de l'inactivation, le transcrit *Xist* dont on connaît la séquence, chez la souris et chez l'homme, semble être déterminant (Kay et al., 1993) (Penny et al., 1996). Au sein du centre d'inactivation, le gène *XIST* (X inactive specific transcripts) est exprimé exclusivement sur le chromosome X inactif (Brown et al., 1991) (Borsani et al., 1991). Ce gène est à l'origine d'un transcrit qui ne présente pas de cadre de lecture. L'expression murine de *Xist* est détectée au stade quatre cellules de l'embryogenèse, alors qu'une inactivation complète du chromosome X n'est observée qu'à la différenciation du trophectoderme extraembryonnaire. Avant la mise en place de l'inactivation, un faible niveau de transcrit *Xist* est détectable dans les cellules souches embryonnaires (ES) de souris (Kay et al., 1993). Chez les murins un élément de contrôle (Xce : élément de contrôle de l'X) appartenant au centre inactivateur semblerait influencer le choix de l'allèle inactivé (Courtier et al., 1995). Le transcrit *Xist* se propage en *cis*, réduisant au silence, la plupart des gènes portés par ce chromosome, certains échappant toutefois physiologiquement à l'inactivation (Brown et al., 1991). La mise en place de l'inactivation entraînerait la répression de l'allèle du chromosome X actif (Xa) et une régulation positive de l'allèle du chromosome X inactif (Xi) (Hendrich et al., 1997). Il est envisagé que ce contrôle soit le résultat d'une modulation de la stabilité du transcrit Xist dans les cellules ES XX (Sheardon et al., 1997). Au cours du procédé d'inactivation, l'ARN *XIST* entrerait en interaction avec des protéines cytoplasmiques pour s'associer au chromosome X inactif (Brown et al., 1996). Une accumulation du transcrit *XIST* est visualisée à l'aide d'une sonde ARN *XIST* anti-sens au sein de noyaux interphasiques au niveau du corpuscule de Barr (Clemson et al., 1996).
L'observation de mutation ponctuelle (Cytosine-> Guanine) dans le promoteur *XIST* semble être à l'origine d'une modification épigénétique des deux chromosome X, au sein des deux familles, chez neuf sujets de sexe féminin. Tous les sujets portant la mutation, montrent une inactivation préférentielle du chromosome X muté, qui suggère qu'il existe une association entre une altération de la régulation de *XIST* et l'inactivation du chromosome X (Plenge et al., 1997).

L'inactivation n'est pas toujours aléatoire et peut devenir sélective, en présence d'un remaniement par trop délétère, pour la cellule. Nous aborderons, exclusivement, l'inactivation préférentielle dans les cas de t(X;A) et de délétions.

3. Inactivation préférentielle chez des patientes présentant un remaniement du chromosome X

Chez un sujet de sexe féminin, lorsqu'un remaniement touche le chromosome X, l'inactivation se fait de telle sorte que le patrimoine génétique de la cellule soit le plus proche de celui d'une cellule normale. Des observations ont conduit certains auteurs, à émettre l'hypothèse d'une inactivation au hasard, suivie d'une élimination pendant les premiers stades du développement embryonnaire, des cellules désavantagées par un patrimoine génétique trop délétère (Mohandas et al., 1983).

Chez des sujets de sexe féminin hétérozygotes pour une **délétion** du chromosome X, apparaît une pression de sélection contre le maintien actif du chromosome X délété. L'inactivation du chromosome X normal, entraînerait une nullisomie de la cellule pour les gènes emportés par la délétion. La pression de sélection est variable, et semble dépendre de la taille de la délétion. Typiquement, les chromosomes X présentant une délétion de grande taille (>2 à 3 Mb) apparaissent totalement inactivés, ce qui laisse penser que la délétion emporte des gènes indispensables à la cellule. A l'inverse, chez des sujets de sexe féminin hétérozygotes pour une délétion de petite taille, la pression de sélection ne se fait pas obligatoirement au profit des cellules qui inactivent le chromosome X délété. L'étude du profil d'inactivation, au sein d'une famille où ségrège une telle délétion, révèle alors une inactivation aléatoire, comparable à celle obtenue pour une paire normale de chromosomes X. En effet, des petites délétions dans les régions Xq27-q28 sont souvent associées à une inactivation aléatoire (Willard et al., 1996) (Wolff et al., 1997).

L'étude dynamique des **translocations (X;A)** a montré que l'inactivation correspondait à un processus d'hétérochromatinisation, se propageant le long du chromosome X. Ce phénomène est également capable de s'étendre au fragment d'autosome adjacent. D'une manière générale, le mécanisme de sélection cellulaire intervient dans le processus d'inactivation du chromosome X, chez des femmes porteuses de t(X;A), contre la disomie fonctionnelle partielle de l'X et contre la monosomie fonctionnelle de l'autosome. L'inactivation de l'Xn, dans les cas de translocation (X;A), permet aux cellules de conserver un patrimoine génétique, très proche de la normale, à l'exception des deux cassures sur le chromosome X et sur l'autosome. Une t(X;A) est associée, dans 80% des cas, à une inactivation systématique de l'X normal (Mattei et al., 1982). Néanmoins, des disomies

fonctionnelles partielles du bras court du chromosome X sont le plus souvent décrites. Cette disomie fonctionnelle est rendue possible par un grand nombre de gènes qui échappent à l'inactivation sur le bras court du chromosome X. Certains cas de t(X;A) équilibrées, impliquant les régions Xp22 et Xq28, sont soumises à une inactivation aléatoire. Ces cellules présentent simultanément, une disomie fonctionnelle partielle du fragment de l'X transloqué sur le der(A) et une monosomie fonctionnelle partielle du fragment de l'autosome transloqué sur le der(X) inactivé. Cette situation est décrite dans 28 cas sur 122 (23%) de translocations (X;A) (Schmidt et al., 1992). Le plus souvent, cette disomie fonctionnelle partielle de l'X et cette monosomie fonctionnelle partielle de l'autosome, se traduisent par des anomalies congénitales multiples, et un retard mental. (Schmidt et al., 1992).

4. Les gènes du chromosome X qui échappent à l'inactivation

L'existence sur le chromosome X de gènes qui échappent à l'inactivation, a, depuis longtemps, été soupçonnée chez les mammifères. En effet, l'observation de sujets présentant un syndrome de Turner, associé à une formule chromosomique 45,X, démontre qu'un X actif n'est pas suffisant pour un développement normal chez la femme (Fergusson-Smith et al., 1965). La plupart des gènes, qui échappent à l'inactivation, décrits à ce jour, sont localisés sur le bras court du chromosome X (et notamment dans PAR1), à l'exception de quelques gènes localisés en Xq. Une étude de l'expression d'un gène lié à l'X, à l'aide de deux hybrides somatiques interspécifiques ayant retenu l'Xa ou l'Xi, permet de déterminer leur statut vis à vis du processus d'inactivation.

A ce jour, 27 gènes sur l'X échappent à son inactivation et peuvent être classés en fonction de leur localisation (dans la région PAR1 ou en dehors de cette région), et l'existence ou l'absence d'une séquence homologue fonctionnelle de ce gène sur le chromosome Y (Brown et al., 1997).

La notion de gènes échappant à l'inactivation, a été décrite, pour la première fois, au sujet de gènes appartenant à **la région PAR1**. Le gène *MIC2*, codant pour l'antigène de surface cellulaire CD99, est exprimé de façon équivalente par les deux chromosomes sexuels X et Y (Goodfellow et al., 1986). Dans la région PAR1, figurent sept autres gènes qui échappent à l'inactivation (Disteche et al., 1995) (figure 9).

Proche de la région PAR1, d'autres gènes échappent à l'inactivation du chromosome X; par exemple le gène de la stéroïde sulfatase (*STS*) (figure 9) est localisé en Xp22.3 et présente **un homologue non fonctionnel sur le chromosome Y** (Meroni et al., 1996). En effet, la copie du gène *STS* présente sur l'Xi, est partiellement inactivée et entraîne le tiers de l'expression issue de l'Xa (Migeon et al., 1982).
A l'opposé, le gène *RPS4X*, localisé en Xq13.1 (figure 9), est insensible à la méthylation et **possède un homologue fonctionnel** sur le bras court du chromosome Y. Les gènes *RPS4X* et *RPS4Y* sont transcrits et codent pour des isoformes de protéines ribosomales S4 (Just et al., 1992).

Dans une région plus proximale à la région PAR1, plusieurs gènes échappent à l'inactivation, et sont soit groupés dans la région Xp11.2 soit disséminés, (figure 9). Parmi ces gènes, certains possèdent un **homologue sur le chromosome Y.** A l'opposé, les locus INE1 et INE2 (Esposito et al., 1997) sont localisés respectivement en Xp22.1 et Xp11.4 (figure 9) échappent à l'inactivation et ne possèdent **pas d'homologue sur le chromosome Y,** ce qui laisse supposer une double dose des transcrits issus de ces gènes chez le sujet de sexe féminin par rapport au sujet de sexe masculin.
Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer l'absence d'inactivation de locus spécifiques :

- la propagation de l'inactivation ne touche pas certains gènes dépourvus de signaux d'inactivation (Disteche et al., 1995)
- la protection de ces gènes par des séquences permettant la fixation d'une ou plusieurs protéines régulatrices ou induisant une structure particulière de l'ADN empêchant la méthylation (Esposito et al., 1997).

Pour étayer ces hypothèses, les îlots CpG localisés dans les régions promotrices des gènes pseudoautosomiques MIC2 et ANT3 ne sont pas méthylés sur le chromosome X inactif et pourraient expliquer, ainsi, l'absence d'inactivation de ces gènes (Slim et al., 1993).

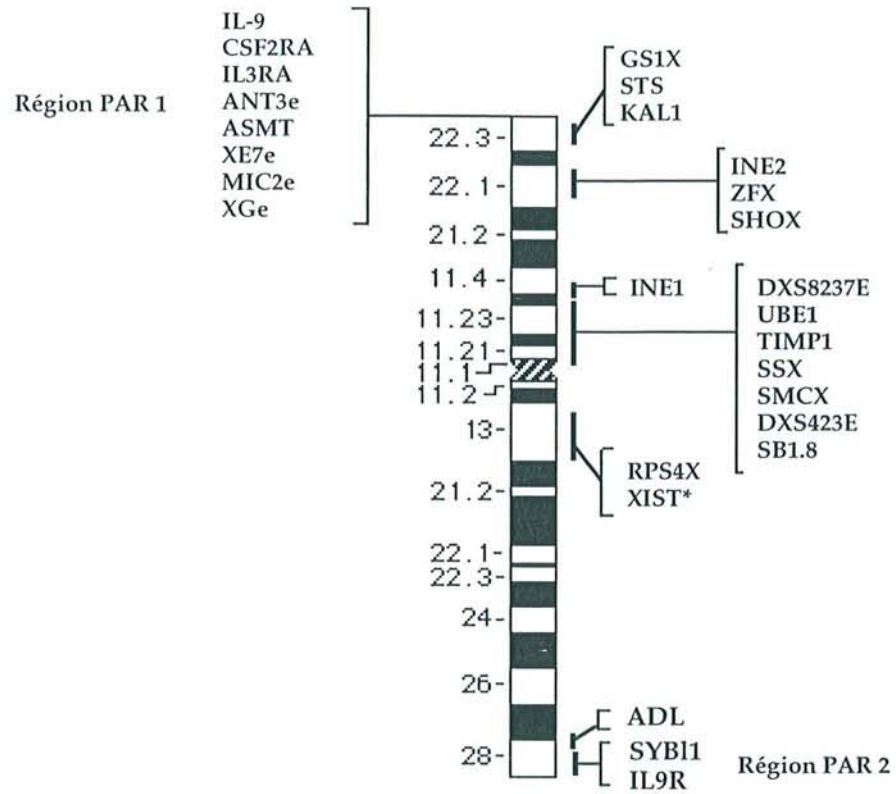


figure 9 : *les gènes qui échappent à l'inactivation de l'X*

IV. OBJECTIF DE NOTRE ETUDE

Nous avons au cours de ce travail, grâce à la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), réalisé la localisation de points de cassure de différents remaniements, impliquant deux régions du chromosome X. Nous avons envisagé, pour chacun des cas, une pathologie de point de cassure. Cette technique nous a permis de positionner les remaniements par rapport à un ensemble de sondes cartographiées sur le chromosome X. Notre travail a été inspiré par une étude de cartographie précédemment réalisé dans le laboratoire (Philippe, thèse, 1993) et par la disposition d'un grand nombre de remaniements du chromosome X. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux régions Xp11.2 et Xq21.3. A cet égard, dans une première partie, nous présentons l'étude de points de cassure intervenant sur le chromosome X chez un garçon, 46,Y,inv(X)(p11.2q21.3), associée à une fente palatine sous muqueuse, un macroorchidisme prépubertaire et un retard mental léger. Dans une deuxième partie, nous avons cartographié le point de cassure chez une patiente présentant, une

t(X;22)(p11.2;p11) associée à un syndrome de Rett. La dernière partie de ce travail, porte sur quatre patientes chez lesquelles, des translocations (X;A) impliquant la région critique (Xq21.3) sont associés à des dysfonctionnements ovariens. Nous avons, pour l'ensemble des cas, cerné le point de cassure, au sein des balises, fournies par la cartographie physique du génome humain. Différentes sondes d'ADN qui chevauchent les zones des remaniements ont été isolées, prélude à l'isolement de gènes candidats.

RESULTATS - DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

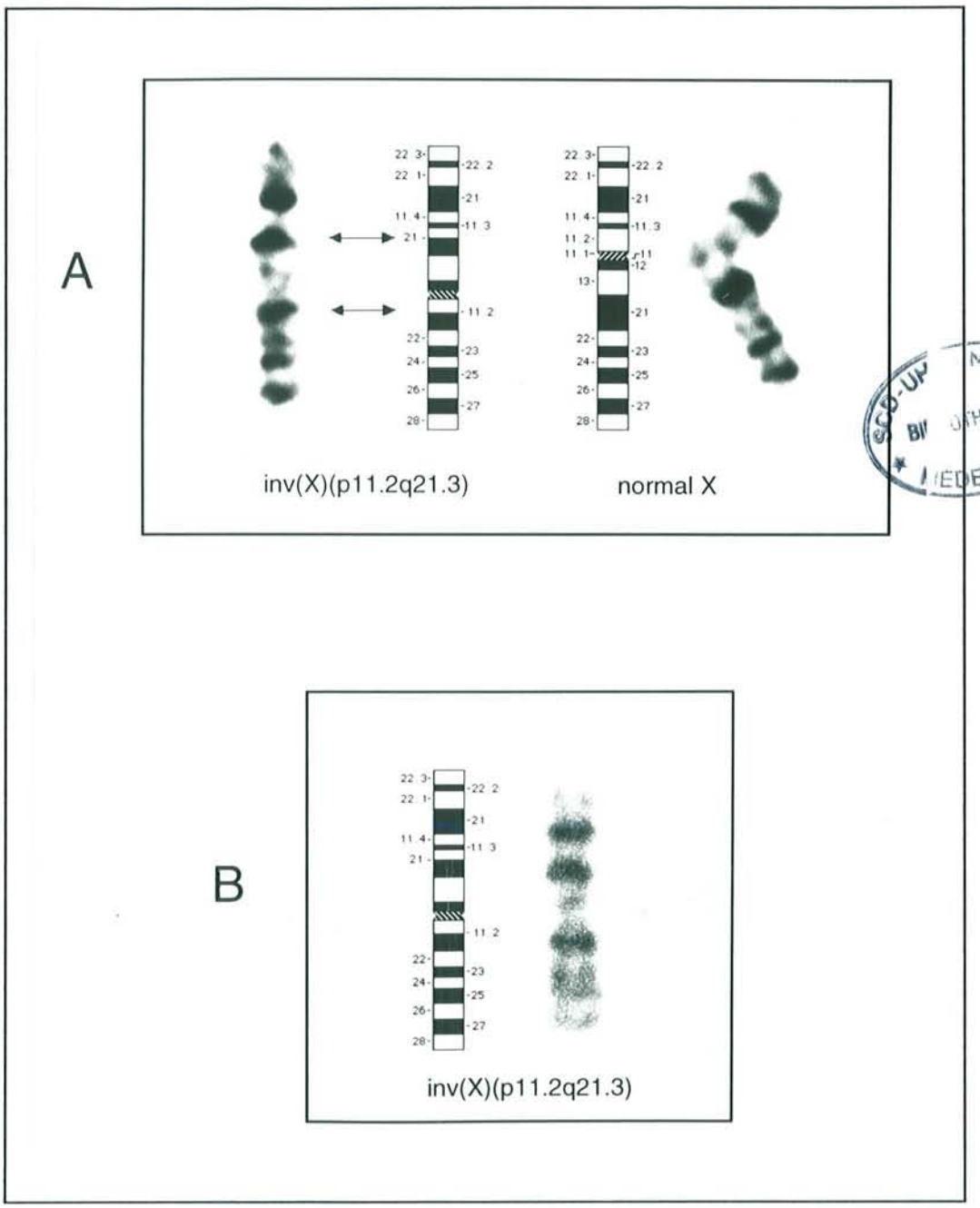
CARACTERISATION MOLECULAIRE DES POINTS DE CASSURE D'UNE INVERSION : inv(X)(p11.2q21.3)

I. PRESENTATION DU CAS ETUDIE

1. Présentation clinique et cytogénétique du patient Cédric

Le jeune garçon a été vu en consultation de génétique à l'age de 11 ans en raison d'une petite taille associée à un retard mental léger. Il est enfant unique, né de parents non consanguins. Par la suite, le couple a eu trois grossesses, dont deux interruptions volontaires de grossesse, la troisième conduisant, à la suite d'une éclampsie, à un enfant mort né. D'une deuxième union, Mme GC a donné naissance à une fille normale. GC est né à terme, à la suite d'un grossesse normale. Son poids de naissance est de 2850 g et sa taille de 46 cm. Son développement durant la petite enfance fut normal. Au cours de la consultation, à 11 ans, sa taille est petite, de 128,5 cm (-2,5 DS), son poids est de 26 kg (-1,5 DS). Le volume testiculaire est augmenté (+2 DS par rapport au stade pubertaire I). Il présente en plus une discrète fente palatine sous-muqueuse sans insuffisance vélaire associée. Il ne présente aucun trait dysmorphique. Son retard mental léger est accompagné d'un retard scolaire de deux ans. Le bilan endocrinien montre une faible diminution de l'hormone de croissance après stimulation. La fonction thyroïdienne est normale. Cet enfant présente un faible taux de testostérone par rapport au taux normal chez les garçons prépubertaires de son âge, ce qui n'est pas en accord avec le macroorchidisme. L'imagerie en résonance magnétique de la région hypothalamo-hypophysaire est sans particularité. Le syndrome de l'X-fragile est exclu par analyse moléculaire.
Le caryotype est réalisé après synchronisation des cultures cellulaires par la thymidine afin d'obtenir une analyse hautement résolutive. Il révèle une inversion péricentrique du chromosome X formulée **46,Y,inv(X)(p11.2q21.3)** (figure 10B). Le même remaniement est mis en évidence chez sa mère (figure 10A) sans conséquence phénotypique.

Une étude de l'inactivation du chromosome X chez la mère de Cédric, réalisée par incorporation de BrdU, révèle une inactivation systématique du chromosome X inversé sur cent métaphases analysées (figure 11). Cette inactivation préférentielle qui serait le résultat d'une pression de sélection négative des cellules inactivant l'X normal, évoque le caractère probablement déséquilibré de l'inversion. On peut supposer que la présence de l'X remanié actif entraîne pour la cellule un phénotype délétère.



SCD-UP NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

figure 10 : *caryotype partiel en bandes GTG et idiogramme de l'inversion inv(X)(p11.2q21.3) de la mère (A) et de Cédric (b)*

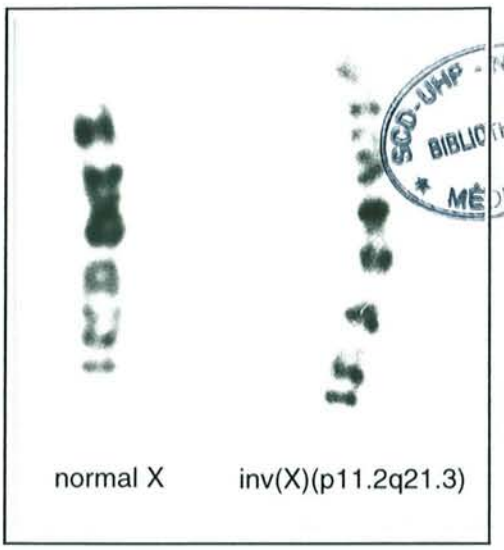


figure 11 : *profil d'inactivation du chromosome X chez la mère de Cédric*

Afin d'éliminer un remaniement complexe associé à cette inversion nous avons testé par FISH, sur les métaphases de Cédric ainsi que sur celles de sa mère, une sonde totale du chromosome X. Le signal fluorescent en vert recouvre le chromosome X inversé chez Cédric (figure 12a) et les deux chromosomes X (l'inversé et le normal) chez sa mère (figure 12b) permettant d'exclure, à ce niveau de résolution, un microréarrangement non décelable en cytogénétique conventionnelle.

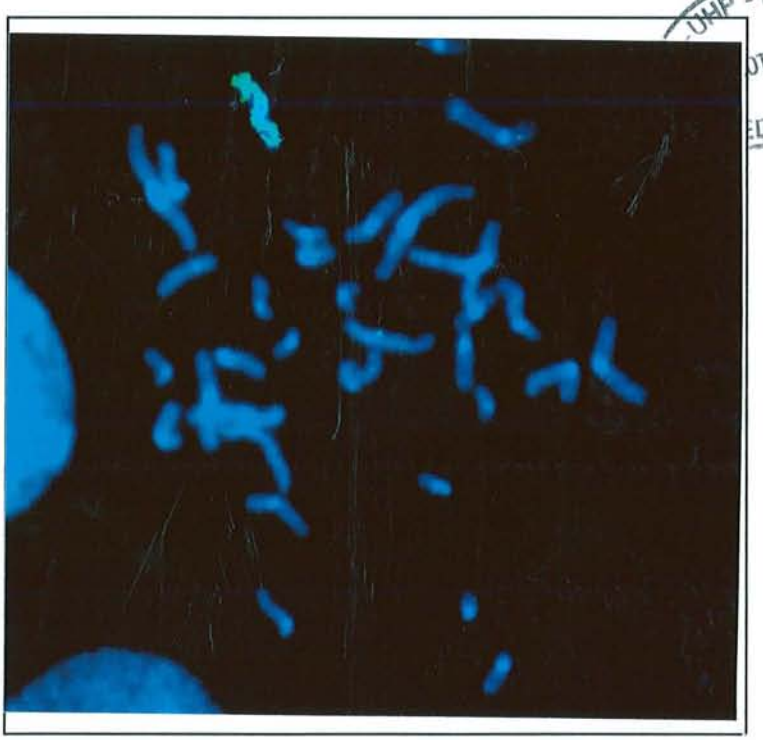


figure 12(a) : *FISH d'une sonde totale du chromosome X sur les chromosomes en prométaphase de Cédric : seul le chromosome X est marqué*

UHP - NANCY
THÈQUE
OINE

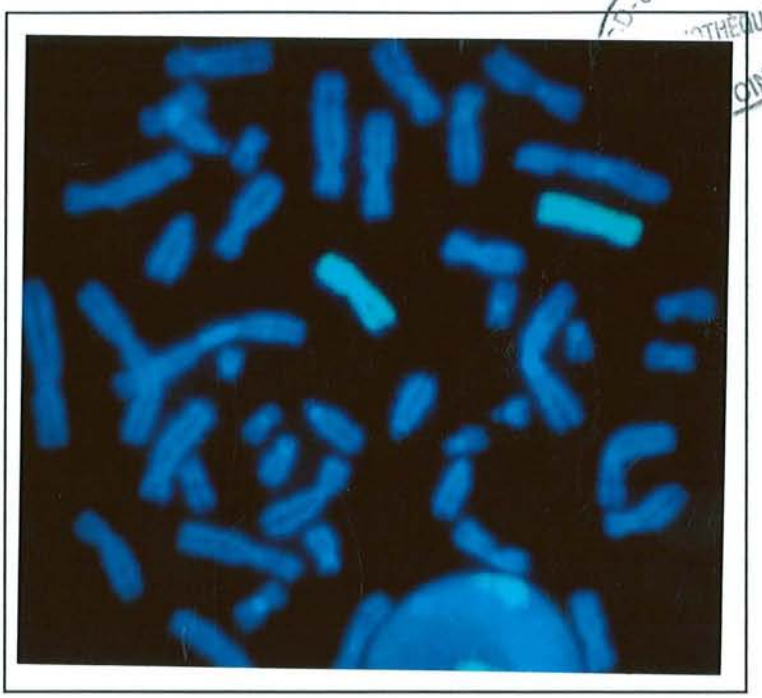


figure 12(b) *: FISH d'une sonde totale du chromosome X sur les chromosomes en prométaphase de la mère de Cédric : les deux chromosomes X sont marqués*

2. Les fentes palatines liées à l'X

Cédric présente une fente palatine sous muqueuse.

Les fentes orofaciales peuvent se manifester, d'une manière générale, sous deux formes distinctes : les fentes labiales ou labio-palatines (FL/LP) et les fentes palatines seules (FP). Certaines apparaissent, dans ce contexte, syndromiques, d'autres sont isolées. Au plan génétique, les fentes sont d'origine polygéniques (Murray et al., 1990) (Temple et al., 1989). A ce jour sept régions chromosomiques autosomiques différentes et une sur le chromosome X ont été impliquées dans des fentes orofaciales (Davies et al., 1995). Les FL/LP sont les formes les plus fréquentes.

Les fentes palatines non syndromiques ont une incidence de l'ordre de 1/1500 naissances et ségrègent, dans certaines familles, de façon isolée, autosomique dominante ou récessive liée à l'X. La forme liée à l'X peut être associée chez certains patients à une ankyloglossie. Les analyses de liaison sur trois grandes familles avec forme liée à l'X ont permis de cerner la région candidate, dite CPX, dans la région Xq21.3, (Ivens et al., 1988) (Gorski et al., 1992) entre les marqueurs DXS326 et DXYS1X (Stanier et al., 1993), puis entre DXS1002 et DXYS1X (Forbes et al., 1995). Au sein de l'inversion le point de cassure en Xq21.3 appartient à la même région que l'intervalle

candidat CPX, il était donc intéressant par une étude moléculaire chez Cédric, porteur d'une fente palatine, de tester l'hypothèse d'une localisation du point de cassure dans la région CPX.

3. Développement testiculaire

L'inversion décrite est également associée à un macroorchidisme pré-pubertaire. Le syndrome de l'X fragile se traduit par un tableau clinique qui inclut un retard mental, un macroorchidisme post-pubertaire, et une dysmorphie faciale caractéristique. Ce syndrome localisé en Xq27.3 est lié à l'existence d'une expansion anormale de triplet CGG au niveau de l'extrémité non traduite de l'exon 1 du gène *FMR1* qui, associée à une hyperméthylation de cette région, conduit à une perte de fonction du gène (Verkerk et al., 1991). L'association d'un macroorchidisme et d'un retard mental permettait d'envisager un syndrome de l'X fragile chez notre patient. Cette hypothèse a été exclue par une analyse en biologie moléculaire réalisée par l'équipe de J.L Mandel à Strasbourg, qui ne décelait pas d'expansion pathologique du triplet CGG au locus FRAXA.
La région Xq21 impliquée dans l'inversion appartient à la région critique (Xq13-q26) dont l'intégrité est nécessaire à la fonction gonadique normale (Sarto et al., 1973). Cette modification de la fonction gonadique peut être produite, soit par l'interruption de ce gène dans sa séquence codante ou régulatrice, soit par un effet de position en amont de ce gène. L'implication de la région Xq21 dans la fonction gonadique est discutée dans la troisième partie de cette thèse.

4. Les retards mentaux liés à l'X

Plus de 147 formes de retards mentaux liés à l'X (RMX) ont été cliniquement décrites (Lubs et al., 1996). L'incidence des retards mentaux liés à l'X est estimée à 2,8/1000 garçons et, 1,8/1000 filles qui seraient porteuses d'une mutation à l'état hétérozygote dans un gène responsable de MRX. Dans cet ensemble d'affections, certaines se distinguent par l'adjonction de signes cliniques précis définissant un retard mental dit syndromique par opposition aux formes isolées, non syndromiques. Les études de liaison génétique sur 42 familles (avec un lod score >2.0) ont confirmé l'hétérogénéité génétique des RMX non spécifiques (incluant le FRAXE) (Gedeon et al., 1996). Ces études de liaison réalisées au sein de familles dans lesquelles ségrègent un retard mental non spécifique ont permis d'isoler au moins 46 locus MRX dont certains sont chevauchants. Ces locus localisés au sein de 8 régions distinctes suggèrent qu'il existe au moins 8 gènes de retards

mentaux non syndromiques sur le chromosome X (Gedeon et al., 1996). Actuellement, trois gènes de retard mental non syndromique ont été isolés : *FMR2* localisé en Xq28 (Gecz et al., 1996), le gène *Oligophrenin 1* localisé en Xq12 (Billuart, communication personnelle, 1998) et le gène*GDI* en xq28. Il semble que la région péricentromérique de l'X contienne un plus grand nombre de gènes de retard mental que le reste du chromosome X (Samanns et al., 1991), (Passos Buenos et al., 1993), (Robledo et al., 1996). La localisation des points de cassure de l'inversion en Xp11 et Xq21 permet d'envisager que l'un de ces points de cassure puisse être à l'origine du retard mental chez Cédric.

II - LOCALISATION MOLECULAIRE DES POINTS DE CASSURE DE L'INVERSION PAR FISH

1. Localisation des YAC au sein des points de cassure de l'inversion

Le chromosome X inversé produit, chez Cédric, un chromosome sub-métacentrique. Au cours des expériences de FISH, il était nécessaire de distinguer le bras p du bras q du chromosome X inversé. Pour cela, nous avons réalisé l'hybridation simultanée de la sonde à tester, avec une sonde témoin. Cette dernière est spécifique du gène de la Stéroïde Sulfatase (STS) en Xp22.3. Si le YAC de la région Xq21 donne un signal sur le bras opposé de la sonde STS, le YAC est distal au point de cassure en Xq21 (figure 13). Par opposition, si le YAC donne un signal sur le même bras que la sonde STS, alors le YAC est proximal au point de cassure en Xq21 (figure 13).

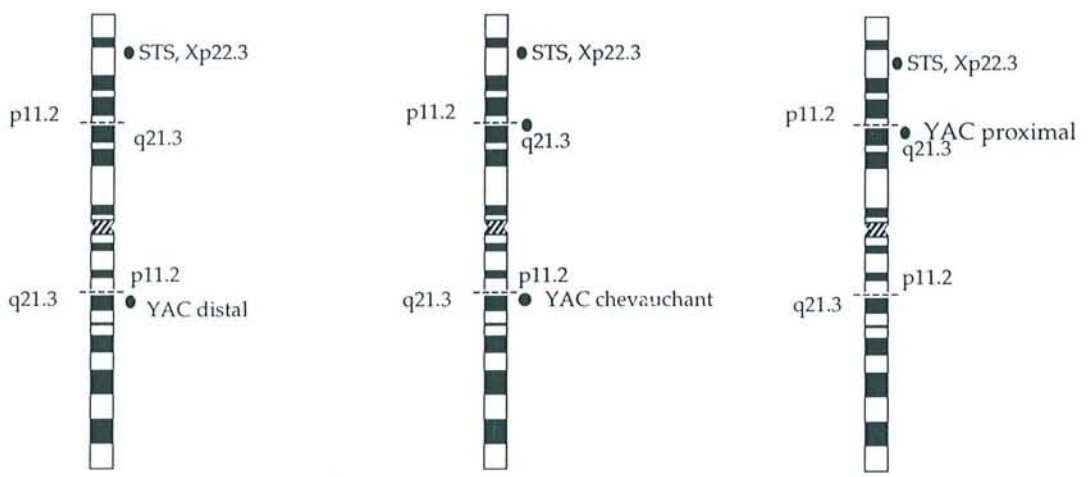


figure 13 : *Localisation par FISH du point de cassure du chromosome X inversé à l'aide de YAC de la région Xq21.3*

Nous avons, pour l'étude du point de cassure en Xp11.2, utilisé le même principe de localisation par FISH. Cependant à l'inverse du point de cassure en Xq21.3, si le YAC de la région Xp11.2 donne un signal sur le bras opposé de la sonde STS, il est proximal au point de cassure en Xp11.2 (figure 14). Au contraire, un signal du YAC sur le même bras que la sonde STS, montre que le YAC est distal au point de cassure en Xp11.2 (figure 14).

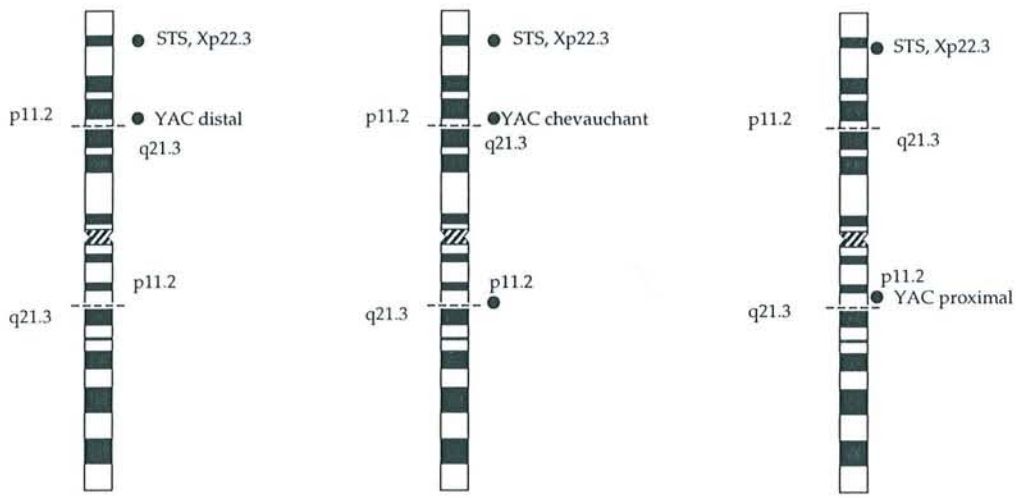


figure 14 : *Localisation par FISH du point de cassure du chromosome X inversé à l'aide de YAC de la région Xp11.2*

Pour les deux points de cassure, la présence simultanée de deux signaux, de part et d'autre du centromère, indique que le YAC chevauche le point de cassure (figures 13 et 14).

2. Le chimérisme des YAC

Une hybridation sur des métaphases normales contrôle la spécificité de chacun des YAC. Le YAC est cohybridé avec une sonde centromérique du chromosome X et donne un signal spécifique de la région attendue. Nous avons écarté de notre étude les YAC chimériques. Ces derniers présentent une spécificité différente ou supplémentaire de celle pour laquelle le YAC est décrit (figure 15). Ils sont le résultat d'une coligation d'un fragment spécifique de la région désirée avec un ou plusieurs fragments provenant de régions différentes. En tenant compte du faible taux de représentativité de notre échantillon nous pouvons estimer ce chimérisme à 10%. Nous avons

rencontré 1 YAC chimérique sur 14 étudiés dans la région Xq21.3, et 3/19 dans la région Xp11.2. Une étude réalisée sur l'ensemble du génome, par Slim, met en évidence un taux de chimérisme de l'ordre de 30%, dans la banque du CEPH (Slim et al., 1995). Au cours de notre travail nous avons utilisé des YAC provenant d'un ensemble de banques plus ou moins chimériques (CEPH, ICRF, ICI, UP, WU) justifiant un pourcentage de chimérisme plus faible.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

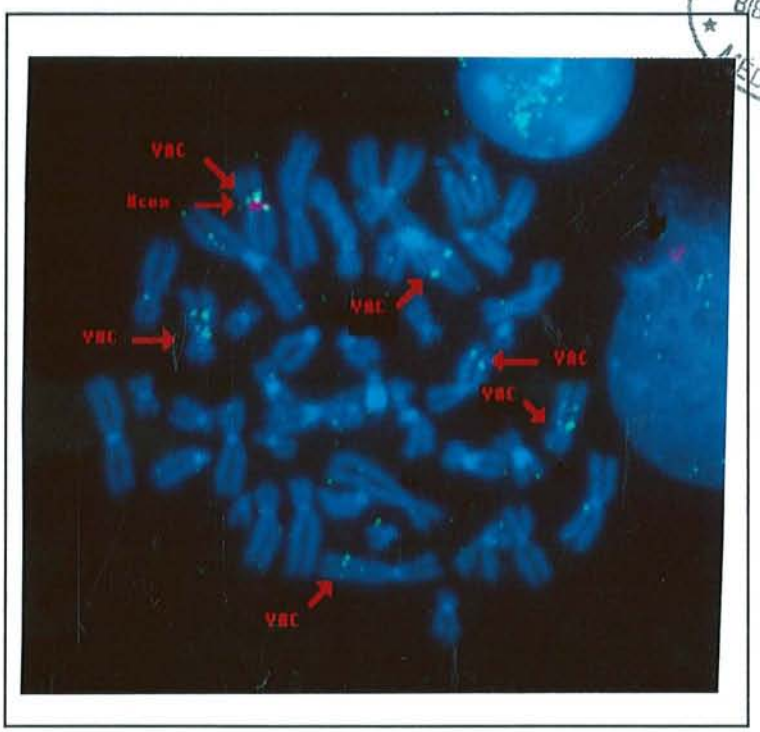


figure 15 : *le YAC CEPH715H4 est hybridé sur des chromosomes normaux en métaphase : le YAC est chimérique*

3- Localisation, par FISH, du point de cassure en Xq21.3

Ce travail a fait l'objet d'une collaboration (Dr C. Philippe, Dr. A.P Monaco, Oxford).

La région CPX est localisée dans la région Xq21.3 entre les marqueurs DXS1002 et DXYS1X (Forbes et al., 1995). Afin de déterminer si le point de cassure se produit dans la région CPX et, par conséquent, peut être à l'origine de la fente sous-muqueuse chez Cédric, l'étude est réalisée par FISH à l'aide d'un ensemble ordonné de YAC choisi entre les marqueurs DXS1002 et DXY1X.

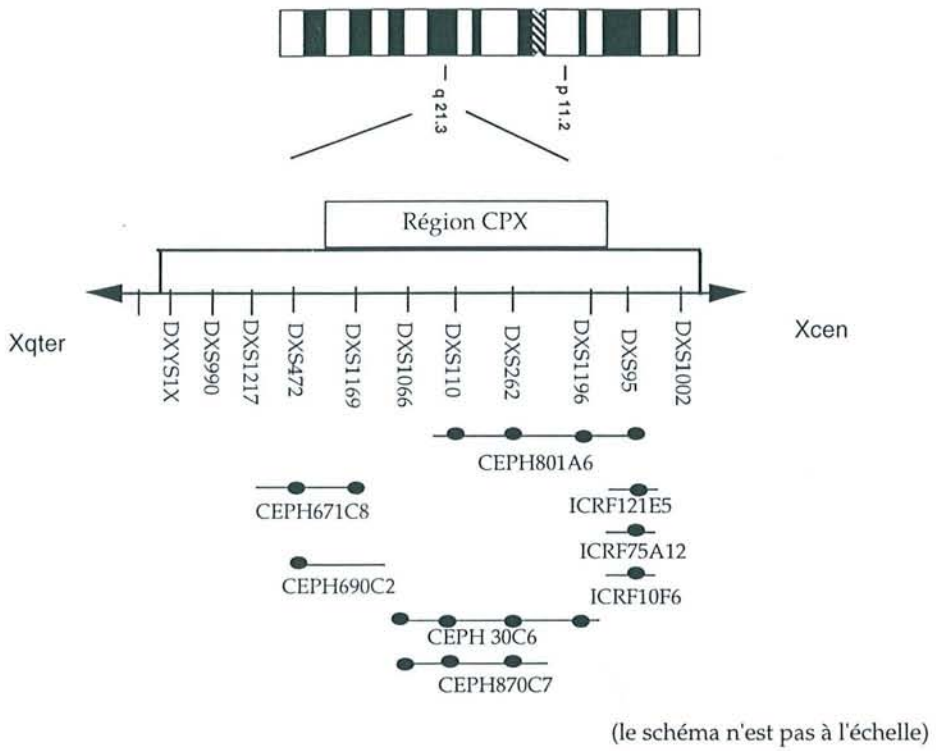


figure 16 : *Carte physique en Xq21.3 de la région CPX*

Les YAC **CEPH801A6, ICRF121E5, ICRF10F6, ICRF75A12,** positionnés entre les marqueurs **DXS95** et **DXS110** (figure 16) ont été localisés sur le même bras que la sonde STS. Ils sont donc proximaux au point de cassure (figure 17).

