



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 HENRI POINCARÉ

UFR de médecine

Ecole doctorale Biologie Santé Environnement (BioSE)

T H E S E

présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Mention : Génomique

par Mylène BERI-DEXHEIMER

Recherche de gènes candidats responsables d'anomalies du développement grâce à la caractérisation moléculaire de microremaniements chromosomiques

le 10 novembre 2009

Membres du jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Pr. Jean-Luc BRESSON	Biologie du développement et de la reproduction, UFC, Besançon
	Pr. Michel GOOSSENS	Génétique, Créteil Paris 12
<i>Examineurs :</i>	Pr. Martine DOCO-FENZY	Génétique, Université de Reims
	Pr. Bruno LEHEUP	Génétique, U.H.P. Nancy I
	Pr. Bertrand RIHN	Biochimie et biologie cellulaire, U.H.P. Nancy I
	Pr. Philippe JONVEAUX	Génétique U.H.P. Nancy I (Directeur de thèse)

Remerciements

Je tiens à remercier ici :

Monsieur le Professeur Philippe Jonveaux, mon directeur de thèse : merci de m'avoir accordé votre confiance, de m'avoir soutenue et de m'avoir permis de mener à terme ce projet.

Monsieur le Professeur Michel Goossens pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'évaluer ce travail,

Monsieur le Professeur Jean-Luc Bresson qui a accepté de faire partie de ce jury et d'être rapporteur de ce travail de thèse,

Monsieur le Professeur Bruno Leheup qui me fait le privilège de juger ce travail,

Monsieur le Professeur Bertrand Rihn : toute ma gratitude pour votre participation à mon jury de thèse,

Madame le professeur Martine Doco-Fenzy pour avoir accepté si rapidement de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail,

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de génétique : à toutes celles et ceux qui m'ont accompagné dans ce travail, m'ont encouragé et ont mis toutes leurs compétences et leur savoir à profit pour faire avancer ce travail . Merci pour leur disponibilité de tous les instants.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : adénosine diphosphate
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
array-CGH : array comparative genomic hybridization
ATP : adénosine triphosphate
BAC : Bacterial Artificial Chromosome
BSA : bovine serum albumine
CBF : core binding factor
CNV : copy number variation
Ct : Cycle threshold
cy : cyanine
 δ -SPD : δ -storage pool disease
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole
dCTP : deoxy cytosine triphosphate
DECIPHER : Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans
Using Ensembl Resources
der : chromosome dérivé
DGV : Database of genomic Variants
DMSO : diméthylsulfoxyde
dNTP : déoxynucléotide triphosphate
DS : déviation standard
ENCODE : Encyclopedia of DNA Elements
ESE : exonic splicing enhancers
FISH : Fluorescent *in situ* hybridization
FoSTeS : fork stalling and template switching
Ig : immunoglobuline
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISE : intronic splicing enhancers
LAM : leucémie aiguë myéloïde
LCR : Low Copy Repeat

MIM : Mendelian Inheritance in Man

NAHR : non allelic homologous recombination

NHEJ : non homologous end joining

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

PAC : P1-derived Artificial Chromosome

PBS : phosphate buffer saline

PC : périmètre crânien

PCR : polymerase chain reaction

QI : quotient intellectuel

RT-QPCR : reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction

SDS : sodium dodécyl sulfate

SNP : single nucleotide polymorphism

SSC : saline sodium citrate

srGAP : Slit-Robo Rho GTPase activating protein

TRAP : thrombin receptor agonist peptide

UCSC : University of California at Santa Cruz

UTR : untranslated region

YAC : Yeast Artificial Chromosome

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Objectifs de cette étude	3
1.2	La cartographie du génome	4
1.2.1	La cartographie génétique	4
1.2.2	La cartographie physique	5
1.3	Les chromosomes et les anomalies chromosomiques	5
1.3.1	Remaniements déséquilibrés	6
1.3.2	Remaniements équilibrés	6
1.3.3	Apport des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire dans la détection des remaniements génomiques et la cartographie physique du génome	8
1.3.4	Modes de formation des anomalies chromosomiques	12
1.3.5	Impact des réarrangements chromosomiques sur le phénotype	17
2	Délétion subtélomérique 20q13.33	29
2.1	Le retard mental	29
2.1.1	Définition et fréquence	29
2.1.2	Etiologies	30
2.2	Patiente 1	30
2.2.1	Clinique	30
2.2.2	Examens complémentaires cytogénétiques	31
2.3	Patiente 2	31
2.3.1	Clinique	31
2.3.2	Examens complémentaires cytogénétiques	32
2.4	Cartographie de la délétion chez les deux patientes	33
2.4.1	Patiente 1	33
2.4.2	Patiente 2	33
2.5	Discussion	33
2.5.1	Délétions terminales 20q décrites dans la littérature	33
2.5.2	Corrélations génotype-phénotype	36
3	Remaniements en 21q22	41
3.1	Anomalie plaquettaire familiale associée à une prédisposition aux leucémies aiguës myéloïdes (FPD/LAM)	41
3.2	Patient 1	42
3.2.1	Clinique	42
3.2.2	Examens complémentaires	42
3.3	Patiente 2	43
3.3.1	Clinique	43
3.3.2	Examens complémentaires	44

3.4	Gènes altérés et implication dans le phénotype observé	46
3.4.1	<i>RUNX1</i> et hémopathies	46
3.4.2	Gènes candidats au retard mental	49
3.5	Discussion	49
3.5.1	<i>RUNX1</i> et hémopathies	49
3.5.2	Délétion 21q22 et retard de développement : gènes candidats	51
3.5.3	Association thrombopénie/retard mental	54
4	Translocation t(3;18)(p12.3;q23)dn et dystonie syndromique	59
4.1	La dystonie	60
4.1.1	Définition	60
4.1.2	Prévalence	60
4.1.3	Classification	60
4.1.4	Physiopathologie	61
4.1.5	Bases génétiques	62
4.1.6	Traitements	66
4.2	Description du cas clinique étudié	66
4.2.1	Clinique de la patiente	66
4.2.2	Examens complémentaires	67
4.2.3	Cartographie des points de cassure	69
4.3	Détermination de l'origine parentale du chromosome 3 transloqué . .	77
4.4	Etude de la région encadrant le point de cassure sur le chromosome 3	78
4.4.1	Cartographie de la région 3p12	78
4.4.2	ROBO1 : roundabout, homologue 1 (<i>Drosophila</i>)	81
4.4.3	Etude de ROBO1	87
4.5	Etude de la région du point de cassure sur le chromosome 18	98
4.5.1	Etude d'un gène hypothétique au point de cassure	98
4.5.2	Recherche d'un effet de position	100
4.6	Discussion	103
4.6.1	Translocations équilibrées et pathologies	103
4.6.2	Conséquences de l'interruption de <i>ROBO1</i>	104
4.6.3	Impact phénotypique de l'interruption de séquence sur le chromosome 18 ?	114
5	Discussion générale	117
5.1	Importance de la caractérisation moléculaire des remaniements chromosomiques et apport des techniques de cytogénétique moléculaire .	117
5.1.1	Cartographie précise et recherche de gènes candidats	117
5.1.2	Compréhension du mécanisme moléculaire du réarrangement	118
5.2	Conséquences phénotypiques des remaniements : difficultés d'interprétation	119
5.2.1	Variations de nombre de copies et polymorphismes	119
5.2.2	Expressivité variable/pénétrance incomplète	121
5.2.3	Translocations équilibrées	122

5.3	Perspectives	123
6	Matériels et méthodes	125
6.1	Matériel biologique	125
6.2	Culture cellulaire	125
6.3	Extraction des acides nucléiques	126
6.3.1	ADN génomique	126
6.3.2	ARN totaux	126
6.3.3	Contrôle de la quantité et qualité des acides nucléiques	126
6.4	Cytogénétique et cytogénétique moléculaire	127
6.4.1	Préparation des chromosomes métaphasiques	127
6.4.2	Caryotype en bandes GTG (bandes G, Trypsine, Giemsa) . .	127
6.4.3	FISH	127
6.4.4	Array-CGH	128
6.5	Techniques de biologie moléculaire	129
6.5.1	Polymerase Chain Reaction (PCR)	129
6.5.2	PCR longs fragments	130
6.5.3	Séquençage	131
6.5.4	Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel (RT- QPCR)	132
6.5.5	Southern blot	133
6.5.6	Northern blotting	134
6.5.7	Western blotting	135
6.6	Chimiotactisme des polynucléaires	135
	Bibliographie	139

Table des figures

1.1	Aberrations chromosomiques de structure	7
1.2	Recombinaison homologue non allélique médiée par des duplications segmentaires	14
1.3	Interruption de la fourche de réplication et commutation de cible (FoSTeS)	16
1.4	Comparaison des 3 mécanismes à l'origine de réarrangements géno- miques	16
1.5	Mécanisme des effets de position	21
2.1	Délétion 20qter (patiente 2) : array-CGH (Genosystem 1MB)	32
2.2	Cartographie de la région 20q13.33	34
2.3	Délétion 20q13.33 (patiente 2) : array-CGH (44K, Agilent)	34
3.1	Séquence de l'exon 4 de <i>RUNX1</i>	43
3.2	Délétion 21q22 : array-CGH (44K, Agilent)	46
3.3	Bornes des délétions 21q22 décrites dans la littérature	54
4.1	Caryotype de la patiente	68
4.2	Cartographie du point de cassure sur le chromosome 3	71
4.3	Cartographie du point de cassure sur le chromosome 18	72
4.4	FISH : BAC chevauchant les points de cassure	73
4.5	Southern blot	74
4.6	Positions des sites de restriction d' <i>EcoRI</i> à la jonction sur le der3 . .	75
4.7	Séquençage de la région entourant les points de cassure	76
4.8	Séquences aux points de cassure sur les 2 dérivés de la translocation .	77
4.9	Séquençage de l'exon 12 de <i>ROBO1</i> contenant le SNP rs2271151 . .	78
4.10	Gènes les plus proches du point de cassure et séquences hautement conservées en 3p12	79
4.11	Représentation des gènes 1Mb de part et d'autre des point de cassure sur les chromosomes transloqués	80
4.12	Transcrits de <i>ROBO1</i>	82
4.13	Structure de la protéine ROBO1	83
4.14	Expression de l'ARNm de <i>ROBO1</i> chez l'homme	84
4.15	Guidage axonal	85
4.16	Western blotting de ROBO1	89
4.17	RT-QPCR de ROBO1 à partir de prélèvements sanguins	91
4.18	Courbes d'amplification en temps réel des gènes de référence et du gène <i>ROBO1</i>	92
4.19	RT-QPCR de ROBO1 à partir de lignées lymphoblastoïdes	93
4.20	Northern blotting à partir d'ARN de lignée lymphoblastoïde	94

4.21	Etude du chimiotactisme des polynucléaires	95
4.22	Contrôle électrophorétique de la PCR à partir de tissus pour isoler un ARNm du gène hypothétique chr18_703.1	99
4.23	Cartographie de la région en 18q23	101
4.24	Etude <i>in silicio</i> de sites accepteurs potentiels d'épissage au niveau du point de cassure sur le der3	108
4.25	Structure génomique de <i>ROBO1</i> et domaines fonctionnels de la protéine	110
6.1	Chimiotactisme des polynucléaires : schéma de l'expérience	136

Liste des tableaux

2.1	Clinique des patients avec délétion terminale 20q	39
3.1	Cartographie de la région délétée en 21q22	45
3.2	Clinique des patients avec délétion 21q22	56
3.3	Clinique des patients avec délétion 21q22 (suite)	57
4.1	Classification moléculaire des dystonies	63
4.2	BAC hybridés localisés sur le chromosome 3	70
4.3	BAC hybridés localisés sur le chromosome 18	72
4.4	Variations de séquence de <i>ROBO1</i>	98
5.1	Critères de pathogénicité des CNV	120

Introduction

Sommaire

1.1	Objectifs de cette étude	3
1.2	La cartographie du génome	4
1.2.1	La cartographie génétique	4
1.2.2	La cartographie physique	5
1.3	Les chromosomes et les anomalies chromosomiques	5
1.3.1	Remaniements déséquilibrés	6
1.3.2	Remaniements équilibrés	6
1.3.3	Apport des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire dans la détection des remaniements génomiques et la cartographie physique du génome	8
1.3.4	Modes de formation des anomalies chromosomiques	12
1.3.5	Impact des réarrangements chromosomiques sur le phénotype	17

La génétique étudie les caractères héréditaires des individus, leur transmission au fil des générations et leurs variations. Les maladies génétiques résultent de toute modification du génome aboutissant à un processus pathologique pour l'individu, en particulier l'altération d'un ou plusieurs gènes. L'un des enjeux de cette discipline est donc de comprendre les mécanismes à l'origine de ces maladies par la mise en relation d'un gène et d'une pathologie. Différentes stratégies d'étude peuvent alors être mises en œuvre.

La première approche est celle du « **clonage fonctionnel** » qui consiste, à partir de l'observation d'un phénotype clinique, à mettre en évidence une perturbation du processus biochimique et de la protéine pour remonter au gène en cause et le cloner. Cependant, pour la plupart des maladies héréditaires, le défaut biochimique n'est pas connu : il convient alors de mettre en place une stratégie de « **clonage positionnel** ». Il s'agit dans ce cas d'isoler un gène à partir de sa localisation chromosomique par la réalisation de plusieurs techniques de cartographies génétique et physique. Cette approche de « gène candidat » a ainsi pour but d'établir des corrélations génotype-phénotype. Les pathologies monogéniques peuvent être la conséquence de déséquilibres génomiques tels que les microdélétions ou les microduplications, mais aussi survenir à la suite d'une mutation ponctuelle ou de tout autre réarrangement chromosomique comme une translocation, une inversion ou une insertion, conduisant à l'interruption d'un gène. Ces anomalies du génome aboutissent alors soit à une altération de l'expression du gène et donc du dosage protéique, soit à des modifications fonctionnelles de la protéine synthétisée.

La mise en évidence d'anomalies chromosomiques constitue un moyen efficace d'isolement et d'identification de gènes candidats. Ainsi, l'isolement d'un gène responsable d'une pathologie donnée, outre les conséquences physiopathologiques, conduit en pratique médicale à la mise en place d'un conseil génétique approprié.

1.1 Objectifs de cette étude

Cette étude a pour but de montrer dans quelle mesure la mise en évidence d'un réarrangement chromosomique peut aboutir à la découverte de gènes candidats dans le cadre d'anomalies du développement. Etant particulièrement impliquée dans la mise en place des différentes approches méthodologiques (en particulier l'hybridation génomique comparative en microréseau ou array-CGH) et dans leur utilisation pour l'analyse des anomalies de structure du génome, mon travail a abouti dans un premier temps à la publication d'une revue sur l'array-CGH et ses applications.

Fort de cette expérience, j'ai pu mettre en application les différents principes ainsi dégagés dans le cadre de l'étude de 2 réarrangements chromosomiques rares de survenue *de novo* associés à un retard mental :

- une délétion subtélomérique en 20q13.33 associée à un retard psychomoteur chez 2 fillettes,
- une délétion interstitielle en 21q22.

Nous avons réalisé une cartographie physique précise de ces délétions grâce à l'utilisation coordonnée de différents outils de cytogénétique et de biologie moléculaire (en particulier l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et l'array-CGH). Ceci a abouti à contribuer à la caractérisation de nouveaux microremaniements chromosomiques submicroscopiques jusqu'alors inconnus. Il a alors été possible de préciser les gènes en déséquilibre potentiellement candidats dans la survenue des affections étudiées grâce à l'analyse des bases de données génétiques apportant des éléments complémentaires sur l'annotation des gènes candidats. Ces travaux ont fait l'objet de 2 publications scientifiques.

Dans un second temps, l'étude d'une translocation réciproque équilibrée t(3;18)(p12.3;q23) décrite chez une enfant présentant une dystonie syndromique associant un retard de développement et une dystonie généralisée précoce a abouti à la cartographie précise des points de cassure et à leur caractérisation moléculaire. Le gène **ROBO1** impliqué dans le guidage axonal s'est révélé interrompu par la translocation. Des explorations complémentaires ont alors été conduites (array-CGH, étude de l'ARN, étude protéique, migration cellulaire et séquençage du gène *ROBO1* chez d'autres patients avec une dystonie syndromique) afin de mieux cerner les conséquences d'une telle anomalie sur la survenue de cette dystonie syndromique. Les résultats de ces études sont présentés et analysés.

Ces exemples, en particulier l'étude de la translocation équilibrée, soulignent les difficultés d'interprétation liées à la découverte de ces réarrangements et donc la nécessité d'apporter la preuve de leur implication dans le phénotype observé par des moyens appropriés.

1.2 La cartographie du génome

Deux approches peuvent être envisagées à la recherche de gènes candidats :

- la **cartographie génétique** qui repose sur l’observation d’un grand nombre de patients atteints par la pathologie,
- la **cartographie physique** qui consiste à localiser un gène candidat à partir de l’observation d’une anomalie chromosomique.

C’est cette deuxième approche qui a été utilisée dans les différents cas étudiés au cours de ce travail.

1.2.1 La cartographie génétique

Au cours de la méiose, la ségrégation indépendante des chromosomes aide à déterminer si des gènes sont situés sur le même chromosome ou sur des chromosomes différents. Les caractères génétiques qui ségrègent ensemble au cours de la méiose sont donc situés sur le même chromosome. On appelle **liaison génétique** la tendance des gènes situés sur le même chromosome à être transmis ensemble. Cependant, le phénomène de recombinaison entre les chromatides de chromosomes homologues paternels et maternels par crossing over au cours de la méiose peut séparer des gènes liés. Or, plus deux gènes sont proches, moins une recombinaison entre eux est probable, donc plus leur liaison génétique est élevée. Ainsi, les gènes déterminant des pathologies peuvent être cartographiés en établissant leur co-ségrégation avec des marqueurs polymorphes de positions connues dans le génome, dont les allèles se transmettent spécifiquement avec la maladie. Il est alors possible de déterminer un **intervalle de liaison** dans lequel est localisé le gène responsable. Plusieurs conditions doivent être réunies pour mener ces études.

1. Il est nécessaire de pouvoir tester un grand nombre de marqueurs polymorphes régulièrement répartis sur l’ensemble des chromosomes. Ils sont caractérisés par la présence, dans une population donnée, d’au moins deux variants alléliques au locus donné. Il en existe différents types :
 - les polymorphismes de longueur des fragments de restriction qui, suite à des mutations, créent ou détruisent les sites de restriction reconnus par des enzymes spécifiques,
 - les microsatellites qui correspondent à une répétition en tandem d’un motif de quelques paires de bases (entre 5 et 50 répétitions en moyenne). Ils sont mis en évidence par PCR suivie d’une électrophorèse capillaire.
 - les marqueurs de type SNP (ou single nucleotide polymorphism, qui peuvent constituer des facteurs de risque dans les pathologies multifactorielles) décelés sur l’ensemble du génome. Leur utilisation s’est accrue plus récemment grâce au développement de la technologie de puces à SNP. Ainsi, des régions d’homzygotie partagée par les sujets porteurs d’une pathologie autosomique récessive ont pu être identifiées.

2. Il faut être en mesure de suivre la ségrégation des loci étudiés au travers

d'un grand nombre de méïoses pour estimer la fréquence de recombinaison entre les marqueurs polymorphes, d'où l'intérêt de pouvoir suivre de grandes familles dans lesquelles ségrège la pathologie.

3. Il convient ensuite de procéder à un traitement statistique des données pour établir les distances génétiques, exprimées en centimorgans (cM), entre les différents loci étudiés.

1.2.2 La cartographie physique

A la différence de l'approche génétique, l'établissement de la cartographie physique repose sur des méthodes directes de localisation, **à partir de la molécule d'ADN**, support physique de l'hérédité. Elle amène à apprécier les distances physiques (mesurées en kb ou Mb) séparant les diverses régions d'un chromosome. Elle consiste à localiser et à ordonner des séquences d'ADN (contigs) au sein de régions cibles ou intervalles. Il s'agit ainsi d'identifier un groupe de fragments clonés chevauchants dont l'ensemble couvre un chromosome voire un génome entier.

La taille des clones utilisés varie de quelques milliers de kb (dans des chromosomes artificiels de levure ou YAC pour yeast artificial chromosome) à quelques centaines de kb (dans des chromosomes artificiels de bactéries ou BAC pour bacterial artificial chromosome) ou à quelques kb (dans des plasmides ou bactériophages). La construction d'une bibliothèque génomique de clones chevauchants va ainsi être utile pour mettre en place une stratégie de marche sur le chromosome (les clones chevauchants s'hybrident entre eux, d'où leur assemblage en une séquence d'un seul tenant) afin d'isoler un gène dont la fonction est inconnue mais la position génétique est connue.

1.3 Les chromosomes et les anomalies chromosomiques

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

Les anomalies chromosomiques sont soit constitutionnelles soit acquises au cours d'un processus de cancérisation.

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

On distingue les anomalies de nombre et de structure. Elles touchent de 0,9 à 1% des

naissances avec ou sans conséquences phénotypiques et peuvent être responsables de fausses couches spontanées. Ne sera traité par la suite que le cas des **anomalies de structure**.

En fonction de la variation de matériel génétique résultant de l'anomalie chromosomique, elles sont classées en réarrangement **équilibré** (sans perte ni gain de matériel chromosomique) ou **déséquilibré** (perte ou gain de matériel génétique).

1.3.1 Remaniements déséquilibrés

1.3.1.1 Les délétions (del)

C'est la perte d'une partie d'un chromosome, soit terminale, soit interstitielle (deux points de cassure et re-soudure). La perte de matériel est très variable, pouvant aller de quelques dizaines à plusieurs millions de paires de bases. Selon leur taille, elles sont visibles au caryotype pour les plus grandes ou détectées uniquement par une technique d'hybridation *in situ* en fluorescence.

1.3.1.2 Les anneaux (r)

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

1.3.1.3 Les duplications (dup)

Il s'agit de la répétition d'un fragment chromosomique de taille variable avec un gain de matériel génétique.

1.3.1.4 Les isochromosomes (i)

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

1.3.2 Remaniements équilibrés

Warburton (1991) a estimé la fréquence des réarrangements chromosomiques équilibrés *de novo* détectés à l'occasion d'une amniocentèse : elle est de 1/2 000 pour les translocations réciproques, 1/9 000 pour les translocations robertsoniennes et 1/10 000 pour les inversions.

1.3.2.1 Les translocations (t)

Elles se caractérisent par 2 cassures sur 2 chromosomes différents, le plus souvent non homologues, et recollement après échange des segments distaux. On distingue les translocations robertsoniennes et les translocations réciproques. Les premières se produisent entre 2 chromosomes acrocentriques (13, 14 15, 21 et 22) par fusion centrique ou par cassure dans les régions juxta-centromériques. Les secondes, qui nous intéressent ici, ont des points de cassure intervenant à n'importe quel endroit sur les bras courts ou longs des chromosomes, hors régions juxta-centromériques des acrocentriques.

1.3.2.2 Les inversions (inv)

Elles impliquent la cassure d'un chromosome en deux points avec inversion du segment intermédiaire entre ces points et re-soudure.

1.3.2.3 Les insertions (ins)

Un fragment de chromosome se casse, les régions flanquant ce fragment se recollent (comme dans une délétion), et le fragment se réinsère à un autre endroit, soit sur le même chromosome, soit sur un autre chromosome. Une insertion peut être directe (dir ins) si le fragment garde son orientation par rapport au centromère (la bande la plus proximale restant la plus proche du centromère). Une insertion peut être inversée (inv ins) si la bande la plus proximale du fragment se retrouve la plus éloignée du centromère.

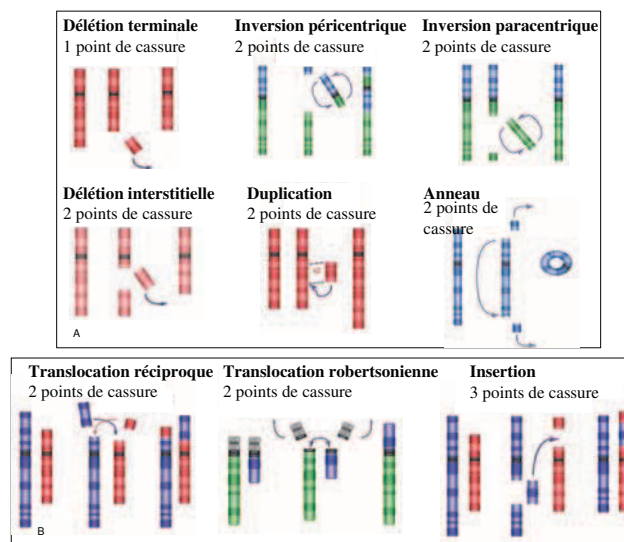


FIG. 1.1 – Aberrations chromosomiques de structure. (A) impliquant un seul chromosome. (B) impliquant plusieurs chromosomes. Source : <http://cvtuel.cochin.univ-paris5.fr/cytogen/2-1.htm>.

1.3.3 Apport des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire dans la détection des remaniements génomiques et la cartographie physique du génome

La mise en évidence de ces réarrangements et leur caractérisation moléculaire nécessitent la mise en œuvre de techniques de détection spécifiques et souvent complémentaires. La détermination de la structure du réarrangement apporte en outre des informations précieuses pour expliquer leur mode de formation.

1.3.3.1 Le caryotype

Il repose sur le classement des chromosomes d'une cellule somatique. Les lymphocytes T issus d'un prélèvement sanguin sont mis en culture et stimulés par un mitogène (phytohémagglutinine) provoquant leur division cellulaire. Les chromosomes sont visualisés en métaphase (forme la plus condensée) et identifiés par une technique de bandes après étalement et coloration (bandes G après coloration au giemsa ou R après un traitement par la chaleur et coloration au giemsa).

Il donne lieu à une **approche globale** de l'ensemble des chromosomes, visualisant les anomalies de structure sans perte ni gain de matériel telles que les inversions et les translocations réciproques mais aussi les aneuploïdies, les duplications ou délétions à condition que la taille en soit suffisante (supérieure à 10Mb). Il peut donc jouer un rôle important dans le clonage et la découverte d'un gène à l'origine d'une pathologie dans la mesure où l'observation d'un réarrangement équilibré tel qu'une translocation ou une inversion peut conduire à la découverte d'un gène qui, du fait de son altération par la cassure chromosomique, est responsable de la pathologie.

Cependant, étant donné les **limites de résolution**, il est moins performant pour déceler les réarrangements déséquilibrés d'une taille inférieure à 10Mb, c'est pourquoi, il est souvent nécessaire d'avoir recours à des techniques de cytogénétique moléculaire telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) voire l'array-CGH dans certains cas.

1.3.3.2 L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Son développement a été initié au début des années 80. Son principe repose sur la capacité d'association (ou hybridation) de 2 brins d'ADN de séquence complémentaire. La région à étudier (située sur un chromosome métaphasique ou au sein d'un noyau en interphase), après dénaturation préalable pour dissocier les deux brins d'ADN, est repérée grâce à une sonde d'ADN de séquence complémentaire et antiparallèle du fragment recherché, marquée par une molécule fluorescente [Pinkel 1986].

Sa mise en œuvre passe par des étapes de culture cellulaire, étalement des chromosomes sur lame, dénaturation de l'ADN cible et des sondes spécifiques de la région à étudier et enfin hybridation. La lecture se fait par microscopie à épifluorescence.

Les sondes sont :

- soit spécifiques d'un locus d'intérêt, parmi lesquelles on peut citer les sondes subtélomériques,
- soit des sondes totales marquant un chromosome dans sa totalité, utiles pour déterminer l'origine d'un marqueur chromosomique ou pour connaître la nature d'un réarrangement complexe impliquant plus de 2 chromosomes.

La FISH contribue à l'établissement de la cartographie des points de cassure par **marche sur le chromosome**.

Elle peut mettre en lumière des **anomalies cryptiques** telles que des translocations, microdélétions ou microduplications chez des individus à caryotype apparemment normal, en particulier dans les régions subtélomériques riches en gènes : la technique de FISH adaptée à la détection des déséquilibres subtélomériques a ainsi montré que ces derniers étaient impliqués dans 5 à 7% des cas de retards mentaux [Flint 2003], [Ravnan 2006].

Sa principale limite réside dans le fait qu'il s'agit d'une technique d'étude **ciblée** d'un locus particulier.

Dans le cas d'une translocation apparemment équilibrée, la technique de FISH établit quels sont les partenaires de la translocation (à l'aide de sondes totales) mais peut aussi mettre en évidence un éventuel **remaniement plus complexe** faisant intervenir plus de deux points de cassure [Ballarati 2009].

La FISH multicolore, par un marquage simultané de l'ensemble des chromosomes par des fluorophores différents ou une association de fluorophores, est également un outil de choix pour la caractérisation de remaniements complexes [de Vree 2009].

Elle n'identifie cependant pas précisément les régions chromosomiques échangées en cas de remaniement intrachromosomique en particulier.

1.3.3.3 L'hybridation génomique comparative en microréseau ou array-CGH

Les conséquences phénotypiques d'une anomalie chromosomique sont dans la majorité des cas le résultat d'un déséquilibre touchant un ou plusieurs gènes sensibles au dosage génique. La taille de ce déséquilibre peut être de l'ordre de quelques dizaines de kilobases à quelques mégabases, ce qui rend le caryotype inapproprié pour sa détection. Le développement de l'array-CGH, notamment des puces à oligonucléotides, permet à l'heure actuelle une étude **pangénomique** et la détection de **déséquilibres génomiques** avec une résolution de l'ordre de **quelques kilobases**.

Son principe repose sur la cohybridation équimoléculaire et compétitive de l'ADN d'un patient et celui d'un témoin, marqués par un fluorophore différent (cyanine 5 et cyanine 3) sur des sondes de séquence connue fixées sur une lame de verre. Le ratio des intensités de fluorescence mesurées par un scanner est proportionnel au

nombre de copies d'ADN dans l'échantillon du patient et du témoin.

Les sondes sont réparties sur l'ensemble du génome. Leur nature, leur nombre, la distance génomique moyenne entre les sondes et leur répartition définissent la résolution de la technique :

- les sondes BAC ou PAC (P1-derived Artificial Chromosome) d'une taille de 75 à 200kb conduisent à une résolution de l'ordre de 1Mb jusqu'à 100kb,
- les sondes à oligonucléotides (de 25 à 85 nucléotides) permettent d'obtenir une résolution allant jusqu'à 6kb actuellement (244 000 oligonucléotides).

Cette technologie a permis d'aboutir au diagnostic étiologique et a facilité l'identification des bases moléculaires de nombreuses pathologies, notamment dans le domaine de la cytogénétique constitutionnelle pour des pathologies telles que le retard mental/retard de développement, l'autisme, les anomalies congénitales. Elle a mis en évidence de nouveaux syndromes microdélétionnels et a contribué à l'identification de gènes candidats en délimitant des régions minimales critiques, intervalles dans lesquels se situent les gènes potentiellement responsables d'un phénotype donné.

Du point de vue de la caractérisation moléculaire d'un remaniement, elle peut mettre en lumière des réarrangements complexes et **caractériser en particulier des translocations apparemment équilibrées**, révélant ainsi des déséquilibres submicroscopiques.

Cette approche ne peut cependant détecter que des remaniements déséquilibrés. Ainsi, en cas de mise en évidence d'un déséquilibre génomique de *novo* chez un enfant, le recours à la FISH sur métaphases à l'aide de sondes spécifiques est nécessaire pour rechercher un éventuel remaniement de structure équilibré parental tel qu'une insertion, une inversion ou une translocation, qui peuvent être à l'origine du déséquilibre. Cette recherche est justifiée par le fait qu'il existe un risque de récurrence du déséquilibre dans la descendance du couple ou des apparentés. Elle ne peut pas non plus détecter un remaniement de structure à l'origine d'une pathologie de point de cassure : dans ce cas, le caryotype reste l'examen de choix.

La description de la technique, ses applications et ses limites ont fait l'objet d'une revue dans Pathologie Biologie (article à la fin de ce chapitre).

1.3.3.4 Les puces SNP

Le séquençage du génome humain, grâce notamment au projet HapMap¹, a favorisé le développement de cette technologie, en permettant l'utilisation de plusieurs centaines de milliers de variations de séquences ponctuelles polymorphes (ou SNP), qui constituent autant de marqueurs sur le génome humain. Son principe est identique à celui de l'array-CGH et repose sur l'**hybridation de**

¹The International HapMap Project. Nature 2003; 426 : 789-96

L'ADN cible du patient marqué par un fluorophore à une sonde de séquence complémentaire (correspondant à une région couvrant un SNP), après amplification par PCR. Les sondes fixées sur la lame correspondent à des oligonucléotides dont la base centrale est spécifique d'un allèle. A la différence de l'array-CGH, il n'y a pas dans ce cas d'hybridation compétitive de 2 ADN mais uniquement de l'ADN du patient. Cette technologie a 3 applications :

- la détection de **variations de nombre de copies** tout comme l'array-CGH : la présence d'une délétion ou d'une amplification se traduit par une variation de l'intensité de fluorescence et une perte d'hétérozygotie. Il est donc possible de détecter des microremaniements chromosomiques à type de délétions ou amplifications.
- la mise en évidence d'une **perte d'hétérozygotie** : elle se traduit pour une région donnée par la perte d'un allèle. Ce phénomène survient en particulier au cours de l'évolution tumorale.
- la mise en évidence d'une **disomie uniparentale** par correction aléatoire d'une trisomie suite à une non disjonction des chromosomes homologues à la méiose. Elle se traduit par une perte d'hétérozygotie sans perte d'intensité de fluorescence pour une région donnée.

Les 2 dernières applications sont spécifiques de cette technique, ce qui lui confère un avantage par rapport à l'analyse par array-CGH.

Elle a contribué aux avancées majeures et rapides de ces dernières années dans la **compréhension des maladies complexes multigéniques** dans la mesure où elle offre une couverture de l'ensemble du génome. La mise en évidence de variations de séquence dans des gènes d'intérêt pour ces pathologies est à la base de la compréhension des mécanismes physiopathologiques en cause [Grant 2008]. Cette approche nécessite des études de cohortes de patients importantes et s'applique donc à des pathologies relativement fréquentes.

D'autre part, dans le cadre de la recherche de gènes candidats suite à la **mise en évidence de déséquilibres génomiques**, la densité des marqueurs est telle que les points de cassure sont déterminés avec précision, d'où une meilleure corrélation génotype-phénotype.

1.3.3.5 Finalement, le séquençage

Il intervient dans la caractérisation moléculaire d'un réarrangement chromosomique. Une fois le fragment de jonction isolé, le séquençage des points de cassure est utile pour caractériser le mécanisme moléculaire en cause : il est ainsi possible de savoir si le réarrangement est lié à la présence de séquences répétées telles que les duplications segmentaires ou s'il est en relation avec l'existence de microhomologies dans la région.

Il permet en outre de savoir quels gènes sont interrompus par les points de cassure, en vue de la compréhension du mécanisme physiopathologique.

1.3.4 Modes de formation des anomalies chromosomiques

Les anomalies de structure surviennent suite à des recombinaisons illégitimes de fragments d'ADN après cassure et recollement de fragments. Le remaniement est intra-chromosomique s'il intéresse un seul chromosome ou inter-chromosomique (translocation) lorsque deux chromosomes ou plus sont en cause.

Ces réarrangements chromosomiques sont la conséquence d'une instabilité génomique liée aux caractéristiques de l'architecture du génome. Ils sont à l'origine de la notion de **désordre génomique** introduite par [Lupski 1998] : ce terme désigne une pathologie causée par une altération du génome (délétions, duplications, inversions ou translocations) aboutissant à une perte, un gain ou une perturbation de l'intégrité structurale d'un gène. Leur taille varie de quelques centaines à plusieurs millions de paires de bases.

Les points de cassure de ces réarrangements chromosomiques se répartissent sur l'ensemble du génome avec toutefois une prédominance au niveau des régions péri-centromériques et subtelomériques, du fait que ces zones présentent une architecture génomique complexe comme en témoigne la présence de duplications segmentaires ou des séquences palindromiques.

Ces réarrangements sont le plus souvent sporadiques et s'expliquent par différents mécanismes qui sont dépendants de l'architecture locale du génome.

1.3.4.1 Les séquences répétées du génome

Dans l'ADN humain, au moins 20 à 30% du génome consistent en des séquences répétitives.

Les séquences intercalées

Elles correspondent à des séquences modérément répétitives et représentent moins de 10^6 copies par génome haploïde. Elles sont intercalées entre des séquences uniques. En fonction de leur longueur, elles sont classées en « **longues séquences répétées intercalées** » (long interspersed repeat sequences ou LINEs) dont la taille est de 6 à 7kb et « **courtes séquences répétées intercalées** » (short interspersed repeat sequences ou SINEs) d'une taille de 70 à 300pb. Parmi ces dernières, on recense les séquences de la famille **Alu**.

Les duplications segmentaires ou « low copy repeats » (LCR)

Il s'agit de séquences de 10 à 300kb, présentant plus de 95% d'homologie, souvent associés à des séquences *Alu*. Elles sont localisées en particulier au niveau des régions péri-centromériques et subtelomériques. Elles peuvent correspondre à des gènes, des pseudogènes, des fragments de gènes, des « clusters » de gènes ou tout autre segment chromosomique. Elles représentent de 5 à 10% du génome et expliquent la présence de points chauds de recombinaison.

Selon l'architecture du génome dans la région soumise au remaniement chromosomique, on distingue les réarrangements récurrents, dont les points de cassure sont fixes, des réarrangements non récurrents pour lesquels les points de cassure sont variables mais à partir desquels il est possible de définir une région minimale critique dans laquelle se trouve(nt) le(s) gène(s) responsable(s) du phénotype.

Trois mécanismes principaux ont ainsi été décrits pour expliquer l'apparition des désordres génomiques [Gu 2008] :

- la recombinaison homologue non allélique,
- la ligature d'extrémités d'ADN non homologues,
- l'interruption de la fourche de réplication et commutation de cible.

1.3.4.2 Réarrangements récurrents résultant d'une recombinaison homologue non allélique

La recombinaison homologue non allélique (NAHR) au cours de la méiose correspond au mécanisme le plus fréquent à l'origine de réarrangements génomiques récurrents. Sa survenue au cours de la mitose est quant à elle à l'origine de mosaïques chromosomiques rencontrées en particulier lors de la survenue de cancers. Elle nécessite la présence de séquences homologues que sont les **uplications segmentaires**. Une recombinaison homologue non allélique entre des duplications segmentaires sur le même chromosome en orientation directe conduit à des délétions/duplications alors qu'une NAHR entre des duplications segmentaires en orientation inversée aboutit à une inversion. Une translocation réciproque est le résultat d'un réarrangement faisant intervenir des duplications segmentaires sur des chromosomes différents (figure 1.2).

Ce mécanisme explique d'une part la récurrence de syndromes microdélétionnels, et d'autre part l'existence d'un syndrome lié à la microduplication correspondant à la même région et qui est souvent identifiée parallèlement à la découverte de la microdélétion.

Les exemples sont nombreux, illustrant l'importance de ce phénomène dans les pathologies humaines.

- Ainsi, la délétion/duplication en **22q11.2** (syndrome de DiGeorge (MIM 188400) et duplication 22q11) d'une taille de 1,5 ou 3Mb est liée à la présence de duplications segmentaires LCR22 [Edelmann 1999].
- La microdélétion d'une taille de 3,7Mb responsable du syndrome de Smith-Magenis et la microduplication responsable du syndrome de Potocki-Lupski (MIM 610883) [Potocki 2000] en **17p11.2** s'expliquent par la présence de LCR (SMS-REP) de 200kb dans cette région [Chen 1997].

A l'inverse, la connaissance de ces LCR a permis la découverte de nouveaux syndromes par le biais de la recherche de déséquilibres dans les régions délimitées par les LCR à l'aide de l'array-CGH. C'est ainsi qu'ont été caractérisés les syndromes

microdélétionnels **17q21.31**, **17q12**, **15q24**, **15q13.3**, et **1q21.1**.

La région **15q13** par exemple, de part la présence de duplications segmentaires complexes, est soumise à des réarrangements chromosomiques : [Sharp 2008] ont ainsi décrit une délétion récurrente de 1,5Mb (entre 2 LCR dénommés BP4 et BP5) dont la fréquence est estimée à 1/40 000.

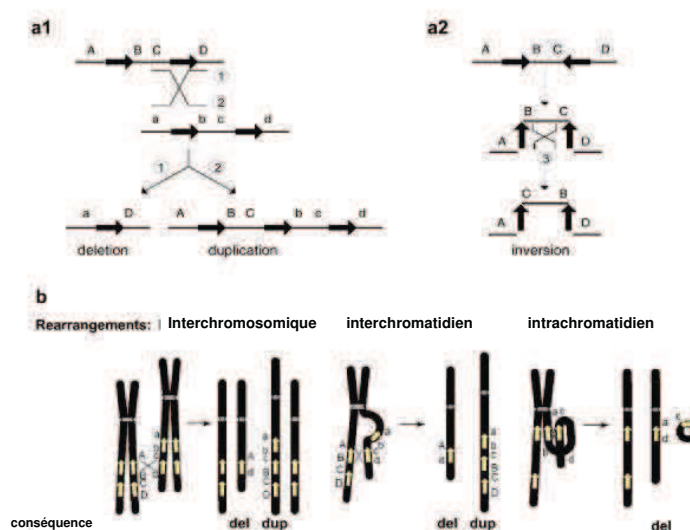


FIG. 1.2 – Recombinaison homologue non allélique médiée par des duplications segmentaires. Les séquences répétées sont représentées par les flèches (orientation dans le sens de la flèche). (a1) Recombinaison entre des duplications segmentaires dans la même orientation -> délétion ou duplication . (a2) Recombinaison entre des duplications segmentaires inversées -> inversion. (b) NAHR interchromosomiques (à gauche) ou interchromatidiens (au centre) -> délétions-duplications réciproques. NAHR intrachromatiniens (à droite) -> délétion. D'après [Gu 2008]

1.3.4.3 Ligature d'extrémités d'ADN non homologues

Les cassures d'ADN double brin apparaissent soit au cours de processus physiologiques tels que la méiose, soit à la suite de stress génotoxiques (radiations ionisantes, ultraviolets, produits chimiques mutagènes) et surviennent suite à une brèche au niveau de la fourche de réplication. Ce type de cassure a été mis en évidence avec une fréquence de 5 à 10% dans des cellules de mammifères en culture. Elles sont extrêmement délétères puisqu'aboutissant à la mort cellulaire ou à des remaniements génétiques.

Leur réparation repose sur deux systèmes principaux : la **recombinaison homologue** qui utilise une séquence d'ADN identique à la séquence endommagée comme matrice ou la **ligature d'extrémités d'ADN non homologues** (NHEJ : non homologous end joining) qui correspond à la resoudure des extrémités d'ADN cassées.

Dans ce cas, après avoir détecté une cassure double brin de l'ADN, les systèmes de réparation réalisent un « **pontage moléculaire** », suivi de la modification des extrémités afin de les rendre compatibles en vue de la ligation. L'une des caractéristiques de ce type de réparation est donc la **perte ou l'ajout de quelques nucléotides** d'origine indéterminée à la jonction.

Ce mécanisme est à l'origine de **délétions** ou de **duplications**.

On peut citer l'exemple de délétions ou duplications non récurrentes dans le gène *PLP1* (proteolipid protein 1) en Xq22 associées au syndrome de **Pelizaeus-Merzbacher** (MIM 312080) pour lesquelles le séquençage des points de cassure montre l'ajout de nucléotides d'origine inconnue [Inoue 2002], [Woodward 2005].

1.3.4.4 Interruption de la fourche de réplication et commutation de cible (FoSTeS)

Un mécanisme basé sur les erreurs de réplication de l'ADN explique les réarrangements non récurrents et le plus souvent complexes tels que des duplications-délétions séparées par des régions non dupliquées ou des duplications-triplications : il s'agit du « fork stalling and template switching » (FoSTeS) (interruption de la fourche de réplication et commutation de cible). Dans ce cas, les sites de jonctions présentent des microhomologies de 2 à 5 nucléotides, ne pouvant par conséquent pas être à l'origine d'une recombinaison homologue. Il est à noter que les jonctions sont situées à proximité de LCR, de séquences palindromiques ou de structures cruciformes.

Dans un premier temps, une **brèche** au niveau d'un brin d'ADN cible d'une fourche de réplication entraîne une rupture de celle-ci.

Le brin d'ADN retardé, du fait de microhomologies à l'extrémité 3' se fixe au niveau d'une seconde fourche de réplication située à proximité (à une distance de 120 à 550kb).

Le croisements de deux fourches de réplication aboutit donc à l'insertion d'une séquence provenant d'un chromosome différent puis le retour à la chromatide sœur survient soit en amont ou en aval de la cassure initiale. Selon sa position, le résultat final est une délétion ou une duplication [Hastings 2009].

La répétition de ce phénomène conduit à des **remaniements complexes**. L'avènement des techniques d'étude du génome plus résolutive telles que l'array-CGH a mis en évidence ces remaniements et a donc permis d'établir ce modèle. Il a été évoqué pour expliquer notamment les réarrangements complexes observés au locus **MECP2** [Bauters 2008].

Ce mécanisme est illustré par la figure 1.3.

La comparaison des 3 mécanismes précédemment décrits est illustrée par la figure 1.4.

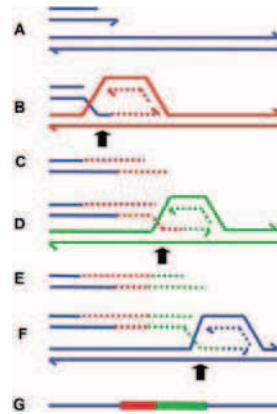


FIG. 1.3 – Interruption de la fourche de réplication et commutation de cible (FoSTeS) : après cassure de la fourche de réplication, la formation d'une seconde fourche est liée à une microhomologie de séquence. D'après [Hastings 2009].

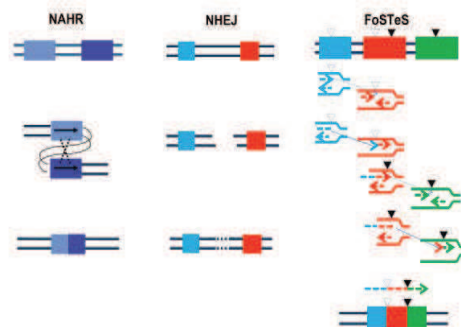


FIG. 1.4 – Comparaison des 3 mécanismes à l'origine de réarrangements génomiques. D'après [Gu 2008].

1.3.5 Impact des réarrangements chromosomiques sur le phénotype

Il dépend en général de la variation de matériel chromosomique (perte ou gain). Ainsi, les réarrangements déséquilibrés se traduisent plus souvent par un phénotype pathologique que les réarrangements équilibrés.

1.3.5.1 Réarrangements déséquilibrés

La répercussion phénotypique d'un réarrangement chromosomique déséquilibré tel qu'une délétion ou une duplication dépend des gènes inclus dans la région en déséquilibre et de leur fonction. Les troubles observés sont en effet la conséquence d'un effet de dosage génique, d'une interruption de séquence ou d'un effet de position.

On peut citer comme exemple de **délétion**, le syndrome de **DiGeorge** (MIM 188400) dû à une microdélétion du bras long du chromosome 22. Dans ce cas, l'haploinsuffisance du gène *TBX1* (T-BOX 1, MIM 602054) est responsable de la majorité des symptômes de la maladie, à savoir la cardiopathie conotruncale, la dysmorphie faciale, l'hypoplasie thymique, l'insuffisance vélopharyngée avec fente palatine ainsi que le dysfonctionnement parathyroïdien se traduisant par une hypocalcémie. On peut ainsi expliquer les signes cardiaques décrits dans ce syndrome par le fait que ce gène joue un rôle important dans le développement de l'arc artériel pharyngé : d'après un modèle murin, son haploinsuffisance conduit à une interruption de l'arc aortique [Lindsay 2001].

Par ailleurs, pour une région donnée, délétions et duplications se traduisent par un phénotype différent, soulignant le fait que le phénotype lié à l'haploinsuffisance est plus sévère.

Les délétions et duplications de cette même région 22q11.2 en constituent un exemple. Une **duplication** de taille identique à celle de la délétion précédemment décrite a été mise en évidence initialement chez des sujets dont le phénotype présentait des similitudes avec celui lié à la délétion [Ensenauer 2003]. Le phénotype des sujets porteurs de cette duplication s'avère en fait être extrêmement variable, allant de l'absence de symptômes à un retard mental sévère, une dysmorphie faciale et des malformations cardiaques [Wentzel 2008].

Certains de ces déséquilibres (délétions ou duplications) sont récurrents et ont été reliés à des **pathologies mendéliennes** autosomiques dominantes ou récessives ou liées à l'X mais ils ont également été mis en relation avec des maladies « complexes » telles que la maladie d'Alzheimer (duplication d'*APP*), l'autisme (délétion homozygote en 3q24), le retard mental (délétions 15q13.3, 17q21.31), la schizophrénie (délétions 1q21.1, 15q11.2 et 15q13.3) par exemple [Zhang 2009].

Enfin, de tels déséquilibres génomiques ne se traduisent pas systématiquement

par un phénotype délétère, preuve en est l'existence de **variations de nombre de copies polymorphes**.

Un CNV ou variation de nombre de copies est défini comme un segment d'ADN dont la taille varie de 1kb à plusieurs Mb et dont le nombre de copies est différent de celui d'un témoin pour lequel il est fixé à 2. Ces polymorphismes sont répartis sur l'ensemble du génome et répertoriés sur le site **Database of genomic variants**¹. Leur nombre n'a cessé de croître. Depuis 2004, 35 publications font état de CNV répertoriés sur ce site, ce qui représente 29 133 CNV correspondant à 8 410 loci répartis sur l'ensemble des chromosomes. Ils représenteraient 5% du génome humain. Ils sont inclus dans des gènes dans environ la moitié des cas, mais aussi dans des régions correspondant à des éléments ultraconservés (0,28% des CNV) ou des microARN (1% des CNV) potentiellement régulateurs de l'expression de gènes et peuvent expliquer une variation d'expression génique dans 17% des cas [Stranger 2007]. Leur effet peut alors se traduire par un effet de dosage génique (délétion, duplication) ou être lié à l'interruption d'un gène.

1.3.5.2 Réarrangements équilibrés

Impact sur la descendance

L'un des risques principaux d'un réarrangement équilibré réside dans la production de gamètes déséquilibrés à la méiose, responsable d'aneusomie segmentaire dans la descendance. Dans le cas d'une **translocation équilibrée**, dans la majorité des cas, les gamètes formés sont normaux par ségrégation méiotique de type alterne. Le risque est essentiellement lié à la production de gamètes anormaux conduisant à des fausses couches multiples ou à la naissance d'un enfant présentant des anomalies congénitales en raison d'un déséquilibre, avec une monosomie partielle d'un des chromosomes impliqués dans la translocation parentale, associée à un trisomie partielle du second.

Dans le cas d'une **inversion péricentrique**, le changement dans l'ordre des gènes ne provoque pas en général d'anomalie phénotypique mais elle peut aboutir à la formation de gamètes déséquilibrés de par la recombinaison méiotique entre les 2 chromosomes homologues, au moment de la formation de la boucle d'inversion, d'où un risque non négligeable de descendance anormale.