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
ÉDECINE

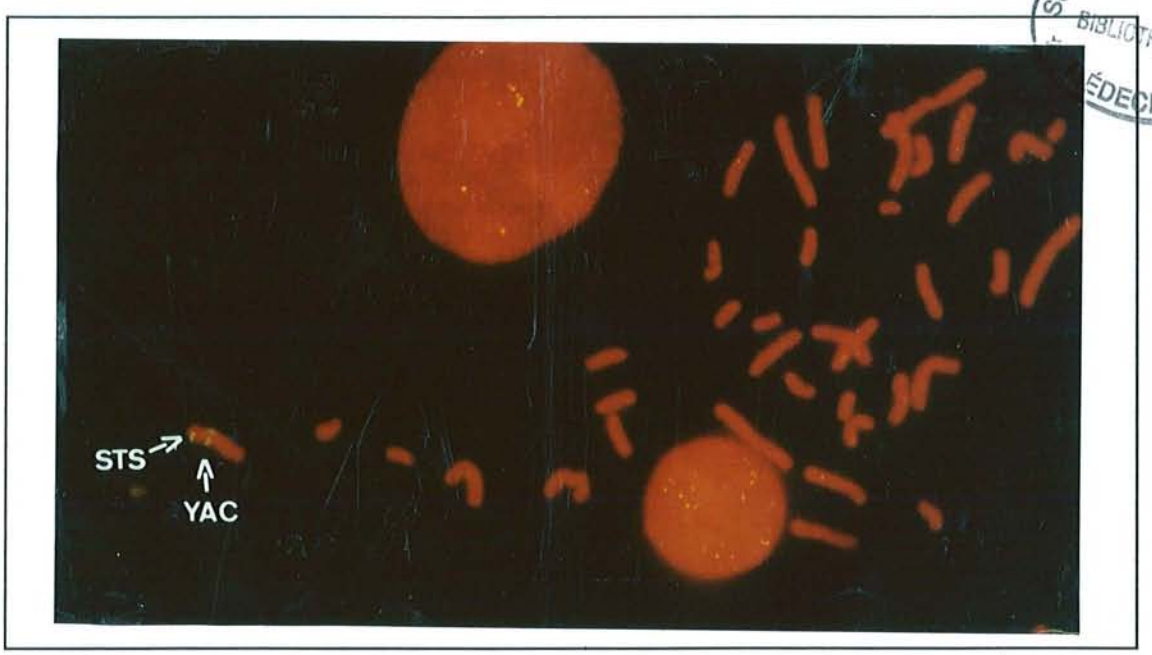


figure 17 : *le YAC ICRF75A12 est hybridé sur les chromosomes prométaphasiques de Cédric: le YAC est proximal par rapport au point de cassure*

Les YAC plus distaux **ICRF30C6, CEPH870C7** couvrent la région entre les marqueurs **DXS1196** et **DXS1066**. Le YAC **CEPH870C7** est proximal par rapport au point de cassure en Xq21. Le YAC **ICRF30C6** a été écarté de l'étude en raison de son chimérisme. Dans la partie la plus distale de la région CPX, nous avons testé les **YAC CEPH671C8** et **CEPH690C2** (figure 16) qui se révèlent également proximaux au point de cassure. Ces résultats ont permis d'exclure la localisation du point de cassure dans la région CPX (Sloan-Béna et al, 1998).

L'étude a été poursuivie au sein de la région d'homologie X-Y (figure 18). Par la présence d'homologie entre les deux chromosomes sexuels au sein de cette région, tous les YAC hybridés donnent simultanément un signal sur le chromosome Y. Huit YAC différents ont été localisés par rapport au point de cassure parmi lesquels le YAC **ICI25FD6** (220 kb) chevauche le point de cassure de Cédric (figure 19a). Ce même YAC chevauche également le point de cassure de la mère de Cédric (figure 19b); il est donc localisé dans l'intervalle : **X cen- DXYS114- point de cassure- DXYS118- Xtel** (figure 18).

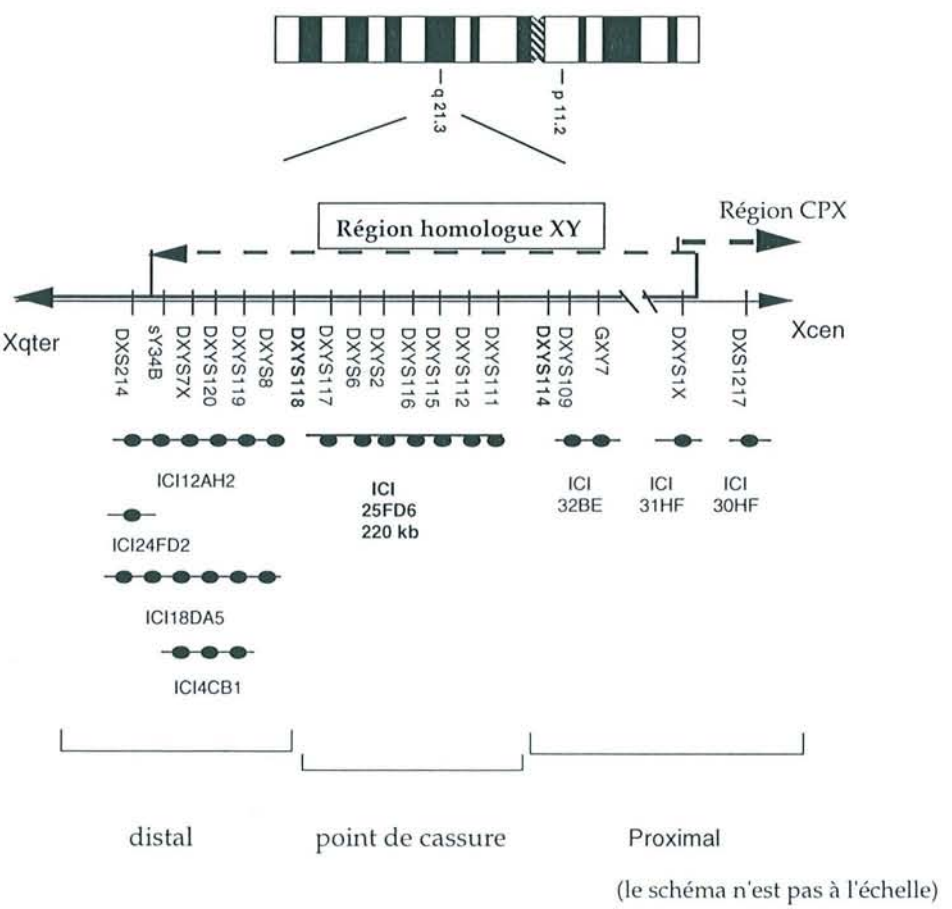


figure 18 : *carte physique de la région du point de cassure en Xq21.3 dans la région XY homologue*

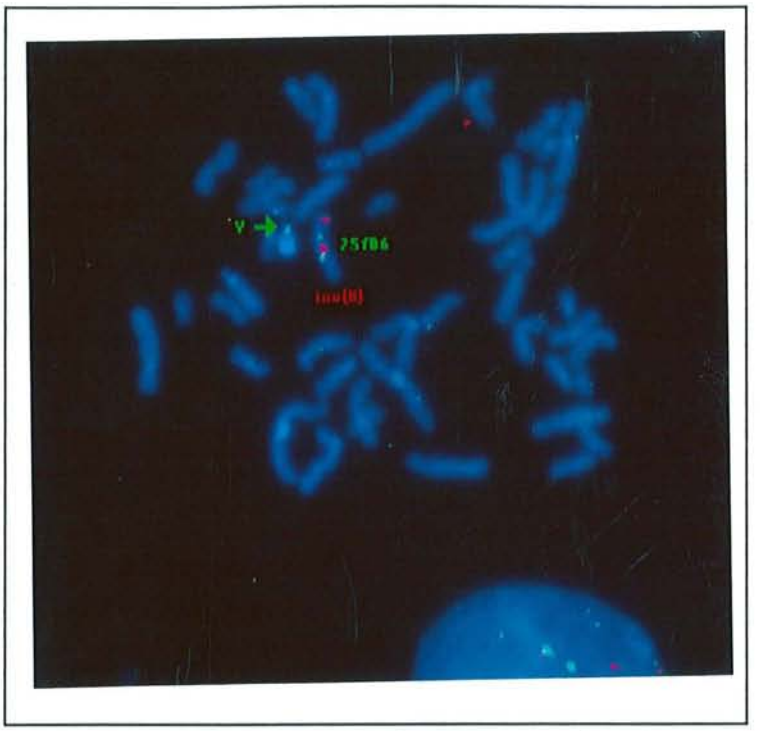


figure 19(a) : *FISH du YAC ICI25FD6 sur les chromosomes prométaphasiques de Cédric: le YAC chevauche le point de cassure*

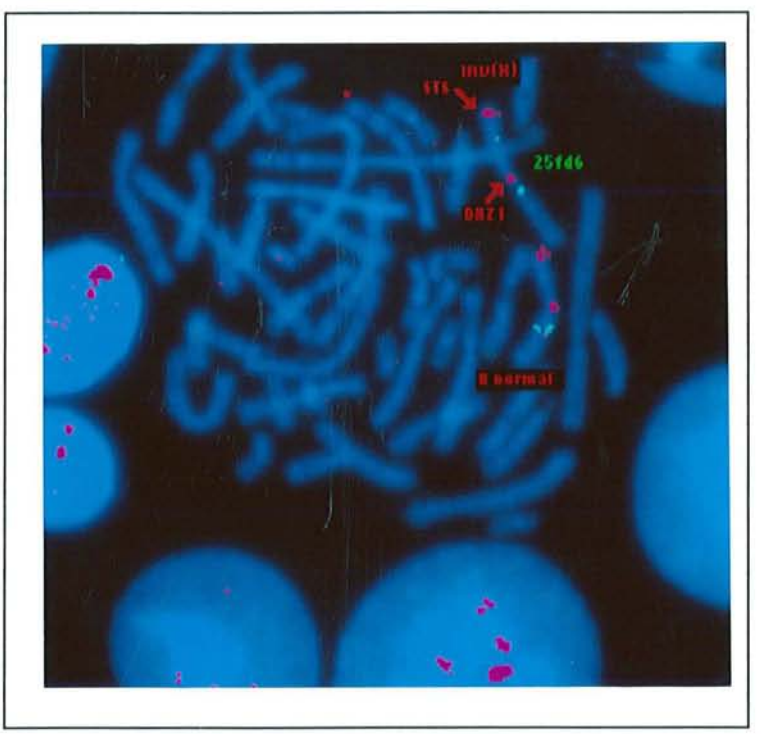


figure 19(b) : *FISH du YAC ICI25FD6 sur les chromosomes prométaphasiques de la mère de Cédric: le YAC chevauche le point de cassure*

4- Localisation par FISH du point de cassure en Xp11.2

4-1 Isolement d'un YAC chevauchant le point de cassure

Nous avons testé des YAC appartenant à la région Xp11.22 (Miller et al., 1995). Les YAC **CEPH967D4, CEPH964E12, CEPH923D3, CEPH687G3, CEPH649F6,** localisés dans la région entre les marqueurs **DXS1000 et DXS991** (figure 20) se sont révélés proximaux par rapport au point de cassure (figure 21).

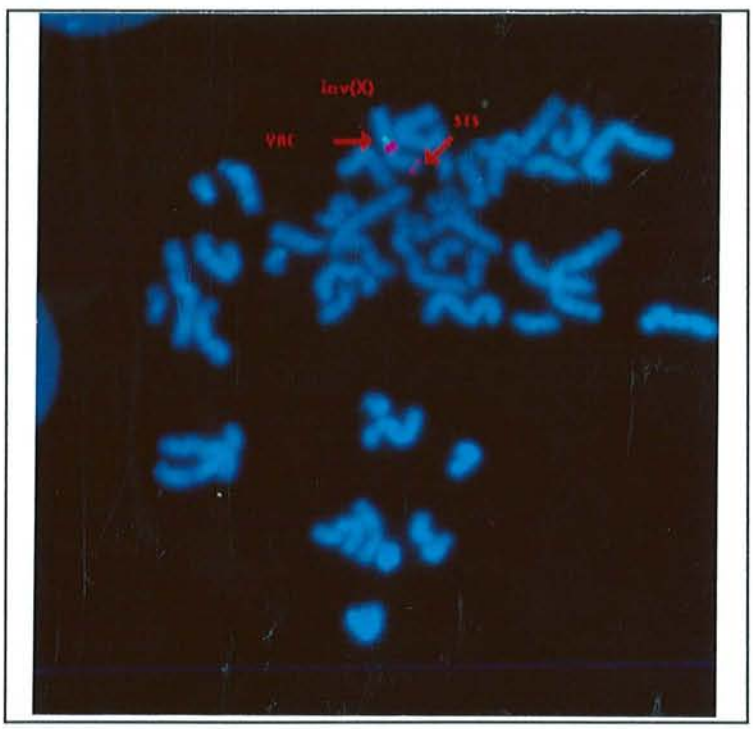


figure 21 : *le YAC CEPH 967D4 est hybridé sur les chromosomes prométaphasiques de Cédric: le YAC est proximal par rapport au point de cassure*

Trois YAC appartenant aux régions cytogénétiques Xp11.23 et Xp11.3 ont été localisés par rapport au remaniement. Le YAC **ICRFc1022,** contenant les gènes **ARAF1** et **SYN1** (figure 20) est distal par rapport au point de cassure.

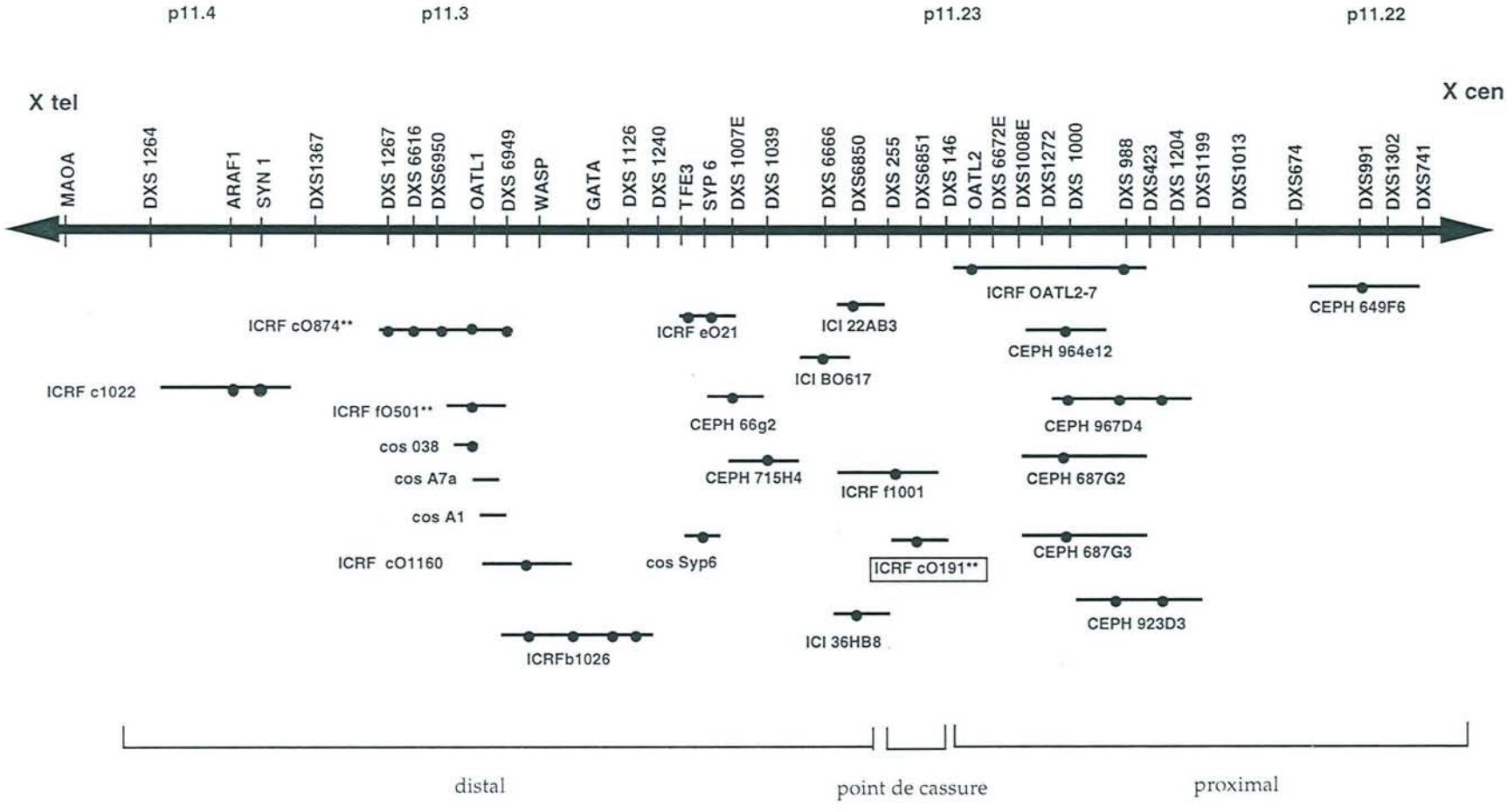


figure 20: *carte physique de la région du point de cassure en Xp11.2*
*** : une banque de cosmides a été réalisée à partir de ce YAC*
□: YAC chevauchant le point de cassure

(le schéma n'est pas à l'échelle)

Le YAC **ICRFcO874** contenant les marqueurs **DXS6949, OATL1, DXS6950, DXS6616, DXS1267** et le YAC **ICRFfO501** positif avec le marqueur **OATL1,** donnent deux signaux localisés de part et d'autre du centromère du chromosome X. Les deux YAC semblent chevaucher le point de cassure de l'inversion en Xp11.2. Le point de cassure serait positionné entre les marqueurs **DXS6950 et WASP** (figure 20).

Les YAC **ICRFcO874 et ICRFfO501,** mesurant 630 kb et 450 kb respectivement, ont été sous clonés en deux banques de cosmides dans sCOGH2. Au cours d'un stage dans le laboratoire de génétique du Dr. A. Monaco, nous avons sous cloné ces deux YAC dans une banque de cosmides.

En parallèle à la construction de ces banques, nous avons souhaité affiner la localisation du point de cassure en testant quatre cosmides de la région du point de cassure qui nous ont été aimablement fournis par le Dr H. Van Bohkoven (Nijemegen, Pays Bas). Les cosmides A1 et 038 correspondent à chacune des extrémités du YAC ICRFfO501, alors que cosA7 correspond à une région interne du même YAC. Le cosmide Syp6 localisé dans une région plus proximale contient le gène de la synaptophysine (figure 22)(Ozcelik et al., 1990).

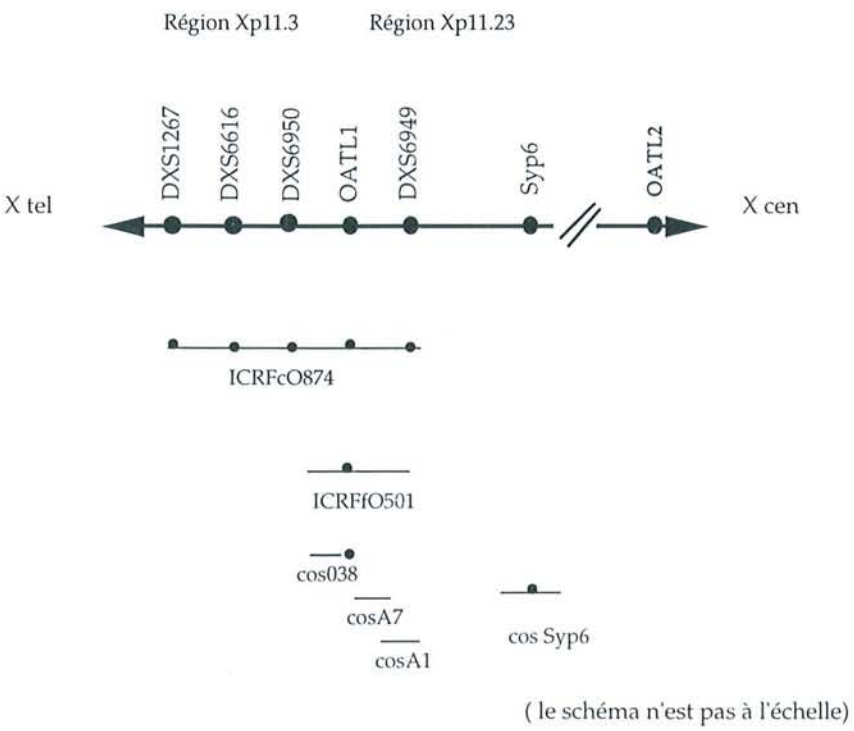


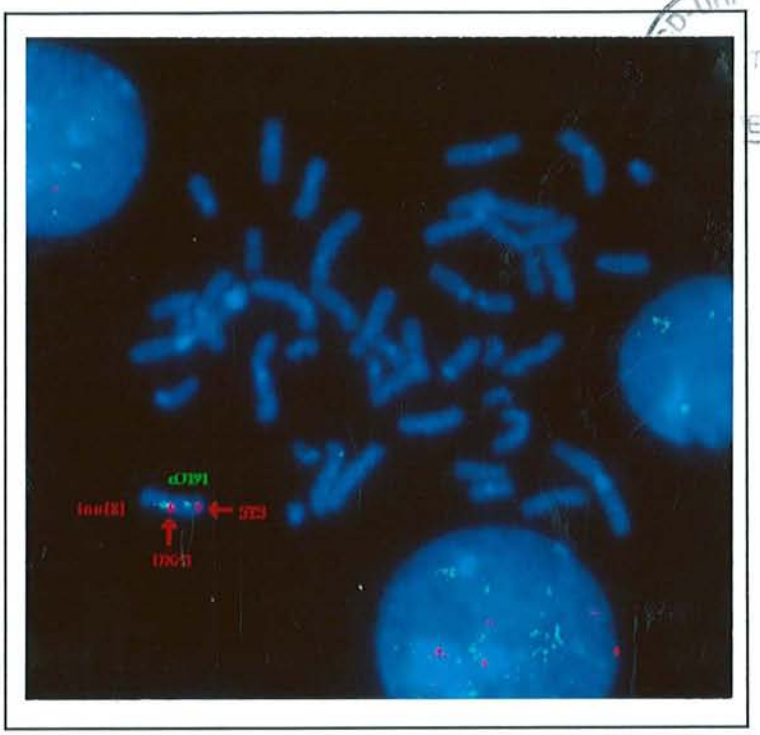
figure 22 : *Carte de la région Xp11.2 /Xp11.3 incluant les deux pseudogènes OATL 1 et OATL2.*

Le cosmide cos038 donne deux signaux de part et d'autre du centromère du chromosome X inversé paraissant chevaucher le point de cassure. Cependant, les cosmides A1, A7 et syp6 sont distaux par rapport au point de cassure. Ce résultat ne confirme pas que le YAC ICRFfO501 chevauche le point de cassure. Si le point de cassure était localisé au sein du cos038, alors les cosmides A1, A7 et syp6 devraient être proximaux par rapport au point de cassure (figure 22).
Nous pouvons expliquer ces résultats par la présence dans la région Xp11.22-Xp11.3 de deux séquences homologues OATL1 en Xp11.3-p11.23 et OATL2 en Xp11.22-11.23 (Figure 20).
Ces deux pseudogènes sont des homologues du gène de *l'ornithine aminotransférase* (*OAT*) localisé sur le chromosome 10 en q26 (Ramesh et al., 1987) (Geraghty et al., 1993). Les deux séquences OATL1 et 2 séparées par moins de 1 Mb ne peuvent être indivisualisées (Chand et al., 1995) par des expériences de FISH sur chromosomes prométaphasiques normaux.

Les deux YAC **ICRFCOfO501** et **ICRFcO874** ne chevauchent donc pas le point de cassure mais reconnaissent les séquences homologues communes aux pseudogènes OATL1 et 2. Les deux pseudogènes sont séparés par le point de cassure de l'inversion.
Le cosmide Syp6 est le dernier élément distal testé qui permet de conclure que le point de cassure est localisé entre **TFE3** (transcription Factor Enhancer 3) et **DXS6672E**.

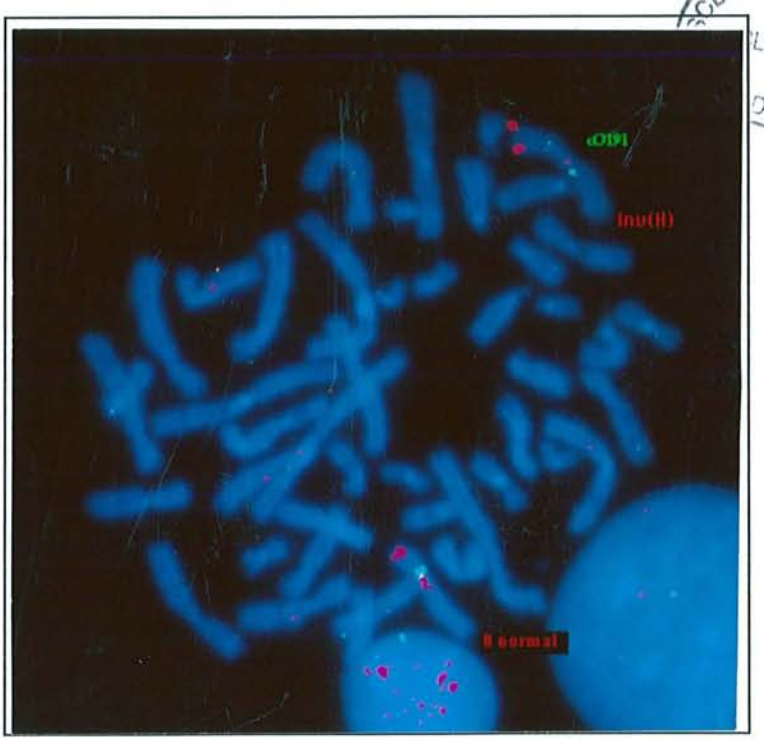
Nous avons poursuivi notre étude en analysant un ensemble de YAC contenus entre ces marqueurs. Les YAC **ICRFb1026, ICRFe021, ICRFf1001, ICI36HB8** (figure 20) sont distaux au point de cassure.
L'hybridation du YAC **ICRFcO191** contenant la région du marqueur **DXS6851** (figure 20) produit deux signaux de part et d'autre du centromère du chromosome X inversé (figure 23a) nous permettant de déduire que ce YAC chevauche le point de cassure. L'intensité du signal fluorescent est plus importante sur le bras long que sur le bras court indiquant que le point de cassure est situé dans la partie distale de ce YAC non chimérique, de 360 kb.
Le YAC ICRFcO191 se comporte de la même façon sur l'X inversé de la mère de Cédric (figure 23b). Nous pouvons en déduire qu'à ce niveau de résolution de l'étude, la mère et son fils portent la même translocation.

A ce stade de l'étude, le point de cassure en Xp11.22 de l'inversion était cerné dans un intervalle de 360 kb au sein du YAC ICRFcO191 : **Xcen-DXS255- point de cassure- DXS146- Xtel.**



SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
DE MÉDECINE

figure 23a : *Hybridation du YAC ICRF c0191 sur les chromosomes prométaphasiques de Cédric : le YAC chevauche le point de cassure.*



SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
DE MÉDECINE

figure 23b : *Hybridation du YAC ICRF c0191 sur les chromosomes métaphasiques de la mère de Cédric: le YAC chevauche le point de cassure.*

4-2 Réalisation de banques de cosmides à partir des YAC ICRFfO501, ICRFcO874 et ICRFcO191

Pour affiner la localisation de ce point de cassure, le sous clonage de ces YAC est réalisé à partir d'ADN extrait de la levure contenant le YAC selon le protocole décrit dans "matériels et méthodes". Au cours de la réalisation d'une banque de cosmide, l'ADN utilisé pour la digestion partielle doit présenter un haut poids moléculaire. Pour ce faire, l'ADN total est précautionneusement extrait puis digéré partiellement par l'enzyme SauIIIA afin d'obtenir des fragments d'une taille de 30 à 40 kb. Les fractions obtenues sont contrôlées (figure 24), celles de taille requise (fractions 1, 2, 3, 4) pour ce clonage ont été rassemblées.

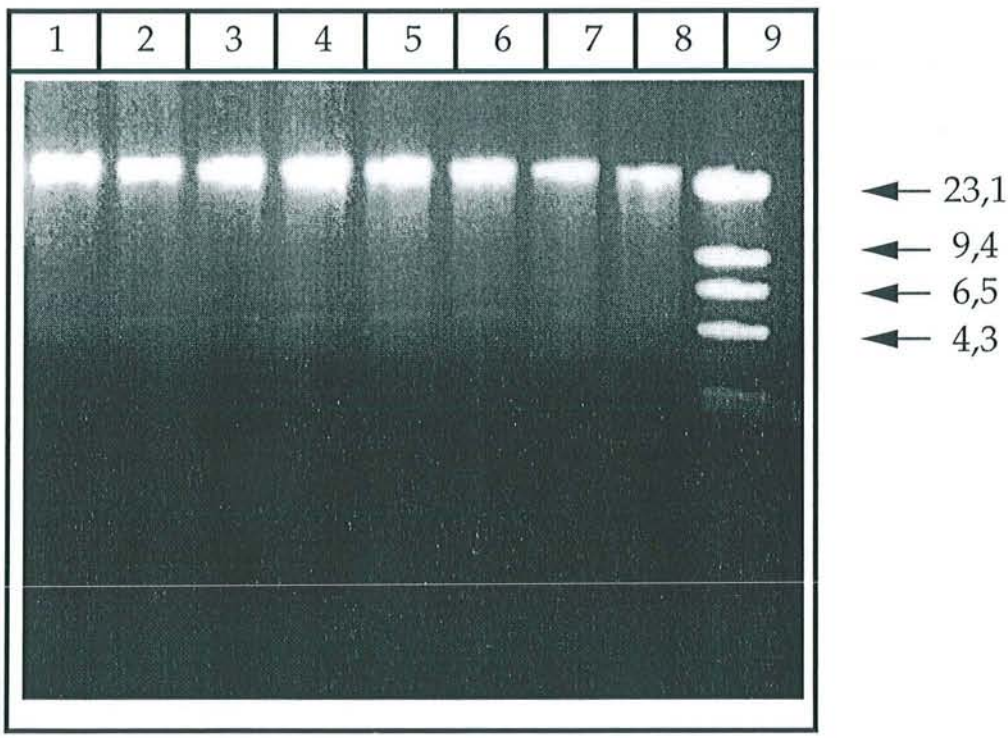


figure 24 : *contrôle de digestion partielle de l'ADN total levure total par SauIIIA selon un temps de digestion croissant en seconde pour une concentration d'enzyme donnée*

En parallèle, l'ADN du vecteur est linéarisé puis déphosphorylé. L'efficacité de la déphosphorylation des extrémités du vecteur est évaluée par un test de ligation du vecteur en présence de ligase (figure 25) :

La ligase ne permet pas la ligation du vecteur si les extrémités de celui-ci sont correctement déphosphorylées (piste 2). La présence d'une kinase permet d'ajouter un groupement phosphate aux extrémités 5' du vecteur et rend ainsi possible la ligation, entraînant la formation de concatemère de vecteur (piste 3).
Le contrôle (piste 1) en l'absence d'enzyme de modification, montre le vecteur linéaire à 11,2 kb. Une électrophorèse permet d'évaluer la taille de chacun des fragments.

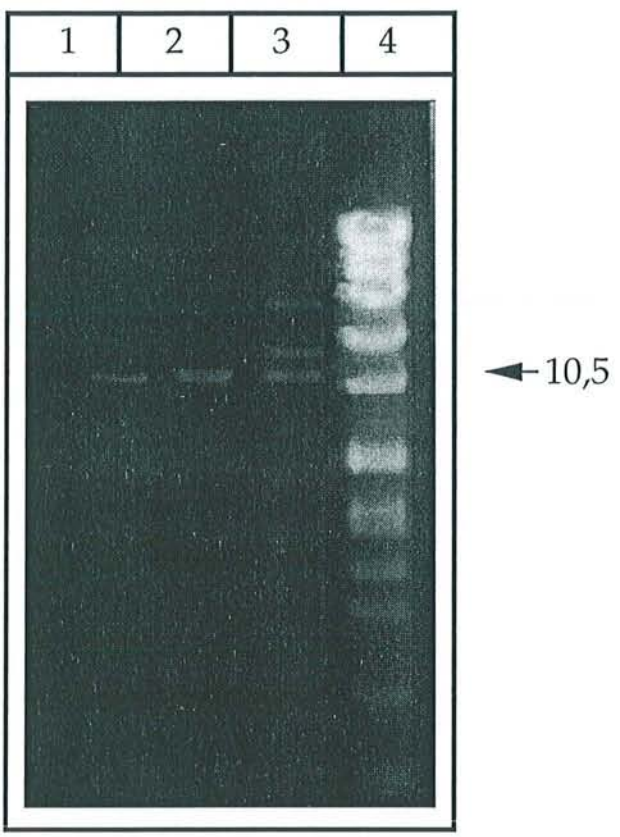


figure 25 : *test de déphosphorylation des extrémités du vecteur*
1 : ADN du vecteur sans enzyme de modification
2 : ADN du vecteur en présence de ligase
3 : ADN du vecteur en présence de ligase et de kinase
4 : Marqueur de taille

L'ADN partiellement digéré est ligaturé au vecteur, puis le produit de ligation est empaqueté dans des têtes de phage à l'aide du kit Gigapack GoldIII- Stratagène. Les têtes de phages ont été utilisées pour transfecter des bactéries XL1Blue-MR compétentes.

Les suspensions de phages sont ensuite titrées :
Titre de la banque **ICRFfO501 : 77 colonies/µl**
Titre de la banque **ICRFcO874 : 603 colonies/µl**
Titre de la banque **ICRFcO191 : 158 colonies/µl**
Après étalement en milieu sélectif, les colonies obtenues font l'objet d'une étape de criblage. Les membranes répliques des boites de culture sont hybridées avec de l'ADN placentaire humain. Un nombre minimum de clones à isoler est nécessaire pour une bonne représentativité de l'ensemble de l'insert de chacun des YAC.

En tenant compte de la taille moyenne de 30 kb de l'insert dans un cosmide, 21 cosmides sont attendus pour couvrir une fois le YAC **ICRFCO874** (630 kb). Une représentativité optimale est obtenue en couvrant sept fois le YAC ce qui implique d'isoler 150 cosmides
Le sous clonage est réalisé à partir de l'ADN total levure (14 Mb)-YAC (0,6 Mb) : le YAC ne représente donc que 4,1% du génome de la levure. Il nous faut donc isoler (150/4) X100 : **3700 colonies.**
Pour les **YAC ICRFfO501 et YAC ICRFcO191, 3200** et **3300** colonies ont été isolées respectivement.

Les banques de cosmides issues des YAC **ICRFfO501, ICRFcO874,** contenant chacune une centaine de clones, n'ont pas été exploitées puisque ces YAC ont été exclus de la région du point de cassure.

Les clones de la banque **ICRFcO191** ont été contrôlés pour vérifier la présence d'un insert et estimer la taille de celui-ci. Pour cela, l'ADN des minipréparations, de chacun des clones, a été digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. Les digestions sont contrôlés par électropohorèse (figure 26). La piste 1 (marqueur de taille) correspond au phage Λ digéré par HindIII. La digestion, par EcoRI, du vecteur recombinant ou non, produit un fragment constant de 4 kb (pistes 2, 3, 4 et 5).
Les autres fragments, de taille variable, nous indiquent, en les additionnant, la taille approximative de l'insert de chaque clone.

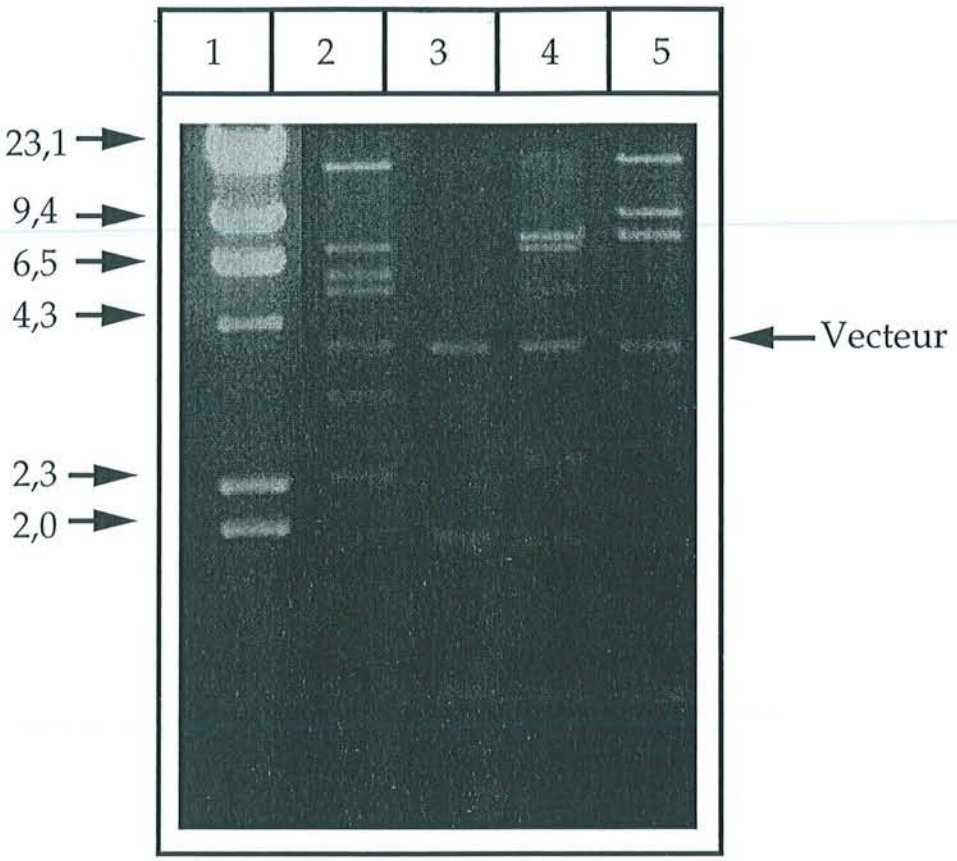


figure 26 : *migration de quatre clones de cosmides issus de la banque ICRFcO191 digérés par l'enzyme de restriction EcoRI*

Les inserts de ces quatre clones ont une taille variant entre 10 kb et 40 kb. Le clone de la piste 3 ne possède pas d'insert, les fragments obtenus correspondent au vecteur. La taille moyenne obtenue sur l'ensemble de ces trois clones est de 25 kb (pistes 2, 4 et 5) (figure 26).
Soixante cinq cosmides sont issus du YAC **ICRFcO191**. La taille du YAC étant de 365 kb, ces 65 clones le couvrent 5,5 fois.

4-3 Recherche d'un cosmide chevauchant le point de cassure en Xp11.2

Les cosmides sont testés à leur tour par FISH sur les chromosomes métaphasiques de GC en cohybridant la sonde STS localisée en Xp22.3. Nous avons localisé 14 cosmides, 11 sont proximaux et 3 distaux. Cette étude a été poursuivie par F. WUILQUE, qui a analysé un total de 30 cosmides. La répartition des cosmides par rapport au point de cassure en fait apparaître 9 distaux, et 17 proximaux.

Cette répartition dans la position des cosmides confirme la localisation distale du point de cassure au sein du YAC ICRFcO191. **Un cosmide (E1) chevauchant présente un signal de part et d'autre du centromère du chromosome X inversé** (figure 27).

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

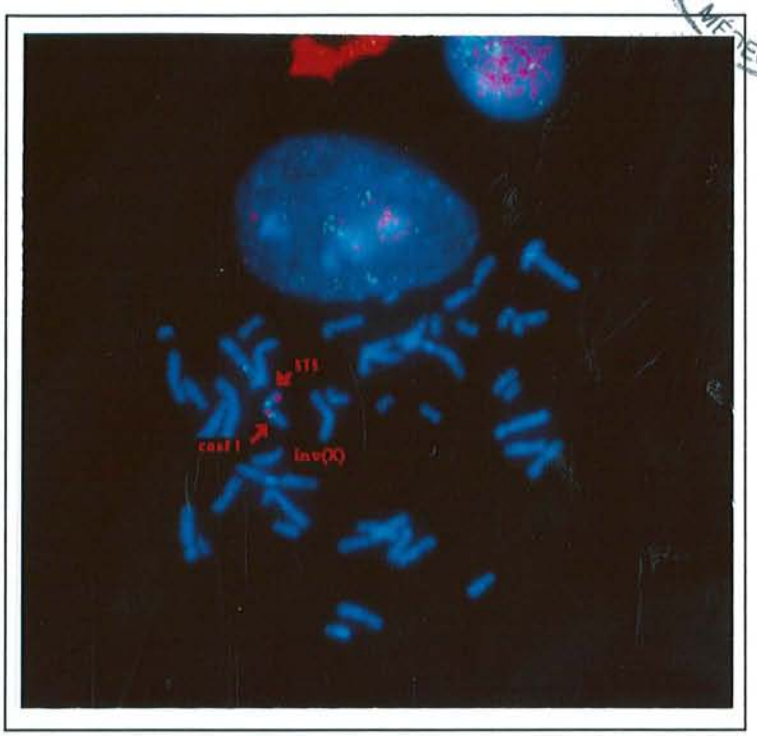


figure 27 : *Localisation, par FISH, du cosmide E1 chevauchant le point de cassure en Xp11.2 de Cédric*

L'intensité de fluorescence des signaux sur chacun les bras p et q sur le chromosome inversé nous permet d'en déduire que le point de cassure est vraisemblablement situé dans le 1/3 proximal du cosmide E1.

Le cosmide E1 est hybridé chez la mère de Cédric et chevauche également le point de cassure. Nous pouvons affirmer qu'à ce stade de résolution de l'étude le remaniement présent chez Cédric est le même que celui de sa mère

Parmi les 30 cosmides testés, deux ne présentent pas de spécifité pour la région Xp11.23, mais s'hybrident sur la paire d'autosome 5. Ce résultat nous indique que le YAC ICRFcO191C1 est chimérique, alors que son contrôle, par FISH sur métaphase normale, le désignait spécifique pour la région Xp11.23. Selon Slim, la sensibilité de la méthode de détection de chimérisme, par FISH, est fonction de la proportion des fragments dans l'insert d'ADN (Slim et al., 1995).

4-4 Cartographie par PCR de 5 EST sur le YAC ICRFcO191

L'étape suivante consiste en la recherche de séquences exprimées au sein de l'intervalle défini par notre cartographie. Nous disposions de 5 EST clonés dans le cadre du programme Genexpress. (Houlgatte et al., 1995). Ces ADNc partiels dérivent d'une banque d'ADNc de cerveau foetal humain (tableau IV).

Nom de l'EST	Taille	N°accès GDB	Localisation	Résultat
Bdy70c01	83 pb	Z24913		-
Bdy96e03	178 pb	FO1051	Xp11.22q11.1	-
Cda02g11	104 pb	FO1412	Xp21.2p11.23	-
Cda0aa10	118 pb	Z38402	Xp21.2p11.23	-
Cdy1ad09	205 pb	Z43374	Xp11.22q11.1	+

Tableau IV : *Les EST contenus dans la région Xp11.2*

Sur les cinq EST de la région testés, seul **Cdy1ad09** a pu être amplifié à partir du YAC ICRFcFO191. Une bande spécifique de 242 pb est obtenue. Nous avons localisé cet EST au sein de l'intervalle de 360 kb défini par le YAC ICRFcO191.
Il n'a pas été possible d'amplifier l'EST Cdy1ad09 au sein du cosmide E1.