Impact sur le phénotype de l'individu porteur

Les réarrangements équilibrés sont le plus souvent asymptomatiques car la totalité de l'information génétique est présente. Néanmoins, [Warburton 1991] a estimé le risque d'anomalie congénitale sévère à 9,4% pour les inversions. D'après une étude de [Bugge 2000] sur la population danoise et du sud de la Suède, la fréquence des remaniements chromosomiques équilibrés décelés à partir de caryotypes en période post-natale, associés à une pathologie serait de l'ordre de 0,3%, incluant des translocations réciproques *de novo* (0,16%) et des inversions *de novo* (0,01%). Cette

¹<http://projects.tcag.ca>

fréquence est 6 fois supérieure à celle de ces remaniements dans la population générale. Dans la moitié des cas, il s'agit de retard mental avec ou sans dysmorphie et/ou malformation congénitale, associé ou non à des symptômes neurologiques additionnels. Par ordre de fréquence, suivent les réarrangements décelés lors d'un bilan d'infertilité.

Pathologies de point de cassure

Lorsque la cassure chromosomique conduit à l'interruption d'un gène et par conséquent à une modification de sa structure ou de sa régulation, ceci peut avoir comme conséquence directe une modification de son profil d'expression. Si ce gène est impliqué dans le développement embryonnaire ou dans une voie de signalisation particulière, le retentissement sur le phénotype peut être important. Ainsi, [Vandeweyer 2009] ont recensé 32 cas de translocations équilibrées sur 92 pour lesquelles un gène interrompu du fait de la translocation a été mis en cause dans le retard mental. Il s'agit de gènes codant des protéines dont l'altération de la fonction peut expliquer le retard mental. On peut relever par exemple les gènes *ZEB2* (intervenant dans le développement embryonnaire des structures neuronales), *NSD1* et *CREBBP* (régulateurs de la transcription), *CNTN4* (intervenant dans la synaptogénèse) et *SHANK3*.

Pathologie récessive

Dans le cas de translocations familiales en particulier, le phénotype observé chez l'enfant et non chez le parent porteur de la même translocation peut être dû à la présence d'une mutation ponctuelle sur l'allèle non transloqué, révélant ainsi une pathologie à transmission récessive.

Effet de position

Ce phénomène conduit à la modification du niveau d'expression d'un gène, liée à un changement de la position de ce gène par rapport à son environnement chromosomique normal, sans mutation intragénique ou délétion [Kleinjan 1998]. Ceci est en fait lié à l'interruption de séquences régulatrices nécessaires à l'expression correcte d'un gène. On en distingue 3 types :

- la région promotrice pour l'initiation de la transcription,
- des séquences « enhancers » ou « silencers » correspondant à des sites de fixation de facteurs de transcription,
- des séquences régulant localement la conformation de la chromatine dont dépend l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN.

L'identification de **séquences régulatrices** est donc importante pour expliquer les conséquences d'un remaniement chromosomique n'altérant pas directement un gène. Une meilleure connaissance de ces dernières a été possible grâce notamment au consortium ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) : cette collaboration internationale a pour but d'établir une liste des éléments fonctionnels du génome

humain (sites de fixation des facteurs de transcription, modification des histones, sites sensibles à la DNaseI, méthylation de l'ADN, annotation des gènes).

Elles correspondent en général à des **séquences non codantes hautement conservées** au cours de l'évolution, représentant de 1 à 2% du génome humain et localisées essentiellement dans les régions intergéniques. Celles-ci ont été initialement définies comme des séquences de plus de 100pb présentant plus de 70% d'homologie entre le génome humain et celui de la souris et représentent 1,3 millions de séquences. Par la suite, l'alignement a été élargi à d'autres espèces phylogénétiquement plus éloignées, la conservation entre plusieurs espèces constituant un critère supplémentaire en faveur de leur fonction régulatrice. Selon [Ovcharenko 2004], un seuil de conservation de 350pb et de 77% d'homologie entre l'homme et la souris conduirait à mettre en évidence la majorité des séquences conservées qui ont une telle fonction.

Un autre argument en faveur de la fonction régulatrice est la proximité de gènes impliqués dans le développement : il a ainsi été mis en évidence que les séquences ultraconservées, c'est-à-dire présentant 100% d'homologie entre l'homme et la souris et/ou hautement conservées entre les vertébrés (homme, souris, téraodon, poulet), sont à proximité de ces gènes et sont susceptibles d'assurer leur régulation [Dermitzakis 2005].

Les conséquences d'un réarrangement chromosomique affectant ces séquences qui peuvent se situer à une distance de plus de 1Mb du gène qu'elles régulent, s'expliquent par différents mécanismes.

- Il peut séparer le promoteur et l'unité de transcription de ses éléments régulateurs situés à distance, inhibant leurs effets aussi bien activateurs que répresseurs.
- A l'inverse, le réarrangement peut entraîner le rapprochement entre un gène et l'activateur d'un second gène, d'où une dérégulation de l'expression du premier gène : ce phénomène est décrit notamment en cancérologie, dans le lymphome de Burkitt par exemple, où le protooncogène *C-MYC* localisé sur le chromosome 8 est dérégulé en raison de la proximité d'un activateur des immunoglobulines suite à une translocation $t(8;14)$, $t(2;8)$ ou $t(8;22)$.
- Un gène et ses éléments régulateurs peuvent se retrouver à proximité d'un second gène, ce qui a pour conséquence une compétition concernant la régulation de ces deux gènes et donc une diminution du niveau d'expression.
- Un rapprochement de régions d'hétérochromatine et d'euchromatine peut se produire, empêchant la transcription du gène.

Ces différents mécanismes sont représentés sur la figure 1.5.

Pour pouvoir expliquer le phénotype observé par un effet de position, il est bien sûr nécessaire d'avoir démontré l'implication du gène situé à distance dans le phénotype, notamment par la mise en évidence de mutations perte de fonction. [Baala 2007] ont ainsi décrit un cas de translocation $t(3;10)(p24;q23)$ homozygote n'interrompant aucun gène mais qui a conduit à la perte d'expression du transcrit du

gène *EOMES* (eomesodermine) situé à 215kb du point de cassure sur le chromosome 3 et donc à une microcéphalie associée à une polymicrogyrie et une agénésie du corps calleux.

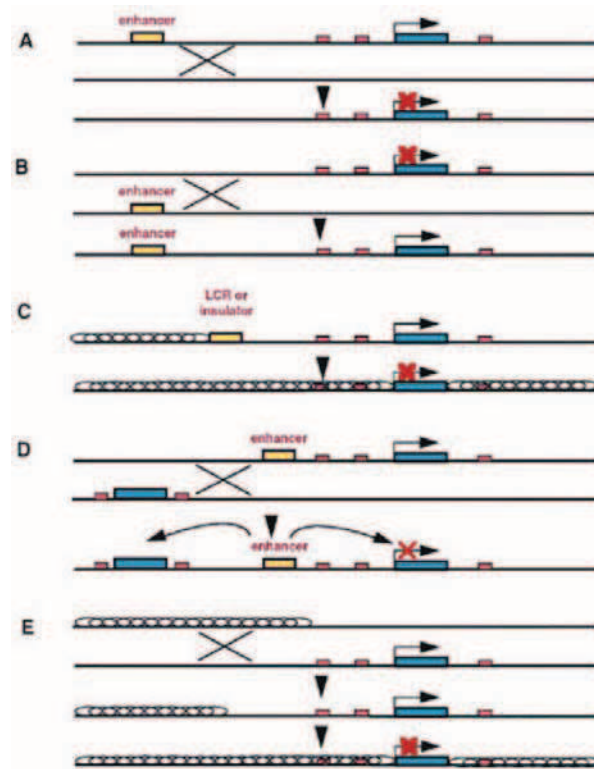


FIG. 1.5 – Mécanismes pouvant expliquer un effet de position : (A) éloignement d'une séquence activatrice de l'unité transcriptionnelle. (B) rapprochement entre une séquence activatrice et un gène. (C) suppression d'une séquence régulatrice. (D) Compétition entre deux gènes pour une même séquence activatrice (E) modification de l'environnement chromatinien d'un gène (rapprochement entre une région d'hétérochromatine et un gène. D'après [Kleinjan 1998].

Déséquilibre associé à une translocation apparemment équilibrée

La définition d'une translocation équilibrée a longtemps reposé sur l'absence de perte ou de gain de matériel chromosomique visible par les techniques de cytogénétique dite conventionnelle, à savoir en particulier le caryotype dont la limite de résolution est de l'ordre de 5 à 10Mb. Les avancées technologiques de cytogénétique moléculaire, en particulier les progrès concernant la résolution des techniques grâce à l'introduction de l'array-CGH, ont conduit à reconsidérer les translocations apparemment équilibrées. Un déséquilibre au niveau du point de cassure ou à distance de celui-ci est en effet retrouvé dans environ 40% des cas avec cette technique [De Gregori 2007], [Schluth-Bolard 2009]. Ces résultats remettent donc en cause l'hypothèse d'une pathologie de point de cassure dans un certain nombre de

cas puisque le phénotype pourrait s'expliquer par un effet de dosage génique. Et ce d'autant plus que [Baptista 2008], dans une étude comparative de sujets sans phénotype particulier et de patients à phénotype anormal, ont mis en évidence des déséquilibres non décrits comme polymorphes associés au point de cassure uniquement dans le second groupe. Le possible retentissement sur le phénotype du patient dépend alors de la nature des séquences en déséquilibre et notamment des gènes inclus.

Remaniement chromosomique complexe associé

Un réarrangement « apparemment » équilibré décelé chez un patient à phénotype anormal peut en fait correspondre à un remaniement complexe, impliquant 2 chromosomes ou plus, avec au moins 3 points de cassure. Ceci rend l'interprétation des conséquences phénotypiques d'un tel réarrangement d'autant plus délicate que le risque de phénotype anormal associé à une translocation équilibrée augmente avec le nombre de points de cassure. Une revue de la littérature recensant 60 cas de translocations équilibrées complexes révèle ainsi que sur 27 patients avec un réarrangement *de novo*, 14 présentent un phénotype anormal [Madan 1997]. En outre, [Patsalis 2004] retrouvent un réarrangement complexe identifié grâce à une technique de FISH dans 3 cas sur 20 de translocations équilibrées décelées au caryotype. Ces éléments soulignent donc l'importance de la caractérisation moléculaire des points de cassure de ces translocations par FISH mais aussi de la recherche de déséquilibres associés par array-CGH.

L'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN (puces à ADN) en pathologie chromosomique constitutionnelle

Microarray-based comparative genomic hybridization in the study of constitutional chromosomal abnormalities

M. Béri-Dexheimer, C. Bonnet, P. Chambon, K. Brochet, M.-J. Grégoire, P. Jonveaux *

Laboratoire de génétique EA 4002-IFR111, CHU de Nancy-Brabois, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Reçu le 21 mars 2006 ; accepté le 4 avril 2006

Disponible sur internet le 11 mai 2006

Résumé

Les anomalies chromosomiques représentent la première cause de retard mental d'origine génétique. Les développements technologiques récents permettent l'étude des anomalies quantitatives du génome à un seuil de résolution 50 à 100 fois supérieur à celui du caryotype constitutionnel. Ces méthodes sont regroupées sous le vocable « caryotype moléculaire » et comprennent la technique des puces à ADN ou hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN. Cette revue décrit le principe de la technique de puce à ADN, les différentes plateformes proposées, leurs applications et limites dans le contexte de diagnostic des anomalies chromosomiques constitutionnelles.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Chromosomal aberrations are the first cause of mental impairment and dysmorphism. Rearrangements involving large chromosomal segments can be detected by standard chromosome analysis using GTG-banding, but this technique is not suited for the detection of small chromosome abnormalities. Array comparative genomic hybridisation (array-CGH) is a method used to detect segmental DNA copy number alterations. Recently, advances in this technology have enabled high-resolution examination for identifying genetic alterations and copy number variations on a genome-wide scale. This review describes the current genomic array platforms and CGH methodologies and highlights their applications for studying constitutional disease.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Cytogénétique ; Retard mental ; Hybridation génomique comparative ; Puces à ADN

Keywords : Human cytogenetics; Mental impairment; Microarrays CGH

1. Introduction

Les techniques de cytogénétique ont mis en évidence le rôle essentiel des anomalies chromosomiques constitutionnelles à l'origine des handicaps mentaux, des syndromes malformatifs et d'échecs de la reproduction [1]. Les anomalies chromosomi-

ques sont la première cause identifiée de retard mental d'origine génétique [2].

La pratique d'un caryotype constitutionnel fait ainsi partie de la démarche diagnostique habituelle face à un retard mental (RM). L'analyse clinique à la recherche d'une dysmorphie faciale, de malformations associées, de troubles du comportement pourra orienter vers une région chromosomique spécifique. Ainsi au cours de ces dernières années, de nouvelles entités syndromiques « chromosomiques » comprenant un RM ont été identifiées. Toutefois, la mise en évidence d'une anomalie déséquilibrée (trisomie et/ou monosomie partielle)

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : p.jonveaux@chu-nancy.fr (P. Jonveaux).

est fonction du pouvoir de résolution de la technique d'analyse des chromosomes. L'analyse cytogénétique conventionnelle (avec un seuil de résolution de 400 bandes distinctes par génome haploïde) ne détecte pas les réarrangements de moins de 5 Mb voire plus si l'anomalie est dite cryptique, intéressant des régions possédant un profil de bandes similaire. Les techniques de haute résolution ont permis d'augmenter la sensibilité de l'analyse cytogénétique, et de passer de la résolution du caryotype « standard » à une résolution améliorée (> 550 bandes). Les anomalies chromosomiques détectables par le caryotype sanguin représentent environ 5 % des patients ayant un retard mental inexplicable [3].

Les techniques de biologie moléculaire (hybridation des acides nucléiques) ont été appliquées avec succès à la cytogénétique dans les années 1990. L'hybridation *in situ* révélée par fluorescence (FISH : fluorescence *in situ* par hybridation) offre la possibilité d'aller plus loin dans le degré de résolution et l'exploration des anomalies chromosomiques au-delà des techniques classiques [4]. Elle est indispensable au diagnostic des microremaniements chromosomiques, délétions et duplications dont l'identification constitue un progrès décisif pour l'élucidation des causes de retard mental. Dans le champ de la microcytogénétique, certaines délétions interstitielles ou terminales sont responsables de syndromes maintenant bien identifiés tels par exemple le syndrome de Williams en 7q11.23, le syndrome de délétion 22q11, le syndrome de Smith-Magenis en 17p11.2, la délétion 1p36. Tout particulièrement, les microremaniements des régions subtélomériques sont observés chez environ 5 % des patients avec un RM associé à un syndrome dysmorphique et/ou une anomalie de la croissance [5,6]. La relative petite taille (1 à 4 Mb) de ces anomalies fait qu'elles ne sont détectables que par d'autres approches telles les techniques de cytogénétique moléculaire. Si l'information clinique est évocatrice, elle conduira vers le locus d'intérêt, l'utilisation de la FISH confirmant alors dans la plupart des cas le diagnostic. Les travaux de cartographie physique sur ces microremaniements ont révélé la présence de séquences flanquantes répétées prédisposant très vraisemblablement aux événements de recombinaison homologue, à l'origine de délétions et de duplications [7]. Ces duplications segmentaires ou duplicons étant distribuées dans de nombreux sites du génome, d'autres événements de type microdélétions ou microduplications seraient susceptibles d'expliquer certaines situations cliniques associées à un RM. L'identification de ces microremaniements est donc dépendante des sondes mises à disposition.

Dans le contexte d'un criblage génomique, les techniques d'analyse globale actuellement disponibles en situation diagnostique reposent sur l'hybridation génomique comparative (CGH). Son principe consiste à cohybrider une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin, marquée chacune par un fluorochrome différent, sur les métaphases d'un sujet témoin. La lecture se fait par l'intermédiaire d'un logiciel qui analyse le rapport de fluorescence en chaque point du chromosome. Le gain ou la perte de matériel chromosomique se traduit par une déviation de l'intensité de fluorescence. La taille des déséquilibres détectés est proche de celle du caryotype. Cependant si la CGH sur chromosomes métaphasiques peut identifier des

déséquilibres non visibles au caryotype classique, elle ne détecte pas les remaniements de petite taille tels ceux observés au cours des syndromes microdélétionnels et les anomalies subtélomériques. L'ensemble de ces données fait apparaître le besoin d'une nouvelle approche de diagnostic cytogénétique dont le but est de caractériser des déséquilibres chromosomiques de petite taille (1 à 4 Mb) et à l'échelle pan-génomique, c'est-à-dire sur un très grand nombre de locus de façon simultanée, en l'absence de signes cliniques évocateurs d'une région chromosomique d'intérêt. Le jumelage de plusieurs technologies a permis la miniaturisation des techniques d'hybridation, autorisant la détection de milliers de molécules d'acide nucléique de façon simultanée sur des matrices solides mesurant quelques centimètres carrés [8]. La technologie émergente des puces à ADN est donc une nouvelle approche pour répondre à de telles situations diagnostiques. Cette revue présentera la technique d'hybridation génomique comparative sur microréseaux d'ADN et ses applications dans l'identification et la caractérisation des anomalies chromosomiques constitutionnelles.

2. Principe de l'hybridation génomique comparative sur microréseaux d'ADN

Cette technique utilise le principe de la CGH sur un support (lame de verre) au niveau duquel sont déposées des séquences d'ADN connues ou cibles. Les sondes correspondent à l'ADN du patient (ADN test) marqué par la Cyanine 3 (Cy3) et l'ADN du témoin par la Cyanine 5 (Cy5). Les deux ADN en quantité équivalente sont dénaturés puis préhybridés en présence d'ADN de type Cot1 (étape permettant de saturer les séquences répétées contenues dans les sondes) et cohybridés en les déposant sur les cibles de la lame. La lame est ensuite placée dans une chambre d'hybridation pendant au minimum 16 heures à 37 °C. Après lavage de la lame, la lecture des signaux est réalisée grâce à un scanner laser automatisé. Une analyse bio-informatique des données est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel qui enregistre l'intensité de fluorescence de l'ADN marqué à la Cy3 et de l'ADN marqué à la Cy5. Après normalisation des intensités de fluorescence, il établit un rapport des intensités de fluorescence (RIF) et donne une représentation graphique de ce rapport. Cette analyse est répétée pour l'ensemble des séquences d'ADN présentes sur la lame. Pour chacune d'entre elles, un RIF égal à 1 correspond à un nombre de copies normal c'est-à-dire deux, entre 1,3 et 1,4 à un gain d'une copie et entre 0,6 et 0,7 à la perte d'une copie (Fig. 1). Afin d'assurer, pour un même patient, un contrôle interne du résultat obtenu, une deuxième lame est hybridée mais cette fois, l'ADN test est marqué par la Cy5 et l'ADN du témoin par la Cy3. Les profils obtenus avec les deux lames sont superposés et seules les déviations concordantes sont retenues comme anormales : gain pour une séquence d'ADN sur le profil de la première lame et perte pour la même séquence avec la deuxième lame. Cette technique permet théoriquement la détection de déséquilibres génomiques de séquences spécifiques au seuil d'une copie, et donc la détection avec la même sensibilité d'une délétion ou d'une duplication.

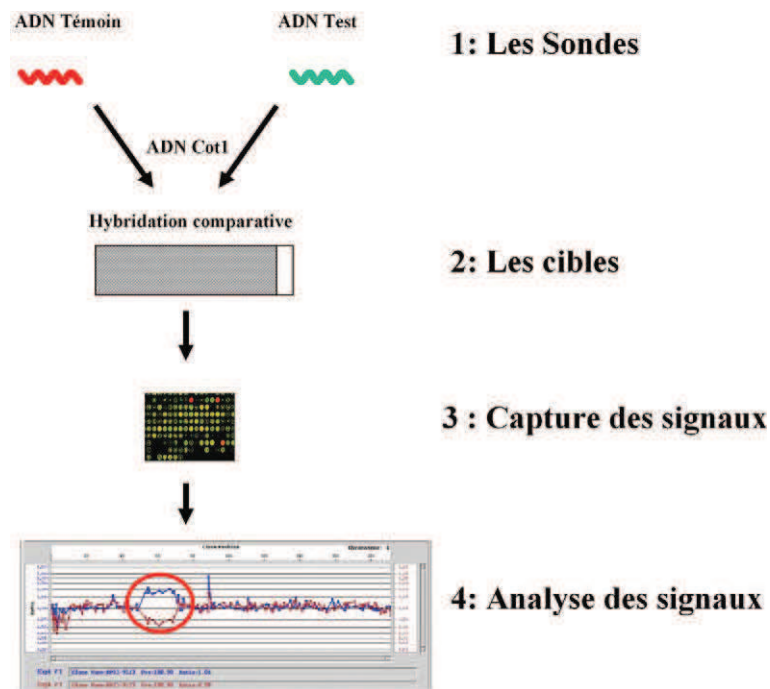


Fig. 1. Principe de l'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN.

Les sondes sont représentées par l'ADN du patient (ADN test) et l'ADN du témoin marqués respectivement par un fluorochrome vert et rouge. Les deux ADN sont cohybridés en quantité équivalente en présence d'ADN Cot1 sur les cibles ADN déposées en microréseau sur un support solide. Les images des signaux fluorescents sont capturées par un scanner et analysées. Les points rouges indiquent une perte de l'ADN test, les points verts un gain de l'ADN test et les points jaunes indiquent la présence d'une quantité équivalente entre l'ADN test et l'ADN témoin. Le rapport de fluorescence peut être représenté sous une forme graphique (exemple de rapport d'une puce de la firme Spectral Genomics). La méthode de marquage inverse des deux ADN test et témoin permet de confirmer le déséquilibre compte tenu de la concordance de la déviation (image en miroir entourée d'un cercle). Chaque point du graphique correspond à une cible dont la cartographie physique sur le chromosome est connue permettant ainsi de quantifier la taille de l'anomalie et d'apprécier les gènes impliqués dans le remaniement.

3. Les différents types de puces à ADN

La résolution de cette technique dépend de la taille des séquences déposées sur la lame, du nombre et de l'espacement régulier des séquences entre elles, en terme de couverture du génome [9,10]. Par rapport à la résolution de la CGH sur métaphase où l'ADN est hautement condensé, celle de la CGH à partir d'un réseau de cibles individualisées est nettement supérieure. L'intensité du signal d'hybridation dépend en partie de la structure et de la taille de l'ADN cible comparées à la complexité de l'ADN sonde. Selon la nature des séquences déposées sur la lame, on distingue différents types de puces.

La cible peut être représentée par des ADNc d'une taille de 0,5 à 2 kb. Les signaux les plus intenses seront observés surtout pour les ADNc les plus longs avec une densité d'autant plus grande d'exons présents sur la puce. Ces cibles ne s'hybrident pas uniformément avec l'ensemble du génome sonde compte tenu de leur constitution exclusive en régions exoniques sans les promoteurs et autres sites de liaison des protéines. Un avantage d'une telle puce réside dans le fait que les délétions et les amplifications peuvent être corrélées au changement d'expression en utilisant la même puce mais avec des sondes de type ARN [11].

À l'opposé, les clones de grande taille (de 50 à 150 kb) de type BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) et PAC (*Phage Artificial Chromosome*) sont des cibles robustes pour la

sensibilité de détection du signal d'hybridation, et de plus non limitées aux seuls gènes annotés dans les bases de données génomiques. Les puces couramment développées par les laboratoires académiques et certaines firmes commerciales possèdent en moyenne 3 000 clones de ce type avec une résolution avancée d'une mégabase c'est-à-dire une couverture de 10 % du génome humain, en supposant que l'espacement des cibles est régulier tout au long du génome [8,12,13].

Les puces à oligonucléotides (de 20-25 bases) obtenues par synthèse photolithographique détectent des polymorphismes mononucléotidiques ou SNP (single nucleotide polymorphisms). Leur emploi nécessite un traitement préalable de la sonde afin de réduire sa complexité génomique et diminuer la probabilité d'hybridation croisée aux multiples cibles oligonucléotidiques de la puce et donc de signaux non spécifiques [14]. Ce type de cible donne une information sur la présence d'une éventuelle aneusomie segmentaire mais aussi sur le statut allélique du locus, avec la possibilité d'identifier une disomie uniparentale [15].

La comparaison des trois types de puces, ADNc, SNP et BAC sur l'ADN remanié de la lignée BT474 issue d'un cancer du sein [16] a révélé que la puce BAC donnait les meilleurs rapports signal-bruit de fond, bien adaptés à la détection des altérations en copie unique de l'ADN.

En augmentant la taille des oligonucléotides (60-70mers) la spécificité de l'hybridation s'améliore conduisant à une effica-

cité comparable à celle des puces BAC quant à leur capacité à détecter des aneusomies segmentaires et sans réduction préalable de la complexité génomique de la sonde [17].

4. Les applications

Comme la très grande majorité des anomalies chromosomiques constitutionnelles conduit à un déséquilibre quantitatif (gain ou perte de tout ou partie de chromosome), les puces à ADN ont été utilisées avec succès dans la détection de ces anomalies de structure déséquilibrées. À partir d'un microréseau constitué en moyenne de 3 000 BACs, correspondant à une résolution théorique d'une mégabase (1 Mb), 16 à 25 % d'aneusomies segmentaires ont été identifiées chez des patients présentant un RM inexplicable [12,18,19]. Ce fort taux reflète sans ambiguïté l'efficacité diagnostique d'une telle technologie sans omettre toutefois un possible biais de sélection des patients. En effet, la plupart des patients a été incluse dans ces études en raison de données cliniques évocatrices d'une anomalie chromosomique, notamment la présence d'un syndrome dysmorphique et d'un trouble de la croissance. Par ailleurs, il a été observé que la fréquence des remaniements cryptiques intercalaires est de 2 à 3 fois celle des déséquilibres subtelomériques qui étaient considérés jusqu'alors comme la deuxième cause de RM après la trisomie 21 [20]. Ces données confirment ainsi la nécessité d'un criblage génomique large et non plus limité aux seules extrémités télomériques.

Tout un nouveau champ de la pathologie chromosomique reliée au RM s'est alors ouvert et ces résultats ont conduit naturellement à produire une puce « pan-génomique », avec une couverture globale du génome, par le dépôt de 32 447 BAC cibles se chevauchant pour la quasi-totalité d'entre-elles, soit dix fois plus que la couverture des puces 1 Mb [21]. Cependant ce maillage étroit de cibles génomiques a fait apparaître une nouvelle dimension de la nature complexe du génome humain [22,23]. Des régions dispersées au sein du génome présentent une variation dans le nombre de copies de grande taille (entre 50 et 150 kb) conduisant à des microduplications et des microdélétions. Ces microremaniements sont favorisés par la présence des séquences répétées homologues de grande taille ou duplicons par un mécanisme de recombinaison homologue non allélique [24]. Plusieurs études sur des populations témoins ont considéré ces variations comme des polymorphismes relativement fréquents. Un recensement de ces variations génomiques, régulièrement mis à jour, est disponible sur le site <http://projects.tcag.ca/variation/>. Certaines de ces régions contiennent des gènes tel le gène du récepteur au neuropeptide Y4 dont on connaît le rôle dans la régulation de la masse corporelle. Les conséquences phénotypiques de ces polymorphismes sont encore inconnues. Leur présence à l'état homozygote ou combinée à d'autres polymorphismes non alléliques pourrait être potentiellement délétère. Dans cet esprit, une étude récente [21] a identifié grâce à une puce à ADN pan-génomique et à partir d'une cohorte de 100 patients atteints d'un RM idiopathique (avec un caryotype normal et après exclusion d'un remaniement subtelomérique), 274 de ces variations de nombre de copies (VNC) d'une taille allant de 50 kb à 12 Mb dont 11

VNC considérées comme pathogènes car apparues de novo chez 10 patients (10 %), 5 VNC incertaines en l'absence d'étude parentale, et 258 VNC héritées d'un parent représentant a priori un polymorphisme non relié au RM. Ces résultats confirment que la technologie est très robuste en terme d'identification d'aneusomies segmentaires (par exemple une duplication d'une taille inférieure à 1 Mb sera détectée par dix clones au lieu d'un seul diminuant le taux de faux positif). De même les auteurs à partir de cette étude concluent que la part des anomalies chromosomiques à l'origine du RM serait de 20 %, en considérant 5 % identifiés à l'aide du caryotype, 5 % d'anomalies subtelomériques et 10 % d'anomalies interstitielles. D'autres études seront manifestement nécessaires pour étayer ces conclusions, mais d'ores et déjà les microremaniements hérités vont poser un sérieux problème dans l'état actuel de nos connaissances quant à leurs implications diagnostiques. Il sera nécessaire de faire la part entre un variant « neutre » ou une anomalie délétère responsable du tableau clinique observé chez l'enfant. La situation peut être d'interprétation plus aisée lorsque l'anomalie héritée (délétion ou duplication) est portée par le chromosome X et que les données cliniques sont en faveur d'un mode de transmission lié au chromosome X, avec un ou plusieurs garçons de la famille atteint du RM lié à l'aneusomie segmentaire de l'X, anomalie transmise par les femmes indemnes cliniquement avec en plus chez elles une inactivation biaisée du chromosome X remanié. En revanche s'agissant des anomalies héritées des autosomes, il n'est pas possible d'écarter l'hypothèse d'un effet pathogène par un mécanisme d'empreinte parentale (bien connue pour certaines régions génomiques), d'une pénétrance incomplète déjà rapportée pour certaines microduplications du chromosome 22 [25] ou de la perte d'hétérozygotie pour un gène délétère récessif.

C'est pourquoi des plateformes spécifiques ont été récemment mises en place, par le Wellcome Trust Sanger Institute (www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/), l'European Cytogenetics Association (www.ecaruca.net/) dont le but est de rassembler les données de cytogénétique moléculaire corrélées aux informations cliniques qui leur sont associées. Ces plateformes fourniront les bases indispensables à la compréhension de ces variations génomiques de grande taille et de leur rôle dans la pathologie constitutionnelle.

Outre l'aspect diagnostique, cette technologie a aussi contribué à la caractérisation clinique et moléculaire de différents syndromes associés à une microdélétion ou une microduplication [9,26]. La définition d'une région critique de 5 Mb a été obtenue en 18q22.3-18q23 pour l'atrésie congénitale des conduits auditifs externes [27]. Quatre microremaniements récurrents de la région 17p11-17p12 associés respectivement à la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1 A, la neuropathie par hypersensibilité à la pression, le syndrome de Smith-Magenis et le syndrome dup(17)(p11.2p11.2) ont été cartographiés précisément [28]. Des puces ont été développées afin de mieux cerner les corrélations génotype-phénotype de certains syndromes microdélétionnels telle la délétion 1p36 [29]. La composition génomique de chromosomes marqueurs a pu être élucidée [30].

L'hybridation génomique comparative en microréseaux a servi de fil d'Ariane dans l'identification de gènes candidats

de certaines pathologies. La mise en évidence d'une microdélétion en 8q12 chez deux patients atteints du syndrome CHARGE (syndrome associant colobome, anomalie cardiaque, atrésie des choanes, retard de croissance, anomalie génitale et anomalie des oreilles) a conduit à déterminer le gène *CHD7* comme responsable de cette affection [31]. De même dans la quête des gènes des retards mentaux non syndromiques liés au chromosome X, le gène *ZNF674* a été découvert grâce à la mise en évidence d'une délétion de 1 Mb en Xp11 à l'aide d'une puce constituée de BACs spécifiques de l'X [32].

La mise en évidence d'une mosaïque d'anomalie chromosomique semble accessible à cette technologie comme cela vient d'être démontré à partir d'une puce BAC de 1 Mb sur un taux aussi faible de 7 % de cellules avec une monosomie 7, situation qui n'a pas été détectée par le caryotype [33].

5. Les limites de la technique

Les nombreuses publications ont largement fait état de l'efficacité diagnostique de l'hybridation génomique comparative sur microréseau d'ADN. Il existe toutefois des limites dans cette efficacité mais elles doivent être relativisées si l'on considère les techniques dont nous disposons actuellement pour détecter les anomalies chromosomiques.

Assurément en premier lieu, les remaniements de structure équilibrés ne seront pas reconnus par cette approche purement quantitative. Ainsi la mise en évidence d'une anomalie déséquilibrée et de survenue de novo chez un enfant nécessitera une analyse cytogénétique parentale pour chercher un éventuel remaniement de structure équilibré. Cette analyse fera appel le plus souvent à une technique FISH sur métaphases à l'aide de sondes spécifiques afin d'identifier une translocation, une inversion ou une insertion, anomalies à risque quant à la récurrence d'un déséquilibre ultérieur dans la descendance du couple mais aussi de ses apparentés.

De même, bien que plus rares, les remaniements de structure équilibrés à l'origine d'une pathologie de point de cassure, par interruption de la structure d'un gène ou de sa régulation par effet de position, ne seront pas diagnostiqués par la puce. Ces situations devraient être guidées par la pratique au préalable d'un caryotype.

Une anomalie de la ploïdie (telle une triploïdie) n'est pas non plus identifiable car les échantillons test et témoin contiennent la même proportion de lot haploïde par quantité d'ADN hybridée.

Finalement, il demeure la limite quant à l'interprétation diagnostique des nombreuses VNC décrits précédemment. Seule la collecte des données clinicobiologiques sur de grandes séries internationales devraient nous éclairer sur le caractère pathogène de certaines de ces VNC.

6. Nouvel outil diagnostique en utilisation clinique

La technologie des puces à ADN appliquée au diagnostic des aneusomies est une approche innovante qui a fait ses preuves, comme en témoignent les publications de la littérature, mais encore réservée à certains centres qui disposent d'une pla-

teforme technique adaptée avec le plus souvent le soutien logistique en termes de fabrication de la puce et d'interprétation des données statistiques issues des résultats d'hybridation. Il existe aussi des puces commercialisées depuis quelques années qui sont mises à disposition des laboratoires de cytogénétique. Il est fondamental de pouvoir connaître la constitution précise de la puce s'agissant des cibles déposées. Ainsi la sélection des clones BAC/PAC doit être drastique avec une étude préalable par FISH pour vérifier la cartographie de chaque cible, unique sans hybridation croisée sur d'autres sites du génome. La liste des clones doit être connue pour bien appréhender la résolution de la puce. Dans la logique d'une utilisation à titre diagnostique, les cibles doivent correspondre aux régions dont le déséquilibre est responsable de pathologies. Chaque région cible devrait être couverte par plusieurs clones, au mieux chevauchants, et encadrés par des clones flanquants témoins pour éviter les risques de faux négatifs et de faux positifs. Pour les mêmes raisons, chaque clone devrait être déposé en trois exemplaires et de façon aléatoire sur la puce. Actuellement, l'interprétation des résultats doit être appréciée à l'aide d'une technique de marquage inverse entre l'ADN test et l'ADN témoin pour éviter les variations inhérentes aux conditions d'hybridation sur la cible. Il est aussi indispensable de nos jours de confirmer les résultats (délétion, duplication) de l'hybridation génomique comparative en microréseau par une technique alternative, FISH ou une technique moléculaire quantitative. Enfin comme cela a été évoqué précédemment, l'étude parentale est obligatoire pour le diagnostic et le conseil génétique ultérieur. Comme toute approche innovante dans le domaine du diagnostic médical, une période d'évaluation sera donc nécessaire notamment dans le choix éclairé des cibles à déposer sur la puce. Cela s'appliquera tout particulièrement dans l'optique avancée d'une utilisation en diagnostic prénatal [34].

7. Conclusion

L'activité médicale de diagnostic cytogénétique va bénéficier dans les années à venir d'un outil très performant pour dépister les déséquilibres génomiques. Cette révolution technologique doit être l'occasion de repenser l'approche diagnostique des anomalies chromosomiques dans un contexte clinique et biologique. Comment s'organisera, en pathologie constitutionnelle, l'exploration cytogénétique des patients face à cette nouvelle technologie ? Quelle sera la stratégie à proposer dans le choix des techniques d'analyse chromosomique ? Le choix s'orientera-t-il vers l'utilisation d'emblée d'une puce à ADN ? S'il est encore trop tôt pour répondre à cette nouvelle situation, il ne faudra pas perdre de vue qu'au-delà de l'identification d'un déséquilibre chromosomique, il existe un mécanisme sous-jacent dont l'exploration pourra faire appel à d'autres approches qu'une puce, aussi sophistiquée soit-elle.

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du PHRC régional de Nancy 2002, au programme de soutien des

innovations diagnostiques et thérapeutiques coûteuses 2004 du Ministère de la Santé. Les auteurs remercient de leurs précieux conseils pour la mise en place de la technologie des puces à ADN, Joris Vermeesch, Paul Van Hummelen et Marijke Bau-ters du Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Leuven, Belgique

Références

- [1] Trask BJ. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 2002;3:769–78.
- [2] Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Berlin: Walter de Gruyter; 2001 (2nd ed.).
- [3] Phelan MC, Crawford EC, Bealer DM. Mental retardation in South Carolina. In: Saul RA, Phelan MC, editors. *Proceedings of the Greenwood Genetic Center*. Greenwood, SC: Greenwood Genetic Center; 1998. p. 45–60.
- [4] Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 2005;6:782–92.
- [5] Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosome rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 1995;9:132–40.
- [6] Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merks GF, Knoers NV, Kets M, et al. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet* 2004;41:892–9.
- [7] Stankeiwicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002;18:74–82.
- [8] Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001;29:263–4.
- [9] Mantripragada K, Buckley PG, Diaz de Stahl T, Dumanski JP. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet* 2004;20:87–94.
- [10] Schoumans J, Anderlid BM, Blennow E, Teh BT, Nordenskjöld M. The performance of CGH array for the detection of cryptic constitutional chromosome imbalances. *J Med Genet* 2004;41:198–202.
- [11] Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12963–8.
- [12] Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003;73:1261–70.
- [13] Greshock J, Naylor TL, Margolin A, Diskin S, Cleaver SH, Futreal PA, et al. 1-Mb resolution arraybased comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res* 2004;14:179–87.
- [14] Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, et al. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 2004;14:287–95.
- [15] Slater HR, Bailey DK, Ren H, Cao M, Bell K, Nasioulas S, et al. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. *Am J Hum Genet* 2005;5:709–26.
- [16] Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004;64:3060–71.
- [17] Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cauwels C, Aguirre AJ, et al. High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2004;64:4744–8.
- [18] Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004;41:241–8.
- [19] Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals : clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006;43:180–6.
- [20] Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999;354:1676–81.
- [21] de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* 2005;77:606–16.
- [22] Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004;36:949–51.
- [23] Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004;305:525–8.
- [24] Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 2005;77:78–88.
- [25] Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, et al. Microduplication and triplication of 22q11.2 : a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;76:865–76.
- [26] Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet* 2004;75:267–81.
- [27] Veltman JA, Jonkers Y, Nuijten I, Janssen I, van der Vliet W, Huys E, et al. van Ravenswaaij-Arts CM Definition of a critical region on chromosome 18 for congenital aural atresia by arrayCGH. *Am J Hum Genet* 2003;72:1578–84.
- [28] Shaw CJ, Shaw CA, Yu W, Stankiewicz P, White LD, Beaudet AL, et al. Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders. *J Med Genet* 2004;41:113–9.
- [29] Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, et al. Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 2003;12:2145–52.
- [30] Bonnet C, Zix C, Gregoire MJ, Brochet K, Duc M, Rousselet F, Philippe C, Jonveaux P. Characterization of mosaic supernumerary ring chromosomes by array-CGH: Segmental aneusomy for proximal 4q in a child with tall stature and obesity. *Am J Med Genet A* 2006;140:233–7.
- [31] Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 2004;36:955–7.
- [32] Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L, et al. ZNF674: a new Kruppel-associated Box-containing Zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006;78:265–78.
- [33] Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalances in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of the literature. *J Med Genet* 2006; (Feb 20, Epub ahead of print).
- [34] Check E. Fetal genetic testing: screen test. *Nature* 2005;438:733–4.

Délétion subtélomérique 20q13.33

Sommaire

2.1	Le retard mental	29
2.1.1	Définition et fréquence	29
2.1.2	Etiologies	30
2.2	Patiente 1	30
2.2.1	Clinique	30
2.2.2	Examens complémentaires cytogénétiques	31
2.3	Patiente 2	31
2.3.1	Clinique	31
2.3.2	Examens complémentaires cytogénétiques	32
2.4	Cartographie de la délétion chez les deux patientes	33
2.4.1	Patiente 1	33
2.4.2	Patiente 2	33
2.5	Discussion	33
2.5.1	Délétions terminales 20q décrites dans la littérature	33
2.5.2	Corrélations génotype-phénotype	36

Cette étude repose sur l'observation de deux patientes porteuses d'une délétion subtélomérique de la région 20q13.33, présentant certes toutes deux un retard mental, mais de sévérité différente avec des troubles associés variables. La cartographie précise de ces déséquilibres apporte ici des informations indispensables à la compréhension des relations génotype-phénotype en pointant les gènes responsables des troubles plus sévères de la patiente 2.

Ces études sont rendues possibles par un travail collaboratif qui permet, à partir de cohortes de patients plus importantes, de colliger des cas similaires ou présentant des aberrations chromosomiques semblables afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques à l'origine d'un phénotype donné.

2.1 Le retard mental

2.1.1 Définition et fréquence

Le retard mental a été défini par l'American Association on Mental Retardation (1992) comme une altération des fonctions cognitives et adaptatives observée chez l'enfant. Il touche 3% de la population générale [Cans 1999], [Des Portes 2002] : le

retard mental léger (quotient intellectuel (QI) de 50 à 70) qui survient avec une incidence de 2 à 3% est 7 à 10 fois plus fréquent que le retard mental modéré (QI de 35 à 50) ou sévère (QI de 25 à 35) retrouvés avec une fréquence de 3 à 4 pour mille [Schaefer 1992].

2.1.2 Etiologies

Si les étiologies sont multiples, il faut noter la part importante des anomalies chromosomiques, estimée entre 4 et 34% (en moyenne 16,1% soit 3906/24245 individus) [Xu 2003]. Parmi celles-ci, la trisomie 21 est la plus fréquente des aneuploïdies (9,2%) et parmi les aneusomies segmentaires prédominent la microdélétion 22q11.2 (2,4%), le syndrome de William-Beuren (1,3%) et la monosomie 1p36 (0,6%). Le syndrome de l’X fragile, anomalie monogénique, est quant à lui responsable de 1,2% des cas de retards mentaux, d’après une étude de [Rauch 2006] portant sur une cohorte de 600 patients atteints de retard mental et/ou anomalies congénitales multiples.

Les techniques de cytogénétique conventionnelle, offrant une résolution de 5 à 10Mb, apporte un diagnostic dans 4 à 10% des cas [Schinzel 2001]. L’introduction de techniques complémentaires telles que la FISH ou la MLPA (Multiplex dependant probe amplification) ont conduit à la détection de réarrangements chromosomiques cryptiques, touchant en particulier les régions subtélomériques, dans 5 à 10% des cas de retard mental idiopathique et d’anomalies congénitales [Flint 1995], [Knight 1997], [Knight 1999], [De Vries 2003], [Koolen 2004], [Monfort 2006]. Par la suite, l’array-CGH a permis la caractérisation de déséquilibres génomiques quantitatifs (variations de nombre de copies ou CNV) à l’échelle pangénomique avec une résolution de l’ordre de quelques kb et a révélé des aneusomies segmentaires dans 10 à 25% des cas [Menten 2006], [Shaffer 2006], [Stankiewicz 2007]. La mise en place de cette technique et son utilisation sur des cohortes importantes de patients a abouti à la caractérisation de nouveaux syndromes microdélétionnels [Slavotinek 2008].

2.2 Patiente 1

2.2.1 Clinique

Cette patiente a été suivie par le Dr Annick TOUTAIN (CHU de Tours). Elle est la seule enfant d’un couple non apparenté, sans antécédents familiaux de retard mental. Née à 38 semaines d’aménorrhée par césarienne au terme d’une grossesse sans particularité, l’examen néonatal est normal (poids : 2840g, taille : 48,5cm, périmètre crânien (PC) : 33cm). Elle a présenté un retard des acquisitions motrices puisque la station assise est acquise à 13 mois et la marche à 19 mois. En parallèle, le développement du langage est également retardé. Un nystagmus est apparu à l’âge de 10 mois. A 12 mois, elle a présenté une scoliose et une malposition du pied en varus ayant nécessité une prise en charge orthopédique.

A 7 ans et 10 mois, elle présente un retard mental léger avec des difficultés de mé-

morisation et des troubles de la motricité fine. Le retard de langage persiste avec un niveau syntaxique insuffisant pour l'âge et des déformations phonologiques. Sa croissance staturo-pondérale est marquée par un PC à 48,8cm (-2,3DS), la taille (124,5cm, +0,3DS) et le poids (23kg, -0,5DS) étant par ailleurs dans les limites de la normale, sa silhouette est longiligne. Sur le plan de sa morphologie crânio-faciale, on note une microcéphalie, une brachycéphalie, une saillie de la suture métopique, un léger prognathisme, une bouche à coins tombants, une antéversion nasale, des fentes palpébrales légèrement obliques en haut et en dehors avec un léger hypertélorisme. Elle présente par ailleurs une myopie.

L'IRM cérébrale s'est révélée normale, ainsi que l'audiogramme, l'électroencéphalogramme et les tests fonctionnels visuels (électrorétinogramme et potentiels évoqués visuels).

2.2.2 Examens complémentaires cytogénétiques

Devant ce tableau clinique, un caryotype a été réalisé : il n'a pas montré de remaniement à une résolution de 550 bandes. Secondairement, la FISH des régions subtélomériques à l'aide du kit Total Vision Multi-color FISH probe panel (Vysis) a révélé une **délétion subtélomérique des bras longs du chromosome 20**. La FISH réalisée chez les parents avec une sonde télomérique 20q (Vysis) ne montre pas de remaniement de cette région : ce déséquilibre est donc survenu *de novo* chez cette patiente.

2.3 Patiente 2

2.3.1 Clinique

Cette patiente, suivie par le Pr Bruno Leheup (CHU de Nancy), est la première enfant d'un couple non consanguin (seconde enfant de la mère et première enfant du père). Elle est née à 38 semaines d'aménorrhée au terme d'une grossesse sans particularité. A la naissance, la taille est normale, on note un périmètre crânien à -1,3DS. Après une adaptation néonatale médiocre, elle a présenté une détresse respiratoire avec cyanose refractaire malgré la mise sous ventilation artificielle. Ceci a conduit à porter le diagnostic de transposition des gros vaisseaux associée à une communication inter-auriculaire de type sinus coronaire, corrigée chirurgicalement à l'âge de 2 mois. Par ailleurs, elle a présenté des convulsions non fébriles (mouvements tonico-cloniques concernant essentiellement l'hémiface et le membre supérieur droit) à deux mois de vie. L'électroencéphalogramme confirme le diagnostic clinique de crises épileptiques subintrantes de type central droit. A 10 mois, l'IRM cérébrale montre un corps calleux fin.

Des troubles autistiques sont apparus précocement avec un mauvais contact visuel, des troubles relationnels et l'apparition de stéréotypies des mains à 2 ans. Sur le plan morphologique, sont notés une trigonocéphalie, une rétraction bitemporale, un épicanthus gauche, un léger hypertélorisme. Elle présente un retard de développe-

ment psychomoteur : la tenue assise a été acquise à 21 mois et la marche à 3 ans et 3 mois. Le langage est absent.

2.3.2 Examens complémentaires cytogénétiques

Le **caryotype** réalisé dans un premier temps s'est révélé normal (résolution : 600 bandes).

L'ensemble des données cliniques ont amené la recherche de syndromes microdélétionnels par **FISH ciblés** : ainsi aucune microdélétion n'a été retrouvée en 22q11 au locus du syndrome de DiGeorge, les microdélétions en 4p (syndrome de Wolf- Hirschhorn) ainsi qu'en 17p11.2 (syndrome de Smith Magenis) ont été exclues. Le diagnostic moléculaire du syndrome d'Angelman par étude du profil de méthylation dans la région 15q11-q13 montre un profil de méthylation normal avec présence de l'allèle maternel, la recherche d'un syndrome de Rett par recherche de mutation du gène *MECP2* s'est révélée quant à elle négative.

L'exploration de l'ensemble du génome a alors été entreprise à l'aide d'une technique d'**array-CGH** avec la puce **Genosystem 1MB** (Spectral Genomics). L'hybridation en flip-flop de l'ADN de la patiente contre un ADN témoin a mis en évidence une **délétion de la région 20qter** : 4 BAC de cette puce sont délétés (RP5-1005F21, RP4-583P15, AL158091 et AL121581), le BAC proximal non délété est RP5-1107C24 (figures 2.1 et 2.2). La distance entre le BAC proximal non délété et le premier BAC délété définit l'intervalle d'incertitude dans lequel se situe le point de cassure : il est de 114kb.

Cette anomalie a été confirmée par la mise en œuvre d'une technique de FISH avec les sondes subtélomériques telvisyon (Vysis) 20p (locus 20PTL18) et 20q (locus 20QTEL14).

Cette délétion s'est révélée **de novo** après contrôle de la région par FISH chez les parents à l'aide de ces mêmes sondes.

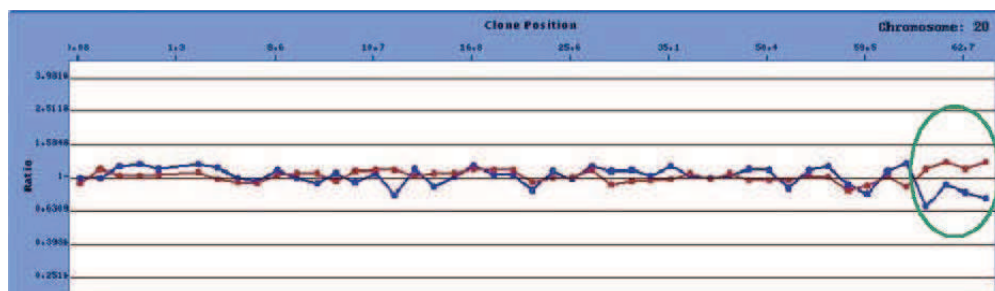


FIG. 2.1 – Délétion 20q13.33 (patiente 2) : array-CGH (Genosystem 1MB) : ratio de fluorescence cyanine5/cyanine3 pour les BAC hybridés sur le chromosome 20. En rouge : hybridation de l'ADN de la patiente 2 marqué par la cyanine 3, en bleu : hybridation de l'ADN de la patiente marqué par la cyanine 5. Les 4 BAC délétés en 20qter sont entourés.

2.4 Cartographie de la délétion chez les deux patientes

Afin de borner plus précisément les délétions 20q décelées chez ces deux patientes, une étude par **FISH** a été entreprise à l'aide de 12 BAC localisés dans cette région, sélectionnés sur le site de l'UCSC¹ (University of California at Santa Cruz) et Ensembl², hybridés sur les chromosomes métaphasiques des patientes.

2.4.1 Patiente 1

La borne proximale de la délétion est localisée entre les BAC RP11-261N11 (non délété) et RP11-365O20 (délété), le point de cassure se situant dans le gène *KCNQ2*. Sa taille est donc de **1,45Mb**, **34 gènes** sont en déséquilibre.

2.4.2 Patiente 2

La borne proximale de la délétion se situe entre les BAC RP11-305P22 (non délété) et RP11-402J8 (délété) : la taille de celle-ci est donc de **1,83Mb**, **40 gènes** sont en déséquilibre.