4-5 Isolement d'ADNc selon la technique de sélection d'ADNc au sein du cosmide chevauchant E1

Ce travail a été réalisé par F. WUILQUE. L'analyse moléculaire du cosmide chevauchant E1 révèle que la taille de l'insert humain est voisine de 25 kb. A ce stade de l'étude la région du point de cassure est isolée dans 25 kb.
En tenant compte du retard mental présenté par Cédric, la recherche d'ADNc a été effectuée à partir d'une banque d'ADNc de cerveau foetal.
Cette expérience a permis d'isoler **5 ADNc de cerveau foetal** correspondant potentiellement à des séquences uniques localisées dans la région du point de cassure. Ces ADNc clonés dans le vecteur pGFPCR servent d'outils de base pour la recherche d'un gène potentiel.

III- Discussion

Nous avons étudié une inversion péricentrique familiale associée à un retard mental léger, probablement non syndromique. La même inversion est observée, chez la mère dont le phénotype est normal. L'étude de l'inactivation du chromosome X montre une inactivation préférentielle du chromosome X inversé. Il est donc possible d'envisager une pathologie de point de cassure au sein de l'inversion (Xp11 et Xq21) chez ce garçon. Existe-t-il dans l'une de ces régions des gènes candidats dont l'altération puisse être responsable des traits cliniques observés?

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence est une approche directe, pour localiser un point de cassure au sein d'un ensemble de YAC ordonnés. Par cette méthode, les YAC ICI25FD6 et ICRFcO191C1, chevauchant respectivement les points de cassure Xq et Xp, ont été isolés. Pour le point de cassure en Xp11.2, l'étude a été conduite jusqu'à l'isolement d'un cosmide (E1) de 25 kb qui chevauche le point de cassure dans sa région 1/3 proximale. L'EST Cdy1ad09 n'est pas amplifié dans le cosmide E1, ce qui n'exclut pas qu'il puisse rester un gène potentiel pour notre étude. Nous avons supposé que le YAC ICRFcO191 contenait un gène responsable de retard mental mais en présence d'une inversion péricentrique du chromosome X, nous ne pouvons exclure toutefois l'implication du point de cassure en Xq21.3. De plus, le remaniement peut être associé à un microréarrangement délétionnel plus complexe, justifiant l'inactivation préférentielle du chromosome X inversé chez la mère.

Les déficiences mentales liées au sexe sont la cause la plus fréquente de retards mentaux héréditaires. Parmi l'ensemble des formes de retard mental non syndromiques liées à l'X (RMX) décrit, 14 sont localisées dans une région qui inclut Xp11.2 et 10 pour Xq21.3 (Lubs, et al., 1996). Dans la région du point de cassure Xp11.23, le gène de retard mental non syndromique MRX50 présente un intérêt particulier puisqu'il est localisé par analyse de liaison dans un petit intervalle Xp11.21-Xp11.3 (Claes et al., 1997). La description de remaniements associés à un retard mental syndromique ou non devrait faciliter l'isolement de ces gènes. Par exemple, un remaniement *de novo* t((X;2)(q22;p25) est décrit chez une fille chez laquelle il est associée à une lissencéphalie. L'étude moléculaire du point de cassure sur le

chromosome X a conduit au clonage du gène *doublecortine* responsable d'hétérotopies laminaires et de lissencéphalies isolées (des Portes et al., 1998). Un autre remaniement t(X;12)(q12;q15) a conduit à l'isolement du gène*oligophrenin 1* responsable de retard mental non syndromique lié à l'X (Billuart, communication personnelle, 1998). La région Xq21.3 est impliqué au sein d'une inversion paracentrique du chromosome X, inv(X)(q21q24) chez un garçon présentant un retard mental léger (Abelovich et al., 1995). Dans notre cas, Cédric présente un retard mental léger accompagné d'autres signes cliniques. Il est possible que l'ensemble des signes cliniques chez ce patient constitue un tableau associé à un syndrome. Dans le cas d'un retard mental non syndromique nous pouvons envisager que l'un ou l'autre des points de cassure de l'inversion soit à l'origine de ce retard mental. Néanmoins, le point de cassure en Xp11.2 apparaît comme un meilleur candidat puisqu'un plus grand nombre de RMX est décrit dans cette région.
Les autres signes du tableau clinique de Cédric sont constitués d'une petite taille, une fente palatine sous muqueuse et un macroorchidisme prépubertaire. La petite taille ne semble pas liée au remaniement puisque le père du patient, dont le caryotype est normal, est également de petite taille. La fente palatine sous muqueuse aurait pu être associée au point de cassure intervenant dans la région Xq21 puisque la région CPX est décrite en Xq21.3 entre les marqueurs DXS1002 et DXYS1X. Cependant, la cartographie par FISH a localisé le point de cassure dans un intervalle distal à la région CPX. Par ailleurs, l'exclusion de la région CPX a été confirmée par PCR, en testant l'ensemble des STS de la région CPX, écartant ainsi l'hypothèse d'une éventuelle délétion associée. L'ensemble de ces études semble exclure chez ce patient l'implication du point de cassure en Xq21 dans la fente palatine.
Dans la littérature, un modèle de souris transgénique est décrit chez lequel l'insertion d'un transposon entraîne une fente palatine liée à l'X. Le transposon est inséré proche du locus *araf* dans la région proximale du chromosome X de la souris. Il semblerait que le locus interrompu chez la souris présente un analogue d'un locus humain, responsable d'une forme de fente palatine liée au sexe (Wilson et al., 1992). Cette région d'homologie contenant le gène *ARAF1* est localisée en Xp11.4, et montre une localisation distale de plusieurs Mb de notre point de cassure en Xp11.23. Ceci nous permet donc d'exclure, chez Cédric, l'implication du point de cassure en Xp11.23 dans ce gène de la fente palatine.

Nous pouvons envisager que le point de cassure en Xq21.3 puisse être responsable du macroorchidisme puisqu'il intervient dans la région

d'homologie X-Y. Le point de cassure en Xq21 se produit dans la région critique (Xq13-q26) nécessaire au développement et à la fonction gonadique (Therman et al., 1990). Le remaniement pourrait interrompre un gène au sein de cette région de séquences impliquées dans le développement testiculaire et être à l'origine du macroorchidisme chez le patient.

DEUXIEME PARTIE

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA TRANSLOCATION (X;22)(p11;p11) OBSERVEE DANS UN CAS DE SYNDROME DE RETT

I- Le syndrome de Rett

1- Présentation clinique du syndrome de Rett

Le syndrome de Rett est une encéphalopathie sévère progressive qui se développe uniquement chez les filles (Rett, 1966). L'incidence des formes classiques est de 1 sur 15 000. Ce syndrome est caractérisé par un développement normal jusqu'à l'âge de 7 à 18 mois, puis une étape de stagnation du développement apparaît, suivie d'une détérioration des praxies manuelles, buccales et articulatoires, qui évoluera vers une régression motrice et cognitive plus globale à partir de la période prépubertaire. Une microcéphalie et un retard de croissance sont mis en évidence chez 85 à 94% des sujets atteints de ce syndrome. Le diagnostic s'appuie sur un ensemble de signes cliniques et paracliniques définis par des critères internationaux (tableau V) (Hagberg et al., 1983).

2- Aspects génétiques du syndrome de Rett (RS)

L'étiologie du syndrome de Rett est, jusqu'à présent inconnue, mais l'hypothèse d'une origine génétique apparaît très probable. Un certain nombre d'arguments plaident en cette faveur :

- Ce syndrome présente la particularité d'affecter quasi-exclusivement des sujets de sexe féminin. Cette particularité est à l'origine de son classement parmi les maladies génétiques dominantes liées à l'X létales chez le garçon (MIM312750).
- Bien que le syndrome de Rett soit sporadique dans la plupart des cas, quelques rares cas familiaux décrits, semblaient montrer une transmission maternelle.
- Plusieurs cas de jumelles monozygotes concordantes sont rapportés (Tariverdian et al., 1987) (Partington et al., 1988). Les cas de gémellité dizygote, observés dans le cadre du RS montrent l'existence d'une discordance (Migeon et al., 1995).

Critères indispensables
Période pré et périnatale apparemment normale.
Développement psychomoteur apparemment normal durant les 6 premiers mois au moins (parfois 12-18 mois).
Périmètre crânien normal à la naissance.
Décélération de la croissance céphalique entre 6 mois et 4 ans.
Perte inexpliquée des activités manuelles volontaires entre 6 et 30 mois, associée à un trouble de la communication et de la relation sociale.
Développement de troubles du langage réceptif et expressif sévère associé à un retard psychomoteur apparemment sévère.
Perte des acquis psychomoteurs, sociaux et comportementaux.
Stéréotypie manuelle après perte des activités manuelles volontaires.
Début d'une apraxie de la marche et d'une apraxie/ataxie du tronc entre 1 et 4 ans.
Diagnostic habituellement provisoire jusqu'à l'âge de 2 à 5 ans.
Critères supplémentaires
Troubles respiratoires.
Apnées durant la veille.
Accès d'hyperventilation.
Spasmes respiratoires.
Expulsion brutale d'air ou de salive.
Anomalies électroencéphalographiques : tracé de base de veille ralenti et ralentissement intermittent à 3-5 Hz.
Décharges épileptiformes avec ou sans crises cliniques.
crises d'épilepsie (plus de 80% des sujets).
Spasticité souvent associée à une amyotrophie, des anomalies vasomotrices des extrémités et à des pieds hypotrophiques.
Maintien postural médiocre souvent associé à des mouvements involontaires du tronc.
Scoliose.
Retard de croissance statural.
Critères d'exclusion
Signes de retard de croissance intra-utérin.
Organomégalie et autres signes de maladie de surcharge.
Rétinopathie et atrophie optique.
Microcéphalie à la naissance.
Suspicion de lésion cérébrales acquises en période périnatale.
Existence d'une maladie métabolique identifiable ou d'une autre maladie neurologique progressive.
Maladie neurologique acquise après infection sévère ou traumatisme cérébral grave.

Tableau V: *critères diagnostiques internationaux du syndrome de Rett*

Il existe plusieurs hypothèses, sur la localisation génétique ainsi que le mode de transmission de cette pathologie.
Trois mécanismes de transmission génétique ont été envisagés :

- autosomique dominante, avec une expression sélective en fonction du sexe,
- une expansion de répétition de trinucléotides,
- liée à l'X dominante, létale ou non exprimée chez le sujet de sexe masculin.

L'hypothèse d'une pathologie monogénique, liée à l'X, et létale chez le sujet de sexe masculin, a développé plusieurs études sur ce chromosome (Schanen et al., 1997) :

- La région Xp21.2-Xq23 semble exclue, par analyse de liaison, (Ellison et al., 1992) (Curtis et al., 1993) (Schanen et al., 1997).
- Les régions Xq28 et Xp22.3, quant à elles, n'ont pas été exclues (Ellison et al., 1992) (Curtis et al., 1993) (Schanen et al., 1997) (Thomas et al., 1997).
- A ce jour, les études d'inactivation du chromosome X, chez les filles RS, apportent des résultats très différents : une inactivation non sélective de l'X chez ces patientes (Migeon et al., 1995) ou une inactivation préférentielle à plus de 65% en faveur de l'X paternel (Camus, et al., 1996).
- Une réplication précoce de la sous bande Xp21.2 au sein du chromosome X inactif, à réplication tardive, sur 36% des cellules analysées, chez une fille RS. La région Xp est proposée comme région critique dans le syndrome de Rett (Panasiuk et al., 1997).
- Plusieurs gènes codant des facteurs neurotrophiques, sont candidats pour cette atteinte neurologique. Certain d'entre eux ont pu être exclu soit sur le chromosome X (Shanen et al., 1997), soit sur des autosomes (Zhang et al., 1997). Les gènes M6, qui codent une glycoprotéine membranaire des neurones, sont localisés en 4q34 (M6a) et Xp22.2 (M6b). Le gène M6b, bien qu'appartenant à une région apparemment exclue par analyse de liaison, reste, selon Olinsky, candidat de par sa fonction pour des affections neurologiques, telles que le syndrome de Rett (Olinsky et al., 1996).

- Très peu de remaniements chromosomiques, ont été rapportés : deux cas de translocations chez des filles RS ont été décrits, impliquant, toutes deux, le chromosome X dans des régions différentes : Xp11.22 (Journel et al., 1990) et Xp22.11 (Zoghbi, et al., 1990). La translocation

t(X;22)(p11.22;p11) est décrite, dans une famille dont les deux filles RS sont porteuses de la translocation associée à une forme typique pour l'une et atténuée pour l'autre (Journel et al., 1990).

Bien que l'hypothèse d'une transmission liée à l'X selon les modes connus jusqu'à présent soit peu probable dans le mécanisme physiopathologique du syndrome de Rett, il nous a semblé intéressant de réaliser, au sein de cette famille, une cartographie physique du point de cassure sur le chromosome X.

II- Description clinique et cytogénétique de la famille L.

1- Description clinique

L'enfant Hélène (III 1 figure 28) est vue en consultation à l'âge de 2 ans pour un retard de développement. Hélène est née à terme à la suite d'une grossesse normale. Après un développement normal jusqu'à l'âge de six mois, une régression est notée. A huit mois elle est de petite corpulence, et développe à treize mois une épilepsie, des mouvements stéréotypés des mains, des traits autistiques de plus en plus marqués aboutissant à une absence de contact avec sa famille.

Un syndrome pyramidal débute à l'âge de 2 ans avec régression des acquisitions motrices, et une microcéphalie. Le diagnostic d'une forme classique du syndrome de Rett fût porté chez Hélène.

Trois années plus tard, le couple a eu une autre fille Anne Catherine (III 2 figure 28) née à terme, à la suite d'une grossesse normale. Son développement est normal jusqu'à l'âge de six mois, lorsqu'un retard mental est suspecté. Son évolution traduit une hypotonie, un manque d'intérêt pour son environnement, des mouvements stéréotypés des mains. Chez cette enfant la station assise est acquise à 18 mois, elle se tient debout à trois ans et marche avec difficultés à partir de 6 ans et demi.

Le diagnostic de syndrome de Rett est posé pour les deux filles sur la base de critères définis (Hagberg et al., 1985). L'enfant Hélène présente tous les critères du syndrome de Rett (tableau V), excepté le retard de croissance précoce. Le tableau clinique de la patiente Anne Catherine (II 2) est compatible avec une forme fruste du syndrome de Rett (Hagberg et al., 1985) (Hagberg et al., 1986).

Aucun antécédent neurologique n'a été rapporté dans la famille (figure 28). La mère a un développement normal sauf une acquisistion de la marche

tardive à l'âge de deux ans. Le père est normal. A la naissance de leur premier enfant, ils sont âgés de 29 et 30 ans respectivement .

2- Etude cytogénétique familiale

Le caryotype en bandes RBG de Hélène (III 1)(figure 28) montre une translocation apparemment équilibrée t(X;22)(p11.2;p11). Cette même translocation est présente *de novo* chez la mère II 2, en bon état de santé. Par ailleurs, la deuxième fille, Anne Catherine (III 2) est porteuse de la même translocation. Le caryotype partiel et l'idiogramme en bandes RBG de la translocation est présenté sur la figure 29.

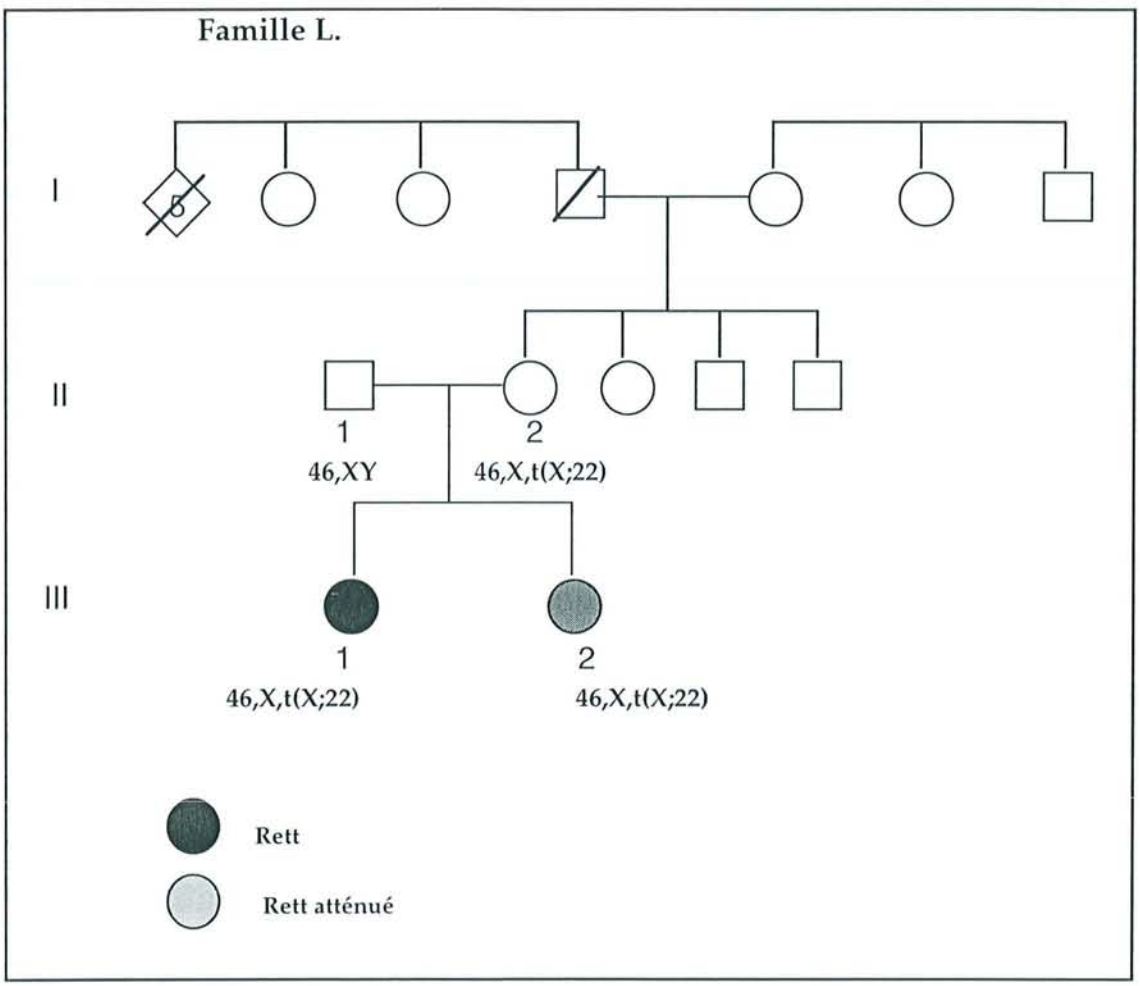


figure 28 : *arbre généalogique de la famille L.*

Une étude d'inactivation de l'X par incorporation de BrdU montre chez la mère (II 2) et ses deux filles (III 1 et III 2) une inactivation préférentielle du chromosome X normal, attendue pour ce type de remaniement.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

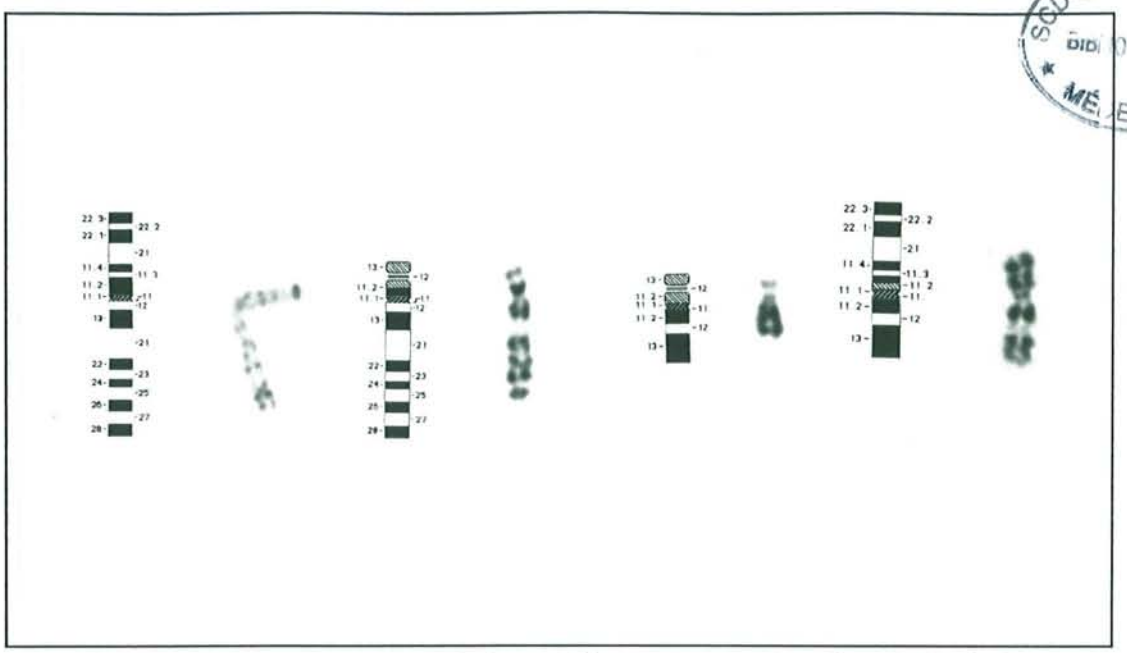


figure 29 : *caryotype partiel et Idiogramme en bandes RBG de la translocation de la famille L.*

III- Cartographie moléculaire du point de cassure sur le chromosome X chez Hélène (III1)

1- Isolement par FISH d'un YAC chevauchant

Le caryotype de la patiente a mis en évidence une translocation t(X;22)(p11.2;p11). Afin de réaliser la cartographie du point de cassure, nous avons utilisé le contig de YAC déjà mis à profit pour la localisation du point de cassure en Xp11.2 chez le patient Cédric.

Nous avons débuté notre étude en hybridant les YAC **ICRFcO191, ICI36HB8** de la région Xp11.23 sur les préparations de chromosomes prométaphasiques de Hélène (figure 30). Ces YAC sont distaux par rapport au point de cassure, ils s'hybrident tous deux sur le chromosome X normal ainsi que sur le der(22) (figure 31).

Nous avons testé d'autres YAC localisés sur une région plus proximale. Les YAC **CEPH649F6**, et **ICRFcO164,** contenant respectivement les marqueurs DXS991 et DXS674, sont proximaux par rapport au point de cassure : les signaux apparaissent sur le chromosome X normal, et sur le der(X) (figure 32).

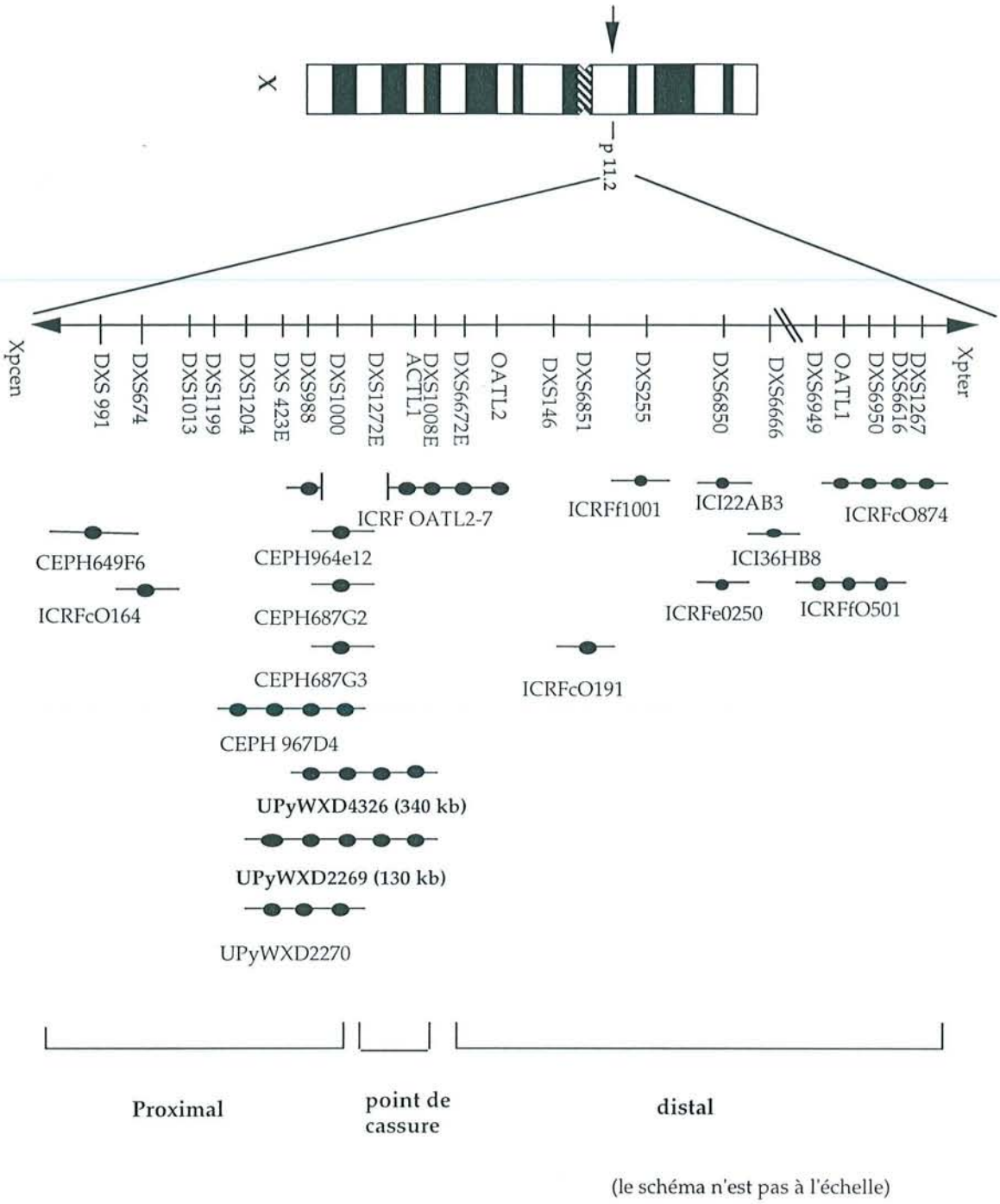


figure 30 : *carte de la région du point de cassure en Xp11.2*

La région du point de cassure est donc située entre les marqueurs DXS674 et DXS6851.

Pour poursuivre cette étude nous avons testé le YAC **ICRFOATL2-7**, qui contient les marqueurs **DXS1000** et **OATL2-7** (figure 30). Le YAC **ICRFOATL2-7** est distal par rapport au point de cassure.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

figure 31 : *Le YAC ICRFcO191 sur les chromosomes métaphasiques de Hélène : le YAC s'hybride sur l'X normal et sur le der(22) : il est distal.*

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

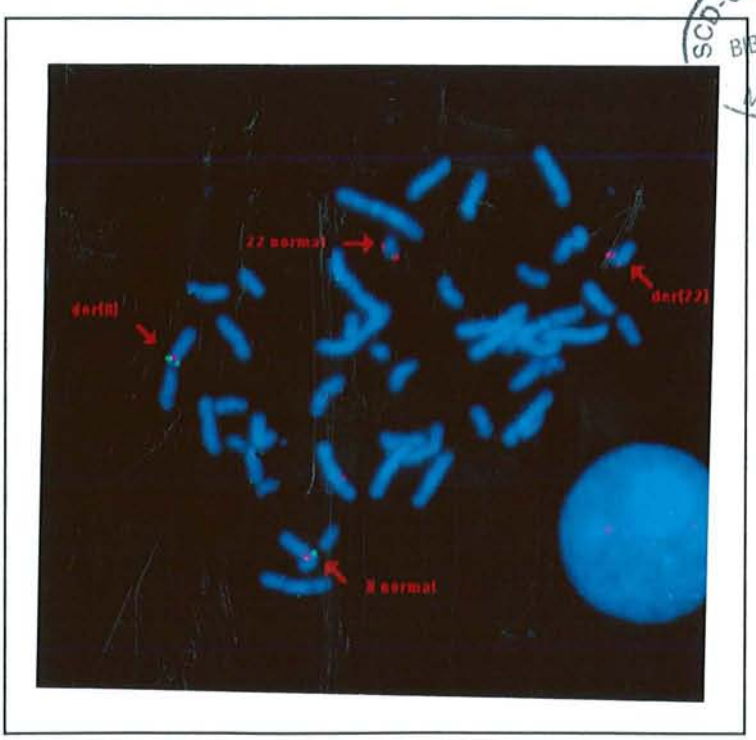


figure 32 : *Le YAC CEPH649F6 sur les chromosomes métaphasiques de Hélène : le YAC s'hybride sur l'X normal et sur le der(X) : il est proximal.*

Cependant, lorsque les YAC **CEPH964E12, CEPH687G2, CEPH967D4** couvrant la région entre les marqueurs **DXS1204** et **DXS1000** (figure 30) sont hybridés, ils sont proximaux par rapport au point de cassure. Ce résultat va à l'encontre de l'indication fournie par le YAC **OATL2-7** qui est distal au point de cassure.
Les données de la cartographie physique indiquent que les YAC **ICRFOATL2-7** et **CEPH967D4** partage une certaine communauté entre DXS988 et DXS1000 (figure 30). Le point de cassure devrait être localisé au niveau la jonction de ces deux YAC. Puisque les YAC **CEPH964E12, CEPH687G2, CEPH967D4** donnent tous trois le même résultat, on peut supposer que le point de cassure est distal par rapport au marqueur **DXS1000** et que le YAC OATL2-7 est délété.
Une amplification par PCR, sur l'ADN du YAC ICRFOATL2-7 des marqueurs DXS1000 et DXS1272E ne donne pas de résultat. Le YAC OATL2-7 est donc délété d'une région minimale allant de DXS1000 à DXS1272E. Cette délétion dans l'insert du YAC ICRFOATL2-7 permet d'expliquer que le YAC ne chevauche pas le point de cassure. N'ayant pas étudié, par PCR, tous les marqueurs du YAC ICRFOATL2-7 nous pouvons simplement conclure que le point de cassure est localisé entre les marqueurs **DXS1000** et **OATL2-7**.

Nous avons testé trois autres YAC **UPyWXD4326, UPyWXD2269, UPyWXD2270** (Miller et al., 1995) localisés dans la région entre les marqueurs **DXS423E** et **DXS1008E** (figure 30). Le YAC UPyWXD2270 est proximal par rapport au point de cassure, confirmant que le point de cassure est distal au marqueur DXS1000.

Les YAC UPyWXD4326, UPyWXD2269 chevauchent le point de cassure, les signaux sont présents sur l'X normal, le der(X) et le der(22) (figure 33).
Nous pouvons en conclure que le point de cassure est localisé entre les marqueurs DXS1000 et DXS1008E.

Les deux YAC chevauchant le point de cassure ayant des tailles respectives de 340 kb et 130 kb, nous avons choisi de sous-cloner le YAC UPyWXD2269 du fait de sa plus petite taille.

Nous avons vérifié que le plus petit YAC UPyWXD2269 chevauchait également le point de cassure chez la mère (II 1) et la soeur (III 2).

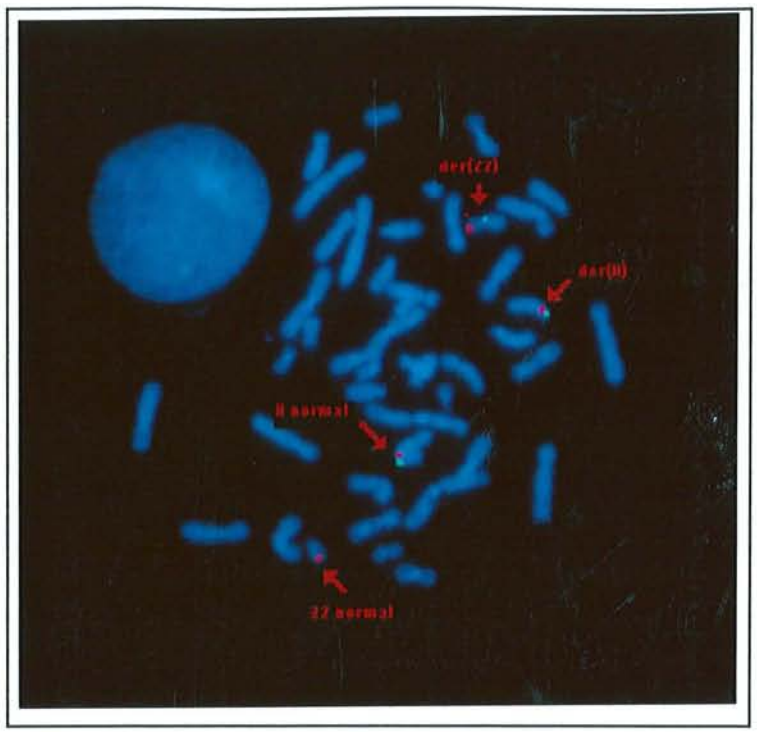


figure 33 : *FISH du YAC UPyWXD2269 sur les chromosomes métaphasiques de Hélène: Le YAC chevauche le point de cassure*

2- Confirmation par PCR de la localisation du point de cassure de H. L (III1)

Nous disposions d'un hybride somatique interspécifique(*) réalisé par fusion de la lignée lymphoblastoïde de la patiente et d'une lignée de hamster doré de Chine (RJK88). Une sélection en milieu HAT, avait retenu des clones ayant conservé la partie des bras longs de l'X actif (HGPRT+). L'analyse par Southern blot, à l'aide de sondes de la région Xp21, permet d'isoler un clone dans lequel le der(X), est le seul matériel de l'X.

Sachant que les remaniements, se produisent, fréquemment, au sein des clones d'hybrides interspécifiques, nous avons voulu nous assurer que ce clone ne contenait pas de matériel du chromosome X autre que le der(X). A l'aide d'une sonde totale du chromosome X, par FISH, nous avons démontré que le der(X), est bien le seul matériel de l'X retenu dans l'hybride (figure 35)

* Les hybrides somatiques sont réalisés, au sein du laboratoire par R. Debard

figure 34 : *Une sonde totale du chromosome X sur les métaphases de l'hybride somatique interspécifique : seul le der(X) est marqué.*

Nous réalisons l'étude de localisation du point de cassure sur le der(X), par PCR. La région du point de cassure a été cernée à l'aide de 11 STS de la région Xp11.2 (tableau VI).

Les amplifications par les STS des régions Xp11.21 et Xp11.22 sont positifs. En revanche, les STS de la région Xp11.23 sont absents du der(X). On peut, donc, en conclure que le point de cassure intervient entre les régions Xp11.22 et Xp11.23, et plus précisément, entre les STS DXS1008E et DXS1272E. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus, par FISH, qui positionnait, également, le point de cassure entre les marqueurs DXS1008E et DXS1272E. L'étude par PCR n'est réalisée que sur un seul clone d'hybride somatique interspécifique, mais ce dernier a été contrôlé pour son contenu en matériel de l'X. De plus les résultats obtenus coïncident avec ceux obtenus par la localisation en FISH.

Locus	Localisation	hybride L. cl1
DXS255	Xp11.23	-
DXS146	Xp11.23	-
DXS1008E	Xp11.23	-
DXS1272E	Xp11.22	+
DXS1000	Xp11.22	+
DXS988	Xp11.22	+
DXS1201	Xp11.22	+
DXS1013E	Xp11.22	+
DXS1199	Xp11.22	+
DXS674 (ALAS2)	Xp11.21	+
DXS991	Xp11.21	+

Tableau VI : *Cartographie du point de cassure par PCR chez Hélène*
+ : amplification/ - : pas d'amplification

3- Réalisation d'une banque de cosmides à partir du YAC UPyWXD2269

Le sous clonage du YAC UPyWXD2269 est effectué, à partir d'ADN extrait de la levure contenant le YAC, selon le procédé décrit dans les matériels et méthodes. Nous ne reviendrons pas sur la construction d'une banque de cosmides, à partir d'un YAC, puisque nous avons décrit la technique dans la première partie.

Le YAC UPyWXD2269 mesure 130 kb. Nous devons isoler 30 cosmides recombinants, pour obtenir une bonne représentativité de son insert. Puisque le YAC représente 1% du génome de la levure, nous devons cribler au moins 3000 colonies.

Nous avons, donc, isolé le nombre de colonies nécessaire, et retenu après criblage par de l'ADN placentaire humain, **27 colonies positives**.

L'ADN est extrait pour chacun des clones et digéré par l'enzyme de restriction EcoRI afin d'évaluer le degré de chevauchement de chacun des inserts des cosmides. Nous avons pu ainsi apprécier la qualité des clones constituant notre banque, et estimer la taille moyenne des inserts. Par ces profils de digestion, nous avons retenu huit clones qui présentent peu de similitude entre eux.

4. Isolement d'un cosmide chevauchant le point de cassure

Parmi les huit testés, le cosmide chevauchant a été isolé (figure 35) permettant d'affiner la localisation du point de cassure. Le point de cassure est cerné dans un intervalle défini par les 25 kb de ce cosmide.

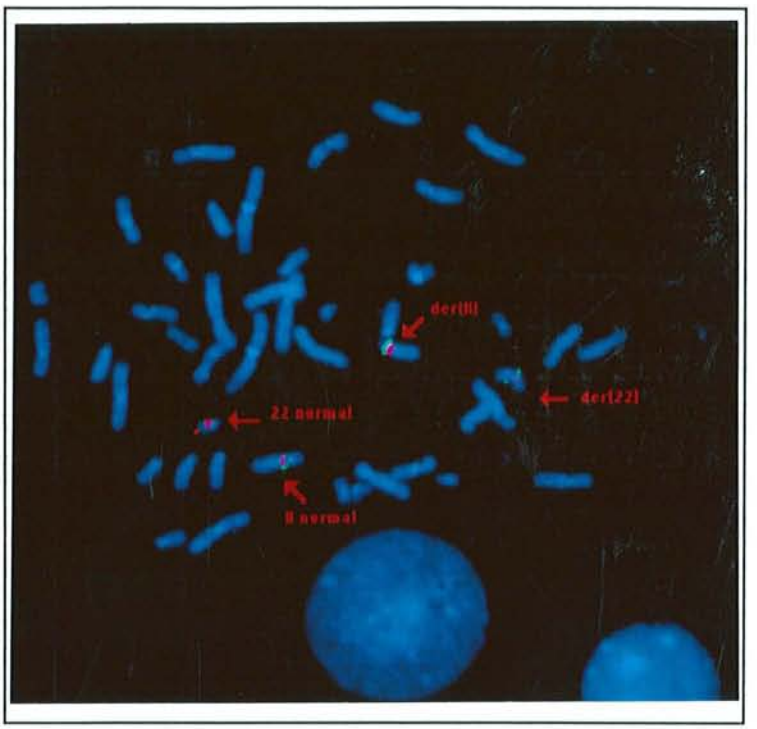


figure 35 : *hybridation du cosmide chevauchant sur les chromosomes prométaphasiques de Hélène*

Nous avons vérifié que ce même cosmide, chevauche le point de cassure du remaniement, chez sa mère et chez sa soeur Anne Catherine

Le cosmide chevauchant fait actuellement l'objet d'analyses, afin d'identifier d'éventuelles séquences codantes pouvant correspondre à un gène potentiellement impliqué dans cette pathologie.

IV- Discussion

Nous avons entrepris une étude de localisation du point de cassure sur le chromosome X chez une fille atteinte d'un syndrome de Rett, associé à une t(X;22) héritée de sa mère. Cette étude, réalisée par FISH, permet de cerner le point de cassure dans une région de 130 kb au sein du YAC UPyWDX2269. Afin de réduire l'intervalle contenant le point de cassure, nous avons sous-cloné le YAC chevauchant et réalisé une banque de cosmides. Un cosmide chevauchant la région du remaniement, est isolé et permet, ainsi, de réduire l'intervalle à une trentaine de kb. Ce même cosmide chevauche le point de cassure sur l'X chez sa mère et sa soeur Anne Catherine. Au seuil de résolution de la technique, nous ne pouvons mettre en évidence un éventuel microréarrangement, associé au point de cassure, permettant, d'expliquer la différence de phénotype entre les deux soeurs et la mère. En parallèle, une cartographie, par PCR, nous a permis de cerner le point de cassure dans un intervalle compris entre les marqueurs DXS1008E et DXS1272E. Des hybrides somatiques interspécifiques, réalisés à partir de la lignée de la mère et de la soeur Anne Catherine, sont en cours de réalisation. La cartographie du point de cassure par PCR sera, donc, de la même façon analysée pour ces individus. Il est intéressant de s'assurer que le point de cassure intervient au sein des mêmes régions chez les deux filles atteintes du syndrome de Rett et chez leur mère. A ce stade de l'étude, nous pouvons envisager une approche par candidat positionnel car nous disposons d'une région définie par une sonde de 130 kb cartographiée sur le génome humain. Grâce à cette méthode, une séquence codante fait actuellement l'objet d'analyses.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer le mécanisme génétique, à l'origine du RS dans la famille L. Dans le cas de cette translocation familiale, la mère est porteuse de la translocation, mais est indemne de l'affection. Ces deux filles ont en commun le der(X) maternel interrompu par la translocation et la copie de l'X paternel. A ce stade de cartographie, et au vu des résolutions, nous ne pouvons évoquer un microréarrangement apparu, au point de translocation, lors de la méiose maternelle.
On ne peut exclure, chez la mère, une mosaïque cellulaire se traduisant par la présence de cellules transloquées dans certains tissus. Cette hypothèse

sera contrôlée par une étude cytogénétique au sein des fibroblastes, et par FISH sur les cellules jugales.