Parmi les gènes compris dans la région délétée commune, on peut noter le gène *KCNQ2*, responsable d'une susceptibilité à l'épilepsie. La position des sondes BAC ainsi que les gènes délétés chez les 2 patientes sont représentés sur la figure 2.2. Cette région délétée ne correspond pas à un polymorphisme de nombre de copies, après contrôle sur le site Database of genomic variants.

Dans un second temps, la cartographie de la délétion 20qter de la patiente 2 a été confirmée par array-CGH à l'aide d'une puce à oligonucléotides 44K (Agilent) : 46 sondes en déséquilibre délimitent une délétion d'une taille maximale de 1,89Mb, incluant les mêmes gènes que ceux retrouvés grâce à la FISH (figure 2.3) Il est à noter que l'évolution technologique a été telle ces dernières années, notamment en ce qui concerne la couverture du génome humain et la résolution (actuellement de l'ordre de quelques kb), que cette technique a supplanté la FISH pour l'établissement des bornes des déséquilibres quantitatifs : un résultat comparable voire plus précis est ainsi obtenu en une seule manipulation.

2.5 Discussion

2.5.1 Délétions terminales 20q décrites dans la littérature

Une délétion terminale isolée du bras long du chromosome 20 a été rapportée chez 7 autres patients jusqu'à présent. Cependant, dans certains cas, les bornes ne sont pas bien définies. Cette étude a été la première à décrire une délétion 20q13.33 avec des bornes précises, permettant ainsi une meilleure connaissance des gènes

¹<http://genome.ucsc.edu>

²<http://www.ensembl.org>

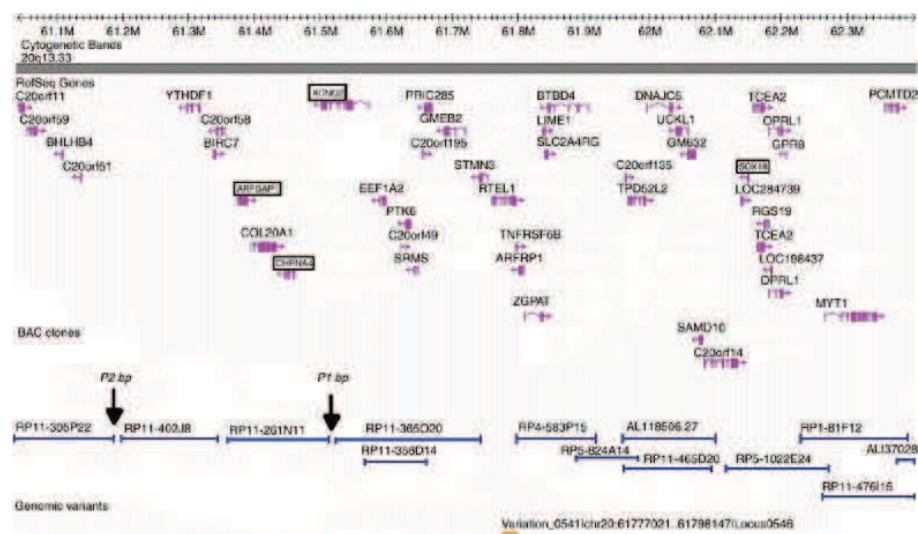


FIG. 2.2 – Cartographie de la région 20q13.33 : les bornes proximales des délétions sont indiquées par les flèches pour les patientes 1 (P1bp) et 2 (P2bp). Les gènes pour lesquels une corrélation génotype-phénotype est discutée sont encadrés. D’après UCSC (construction génomique hg18, mars 2006) et database of genomic variants

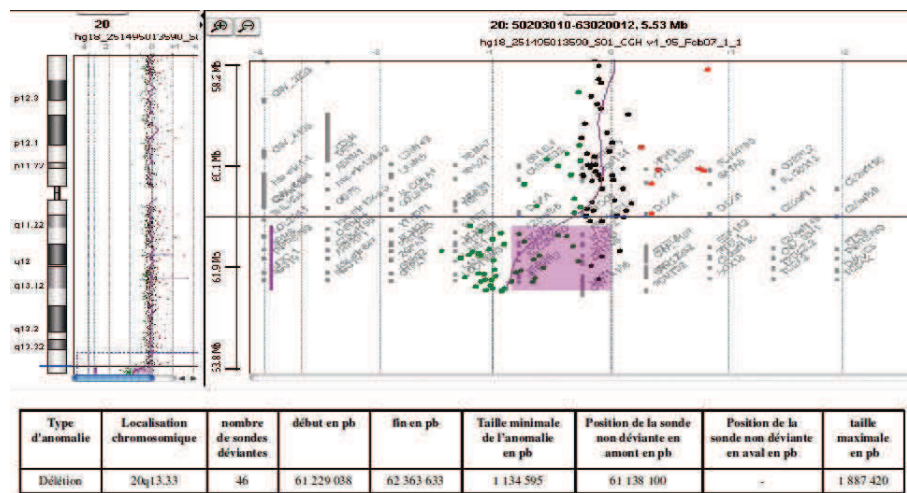


FIG. 2.3 – Délétion 20q13.33 : array-CGH (44K, Agilent) : hybridation de l’ADN de la patiente 2 marqué par la cyanine 5 contre un ADN témoin marqué par la cyanine 3. Le rectangle violet délimite la région déléetée. La ligne continue indique la moyenne des ratios cy5/cy3 en log2 (centrée sur 0 et déviée vers les valeurs négatives à l’endroit de la délétion). Chaque point correspond à une sonde oligonucléotidique (vert : délétion, rouge : amplification, noir : absence de déséquilibre). Le tableau indique les bornes ainsi que les tailles minimale et maximale de la délétion.

impliqués dans les troubles observés et une corrélation génotype-phénotype.

Une délétion terminale de plus grande taille (20q13qter) a été associée à une épilepsie sévère, une dysmorphie faciale et des malformations des extrémités [Fraisie 1981].

[Roberts 2004] décrivent le cas d'un patient de 9 ans avec un retard de développement sans épilepsie. La tenue assise a été acquise à 8 mois, la marche à 15 mois. Un retard de langage est noté (premiers mots à 3 ans et phrases courtes à 5 ans). Sur le plan morphologique, il présente des fentes palpébrales orientées vers le haut, des sourcils arqués, un nez bulbeux, un philtrum court et une lèvre supérieure fine.

Deux autres délétions 20qter *de novo* ont été décrites, d'une part chez un garçon de 11 ans avec anomalies congénitales multiples, et d'autre part chez un second patient de 7 ans présentant un retard mental [Ravnan 2006].

Aucune indication n'est donnée quant à aux bornes précises des délétions mises en évidence par FISH à l'aide de sondes subtlomériques dans ces 2 études.

[Béna 2007] rapportent le cas d'une enfant de 4 ans sans retard moteur ni signe évident de dysmorphie mais dont le motif de consultation était un retard de langage (3 mots à 4 ans, phrases simples à 6 ans et 8 mois). Elle souffre en outre d'un strabisme convergent et présente une hyperlaxité des articulations et des pieds plats. Une délétion 20qter de 1,1 à 1,6Mb incluant les gènes *CHRNA4* et *KCNQ2* a été mise en évidence.

En outre, une délétion *de novo* d'une taille identique à celle de la patiente 2, chez un patient présentant un retard mental, une hypotonie, une dyspraxie et une apraxie de la marche, une épilepsie et des caractéristiques morphologiques associant des fentes palpébrales obliques et en haut et un nez large a été rapportée dans la base de données DECIPHER³ (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources) (patient 2615).

Une délétion 20qter de plus petite taille a enfin été rapportée par [Kroepfl 2008] chez une patiente de 30 mois présentant un retard de développement sévère associant un retard moteur, un retard de langage, un faible contact visuel et un nystagmus.

D'autre part, un cas de délétion 20q de 1,6Mb mais associée à une duplication terminale 20p de 4,7Mb, liées à l'existence d'une inversion péricentrique familiale du chromosome 20, a été décrite chez une enfant de 7 ans souffrant d'épilepsie généralisée, d'ataxie modérée, de retard de développement et présentant des troubles du comportement à type d'auto-agressivité. La dysmorphie faciale est modérée,

³<https://decipher.sanger.ac.uk>

associant un front large, un hypertélorisme, un nez long, une lèvre supérieure fine et des oreilles dysplasiques [Ardalan 2005].

Les caractéristiques cliniques de ces patients sont résumées dans le tableau 2.1.

2.5.2 Corrélations génotype-phénotype

Les tailles des délétions 20qter décrites dans la littérature sont variables ainsi que la sévérité des phénotypes associés. Cependant, les délétions mises en évidence chez les patientes de cette étude ainsi que celles décrites dans la plupart des cas où les bornes sont déterminées emportent une quarantaine de gènes parmi lesquels 3 sont reliés à un phénotype particulier : *SOX18* (MIM 601618), *KCNQ2* (MIM 602235) et *CHRNA4* (MIM 118504). D'autre part, la comparaison des 2 patientes que nous avons étudiées montre que la taille des délétions diffèrent de 324kb : les gènes *CHRNA4* et *ARFGAP1* (MIM 608377) sont inclus dans cet intervalle. Ces gènes, de par leur fonction, pourraient être considérés comme étant responsables des différences phénotypiques entre ces 2 enfants.

Curieusement, la plus petite délétion de cette région, rapportée par [Kroepfl 2008], ne contient que 2 gènes, *MYT1* et *PCMTD2*, mais engendre un phénotype plus sévère que ceux décrits chez la patiente 1 de cette étude et celle décrite par [Béna 2007]. L'épilepsie est retrouvée chez la plupart des patients avec une délétion des gènes *KCNQ2* et *CHRNA4*, laissant supposer que l'haploinsuffisance de ces gènes, en particulier du second, est bien en cause dans cette affection. Seule la patiente décrite par [Béna 2007] ne souffre pas d'épilepsie, cependant celle-ci pourrait être de survenue plus tardive.

2.5.2.1 *KCNQ2*

Ce gène code une sous-unité d'un canal potassique voltage dépendant qui joue un rôle important dans la **détermination du seuil d'excitabilité des neurones** ainsi que dans la réponse aux afférences synaptiques. Des mutations de *KCNQ2*, des délétions, des duplications et une insertion de 5pb ont été associées à des convulsions néonatales bénignes se caractérisant par des crises d'**épilepsie** survenant dès les premiers jours de vie et se résolvant spontanément dans la première année de vie dans la plupart des cas (MIM 121200). La transmission autosomique dominante, les troubles observés s'expliquent par un mécanisme d'haploinsuffisance.

Ce gène est délété chez les deux patientes de cette étude et celle décrite par [Béna 2007], cependant, seule la patiente 2 a présenté un épisode de convulsions non fébriles à l'âge de 2 mois. Cette **expressivité variable** est en effet l'une des caractéristiques des épilepsies causées par des mutations des canaux ioniques [Turnbull 2005].

Un modèle murin *Szt1* correspondant à une délétion de 300kb du chromosome 2 comprenant les gènes *Kcnq2*, *Arfgap1* et *Chrna4* à l'état hétérozygote est associé à une susceptibilité accrue à l'épilepsie, tout comme les mutants *Kcnq2* knock out,

confirmant l'implication de ce gène dans la susceptibilité à l'épilepsie [Yang 2003].

2.5.2.2 *CHRNA4*

Ce gène code la sous-unité $\alpha 4$ d'un récepteur nicotinique à l'acétylcholine, exprimé au niveau du cortex frontal, intervenant dans la transmission du signal synaptique. La liaison à ce neurotransmetteur entraîne un changement conformationnel de ce récepteur et l'ouverture d'un canal ionique transmembranaire. Une mutation faux-sens dans ce gène a été reliée à l'**épilepsie nocturne du lobe frontal** à transmission autosomique dominante (MIM 600513). Elle se caractérise par la survenue de crises motrices hyperkinétiques ou toniques, apparaissant dans l'enfance et persistant à l'âge adulte. Le diagnostic en est souvent difficile du fait de la symptomatologie nocturne. En outre, une mutation hétérozygote de ce gène (Ser252Leu) a été reliée à une épilepsie nocturne du lobe frontal associée à un retard mental léger à modéré dans une famille coréenne [Cho 2003].

2.5.2.3 *ARFGAP1*

Cette guanosine triphosphatase (GTPase) activant l'ADP rybosylation facteur 1 (ARF1) est associée au **trafic membranaire** au niveau de l'appareil de Golgi. Le transport vésiculaire entre en jeu dans l'homéostasie intra et extracellulaire de lipides et protéines. La formation des vésicules de transport est initiée par l'action de GTPases. ARF1, en particulier, est nécessaire à la biosynthèse des protéines chaperonnes (COPI I). ARFGAP1 induit l'hydrolyse d'ARF1, et par conséquent interviendrait dans la dissociation des protéines chaperonnes pour permettre la fusion des vésicules avec leur compartiment cible. Au vu de ces informations, ce gène est apparu comme un gène dont l'altération pourrait être en partie responsable du phénotype de la patiente 2. Cependant, des données récentes ne vont pas dans ce sens : le rôle d'ARFGAP1 dans la biosynthèse des protéines chaperonnes n'a pas été clairement établi *in vitro* et son inhibition par des SiARN (silencer ARN) ne semble pas avoir de conséquence phénotypique *in vivo* [Beck 2009]. De plus, une délétion incluant ce gène a été décelée chez 3 sujets contrôles/485 et 33/95 respectivement par [Jakobsson 2008] par array-CGH avec des sondes SNP et [Wong 2007] par array-CGH avec des sondes BAC.

2.5.2.4 *SOX18*

Des mutations dans le gène codant le facteur de transcription SRY-box18 ont été décrites dans 3 familles dont 2 consanguines et reliées à l'**hypotrichose-lymphoedème-télangiectasie** [Irrthum 2003], caractérisée par une hypotrichose avec absence de cils, des oedèmes lymphatiques des membres inférieurs ou des paupières et des anomalies des vaisseaux sanguins périphériques (MIM 607823). La transmission est autosomique dominante ou récessive. Cependant, aucun des patients avec une délétion 20qter comprenant ce gène ne présente ces symptômes,

suggérant que l'haploinsuffisance de ce gène n'est pas responsable de ce syndrome.

Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans la revue European Journal of Human Genetic :

Genotype-phenotype correlations to aid in the prognosis of individuals with uncommon 20q13.33 subtelomere deletions : a collaborative study on behalf of the « association des cytogénéticiens de langue française ».

Beri-Dexheimer M, Gregoire MJ, Toutain A, Brochet K, Briault S, Schaff JL, Leheup B, Jonveaux P.

Eur J Hum Genet 2007 Apr ; 15(4) : 446-52.

	a (Paganotto 1)	b (Paganotto 2)	c (Francis et al.)	d (Roberts et al.)	e (Andrékin et al.)	f (Béna et al.)	g (DECTYPIER 2013)	h (Knapik et al.)
anomalie cytogénétique	del(20)(q13.33)	del(20)(q13.33)	del(20)(q13)	del(20)(q13.33)	del(20)(q13.33)	del(20)(q13.33)	del(20)(q13.33)	del(20)(q13.33)
borne proximale de la délétion 20q (q10)	61 516 517pb	Entre 61 138 100 et 61 229 030pb			entre 60 8 et 61 300pb	61 240 74 640	Entre 62 209 440 et 62 301 671pb	
Classe <i>CHRNA4</i> et <i>ARFGAP1</i>	non délétés	délétés	ND	ND	délétés	délétés	délétés	non délétés
Âge	7 ans	8 ans	3 mois	9 ans	7 ans	8 ans	7 ans	30 mois
Retard de développement	léger	sévère	retard global majeur	léger	oui		Oui / hypotonie	sévère
Marche	19 mois	3 ans et 3 mois		15 mois				29 mois
Langage	anomalies de la phonation	absent		premiers mots à 3 ans	ND	3 ans à 4 ans / phrases simples à 6 ans		absent
Troubles du comportement		troubles autistiques			troubles psychiatriques / auto-agressivité			Contact visuel et interactions sociales faibles
Épilepsie	oui : 1 épisode	oui			oui	non	oui	
Neurologie	nystagmus	saccades irrégulières / saccades multiples			ataxie cérébelleuse		Dyspraxie / apraxie de la marche	nystagmus
Dysmorphie						non		
Céane	Microphtalmie / brachyophtalmie / saddle de la suture métopique	brachyophtalmie						
Front	constriction temporo-faciale	constriction temporo-faciale	prononcée		large			
Yeux	hypertériorité nasolacrariale / fortes palpébrales en haut et dehors	hypertériorité nasolacrariale / éperon nasolacrariale	éperon nasolacrariale	fortes palpébrales en haut et dehors	hypertériorité nasolacrariale		fortes palpébrales en haut et dehors	fortes palpébrales en haut et dehors
Nos	marques antérieures	marques antérieures	marques antérieures	bulbaux	long		large	
Bouche	lèvre supérieure fine	lèvre supérieure fine	lèvre supérieure fine	lèvre supérieure fine	lèvre supérieure fine			lèvre supérieure fine
oreilles	coches tombantes	coches tombantes	coches tombantes	bas implantées postérieures	anormales de l'axe	dysplasiques		
anomalies des membres et extrémités				clémodactylie des 5èmes doigts	hypertériorité des articulations			
Autres anomalies	prédisposition des gros vaisseaux / communication inter-aortique			anomalie unilatérale	strabisme			strabisme

TAB. 2.1 – Caractéristiques cliniques des patients avec une délétion terminale 20q.
ND : non documenté

ARTICLE

Genotype–phenotype correlations to aid in the prognosis of individuals with uncommon 20q13.33 subtelomere deletions: a collaborative study on behalf of the ‘association des Cytogénéticiens de langue Française’

Mylène Béri-Deixheimer¹, Marie-José Gregoire¹, Annick Toutain², Karène Brochet¹, Sylvain Briault², Jean-Luc Schaff³, Bruno Leheup⁴ and Philippe Jonveaux^{*,1}

¹Laboratoire de Génétique, EA 4002, CHU, Nancy-University, France; ²Service de Génétique, Hôpital Bretonneau, Tours, France; ³Service de neurologie, CHU, Nancy-University, France; ⁴Service de médecine infantile et génétique clinique, CHU, Nancy-University, France

The identification of subtelomeric rearrangements as a cause of mental retardation has made a considerable contribution to diagnosing patients with mental retardation. It is remarkable that for certain subtelomeric regions, deletions have hardly ever been reported so far. All the laboratories from the ‘Association des Cytogénéticiens de Langue Française’ were surveyed for cases where an abnormality of the subtelomere FISH analysis had been ascertained. Among 1511 cases referred owing to unexplained mental retardation, 115 (7.6%) patients showed a clinically significant subtelomeric abnormality. We report the clinical features and the molecular cytogenetic delineation of isolated *de novo* deletions on 20q13.33 in two cases. Detailed mapping was performed by micro-array CGH in one patient and confirmed by FISH in the two patients. We compare our data with the only three patients reported in the literature. Both patients shared a deleted region of approximately 1.33 Mb including 40 genes, with a 324 kb difference between the two patients. Haploinsufficiency for *CHRNA4* and *ARFGAP1* may have contributed towards a severe phenotype. In addition, the data in all patients suggest that haploinsufficiency for *SOX18* may not cause the hypotrichosis–lymphedema–telangiectasia syndrome, or causes milder disease. Our study gives important information by defining the size of imbalance and better predicting the phenotype. Two clinically distinct phenotypes may be drawn, a mild mental retardation or a more complex and severe phenotype, according to the presence or absence of the *CHRNA4* and *ARFGAP1* genes respectively.

European Journal of Human Genetics (2007) 15, 446–452. doi:10.1038/sj.ejhg.5201784; published online 7 February 2007

Keywords: 20q subtelomere deletion; *CHRNA4*; *KCNQ2*

*Correspondence: Dr P Jonveaux, Laboratoire de génétique, EA 4002, Nancy-University, CHU Nancy-Braboïs, Rue du Morvan, 54511 Vandœuvre les Nancy, France.

Tel: +33 3 83 15 37 71; Fax: +33 3 83 15 37 72;

E-mail: p.jonveaux@chu-nancy.fr

Received 5 October 2006; revised 7 December 2006; accepted 20 December 2006; published online 7 February 2007

Introduction

Cryptic subtelomeric rearrangements are estimated to account for approximately 5% of mental retardation (MR)/malformation syndromes, with a higher deletion rate in those with moderate to severe MR than in mild MR.¹ Although in some subtelomeric rearrangements, the phenotype is well described, there are many cryptic

rearrangements for which there is little or no phenotypic information complicating the diagnostic and prognostic implications. Therefore, further studies are needed to delineate genotype–phenotype correlations for each human subtelomeric region. All the laboratories from the ‘Association des Cytogénéticiens de Langue Française’ (<http://www.eacrf.org>) offering an appropriate cytogenetic service were surveyed over a 10-year period (1994–2004) for cases where a submicroscopic telomeric abnormality had been ascertained. Among 1511 cases referred owing to unexplained MR, 115 (7.6%) patients showed a clinically significant subtelomeric abnormality. We report the phenotypic and the molecular cytogenetic characterization of two patients with uncommon isolated *de novo* subtelomeric 20q deletions. Detailed mapping was performed by microarray CGH in one patient and confirmed by FISH in the two patients. We compare our data with the only three previously reported cases in the literature. These findings are discussed with respect to the genes in the deleted region of chromosome 20q13.33.

Materials and methods

Patients

Patient 1 is the only child of unrelated parents, aged 35 (mother) and 34 (father). Family history was negative for congenital anomalies and/or MR. This girl was born at 38 weeks of gestation after an uneventful pregnancy and delivery. The birth weight, length and head circumference were normal. She sat at 13 months and walked at 19 months. At 7 years 10 months, she had mild psychomotor retardation associated with a nystagmus and her language abilities were mildly retarded with phonological abnormalities. A physical examination showed the length to be 124.5 cm (+0.3SD), weight 23 kg (–0.5SD) and head

circumference 48.8 cm (–2.3SD). Craniofacial dysmorphism included microcephaly, brachycephaly, prominent metopic suture, temporal narrowing, mild hypertelorism, upslanting palpebral fissures, anteverted nares, downturned corners of the mouth and a thin upper lip (Figure 1a). The neurological examination was normal. Audiogram, electroencephalogram (EEG), visual evoked potentials (VEP), electroretinogram (ERG), and a magnetic resonance imaging (MRI) brain were normal. Patient 1 had a normal 46,XX karyotype at 550-band resolution.

Patient 2 is the second child of a 29-year-old-mother without medical report in her family. She has been treated for recurrent depressive episodes with fluoxetine for several years. As soon as pregnancy was reported she was given citalopram. The girl is the first child of her 28-year-old-father. Family history was unremarkable. The pregnancy was reported as normal with delivery at term. Birth weight and length were normal. In the first hours of life, she experienced respiratory distress leading to the diagnosis of great vessels transposition. Full surgical correction was done at 2 weeks. At 2 months of age she suffered of an episode of convulsion without fever. The EEG was reported as abnormal (data not available). A brain MRI performed at the age of 10 months showed a thin corpus callosum. Autistic behaviours were reported early on, with poor eye contact contrasting with normal VEP. Smiling was first reported at the age of 4 months and the oral language was completely absent at the age of 28 months. At the age of 2 years, poor social relations were reported with stereotypies of the hands. Sleep was irregular with multiple nocturnal wake-up. She poorly reacted to noises and sounds without anomalies of auditory evoked responses. Motor milestones were also delayed: she sat at the age of 21 months and walked at 3 years 3 months. Craniofacial dysmorphism included trigonocephaly, temporal narrowing, mild

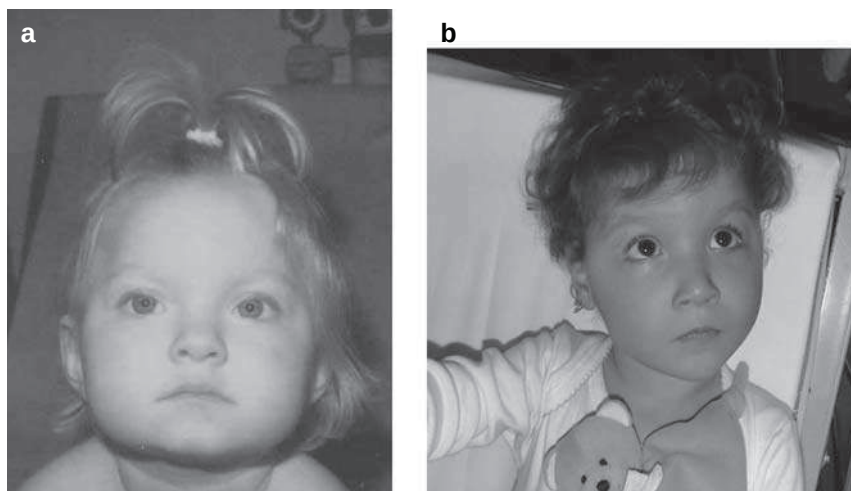


Figure 1 Facial appearance of patient 1 at age 3 years (a) and patient 2 at age 4 years (b). Written consents to publish these photographs were obtained from the parents of each child.

hypertelorism, and epicanthic folds (Figure 1b). Metabolic evaluation was reported as normal at the age of 2 years. High-resolution cytogenetic evaluation was normal (600 band level). FISH studies using different probes, that is, 17p11 (Smith–Magenis syndrome), 22q11 (DiGeorge syndrome), 4p16 (Wolf–Hirschhorn syndrome) were normal. Methylation pattern study at 15q11–13 was also normal just as the molecular evaluation at the *MECP2* locus.