Nous pouvons également envisager qu'une mutation soit survenue sur l'allèle paternel, au sein d'un gène interrompu sur l'allèle maternel par la translocation, entraînant, ainsi, l'absence de transcrit fonctionnel chez les patientes III 1 et III 2. Dans l'hypothèse d'une mutation de l'allèle paternel, il serait nécessaire d'expliquer pourquoi celui-ci ne présente aucun trait phénotypique. La mutation peut être exclusivement dans la lignée germinale, épargnant la lignée somatique. Il se peut également qu'une mutation dans ce gène épargne les hommes, expliquant par là même l'apparition du syndrome de Rett exclusivement chez les filles (Ryan et al., 1997).
Les données de la littérature rapportent plusieurs familles, chez lesquelles deux demi-soeurs utérines sont atteintes du syndrome de Rett (Archidiacono et al., 1997))(Hagberg et al., 1983). Ce mode de transmission évoque plutôt une mutation maternelle en mosaïque germinale. Nous pouvons enfin envisager l'altération d'un gène sur l'X, dont l'expression dépende de l'empreinte parentale. Chez les deux filles Hélène et Anne Catherine, l'X transloqué, est d'origine maternelle, il serait intéressant de mettre en évidence que la translocation chez la mère porte sur le chromosome X d'origine paternel. L'expression différentielle de ce gène selon l'empreinte parentale pourrait donc rendre compte de l'atteinte limitée aux deux filles. A cet égard, l'étude de l'origine parentale de l'X transloqué est en cours de réalisation.

L'étude moléculaire du point de cassure en Xp11.2, dans cette famille, permettra d'isoler un éventuel gène à l'origine du syndrome de Rett.

TROISIEME PARTIE

LOCALISATION DE POINTS DE CASSURE DANS LA REGION Xq21 CHEZ DES PATIENTES PRESENTANT UN DYSFONCTIONNEMENT OVARIEN

LA REGION POF : Xq13-q26

I - LA REGION "Premature Ovarian Failure"(POF)

1- Historique de la région critique

Le terme POF se traduit, par un défaut dans le développement et les fonctions ovariennes, associant une aménorrhée primaire ou secondaire avec un taux élevé des gonadotrophines sériques, ou une ménopause précoce.

L'origine génétique, de ces manifestations a été évoquée par la découverte de sujets de sexe féminin, présentant un dysfonctionnement ovarien associé à un remaniement chromosomique (Sarto et al., 1973). Ces anomalies chromosomiques, de type délétion ou translocation, impliquent le plus souvent le bras long du chromosome X (Therman, et al., 1990). De plus, chez les sujets de sexe masculin, les t(X;A) (quelle que soit la localisation du point de cassure sur l'X) sont souvent associées à des troubles de la spermatogénèse entraînant une stérilité (Madan, 1983). A partir de 6 patientes présentant une t(X;A) associée à une aménorrhée primaire, Sarto, en 1973, propose la région Xq13-q26, comme une région critique nécessaire à une fonction ovarienne normale (région POF : Premature Ovarian Failure) (Sarto et al., 1973). Plus tard, cette région fut divisée en deux segments Xq13-q22 et Xq22-q26, séparés par une petite région en Xq22, au sein de laquelle les remaniements ne semblaient pas entraîner de dysfonctionnement ovarien (Madan, 1983).

2- Implication de la région critique dans le POF

Une revue de la littérature présentée par Therman, en 1990, rassemble l'ensemble des t(X;A) associée à un dysfonctionnement ovarien. Un nombre de 126 t(X;A) associées à un POF sont présentées sur la figure 36 (Philippe, thèse 1993). De l'observation de cette figure, il ressort qu'une cassure dans les régions Xq21-q22, q22-q24 semble être incompatible avec un fonctionnement ovarien normal exceptée la petite région déjà décrite par Madan.

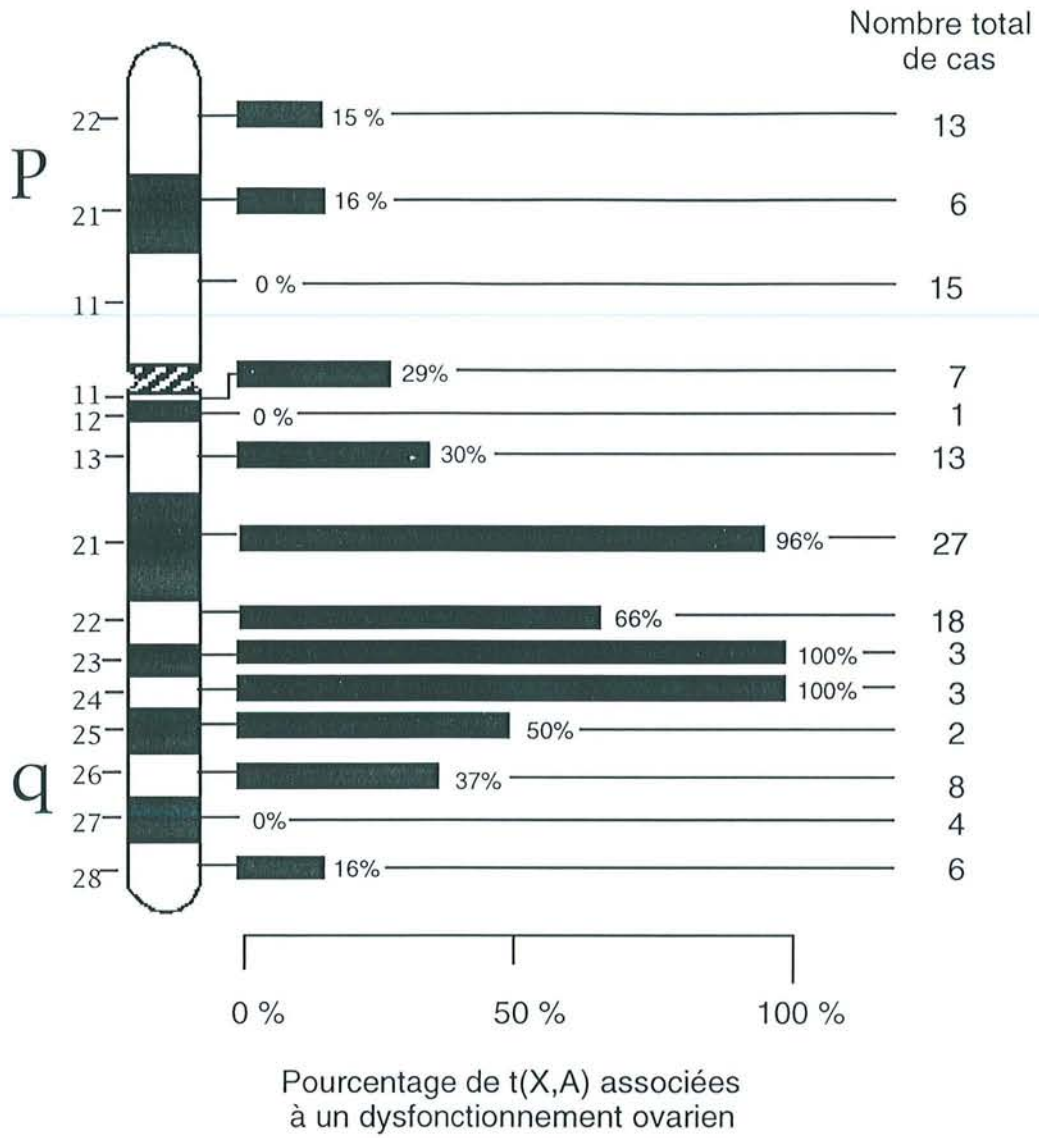


Figure 36 : *t(X;A) et dysfonctionnement ovarien*

126 t(X;A) chez des femmes adultes sont répertoriées dans cette figure : 118 cas rassemblés dans une revue de la littérature par Therman et al. en 1990, auxquels sont ajoutées les 7 t(X;A) caractérisées par Philippe et al en 1993.

L'ensemble des données conduit à la théorie d'une région POF, contenant deux groupes de gènes : un groupe proximal en Xq13-q22, et un distal en Xq22-q26. La modification d'un de ces gènes entraîne un dysfonctionnement ovarien. Le fonctionnement normal de ces gènes serait entravé par une cassure, à l'origine de l'interruption d'un gène, ou d'un effet de position de celui-ci.

Cependant, des travaux montrent que le dysfonctionnment gonadique ne dépend pas eclusivement de la région critique.

- Therman, en 1990, décrit d'autres régions du chromosome X intervenant dans le POF. Le remaniement de ces régions serait à l'origine d'un dysfonctionnement ovarien, dans 15% à 66% des cas, selon la région concernée (figure 36). Par exemple, des remaniements de la région p21 ou q28, entraînent une anomalie de la fonction ovarienne mais dans moins d'un cas sur cinq (figure 36).
- En outre, tous les remaniements qui interviennent dans la région critique n'entraînent, pas obligatoirement, un dysfonctionnement ovarien. Par exemple, une patiente porteuse d'une t(X;A) avec un remaniement dans la région Xq21 est décrite avec un phénotype normal (cas 5513, Philippe, et al., 1995). Un autre exemple est décrit par une inversion paracentrique du chromosome X des bandes q21.2 et q24 se traduit par une fonction ovarienne normale chez un sujet de sexe féminin (Abeliovitch et al., 1995)
- L'hypothèse de Madan, qui exclut la bande cytogénétique Xq22 de la région critique, n'est que partiellement confirmée si l'on considère, selon Therman, que 2/3 des remaniements dans la région Xq22 sont à l'origine de dysfonctionnement ovarien (figure 36). De plus, une t(X;A) impliquant la région Xq22, se trouve associée à un dysfonctionnement ovarien et à une surdité (Dr Jonveaux, Nancy, communication personnelle).
- Une cassure dans la région critique, ne semble pas être l'unique cause d'un dysfonctionnement ovarien. En effet, une monosomie partielle du bras court du chromosome X en p21.2, présente chez deux filles, entraîne chez l'une d'entre elle certains signes cliniques de syndrome de Turner, y compris un dysfonctionnement ovarien. L'autre fille présente un phénotype normal. Ce cas illustre la variabilité du phénotype associé à une délétion Xp identique. Néanmoins, il conviendrait de compléter cette étude par la réalisation du statut d'inactivation du chromosome X chez les deux filles, pouvant traduire une inactivation différentielle entre ces deux patientes. (Zinn et al., 1997).

Nous avons participé à l'étude collaborative, dirigée par D. Toniolo (Pavia, Italie), sur la cartographie physique de points de cassure chez 11 patientes, chez lesquelles une t(X;A) est associé à dysfonctionnement ovarien. Quatre patientes ont été particulièrement analysées. Ces localisations ont été réalisées à l'aide d'hybrides somatiques interspécifiques contenant le der(A),

comme seul matériel de l'X a été vérifié; puis les points de cassure ont été localisés, par rapport aux marqueurs de la région proximale des bras longs du chromosome X (Philippe et al., 1993) (Philippe et al., 1995)

II - PRESENTATION DES CAS ETUDIES

Le tableau VII résume la symptomatologie cliniques associées aux t(X;A) chez les quatre patientes (BC, FA, WD, LG); le point de cassure sur l'X correspondant, pour ces quatre cas, à la bande Xq21.
La figure 37 montre les caryotypes partiels en bandes GTG de ces t(X;A).

CAS	CARYOTYPE	SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE
BC (1)	46,X,t(X;12)(q21;p13) t(X;A) familiale	Aménorrhée secondaire à 17 ans
FA (1)	46,X,t(X;15)(q21;q26) t(X;A) *de novo*	Aménorrhée secondaire à 27 ans
LG (2)	46,X,t(X;9)(q21;q33) t(X;A) *de novo*	Aménorrhée secondaire à 19 ans Fente labiale Retard intellectuel modéré
WD (1)	46,X,t(X;2)(q21;p25) t(X;A) *de novo* ?	Aménorrhée primaire Ovaires fibreux Légère dysmorphie faciale

(1) Cas Nancéiens

(2) Cas fourni par le Pr M. J. ANDRE, CHRU de Nantes

Tableau VII : *Données cytogénétiques et cliniques des quatre patientes*

Dans 3 cas sur 4, la translocation est apparue *de novo*. Pour le cas BC, l'anomalie chromosomique est familiale : la même translocation t(X;12) est retrouvée chez la mère qui a développé également une aménorrhée secondaire à l'âge de 32 ans.

UHP - NANCY 1
SCD BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

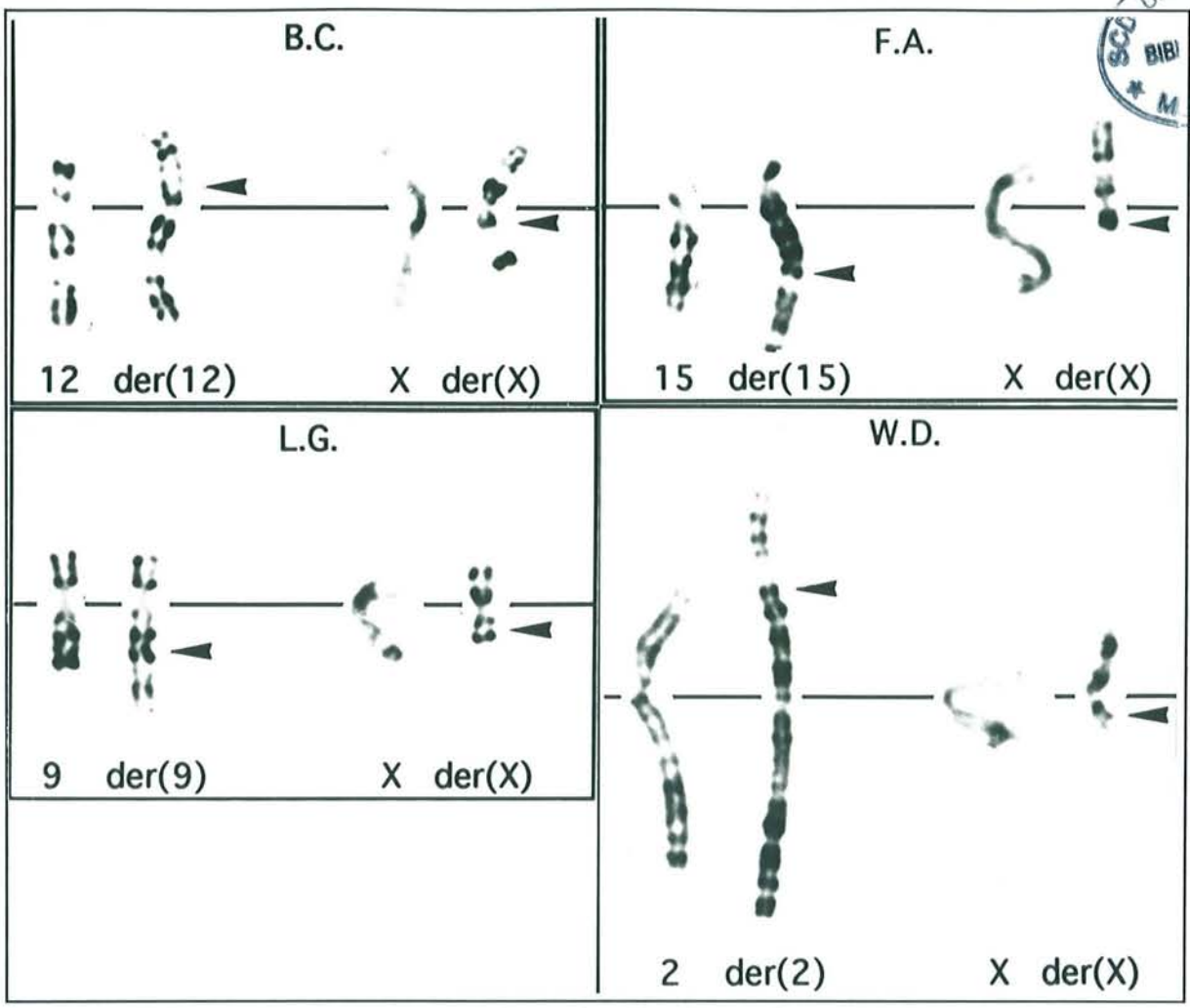


figure 37 : *caryotypes partiels en bandes GTG chez les quatre patientes*

III- CARTOGRAPHIE PAR FISH DES POINTS DE CASSURE

Les résultats de l'étude moléculaire réalisée à l'aide de marqueurs de la région Xq21 sur les hybrides somatiques interspécifiques des quatre cas, sont résumés sur la figure 38.

Au cours de notre travail, la cartographie physique de chaque point de cassure, a été réalisée par rapport à un ensemble ordonné de YAC qui nous ont été fournis par l'équipe de D. Toniolo. Les YAC sont utilisés comme sonde, pour des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence, réalisées sur des préparations de chromosomes prométaphasiques de chacune des patientes. Pour chacun des cas, afin d'identifier sans ambiguïté le der(A) et le der(X), un YAC et une sonde centromérique spécifique du chromosome X, ou de l'autosome impliqué dans le remaniement sont cohybridés.

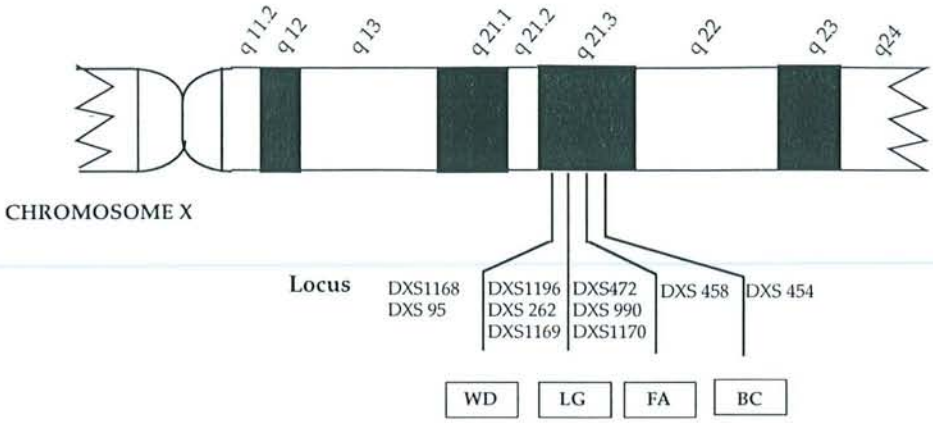


figure 38 : *localisation moléculaire des points de cassure sur l'X*

1- Patiente WD

La patiente WD présente la translocation (X;2)(q21;p25) (figure 39) dont le point de cassure sur l'X a été localisé entre les marqueurs DXS95 et DXS1196 (figure 40) (Philippe et al., 1995).

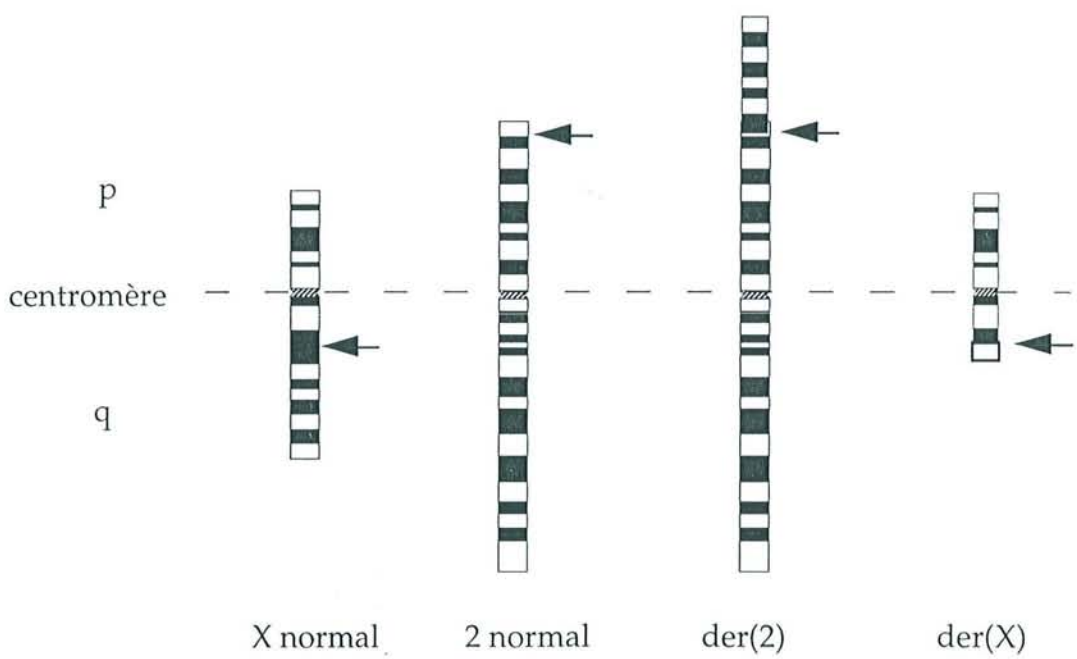


figure 39 : *Idiogramme en bandes GTG de la t(X;2)(q21;p25)*

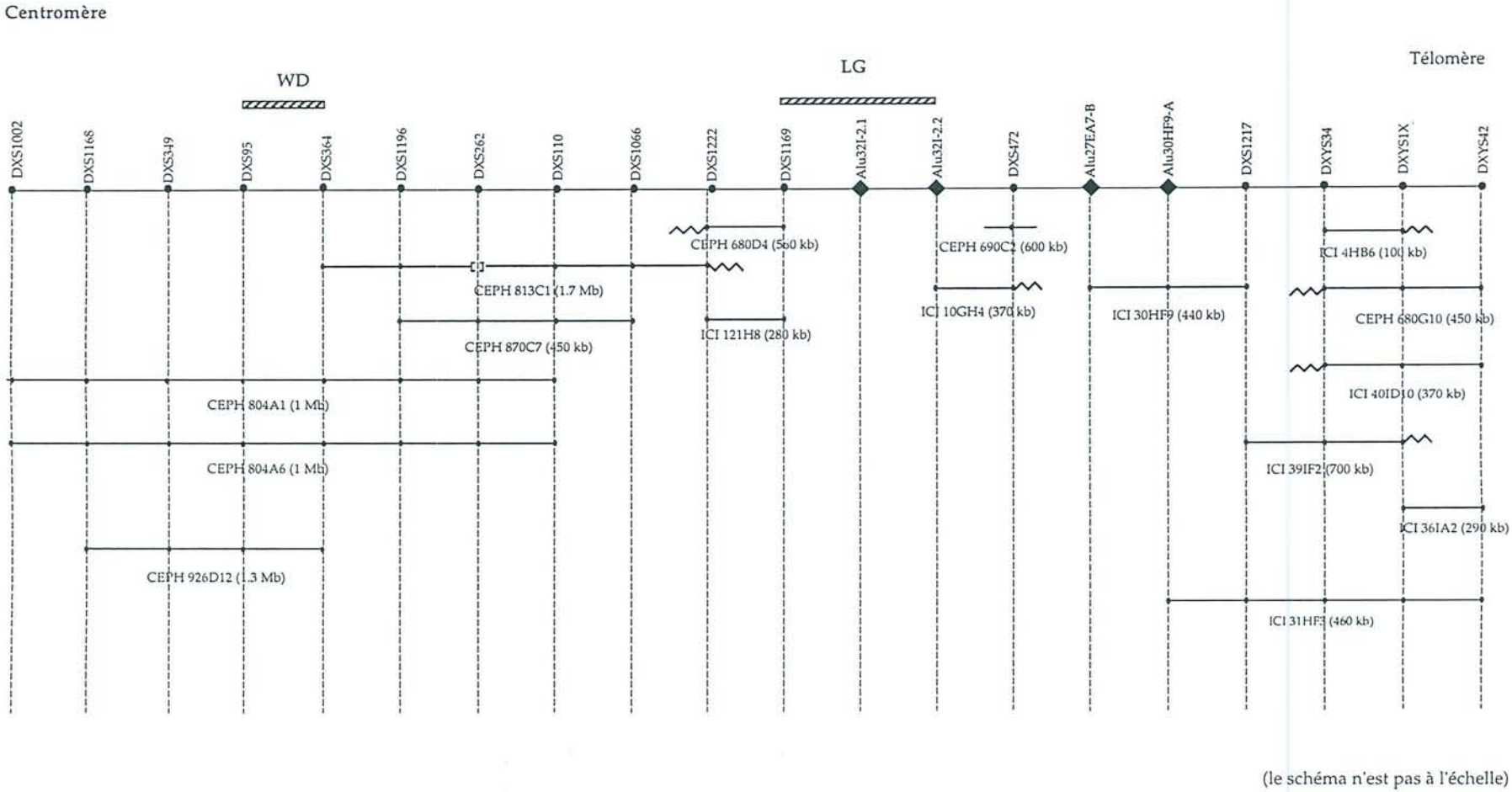


figure 40 : carte de la région Xq21.31 entre les marqueurs DXS1002 et DXyS42:
Les STS sont représentés par ⬬; Les sondes sont représentées par ■ ; Les sondes Alu-PCR sont repésentés par ◆
(Sala et al. Genomics 40, 123-131 (1997)).

Nous avons testé deux YAC CEPH813C1 et CEPH926D12 couvrant une région située entre les marqueurs DXS1168 et DXS1222. Le YAC **CEPH 813C1** de 1.7 Mb est positionné entre les marqueurs **DXS364** et **DXS1222** (Figure 40) et donne, par FISH, un signal sur le **chromosome X normal** ainsi que sur le **der(2). Le point de cassure de WD** sur le chromosome X est, donc, **proximal** au marqueur **DXS364**.

Le YAC **CEPH926D12** (1.3 Mb) appartient à une région proximale au YAC CEPH813C1 et devrait permettre de se rapprocher du point de cassure sur l'X (figure 40). Le YAC **CEPH926D12** couvre la région entre les marqueurs **DXS1168 et DXS364**. L'analyse de ce YAC sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente WD révèle trois signaux : sur le **chromosome X normal**, sur le **der(X)** ainsi que sur le **der(2)**. La présence de ces trois signaux indique que le YAC **CEPH926D12 chevauche** le point de cassure sur le chromosome X chez la patiente **WD** (figure 41).

Cette expérience de FISH a été successivement réalisée en présence de la sonde centromérique du chromosome X et de celle du chromosome 2. Ce résultat est confirmé par l'hybridation du YAC **CEPH804A1**, qui contient les marqueurs **DXS1002 et DXS110** (figure 40) et qui chevauche également le point de cassure. Le **point de cassure de WD** sur l'X est localisé entre les marqueurs **DXS95 et DXS364**.

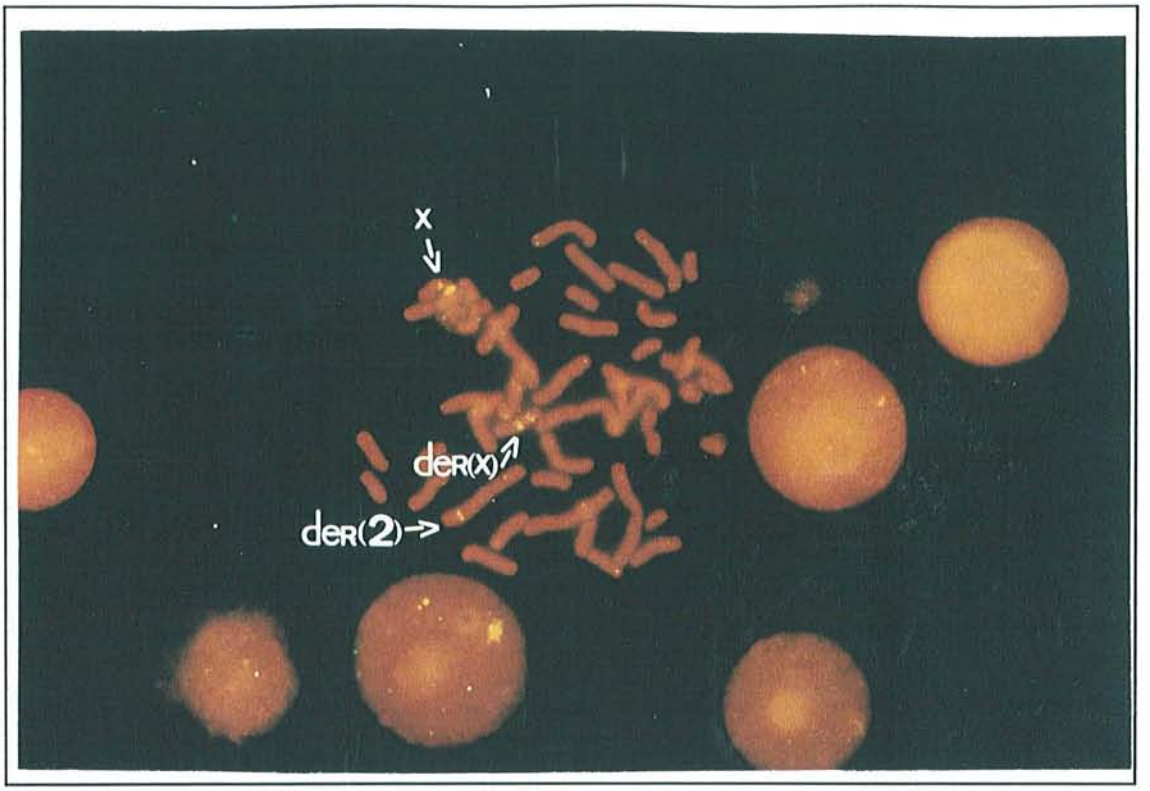


figure 41 : *hybridation in situ en fluorescence du YAC CEPH926D12 et d'une sonde centromérique du chromosome X sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente WD : le YAC chevauche le point de cassure*

2- Patiente LG

La patiente LG présente la translocation t(X;9)(q21;q33) (figure 42) dont le point de cassure est localisé au sein de la région Xq21.3 entre les marqueurs DXS1169 et DX472 (figure 40) (Philippe et al., 1995).

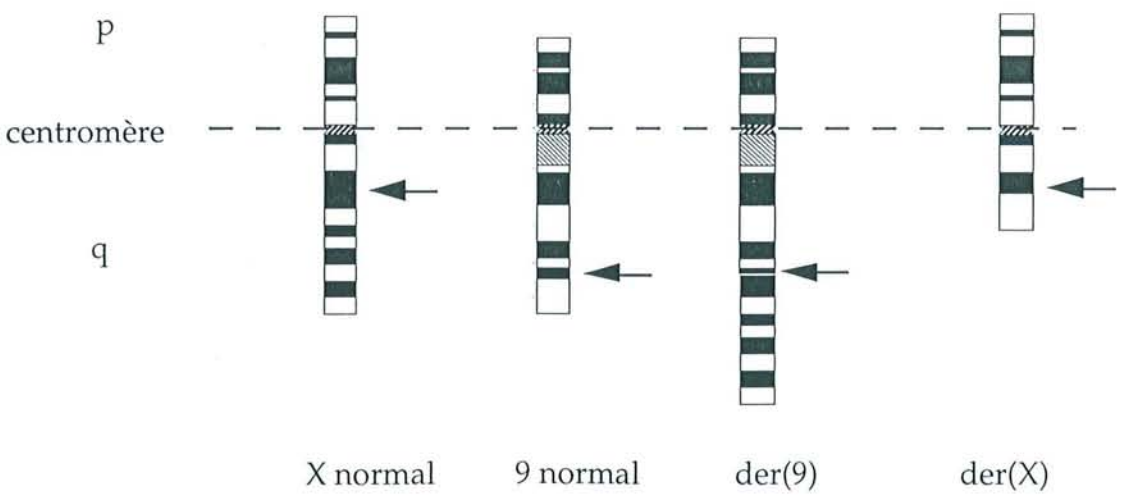
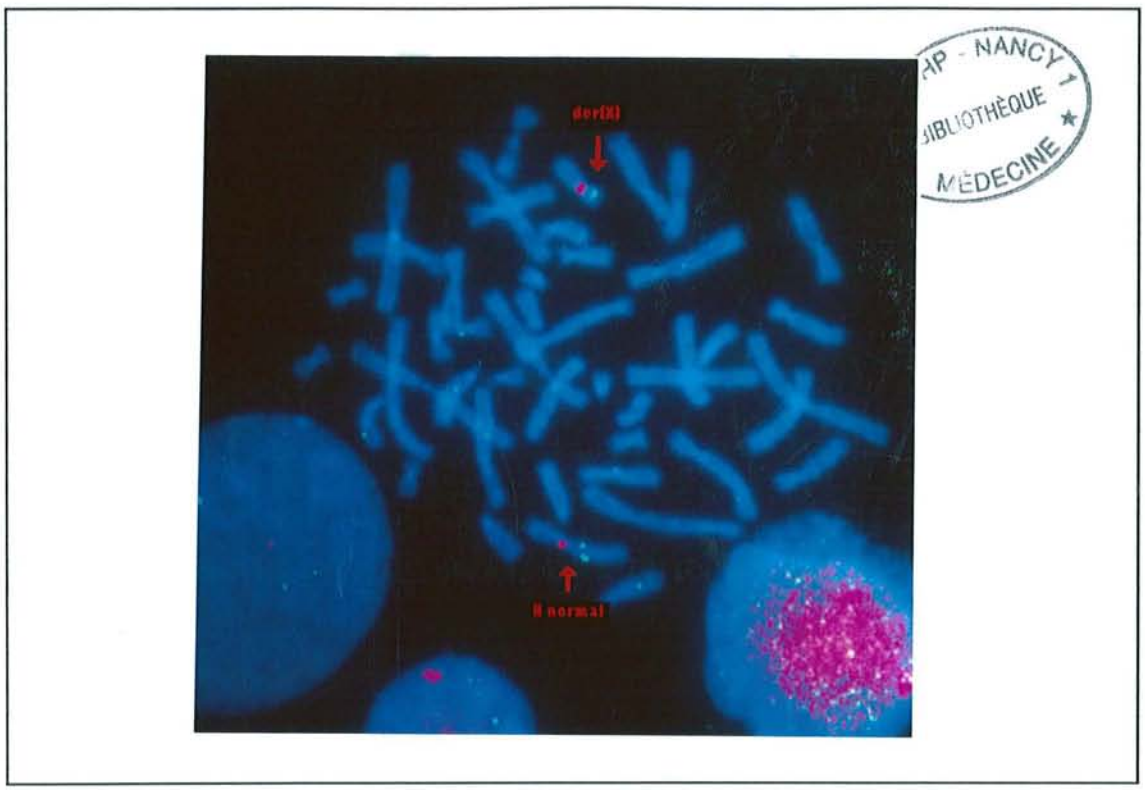


figure 42: *Idiogramme en bandes G de la t(X;9)((q21;q33)*

Le YAC **CEPH680D4** confirme la localisation distale du point de cassure par rapport au marqueur DXS1169 (figure 43).



HP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

figure 43 : *Hybridation du YACCEPH680D4 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente LG : le YAC est proximal au point de cassure*

Nous avons poursuivi cette étude en analysant des YAC de la région d'homologie X-Y. Les YAC **ICI4HB6** et **ICI36IA2** sont positionnés dans une région entre les marqueurs **DXYS34** et **DXYS42** (figure 40) et par hybridation, donnent des signaux sur le chromosome **X normal** ainsi que sur le **der(9)**.
Nous pouvons, donc, affirmer que le point de cassure est localisé entre les marqueurs **DXS1169 et DXYS34**.
Puis, trois autres YAC ont été testés : **ICI39IF2, ICI31HF3, ICI40ID10.** Le YAC **ICI40ID10** a été écarté de notre étude pour chimérisme. Les YAC **ICI39IF2 et ICI31HF3** sont localisés sur le chromosome **X normal** ainsi que sur le **der(9),** ils sont distaux au point de cassure (figure 44). Le YAC **ICI10GH4** est également distal au point de cassure, nous pouvons en conclure que le point de cassure est inclu dans l'intervalle **DXS1169-Alu32I-2.2.**

-UHP - NANCY
BLIOTHÈQUE
MÉDECINE

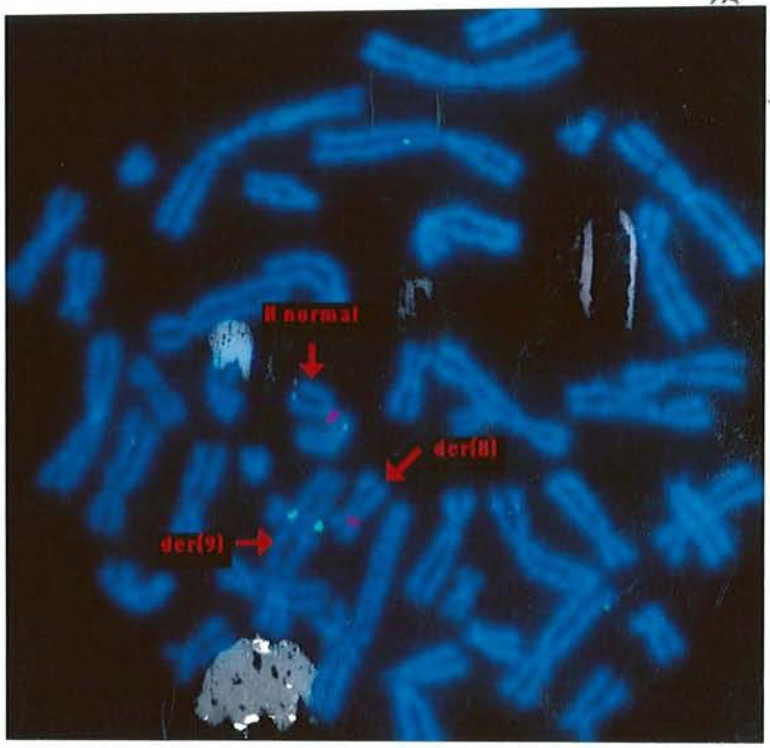


figure 44 : *hybridation in situ en fluorescence du YACCEPH 31HF3 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente LG : le YAC est distal au point de cassure*

3 - Patiente FA

La patiente FA présente une translocation t(X;15)(q21;q26) (figure 45) dont le point de cassure a été localisé au sein de la région Xq21.3 entre les marqueurs DXS1170 et DXS458 (figure 46) (Philippe et al., 1995).

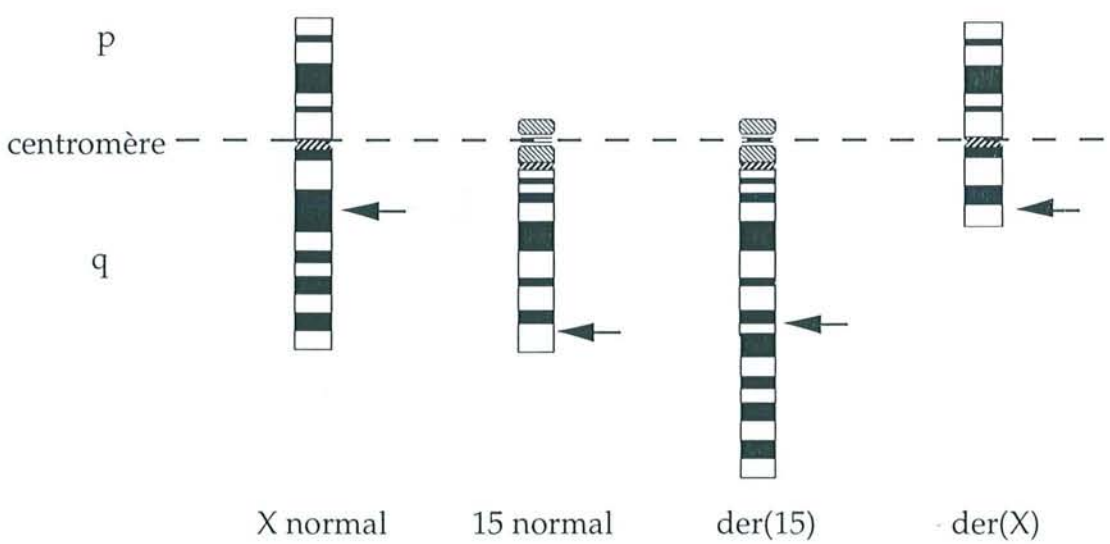


figure 45 : *Idiogramme en bandes GTG de la t(X;15)(q21.q26)*

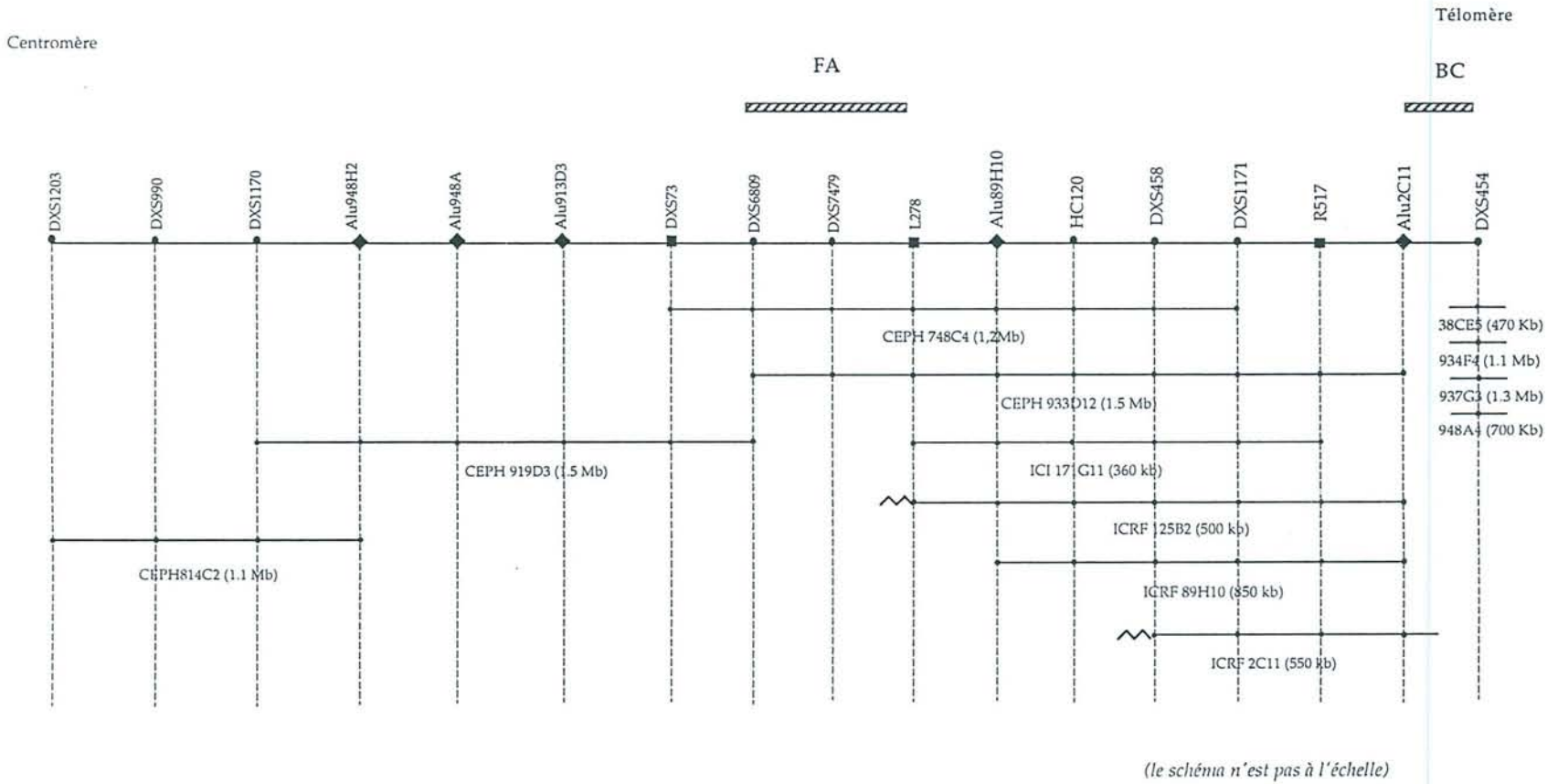


figure 46 : *carte de la région Xq21.31: entre les marqueurs DXS1203 et DXS454*
Les STS sont représentés par ●; Les sondes sont représentées par ■ ; Les sondes Alu-PCR sont repésentés par ◆ (Sala et al. Genomics 40, 123-131 (1997)).