Molecular cytogenetic investigations

Blood samples were obtained from patients and controls according to our institutional ethical committee and after appropriate informed consent. Among the two patients with submicroscopic 20qter deletion, subtelomeric regions were screened in patient 1 with the Total Vision FISH Probe panel (Vysis Inc., Downer's Groves, IL, USA) as instructed by the manufacturer. Array CGH analysis was performed in patient 2 using 1 Mb resolution human bacterial artificial chromosome (BAC) microarray, accord-

ing to the manufacturer's recommendations (Spectral Genomics, Inc., Houston, TX, USA). Patient and reference (normal female) blood sample genomic DNAs were each split in two samples for differential labelling with Cy3 and Cy5 labeled nucleotides (Amersham Biosciences, Orsay, France) according to standard DNA extraction and random priming protocols. The patient Cy3-labeled DNA was mixed with the Cy5-labeled reference DNA and the patient Cy5-labeled DNA was mixed with the Cy3-labeled reference DNA. Each mix was denatured, and applied to the slides. Slides were hybridised for 48 h, washed in 50% formamide, 2XSSC solutions at 45°C, and scanned on a GenePix 4000B Axon scanner. Images were analysed with SpectralWare software provided by spectral Genomics. Validation and characterisation of the observed chromosome imbalance was achieved by FISH analysis with probes obtained from the Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>) and selected according to their position on chromosome 20q13.33 according to publicly available

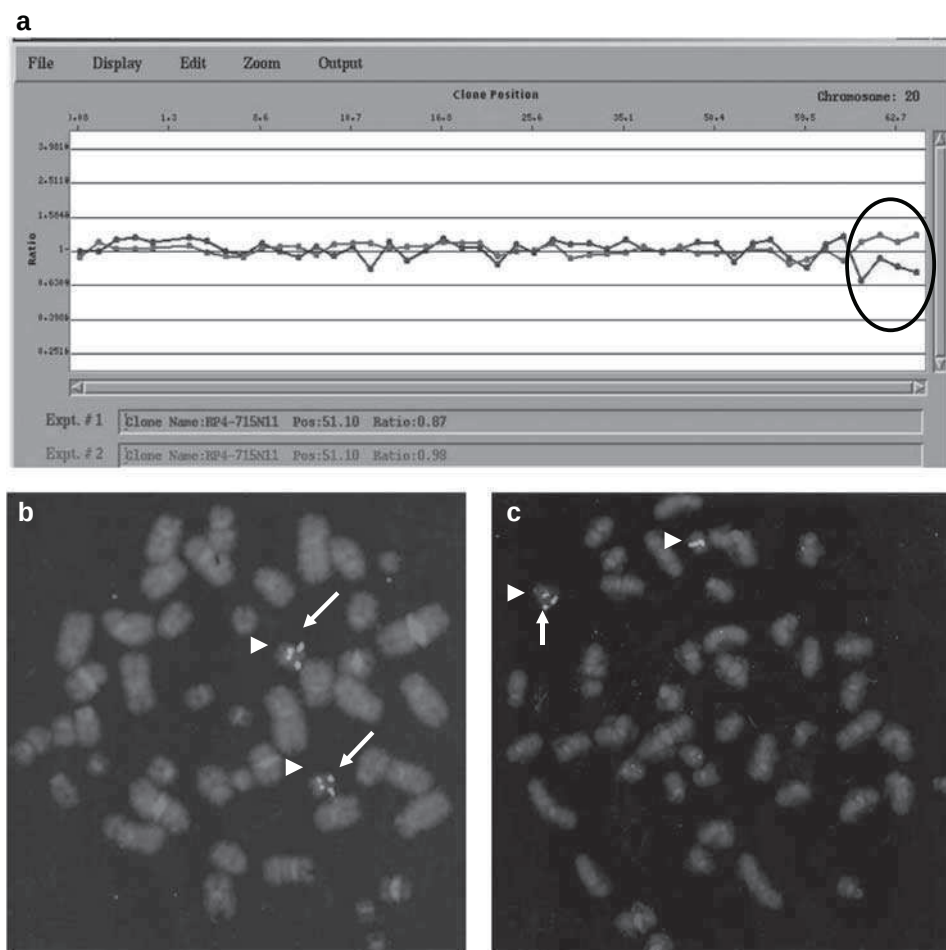


Figure 2 (a) Chromosome 20 ratio plot with deviations from the expected 1:1 ratio from clone RP4-583P15 to clone AL137028 (circled in black). FISH to metaphase chromosomes of patient 1 (b) and patient 2 (c) using the BAC RP11-261N11 probe containing *CHRNA4* and *ARFGAP1* genes (arrows) and a 20 centromeric control probe (Vysis) (arrowheads) showed the deletion of one signal of the BAC RP11-261N11 probe in patient 2 (c).

genome resources (NCBI Map Viewer: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Santa Cruz Human Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu>). BAC DNA was labelled with biotin by nick translation. The labelled probes were visualized with fluorescein isothiocyanate–avidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Results

Patient 1: subtelomeric screening with the Total Vysion FISH Probe panel revealed an isolated subtelomeric 20q deletion: 46, XX, ish del(20)(qter)(20QTEL14-)dn (not shown). Parental 20qter FISH studies revealed a normal pattern in both parents.

Patient 2: an array CGH analysis was performed with 1 Mb resolution human DNA microarrays as described previously.² Four probes identified as lost were RP4-583P15, AL11806.27, RP1-81F12 and AL137028 (Figure 2). Parental FISH study confirmed *de novo* 20q deletion.

To analyse the chromosome deletions at a higher resolution, BAC clones mapping within and immediately adjacent to the deleted segment were hybridized to metaphase and interphase nuclei from cultured peripheral leucocytes from the patients (Figure 3). Following BAC clones were used, from the centromere to the telomere,

RP11-325F17, RP5-885L7, RP11-305P22, RP11-402J8, RP11261-N11, RP11-365O20, RP11-358D14, RP4-583P15, RP5-824A14, RP11-465D20, RP6-1022E24 and RP11-476I15. Patient 1 breakpoint mapped between clone RP11-261N11 and RP11-365O20, whereas Patient 2 breakpoint mapped between clone RP11-305P22 and RP11-402J8. Both patients share a deleted region of approximately 1.33 Mb including 40 confirmed and predicted genes. In these two patients, the deletions differ in 324 kb encompassing five genes, *YTDF1*, *BIRC7*, *ARFGAP1*, *COL2A1* and *CHRNA4* (Figure 3). The RP-11261N11 probe containing *ARFGAP1* and *CHRNA4* genes was only deleted in patient 2 (Figure 2).

Discussion

To best our knowledge, only three patients with a pure deletion limited to the terminal segment of 20q have been reported in the literature but unfortunately without any accurate size (Table 1). A 9-year-old male had global developmental delay without seizures.³ He sat at 8 months, walked at 15 months, had first words at age 3, and began using short sentences at age 5. At age 7, cognitive testing placed him in the mentally retarded range. On physical examination, he had a frontal upsweep of the hair,

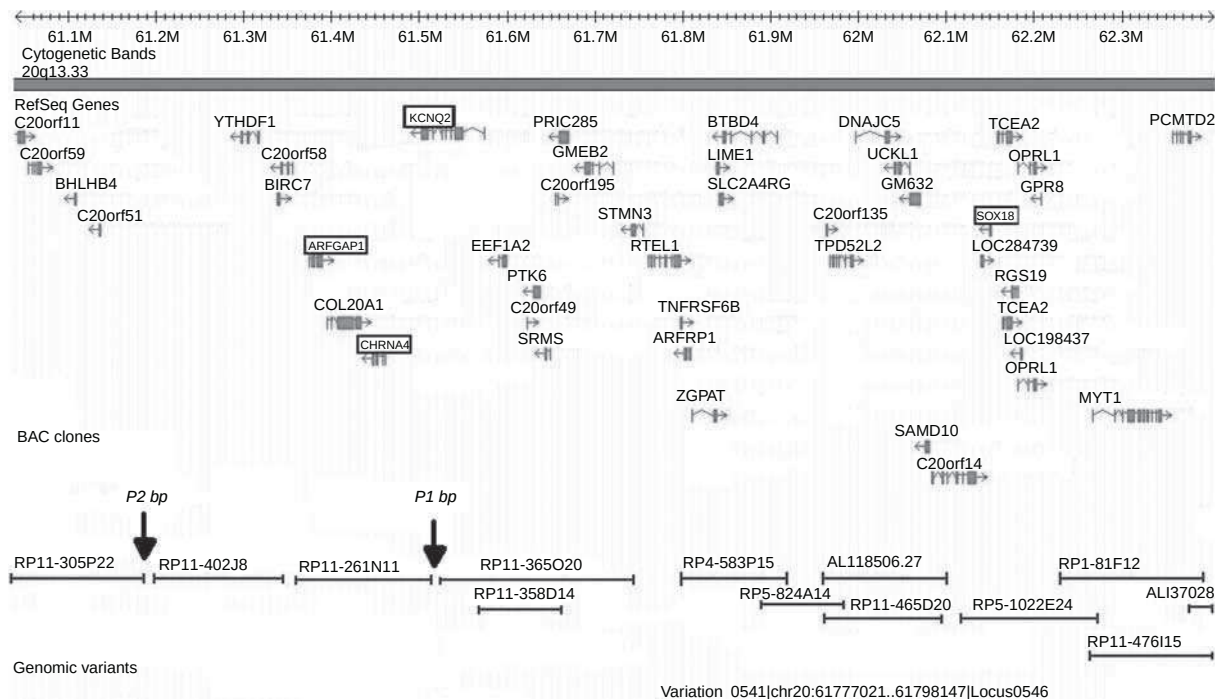


Figure 3 Map of the 20q13.33 region showing the relative position of Ref Seq genes, BAC clones and genomic variants. BAC clones RP4-583P15, AL118506.27, RP1-81F12 and AL137028 are present on Spectral Genomics microarrays. The position of the deletion breakpoint is indicated in patient 1 (P1bp) and patient 2 (P2bp). The drawing is based on the UCSC map, March 2006 release (<http://genome.cse.ucsc.edu/>), and the Database of Genomic variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

Table 1 Clinical features of affected individuals with chromosome 20q terminal deletions. No clinical data are available for the two patients reported by Ravnán *et al*⁴

	<i>Patient 1</i>	<i>Patient 2</i>	<i>Fraisse et al</i> ⁶	<i>Roberts et al</i> ³	<i>Ardalan et al</i> ⁵
Cytogenetic abnormality	del(20)(q13.33)	del(20)(q13.33)	del(20)(q13)	del(20)(q13.33)	Del(20)(q13.33) and dup(20)(p13) deleted
<i>CHRNA4</i> and <i>ARFGAP1</i> genes	Not deleted	deleted	NT	NT	
Age	7 year	4 year	3 month	9 year	7 year
Psychomotor and behavioural development	Mild global delay with phonological abnormalities Walked 19 month	Severe global delay Sat 21 mo Walked 3y 3 month Autistic behaviour	Major global delay with severe hypotonia	Mild mental retardation Walked 15 month First words 3 year	Severe mental retardation Aggressive and self-injurious behaviour Large forehead
Head	Microcephaly, brachycephaly, prominent metopic suture, temporal narrowing	Trigonocephaly Temporal narrowing	Prominent forehead		
Eyes	Mild hypertelorism Upslanting palpebral fissures	Mild hypertelorism Epicanthic folds	Slanting eyes Epicanthic folds	Upslanting palpebral fissures	Mild hypertelorism
Nose	Anteverted nostrils		Broad nasal bridge Anteverted nostrils	bulbous	Long prominent nose
Mouth	Down-turned corners Thin upper lip	Thin upper lip	Long upper lip Thick lower lip	Smooth short philtrum Thin upper lip	Short upper lip
Ears			Low set, malformed		Dysplastic
Neurology	Nystagmus	One episode of convulsion Irregular sleep with multiple nocturnal wake-up	Generalized tonic seizures		Generalized tonic seizures Mild ataxia

Abbreviation: NT, not tested.

up-slanting palpebral fissures, slightly arched eyebrows, bulbous nose, smooth short philtrum and a thin upper lip with a slight Cupid's bow. The deletion was identified by use of subtelomeric probes, but the probes used were not reported. Two other *de novo* 20qter deletions cases⁴ were reported using the Vysis Total Vision probe panel in a large study population, with only a clinical indication, that is, multiple congenital anomalies in a 11-year-old boy (case 142), and developmental delay and mental retardation in a 7-year-old boy (case 143). In addition, a more complex imbalance was reported in a 7-year-old girl⁵ carrying a 1.6 Mb deletion of the terminal region of 20q deletion with a 4.7 Mb duplication of the terminal segment of 20p inherited from a familial pericentric insertion of chromosome 20. She suffered generalized tonic seizures, and also had mild ataxia, psychomotor development delay, aggressive and self-injurious behaviour. There was a discrete facial dysmorphism with a large forehead, mild hypertelorism, long prominent nose, short upper lip and dysplastic ears. Finally, a larger terminal deletion (q13qter) was associated with severe seizures, facial dysmorphism and malformation of the extremities.⁶

The 1.33 Mb deleted region identified in our patients encompasses approximately 40 confirmed and predicted genes including three with known phenotype: *SOX18*, *KCNQ2* and *CHRNA4*. Different mutations in the voltage-gated potassium channel gene *KCNQ2* have been identified in the syndrome benign familial neonatal convulsions, a mild autosomal dominant epilepsy with incomplete penetrance (OMIM 121200). Our two patients have a deletion of the *KCNQ2* gene, but only patient 2, at 2 months of age, suffered of an episode of convulsions without fever. Variable expressivity is a common feature of epilepsy caused by ion channel mutations in human patients.⁷

Patient 2 deletion includes the genes *CHRNA4*, *ARFGAP1* and *KCNQ2*. Autistic behaviours were reported early on and particularly her sleep was irregular with multiple nocturnal wake-up. Mutations in the α -4 subunit of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene *CHRNA4* have been reported in autosomal-dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE; OMIM 6005 513), a syndrome whose clinical diagnosis is often very difficult because of the nocturnal manifestation of symptoms. Mental retardation has been associated with a heterozygous *CHRNA4* Ser252Leu mutation in a Korean kindred with ADNFLE.⁸

The consequences of a decrease in the ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1 gene (*ARFGAP1*) expression have not been characterized.⁹

A mouse model is provided by the *Stz1* mutation, a spontaneous 300 kb deletion on mouse chromosome 2 that includes *Kcnq2*, *Arfgap1* and *Chrna4*.¹⁰ Mice heterozygous for the *Stz1* mutation have increased susceptibility to seizures similar to that seen in *Kcnq2* null heterozygotes, whereas *Chrna4* null heterozygotes have not been reported

to be seizure-sensitive. Interestingly, the 20qter deletion described by Ardalan *et al*⁵ included the genes *KCNQ2*, *ARFGAP1* and *CHRNA4* in a patient with a seizure disorder. Haploinsufficiency for *CHRNA4* in addition to loss of *KCNQ2* and *ARFGAP1* may account for the more severe clinical features with seizures. Finally, mutations in the transcription factor gene *SOX18* has been shown in three families to underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis–lymphedema–telangiectasia.¹¹ The absence of these symptoms in our two patients (and in the four patients reported in the literature with pure terminal 20q deletion) suggests that haploinsufficiency for *SOX18* may not cause hypotrichosis–lymphedema–telangiectasia, or causes milder disease.

In summary, genotype–phenotype correlations have narrowed the critical interval for the clinical spectrum associated with 20q13.33 deletion. Two clinically distinct phenotypes may be drawn, a mild mental retardation without specific dysmorphism or a more complex and severe phenotype with behaviour problems and seizure disorders, according to the presence or absence of the *CHRNA4* and *ARFGAP1* genes, respectively. Terminal deletions of 20q seem to be a rare event. Actually, some deletions are simply not looked for in the right population because of the mild mental retardation. However, it also may indicate that the underlying DNA structure in 20q13.33 is less amenable to breakage. A more detailed phenotype description and molecular characterization of further patients with 20q13.33 deletion may help to confirm these data.

Acknowledgements

We thank the staff of all contributing French clinical cytogenetics laboratories for their time and effort in submitting data. We also thank to the patients and their family for their cooperation. This study was supported by a regional PHRC-Nancy.

References

- De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, Van Ravenswaaij-Arts C: Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; **40**: 385–398.
- Bonnet C, Zix C, Gregoire MJ *et al*: Characterization of mosaic supernumerary ring chromosomes by array-CGH: segmental aneusomy for proximal 4q in a child with tall stature and obesity. *Am J Med Genet* 2006; **140A**: 233–237.
- Roberts AE, Cox GF, Kimonis V, Lamb A, Irons M: Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature. *Am J Med Genet* 2003; **128A**: 352–363.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P *et al*: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2003; **43**: 478–489.
- Ardalan A, Prieur M, Choiset A, Turleau C, Goutieres F, Girard-Orgelet S: Intrachromosomal insertion mimicking a pericentric inversion: molecular cytogenetic characterization of a three break rearrangement of chromosome 20. *Am J Med Genet* 2005; **138A**: 288–293.

- 6 Fraisse J, Bertheas MF, Frere F, Laurus B, Rolland MO, Brizard CP: Partial monosomy 20q: a new syndrome. Regional assignment of the adenosine deaminase (ADA) locus on 20q13. *Ann Genet* 1981; **24**: 216–219.
- 7 Turnbull J, Lohi H, Meisler MH, Kearney JA, Minassian BA: Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 2491–2500.
- 8 Cho YW, Motamedi GK, Laufenberg I *et al*: A Korean kindred with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation. *Arch Neurol* 2003; **60**: 1625–1632.
- 9 Yang JS, Lee SY, Gao M *et al*: ARFGAP promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *J Cell Biol* 2002; **159**: 69–78.
- 10 Yang Y, Beyer BJ, Otto JF *et al*: Spontaneous deletion of epilepsy gene orthologous in a mutant mouse with a low eletroconvulsive threshold. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 975–984.
- 11 Irrthum A, Devriendt K, Chitayat D *et al*: Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 2003; **72**: 1470–1478.

Remaniements en 21q22

Sommaire

3.1	Anomalie plaquettaire familiale associée à une prédisposition aux leucémies aiguës myéloïdes (FPD/LAM)	41
3.2	Patient 1	42
3.2.1	Clinique	42
3.2.2	Examens complémentaires	42
3.3	Patiente 2	43
3.3.1	Clinique	43
3.3.2	Examens complémentaires	44
3.4	Gènes altérés et implication dans le phénotype observé . .	46
3.4.1	<i>RUNX1</i> et hémopathies	46
3.4.2	Gènes candidats au retard mental	49
3.5	Discussion	49
3.5.1	<i>RUNX1</i> et hémopathies	49
3.5.2	Délétion 21q22 et retard de développement : gènes candidats	51
3.5.3	Association thrombopénie/retard mental	54

Cette étude regroupe deux observations de thrombopénies pour lesquelles une haploinsuffisance du gène *RUNX1* a été mise en évidence. Le mécanisme responsable de celle-ci est cependant différent dans les deux cas : le premier patient est porteur d'une délétion intragénique à l'origine d'anomalies hématologiques alors que la seconde présente une délétion de 3,16Mb englobant ce gène et s'associant à un retard mental syndromique. Dans ce cas, la mise en évidence d'un déséquilibre génomique est le point de départ de la recherche de gènes candidats au retard mental.

3.1 Anomalie plaquettaire familiale associée à une prédisposition aux leucémies aiguës myéloïdes (FPD/LAM)

Le FPD/LAM (MIM 601399) est une pathologie autosomique dominante caractérisée par des anomalies de nombre et de fonction plaquettaires et un risque accru de développer un syndrome myélodysplasique ou une leucémie aiguë myéloïde (LAM). Il a été initialement relié à une mutation hétérozygote constitutionnelle du gène *RUNX1* [Song 1999]. Il existe actuellement 19 cas confirmés et rapportés dans

la littérature [Song 1999], [Buijs 2001], [Michaud 2002], [Ganly 2004], [Heller 2005], [Matheny 2007], [Kirito 2008], [Owen 2008]. Ces patients présentent généralement une tendance légère à modérée au saignement. Le principal risque réside cependant dans la survenue d'une LAM dont la fréquence est estimée à 35% [Ganly 2004]. Les mécanismes évoqués pour expliquer la pathologie sont soit une haploinsuffisance du gène, soit un effet dominant négatif [Michaud 2002], [Kirito 2008], [Matheny 2007].

3.2 Patient 1

3.2.1 Clinique

Ce patient a présenté un purpura ecchymotique à l'âge de 2 ans, sans autre antécédent de diathèse hémorragique. Par ailleurs, l'examen clinique est sans particularités. A l'âge de 6 ans, il a développé une **LAM** caractérisée par une moelle osseuse hypercellulaire et infiltrée par 20% de blastes immatures (CD34+, HLA-DR+) avec marqueurs myéloïdes (MPO+, CD13+, CD33+, CD117+) et des signes de myélodysplasie. Le caryotype médullaire réalisé à l'occasion de la découverte de l'hémopathie n'a pas révélé d'anomalie. Ce patient a été mis en rémission complète après chimiothérapie d'induction et allogreffe phéno-identique non apparentée de cellules souches hématopoïétiques.

3.2.2 Examens complémentaires

3.2.2.1 Exploration des fonctions plaquettaires

L'hémogramme réalisé en rémission complète de la LAM avant allogreffe révèle une thrombopénie modérée isolée ($50.10^9/L$) sans anomalie morphologique des plaquettes. Aucune anomalie de l'hémostase n'a été décelée. Par contre, les tests d'agrégation plaquettaire sont perturbés : sont notées une absence d'agrégation secondaire en réponse à l'ADP ($10\mu g$) et à l'adrénaline associée à une nette diminution et une réversibilité de la réponse au collagène ($2\mu g/mL$) et à l'acide arachidonique ($1,39mM$). La sécrétion d'ATP par les granules denses en réponse au collagène ($20\mu g/mL$) et TRAP (thrombin receptor agonist peptide) ($25\mu g/mL$) est nettement diminuée par rapport au témoin. L'exploration par cytométrie en flux de la fonction des granules denses des plaquettes montre une diminution de la capture et de la sécrétion de mépacrine (composant sélectivement excrétés par les granules denses) ainsi qu'une diminution de l'expression membranaire du CD63 (marqueur des granules denses lors de l'activation plaquettaire) après stimulation par la thrombine ($0,4UI/mL$) : ce résultat est en faveur d'une **thrombopathie δ -SPD** (δ -storage pool disease) qui correspond à un déficit congénital en granules denses dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Par ailleurs, l'exploration des granules alpha et des glycoprotéines membranaires par cytométrie en flux révèle un défaut d'internalisation de la glycoprotéine GPIb α alors que l'expression de GPIIb/IIIa (CD41a) et de la P-selectine (CD62P) avant et après stimulation par le TRAP est normale.

3.2.2.2 Exploration familiale

L'étude familiale a montré que la mère de cet enfant, qui ne présentait par ailleurs aucun signe de saignement, avait une thrombopénie isolée modérée ($120-150.10^9/L$) et une altération des fonctions plaquettaires compatible avec une thrombopathie δ -SPD.

3.2.2.3 Exploration du gène *RUNX1*

Devant une thrombopénie-thrombopathie familiale associée à une prédisposition aux LAM, le séquençage des régions codantes du gène *RUNX1* a été entrepris chez le patient et sa mère : il a révélé une **délétion hétérozygote de 8 nucléotides c.442_449del** (séquence de référence NM_001754.3) dans l'exon 4, entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré chez ces deux sujets (figure 3.1).

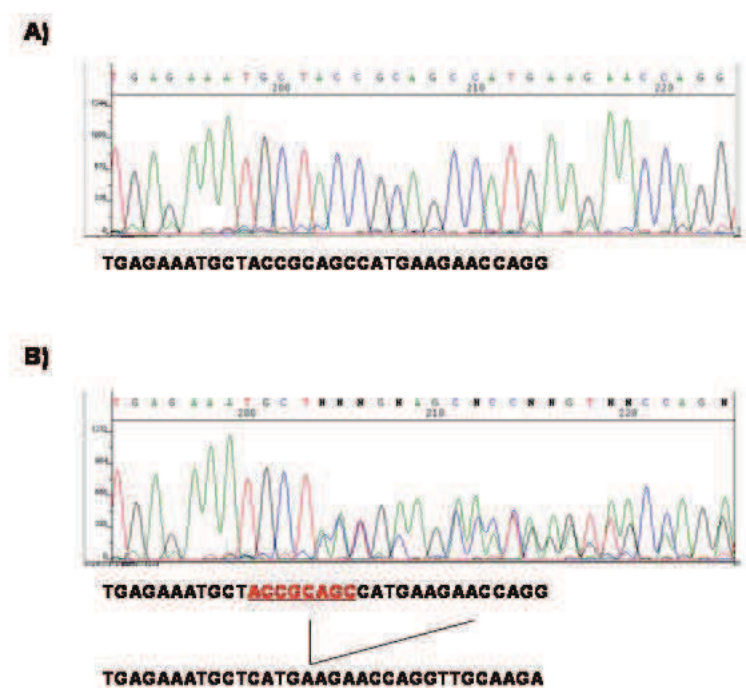


FIG. 3.1 – Séquence d'ADN montrant la délétion de 8pb dans l'exon 4 de *RUNX1* chez le patient 1 et sa mère (B) par rapport à la séquence d'un témoin (A)

3.3 Patiente 2

3.3.1 Clinique

Cette patiente est actuellement âgée de 14 ans. En période prénatale, à 32 semaines d'aménorrhée, un retard de croissance a été

détecté ainsi qu'une dysplasie multikystique du rein gauche, anomalies qui ont conduit à la réalisation d'un caryotype foetal sur cellules de liquide amniotique, révélant une formule chromosomique normale 46,XX.