Trois YAC couvrant la région entre DXS990 et DXS458 sont analysés (figure 46). Les YAC **CEPH814C2 et CEPH919D3** s'hybrident de la même façon, par un signal sur le chromosome **X normal** ainsi que sur le **der(X)**. Ce résultat nous indique que ce point de cassure est **distal** au marqueur **DXS6809**.

Puis, nous avons testé le YAC **CEPH748C4** (1.2 Mb) positionné entre les marqueurs **DXS73 et DXS1171**. Ce YAC est localisé sur le chromosome **X normal,** sur le **der(15)** et sur le **der(X)** nous indiquant qu'il **chevauche le point de cassure** de FA (figure 47).

UHP - NANCY 1 SCD BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

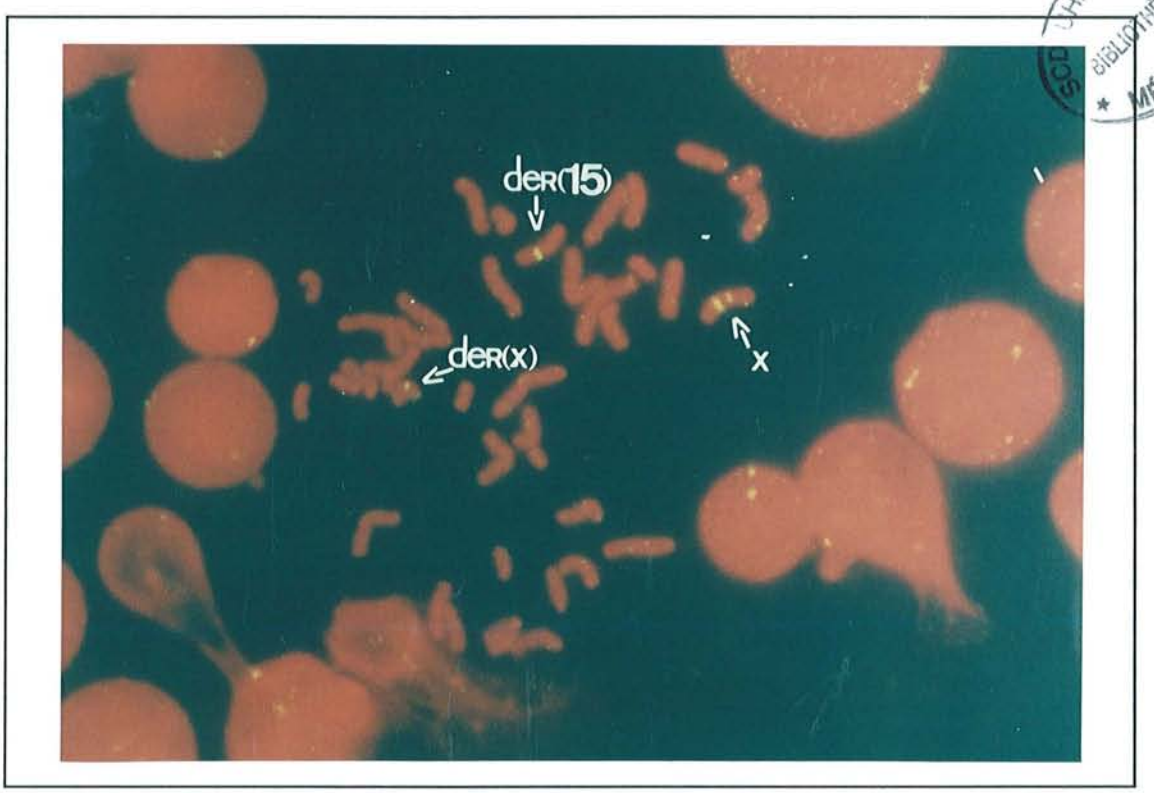


figure 47 : *hybridation du YAC CEPH748C4 sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente FA : le YAC chevauche le point de cassure*

Le point de cassure est donc localisé, par FISH, dans une région de 1,2 Mb entre les marqueurs **DXS6809 et DXS1171** (figure 46). Nous avons voulu affiner cette localisation par le YAC **ICI17IG11** qui présente une zone commune avec le YAC CEPH748C4 entre les marqueurs **L278 et DXS1171**. L'hybridation du YAC **ICI17IG11** donne un signal sur le chromosome **X normal** ainsi qu'un signal sur le **der(15)**. Cette observation nous permet de localiser le point de cassure, au sein du YAC **CEPH748C4,** entre les marqueurs **DXS6809 et L278**. Ces résultats sont confirmés par l'hybridation des YAC ICRF89H10 et ICRF2C11 qui sont distaux par rapport au point de cassure.

4- Patiente BC

La patiente BC présente la translocation t(X;12)(q21;p13) (figure 48) dont le point de cassure a été localisé au sein de la région Xq21 entre les marqueurs DXS458 et DXS454 (figure 46) (Philippe et al.,1995).

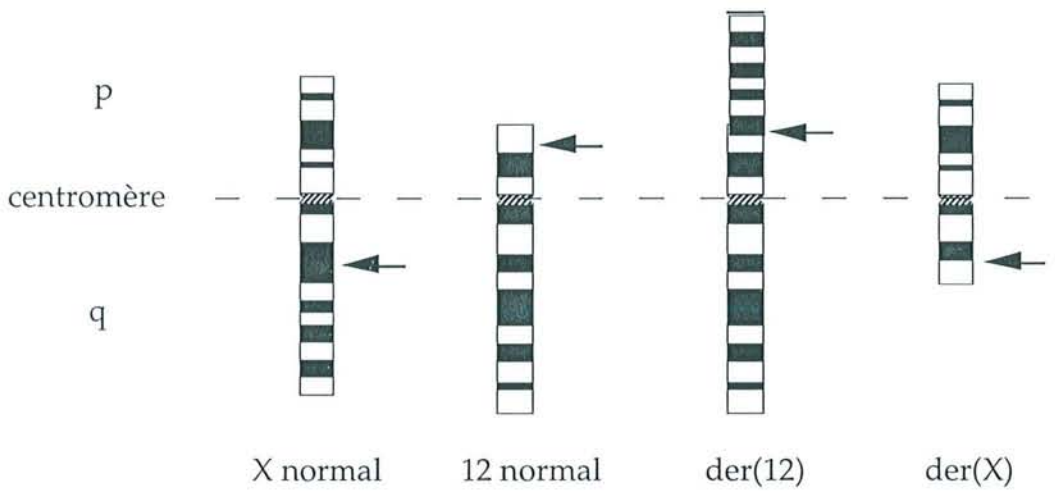


figure 48 : *Idiogramme en bandes GTG de la t(X;12)(q21;p13)*

Nous avons testé les YAC **CEPH933D12 et ICI17IG11** (figure 46). Ces YAC localisés entre les marqueurs **DXS6809** et **Alu2C11** donnent un signal sur le **chromosome X** ainsi qu'un signal sur le **der(X)**. Le point de cassure sur l'X, est **distal** par rapport au YAC CEPH933D12, et par conséquence au marqueur **Alu2C11**. Nous avons testé le YAC **ICRF2C11** entre les marqueurs **DXS458 et Alu2C11** (figure 46), il donne des signaux sur les chromosomes **X normal, der(X)** et **der(12)** (figure 49). Ce YAC chevauche donc le point de cassure par sa région distale au marqueur Alu2C11 puisque le YAC CEPH933D12 ne chevauchait pas le point de cassure.

Afin de préciser cette localisation d'autres YAC positifs avec le marqueur **DXS454**, sont testés. Les YAC **ICI38CE5, CEPH934F4, CEPH937G3, et CEPH948A4** donnent des signaux sur le chromosome **X normal**, et le **der(12)**. Cette localisation permet de déterminer que le point de cassure est positionné de façon **proximale** par rapport au marqueur **DXS454**. Nous pouvons conclure que le point de cassure de **BC** est localisé entre les **marqueurs Alu2C11 et DXS454**.

figure 49 : *hybridation in situ en fluorescence du YAC CEPH 2C11 et d'une sonde centromérique du chromosome X sur les chromosomes prométaphasiques de la patiente BC : le YAC chevauche le point de cassure*

IV- DISCUSSION

Le travail de Philippe en 1995 avait permis de cerner, par PCR, les points de cassure sur l'X de chacune des quatre patientes étudiées. Nous avons affiné cette localisation, par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence. Dans trois cas, nous avons pu isoler, un YAC chevauchant le point de cassure. Pour le remaniement de LG, nous avons pu préciser l'intervalle de localisation du point de cassure. Les quatre régions définies sont résumées dans le tableau VIII, où l'on peut apprécier l'affinement de la localisation des points de cassure, par PCR en Mb, et par FISH en kb.

Patiente	Région définie par PCR	Région définie par FISH
WD	entre DXS95 et DXS1196 (1Mb)(1)	entre DXS95 et DXS364 (220 kb)(2)
LG	entre DXS1169 et DXS472 (2 Mb)(1)	entre DXS1169 et Alu32I-2.2 (180 kb)(2)
FA	entre DXS1170 et DXS458 (1,5 Mb)(1)	entre DXS6809 et L278 (200 kb)(2)
BC	entre DXS458 et DXS454 (1 Mb)(1)	entre Alu2C11 et DXS454

(1) définis d'après le 7th X Chromosome Workshop (Cambridge, 1996)

(2) définis par déduction de la taille des YAC

tableau VIII: *cartographie des points de cassure sur l'X chez les quatre patientes*

Les résultats de cartographie des points de cassure sur l'X, chez ces quatre patientes, ont été inclus au sein d'une étude plus globale. Cette dernière a été réalisée sur 11 patientes présentant un remaniement de type t(X;A), associé à un dysfonctionnement ovarien (Sala et al., 1996). La région de chacun des points de cassure, (WD, LG FA), partage une certaine communauté avec celle des points de cassure d'autres patientes, étudiées par l'équipe de D. Toniolo :

- **GM50110A et WD** dans la région **DXS349 - DXS364** (600 kb)
- **LB368 et LG** dans la région **DXS1169 - DXS472** (2 Mb)
- **7B et FA** dans la région **DXS6809 - L278** (550 kb)

Le point de cassure le plus proximal (WD) est séparé du point de cassure le plus distal (BC) par 13 Mb.
La réalisation d'un contig de 119 YAC dans la région entre les marqueurs DXS233 et DXS454, a permis de localiser, dans la région Xq21, chez ces 11 patientes, les points de cassure sur l'X au sein de 6 régions (Sala et al., 1996).
La région étudiée couvre 15 Mb, ce qui permet d'exclure l'hypothèse d'un gène unique responsable de la fonction ovarienne. A partir de ces données,

on peut supposer, que cette région contient plusieurs gènes, responsables de la mise en place d'une fonction gonadique normale, et pouvant être interrompu par des points de translocation. Le remaniement intervenant dans un gène ou sa région régulatrice, produit, ainsi, une modification qualitative ou quantitative de son expression. De même, il est possible d'envisager que le phénotype, soit le résultat d'un effet de position. La région Xq21 est impliquée dans la région critique (Xq13-q26), mais les gènes contenus dans cette région ne sont pas les seuls responsables de dysfonctionnement ovarien puisque d'autres régions de l'X semblent également impliquées dans le POF. L'ensemble de ces données, conforte l'hypothèse de plusieurs gènes responsables du fonctionnement ovarien, de la même façon qu'un grand nombre de gènes, dispersés sur le chromosome X, est à l'origine de retards mentaux syndromiques ou non spécifiques, liés à l'X (Lutz et al., 1996). Jusqu'alors, le seul gène décrit comme responsable de POF est celui du récepteur à la FSH (follicle-stimulating hormone, localisé en 2p). Des mutations de ce gène ont été observées au sein de familles finnoises (Aittomaki et al., 1995).

Un second gène impliqué dans le POF vient d'être isolé, par l'équipe de D. Toniolo. L'analyse du YAC CEPH 933D12 chevauchant le point de cassure en Xq21 de la patiente BC a conduit à l'isolement d'une séquence codante qui présentait une homologie avec le gène diaphane de la drosophile. Le gène *dia* est responsable de stérilité chez les drosophiles mâles et femelles, et participe à l'établissement de la polarité cellulaire et à la cytokinèse. L'homologue humain de ce gène (*DIA*) est localisé dans la région critique du POF. Chez la patiente BC, à l'aide de la lignée cellulaire, le point de cassure a pu être localisé au niveau du dernier intron de ce gène. A la suite de la translocation, le gène *DIA* sur le der(X) pourrait être fusionné à des séquences du chromosome 12 et une protéine chimérique pourrait être synthétisée. Alternativement, en l'absence de la séquence UTR en 3', les transcrits pourraient être instables et dégradés rapidement. A ce stade de l'étude, il est nécessaire de réaliser des analyses de mutation au sein du gène DIA, chez un grand nombre de patient, présentant un dysfonctionnement ovarien, afin de démontrer l'implication du gène *DIA* dans le développement ovarien (Bione et al., 1998).

D'autres études moléculaires des points de cassure sur l'X associés à un dysfonctionnement ovarien devraient permettre d'isoler de nouveaux gènes candidats dans la vaste région POF.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Les remaniements chromosomiques sont des outils précieux pour l'identification de gène candidats à l'origine de maladies génétiques. Ainsi, la région touchée par le remaniement fournit un positionnement plus ou moins précis de ces gènes, à l'origine, chez les patients, de phénotypes pathologiques. Nous avons, au cours de ce travail de thèse, utilisé cette approche pour des anomalies du chromosome X associées à une pathologie. L'analyse cytogénétique hautement résolutive, donne une localisation chromosomique de l'ordre de la sous-bande. Cette localisation constitue le point de départ de notre étude.
Nous nous sommes attachés, à l'étude de deux régions distinctes du chromosome X : Xp11.2 et Xq21.3. L'état d'inactivation du chromosome remanié, oriente, de par une inactivation sélective, vers le caractère déséquilibré du remaniement.

Les données sur le chromosome X fournies par la carte physique du génome humain, nous ont permis de positionner, par FISH, six remaniements. Grâce aux contigs ordonnés de YAC existant dans ces régions. Sept zones de remaniements ont été isolés au sein de YAC dont la taille varie entre 130 kb et 1,5 Mb. Un point de cassure en Xq21.3 (LG) est cerné dans un intervalle de 2 Mb. Les deux points de cassure dans la région Xp11.2, de l'inversion du chromosome X chez le patient Cédric et de la translocation (X;22) chez la patiente Hélène, sont caractérisés par un cosmide chevauchant. La découverte de cosmides chevauchant ces points de cassure, a constitué une étape majeure, par la réduction de l'intervalle à une vingtaine de kb.

L'étape ultérieure est l'identification de séquences codantes au sein de ces cosmides. Outre les techniques de sélection d'ADNc, d'amplification d'exons, la stratégie de candidat positionnel s'est développée considérablement en raison du grand nombre de transcrits mis à disposition par les programmes d'étude sur le génome humain.
L'implication d'une séquence codante dans la survenue du phénotype doit être validée par la mise en évidence d'une altération de structure et/ou du niveau d'expression du gène au cours du remaniement. Enfin, la découverte de mutation de ce gène chez d'autres patients atteints de la même pathologie, confirmera le rôle de gène candidat. A ce propos les deux points de cassure dans la région Xp11.2 de l'inversion du chromosome X chez le patient Cédric et de la translocation t(X;22) chez la patiente Hélène, caractérisés par un cosmide chevauchant, font actuellement l'objet d'une

telle recherche dont les résultats semblent prometteurs en raison de l'isolement de plusieurs séquences codantes potentiellement candidates.

PUBLICATIONS

J Med Genet 1998;35:146–150

Characterisation of an inverted X chromosome (p11.2q21.3) associated with mental retardation using FISH

Frédérique Sloan-Béna, Christophe Philippe, Bruno LeHeup, Frédéric Wuilque, Elaine R Levy, Michèle Chéry, Philippe Jonveaux, Anthony P Monaco

Abstract

We report on a patient with a pericentric inversion of the X chromosome, 46,Y,inv(X)(p11.2q21.3), who was referred for cytogenetic analysis because of mild mental retardation, short stature, prepubescent macro-orchidism, and submucous cleft palate. The same chromosomal abnormality was found in the proband's mother. The inverted X chromosome was late replicating in all the mother's lymphocytes studied, indicative of a likely unbalanced inversion. We show, by fluorescence in situ hybridisation (FISH) using a panel of ordered yeast artificial chromosome (YAC) clones, that the Xp breakpoint is localised in Xp11.23 between DXS146 and DXS255 and that the Xq breakpoint is assigned to the X-Y homologous region in Xq21.3. YACs crossing the Xp and Xq breakpoints have been identified. One of these two breakpoints could be linked to the mental retardation in this patient as many non-specific mental retardation (MRX) loci have previously been located in the pericentromeric region of the X chromosome. Morever, the elucidation at the molecular level of this rearrangement will also indicate if cleft palate or prepubescent macro-orchidism, or both, in this boy are related to one of the two X breakpoints.

(*J Med Genet* 1998;35:146–150)

Keywords : non-specific X linked mental retardation; X inactivation; pericentric inversion of X chromosome; physical mapping

Laboratoire de Génétique Médicale, CHU Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54511 Vandoeuvre les Nancy, France
F Sloan-Béna
F Wuilque
M Chéry
P Jonveaux

The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, UK
C Philippe
E R Levy
A P Monaco

Service de Médecine Infantile, CHU de Nancy, France
B LeHeup

Correspondence to:
Dr Jonveaux.

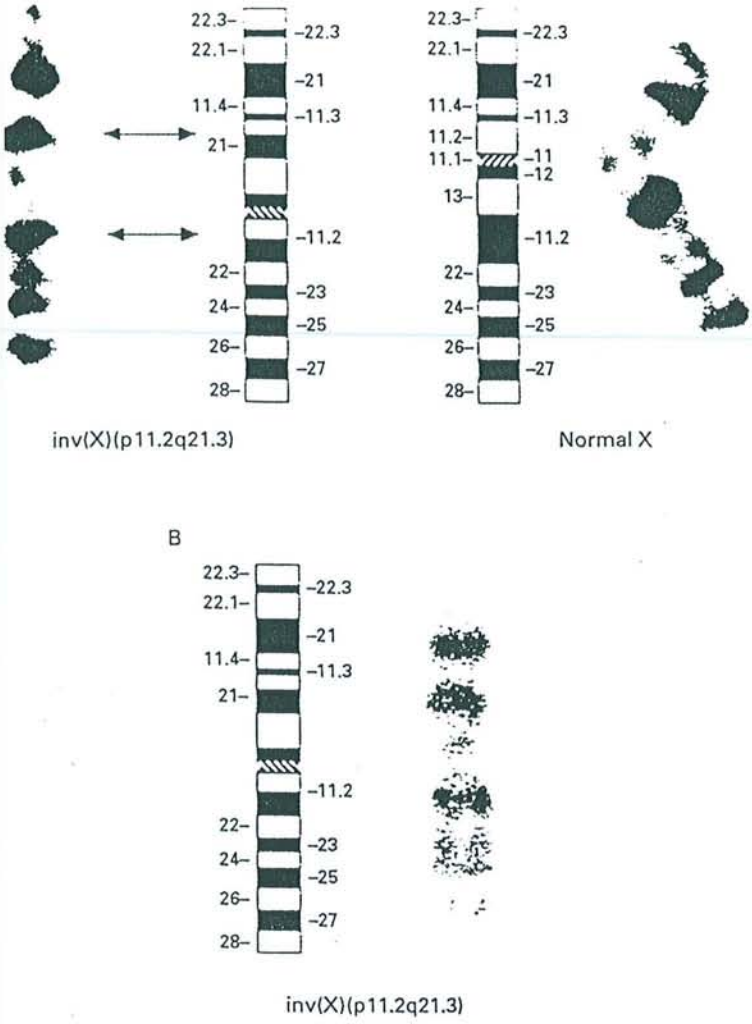
Received 4 December 1996
Revised version accepted for publication 29 August 1997

To date, as many as 147 X linked clinical entities with mental retardation (XLMR) have been described.[1] The overall incidence of XLMR has been estimated to be 1.8 per 1000 males whereas nearly 2.8 per 1000 females are expected to be carriers of at least one mutated gene responsible for XLMR.[2,3] XLMR can be classified as either syndromal or non-specific, depending on the presence or absence of phenotypic characteristics that define a syndrome. The lack of distinctive clinical criteria within the non-specific XLMR group (MRX) means that the only approach to differentiate between them is through non-overlapping regional localisation of the associated gene.[4] Genetic heterogeneity of MRX has been largely shown by mapping studies[1] and as many as 42 MRX families with a lod score of ≥ 2.0 (including FRAXE) have been reported so far.[5] In addition, there is evidence for a clustering of such genes in the pericentromeric region of the X chromosome.[6–8] Numerous disease loci have been mapped precisely through the study of chromosome aberrations[9] and progress has been made in the identification of possible specific sites for MRX from patients with structural abnormalities of the X chromosome (X;autosome translocations and small deletions).[10–18] The results of these two approaches (linkage and cytogenetic analysis) indicate that at least 10-12 non-overlapping genes must be involved in MRX.[1,5]

We have identified a male with an inverted X chromosome, inv(X)(p11.2q21.3), associated with mild mental retardation and minor anomalies. Here we report on the fine mapping of X chromosomal breakpoints as the first step towards the identification of gene(s) involved in this MRX.

Case report

The proband, an 11 year old boy, was the first born child to healthy, non-consanguineous parents. Subsequently, the couple had three pregnancies of which two were electively terminated early and one led to a stillborn infant as a result of eclampsia. From a second union, his mother had a normal daughter. The proband was born at term after an uneventful pregnancy. Birth weight was 2850 g and birth length 46 cm. Early development was reported as normal. He was first seen at the age of 11 years for decreased height and mental retardation. On physical examination, his height was 128.5 cm (-2.5 SD) and weight 26 kg (-1.5 SD for chronological age). Testicular volumes were increased (30 mm in length, +2 SD for age and pubertal stage I). There was also a slight submucous cleft palate without any palatal dysfunction or velar insufficiency. There were no other dysmorphic features. He had mild mental retardation with a two year delay in school progression. On endocrinological evaluation partial growth hormone insufficiency was shown after two pharmacological stimulations. The thyroid function was normal. There was a low testosterone level, in the normal range for prepubescent boys and in contrast to the testicular size. On magnetic resonance imaging, the hypothalamus and pituitary glands were reported as normal. Fragile X (FRAXA) syndrome was ruled out by molecular analysis.



gure 1 Partial GTG banded karyotype and idiogram of the inversion v(X)(p11.2q21.3) from the mother (A) and her son (B).

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis was performed on thymidine synchronised cultures in order to obtain chromosomes suitable for high resolution studies.[19] R banding was achieved by BrdU incorporation for at least six hours of culture, followed by fluorescence-photolysis-Giemsa (FPG) staining. G banding was achieved by the trypsin-Giemsa method. Late replication studies were performed from synchronised and standard 72 hours lymphocyte cultures by adding BrdU for the last six hours of culture and FPG staining.

Fluorescence in situ hybridisation

Mapping of the X chromosome breakpoints was achieved by using YAC clones from well characterised YAC contigs in both Xp11[18 20-22] and Xq21.3.[23 24] YAC clones expected to be located between the genetic markers DXS1000 and OATL1 in Xp11.2 and between DXS1196 and DXS214 in Xq21.3 were used as probes for FISH on the patient's chromosomes. YAC clones were obtained from the CEPH MegaYAC library,[25] the ICRF YAC library,[26] and the ICI YAC library.[27] Total yeast DNA was isolated and then labelled with biotin by nick translation using standard methods.[28] In order to distinguish between the p and q arms of the submetacentric inv(X) chromosome in our patient, a digoxigenin labelled probe specific for the steroid sulphatase (STS) locus on Xp22.3 (Oncor) was used as a marker for the p arm. Approximately 50 ng biotin labelled total yeast DNA was mixed with 2.5 μg human Cot-1 DNA to suppress repetitive sequences and 10 μg sheared salmon sperm DNA as carrier, precipitated in ethanol, and redissolved in a 25 μl hybridisation mix (2 × SSC, 50% deionised formamide, and 10% dextran sulphate). After denaturation for 15 minutes at 75°C, the probe mix was allowed to anneal for 30 minutes at 37°C and was then transferred to microscope slides with metaphase chromosome spreads from the patient. Metaphase chromosomes were denatured in 70% formamide at 75°C for two minutes and dehydrated in an ethanol series. After hybridisation for 16 hours at 37°C, the slides were washed in 50% formamide, 2 × SSC (3 × 5 minutes, 45°C) followed by washes in 0.1 × SSC (3 × 5 minutes, 60°C). The hybridisation signals were coloured by Texas Red and avidin-fluorescein isothiocyanate (FITC), so that the STS probe signal appeared red-purple and the specific YAC clone signal appeared green on metaphase chromosomes that were DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) counterstained.

Results

A pericentric inv(X)(p11.2q21.3) (fig 1) was diagnosed in the proband and his mother. Other relatives refused to cooperate. However, no increased miscarriage rate or liveborn unbalanced offspring were observed in two generations. No difference was observed between the mother's and son's inverted X chromosome. One hundred metaphases were scored on the mother for late replication studies. The inverted X chromosome was late replicating in all lymphocytes examined (data not shown).

An idiogram of the pericentric inversion is shown in fig 1. A painting probe from the X chromosome was tested on the mother's and the proband's metaphases. We did not detect any other gross chromosomal rearrangements (data not shown). YACs from previously established YAC contigs in Xp11 (fig 2A) and Xq21 (fig 2B) were used to map by FISH the inversion breakpoints on both the mother's metaphases (fig 3A, C) and the son's metaphases (fig 3B, D). In the mother, the normal X homologue served as a control for the result obtained for the aberrant chromosome. In the Xp11 region (fig 2A), YACs positive with OATL1 (ICRF y900F501) and OATL2 (ICRF OATL2-1) both gave the same hybridisation pattern on the inverted X chromosome with one signal on both p and q arms, indicating that they cross the Xp11 breakpoint. FISH analysis of cosmids derived from ICRF YAC y900F501, positive with either the left or the right arm of the pYAC4 vector, gave the same result on the proband's metaphase with only one signal distal to the Xp11 breakpoint. From this result we can conclude that the YAC signals resulted from cross hybridisation between sequences reiterated several times at

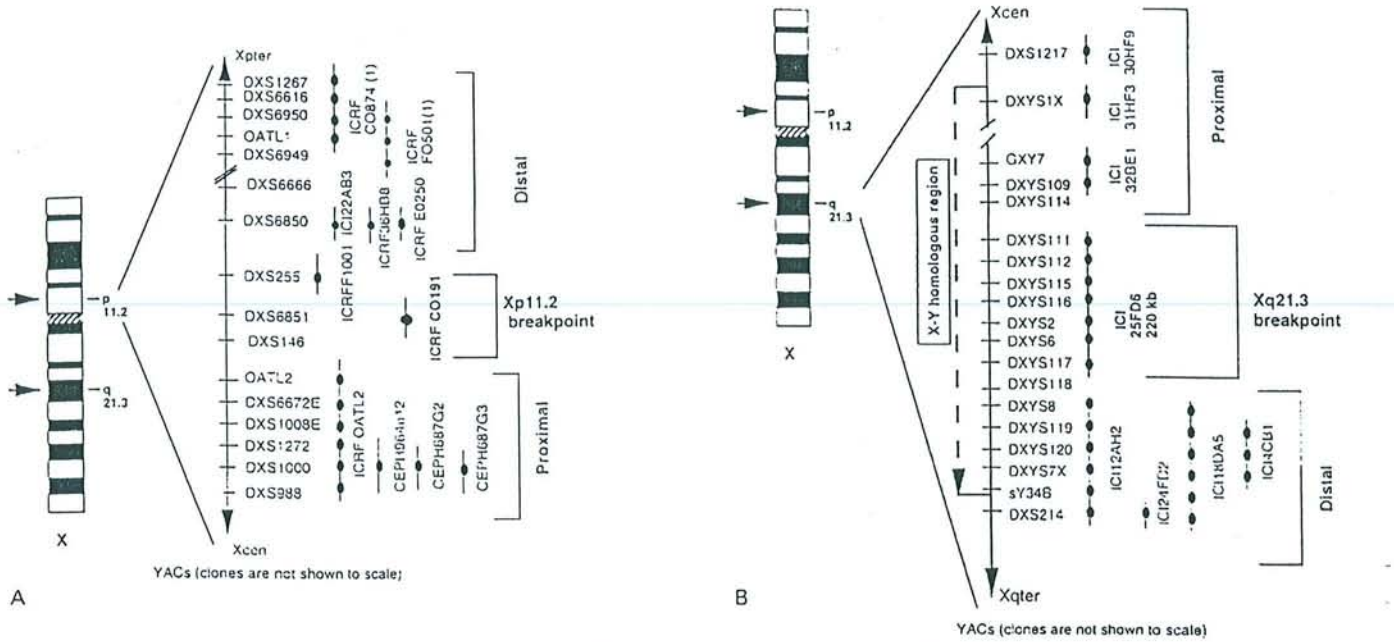


Figure 2 (A) Molecular localisation of the Xp breakpoint by FISH using YACs between OATL1 and DXS1000. (B) Molecular localisation of the Xq breakpoint by FISH inside the X-Y homologous region in Xq21.3.

each non-adjacent OATL cluster in Xp11.[29] Only one signal was observed on a normal X chromosome because the physical length between the two clusters is only a few Mb. YAC clone ICRF y900C0191, positive with DXS6851 (fig 2A), gave two hybridisation signals on the inverted X chromosome (fig 3A, B) indicating that this YAC spans the Xp11.2 breakpoint. Localisation of the Xq breakpoint (fig 2B) showed that ICI YAC 25FD6 crosses the Xq breakpoint (fig 3C, D), locating the Xq21.3 breakpoint in the X-Y homologous region within a 220 kb region between DXYS114 and DXYS118. These results are consistent with all the YACs tested and shown to map both proximally and distally according to their positions on the map (fig 2A, B).

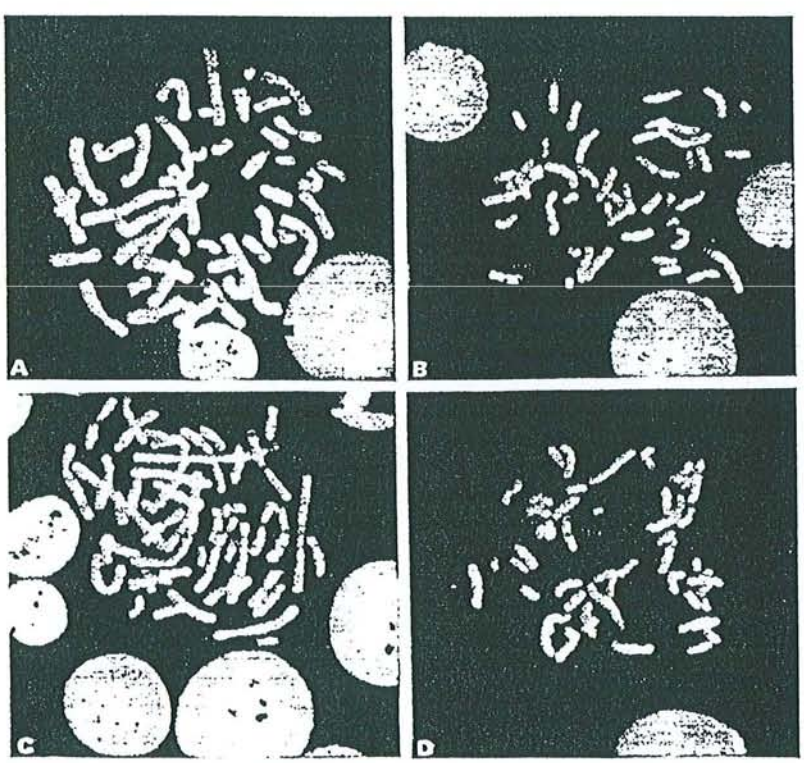


Figure 3 FISH analysis of biotinylated ICRF YAC y900C0191 to a mother's metaphase (A) and a proband's metaphase (B) showing two signals on the inverted X chromosome. The red signals correspond to Oncor STS probe on Xp22.3, which is supplied together with a centromeric X probe. FISH analysis of biotinylated ICI YAC 25FD6 on a mother's metaphase (C) and a proband's metaphase (D) showing two signals on the inverted X chromosome and one signal on the Y chromosome (X-Y homologous region) (arrow). The red signal corresponds to the STS locus on Xp22.3

Discussion

We described a new familial pericentric inversion (X)(p11.2q21.3) associated with mild non-specific mental retardation. Rearrangements of the X chromosome are relatively frequent and include deletions, translocations, and isochromosomes. However, pericentric inversions of the X chromosome are very rare, occurring at a frequency of 1/28 000-1/30 000.[30] The cytogenetic abnormality was found in an 11 year old boy with mild mental retardation, short stature, submucous cleft palate, and prepubescent macroorchidism. The proband's mother, a carrier of the same inv(X), is phenotypically normal. X inactivation study in the mother shows a preferential skewed inactivation of the inverted X chromosome. This non-random inactivation pattern suggests an unbalanced inversion. However, another possibility could be that the "skewed" X inactivation reflects a selection for cells with the inverted X inactivated. As a direct approach towards positioning the X chromosome breakpoints, we have used YAC clones as probes for FISH analysis. Our results show that YAC clones ICRF y900C0191 and ICI 25FD6 span the Xp and Xq breakpoints, respectively. This suggests that the chromosome segments inserted in these YAC clones might include an MRX gene. Two cases with X chromosome aberrations and breakpoints similar to those reported in our study have been published: a moderately mentally retarded adolescent female with general hypotrophy associated with a de novo apparently balanced

t(X;20)(p11.2;q13.3), and a mentally retarded boy with a paracentric inversion of the long arm of the X chromosome, inv(X)(q21q24), that cosegregated with mental retardation.[31] In this family, carrier females were asymptomatic. Deafness was also observed but did not seem to cosegregate with the X inversion. In addition, by linkage analysis, a large number of syndromic and isolated XLMR were mapped to the region including Xp11 and Xq21.[3 5 7 8] In our family, the affected boy suffers from borderline mental retardation (MR) with other clinical signs, but because he is the only affected male we must consider the MR, if genetically determined, as a non-specific mental retardation which could be linked to one of the two X breakpoints both located in the pericentromeric region. The Xp11.2 breakpoint seems to be a better candidate for disruption of an XLMR gene as it is crossed by many MRX genetic intervals.[5]

The clinical features also include short stature, submucous cleft palate (CP), and prepubescent macro-orchidism. The short stature is probably unrelated to the inv(X) as the father who does not carry the inversion is only 165 cm tall. The occurrence of cleft palate is more striking as a gene for an X linked CP (CPX, MIM 303400) is located in band Xq21 between DXS1196 and DXS1217.[23] FISH analysis has enabled us to map the Xq21 breakpoint in the X-Y homologous region (fig 3C, D), a few Mb distal to the telomeric end of the CPX interval as determined by linkage study in an Icelandic pedigree.[23] This location seems to rule out the involvement of the Xq breakpoint in the CP in this boy. Nevertheless, the X inactivation pattern in the proband's mother could indicate a more complex rearrangement with a deletion of part of the CPX region. It is noteworthy that an intensive STS PCR screening with markers from DXS95 to DXYS1X did not detect any deletion (data not shown). A transgenic mouse model of X linked cleft palate has been reported.[32] The disrupted cellular sequences have been mapped to the proximal region of the mouse X chromosome, just proximal to the *Araf* locus. This mouse locus may represent the analogue of a human locus mutated in a sex linked, heritable form of CP. The human ARAF1 gene is localised in Xp11.23, several Mb distal to the location of our Xp11.23 breakpoint,[33] excluding the involvement of this locus in the CP in this boy. The inv(X) was also associated with prepubescent macro-orchidism at the age of 11. Molecular examination excluded a mutation in the FMR1 gene and endocrinological evaluation showed normal thyroid function. In the case reported by German *et al*,[34] the male carriers of inversion inv(X)(p11q26) have ambiguous genitalia and Madan[35] suggested that "some sort of position effect in the X affecting the sexual phenotype may also be operating in the male". In view of the fact that the Xq breakpoint in our patient occurs in the X-Y homologous region, one could speculate that it disrupts expressed sequences involved in testicular development. The Xq breakpoint is located inside the so-called critical region (CR) (q13-q26) which has to be intact on both X chromosomes for proper ovarian development and function.[36] Our case is another exception to this rule and molecular cloning of breakpoints inside the CR with or without ovarian dysgenesis should clarify this complex concept of CR.

Further studies will involve cosmid cloning of both breakpoints and search for expressed sequences at or near Xp and Xq breakpoints. Elucidation at the molecular level of this rearrangement will indicate if any of the clinical symptoms in this patient are the result of the inverted X chromosome.

We thank Professor S Gilgenkrantz for valuable discussions and the group of H H Ropers (Nijmegen, The Netherlands) for their help in the localisation of the Xp breakpoint. This work, FSB, and CP were supported by the European Community Human Genome programme (EC contract GENE-CT93-0022) and l'Association Française contre les Myopathies (AFM). The Sanger Centre (Cambridge, UK) provided us with the ICI YACs. APM is a Wellcome Trust Principal Research Fellow.

1 Lubs HA, Chiurazzi P, Arena JF, *et al.* X-linked mental retardation genes: update 1996. *Am J Med Genet* 1996;64:147-57.
2 Glass IA. X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991;28:361-71.
3 Neri G, Guerrieri F, Gal A, Lubs HA. X-linked mental retardation genes: update 1994. *Am J Med Genet* 1994;51: 542-9.
4 Kerr B, Turner G, Mulley J, *et al.* Non-specific X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991;28:378-82.
5 Gedeon AK, Donnelly AJ, Mulley JC, *et al.* How many X-linked genes for non-specific mental retardation are there? *Am J Med Genet* 1996;64:158-62.
6 Samanus C, Albrecht R, Neugebauer H, Neri G, Gal A. Gene for nonspecific X-linked mental retardation maps in the pericentromeric region. *Am J Med Genet* 1991;38:224-7.
7 Passos-Buenos MR, Byth BC, Rosenberg S, *et al.* Severe nonspecific X-linked mental retardation caused by a proximally Xp located gene. *Am J Med Genet* 1993;46:172-5.
8 Robledo R, Melis P, Laficara F, *et al.* Further linkage evidence for localization of mutational sites for non syndromic types of X-linked mental retardation at the pericentromeric region. *Am J Med Genet* 1996;64:107-12.
9 Tommerup N. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet* 1993;30:713-27.
10 Fries MH, Lebo RV, Schonberg SA, *et al.* Mental retardation locus in Xp21 chromosome microdeletion. *Am J Med Genet* 1993;46:363-8.
11 Raeymaekers P, Lin J, Gu XX, *et al.* Non-specific mental retardation is probably caused by a microdeletion in Belgian family. *Am J Med Genet* 1996;64:15-20.
12 Van der Maarel SM, Scholten I, Weghuis OS, *et al.* Cloning of candidate genes for X-linked mental retardation by use of chromosome aberrations. *Am J Med Genet* 1996;64:15-20.
13 Gustavson P, Gustavson KH, Larsson K, *et al.* Mapping of a balanced X;15 translocation in a female with severe mental retardation. *Am J Med Genet* 1996;64:15-20.
14 May M, Colleaux L, Murgia A, *et al.* Molecular analysis of four males with mental retardation and deletions of Xq21.1 between DXS233 and CHM. *Hum Mol Genet* 1995;4: 1465-6.
15 Rousseau F, Vincent A, Rivella S, *et al.* Four chromosomal breakpoints and four new probes mark out a 10-cM region encompassing the fragile X locus (FRAXA). *Am J Hum Genet* 1991;48:108-16.
16 Lahn BT, Ma N, Breg WR, *et al.* Xq-Yq interchange resulting in supernormal X-linked gene expression in severely retarded males with 46 XYq- karyotype. *Nat Genet* 1994;8: 243-50.
17 Billuart P, Vinet MC, des Portes V, *et al.* Identification by STS PCR screening of a microdeletion in Xp21.3-22.1 associated with non-specific mental retardation. *Hum Mol Genet* 1996;5:977-9.
18 Van der Maarel S, Scholten IHJM, Maat-Kievit JA, *et al.* Yeast artificial chromosome cloning of the Xq13.3-q21.31 region and the fine mapping of a deletion associated with chorioderemia and non-specific mental retardation. *Eur J Hum Genet* 1995;3:207-18.
19 Gosden CM, Davidson C, Roberston M. Lymphocyte culture. In: Rooney ED, Czepulkowski BH, eds. *Human cytogenetics, constitutional analysis. A practical approach.* Vol 1. 2nd ed. Washington DC: IRL Press, 1992:31-54.
20 Knight JC, Grimaldi G, Thiesen HJ, *et al.* Clustered organization of Krüppel zinc-finger genes at Xp11.23, flanking a translocation breakpoint at OATL1: a physical map with locus assignments for ZNF21, ZNF41, ZNF81, and ELK1. *Genomics* 1994;21:180-7.
21 Coleman MP, Nemeth AH, Campbell L, *et al.* A 1.8 Mb YAC contig in Xp11.23: identification of CpG islands and physical mapping of CA repeats in a region of high gene density. *Genomics* 1994;21:337-43.