A la naissance, à terme, l'enfant mesure 45cm (-3,5DS) pour un poids de 2140g (-3DS), présente une microcéphalie (périmètre crânien : -2,5DS) et une **hypotonie**. Une **communication inter-auriculaire** liée à une hypoplasie du septum primum a nécessité une correction chirurgicale à l'âge d'un an. L'examen clinique révèle une fossette présacrée borgne et une hypoplasie des grandes lèvres et une hémiparésie gauche. L'IRM cérébrale montre une micropolygyrie frontale et pariétale droite.

A 10 ans, l'examen clinique montre un **retard de croissance** (taille à -2,5DS) et une **microcéphalie** persistante (périmètre crânien à -2,3DS).

On note une **dysmorphie** faciale avec une énophtalmie et un front bombant, une hypoplasie de l'étage moyen, des narines antéversées, des fentes palpébrales obliques en haut, un télécanthus modéré, des lèvres fines et des coins orientés vers le bas. Son développement psychomoteur est marqué par un **retard de langage** majeur et **pas d'autonomie à la marche**.

Sur le plan hématologique, une **thrombopénie isolée** ($57.10^9/L$) avec microcytose (volume plaquettaire moyen : 6,4fL. Normes : 7,2 à 11,1fL) est détectée à l'héogramme, alors qu'aucun épisode hémorragique n'est rapporté.

3.3.2 Examens complémentaires

3.3.2.1 Exploration des fonctions plaquettaires

Les tests d'agrégation plaquettaire sont les mêmes que ceux réalisés pour le patient 1 : les mêmes résultats sont observés après stimulation à l'ADP, à l'acide arachidonique, au collagène et TRAP. L'exploration par cytométrie en flux révèle par ailleurs une anomalie des granules denses des plaquettes se traduisant par une diminution de la capture et de la sécrétion de mépacrine ainsi que par une diminution de l'expression membranaire du CD63 après stimulation par la thrombine (0,4UI/mL). Il s'agit dans ce cas d'une **thrombopathie δ -SPD**.

L'étude familiale ne montre pas d'anomalie plaquettaire chez la mère mais les explorations n'ont pu être menées chez le père.

3.3.2.2 Examens cytogénétiques

Le retard de développement psychomoteur a conduit à réaliser une étude cytogénétique. Le caryotype s'est révélé normal.

Dans un second temps, la technique d'**array-CGH** (puce Genosensor Array300 incluant 287 sondes BAC) a identifié une **délétion interstitielle en 21q22** incluant le gène *RUNX1* (sonde BAC CTC-337K2 déviante avec un ratio moyen de 0,58). Les sondes adjacentes non déviantes sont RP1-98L15 (numéro d'accension GenBank AL078615) et RP11-119A10, délimitant ainsi une délétion d'une taille maximale de

23,1Mb (de 14 579 397 à 37 669 622pb, construction génomique hg18).

Cette anomalie a été vérifiée par FISH à l'aide de la sonde locus spécifique TEL-AML1 (Vysis).

3.3.2.3 Cartographie physique de la délétion 21q22

FISH

La technique de FISH utilisant des sondes BAC localisées dans la région remaniée a par la suite borné la délétion avec plus de précision. Dix huit BAC ont été successivement hybridés, parmi lesquels 11 sont délétés. Le point de cassure proximal se situe entre les BAC RP11-430F9 et **RP11-165F7** et le point de cassure distal entre **RP11-73C15** et RP11-135F21. A noter que 2 des BAC délétés (RP11-422J22 et RP11-451M12) comprennent dans leur séquence le gène *RUNX1* (tableau 3.1). Cette délétion, d'une taille approximative de **3,3Mb**, inclut par ailleurs **29** gènes.

BAC	Localisation du BAC en pb à partir de l'extrémité du bras court du chromosome 21 (hg18)	Taille du BAC en pb	Résultat de la FISH
RP11-96H21	30 854 754 à 31 025 100	170 347	non délété
RP11-5N20	31 578 100 à 31 736 757	158 658	hybridation aspécifique (acrocentriques)
RP11-147H1	32 372 362 à 32 372 918	557	non délété
RP11-54F16	32 694 022 à 32 849 422	155 401	non délété
RP11-430F9	32 676 928 à 32 869 834	192 907	non délété
RP11-165F7	32 853 175 à 33 028 969	175 795	délété
RP11-67E8	32 990 799 à 33 134 028	143 230	délété
RP11-79D9	33 204 657 à 33 369 197	164 541	délété
RP11-357B7	34 060 540 à 34 237 979	177 440	délété
RP11-133J19	34 518 693 à 34 705 081	186 389	délété
RP11-415I16	34 673 727 à 34 852 873	179 147	délété
RP11-422J22	34 958 333 à 35 122 861	164 529	délété
RP11-451M12	35 302 676 à 35 500 392	197 718	délété
RP11-118P22	35 640 807 à 35 813 357	172 551	délété
RP11-475I12	35 923 797 à 36 101 220	177 424	délété
RP11-73C15	36 089 498 à 36 252 660	163 163	délété
RP11-135F21	36 189 868 à 36 333 860	143 993	non délété
RP11-382P7	36 334 549 à 36 498 668	164 120	non délété

TAB. 3.1 – Cartographie de la région 21q22 : résultat de l'hybridation des BAC pour borner la délétion par FISH.

Array-CGH à oligonucléotides

Cette cartographie a ensuite été confirmée par array-CGH à l'aide d'une puce à

oligonucléotides comportant 44 000 sondes (Agilent), après hybridation de l'ADN de la patiente contre un ADN d'un témoin de même sexe. Cinquante neuf sondes déviantes délimitent une délétion d'une taille comprise entre 3,16 et 3,30Mb (arr 21q22.11q22.12(32,930,254X2,32,994,177-36,156,886X1,36,229,718X2)) (figure 3.2).

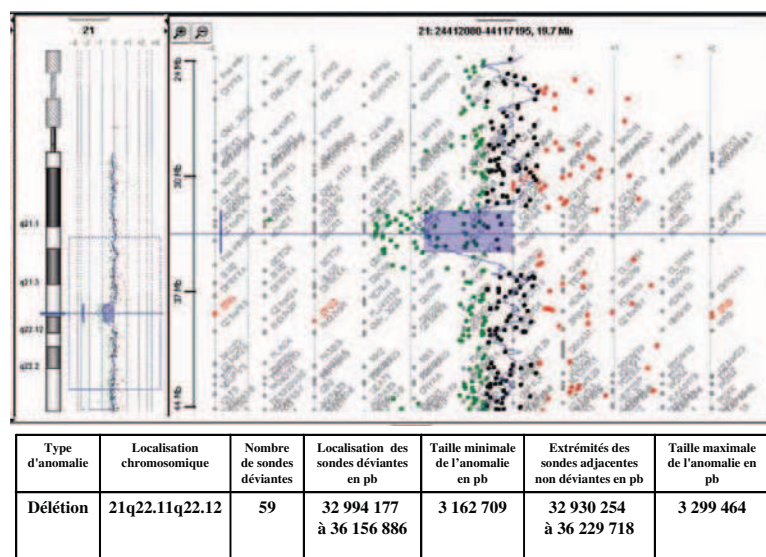


FIG. 3.2 – Délétion 21q22 : array-CGH (44K, Agilent) : hybridation de l'ADN de la patiente 2 marqué par la cyanine 5 contre un ADN témoin marqué par la cyanine 3. Le rectangle bleu délimite la région délétée. La ligne continue indique la moyenne des ratios cy5/cy3 en $\log_2$ (centrée sur 0 et déviée vers les valeurs négatives à l'endroit de la délétion). Chaque point correspond à une sonde oligonucléotidique (vert : délétion, rouge : amplification, noir : absence de déséquilibre). Le tableau indique les bornes ainsi que les tailles minimale et maximale de la délétion.

3.4 Gènes altérés et implication dans le phénotype observé

Après contrôle sur le site Database of genomic variants, il apparaît que les gènes délétés ne sont pas inclus dans des régions décrites comme polymorphes, ce qui est en faveur du caractère délétère de ce déséquilibre.

3.4.1 *RUNX1* et hémopathies

3.4.1.1 Structure

RUNX1 (Runt-related transcription factor 1, également appelé AML1 ou CBFA2) est un facteur de transcription de la famille des core binding factors (CBF).

Les membres de cette famille sont constitués d'une sous-unité α capable de se lier à l'ADN et d'une sous-unité β (CBF β). *RUNX1*, localisé en 21q22 code une sous-unité α et forme avec CBF β un complexe hétérodimérique, augmentant ainsi son affinité pour l'ADN et sa stabilité.

RUNX1 comporte 9 exons et 12 transcrits alternatifs ont été décrits [Levanon 2001], différant dans leur partie 5' et 3', codant 3 protéines RUNX1a, RUNX1b et RUNX1c contenant respectivement 250, 453 et 480 acides aminés. Elles ont toutes en commun le **domaine Runt**, région conservée de 128 acides aminés, responsable de la fixation à l'ADN et de l'interaction avec la sous-unité β .

3.4.1.2 Fonctions

RUNX1 joue un rôle important dans l'hématopoïèse : en effet, le complexe RUNX1/CBF β reconnaît une séquence consensus présente au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la **différenciation des cellules hématopoïétiques**. Il régule en particulier l'expression de *M-CSFR* (macrophage colony stimulating factor receptor), de l'interleukine 3, de la myéloperoxydase et des gènes TCR β (T-cell receptor β).

Rôle de RUNX1 dans l'hématopoïèse

Des modèles murins knock-out ont montré son rôle essentiel dans l'hématopoïèse : ces souris meurent durant le développement embryonnaire suite à une absence totale d'hématopoïèse fœtale hépatique. De plus, après transplantation chez des souris adultes, les cellules déficientes pour RUNX1 ne sont pas capables de reproduire une hématopoïèse [Okuda 1996]. Une étude menée par [Wang 1996] révèle que les souris homozygotes meurent suite à une hémorragie du système nerveux central, alors que la perte d'une copie de ce gène réduit significativement le nombre de progéniteurs érythroïdes et myéloïdes.

Il intervient en outre dans la régulation des cellules T et la différenciation des mégacaryocytes [Ichikawa 2004].

Rôle de RUNX1 dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse

Chez l'homme, RUNX1 est fortement exprimé au niveau des mégacaryocytes. Chez les souris hétérozygotes *RUNX1*^{+/-}, une réduction de 15% du nombre de plaquettes est observée [Sun 2004].

La perte de *RUNX1* chez des souris Mx-cre adultes entraîne une atteinte sévère de la **formation des plaquettes** et de la **différenciation des mégacaryocytes** ainsi qu'une augmentation du nombre de progéniteurs clonogéniques de mégacaryocytes [de Bruijn 2004].

De même, un modèle cellulaire confirme l'implication de RUNX1 dans la différenciation mégacaryocytaire [Elagib 2003].

Enfin, RUNX1, intervient dans la régulation de P19^{INK4D}, protéine entrant en jeu dans l'arrêt du cycle d'endomitose des mégacaryocytes [Gilles 2008].

3.4.1.3 RUNX1 et hémopathies

Différents types d'altérations du gène *RUNX1* sont retrouvées dans les hémopathies. Des anomalies constitutionnelles ou acquises ont été décrites, à savoir :

- des translocations réciproques impliquant la région 21q22,
- des amplifications géniques,
- des mutations ponctuelles.

Translocations

RUNX1 a été initialement identifié par le biais de la translocation **t(8;21)** aboutissant à la présence d'un transcrit de fusion AML1-ETO [Miyoshi 1991] et [Miyoshi 1993], retrouvé en particulier dans les LAM2 selon la classification FAB (French American British).

Il est également impliqué dans les leucémies aiguës lymphoblastiques proB de l'enfant où la translocation **t(12;21)** conduit à la présence d'un transcrit de fusion ETV6-RUNX1 ou TEL-AML1 dans 20% des cas [Romana 1995].

Plus rarement, le transcrit AML1-MDS1 issu de la translocation **t(3;21)** est décelé dans les syndromes myélodysplasiques et les phases blastiques de leucémies myéloïdes chroniques [Nucifora 1995].

Ces réarrangements entraînent la formation d'un gène de fusion et la synthèse d'une protéine chimérique agissant par un effet dominant négatif [Hiebert 2001].

Amplification génique

Des amplifications de *RUNX1* ont été décrites à la fois dans des hémopathies lymphoïdes et myéloïdes (LAM et syndromes myélodysplasiques) [Moosavi 2009].

Mutations ponctuelles

- Des mutations **acquises** inactivatrices ou à effet dominant négatif de *RUNX1* ont été identifiées dans environ 6,5% des hémopathies malignes, avec une fréquence particulièrement élevée dans les leucémies aiguës M0 (15 à 20% des cas) [Preudhomme 2000]. Dans les syndromes myélodysplasiques ou les LAM secondaires à des syndromes myélodysplasiques, une mutation ponctuelle de *RUNX1* est retrouvé dans 25% des cas et se trouve associée à un mauvais pronostic.
- Des mutations **constitutionnelles** de type non-sens, faux-sens ou des délétions intragéniques se transmettant en dominance ont été identifiées chez des sujets présentant une anomalie plaquettaire familiale avec prédisposition aux LAM (FPD/LAM) [Song 1999], [Osato 2004], [Roumier 2003].

3.4.2 Gènes candidats au retard mental

RUNX1 n'étant pas impliqué dans le retard mental ou les troubles du développement psychomoteur, d'autres gènes localisés dans cette région délétée sont en cause dans les troubles observés chez la patiente 2.

La cartographie des points de cassure a mis en évidence une délétion de 29 gènes. Parmi ceux-ci, il faut souligner le rôle particulier de *SINJ1*, *ITSNL1*, *RCAN1* et *CLIC6* au niveau cérébral, ayant conduit initialement à considérer ces gènes comme des gènes candidats au retard mental.

- La **synaptojanine 1** (*SYNJ1*) est une phosphoinositide phosphatase. Cette protéine participe, avec la dynamine, à l'endocytose des vésicules synaptiques au niveau présynaptique [Lee 2007]. Elle régule également l'internalisation des récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5méthylisoxazole-4-propionic acid) qui sont responsables de la transmission au niveau des synapses excitatrices via leur interaction avec le glutamate [Gong 2008].
- **L'intersectine 1** (*ITSNL1*) est une protéine membranaire cytoplasmique intervenant dans les phénomènes d'endocytose membranaire et qui serait impliquée dans le recyclage des vésicules synaptiques [Evergren 2007].
- le gène de la **calcipressine** (*RCAN1*) est localisé dans la région critique du syndrome de Down. Cette protéine régulatrice de la calcineurine A serait impliquée dans le retard mental lié à ce syndrome. Un modèle murin de souris knock-out a montré son rôle dans les processus de mémorisation et de plasticité synaptique par inhibition de la voie de signalisation impliquant cette phosphatase [Hoeffer 2007].
- ***CLIC6*** est un membre de la famille des canaux au chlore intracellulaires qui interagit avec les récepteurs à la dopamine D2-like [Griffon 2003a].

3.5 Discussion

3.5.1 *RUNX1* et hémopathies

Dans cette étude, pour le patient 1, c'est la survenue d'une leucémie aiguë chez un patient présentant une thrombopénie familiale modérée qui a été le point de départ de l'exploration de *RUNX1*.

Dans le second cas, la microdélétion incluant le gène *RUNX1* a été mise en évidence dans le cadre de la recherche étiologique d'un retard de développement psychomoteur associé à un retard de croissance et à une microcéphalie.

Ces deux observations ont donc mis en évidence une haploinsuffisance de *RUNX1*, conséquence de deux altérations géniques différentes (délétion intragénique décalant le cadre de lecture ou délétion complète) expliquant la thrombopénie.

Le principal enjeu lors de la découverte d'une altération constitutionnelle d'une copie de *RUNX1* est l'évaluation du **risque leucémogène** pour le patient afin d'adapter sa prise en charge.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la survenue d'une LAM chez les patients présentant une anomalie plaquettaire familiale en relation avec une altération de *RUNX1* est le plus souvent associée à l'**altération biallélique** de ce gène.

C'est ce que décrivent [Preudhomme 2009] : dans cette étude, 6 des 8 patients qui ont développé une leucémie aiguë et pour lesquels l'analyse moléculaire de *RUNX1* a été entreprise, présentaient soit une mutation somatique du second allèle soit une duplication du chromosome 21 porteur de l'anomalie, au niveau du clone leucémique.

D'autre part, des altérations acquises bialléliques ont été mises en évidence chez 14 sujets leucémiques/300 [Preudhomme 2000].

Dans l'étude de [Shinawi 2008], a été retrouvée chez le patient porteur d'une délétion complète de *RUNX1* qui a eu une LAM, une trisomie 21 sur cellules tumorales correspondant à une duplication du chromosome porteur de la délétion de ce gène, impliquant donc potentiellement un effet de dosage génique d'autres gènes en relation avec le mécanisme leucémogène. Dans ce cas, le clone leucémique présente par ailleurs une duplication 7p comprenant le cluster de gènes *HOX* qui ont été impliqués dans la survenue de LAM.

Enfin, d'après [Michaud 2002], dans les familles avec des mutations responsables d'une haploinsuffisance, la proportion de sujets développant une leucémie est plus faible que dans les familles avec une mutation responsable d'un effet dominant négatif.

Ces différentes observations sont donc en faveur de la survenue d'un **deuxième évènement** qui serait nécessaire à l'apparition d'une leucémie : l'altération de *RUNX1* (liée à une translocation, une mutation ou une délétion) serait l'évènement initial nécessaire à l'établissement d'un « clone préleucémique » par accumulation de progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes avec une capacité accrue d'autorenouvellement, une altération de la différenciation et une augmentation du potentiel de réplication. Ces cellules constitueraient alors une cible privilégiée pour l'apparition d'évènements secondaires conduisant à l'apparition de cellules leucémiques. C'est l'hypothèse avancée par [Niebuhr 2008]. Selon ces auteurs, plusieurs constatations viennent étayer cette thèse.

- Des temps de latence variables précédant la survenue d'une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) ont été observés chez des jumeaux porteurs d'une translocation t(12;21).

- Cette translocation a été détectée dans le sang de nouveaux-nés avec une fréquence 100 fois plus élevée que celle de la survenue de LAL néonatales. Il en est de même en ce qui concerne la fréquence des t(8;21) dans les sangs de cordon par rapport à la fréquence de LAM néonatales.
- Enfin, des mutations de récepteurs aux tyrosines kinases KIT sont fréquemment associées aux altérations de *RUNX1* dans les LAM, alors que des délétions de facteurs de transcription des cellules B ont été retrouvées dans les LAL-B, y compris en association à une translocation t(12;21).

Les deux patients étudiés ici présentent une thrombopathie-thrombopénie correspondant à un défaut des granules denses de type δ -SPD. Sur les deux cas décrits, seul le patient 1 a présenté une LAM à l'heure actuelle, sans autre anomalie cytogénétique décelée que la délétion de 8pb touchant l'exon 4 de *RUNX1*. Cependant, la perte ou l'altération du second allèle de ce gène n'a pas été recherchée sur les cellules leucémiques.

En ce qui concerne la patiente 2, la mise en évidence de la délétion de ce gène va conduire à proposer une surveillance hématologique étant donné le risque non négligeable de LAM.

Il faut souligner que l'exploration familiale du statut mutationnel de *RUNX1* prend tout son sens en cas de nécessité de greffe intra-familiale de cellules souches hématopoïétiques, envisagée comme traitement de la LAM chez l'un des membres, dans un contexte de pathologie autosomique dominante à pénétrance incomplète. Il est en effet important que le donneur de la greffe ne présente pas d'altération de ce gène.

3.5.2 Délétion 21q22 et retard de développement : gènes candidats

La recherche de gènes candidats *via* la mise en évidence d'un syndrome microdélétionnel passe par une étude du profil d'expression des gènes en déséquilibre ainsi que par la connaissance de leur rôle physiologique (*via* des modèles cellulaires ou animaux). Plusieurs gènes peuvent alors apparaître comme des candidats potentiels. La mise en évidence de déséquilibres génomiques et leur cartographie précise et rapide grâce à l'array-CGH permet de connaître les gènes qui y sont inclus. Ainsi, il est aisé d'établir une comparaison de ces déséquilibres (points de cassure et taille), de visualiser les régions chevauchantes chez des patients qui présentent un phénotype similaire (ici un retard de développement associé à une dysmorphie) et de définir une région critique minimale.

De même, il est possible d'exclure certains gènes comme des candidats probables lorsqu'ils sont en déséquilibre chez des sujets ne présentant pas de traits phénotypiques communs. Cette démarche est illustrée par l'exemple de la délétion 21q22 chez des patients présentant un retard mental.

La patiente présentée dans cette étude constitue le premier cas décrit dans la littérature de délétion 21q22 associant un retard mental, une thrombopa-

thie/thrombopénie et une dysmorphie crânio-faciale, contribuant ainsi à la découverte d'un nouveau « syndrome microdélétionnel ». A ce jour, 5 études regroupant 8 sujets ont mis en évidence des délétions 21q22 chez des patients présentant un phénotype similaire.

- [Hoyer 2007] ont mis en évidence une délétion de cette région chez un patient avec retard mental et petite taille.
- [Shinawi 2008] présentent 3 patients avec une thrombopénie chronique (60 à $78.10^9/L$) associée à un retard de croissance, un retard mental variable et des signes de dysmorphie.
- [Popovici 2009] rapportent deux cas de délétions chez des sujets avec un retard mental sévère, une absence de langage, une épilepsie, des troubles du comportement et une dysmorphie crânio-faciale.
- Un cas a été rapporté dans la base de données DECIPHER qui regroupe des données cytogénétiques et cliniques de patients présentant un retard de développement : le patient décrit (4576) porteur d'une délétion 21q22 de 4,47Mb, mais qui est associée à une duplication 17p11.2 de 0,3Mb, présente également un retard mental.

Le retard de développement est constant, avec une sévérité variable reliée dans le cas présent à la taille de la délétion (le patient présentant la plus petite délétion a le retard le moins sévère) : il associe un **retard mental** à un **retard de croissance**. Les signes les plus fréquemment rapportés par ailleurs sont la microcéphalie, la dysmorphie associant un hypertélorisme et des narines antéversées. Une épilepsie est observée dans 3 cas sur 8. Les caractéristiques cliniques de ces patients ainsi que les tailles respectives des délétions sont résumées dans les tableaux 3.2 et 3.3.

Afin de déterminer le mécanisme moléculaire éventuel à l'origine de ces réarrangements, les régions correspondant aux points de cassure ont été étudiées *in silico* : en effet, la présence de duplications segmentaires favorise les réarrangements génomiques par un mécanisme de recombinaison homologue non allélique. Ces séquences répétées ont ainsi été retrouvées associées aux bornes de duplications ou délétions décelées par array-CGH dans 23% des cas et sont à l'origine de réarrangements récurrents, dont les points de cassure sont fixes [Rudd 2009]. Dans le cas présent, l'étude de l'architecture génomique en 21q22 n'a pas révélée de duplications segmentaires aux bornes des délétions, ce qui explique l'absence de récurrence des points de cassure.

Plusieurs gènes délétés sont de bons candidats au retard mental en raison de leur expression au niveau cerveau et de leur implication dans les fonctions cognitives. La région commune délétée a une taille de 0,7Mb (figure 3.3) et englobe

les gènes *RUNX1*, *CLIC6*, *DSCR1* et une partie de *KCNE1*. Cependant, le patient avec cette délétion de 0,7Mb présente un phénotype plus atténué, laissant supposer que d'autres gènes peuvent être en cause dans le phénotype observé chez les autres patients. La taille minimale critique serait alors, d'après ces données, de 1,3Mb (en excluant le patient b).

Cependant, [Buijs 2009] rapportent le cas d'un patient sans retard de développement avec une délétion 21q22 de 1,6Mb, incluant le gène *RUNX1*, chevauchant en partie les délétions décrites précédemment. Ceci permet de réduire la taille de la région minimale délétée en relation avec le retard mental à 0,4Mb et d'en conclure que le gène candidat dans cette région est *ITSN1*.

L'intersectine 1 est une protéine cytoplasmique conservée au cours de l'évolution. Les deux isoformes sont détectés dans les tissus fœtaux et adultes aussi bien chez l'homme que chez la souris. Chez la souris, *Itsn1* est exprimé dans les zones de prolifération et de différenciation neuronale au cours du développement fœtal et chez l'adulte, suggérant son rôle important dans le développement cérébral.

Elle intervient dans l'endocytose et le recyclage des vésicules synaptiques médiés par la clathrine.

D'autre part, sa surexpression au niveau cérébral chez des sujets atteints du syndrome de Down est en faveur de son implication dans les troubles observés chez ces patients [Pucharcos 1999]. Il en résulte une inhibition de l'entrée de la transferrine et un blocage de l'endocytose [Pucharcos 2000].

Un modèle cellulaire montre qu'*ITSN1* est également impliqué dans les phénomènes d'exocytose par activation de *Cdc42*, ce dernier favorisant l'exocytose en stimulant l'assemblage des molécules d'actine aux sites d'ancrage pour la sécrétion de granules [Malacombe 2006].

Un modèle de souris knock out confirme le rôle d'*ITSN1* dans le **trafic vésiculaire** aussi bien au niveau de l'endocytose que de l'exocytose [Yu 2008].

Tous ces arguments sont donc en faveur de l'implication de l'altération d'*ITSN1* dans le retard mental lié à une délétion de la région 21q22.