22 Hagemann T, Surosky R, Monaco AP, *et al.* Physical mapping in a YAC contig of 11 markers on the human X chromosome in Xp11.23. *Genomics* 1994;21:262-5.
23 Forbes S, Brennan L, Richardson M, *et al.* Refined mapping and YAC cloning construction of the X-linked cleft palate and ankyloglossia locus (CPX) including the proximal X-Y homology breakpoint within Xq21.3. *Genomics* 1996;31: 36-43.
24 Sargent CA, Briggs H, Chalmers IJ, *et al.* The sequence organization of Yp/proximal Xq homologous regions of the human sex chromosomes is highly conserved. *Genomics* 1996;32:200-9.
25 Chumakov IM, Rigault P, Le Gall I, *et al.* A YAC contig map of the human genome. *Nature Suppl* 1995;377:175-83.
26 Larin Z, Monaco AP, Lehrach H. Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4123-7.
27 Anand R, Riley JH, Butler R, *et al.* A 3.5 genome equivalent multi access YAC library: construction, characterization, screening and storage. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1951-6.
28 Markie D, Davies A. YAC DNA preparation and labelling for high throughput FISH analysis. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:720-1.
29 Lafreniere R, Geraghty M, Valle F, *et al.* Ornithine aminotransferase-related sequences map to two nonadjacent intervals on the human X chromosome. *Genomics* 1991;10:276-9.
30 Schorderet D, Friedman C, Disteche C. Pericentric inversion of the X chromosome: presentation of a case and review of the literature. *Ann Genet* 1991;34:98-103.
31 Abeliovich D, Dagan J, Kimchi-Sarfaty C, Zlotogora J. Paracentric inversion X(q21q24) associated with mental retardation in males and normal ovarian function in females. *Am J Med Genet* 1995;55:359-62.
32 Wilson JB, Ferguson MWJ, Jenkins NA, *et al.* Transgenic mouse model of X-linked cleft palate. *Cell Growth Differ* 1992;4:67-76.
33 Nelson DL, Ballabio A, Cremers F, Monaco AP, Schlessinger D. Report of the sixth international workshop on X chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71: 308-42.
34 German J, Archibald R, Chaganti R. An inherited pericentric X chromosome associated with male pseudohermaphroditism. *Excerpta Medica Int Cong Series* 1976; 397:126.
35 Madan J. Balanced structural changes involving the human X: effect on sexual phenotype. *Hum Genet* 1983;63:216-21.
36 Therman E, Laxova R, Susman B. The critical region of the human Xq. *Hum Genet* 1990;85:445-6.

GENOMICS 40, 123–131 (1997)
ARTICLE NO. GE964542

Eleven X Chromosome Breakpoints Associated with Premature Ovarian Failure (POF) Map to a 15-Mb YAC Contig Spanning Xq21

CINZIA SALA,* GIULIA ARRIGO,* GIOVANNA TORRI,* FRANCESCO MARTINAZZI,* PAOLA RIVA,† LIDIA LARIZZA,† CHRISTOPHE PHILIPPE,‡ PHILIPPE JONVEAUX,‡ FREDERIQUE SLOAN,‡ TULLIO LABELLA,§ AND DANIELA TONIOLO¶,[1]

*DIBIT-HSR, Milan, Italy; ¶Institute of Genetics Biochemistry and Evolution, CNR, 27100 Pavia, Italy; †Department of Biology and Medical Genetics, University of Milan, 20122 Milan, Italy; §Institute of Protein Biochemistry and Enzymology, CNR, Naples, Italy; and ‡Laboratory of Genetics, University Hospital of Nancy, Nancy, France

Received July 12, 1996; accepted November 18, 1996

Eleven balanced X-autosome translocations associated with premature ovarian failure (POF) were mapped to a YAC contig spanning most of Xq21 and constructed between the DXS223 and DXS1171 loci. The contig corresponds to a genomic region of about 15 Mb and contains the whole X-Y homologous region. The most proximal and most distal breakpoints associated with POF were mapped 15 Mb apart. The remaining breakpoints were localized along this large region, in the X-specific and in the X-Y homologous region. Four of the YACs contained two breakpoints in the same or in flanking STS intervals. Our results confirm the cytological findings and suggest that a minimum number of eight different genes in Xq21 may be involved with ovary development. Interruption of such loci could be the cause of POF. © 1997 Academic Press

INTRODUCTION

X chromosome monosomies (XO) and a number of diverse X chromosome rearrangements are associated, in females, with defects of ovarian development. The best studied cases are the XO females affected with Turner syndrome, who present, among other symptoms, short stature and ovarian dysgenesis. In these females, gonads do not develop either because the primordial germ cells do not reach the gonad or because they are lost after seeding the primordial gonad (Sing and Carr, 1966). The ovaries appear as streaks of primitive connective tissue stroma, lacking primary follicles and lying adjacent to the Fallopian tubes. As a consequence, gonadal sex hormone production at puberty fails to occur, resulting in sexual infantilism and primary amenhorrea. Apart from monosomy, a variety of structural anomalies of the X chromosome have been observed associated with stigmata of gonadal dysgenesis: in a few cases streak gonads have been described, but more often the diagnosis is of primary or secondary amenorrhea associated with elevated gonadotropin levels, and it is defined as premature ovarian failure (POF) (Coulam, 1982). The two most frequently encountered structural abnormalities are deletions and isochromosomes. Less frequent are balanced X-autosome translocations associated with primary or secondary amenhorrea. Taken together the findings of this group of patients suggest that most abnormalities that involve the long arm of the X chromosome affect ovarian function while those in the short arm appear to affect stature (Sarto *et al.*, 1973; Therman *et al.*, 1990).

In approximately 1% of women, POF can occur also in the absence of chromosomal rearrangements (Coulam *et al.*, 1986). Known causes include immunological disorders with production of antiovarian or antireceptor antibodies, viral infections, cytotoxic drugs, and radiations. Most cases are idiopathic. Familial forms of POF have been described, confirming that alterations in a specific gene(s) may be involved in the phenotype.

Cytogenetic analysis of Xq rearrangements has suggested that a large region, from Xq13 to Xq26, defined the "critical region," is essential for normal ovarian function (Sarto *et al.*, 1973). Attempts to correlate karyotypes and phenotypes have, however, yielded inconsistent results and have led to concern about the accuracy of the definition of the breakpoints, which was done purely on a cytogenetic basis. Moreover, the variety of the structural anomalies involved did not help in clarifying the role of the X chromosome in ovarian function nor in determining whether the phenotypes associated with the XO or with chromosomal rear-

[1] To whom correspondence should be addressed at Institute of Genetics Biochemistry and Evolution, CNR, Via Abbiategrasso 207, 27100 Pavia, Italy. Telephone: 39-382-546340. Fax: 39-382-422286. E-mail: Toniolo@ipvgbe.igbe.pv.cnr.it.

0888-7543/97 $25.00
Copyright © 1997 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

TABLE 1

Patient	Translocation	Clinical features
LA1	46, X, t(X;1)(q21;p34)	Secondary amenorrhoea, elevated gonadotropins, small ovaries
LB106	46, X, t(X;2)(q21;q23)	Primary amenorrhoea
GM5011A	46, X, t(X;2;8)(q21;q14;p11)	Primary amenorrhoea, lack of secondary sexual development
LB368	46, X, t(X;12)(q21;p13)	Primary amenorrhoea
GM10386	46, X, t(X;19)(q21;p22)	Primary amenorrhoea
LR	46, X, t(X;9)(q21;q22)	Secondary amenorrhoea
7B	46, X, t(X;9)(q21;q34)	Amenorrhoea, absent breast development, small ovaries

rangements can be ascribed to the same cause. To define the alterations of the critical region in Xq, we attempted a precise mapping of one type of chromosomal rearrangement involved with POF, the X-autosome balanced translocations. In similar cases, the interruption of a specific sequence at the breakpoint has often been shown to be the cause of an altered phenotype. In this paper we report the construction of a YAC contig spanning 11 breakpoints and the fine mapping of the breakpoints by *in situ* hybridization.

MATERIALS AND METHODS

Clinical and cytogenetic data. Patients are described in Table 1 and in Philippe *et al.* (1995). GM5011A and GM10386 were purchased from the NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, NJ). Lymphoblastoid cell lines were established from peripheral blood using Epstein–Barr virus (EBV) according to standard methods (Neitzel, 1986).

YAC clone isolation and construction of the contig. The STSs used to construct the contig are listed in Table 2. Yeast cells were grown in selective AHC medium. The presence of the STS was determined by PCR (see Table 2) from yeast cells or DNA. To estimate the size of the YACs, yeast chromosomes were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in 1.5% agarose gel in a LKB apparatus. After electrophoresis for 22–24 h at 170 V, with pulse times varying from 35 to 80 s (or from 50 to 150 s for YACs larger than 500 kb), gels were stained with ethidium bromide, blotted onto Hybond-N (Amersham) membranes, and hybridized with ^{32}P-labeled total human DNA.

Alu-PCR. The primers *Alu*-S, *Alu*-J (Munroe *et al.*, 1994), and *Alu* 278 (Nelson *et al.*, 1989) were used to amplify YAC DNA specifically from a total yeast DNA preparation. For *Alu*-end preparation the left and right arm primers (YAC4L and YAC4R in Nelson *et al.*, 1991) were used as well. In a total reaction volume of 25 μl, the PCR amplifications contained 25 ng of template, 1 μM primers *Alu*-S/J (mixed in a 4:1 ratio) and/ or YAC4L/R, 1 U of *Taq* Polymerase (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 300 μM dNTPs. PCR was for 35 cycles: 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 4 min followed by 72°C for 10 min. Whole *Alu* product or isolated bands eluted from gels were used as probes.

In situ hybridization. YAC DNA was separated from the yeast chromosomes by PFGE. The YAC DNA was cut from low-melting agarose gel. After treatment with 1.5 U of β-agarase (New England Biolabs), the DNA was digested with *Sau*3A (Promega), ligated to *Sau*3A-linkers D921 (5′-GATCAGAATTCTGTACCGTGGAC-3′) and D922 (5′-GATCGTCCACGGTACCGAATTCT-3′), and amplified by PCR in a reaction of 50 μl, containing 10 ng of template DNA, 250 ng of D921, 200 μM dNTPs, 1 mM $MgCl_2$, and 1.5 U of *Taq* Polymerase (Promega) with the following cycling times: 94°C for 45 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 4 min, plus 3 s of extension at each cycle for 40 cycles. DNA was labeled by nick-translation with biotin-16–dUTP according to the Boehringer Mannheim protocol. *In situ* hybridizations were performed as described previously (Rossi *et al.*, 1994). Hybridization was detected by incubation of the slides with fluorescein isothiocyanate–avidin (ONCOR) using two steps of amplification. Slides were counterstained with propidium iodide (1 μg/ml), banded with diamidinophenylindole (DAPI), and mounted in antifade solution (Vectashield mounting medium; Vector).

RESULTS

A Contig of 15 Mb Spanning the Critical Region

Seven balanced X-autosome translocations associated with POF in females with normal stature and no other Turner stigmata were initially collected for this study. They were cytogenetically mapped in Xq21–q22. A brief description of the seven cases is in Table 1.

To map the seven breakpoints, YACs were isolated using STSs derived from known loci (ZNF6, CHM, DXS454, AGMX, COL4A5, and DXS424 (Willard *et al.*, 1994)) or developed in our laboratory from end points of X chromosome deletions induced by insertion of telomeric sequences and previously ordered along Xq (Farr *et al.*, 1992). Nine YACs were used as probes in *in situ* hybridization to metaphase chromosomes of the patients. All the breakpoints were localized between the YACs 36CB1 and 17IG11, which were identified by STSs derived from the ZNF6 gene in Xq21 (Lloyd *et al.*, 1991) and the TMY120 telomeric sequence, at the Xq21–q22 border (Farr *et al.*, 1992), respectively. Two breakpoints, LA1 and LB106, were mapped between YACs 36CB1 and 40AB3. The remaining five breakpoints were flanked by YACs 40AB3 and 171G11.

To create a YAC contig across the interval, 8 additional STSs (DXS1102, DXS1169, DXS472, DXS1217, DXYS1X, DXS3, DXS1170, and DXS458) were used to screen the ICI and the CEPH YAC libraries (Albertsen *et al.*, 1990). Whole *Alu*-PCR products of the YACs 36CB1, 40AB3, and 17IG11 were also used as probes to screen the ICRF YAC library (Larin *et al.*, 1991). A total of 58 YACs were identified. Search of the Généthon and the Whitehead Institute Databases revealed 15 more YACs overlapping with the ones identified in our laboratory. The overlaps among all the YACs were verified with 24 additional STSs and hybridization probes (they are indicated as squares in Fig. 1). Five of the probes were previously described and ordered in the region (Philippe *et al.*, 1995); the remaining were YAC end clones or cosmids isolated in our laboratory.

TABLE 2

Locus	Probe	Primer sequence (5′–3′)	Product size (bp)	Annealing temp (°C)	Reference
DXS355	RX167	catctgtggagaaccaagg actgctccttgccctact	162	60	Barker and Fain (1993)
DXS1167	D3	cttccatcttgaagctttcc tgaactcctaattaatgagtgttc	182	58	Barker and Fain (1993)
DXS1209	AFM273zd5	agatggagaacagattattggt tctatcactatatatatgcnatccc	150	58	Gyapay *et al.* (1994)
ZNF6	HSZNF	aaccaggcagtggcaaacag tatggcaagggtacactgtg	571	58	This study
CHM		taggctacacagtgtagtaa gacttctctcctcccagagg	322	55	This study
DXS1002	AFM249vh5	ctgctacccttttagttctctc tccatgttgctgcgaa	266–274	55	Gyapay *et al.* (1994)
DXS1168	XKL10	ttctgtatggtcaaatagtattcc aaaagtcaatagatattctggtcc	159	58	Barker and Fain (1993)
DXS349	RX98	cattctaagcctcaagttgg ttgtccccattgttgtgtattct	170	55	Barker and Fain (1993)
DXS95	pXG-7	cttgagtgttgtatgagac ttaatgggagctagaagg	161	50	Forbes *et al.* (1996)
DXS364	RX272	gcagtaaagtcaggagaggg ctctcactgcagctttcct	161	50	Barker and Fain (1993)
DXS1196	AFM56yb8	ctaaattctcctccaccggtg tttccagagcagattttcagt	209–227	56	Gyapay *et al.* (1994)
DXS262	KZ040	ctcctagtatctggaacacgaa aggataatttgatgtcatcctt	142	58	Barker and Fain (1993)
DXS110	p722	tgagttgaagaaagtggg ggtgtgttaagtcagaag	170	57	Forbes *et al.* (1996)
DXS1066	AFM234tf8	tgatgattctggatcttgtcactgg tctgtgaaaattggactcaggaagc	257–269	66	Gyapay *et al.* (1994)
DXS1222	AFM308xb9	gcaaaaatccccagcc ttcattgccatccagattc	234–240	48	Gyapay *et al.* (1994)
DXS1169	A1	aacccagctcataccacag ttttgtgctagttctatctcatct	153	56	Barker and Fain (1993)
DXS472	pXG8	gtggagtttgagaaatt gaatagaggaaaaagttg	207	52	Forbes *et al.* (1996)
DXS1217	AFM288ye9	atgaagtatcgtatctgaatcccg tccagtaagtttggtctatatgacg	231–243	65	Gyapay *et al.* (1994)
DXYS34	GMGXY8	agagagccataatctttttgc cccagagaccagaacatttt	200	57	Affara NA (1987)
DXYS1X	DXYS1/4	atatctctgttcacttctg ggattcaaggtgtcagta	170–174	51	Browne *et al.* (1991)
DXYS42	sY20	tcatagcccaagacaaggag atggtaaatccagcacagga	295	60	Vollrath *et al.* (1992)
DXYS5	sY24	tatgatgttagccatgggct atgaggccagcattactctg	373	60	Vollrath *et al.* (1992)
DXYS108	sY25	gcatcaacacagaccaacaa ggttggctacagaaagaagg	326	60	Vollrath *et al.* (1992)
DXYS33	GMGXY7	tctgtgttttgctgttgatg tgggaaaataagctcaagtata	200	55	Affara NA (1987)
DXS214		aagctttacagtttgtcatcaag caagtgtctatggaatgagaaaa	110	54	GDB
DXYS110	sY28	actattttgcccatgtggac atgagctgctgtctcaatcc	311	60	Vollrath *et al.* (1992)
DYS254	sY43	cctttcatgacgtatagctgg aaagttttgaataccaagagaagg	300	60	GDB
DXYS36	GMGXY12	tttgagtctttccaccagca cccaagacaaaaactgctga	500	58	Affara NA (1987)
DXYS9	sY47	atctgtgaagcacccactgt cctgttgcaaatgacaatg	174	60	Vollrath *et al.* (1992)
DXYS123	sY49	atacagctttatttcttgcttttc cgtgtttcaaaacgctgtag	104	58	Vollrath *et al.* (1992)
DXYS12	sY48	gaggcaatcacaaattctgg tggctgaatgataacccatt	329	60	Vollrath *et al.* (1992)
DXYS35	GMGXY9	taactgccctggactcttca gaacctcaccaaacgctaaa	150	57	Affara NA (1987)
DXYS4	sY52	ctcaaaatttccgtgtgctt′	292	60	Vollrath *et al.* (1992)

TABLE 2—*Continued*

Locus	Probe	Primer sequence (5′–3′)	Product size (bp)	Annealing temp (°C)	Reference
		cgccaaaacaggagattaga			
DXYS31X	GMGXY5	tcattgtggttttgattgc	200	56	Affara NA (1987)
		aatcggacttcatcaaaattaa			
DXS3	p19-2	aatacatagggttattgtgacc	175–181	55	Stanier P (1991)
		ccacctctctgaaagtgtgt			
DXS1203	AFM262vg1	cctgaatttccccagc	210–220	50	Gyapay *et al.* (1994)
		tcccacttgccaactc			
DXS990	AFM136yc7	agctatatgaccagtacaaacatac	172–180	58	Gyapay *et al.* (1994)
		gacagaagggacatcaactc			
DXS1170	B8	tgccatctatactagtcaggg	137	55	Barker and Fain (1993)
		ctttacaataataattgggtgct			
DXS6809	CHLC.GATA	tgaaccttcctagctcagga	255	55	GDB
	69B12	tctggagaatccaattttgc			
DXS7479	WI6160	gcagagaacatgctttattgagg	199	58	GDB
		gtgggttgggggagctaatt			
HC120	HyTM120	agtacgatcctactgtgacc	147	53	This study
		atccaagtacacacacatc			
DXS458	Mfd79	gataaaactgcatagaaatgcg	186	55	Weber *et al.* (1990)
		caactgggatattgacattg			
DXS1171	D16	gttgaaagaatagaacaagtatcc	162	55	Barker and Fain (1993)
		gggggtaaagttccatga			
DXS454	Mfd72	agaagacataaggatactgc	145	48	Weber *et al.* (1990)
		gatcccaactatttctttct			

Finally, *Alu*-PCR probes were prepared from some of the YACs and used to confirm or demonstrate the overlaps and the order of the STSs: they are indicated with diamonds in Fig. 1.

Overlap with the contig in the X-Y homologous region constructed by Sargent *et al.* (1996) was also established. Screening with the DXS3 primers identified YACs 804H6 and 871G4, from the CEPH library, which also contained the DXYS31, DXYS4, and DXYS35 loci mapped to the distal part of the X-Y homologous region. Screening the ICI library (Anand *et al.*, 1990) with DXS1217 identified six YACs, three of which (25FE6, 31HF3, and 39IF2) also contained the DXYS34 and DXYS1 loci mapped to the proximal part of the X-Y homologous region. The YAC 968A8 closed the only gap left in the X-Y homologous region contig (Sargent *et al.*, 1996).

The entire contig is shown in Fig. 1. It overlaps the 3-Mb contig of the X-linked cleft palate region (Forbes *et al.*, 1996). Since the contig was assembled solely on the basis of the STS and marker content, it is difficult to infer its exact physical size. The size of many of the YACs was known from the databases: those reported in Fig. 1 were also determined in our laboratory by PFGE and hybridization to total human DNA. It is thus possible to estimate the maximum length of the contig, which is defined by the shortest tiling path of overlapping YACs. This would involve 119 YACs with a total size of 15 Mb, assuming no chimerism.

Mapping Breakpoints by in Situ Hybridization

YACs from the region were used as probes in FISH (fluorescence *in situ* hybridization) experiments to look for those spanning each of the seven breakpoints in our panel.

The two YACs 36CB1 and 40AB3, flanking the breakpoints LB106 and LA1, were found to be close to each other. The overlapping YACs 922B5 and 949E11 linked the two and were shown to span both breakpoints, which were thus mapped between the ZNF6 gene and the left arm of YAC 40AB3, in the same STS interval (the hybridization with YAC 949E11 is shown in Fig. 2).

The third YAC, 17IG11, was much more distal. Many YACs in the contig were tested, until YACs 926D12, 32IB3, 12AH2, and 855D9 were found to span the breakpoints of GM5011A, LB368, GM10386, LR, and 7B, respectively. Some of the hybridizations are shown in Fig. 2. Overlapping YACs were used to define the position of each breakpoint better. The minimal region defined by the different FISH probes is shown in Fig. 1 above the contig as a stippled box. These experiments identified five different YACs spanning the seven breakpoints. In two instances different breakpoints were in the same YACs. In addition to those in LB106 and LA1, the breakpoints in GM10386 and LR were in the same YAC of 660 kb, 12AH2. They were mapped in different but flanking STS intervals: the breakpoint of GM10386 was contained in the smaller YAC 4CB1, which was instead proximal to the breakpoint in LR.

Four X-autosome balanced translocations (LG, WD, FA, and BC) were recently mapped in respect to molecular markers of Xq in the same region we have defined (Philippe *et al.*, 1995). They were localized to the YACs using the same strategy. The positions of the four breakpoints are shown above the YAC contig in Fig. 1.

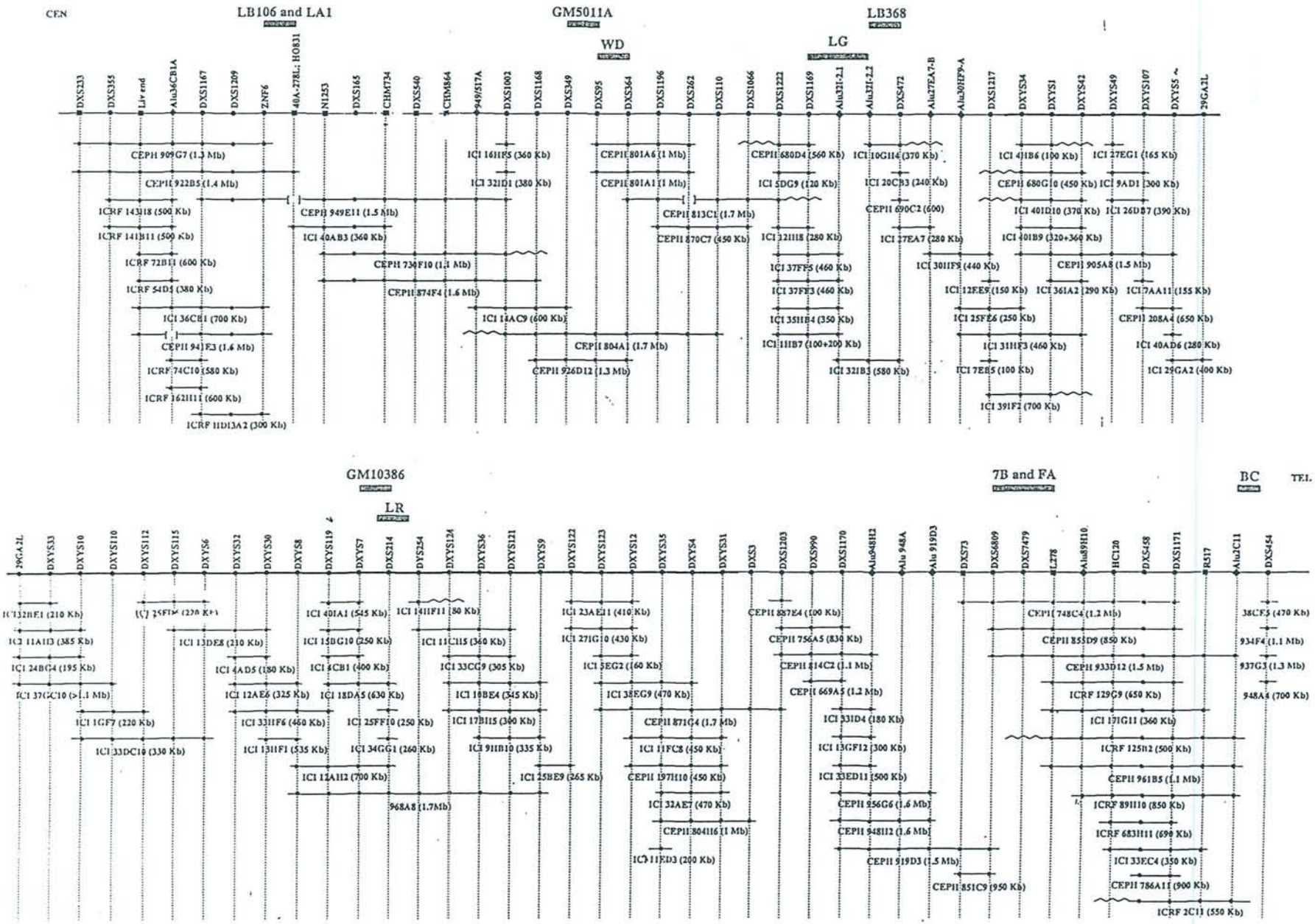
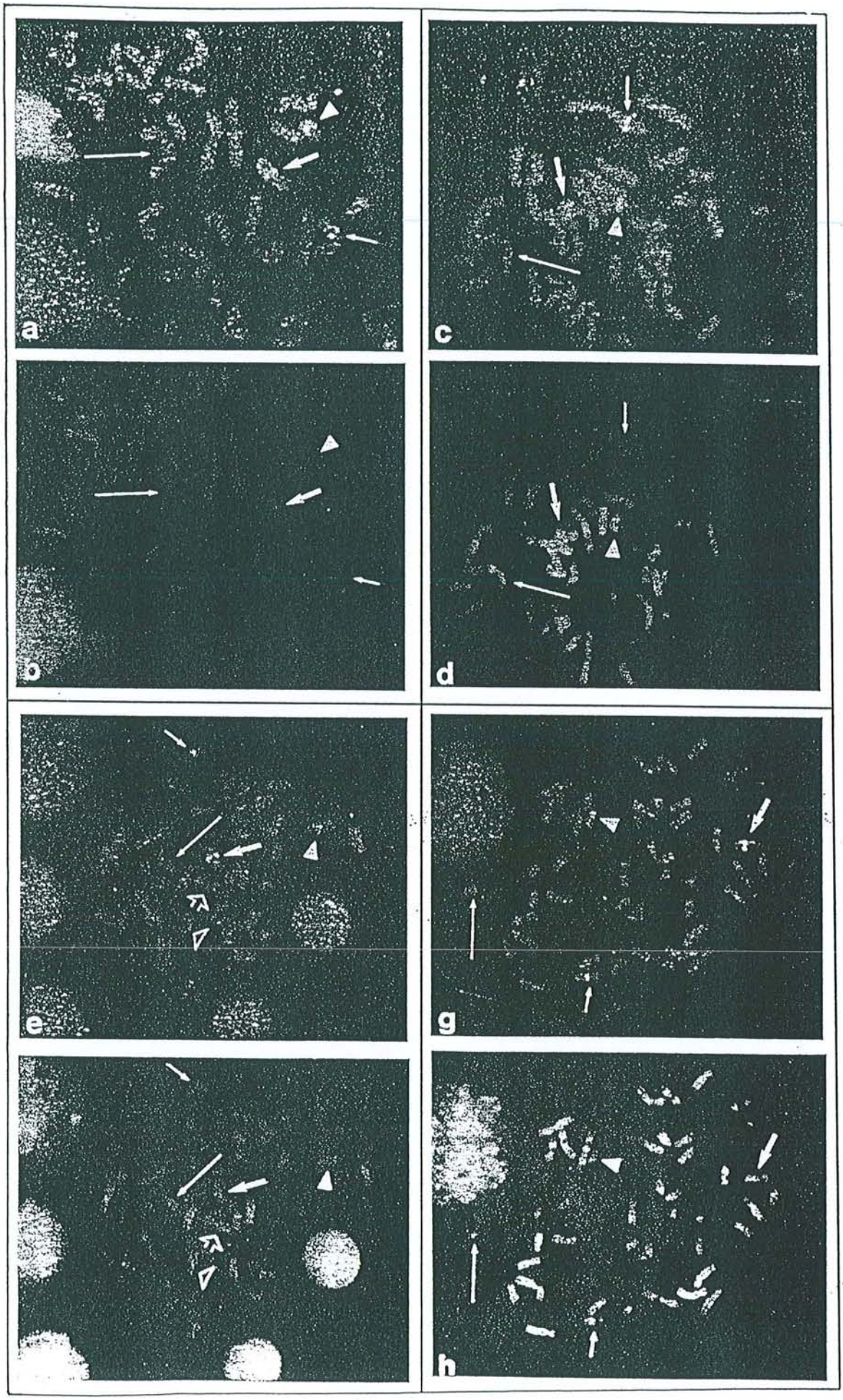


FIG. 1. YAC contig. STSs are represented by circles, hybridization probes by squares, and *Alu*-PCR probes by diamonds. The thicker line shows the X-Y homologous region. The gray areas above the map indicate the minimum regions where the breakpoints were localized. Vertical dashed lines divide the contig into 76 bins.


a
c
b
d
e
g
f
h

Patient BC defined a new breakpoint region. WD and LA had breakpoints in YACs 926D12 and 855D9, respectively, previously defined by GM5011A and 7B. They were mapped in the same intervals as GM5011A and 7B or in flanking STS intervals. The YAC 35HB4 contained sequences spanning the breakpoint of patient LG: as the same was not true for YACs 680D4 and 37FF5, the breakpoint was mapped to the distal portion of YAC 35HB4, possibly in the proximal end of YAC 32IB3, overlapping by one STS with YAC 35HB4 and spanning the breakpoint of the patient LB368. The FISH mapping agrees with the previous molecular characterization of the patient (Philippe *et al.*, 1995), between markers DXS1006 and DXS472. Patients LG and LB368 seem to identify the same genomic region.

DISCUSSION

Eleven balanced X-autosome translocations associated with POF were mapped to a YAC contig spanning most of Xq21. The contig was constructed between the DXS233 and DXS1171 loci (Willard *et al.*, 1994). Eighty known Xq21 loci were localized to 119 YACs and ordered along the chromosome. Most of the region, of about 15 Mb, is covered by multiple YACs. The X-Y homologous region (Sargent *et al.*, 1996) is within the contig, and its proximal and distal ends were marked by YACs containing X-specific and X-Y homologous loci. The YACs 25FE6, 31HF3, and 39IF2 were at the proximal border of the X-Y homologous region, and YACs 304H6 and 871G4 were at the distal border of the region. Part of the region corresponds to the 3-Mb contig constructed around the X-linked cleft palate gene (Forbes *et al.*, 1996).

The most proximal (LB106 and LA1) and most distal (BC) breakpoints associated with POF were about 15 Mb apart in Xq21. The rest of the breakpoints were spread along this very large region, in the X-specific as well as in the X-Y homologous region. Four additional X-autosome balanced translocations were independently localized using molecular markers. Two were in females affected with choroideremia (CHM) and POF. They interrupted the CHM gene (Siu *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1989), which was mapped in our contig to the 949E11 YAC, distal to LA1 and LB106. The remaining two patients have been recently described (Powell *et al.*, 1994; van der Maarel *et al.*, 1995): both map to the proximal border of Xq21, proximal to the ones described in this paper, between the DXS556 and DXS169 loci (Willard *et al.*, 1994). Thus the critical region for X-autosome balanced translocations associated with POF spans the whole of Xq21. Our data confirm the cytological findings, suggesting that a large region between Xq13 and Xq22 was involved with POF (Sarto *et al.*, 1973). As was pointed out by several authors (Sarto *et al.*, 1973; Therman and Susman, 1990; Therman *et al.*, 1990) the critical region apparently consists of two segments, Xq13–q22 and Xq22–q26, separated by a short region in Xq22. Breaks in this segment do not interfere with gonadal development. The map of additional breakpoints in the same and in the more distal region will definitely clarify this point.

Our results make very unlikely the hypothesis of a single gene responsible for POF unless it is gigantic. A position effect of the translocations on the expression of flanking genes has also been proposed, based on the expectation that the region was gene poor. However, our data demonstrate that many breakpoints map between known Xq21 genes as well as disease genes (ZNF6, CHM, cleft palate, mental retardation). The phenotype of the patients is only POF unless the breakpoint interrupts a gene, as is the case of the two breakpoints in the CHM gene, which causes choroideremia as well (Siu *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1989). Recently a breakpoint in a normal female (case 5513, in Philippe *et al.*, 1995) was mapped between the ZNF6 and the CHM gene. This case suggests that not all the breakpoints in the region would produce POF and thus tentatively also excludes the hypothesis that the rearrangements per se are the cause of POF as they may be reducing the number of successful meiotic events during oogenesis (Speed, 1988). Thus the more likely explanation of the POF phenotype is the presence of several genes involved in ovary development and/or oogenesis that are interrupted by the balanced translocations. Based on our data and on the data from the literature, we suggest that several different genes on the X chromosome may be important for ovarian function and that eight of them may be in Xq21: six were identified in this work and two by the four patients from the literature, described above.

Ovarian dysgenesis has been described in the vast majority of XO females and in females presenting large deletions in Xq. POF associated with Xq-autosome translocations has been related to the same phenomenon (Schmidt and Du Sart, 1992). Disruption of the chromosome would lead to functional hemizigosity for a gene(s) that is normally active on both X chromosomes and that is required in a higher dosage. The position of the 11 breakpoints mapped in this paper

FIG. 2. FISH experiments with some of the YACs spanning the breakpoints. (a) Metaphase from patient LB106 hybridized with the YAC 949E11; (b) the same metaphase after DAPI staining. (c) Metaphase from patient LA1 hybridized with the YAC 949E11; (d) the corresponding DAPI staining. (e) Metaphase of the GM5011A cell line hybridized with the YAC 926D12; (f) the corresponding DAPI staining. (g) Metaphase of the GM10386 cell line hybridized with the YAC 12AH2; (h) the corresponding DAPI staining. The thick arrows indicate the normal X, arrowheads indicate the derivative (X), the little thin arrows indicate the derivative autosomes, and the long thin arrows the normal autosome. In e and f, the empty arrows indicate the normal chromosome 2 and the empty arrowheads indicate the derivative chromosome 2 in the GM5011A complex translocation.

and the four mapped by others in respect to molecular loci of the region is, however, completely superimposable with two large deletions (RvD and NP) described as occurring in males affected with contiguous gene syndromes (Merry *et al.,* 1989). The same deletions were found in their mothers, who are described as fertile, as are a number of other females carrying smaller deletions in the same region (Cremers *et al.,* 1990). Their X-inactivation pattern, when described, is apparently random. The overlap and the different phenotypes associated with the two groups of chromosomal rearrangements in Xq21 therefore suggest that X-autosome balanced translocations may not be related to gene dosage, as is the case in XO females. Further molecular and cytogenetic studies are needed to determine the molecular basis of ovarian dysfunction(s) associated with the diverse X chromosome rearrangements.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the cytogeneticists and the clinicians P. Jacobs, L. Borgese, R. Carrozzo, and G. Croci, who gave us the patients, and F. liBergolis for technical assistance. We also thank H. Cooke for help with some of the FISH, C. Sargent for giving us information on the X-Y homology region before publication, and Prof C. Danesino (Telethon project C13) for establishing lymphoblastoid cell lines. This work was funded by EC Grants Gene CT93 0039 and Gene CT93 0088 and by Telethon Italy.

REFERENCES

Affara, N. A. (1987). Mapping the testis determinants by an analysis of Y-specific sequences in males with apparent XX and X0 karyotypes and females with XY karyotypes. *Nucleic Acids Res.* 15: 7325–7342.

Albertsen, H. M., Abderrahim, H., Cann, H. M., Dausset, J., Le Paslier, D., and Cohen, A. (1990). Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4256–4260.

Anand, R., Riley, J. H., Smith, J. C., and Markham, A. F. (1990). A 3.5 Genome equivalent multi access YAC library: Construction, characterization, screening and storage. *Nucleic Acids Res.* 18: 1951–1956.

Barker, D. F., and Fain, P. R. (1993). Definition and mapping of STSs and RFLP loci in Xp11–q22. *Genomics* 18: 712–716.

Browne, D. L., Zonana, M., and Litt, M. (1991). Dinucleotide repeat polymorphism at the DXYSIX locus. *Nucleic Acids Res.* 19: 1721.

Coulam, C. B. (1982). *Fertil. Steril.* 38: 645–655.

Coulam, C. B., Adamson, S. C., and Annegers, J. F. (1986). Incidence of premature ovarian failure. *Obstet. Gynecol.* 67: 604–606.

Cremers, F. P. M., Sankila, E.-M., Brunsmann, F., Jay, M., Jay, B., Wright, A., Pinckers, A. J. L. G., Schwartz, M., van de Pol, D. J. R., Wieringa, B., de la Chapelle, A., Pawlowitzki, I. H., and Ropers, H.-H. (1990). Deletions in patients with classical choroideremia vary in size from 45 to several megabases. *Am. J. Med. Genet.* 47: 622–628.

Farr, C. J., Stevanovic, M., Thomson, E. J., Goodfellow, P. N., and Cooke, H. (1992). Telomere-associated chromosome fragmentation. Application in genome manipulation and analysis. *Nature Genet.* 2: 275–282.

Forbes, S. A., Brennan, L., Richardson, M., Coffey, A., Cole, C. G., Gregory, S. G., Bentley, D. R., Mumm, S., Moore, G. E., and Stanier, P. (1996). Refined mapping and YAC contig construction of the X-linked cleft palate and ankyloglossia locus (CPX) including the proximal X-Y homology breakpoint within Xq21.3. *Genomics* 31: 36–43.

Gyapay, G., Morisette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millaseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., and Weissenbach, J. (1994). The 1993–94 Généthon human genetic linkage map. *Nature Genet.* 7: 242–339.

Kaplan, J., Gilgenkrantz, S., Dufier, J. L., and Frezal, J. (1989). Choroideremia and ovarian dysgenesis associated with an X;7 de novo balanced translocation. *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 1022.

Larin, Z., Monaco, A. P., and Lehrach, H. (1991). Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3233–3237.

Lloyd, S. L., Sargent, C. A., Chalmers, J., Lim, E., Habeebu, S. S. M., and Affara, N. A. (1991). An X-linked zinc finger gene mapping to Xq21.1–q21.3 closely related to ZFX and ZFY: Possible origins from a common ancestral gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 4835–4841.

Merry, D. E., Lesko, J. G., Sosnoski, D. M., Lewis, R. A., Lubinsky, M., Trask, B., van den Engh, G., Collins, F. S., and Nussbaum, R. L. (1989). Choroideremia and deafness with stapes fixation: A contiguous gene deletion syndrome in Xq21. *Am. J. Med. Genet.* 45: 530–540.

Munroe, D. J., Haas, M., Bric, E., Whitton, T., Aburatani, H., Hunter, K., Ward, D., and Housman, D. E. (1994). IRE-bubble PCR: A rapid method for efficient and representative amplification of human genomic DNA sequences from complex sources. *Genomics* 19: 506–514.

Neitzel, H. (1986). A routine method for the establishment of the permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum. Genet.* 73: 320–326.

Nelson, D. L., Ledbetter, S. A., Corbo, L., Victoria, M. F., Ramirez-Solis, R., Webswer, T. D., Ledbetter, D. H., and Caskey, C. T. (1989). Alu polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6686–6690.

Nelson, D. L., Ballabio, A., Victoria, M. A., Pieretti, M., Bies, R. D., Gibbs, R. A., Maley, J. A., Chinault, A. C., Webster, T. D., and Caskey, C. T. (1991). *Alu*-primed polymerase chain reaction for regional assignment of 110 yeast artificial chromosome clones from the human X chromosome: Identification of clones associated with a disease locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6157–6161.

Philippe, C., Arnould, C., Sloan, F., van Bokhoven, H., van der Velde-Visser, S. D., Chery, M., Ropers, H. H., Gilgenkrantz, S., Monaco, A. P., and Cremers, P. M. (1995). A high-resolution interval map of the q21 region of the human X chromosome. *Genomics* 27: 539–543.

Powell, C. M., Taggart, R. T., Druheller, T. C., Wangsa, D., Qian, C., Nelson, L. M., and White, B. J. (1994). Molecular and cytogenetic studies of an X;autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* 52: 19–26.

Rossi, E., Faiella, A., Zeviani, M., Labeit, S., Florida, G., Brunelli, S., Cammarata, M., Boncinelli, E., and Zuffardi, O. (1994). Order of six loci at 2q24–q13 and orientation of the HOXD locus. *Genomics* 24: 34–40.

Sargent, C. A., Briggs, H., Chalmers, I. J., Lambson, B., Walker, E., and Affara, N. A. (1996). The sequence organization of Yp/proximal Xq homologous regions of the human sex chromosomes is highly conserved. *Genomics* 32: 200–209.

Sarto, G. E., Therman, E., and Patau, K. (1973). X inactivation in man: A woman with t(Xq−;12q+). *Am. J. Hum. Genet.* 25: 262–270.

Schmidt, M., and Du Sart, D. (1992). Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactiva-

tion pattern in females with balanced X-autosome translocations. *Am. J. Med. Genet.* 42: 161–169.

Sing, R. P., and Carr, D. H. (1966). *Anat. Rec.* 155: 369–384.

Siu, V. M., Gonder, J. R., Jung, J. H., Sergovich, F. R., and Flintoff, F. W. (1990). Choroideremia associated with an X-autosomal translocation. *Hum. Genet.* 84: 459–464.

Speed, R. M. (1988). The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes. *Hum. Genet.* 78: 260–266.

Stanier, P., Newton, R., Forbes, S. A., Ivens, A., and Moore, G. E. (1991). Polymorphic dinucleotide repeat at the DXS3 locus. *Nucleic Acids Res.* 19: 4793.

Therman, E., and Susman, B. (1990). The similarity of phenotypic effects caused by Xp and Xq deletions in the human female: A hypothesis. *Hum. Genet.* 85: 175–183.

Therman, E., Laxova, R., and Susman, B. (1990). The critical region on the human Xq. *Hum. Genet.* 85: 455–461.

van der Maarel, S. M., Scholten, I. H. J. M., Maat-Kievit, J. A., Huber, I., de Kok, Y. J. M., deWijs, I., van de Pol, T. J. R., van Bokhoven, H., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J. B., Philippe, C., Monaco, A. P., Smeets, H. J. M., Ropers, H.-H., and Cremers, F. P. M. (1995). Yeast Artificial Chromosome cloning of the Xq13.3–q21.31 region and fine mapping of a deletion associated with choroideremia and nonspecific mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* 3: 207–218.

Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L. G., Beer-Romero, P., Bogan, J. S., and Page, D. C. (1992). The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258: 52–59.

Weber, J. L., Kwitek, A. E., May, P. E., Polymeropoulos, M. H., and Ledbetter, S. (1990). Dinucleotide repeat polymorphisms at the DXS453, DXS454 and DXS458 loci. *Nucleic Acids Res.* 18: 4037.

Willard, H. F., Cremers, F. P. M., Mandel, J. L., Monaco, A. P., Nelson, D. L., and Schlessinger, D. (1994). Report of the fifth international workshop on human X chromosome mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 67: 295–358.

SHORT COMMUNICATION

A High-Resolution Interval Map of the q21 Region of the Human X Chromosome

CHRISTOPHE PHILIPPE,*,[1] CÉCILE ARNOULD,† FRÉDÉRIQUE SLOAN,† HANS VAN BOKHOVEN,‡ SASKIA D. VAN DER VELDE-VISSER,‡ MICHÈLE CHERY,† H. HILGER ROPERS,‡ SIMONE GILGENKRANTZ,† ANTHONY P. MONACO,* AND FRANS P. M. CREMERS‡

*ICRF Laboratories, The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Windmill Road, Headington, Oxford OX3 7BN, United Kingdom; †Laboratoire de Génétique Humaine, CRTS, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France; and ‡Department of Human Genetics, University Hospital Nijmegen, P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

Received January 24, 1995; accepted April 7, 1995

In a previous study, we have developed a panel of chromosomal rearrangements for the physical mapping of the q13–q21 region of the human X chromosome (Philippe *et al.*, *Genomics* 17: 147–152, 1993). Here, we report the physical localization of 36 additional polymorphic markers by polymerase chain reaction analysis. The high density of chromosomal breakpoints in Xq21 allows us to map 58 DNA loci in 22 intervals. As a result, this segment of the X chromosome is saturated with approximately three sequence tagged sites per megabase of DNA, which will facilitate the construction of a YAC contig of this region. © 1995 Academic Press, Inc.

The Xq21 band is the most prominent, dark staining Giemsa band of the human X chromosome. This segment seems to be relatively devoid of functionally important genes, as demonstrated by the existence of male-viable deletions spanning almost the entire Xq21 region (3). These deletions very often are associated with contiguous gene syndromes consisting of choroideremia (CHM), X-linked mixed deafness (DFN3), and nonspecific mental retardation (MR). Together with X;autosome translocations (t(X;A)), the deletions were instrumental for positional cloning of the CHM gene (4, 15), and more recently, the DFN3 gene (6). Genetic linkage studies in families with syndromic forms of mental retardation, most notably the Allan–Herndon–Dudley syndrome locus (21), the Juberg–Marsidi syndrome (20), and X-linked α thalassemia/mental retardation (10), suggest a location of these genes in the Xq12–q21 region. Whether any of these syndromes and nonspecific MR are caused by mutations in the same gene remains to be investigated. In addition, the Xq21 region contains a gene underlying X-linked cleft palate and/or ankyloglossia (CPX) (22).

[1] To whom correspondence should be addressed. Telephone: (44) 1865 740 020.

Deletions and translocations have been very useful for the improvement of the physical map of the human genome, especially for the X chromosome. This is particularly true for the Xp22, Xp21, and Xq21 regions. We have previously developed a panel of 24 X-chromosomal rearrangements that, by means of Southern blot analysis, has allowed us to map physically more than 30 DNA markers within 18 intervals of Xq21 (16). Here we report the localization of an additional 26 DNA loci in Xq21 with special emphasis on polymorphic markers. These new markers have been mapped by polymerase chain reaction (PCR) analysis on genomic DNA from either lymphoblastoid cell lines of males with interstitial deletions or somatic cell hybrids derived from females with X;autosome translocations. The PCR data were combined with the hybridization data, which yielded a high-resolution interval map for Xq21.

A reaction volume of 50 μl was used with 200 ng of genomic DNA, 0.25 μg of each primer, 200 μM deoxynucleotide triphosphates, 1× PCR buffer specified by the *Taq* DNA polymerase suppliers, and 1 unit of *Taq* DNA polymerase. In most cases, the PCR conditions were those described in the original descriptions of the different markers. Occasionally, to improve PCR specificity, we modified either the annealing temperature or the $MgCl_2$ concentration. For each DNA marker mapped by PCR analysis, controls were carried out with a normal female cell line, a hamster cell line, and GMO6318B, a hybrid cell line containing the X chromosome as the sole human component (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository). Fifteen microliters of the PCR reaction was analyzed on a 3% agarose gel (1.5% Seakem GTG agarose + 1.5% Nusieve GTG agarose).

A total of 36 sequence tagged sites, STSs, (Table 1) including 20 microsatellite markers from the Généthon second-generation genetic linkage map (9) have been physically mapped to the proximal region of Xq. Most of these markers represent short tandem repeats (STR) with high heterozygosity that are of interest for linkage

GENOMICS 27, 539–543 (1995)
0888-7543/95 $6.00
Copyright © 1995 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

TABLE 1

STR and RFLP Loci Mapped by PCR in This Study

Locus	Name	STR	Heterozygosity	Reference
DXS262	KZ040	—	0.27 (RFLP)	1
DXS345[a]	RX72R1	—	0.38 (RFLP)	This study
DXS346	RX86	$(CA)_{17}$	0.20	1
DXS355	RX167	$(TAAAA)_4$	0.38 (RFLP)	1
DXS364	RX272	$(AC)_{14}$	0.46	1
DXS441/DXS566[b]	1 and 2/HX60	$(AC)_{19}/(AC)_{19}$	0.76/0.68	17, 18
DXS453/DXS983[c]	Mfd66/AFM078za1	$(AC)_{22}/(AC)_n$	0.63/0.64	9, 25
DXS454	Mfd72	$(AC)_{17}G(GA)_8$	0.59	25
DXS456	XG30B	$(AC)_n$	0.77	14
DXS458	Mfd79	$(AC)_{15}A$	0.62	25
DXS571/DXS1105[d]	HX79(B1B2)/AFM263wc1	$(CA)_{16}/(AC)_n$	0.46/0.38	5, 9
DXS738	MIT-E114	$(CA)_{17}$	0.71	12
DXS986	AFM116xg1	$(AC)_n$	0.75	9
DXS988	AFM123xd4	$(AC)_n$	0.60	9
DXS990	AFM136yc7	$(AC)_n$	0.75	9
DXS991	AFM151xf6	$(AC)_n$	0.81	9
DXS995	AFM207zg5	$(AC)_n$	0.60	9
DXS1000	AFM248te9	$(AC)_n$	0.34	9
DXS1002	AFM249vh5	$(AC)_n$	0.70	9
DXS1066	AFM234tf8	$(AC)_n$	0.37	9
DXS1120	L21174	$(AC)_{23}$	0.74	7
DXS1124	L21177	$(TG)_6TT(TG)_{17}$	0.54	7
DXS1167	D3	$(AC)_{5,5,7}(CA)_7$	0.03	1
DXS1168	XKL10	$(CA)_{16}G(CA)_{14}$	0.53	1
DXS1169	A1	$(CA)_{19}$	0.53	1
DXS1170	B8	$(CA)_{24}$	0.67	1
DXS1196	AFM056yb8	$(AC)_n$	0.79	9
DXS1197	AFM072za5	$(AC)_n$	0.64	9
DXS1203	AFM262vg1	$(AC)_n$	0.65	9
DXS1209	AFM273zd5	$(AC)_n$	0.45	9
DXS1217	AFM288ye9	$(AC)_n$	0.62	9
DXS1221	AFM303wd1	$(AC)_n$	0.59	9
DXS1222	AFM308xb5	$(AC)_n$	0.65	9
DXS1225	AFM311vg5	$(AC)_n$	0.74	9
DXS1230	AFM337zb1	$(AC)_n$	0.62	9
DXS1231	AFM340ye1	$(AC)_n$	0.49	9

Note. The characteristics of the DNA loci are those reported in the original description of the PCR markers. While our work was in progress, several dinucleotide repeats with different DXS number were shown to be identical (see footnotes *b–d*).

[a] The novel STS primer pair for probe RX-72R1 (DXS345) has been developed by D. F. Barker, Utah, (pers. comm.) and is as follows (5′ → 3′): RX72R1(a) F, AGCAACAGCTAATTTCTATGG; RX72R1(a) R, ACAAACTTTTACCCCTGCT. The PCR was performed as described in the text with a final $MgCl_2$ concentration of 1.5 m*M*. After a first denaturation step (5 min at 94°C), 40 cycles (94°C for 40 s, 53°C for 40 s) were performed. A final elongation step (5 min at 72°C) ended the process.

[b] Lindsay *et al.* (13) have demonstrated that the microsatellite at DXS566 corresponds to the dinucleotide repeat at DXS441.

[c] Rider and Monaco (19) have proved that the dinucleotide repeat at the locus DXS453 is identical to that designated at locus DXS983.

[d] Gyapay *et al.* (9) noted that microsatellites at DXS571 and DXS1105 are identical.

analysis in families with X-linked diseases located in the proximal region of the long arm of the human X chromosome. Of the 36 new STSs integrated in the physical map, 10 are located either proximal to the C56N breakpoint or distal to the SN breakpoint. Therefore, with the exception of DXS441/566, which is deleted in patient RvD, they are not included in Fig. 1. Loci DXS453/983, DXS988, DXS991, and DXS1000 map proximal to the PMI breakpoint (GDB breakpoint 84 not depicted in Fig. 1). Loci DXS1124 and DXS1221 are located within Xq13 between the PMI and the C56N breakpoints. Among the 36 DNA markers tested, DXS456, DXS571, and DXS1120 are distal to the SN breakpoint (the SN breakpoint is located between DXS87 and DXS571 in Xq22.3).

Our study resolves the Xq21 band of the X chromosome into 22 ordered intervals from the RvD proximal deletion boundary (BXP 93) to the distal deletion breakpoints in patients RvD and MBU (BXP 94 and BXP 110, respectively) (Fig. 1). Interval 23 corresponds to almost the entire Xq22 band, as DXS17 has been mapped to Xq22.3 (26). The gradual integration of 24 STRs and 2 conventional RFLP markers allowed us to create 4 additional intervals since the previously published map (16). According to the most updated consensus map of the X chromosome (26), BXP 93 is located between PGK1 and DXS566 at the boundary between Xq13.3 and Xq21.1, while both BXP 94 and BXP 110 (distal deletion breakpoints in RvD and MBU, respectively) are flanked by DXS118 and DXS454 in the proximal part of Xq22.1.

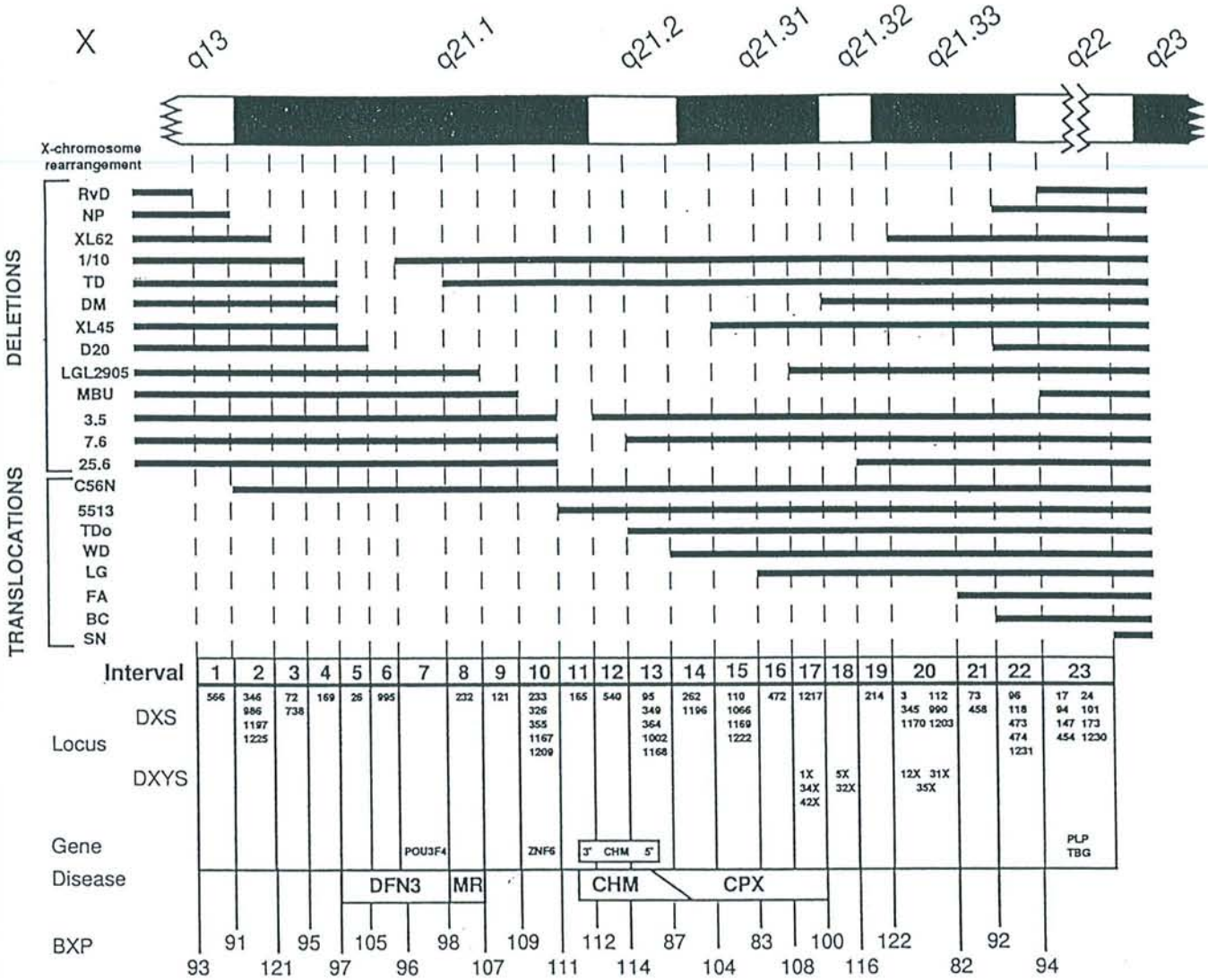


FIG. 1. Detailed physical mapping of marker loci in Xq21. Since the previously published map (16), six X-rearrangements have been removed from this deletion translocation panel: duplications CN and KM, deletions SD and 33.1, and translocations CIII-1 and HR10. We have added one rearrangement, 5513, found in a female carrying a balanced X;autosome translocation, 46,X,t(X;22)(q21.2;p12), which is not associated with any abnormal phenotype. EBV-transformed cells from this female were fused with Wg3h hamster cells by using polyethylene glycol. Hybrid clones containing the der22 as the sole human X component were obtained under HAT (hypoxanthine, aminopterine, thymidine) selection essentially as described by Benham *et al.* (2). At the top an idiogram of the Xq21 region in G-banding is presented. For each X-rearrangement the segment of the X chromosome present is indicated by a bar. Within each interval the probes are arranged arbitrarily in increasing numerical order. The different disease loci in Xq21 as well as the GDB (Genome Data Base) breakpoint numbers (BXP) are depicted at the bottom of the figure. For the BXP numbers, when more than one deletion/translocation breakpoint defines the boundary between two intervals, we have chosen a BXP number corresponding to the first X-rearrangement from the top to the bottom of the figure (for example, BXP 91 corresponds to the proximal breakpoint of the deletion NP).

The human choroideremia gene (CHM) spans at least 150 kb in Xq21.2 between DXS165 and DXS1002 (23, 24). Based on the distal deletion breakpoint (BXP 188) in patient MS (24), DXS1002 is located proximal to DXS95 in interval 13. From fine mapping of Xq21 deletions associated with complex syndromes (11), interval 8 contains a gene involved in MR. The X-linked cleft palate and/or ankyloglossia (CPX) locus has been mapped by linkage analysis between DXS95 and DYXS1X (22). The physical map reported in this study should facilitate the positional cloning of disease genes from the Xq21 region. The positioning of the microsatellite marker AFM207zg5 (DXS995) in interval 6 is a good example, as it has been very useful for cloning and characterization of the critical region for DFN3 (11). Very recently, by combining positional cloning and candidate gene approaches, the POU domain gene BRN4 (8) was shown to be implicated in X-linked mixed deafness (6).

The high density of naturally occurring chromosomal rearrangements in this segment of the X chromosome allowed us to build a high-density map. The physical size of the X-chromosomal segment between DXS566 and DXS118 is estimated to be roughly 15–20 Mb, which brings the average size for each interval to less

than 1 Mb. Moreover, as each interval contains on average 2.6 DNA markers, this Xq21 map should contain 1 marker per every 350 kb.

In establishing this translocation/deletion map, we have assumed that each rearrangement is not more complex than a simple translocation or interstitial deletion. Furthermore, the use of hybrid cell lines for mapping needs vigilance as tiny rearrangements are quite frequent. For every DNA marker localized, our findings are in agreement with all genetic and physical data published so far in the proximal region of Xq, and no single deletion or translocation gave inconsistent results when compared to other X-rearrangements, indicating that these rearrangements are not complex. Some YAC contigs have been built in Xq21, but several gaps remain (26). The detailed physical map presented here will be of great value in generating a complete YAC contig of the Xq21 region and provides a very efficient way to map precisely any new microsatellite or expressed sequence tag positioned in the proximal part of the long arm of the human X chromosome. Any new STS localized in the Xq proximal region can be sent to the authors for refined mapping, or, alternatively, DNA samples from the deletion/translocation panel are available upon request. This work demonstrates the importance of chromosome rearrangements in human gene mapping.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Association Française de Lutte contre les Myopathies, the Imperial Cancer Research Fund, and the European Community Human Genome Programme (EC Contract GENE-CT93-0022). The research of F.P.M.C. has been made possible by a fellowship from the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. The authors are indebted to Dr. J. Weissenbach (Paris, France) for supplying microsatellite primer sequences prior to publication and to Dr. D. F. Barker (Utah, U.S.A.) for providing the novel STS primer pair for probe RX-72R1 (DXS345). We thank Dr. Karen David of the Brooklyn Hospital (New York, U.S.A.) for sending us blood sample from the female carrying the t(X;22) translocation.

REFERENCES

1. Barker, D. F., and Fain, P. M. (1993). Definition and mapping of STSs at STR and RFLP loci in Xp11–Xq22. *Genomics* 18: 712–716.
2. Benham, F., Hart, K., Crolla, J., Bobrow, M., Francavilla, M., and Goodfellow, P. M. (1989). A method for generating hybrids containing nonselected fragments of human chromosomes. *Genomics* 4: 509–517.
3. Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J. R., Diergaarde, P. J., Wieringa, B., Nussbaum, R. L., Schwartz, M., and Ropers, H. H. (1989). Physical fine mapping of the choroideremia locus using Xq21 deletions associated with complex syndromes. *Genomics* 4: 41–46.
4. Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J. R., van Kerkhoff, L. P. M., Wieringa, B., and Ropers, H. H. (1990). Cloning of a gene that is rearranged in patients with choroideremia. *Nature* 347: 674–677.
5. Curtis, A. R. J., Roustan, P., Kamakari, S., Thiselton, D., Lindsay, S., and Bhattacharya, S. S. (1992). Two dinucleotide repeat polymorphisms at the DXS571 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1: 776.
6. de Kok, Y. J. M., van der Maarel, S. M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A. P., Malcolm, S., Pembrey, M. E., Ropers, H. H., and Cremers, F. P. M. (1995). Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene brain 4. *Science* 27: 685–688.
7. Donnelly, A., Kozman, H., Gedeon, A. K., Webb, S., Lynch, M., Sutherland, G. R., Richards, R. I., and Mulley, J. C. (1994). A linkage map of microsatellite markers on the human X chromosome. *Genomics* 20: 363–370.
8. Douville, P. J., Atanasoski, S., Tobler, A., Fontana, A., and Schwab, M. E. (1994). The brain-specific POU-box gene Brn4 is a sex-linked transcription factor located on the human and mouse X chromosomes. *Mamm. Genome* 5: 180–182.
9. Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., and Weissenbach, J. (1994). The 1993–94 Généthon human genetic linkage map. *Nature Genet.* 7: 246–339.
10. Houdayer, C., Toutain, A., Ronce, N., Lefort, G., Sarda, P., Taib, J., Briault, S., Lambert, J. C., and Moraine, C. (1993). X-linked α thalassemia/mental retardation syndrome: Analysis in a new family further supports localization in proximal Xq. *Ann. Génét.* 36: 194–199.
11. Huber, I., Bitner-Glindzicz, M., de Kok, Y. J. M., van de Maarel, S. M., Ishikawa-Brush, Y., Monaco, A. P., Robinson, D., Malcolm, S., Pembrey, E., Brunner, H. G., Cremers, F. P. M., and Ropers, H. H. (1994). X-linked mixed deafness (DFN3): Cloning and characterization of the critical region allows the identification of novel microdeletions. *Hum. Mol. Genet.* 3: 1151–1154.
12. Hudson, T. J., Engelstein, M., Lee, M. K., Ho, E. C., Rubenfield, M. J., Adams, C. P., Housman, D. E., and Dracopoli, N. C. (1992). Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms. *Genomics* 13: 622–629.
13. Lindsay, S., Curtis, A. J. R., Roustan, P., Kamakari, S., Thiselton, D. L., Stephenson, A., and Battacharya, S. S. (1993). Isolation and characterization of three microsatellite markers in the proximal long arm of the human X chromosome. *Genomics* 17: 208–210.
14. Luty, J. A., Guo, Z., Willard, H. F., Ledbetter, D. H., Ledbetter, S., and Litt, M. (1990). Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 776–783.
15. Merry, D. E., Janne, P. A., Landers, J. E., Lewis, R. A., and Nussbaum, R. L. (1992). Isolation of a candidate gene for choroideremia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2135–2139.
16. Philippe, C., Cremers, F. P. M., Chery, M., Bach, I., Abbadi, N., Ropers, H. H., and Gilgenkrantz, S. (1993). Physical mapping of DNA markers in the q13–q22 region of the human X chromosome. *Genomics* 17: 147–152.
17. Porteus, M. E. M., Curtis, A., Lindsay, S., Williams, O., Goudie, D., Kamakari, S., and Bhattacharya, S. S. (1992). The gene for Aarskog syndrome is located between DXS255 and DXS566 (Xp11.2–Xq13). *Genomics* 14: 298–301.
18. Ram, K. T., Barker, D. F., and Puck, J. M. (1992). Dinucleotide repeat polymorphism at the DXS441 locus. *Nucleic Acids Res.* 20: 1428.
19. Rider, S. H., and Monaco, A. P. (1993). Primers for the dinucleotide repeat at the DXS453 locus also recognize the DXS983 locus. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1510.
20. Saugier-Veber, P., Abadie, V., Moncla, A., Mathieu, M., Puissan, C., Turleau, C., Mattei, J. F., Munnich, A., and Lyonnet, S. (1993). The Juberg–Marsidi syndrome maps to the proximal long arm of the X chromosome (Xq12–q21). *Am. J. Hum. Genet.* 52: 1040–1045.
21. Schwartz, C. E., Martin, J., Ouzts, L., Arena, J. F., Lubs, A. H., and Stevenson, R. E. (1994). Allan–Herndon–Dudley syndrome, linkage analysis in a third family and refinement of the localization in Xq21. *Cytogenet. Cell Genet.* 67: 351.
22. Stanier, P., Forbes, S., Richardson, M., Brennan, L., Cole,

MATERIELS ET METHODES

I CULTURES CELLULAIRES

1. Entretien des lignées lymphoblastoïdes continues

Les cellules sont conservées dans un milieu de congélation dans l'azote liquide à -196°C.

Composition du milieu de congélation :

- Milieu de culture I
- DMSO (diméthyl-sulfoxyde) 12%
- Plasmagel glucosé désodé 30%

Les lignées lymphoblastoïdes sont entretenues en suspension, le mileiu est renouvellé deux fois par semaine.

Composition du milieu de culture I :

- RPMI 1640
- SVF (serum de veau foetal) 15%
- Kanamycine 50 µg/ml

2. Entretien d'hybrides somatiques interspécifiques

Les cellules d'hybrides somatiques interspécifiques sont cultivées dans le milieu de sélection HAT (ce milieu réalise une pression de sélection pour conserver le chromosome X (qui porte le gène HGPRT en Xq26.3)

composition du milieu HAT :

- RPMI 1640
- SVF 20%
- Kanamycine 50 µg/ml
- Hypoxanthine 10^{-4} M
- Aminoptérine 4 10^{-7} M
- Thymidine 1,6 10^{-5} M
- Ouabaïne 10^{-6} M
- Glycine 3 10^{-6} M

Les cellules d'hybrides, ainsi que les cellules de rongeurs, sont des cellules adhérentes qui peuvent être décollées du support par l'action de la trypsine. Quelques gouttes de trypsine (1/200ème) sont déposées sur le tapis de cellules adhérentes. Après quelques minutes, les cellules se décrochent. Elles sont récoltées par aspiration puis lavées à l'aide de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline : NaCl 10 mM, KCl 20 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,4). Le culot cellulaire est récupéré par centrifugation pendant 5 min à 1200 t/min.

3. Culture de levure et de YAC

Les cellules de levures, transformées par des YAC, sont cultivées en vue d'une extraction d'ADN total.

3.1 Stockage des levures dans le glycérol et congélation

A partir d'une culture de 12 à 16 heures à 30°C, 700 µl de culture sont mélangés à 300 µl de glycérol puis congelés à -80°C.

3.2 Milieu d'expansion des levures

- glucose 100 mM
- 8 g de base nitrogene
- L-tyrosine 0,3 mM
- hémisulfate - adénine 0,3 mM
- casaminoacides 3%

La solution est stérilisée par autoclavage pendant 15 min à 120°C à 2 bars.

3.3 Préparation des boîtes de Pétri

Le milieu d'expansion est gélifié par l'addition de 1,6% d'agar, autoclavé pendant 15 min à 120°C, 2 bars, puis refroidi jusqu'à 55°C. La boîte est coulée à cette température, puis refroidie et conservée à 4°C. La mise en culture des cellules s'effectue en grattant les colonies en surface avec une pointe stérile, en les étalant sur une boîte mise à incuber pendant 48 heures à 30°C.

3.4 Repiquage des colonies

Chaque colonie prélevée à l'aide d'une pipette stérile est remise en culture dans 15 ml du milieu de propagation de levure et subit une pré-culture pendant 24 heures sous agitation à 200 t/min. 2 à 3 ml de cette culture sont remis dans 40 ml de milieu dans un tube falcon, et incubés une nuit à 30°C sous agitation forte.

4. Culture de bactéries transformées par les cosmides

4.1. conservation des colonies dans du glycérol et congélation

A partir d'une culture de 12 à 16 heures à 30°C, 700 µl de culture sont mélangés à 300 µl de glycérol puis congelés à -80°C.

4.2. Milieu d'expansion des bactéries

1 litre de milieu LB (Luria-Bertrani Medium) est préparé et autoclavé pendant 15 min à 120 bar :

- 10 g de bacto-tryptone
- 5 g d'extrait de levure
- NaCl 150 mM

Le pH est ajusté à 7 par de la soude 5N.

4.3. Repiquage des colonies

Les bactéries sont remises en culture à partir de la culture congelée, sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélifié par de l'agarose 1,6 % en présence de 50 µg/ml d'ampicilline. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C. Les bactéries sont ensuite cultivées en milieu LB liquide, une colonie est remise en culture dans 15 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline, et incubé 12 heures à 37°C sous agitation 200 t/min.

II- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Extraction d'ADN génomique total (Jeanpierre 1987)

La technique est réalisée à partir de prélèvements de sang, de lignées lymphoblastoïdes, ou d'hybrides somatiques interspécifiques .

• Le sang périphérique du patient est prélevé sur EDTA, les lymphocytes sont séparés des globules rouges à température ambiante grâce à l'action d'une solution de lyse SLR (Tris 10 mM, MgCl2 5 mM, NaCl 9 mM) après centrifugation 10 min à 2500 t/min le culot cellulaire est lavé trois fois avec la solution SLR.

• Des cultures sub-confluentes d'hybrides somatiques interspécifiques, ou de lignées lymphoblastoïdes sont utilisées directement pour l'extraction d'ADN.

Les cellules (lymphocytes, lymphoblastes, cellules hybrides ou cellules de rongeurs), après trypsination éventuelle, sont récoltées par centrifugation 5 min à 1200 t/min. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 7 ml de guanidine 6 M + 0,5 ml d'acétate d'ammonium 7,5 M puis agité pendant 1 heure à température ambiante. Puis, sont ajoutés la protéinase K à 100 µg/ml et 1 ml de sarcosyl 10% (m/v), le tout est placé 1 heure à 60°C sous agitation douce. Après refroidissement, 2,5 volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. L'ADN précipité est alors récupéré, et lavé deux fois dans de l'éthanol 70%. Le culot d'ADN est suspendu dans un volume adéquat de tampon TE 10 : 1 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). La concentration en ADN est estimée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm. Pour détecter une éventuelle contamination protéique, on effectue une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN de bonne qualité doit avoir un rapport DO260/DO280 compris entre 1,7 et 2.

2. Extraction d'ADN de levure tranformées par les YAC

2.1. Solutions

• **milieu lyticase** : sorbitol 1M, EDTA 60 mM, citrate de sodium 100 mM pH 7, β- mercapto-éthanol 100 mM.

• **solution de lyse des levures :** Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 25 mM, NaCl 500 mM, β- mercapto-éthanol 3 mM, Nonidet- P40 0,1 % .

• **tampon de la lyticase :** glycérol 50 %, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1mM, KCl 50 mM, sérum albumine bovine (BSA) 100 µg/ml, lyticase 600 U/ml et conservation à - 20°C.

2.2. Protocole

3 ml de culture de levure sont centrifugés 5 min à 3 500 t/min à température ambiante. Le culot de cellules est remis en suspension dans 0,7 ml d'eau distillée, et centrifugé 10 min à 3 500 t/min. Le culot est alors repris dans 0,7 ml de milieu lyticase, dans lequel est ajouté la lyticase (10 unités), et incubé pendant 2 heures à 37°C. Le tube est centrifugé à 4°C, pendant 5 min à 10 000 t/min. Puis, le culot est remis en suspension dans 0,7 ml de

solution de lyse des levures, à laquelle sont ajoutés 60 µl de SDS 10% et l'ensemble est incubé 15 min à 68°C.
Chaque tube est traité avec 30 µl de solution de protéinase K (10 mg/ml) toute la nuit à 37°C. L'ADN est extrait par un traitement phénol/chloroforme réalisé de la façon suivante : un volume de phénol (700 µl) est ajouté, l'ensemble est agité durant 15 min, centrifugé pendant 10 min à 10 000 t/min, puis la phase aqueuse est récupérée. Une seconde extraction est réalisée avec un volume de phénol pour un volume de chloroforme, suivi d'une centrifugation de 5 min, puis la dernière extraction est réalisée avec un volume de chloroforme. L'ADN est précipitée avec 0,8 volume d'isopropanol, le tube est centrifugé 5 min à 10 000 t/min à 4°C. Le culot ADN/ARN est dissout dans 200 µl de TE/RNase (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, RNase 0,1 mg/ml) à 65°C, et incubé 15 min à 37°C. La précipitation est réalisée par 2,5 volumes d'éthanol absolu (500 µl) et 1/10 ème de volume d'acétate de sodium, le tube est centrifugé 5 min à 10 000 t/min, lavé une fois avec un volume d'éthanol à 70 %, puis centrifugé 5 min à 10 000 t/min à 4°C. Le culot est dissout dans 50 µl d'eau ultra pure.

2.3. Estimation de la qualité de l'ADN de levures extrait et mesure de la concentration

Ce contrôle est réalisée sur un gel d'agarose 0,8 %/TBE 1X (TBE 10X : Tris base 0,9 M, Acide Borique 0,9M et EDTA 0,01 M; pH 8,2) La concentration en ADN de levure est déterminée par spectrofluorimètrie.

3. Minipréparation d'ADN de cosmide

3.1 Protocole d'extraction d'ADN de cosmide

Le lendemain de la culture de bactéries, 2 ml de culture sont centrifugés à 13 000 t/min pendant 1 min. Le surnageant est éliminé, le culot est remis en suspension dans 200 µl de milieu GTE (Glucose 50mM, TrisHCl 25mM, EDTA 10mM) auxquel sont ajoutés 400 µl de solution NaOH 2 mM, SDS 0.2%, préparée extemporanément et placé sur la glace pendant 5 min. Puis 300 µl d'acétate de potassium 5M pH 4,8 sont ajoutés, l'ensemble est immédiatement mélangé par inversion du tube et placé à 0°C, pendant 5 min. Le tube est centrifugé à 13 000 t/min pendant 8 min. Le surnageant est transféré dans un tube eppendorf de 2 ml, auquel 0,7 volume d'isopropanol

est ajouté pour précipiter l'ADN; la solution est conservée 10 min à température ambiante puis centrifugée 10 min à 13 000 t/min. Le culot est lavé à l'éthanol 70% puis remis en suspension dans 40 µl de TE.

3.2 Evaluation de la qualité de l'ADN de cosmide et mesure de la concentration

Avant la migration sur gel d'électrophorèse, l'ADN est linéarisé par 10 unités de l'enzyme de restriction XbaI. L'ADN linéarisé migre plus facilement dans un gel d'agarose 0,8 %. Il est possible de comparer la taille du fragment obtenu avec un marqueur de taille. La concentration en ADN est mesurée par un spectrofluorimètre.

4. Amplification in vitro de séquences d'ADN par PCR

4. 1 Protocole d'amplification

L'amplification par PCR d'une séquence encadrée par deux amorces spécifiques est réalisée comme suit :
La composition standard de 50 µl de mélange réactionnel est la suivante :

- Taq Polymérase : 0,5 unité,
- dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates : dATP, dTTP, dGTP et dCTP) : 100 µM.
- Amorces : 0,25 µg de chacune des deux amorces
- ADN : 125 ng
- DMSO : 5%

Le tampon utilisé est vendu avec l'enzyme (Perkin Elmer ou Eurobio). Le MgCl2, ajouté au mélange, a un effet sur la spécificité et le rendement de la réaction d'amplification. La concentration optimale utilisée est de l'ordre de 0,8 mM.

Les conditions d'amplification sont les suivantes : après une dénaturation initiale de 5 min à 94°C : 30 cycles d'amplification sont réalisés.

- dénaturation 1 min à 94°C
- hybridation 1 min à une température variable, calculée en fonction de la séquence des amorces $t° = 2(A+T) + 4(G+C) - 5$
- extension 2 min à 72°C

Les trente cycles sont suivis d'une élongation terminale de 7 min à 72°C. Afin d'augmenter la spécificité de l'amplification certaine température

d'hybridation des amorces ont été augmentées (entre 2 et 5°C selon la spécificité de l'amplification). Après PCR, les produits d'amplification sont contrôlés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1 à 3% (en fonction de la taille de l'amplimère à séparer).

4. 2 Marqueurs de type STS étudiés par PCR

Locus	sonde	localisation
DXS146	pTAK8	Xp11.23
DXS1008E	553/554	Xp11.23
DXS1272E	Hup1/Hup2	Xp11.22
DXS1000	AFM248te9	Xp11.22
DXS988	AFM123xd4	Xp11.22
DXS1204	AFM106xa3	Xp11.22
DXS1013E	885/886	Xp11.22
DXS6851		Xp11.22
DXS1199	AFM248wf9	Xp11.22
DXS991	AFM151xf6	Xp11.21

4.3 Marqueurs de type EST étudiés par PCR

nom	n° d'accès GDB	localisation
Bdy 70C 01	Z24913	Xp11.22-q11.1
Bdy 96e 03	F01051	Xp11.22-q11.1
Cdy1ad 09	Z43374	Xp11.22-q11.1
Cda Oaa 10	Z38402	Xp21.2-p11.23
Cda 02g 11	F01412	Xp21.2-p11.23

5. Sous-clonage des YAC ICRFcO191, UPyWXD2269 ICRFf501et ICRFcO874 dans le vecteur cosmidique sCOGh2.

5.1 Préparation de l'ADN génomique

L'ADN est extrait selon le méthode décrite précédemment (paragraphe II- 1)

5.1.1. Digestion partielle par SauIIIA de l'ADN contenu dans les levures

10 µg d'ADN sont partiellement digérés dans un volume de 400 µl final, le milieu réactionnel est préchauffé à 37°C puis 0,1 unité d'enzyme SauIIIA est ajouté. L'incubation est réalisée à 37°C. Des aliquots de 50 µl sont prélevés aux temps 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 4 - 5 min. Chaque réaction est stoppée par l'ajout de 15 µl d' EDTA 0,5 M (pH8).

Afin de contrôler la taille des fragments obtenus, 10 µl de chaque aliquots sont déposés sur un gel d'agarose 0,3%/TBE 1X et séparés par électrophorèse pendant 24 heures à 40 volts en présence du marqueur de taille ADN de phage L non digéré.

La taille requise des fragments pour le clonage dans ce type de vecteur est de l'ordre de 30-40 kb. Les fractions dont la taille correspond à celle souhaitée sont rassemblées, puis une extraction phénol-chloroforme est réalisée comme précédemment. La phase aqueuse est précipitée comme décrit précédemment. L'ADN est resuspendu dans 10 µl de TE.

5.1.2. Déphosphorylation de l'ADN partiellement digéré

La déphosphorylation, indispensable pour éviter la réassociation des fragments entre eux, est réalisée dans un volume final de 100 µl en présence de 25 unités de phosphatase alcaline de crevette. L'ensemble est incubé pendant 1 heure à 37°C. L'enzyme est inactivée à 65°C pendant 15 min. Les tubes sont placés à température ambiante et l'ADN est extrait par la méthode phénol/chloroforme. La phase aqueuse est précipitée comme précédemment. Le culot est remis en suspension dans 10 µl de TE.

5.2. Préparation du vecteur de clonage sCOGH2

Le vecteur de clonage nous a été fourni par l'équipe du Dr J.T. den Dunnen de l'université de Leiden, Hollande. Ce vecteur est maintenu dans des souches bactériennes de type E. Coli HB10B conservées à -80°C.

5.2.1. Linéarisation du vecteur sCOGH2 par XbaI

10 µg d'ADN sont digérés en présence de 9 U/mg de l'enzyme XbaI pendant 2 heures à 37°C. La digestion est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8%/TBE 1X, un fragment à 11,2 kb est visible.

L'ADN est extrait par la méthode phénol/ chloroforme. L'ADN est précipité comme décrit précédemment. L'ADN est suspendu dans du TE 1X à une concentration de 1 µg/µl.

5.2.2. Déphosphorylation du vecteur linéarisé par XbaI

La déphosphorylation, afin d'éviter la réassociation du vecteur sur lui même, de 10 µg d'ADN de vecteur est réalisée en présence de 15 unités de phosphatase alcaline de crevette. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 1 heure. L'enzyme est inactivée à 65°C pendant 15 min.
L'extraction et la précipitation sont réalisés comme décrit précédemment. Le culot est remis en suspension dans du TE 1X à une concentration de 1µg/µl.
Afin de valider l'étape de déphosphorylation du vecteur, nous réalisons un test qui consiste à utiliser deux enzymes afin de tester l'absence de phosphate aux extrémités du vecteur. 300 ng de vecteur sont préparés dans un volume réactionnel final de 30 µl en présence de 2 µl de rATP 10 mM.
Trois volumes de 10 µl chacun sont aliquotés :

- Le premier tube sert de contrôle,
- Le deuxième tube est incubé en présence de 4 unités de T4 DNA ligase,
- Le troisième tube est incubé en présence de 4 unités de T4 DNA ligase, et de 10 unités d'une T7 polynucléotide kinase.

Les trois tubes sont incubés à 37°C pendant 2 heures. Les produits sont contrôlés sur un gel d'électrophorèse à 0,8% : si la déphosphorylation à été correctement réalisée, on s'attend à voir une bande de 11,2 kb correspondant au vecteur linéarisé dans les tubes 1 et 2. En effet la ligase ne peut agir si les extrémités du vecteur sont phosphorylées. Dans le troisième tube, la présence de kinase permet de phosphoryler les extrémités du vecteur et l'on observe alors la formation de concatémères de vecteur, il apparaît sur le gel des fragments de taille croissante (11,2; 22,4; 33,6..).

5.2.3 Digestion du vecteur linéarisé déphosphorylé par BamHI

Le vecteur linéarisé et déphosphorylé est coupé au niveau de son site de clonage BamHI par 5 U/µg d'enzyme de restriction BamHI pendant deux heures à 37°C. La digestion est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8%. Deux bandes sont observées : à 7,7 et à 3,5 kb. L'ADN est extrait par la méthode phénol/chloroforme. L'ADN en phase aqueuse est précipité comme

précédemment. L'ADN est resuspendu dans de l'eau distillée à une concentration de 1 µg/µl. L'échantillon est conservé à -20°C.

5.3 Etape de ligation de l'ADN

La concentration finale d'ADN de levure et YAC préparé comme précédemment dans la réaction de ligation doit être de 225 ng/µl et celle du vecteur sCOGH2 préparé doit être en excès 10 fois. Dans la réaction de ligation sont ajoutés 2 µl de rATP 10 mM. Le volume final est ajusté à 20 µl. Un contrôle négatif sans ADN génomique est réalisé par 1 µg d'ADN de vecteur sCOGH2 en présence de 2 µl de rATP 10 mM le volume final étant de 20 µl. Un contrôle négatif sans ligase est réalisé. Dans chacun des échantillons 4 unités d'enzyme T4 DNA ligase sont ajoutés. La réaction de ligation dure 24 heures à 16°C.

Après incubation, 1 µl de chaque aliquot est contrôlé par électrophorèse. L'ADN génomique ligaturé dans le vecteur se traduit par la disparition des deux bras libres du vecteur. Les aliquots peuvent être conservés à -20°C.

5.4. Empaquetage des vecteurs recombinants dans des têtes de phages LcI857

Cette étape a été réalisée à l'aide du kit Gigapack III gold selon les instructions du fournisseur Stratagène. Les produits de ligation sont ainsi emballés dans des têtes de phage LcI857 Sam7. Les phages sont conservés dans du tampon SM jusqu'à la transfection.

composition du tampon SM (par litre) :

- NaCl 40 mM
- MgSO4 15 mM
- Tris-HCl 50 mM (pH7,5)
- gélatine 0,01%

Le milieu est autoclavé pendant 15 min à 120°C, sous une pression de 2 bars.

5.5. Transfection de la bactérie XL1-Blue MR par les phages LcI857

5.5.1. Préparation de la bactérie hôte

La bactérie XL1-Blue MR se développe en une boîte de Pétri sur milieu de culture gélifié par 1,6% d'agar.
Une colonie est repiquée en milieu liquide dans 50 ml de milieu LB supplémenté par du maltose 0,2% et du $MgSO_4$ 10 mM. La culture est réalisée à 37°C sous agitation à 200 t/min pendant 5 heures, afin d'obtenir une densité optique à 600 nm voisine de 1. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 2 000 t/min.

Le culot de cellules est ensuite remis en suspension avec précaution dans du $MgSO_4$ 10 mM. Les cellules sont utilisées le jour même pour la transfection .

5.5.2 Titration de la banque de cosmides non amplifiée

La banque non amplifiée est titrée en réalisant deux dilutions (1 : 10 et 1 : 50).
25 µl de chaque dilution à titrer et de cellules hôtes XL1 Blue MR (DO_{600}=1) sont mélangés dans un tube de type eppendorf, les préparations sont incubés pendant 30 min à température ambiante.
Pour permettre aux cellules transfectées d'exprimer la résistance à l'antibiotique (la sélection utilisé implique le gène de résistance à l'ampicilline) les bactéries sont incubées dans 200 µl de milieu LB à 37°C; les tubes sont agités par renversement toutes les 15 min; pour chaque dilution le volume total est ensuite déposé et étalé sur une boîte Pétri de milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline. Les boîtes sont incubées pendant 16 heures à 37°C.

Les bactéries transfectées sélectionnées par la présence d'antibiotique sont dénombrées le lendemain, afin de déterminer le titre en phage.

5.6. Réalisation des membranes répliques des boîtes de culture

Les boîtes de culture 22x22 cm colonisées sont refroidies à 4°C, pendant deux heures afin de durcir les colonies, puis des membranes répliques sont réalisées à température ambiante.

La membrane à répliquer est placée pendant 1 min sur la boite de culture en notant soigneusement le sens de la boîte, sous hotte stérile. La membrane est ensuite traitée par une succession de 3 bains :

- dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N) pendant 7 min "colonies dessus".
- Puis, dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M, TrisHCl 0,5 M pH7,2, EDTA 1mM) pendant 3 min, la membrane est ensuite lavée dans une solution SSC2X SDS 0,1%, puis est séchée à température ambiante.
- La fixation de l'ADN est réalisée sous UV pendant une heure et rincée dans une solution SSC5X pendant 1 min sous agitation douce.

5.7. Criblage de la banque avec une sonde ADN humain total

5.7.1. Etape de préhybridation de la membrane

Composition du milieu de pré-hybridation et d'hybridation : SSC 6X, SDS 0,5% et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué.

Dans un tube à hybridation, les drains et les membranes sont disposés en alternance puis l'ensemble est roulé et inséré dans un tube d'hybridation, 10 ml de solution de pré-hybridation sont ajoutés. Les membranes sont pré-hybridées pendant 2 heures sous rotation dans un four à hybridation à 65°C.

5.7.2. Marquage de la sonde

La sonde (50 ng) est marquée en présence de 40 µcurie de α^{32}P dCTP après dénaturation pendant 10 min à ébullition, par la technique de de multi-amorçage au hasard, selon les instructions du fournisseur Boehringer Mannheim. Le produit de marquage est incubé pendant 45 min à 37°C. Une colonne Sephadex G50 est utilisée pour séparer la sonde marquée des nucléotides non incorporés.

5.7.3. Lavage des membranes

Le premier lavage est réalisé dans le tube pendant 10 min à 65°C dans le four à hybridation avec une solution SSC 2X, SDS0,1%. Les membranes sont mises dans un bac et lavées pendant 15 min à 65°C au bain marie, sous agitation dans du SSC 2X, SDS0,1%. Cette opération est répétée deux fois.

Les membranes sont déposées sur du papier whatman afin qu'elles sèchent, puis emballées dans du film plastique et mises en contact avec un film Kodak XOMAT. L'exposition a lieu pendant 24 heures à -80°C dans une cassette hermétique. Le film orienté après développement, est reporté sur la boîte de culture.

5.7.4. Localisation des clones positifs et repiquage

Les clones positifs sont récupérés et mis en culture sur une plaque de type Elisa chacun des puits contenant 100 µl de milieu LB en présence d'ampicilline 50 µg/ml. Une plaque réplique analogue est congelée après ajout de 70 µl de glycérol.

III TECHNIQUES CYTOGENETIQUES

1. Préparation de chromosomes métaphasiques

Ces préparations sont réalisées par une technique cytogénétique classique : les cellules sont bloquées en métaphase par action de la colchicine (1 ng/ml) pendant 1 heure. Les chromosomes sont dispersés par un choc hypotonique (KCl 0,075 M pendant 15 min à 37°C), la suspension cellulaire est traitée par du fixateur (3 volumes d'éthanol/1 volume d'acide acétique) pendant 10 min (l'opération est réalisée 3 fois). Les mitoses sont étalées sur lames dégraissées.

Les caryotypes partiels des chromosomes en métaphase des patients sont présentés en bandes GTG (bandes G, Trypsine, Giemsa) (Seabright,1971).

2. Préparation de chromosomes en prométaphase à partir des lignées

Les chromosomes prométaphasiques sont obtenus par une technique de synchronisation (Yunis et al, 1976) : la culture est stimulée par renouvellement du milieu le matin. Puis, les cellules sont synchronisées (blocage en phase S du cycle cellulaire) par un apport de methotrexate 10^{-7} M (50 ng/ml) pendant 17 heures. Deux lavages sont effectués avec du milieu de culture, et le BrdU 10^{-5}M (5-bromodéoxyuridine) est ajouté dans le milieu de culture.

La technique cytogénétique classique est débutée 5 heures 30 après l'ajout de BrdU. Les chromosomes en bandes RBG (bandes R, BrdU,

Giemsa) sont colorés par la technique FPG (Fluorescence Plus Giemsa) (Perry et al., 1974). L'incorporation de BrdU s'effectue au niveau des bandes G à réplication tardive, ces régions sous l'action du Hoechst apparaîtront pâles, les bandes R seront donc foncées après une coloration au Giemsa. A l'inverse, l'X inactif à réplication tardive apparaîtra despiralisé et pâle du fait de l'incorporation de BrdU.

Les techniques de bandes chromosomiques sont réalisées selon les protocoles décrits par Dutrillaux et Couturier (1981).

IV CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

1. hybridation *in situ* en fluorescence

1.1. Préparation des lames

Les lames utilisées pour la FISH sont des préparations chromosomiques métaphasiques ou prométaphasiques obtenues par les techniques cytogénétiques classiques (III).

1.1.1 Pré-traitement des lames

Les préparations sont étalées puis traitées pendant une nuit dans l'éthanol 70% à 4°C. Au matin, les lames sont sorties de l'éthanol et séchées à l'air libre. Elles sont ensuite traitées par l'acide acétique 70% pendant 1 min sous agitation (afin d'enlever le cytoplasme résiduel),et rincées dans le tampon PBS, trois fois 5 min environ sous agitation à température ambiante. Elles sont alors déshydratées pendant 1 min à température ambiante sous agitation dans des bains d'éthanol successifs 70%, 85%, et 100%. Les lames sont traitées par une solution de ribonucléase pancréatique SSC2X, RNase 200 ng/ml. Elles sont alors recouvertes par une lamelle et incubées pendant 1 heure à 37°C dans une boite en atmosphère humide SSC2X. Ce traitement est suivi de trois lavages de 5 min dans SSC2X pH7 sous agitation à température ambiante et d'une déshydratation à température ambiante dans des bains d'éthanol successifs 70 %, 85 %, 100 % chacun 1 min.

1.1.2. Dénaturation des lames

Les lames sont dénaturées pendant 2 min dans une solution de formamide 70%/SSC 2X pH7 sous agitation à 70°C. La dénaturation est suivie de trois lavages de deux minutes dans du SSC2X, puis d'une déshydratation à température ambiante sous agitation dans des bains d'éthanol successifs 70%, 85%, 100% chaque bain 1 min .

1.2. Préparation de la sonde

1.2.1. Marquage de la sonde

1 µg de sonde est marqué par nick-translation en incorporant un nucléotide modifié par une molécule de biotine : 16-biotine dUTP. L'incubation est de 60 min à 16°C. La sonde est coprécipitée avec 100 µg d'ADN de sperme de saumon par 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M (pH5,5) et 2,5 volumes d'éthanol absolu. La précipitation est réalisée à -80°C pendant 30 min. La sonde est centrifugée pendant 15 min à 13 000 t/min. Puis le surnageant est éliminé et le culot est lavé par 500 µl d'alcool 70% et centrifugé pendant 5 min à 13 000 t/min. Après avoir ôté le surnageant, le culot d'ADN est séchée dans l'étuve à 37°C. l'ADN est, alors, dissout dans 100 µl de TE. L'ADN compétiteur, (ADN Cot 1), est ajouté en quantité 50 fois supérieure à la quantité de sonde. La totalité de cet ADN est précipité comme décrit précédemment. Le culot est remis en suspension dans le tampon d'hybridation agité, et centrifugé. La quantité de sonde à déposer est mise en suspension dans 6 µl de tampon d'hybridation. Le **tampon d'hybridation** est préparé comme suit : dextran sulfate 10% formamide déionisée 50%, SSC2X, tween 20 1%, pH7. L'ensemble est dissous à 80°C. et conservé à -20°C.

1.2.2. Dénaturation de la sonde

La sonde est dénaturée pendant 10 min à 80°C, puis, préhybridée avec l'ADN compétiteur pendant 30 min à 37°C. Elle est ensuite conservée sur la glace jusqu'à utilisation.

1.3. Hybridation

Les quantités de sonde déposées sur la lame varient en fonction de la taille de la sonde utilisée,

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

- Pour les sondes de type YAC : 250 ng de sonde
- Pour les sondes de type cosmide : 80 ng de sonde.

Le dépôt est recouvert d'une lamelle en verre de dimension 18 mm x 18 mm et l'hybridation est réalisée dans une boîte en atmosphère humide (formamide 50%/SSC 2X) dans une étuve à 37°C, deux jours pour les sondes de type YAC ou une nuit pour les cosmides, les sondes centromériques, les sondes ADN totales ou spécifiques d'un locus.

1.4. Lavages de post-hybridation

- Pour les YAC et les cosmides l'ensemble des lavages sont réalisés dans un bain-marie à 42°C sous agitation :

trois lavages de 5 min dans une solution de formamide 50%/SSC 2X, pH7, puis trois autres bains de 5 min dans du SSC 2X pH7.

- Pour les sondes totales, les lavages sont réalisés sous agitation :

15 min dans la formamide 50%/SSC 2X pH7 à 43°C suivi de 5 min dans du SSC 2X à 43°C suivi de 15 min dans du SSC 0,1X, pH 7,0 à 60°C.

Dans l'ensemble des cas, les lames sont transférées dans du tampon BN à température ambiante (sodium bicarbonate 0,1mM, Nonidet P-40 0,05%, pH 8) puis sont ensuite stockées à 4°C dans une solution de tampon BN en attendant la détection. **Au-delà de cette étape les lames ne devront jamais sécher.**

1.5. Détection immunologique

Les lames sont retirées du tampon BN puis incubées afin de saturer les sites non spécifiques à température ambiante par 100 µl de tampon BN contenant 5% de réactif de blocage pendant 10 min, elles sont recouvertes d'une lamelle. Les lamelles sont ensuite retirées, l'excès de liquide est drainé, et 100 µl d'une solution d'avidine fluorescéinée sont déposés sur la lame (3 µg/ml en tampon BN avec 5% de réactif de blocage) , qui est ensuite recouverte d'une lamelle. Le montage est incubé 30 min à 37°C. Afin d'éliminer l'avidine fluorescente non fixée, cette étape est suivie de trois lavages de 5 min, chacun dans du tampon BN à 37°C sous agitation.

L'intensité du signal fluorescent peut-être amplifié par ajout d'un anticorps anti-avidine biotinylé (5 µg/ml en tampon BN avec 5% de réactif de blocage), puis d'une avidine fluorescente (3 µg/ml en tampon BN avec 5% de réactif de blocage) sur chaque lame comme précédemment et les

lavages sont effectues de la même façon. Après avoir drainé l'excès de liquide sur la lame, une solution qui limite l'extinction de la fluorescence et colore les chromosomes en bleu (360 nm) par le DAPI est déposée (DAPI antifade, Oncor).

SCD-UHP - NANCY
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

1.6 Microscopie

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence. La sonde apparaît en jaune (la fluorescéine émet autour de 520 nm) ou en rouge (la rhodamine émet autour de 450 nm) visualisée par un filtre sélectif. Les captures successives de chacune des fluorescences par des filtres spécifiques permettent d'obtenir une image globale numérisée sur laquelle on peut réaliser un traitement d'image par l'analyseur d'images (PSI Power Gene FISH system).

2. Sondes utilisées en FISH

Les sondes utilisées au cours de ce travail ont été obtenus à partir de la banque mégaYAC du CEPH (Chumakov et al., 1995), de la banque de YAC de l'ICRF (Larin et al., 1991), de la banque de YAC de ICI (Anand et al.,1990) de la banque de l'Université de Pennsylvanie (UP), et de l'Université de Washington (WU).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Abeliovich D, Dagan J, Kimchi-Sarfaty C et al. **(1995)** Paracentric inversion X(q21.2q24) associated with mental retardation in males and normal ovarian function in female. American journal of Medical Genetics 55: 359-362.

Aittomaki K, Lucena J, Pakarinen P et al. **(1995)** Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. Cell 82: 959-968.

Anand R, Riley J, Butler R et al. **(1990)** A 3,5 genome equivalent multi access YAC library: construction, characterization, screnning and storage. Nucleic Acid Research 18: 1951-1956.

Archidiacono N, Lerone M, Rocchi M et al. (**1991**) Rett Syndrome: exclusion mapping following the hypothesis of germinal mosaicism for new X-linked mutations. Human Genetics 86 (6): 604-606.

Banfi S, Guffanti A, Borsani G **(1998)** How to get the best of dbEST. Trends in Genetics 14: (2) 80-81.

Barr M, Bertram E (**1949**) A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature 163 676.

Bensimon A , Simon A, Chiffaudel A et al. (**1994**) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. Science 265: 2096-2098.

Bentley-Lawrence J , Carter K and Gerdes M (**1992**) Extending the capacities of interphase chromatin mapping. Nature Genetics 2 (3): 171-172.

Berry R , Stevens T, Walter N et al.(**1995**) gene-based sequence-tagged-site (STSs) as the basis for a human gene map. Nature Genetics 10: 415-423.

Billuart P (**1998**) Oligophrenin I. Communication personnelle

Bione S, Sala C, Mansini C et al. (**1998**) A human homologue of the D. Melanogaster diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. American Journal of Human Genetics (in press).

Boguski M, Schuler G (**1995**) ESTablishing a human transcript map. Nature Genetics 10: 369-371.

Bonifas J, Morley B, Oakey R et al. (**1987**) Cloning of a cDNA for steroid sulfatase: frequent occurence of gene deletions in patients with recessive X chromosome-linked ichthyosis. Proceedings National of the Academy of Science. USA 84: 9248-9251.

Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler M et al. (**1991**) Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. Nature 351: 325-329.

Brown C, Lafreniere R, Powers V et al. (**1991**) Localization of the X inactivation center on the human X chromosome in Xq13. Nature 349: 82-84.

Brown C, Ballabio A, Rupert J et al. (**1991**) A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature 349: 38-44.

Brown C, Willard H (**1994**) The human X-inactivation center is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. Nature 368: 154-156.

Brown C , Baldry S (**1996**) Evidence that heteronuclear proteins interact with *XIST* RNA in vitro. Somatic Cell Molecular Genetics 22: 403-417.

Brown C, Carrel L, Willard H (**1997**) Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. American Journal of Human Genetics 60: 1333-1343.

Burke D, Carle GF, Olson MV (**1987**) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vector. Science 236: 806-812.

Camus P, Abbadi N, Perrier M et al (**1996**) X chromosome inactivation in 30 girls with Rett syndrome : analysis using the probe M27β. Human Genetics 97: 247-250.

Carle G, Franck M, Olson M (**1986**) Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science 232: 65-68.

Carpenter N **(1983)** Balanced X;Autosome translocations and gonadal dysfunction in females and males. Cytogenetics of the Mammalian X chromosome, Part B: Cytogenetic of the mammalian X chromosome, Progress and topics in cytogenetics 3B: 211-224.

Cavenee W, Dryja T, Phillips R et al. **(1983)** Expression of recessive alleles by chromosomal mecanism in retinoblastoma. Nature 305: 779-784.

Chand A, Clark J, Cooper C et al. **(1995)** Long-range organization of reiterated sequences, including the SSX1 cDNA at the OATL1 cluster in Xp11.23. Genomics 30: 545-552.

Chumakov I, Rigault P, leGall I et al. (**1995**) A YAC contig map of the human genome. Nature 377: 175-225.

Claes S, Vogels A, Holvoet M et al. (**1997**) Regional localization of two genes for nonspecific X-linked mental retardation to Xp22.3-p22.2 (MRX49) and Xp11.3-p11.21 (MRX50). American Journal of Medical Genetics 73: 474-479.

Clemson C , McNeil J, Willard H et al. (**1996**) *XIST* RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. Journal of Cellular Biology 132: 259-275.

Cohen D, Chumakov I, Weissenbach J (**1993**) A first-generation physical map of the human genome. Nature 366: 698-701.

Collins F (**1992**) Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. Nature Genetics 1: 3-6.

Collins F (**1995**) Positional cloning moves from perditional to traditional. Nature Genetics 9: 347-350.

Cooke H, Brown W, Rappold G (**1985**) Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. Nature 317: 687-692.

Courtier B, Heard E, Avner P (**1995**) Xce haplotypes show modified methylation in a region of the active X chromosome lying 3' to Xist. Proceeding National Academy of Sciences. USA 92: 3531-3535.

Cox D (**1992**) Radiation Hybrid Mapping. Cytogenetics and Cell Genetics 59 (2-3): 80-81.

Curtis A, headland S, Lindsay S (**1993**) X chromosome linkage studies in familial Rett syndrome. Human Genetics 90: 551-555.

Davies K (**1991**) The essence of inactivity. Nature 349: 15-16.

Davies A, Stephens R, Olavesen M et al. (**1995**) Evidence of a locus for orofacial clefting on human chromosome 6p24 and STS content map of the region. Human Molecular Genetics 4 (1): 121-128.

Dietz H, Cutting G, Pyeritz R et al. (**1991**) Marfan Syndrome Caused by a Recurrent de novo Missense Mutation in the Fibrillin Gene. Nature 352 (6333): 337-339.

Disteche C (**1995**) Escape from X inactivation in human and mouse. Trends in Genetics 11 (1): 17-22.

Dutrillaux B, Couturier J (**1981**) La pratique de l'analyse chromosomique (Technique de laboratoire). Masson editeur Paris 12 86.

Ellison K, Fill C, Terwilliger J (**1992**) Examination of X chromosome markers in Rett syndrome: exclusion mapping with a novel variation on multilocus linkage analysis. American Journal of Human Genetics 50: 278-287.

Esposito T, Gianfrancesco F, Ciccodicola A et al. (**1997**) Escape from X inactivation of two new genes associated with DXS6974E and DXS7020E. Genomics 43: 183-190.

Fergusson-Smith M (**1965**) Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. Journal of Medical Genetics 2: 142.

Forbes S, Richardson M, Brennan L et al. (**1995**) Refinement of the X-linked cleft palate and ankyloglossia (CPX) localization by genetic mapping in an Icelandic kindred. Human Genetics 95: 342-346.

Freije de D , Helms C, Watson M et al. (**1992**) Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. Science 258: 1784-1787.

Frezal J **(1996)** Les maladies liées à l'X, dix ans après. 12ème séminaire de Génétique Clinique. Hôpital Necker- Paris.

Gabriel-Robez O, Rumpler Y, Ratomponirina C et al. (**1990**) deletion of the pseudoautosomal region and lack of sex-chromosome pairing at pachytene in two infertile men carrying an X;Y translocation. Cytogenetic and Cell Genetics 54: 38-42.

Gall J, Pardue M (**1969**) Proceedings National Academy of Sciences. USA 63: 378.

Gecz J , Gedeon A, Sutherland G et al. (**1996**) Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. Nature Genetics 13: 105-108.

Gedeon A (**1994**) How many X-linked genes for non-specific mental retardation (MRX) are there? American Journal of Medical Genetics 64: 158-162.

Gedeon A, Kerr B, Mulley J **(1996)** Pericentromeric genes for non-specific X-linked mental retardation (MRX). American Journal of Medical Genetics 51: 553-564.

Geraghty M, Brody L, Martin L **(1993)** The isolation of cDNAs from OATL1 at Xp11.2 using a 480 kb YAC. Genomics 16: 440-446.

Goodfellow P, Darling SM, Thomas N et al. (**1986**) A pseudo-autosomal gene in man. Science 143: 740-743.

Gorski S, Adams K, Birch P et al. (**1992**) The gene responsable for X-linked cleft palate (CPX) in a British Columbia native kindred is localized between PGK1 et DXYS1. American Journal of Human Genetics 50: 1129-1136.

Grouchy de J **(1992)** Où cours-tu primate, l'homme est-il le cancer de la création. Expansion Scientifique Française.

Groupe des cytogénéticiens Français (**1986**) Pericentric inversions in man. A French collaborative study. Annales de Génétique 29: 129-168.

Haaf T, Ward D (**1994**) High resolution ordering of YAC contigs using extende chromatin and chromosomes. Human Molecular Genetics 3 (4): 629-633.

Hagberg B, Aicardi J, Dias K et al. (**1983**) A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome. Report of 35 cases. Annals of Neurology 14: 471-479.

Hagberg B, Goutières F, Hanefeld F, et al. **(1985)** Rett's syndrome: criteria for inclusion and exclusion. Brain Development 7: 372-373.

Hagberg B, Rasmussen P (**1986**) "Forme fruste" of Rett syndrome: A case report. American Journal of Medical Genetics Supplement 1: 175-191.

Heiskanen M, Peltonen L, Palotie A (**1996**) Visual mapping by high resolution FISH. Trends in Genetics 12 (10): 379-382.

Hendrich B, Plenge R, Willard H (**1997**) Identification and characterization of the human *Xist* promoter: implications for models of X chromosome inactivation. Nucleic Acid Research 25: 2661-2671.

Heng H , Squire J, Tsui L (**1992**) High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. Proceedings National of Academy of Sciences. USA 89: 9509-9513.

Houlgatte R , Mariage-Samson R, Duprat S et al. (**1995**) The genexpress index: a resource for gene discovery ant the genic map of the human genome. Genome Research 5: 272-304.

SCD - UHP - NANC
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECIN

Hu X , Burghes A, Ray P **(1988)** Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophy . Journal of Medical Genetics. 25: 369-376.

Ioannou P, Amemiya C, Garnes J et al. **(1994)** A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. Nature Genetics 6 : 84-89.

Ivens A, Moore G, Chambers J et al. **(1988)** X-linked cleft palate: the gene is localized between polymorphic DNA markers DXYS12 and DXS17. Human Genetics 78: 356-358.

Jalal S , Dahl R, Erickson L et al. **(1996)** Cytogenetic and clinical characteristics of a case involving complete duplication of Xpter->Xq13. Journal of Medical Genetics 33: 237-239.

Jeanpierre M (1987) A rapid method for the purification of DNA from blood. Nucleic Acid Research 15: 22.

Journel H, Melki J, Turleau C et al. **(1990)** Rett phenotype with X/autosome translocation: possible mapping to the short arm of chromosome X. American Journal of Medical Genetics 35: 142-147.

Just W, Geerkens C, Held K et al. **(1992)** Expression of RPS4X in fibroblasts from patients with structural aberrations of the X chromosome. Human Genetics 89: 240-242.

Kay G, Penny G, Patel D et al. **(1993)** Expression of *Xist* during mouse developpment suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. Cell 72: 171-182.

Kunkel L **(1986)** Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature 322: 73-77.

Larin Z, Monaco A, Lehrach H **(1991)** Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. Proceedings National Academy of Sciences. USA 88: 4123-4127.

Lee B, Godfrey M, Vitale E et al. (**1991**) Linkage of Marfan Syndrome and a Phenotypically Related Disorder to 2 Different Fibrillin Genes. Nature 352: (6333): 330-334.

Lengauer C, Speicher M, Popp S et al. (**1993**) Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. Human Molecular Genetics 2 (5): 505-512.

Li L, Hamer D (**1995**) Recombinaison and allelic association in the Xq/Yq homology region. Human Molecular Genetics 4 (11): 2013-2016.

Lichter P, Cremer T, Tang C et al. (**1988**) Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. Proceedings National Academy of Sciences. USA 85: 9664-9668.

Lichter P, Cremer T, Borden J et al. (**1988**) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Human Genetics 80: 224-234.

Lubs H, Chiurazzi P, Arena F et al. (**1996**) XLMR Genes: Update 1996. American Journal of Medical Genetics 64: 147-157.

Lyon M (**1961**) Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature 190: 372-373.

Madan K **(1983)** Balanced structural changes involving the human X: Effect on sexual phenotype. Human Genetics 63: 216-221.

Mandel J-L,Willard H, Nussbaum R **(1989)** Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. Cytogenetics and Cell Genetics 51: 384-437

Mannens M, Hoovers J, Bleeker-Wagemakers E et al. (**1991**) The distal region of 11p13 and associated genetic diseases. Genomics 11: 284-293.

Marra M, Hillier L, Waterston R (**1998**) Expressed sequence tags-ESTablishing bridges between genomes. Trends in genetics 14 (1): 4-7.

Mattei MG, Mattei JF, Ayme S et al. (**1982**) X-Autosome translocations: Cytogenetic characteristics and their consequences. Human Genetics 61: 295-309.

Mattei MG , Philip N, Passage E et al. (**1985**) DNA probe localisation at 18p11.3 band by in situ hybridization and identification of a small supernumerary chromosome. Human Genetics 69: 268-271.

Meroni G , Franco B, Archidiacono N et al. (**1996**) Characteriation of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggests gene duplications in an ancestral pseudoautosomal region. Human Molecular Genetics 5 (4): 423-431.

Migeon B, Shapiro L, Norum R et al. (**1982**) Differential expression of steroid sulfatase locus on active and inactive human X chromosome. Nature 299: 838-840.

Migeon B, Dunn MA, Thomas G et al. (**1995**) Studies of X inactivation and isodisomy in twins provide further evidence that X chromosome is not involved in Rett syndrome. American Journal of Human Genetics 56: 647-653.

Miller A , Gustashaw K, Wolff D et al. (**1995**) Three genes that escape X chromosome inactivation are clustered within a 6 Mb YAC contig and STS map in Xp11.21-p11.22. Human Molecular Genetics 4 (4): 731-739.

Mohandas T, Shapiro LJ (**1983**) Factors involved in X-chromosome inactivation. Cytogenetics of the Mammalian X chromosome, Part A Basic mechanism of the X chromosome behavior, Progress and topics in cytogenetics 3A: 271-297.

Murray J, Nishimura D, Buetow K et al. (**1990**) Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome 1q. American Journal of Human Genetics 46: 486-491.

Narahara K, Kikkawa S, Kimira S et al. (**1984**) Regional mapping of catalase and Wilms tumor-aniridia, genitourinary abnormalities, and mental

retardation triad loci to the chromosome segment 11p1305->p1306. Human Genetics 66: 181-185.

Ohno S (**1969**) Evolution of sex chromosome in mammals. Revue Annuelle de Génétique 3: 495-497.

Olinski S , Loop B, Dekosky A et al. (**1996**) Chromosomal mapping of the human M6 genes. Genomics 33: 532-536.

Ozçelik T , Lafreniere R, Archer B et al. (**1990**) Synaptophysin: structure of the human gene and assignment to the X chromosome in man and mouse. American Journal of Human Genetics 47: 551-561.

Panasiuk B, Midro A, Zadrozna-Tolwinska B (**1997**) Earlier finishing of Xp21.2 subband replication of the inactive X chromosome in Rett syndrome girl but not in her 47,XXX mother. Clinical Genetics 52: 120-125.

Parra I, Windle B (**1993**) High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. Nature Genetics 5: 17-21.

Partington M (**1988**) Rett syndrome in monozygotic twins. American Journal of Medical Genetics 29: 633-637.

Passos-Buenos M , Byth B, Rosenberg S et al. (**1993**) Severe nonspecific X-linked mental retardation caused by a proximally Xp located gene: intragenic heterogeneity or a new form of X-linked mental retardation? American Journal of Medical Genetics 46: 172-175.

Penny G, Kay G, Sheardown S et al. (**1996**) Requirement for *Xist* in X chromosome inactivation. Nature 379: 131-137.

Perry P, Wolff S (**1974**) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251: 156-158.

Philippe C, Cremers F, Chery M et al. (**1993**) Physical mapping of DNA markers in the q13-q22 region of the human X chromosome. Genomics 17: 147-152.

Philippe C. Cartographie physique du chromosome X humain. 174 pages Thèse Génie Biologique et Médical, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy 1993.

Philippe C, Arnould C, Sloan F et al. (**1995**) A high resolution interval Map of the q21 region of the human X chromosome. Genomics 27: 539-543.

Pinkel D, Staume T, Gray J (**1986**) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensivity, fluorescence hybridization. Proceedings National Academy of Sciences. USA 83: 2934-2938.

Pinkel D, Landegent J, Collins C et al. (**1988**) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. Proceedings of National Academy of Sciences. USA 85: 9138-9142.

Plenge R, Hendrich B, Schwartz C et al. (**1997**) A promotor mutation in the *XIST* gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. Nature Genetics 17: 353-356.

des Portes V, Pinard J, Billuart P et al. (**1998**) Identification of a novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. Cell 92: 51-61.

Ramesh V, Eddy R, Bruns G **(1987)** Localization of the Ornithine aminotransferase gene and related sequences on two human chromosomes. Human Genetics 76: 121-126.

Rappold G (**1993**) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. Human Genetics 92: 315-324.

Rett A (**1966**) Ueber ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. Wienrisch Medizinal Wochenschrift 116: 724-738.

Robledo R, Melis P, Laficara F et al. (**1996**) Further linkage evidence for localization of mutational sites for nonsyndromic type of X-linked mental retardation at the pericentromeric region. American Journal of Medical Genetics 64: 107-112.

Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B et al. (**1989**) *I*dentification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. Science 245: 1059-1080.

Roseri M, Goguel A, Martin A et al. (**1994**) A 1,7-Mb YAC contig around the human BDNF gene (11p13): integration of the physical, genetic, and cytogenetic maps in relation to WAGR syndrome. Genomics 24: 69-77.

Royer-Pokora B, Kunkel L, Monaco A et al. (**1986**) Cloning the gene for an inherited human disorder- chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal localisation. Nature 322: 32-38.

Ryan S, Chance P, Zou C et al. (**1997**) Epilepsy and mental retardation limites to females: an X-linked dominant disorder with male sparing. Nature Genetics 17: 92-95.

Saiki R, Scharf S, Falcona F et al. (**1985**) Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Sala C, Arrigo G, Torri G et al. (**1997**) Eleven X chromosome breakpoints associated with Premature Ovarian Failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. Genomics 40: 123-131.

Samanns C, Albrecht R, Neugebauer M et al. (**1991**) Gene for non-specific X-linked mental retardation maps in the pericentromeric region. American Journal of Medical Genetics 38: 224-227.

Sarto G, Therman E, Patau K (**1973**) X inactivation in man: a woman with t(Xq-;12q+). American Journal of Human Genetics 25: 262-270.

Scherer G , Schempp W, Baccichetti C et al. (**1989**) Duplication of an Xp segment that includes the ZFX locus causes sex inversion in man. Human Genetics 91: 291-294.

Schmidt M , Dusart D (**1992**) Functional disomies of the X-chromosome influence the cell selection and hence the X-inactivation pattern in females with balanced X-Autosome translocations - A review of 122 cases. American Journal of Medical Genetics 42 (2): 161-169.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, et al. (**1996**) Multicolor spectral Karyotyping of human chromosomes. Science 273: 494-497.

Schuler G, Boguski M, Stewart A et al. (**1996**) A gene map of the Human Genome. Science 274: 540-546.

Seabright M (**1971**) A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet ii 971-972.

Shanen N, Roth-Dahle J, Capozzoli F et al. (**1997**) A new Rett syndrome family consistent with X-linkes inheritance expands the X chromosome exclusion map. American Journal of Human Genetics 61: 634-641.

Shanen N, Hofferbert S, Heidary G et al. (**1997**) Molecular genetics of Rett syndrome. European Child and Adolescent Psychiatry 6 (1): 94.

Sheardon S, Duthie S, Johnston C et al. (**1997**) Stabilization of Xist RNA mediates initation of X chromosome inactivation. Cell 91: 99-107.

Shizuya H, Birren B, Kim U et al. **(1992)** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor based vector. Proceedings National Academy of Sciences USA 89 : 8794-8797.

Slim R, Levilliers J, Ludecke H et al. (**1993**) A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escape X-inactivation. Genomics 16: 26-33.

Slim R, Machavoine C, Bernheim A (**1995**) Assignments of 37 YAC clones to R-banded chromosomes by fluorescent in situ hybridization. Cytogenetics and Cell Genetics 65: 104-107.

Sloan-Béna F, Philippe C, LeHeup B et al. (**1998**) Characterization of an inverted X-chromosome (p11.2q21.3) associated with mental retardation using FISH. Journal of Medical Genetics 35: 146-150.

Southern E (**1975**) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 88: 503-517.

Speicher M, Ballard SG, Ward DC (**1996**) Karyotyping human chromosomes by combinatorial muti-fluor FISH. Nature Genetics 12: 368-375.

Stanier P, Forbes A, Arnason A et al. (**1993**) The localization of a gene causing X-linked cleft palate and ankyloglossia (CPX) in an Iceland kindred is between DXS326-DXYS1X. Genomics 17: 549-555.

Tariverdian G, Kantner G, Vogel F (**1987**) A monozygotic twin pair with Rett syndrome. Human Genetics 75: 88-90.

Temple K, Calvert M, Plint D et al. (**1989**) Dominantly inherited cleft lip and palate in two families. Journal of Medical Genetics 26: 386-389.

Therman E, Laxova R, Susman B (1990) The critical region on the human Xq. Human Genetics 85: 455-461.

Thomas N, Davies K, Webb T et al. (**1997**) Molecular genetic studies in familial Rett syndrome. European Child and Adolescent Psychiatry 6 (1): 95.

Verkerk A, Pieretti M, Sutcliffe J et al. (**1991**) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell 65: 905-914.

Warburton D (**1991**) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. American Journal of Human Genetics 49: 995-1013.

Wiegant J , Ried T, Nederlof P et al. (**1991**) In situ hybridization with fluoresceinated DNA. Nucleic Acid Research 19 (12): 3237-3241.

Wiegant J, Kalle W, Mullenders L et al. (**1992**) High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. Human Molecular Genetics 1 (8): 587-591.

Wiegant J, Wiesmeijer C, Hoovers J, et al. (**1993**) Multiple and sensitive Fluorescence in situ hybridization with rhodamine- fluorescein- and coumarin-labeled DNAs. Cytogenetics and Cell Genetics 63: 73-76.

SCD-UHP - NANCY
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

Willard H (**1996**) X chromosome inactivation and X-linked mental retardation. American Journal of Medical Genetics 64: 21-26.

Wilson J, Ferguson M, Jenkins N et al. (**1992**) Transgenic mouse model of X-linked cleft palate. Cell growth and differenciation 4: 67-76.

Wolff D , Gustashaw K, Zurcher V et al. (**1997**) Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in females depending upon the X inactivation pattern. Human Genetics 100: 256-261.

Wu B, Milunski A, Wyandt H, et al. (**1993**) In situ hybridization applied to Waardenburg syndrome. Cytogenetics and Cell Genetics 63: 29-32.

Yunis J (**1976**) High resolution of human chromosomes. Science 191: 1268-1270.

Zhang Z, Xiang F, Anvret M (**1997**) Gene mapping of the Rett syndrome. European Child and Adolescent Psychiatry 6 (1): 95.

Zinn A, Ouyang B, Ross J et al. **(1997)** Del(X)(p21.2) in a mother and two daughters with variable ovarian function. Clinical Genetics 52 : 235-239.

Zoghbi H, Ledbetter D, Schultz R et al. (**1990**) A de novo X;3 translocation in Rett syndrome. American Journal Medical Genetics 35: 148-151.

7th X chromosome Workshop, Cambridge (**1996**).

Nombre de références bibliographiques : 155.

université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE
DE NANCY
13. MAI 1998
COURRIER ARRIVEE
N° 6198

Nom : **SLOAN épouse BENA**

Prénom : **Frédérique**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE ET SANTÉ**

Spécialité : **GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 12 05 1998 n°23

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 LE PRESIDENT

J.P. FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex - Tél. 03 83 85 48 00 - Fax 03 83 85 48 48
Adresse électronique : _____ @uhp.u-nancy.fr

SCD-UHP - NANCY
BIBLIOTHEQUE
MÉDECINE

RESUME EN ANGLAIS

PHYSICAL MAPPING OF X-CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN PATIENTS WITH ASSOCIATED PHENOTYPES USING *In situ* HYBRIDIZATION

Chromosomal rearrangements, such as translocation and inversion, have greatly facilitated the identification of disease-associated genes. In this study, (as the prerequisite for the cloning of gene) we mapped using FISH and a contig of YAC probes, several X chromosomal breakpoints on patients with associated phenotypes. YAC and cosmid spanning breakpoints were isolated as the prerequite for the cloning of candidate gene. In the first part of this study, we report on a patient with a pericentromeric inversion of X chromosome, inv(X)(p11.2q21.3), associated with mild mental retardation, short stature, prepubescent macroorchidism and submucous cleft palate. In the second part, we report a familial translocation t(X;22) associated with Rett syndrome, in the two daughters, and the last part is about Xq21 breakpoints located inside the so-called critical region, which has to be intact for proper ovarian development and function. The molecular level elucidation of these rearrangements will so indicate if the pathologics phenotypes are related to the breakpoints.

KEY WORDS: chromosomal rearrangement; physical mapping; in situ hybridization; X chromosome

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

CARTOGRAPHIE PHYSIQUE PAR HYBRIDATION *in situ* EN FLUORESCENCE : APPLICATION A L'ETUDE DE REMANIEMENTS DU CHROMOSOME X ASSOCIES A DES PATHOLOGIES

RESUME en français:

Nous avons cartographié, grâce à la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), sept points de cassure intervenant au sein de remaniements associés à des phénotypes pathologiques. Nous nous sommes intéressés à deux régions du chromosome X: p11.2 et q21.3. Dans une première partie, nous présentons le cas d'une inversion inv(X)(p11.2q21.3) associée à une fente palatine sous muqueuse, un macroorchidisme prépubertaire et un retard mental léger. Dans une deuxième partie, nous avons cartographié le point de cassure au sein d'une translocation familiale t(X;22)(p11;p11) associée chez deux soeurs à un syndrome de Rett. Dans une troisième partie, nous avons contribué à la localisation de points de cassure dans la région critique Xq21, chez des patientes porteuses de t(X;A) associées à un dysfonctionnement ovarien. La technique FISH nous a permis de positionner les remaniements par rapport à un ensemble de sondes ordonné du chromosome X et d'isoler un ou plusieurs YAC qui chevauchent la zone du remaniement. Le sous clonage de certains d'entre eux, dans une banque de cosmides a restreint la zone du remaniement à une vingtaine de kb. Cette cartographie de point de cassure est une étape du clonage positionnel, prélude à l'isolement de gènes candidats.

DISCIPLINE : BIOLOGIE ET SANTE

MOTS-CLES :
cartographie physique; remaniement chromosomique; chromosome X; Hybridation in *situ* en fluorescence; Xq21.3; Xp11.2

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :
Laboratoire de Génétique- CHU BRABOIS
2 allée du Morvan
54511 VANDOEUVRE-LES-NANCY