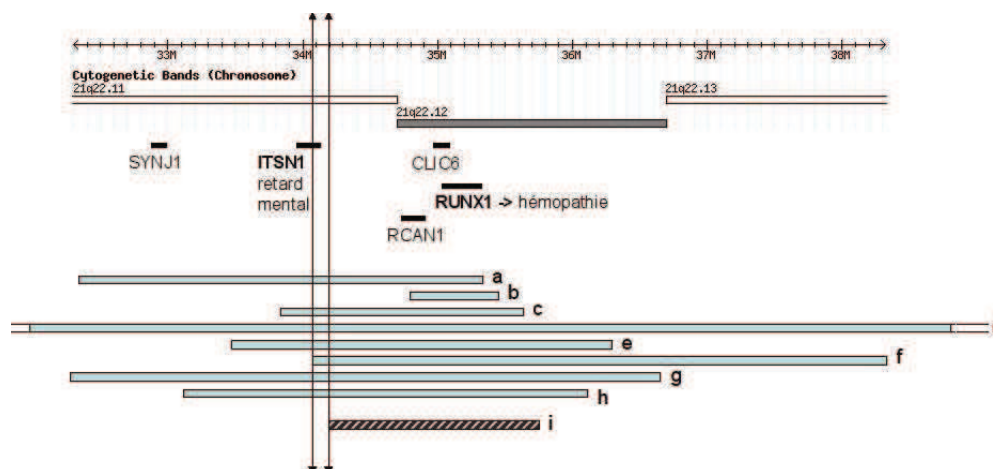


FIG. 3.3 – Bornes des délétions 21q22 décrites par [Hoyer 2007] (a), [Shinawi 2008] (b, c et d), [Popovici 2009] (e et f), DECIPHER 4576 (g), notre patiente (h) et [Buijs 2009] (i). Les gènes indiqués sont ceux retenus comme candidats suite à notre étude. La région hachurée (i) est exclue comme région candidate au retard mental. Les gènes retenus comme responsables du phénotype sont en gras : *RUNX1*, responsable d'hémopathie est délété dans tous les cas, *ITSN1* est le seul gène inclus dans la région minimale critique du retard mental (entre les 2 flèches).

3.5.3 Association thrombopénie/retard mental

L'association d'une thrombopénie congénitale et d'un retard mental est relativement rare : elle est retrouvée dans le syndrome de Jacobsen (MIM 147791), le syndrome de Paris-Trousseau (MIM 188025), le syndrome TAR (thrombopénie associée à l'absence de radius) (MIM 274000) et le syndrome de DiGeorge (MIM 192430). Les signes cliniques associés permettent néanmoins de les différencier.

- Les patients atteints du syndrome de **Jacobsen** présentent une dysmorphie faciale avec trigonocéphalie, des anomalies cardiaques et une thrombopathie avec thrombopénie avec présence de plaquettes contenant des granules α géants.
- Le syndrome **TAR** se caractérise par une thrombopénie isolée sévère à la naissance, spontanément résolutive après la première année de vie et une absence de radius. Peuvent s'y associer des malformations rénales et cardiaques.
- Le syndrome de **DiGeorge** associe un retard mental, une thrombopénie avec des plaquettes de grande taille, des anomalies cardiaques conotruncales, une dysmorphie faciale et un déficit immunitaire.

Les signes cliniques associés à la **délétion 21q22** décrite ici définissent une nouvelle entité associant un **retard mental** et une thrombopathie caractérisée par une **thrombopénie** et une **altération de l'agrégation plaquettaire**. Il semble alors approprié de proposer une recherche de microdélétion 21q22 devant l'association de ces symptômes.

Ce travail a été publié dans la revue European Journal of Human Genetic :
Clinical Phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency from point mutations to large genomic deletions.

Beri-dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, Roth V, Gregoire MJ, Bordigoni P, Lecompte T, Leheup B, Jonveaux P.
Eur J Med Genet 2008 Aug ; 16(8) : 1014-8.

	a (Hoyer)	b (Shinawi patient 1)	c (Shinawi patient 2)	d (Shinawi patient 3)	e (Popovici patient 1)	f (Popovici patient 2)	g (DECIPHER 4576)	h (patient de cette étude)
Thrombopénie	ND	oui	oui	oui	oui	oui	ND	oui
Autres troubles hématologiques	ND	SMD/LAM à 6 ans	macrocytose	non	non	non	ND	non
Poids de naissance en g	ND	2920	2041 (<3ème percentile)	1955 (<3ème percentile)	ND	ND	<3ème percentile	2140
Taille	petite taille	<3ème percentile	<3ème percentile	<3ème percentile			petite	petite
Retard du crois-sance		oui	oui	oui				oui
Retard de développement	oui	motricité fine	global	global	severe	severe	oui	oui
Langage					absent	absent		retard majeur
Marche					retard (6,5 ans)			non autonome
Troubles du comportement					oui	oui	bruxisme	
Epilepsie	non	non	non	oui	oui	oui		non
Anaïsrie cérébrale			retard de myélinisation / dysgénésie du corps callosus	aplasie du corps callosus	IRM normale	IRM normale		microgyrie frontale et partie droite

TAB. 3.2 – Caractéristiques cliniques des patients avec thrombopénie syndromique et taille des délétions : a : [Hoyer 2007] ; b, c et d : [Shinawi 2008] ; e et f : [Popovici 2009] ; g : cas DECIPHER 4576 ; h : patiente de cette étude

ND : non documenté SMD : syndrome mélodysplasique, LAM : leucémie aiguë myéloïde).

Bornes des délétions : construction génomique hg18, mars 2006

	a (Hoyer)	b (Shinawi patient 1)	c (Shinawi patient 2)	d (Shinawi patient 3)	e (Popovici patient 1)	f (Popovici patient 2)	g (DECIPHER 4576)	h (patient de cette étude)
Dysmorphie	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Front								bombant
Yeux		Hypertélorisme / en amande	Hypertélorisme / épicanthus / sourcils épars	Hypertélorisme / épicanthus / épiphalmie / strabisme	hypertélorisme	strabisme		Exophtalmie / tentes palpébrales obliques en haut / télécanthus
Nez		racine large / narines antérieures	Petit / narines antérieures	arrête du nez plat	pointe bulbueuse / narines antérieures	pointe bulbueuse		narines antérieures
Bouche		palais haut / anomalies de l'émail			lèvre inférieure éversée / coins tombants	lèvre supérieure fine / lèvre inférieure éversée / coins tombants	petites dents	lèvres fines / coins tombants
Thorax		mamelons inversés	mamelons inversés	mamelons inversés				
Crâne		front proéminent		front haut et large / occiput plat	scaphocephalie			hypoplasie de l'os base moyen
Microcéphalie	oui	non	oui	oui	oui	oui	oui	oui
anomalies des membres et extrémités			ongles hypoplasiques		doigts courts / camptodactylie / syndrome des pieds / ongles hypoplasiques		ongles dystrophiques	
Autres anomalies			transposition des gros vaisseaux / pas de testicule gauche	alopécie			retard d'âge osseux	hémiparésie gauche / anomalies cardiaques, rénales et génitales
Bornes de la délétion en pb	32 329 260 35 362 570	34 796 000 35 507 000	33 833 000 33 647 000	27 198 000 46 915 000	33 482 925 36 366 200	34 061 953 38 520 432	32 296 150 36 643 532	32 994 177 36 156 880
Taille de la délétion en Mb	3	0.7	1.81	19.8	2.9	4.3	4.47	3.16

TAB. 3.3 – Caractéristiques cliniques des patients avec thrombopénie syndromique et taille des délétions (suite) : a : [Hoyer 2007] ; b, c et d : [Shinawi 2008] ; e et f : [Popovici 2009] ; g : cas DECIPHER 4576 ; h : patiente de cette étude
ND : non documenté SMD : syndrome mélodysplasique, LAM : leucémie aiguë myéloïde).

Bornes des délétions : construction génomique hg18, mars 2006

SHORT REPORT

Clinical phenotype of germline *RUNX1* haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions

Mylène Béri-Dexheimer¹, Véronique Latger-Cannard², Christophe Philippe¹, Céline Bonnet¹, Pascal Chambon¹, Virginie Roth¹, Marie-José Grégoire¹, Pierre Bordigoni³, Thomas Lecompte², Bruno Leheup⁴ and Philippe Jonveaux^{*,1}

¹Laboratoire de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy Brabois, Nancy Université, EA4002, France;

²INSERM U734, Laboratoire d'Hématologie, Nancy Université, CHU Nancy, France; ³Service de Médecine Infantile 1, CHU Nancy, France; ⁴Service de Médecine Infantile 3 et de Génétique Clinique, CHU Nancy, France

Germline *RUNX1* mutations result in a rare autosomal dominant condition characterized by qualitative and quantitative platelet defects and predisposition to the development of myeloid malignancies (familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukaemia, FPD/AML). Only 13 pedigrees have previously been described so far. We report on two novel germline *RUNX1* mutations: (1) an out-of-frame 8 bp heterozygous deletion (c.442_449del) in an FPD/AML pedigree and (2) a *de novo* 3.5 Mb deletion in the 21q22.11.21q22.12 region encompassing the *RUNX1* gene in a mentally retarded female patient with short stature and thrombocytopenia. Interestingly, a similar *de novo* submicroscopic deletion has been recently reported in the literature in a mentally retarded patient. Mental retardation is one of the most common disorders and primary causes of thrombocytopenia are rare. When occurring together, these features should prompt to test for 21q22 deletion for comprehensive genetic counselling and clinical management.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 14 May 2008; doi:10.1038/ejhg.2008.89

Keywords: *RUNX1*; inherited thrombocytopenia; 21q22 microdeletion

Introduction

Familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukaemia (FPD/AML; OMIM 601399) is an autosomal dominant disorder in which affected members have a clinical history of bleeding tendency and mild to moderate thrombocytopenia with normal platelet size and morphology, and/or abnormal platelet aggregation in response to arachidonic acid.¹ Predisposition to develop myelodysplasia

and AML is another feature of this platelet disorder, with a leukaemic rate of approximately 35%. Affected individuals within the same family may present with variable clinical severity at varying ages. The disorder is located on chromosome 21q22.12, and germline heterozygous mutations in the haematopoietic transcription factor *RUNX1* (also known as *AML1* and *CBFA2*) have been identified in 13 pedigrees reported so far, including missense, frameshift, nonsense mutations and a large intragenic deletion.^{2–7} In the present study, we describe two novel germline *RUNX1* mutations including a large genomic deletion influencing the clinical phenotype. We therefore suggest giving consideration to cryptic deletion of chromosome 21q22.11q22.12 in the diagnosis of unexplained mental retardation/thrombocytopenia syndromes.

*Correspondence: Professor Dr P Jonveaux, Laboratoire de Génétique, EA 4002, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy Brabois, Nancy Université, Rue du Morvan, Vandoeuvre les Nancy F-545111, France.
Tel: +33 3 83 15 37 71; Fax: +33 3 83 15 37 72;
E-mail: p.jonveaux@chu-nancy.fr
Received 4 December 2007; revised 6 March 2008; accepted 11 March 2008

Methods and results

Blood samples and clinical information from all patients analysed were obtained with approval of the institutional review boards of Nancy University hospital.

Case 1

The male proband was first seen in 1999 at the age of 2 because of purpura without history of easy bruising and bleeding. Physical examination did not reveal any abnormal findings except ecchymoses and petechiae. His blood count showed haemoglobin 13.4 g per 100 ml, normal leucocyte count $5.67 \times 10^9/l$ and decreased platelet count $50 \times 10^9/l$. Peripheral blood smear examination showed platelet of normal size and morphology. Coagulations tests (APTT, PT and fibrinogen) were in normal ranges. Platelet studies showed the absence of second-wave aggregation in response to adenosine diphosphate (ADP, $10 \mu M$) and a reduced and reversible response to collagen ($2 \mu g/ml$) and arachidonic acid ($1.39 mM$). ATP secretion from dense granules in response to collagen ($20 \mu g/ml$) and thrombin receptor agonist peptide (TRAP) was markedly reduced respectively (peak ATP concentration proband: $0.8 \mu M$ ATP/healthy donor: $13 \mu M$ ATP; proband: $1.3 \mu M$ ATP/healthy donor: $11.8 \mu M$ ATP). Flow cytometry analysis showed a reduced uptake and release of mepacrine, a compound selectively taken up by dense granules,^{8,9} associated with a low expression of CD63, a membrane marker of dense granule, on activated platelets. These abnormalities were in favour of platelet dense granule disorder or δ -storage pool disease (δ -SPD). Membrane glycoprotein expression, GPIIb/IIIa (CD41a) and GMP140

(CD62P) was normal before and after TRAP stimulation. GPIb α (CD42b) was weakly internalized after platelet stimulation. After 4 years, at the age of 6, he developed AML. Peripheral blood analysis showed pancytopenia with haemoglobin 5.8 g per 100 ml, WBC $2.1 \times 10^9/l$ and a platelet count of $10 \times 10^9/l$. A bone marrow aspirate yielded a very hypercellular bone marrow with blasts (20%) and myelodysplastic features. Blasts phenotype was immature with myeloid markers leading to AML diagnosis. Cultured leukaemic cells showed a normal karyotype. He underwent successful bone marrow transplantation from HLA-haploidentical donor and is still in remission 4 years later.

His mother, a woman without any bleeding or physical abnormality, was found to have mild isolated thrombocytopenia ($120\text{--}150 \times 10^9/l$) and abnormal platelet behaviour consistent with a δ -SPD. Haematological features of the proband's maternal grandparents were normal. To further elucidate the genetic origin of this autosomal dominant platelet disorder, exons 3–6 of the *RUNX1* gene were amplified from genomic DNA extracted from peripheral blood samples of the male proband, his father and his mother. Primer pairs were designed as previously described.² The purified PCR products were bidirectionally sequenced with the BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). An out-of-frame 8 bp heterozygous deletion (c.442_449del) was identified in exon 4 of *RUNX1* in the genomic DNA of the proband and his mother (Figure 1a). Sequence variation identified in exon 4 of *RUNX1* was numbered starting from the first base of the ATG start codon, numbering based on reference

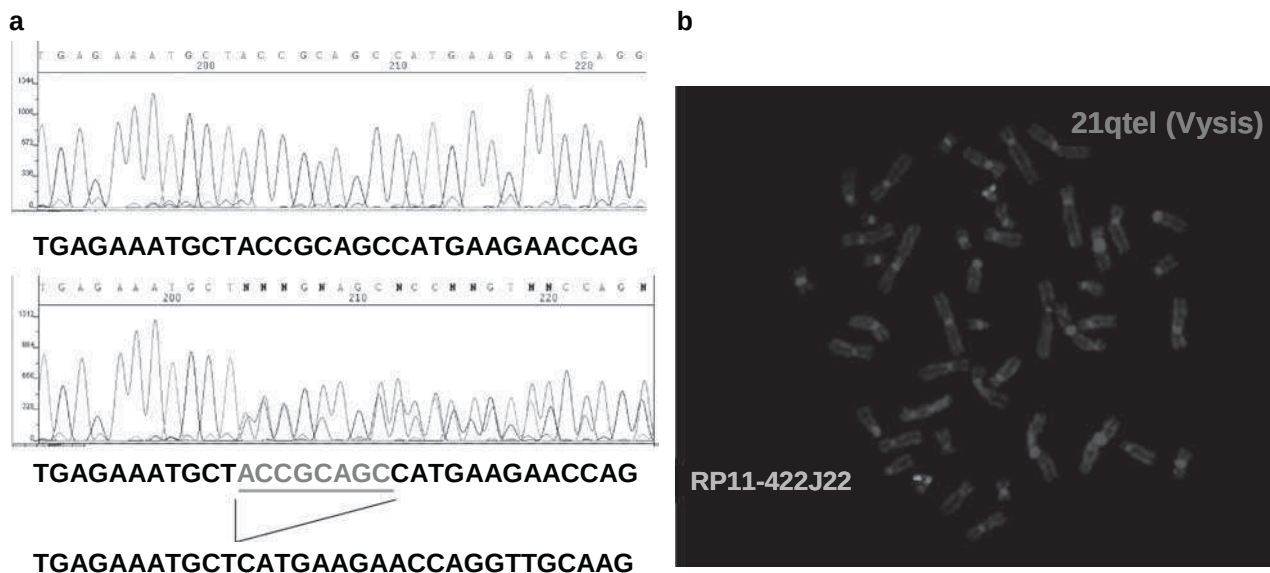


Figure 1 (a) DNA sequence of the Case 1 patient (bottom) showing the 8 bp deletion in exon 4 of *RUNX1*, and a control sequence (top). (b) FISH analysis of the clone RP11-422J22 (34958334–35122861) showing only one green signal on metaphase chromosome 21. The red signal corresponds to the control probe on 21qter (Vysis Inc.).

sequence NM_001754.3. The effect of the 8 bp deletion at the protein level was predicted with the EMBOSS Transeq software (<http://www.ebi.ac.uk/>). If translated, the mutated allele would lead to a severely truncated protein (p.Thr148HisfsX9). However, the mutant mRNA harbours a premature termination codon (PTC), such PTC often triggers nonsense-mediated mRNA decay of mRNA.¹⁰ Although the mutant mRNA level has not been studied *in vitro*, this out-of-frame deletion most probably corresponds to a null allele.

Case 2

This girl was first seen at the age of 10 to explore speech and developmental delay associated with short stature and microcephaly. She is the only child of unrelated healthy parents (a 19-year-old father and a 16-year-old mother at the conception). Family history was unremarkable. During gestation growth delay was reported at the fifth-month ultrasonographic examination. At the same time multiple renal cysts were also seen in the left kidney. Cytogenetic analysis on amniotic fluid was normal. She was born at full term with low weight (−3 SD), short length (−3.5 SD) and microcephaly (−3 SD). Hypotonia was present. A severe inter-atrial septal defect due to hypoplastic septum primum required surgical correction at 1 year of age. The genital examination showed hypoplastic labia majora. Micropolygyria of the right frontal and parietal area was reported by MRI. At the age of 10, clinical evaluation revealed height at −2.5 SD, with persistent microcephaly (−2.3 SD). Craniofacial dysmorphism included a prominent metopic ridge, upslanted palpebral fissures, anteverted nares, moderate telecanthus and downturned corners of the mouth with thin lips. Neurodevelopmental features included psychomotor retardation with severely delayed receptive and expressive language skills. She had not any history of bleeding. Peripheral blood analysis showed isolated thrombocytopenia (platelet count of $57 \times 10^9/l$) with a normal platelet morphology. Platelet studies revealed reduced and reversible response to ADP ($10 \mu M$) and arachidonic acid (1.39 mM). ATP secretion in response to collagen ($20 \mu g/ml$) and TRAP was markedly reduced (peak ATP concentration proband: $0.8 \mu M$ /healthy donor: $10.1 \mu M$; proband: $0.8 \mu M$ /healthy donor: $10.4 \mu M$). Flow cytometry analysis of dense granules showed a reduced uptake and release of mepacrine associated with a low expression of CD63. These abnormalities were in favour of δ -SPD diagnosis. Membrane glycoprotein expression GPIIb α (CD42b) and GMP140 (CD62P) was normal before and after TRAP stimulation. GPIIb/IIIa (CD41a) expression was weakly reduced on resting and stimulated platelet. A DNA sample from the patient was analysed using the GenoSensor Array (Vysis Inc., Abbott Laboratories SA, Downers Grove, IL, USA) according to the protocols recommended by the manufacturer and as described previously.¹¹ This array contained 287 genomic

targets cloned from six PAC and BAC libraries, unevenly distributed over the genome, including cancer amplicons/ oncogenes, tumour-suppressor genes, loci of insertions/deletions/duplications, telomeres and markers added to reduce gaps (<http://www.vysis.com>). The microarray slides were analysed using the GenoSensor Reader System (Vysis Inc.) according to the manufacturer's instructions. On the basis of previous control experiments using the GenoSensor Array 300, we determined losses and gains of target DNA sequence copy number by a green/red ratio <0.8 and >1.2 respectively. A deletion of a 21q22 clone (RP11-422J22) including *RUNX1* was detected. To confirm and further characterize the deletion, FISH analysis was performed using BAC probes (The Wellcome Trust Sanger Institute, UK) mapping to 21q22.11q22.12 (Figure 1b). According to the UCSC genome browser (March 2006), the proximal breakpoint mapped between clone RP11-430F9 and RP11-165-F7 whereas the distal breakpoint resided between clone RP11-73C15 and RP11-135F21 leading to a deleted region of approximately 3.3 Mb including 29 confirmed and predicted genes. The karyotype is written as: 46,XX.arr cgh 21q22.12(RUNX1)x1.ish del(21)(q22.11q22.12)(RP11-165F7-,RP11-67E8-,RP11-79D9-,RP11-357B7-,RP11-133J19-,RP11-415I16-,RP11-422J22-,RP11-451M12-,RP11-118P22-,RP11-475I12-,RP11-73C15-). Maternal 21q22.12 FISH using the RP11-422J22 probe encompassing the *RUNX1* gene was normal. The father was not available for investigation.

Discussion

Heterozygous germline mutation in the *RUNX1* gene (UCSC browser, March 2006: 21q22. 12: 35081968-35182857) causes FPD with predisposition to acute myelogenous leukaemia. FPD is not fatal but significantly inhibits blood clotting, which could be life threatening after surgery, injury or dental treatment. The incidence of leukaemia among affected individuals varies from 20 to 50%. The affected subjects seem to develop myeloid malignancies throughout their lifespan. FDP/AML is extremely rare worldwide with a total of 13 pedigrees identified so far. In addition to a novel two-generation family with typical FDP/AML and a frameshift *RUNX1* mutation, we described in a mentally retarded patient with short stature and thrombocytopenia, a microdeletion that includes *RUNX1* and several neighbouring genes. Larger chromosome deletions spanning the 21q22 region have previously been reported in patients with mental impairment and multiple abnormalities,^{12–13} unfortunately without any accurate size. To the best of our knowledge, only one similar microdeletion has been recently identified during a study of 100 children with idiopathic mental retardation and normal standard chromosomal analysis, using a GeneChip mapping 100K SNP array.¹⁴ Only an

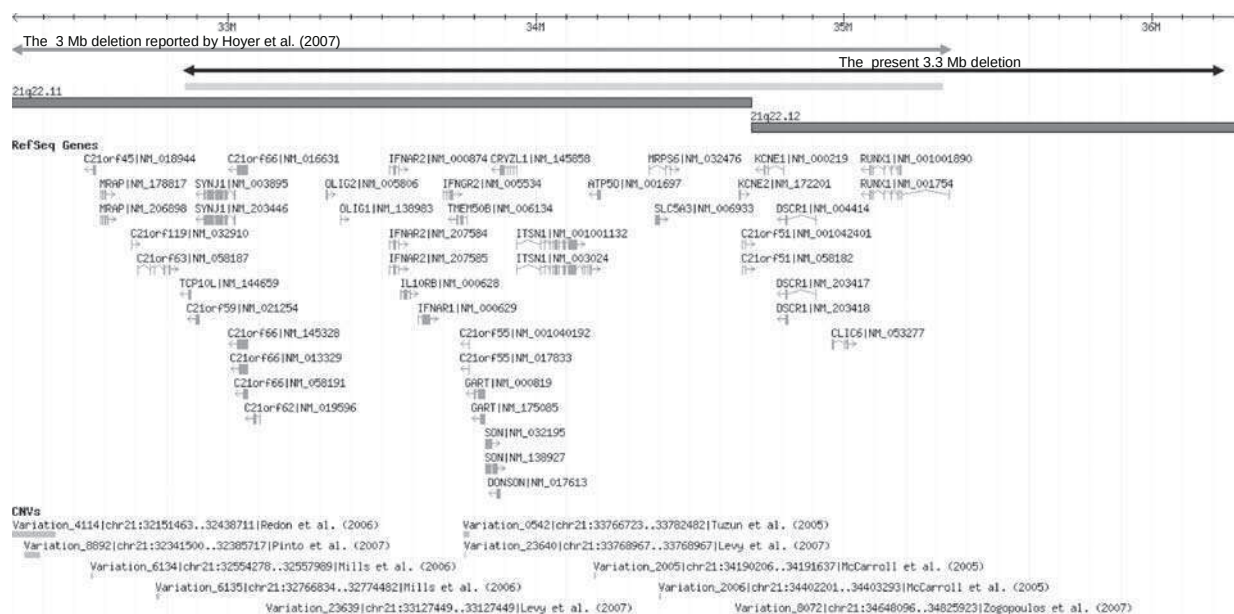


Figure 2 Map of the 21q22.11q22.12 region showing the relative position of Refseq genes and genomic variants. The grey line indicates the extent of the 3 Mb deletion reported by Hoyer *et al.*¹⁴ the black line indicates the extent of the 3.3 Mb deletion identified in the present patient and the blue line indicates the overlapping aberrant region. The drawing is based on the UCSC map (March 2006) and the Database of Genomic Variants.

overview of the clinical findings was reported. This patient had a short stature without major morphological anomalies. Breakpoints were mapped from SNP rs8129832 (32329260) to SNP rs10483024 (35362570) indicating a 3 Mb deletion. It would be interesting to look for a platelet disorder in this patient as the deletion includes the *RUNX1* gene. Actually, this deletion shares 25 out of 29 genes included in our patient's deletion (Figure 2). Furthermore, the author confirmed the *de novo* occurrence of the deletion, strengthening a disease-causing deletion in our patient. No evidence of segmental duplications or low-copy repeats was found near any of the four breakpoints in these two patients. According to the Database of Genomic Variants, a curated catalogue of large-scale variation in the human genome (<http://projects.tcag.ca/variation/>), some copy number polymorphisms have been described on 21q22.11q22.12. These data can aid in the identification of potential genes that are more likely to be causative of the patients' phenotype. In addition to *RUNX1* haploinsufficiency clearly involved in FDP/AML, at least four candidate genes, *SYNJ1*, *ITSN1*, *RCAN1* and *CLIC6*, located outside polymorphic regions, could contribute to mental retardation. Synaptojanin-1 is a nerve terminal protein that appears to participate with dynamin in synaptic vesicle recycling.¹⁵ Intersectin 1 is a cytoplasmic membrane-associated protein that indirectly coordinates endocytic membrane traffic with the actin assembly machinery. In addition, the encoded protein may regulate the formation of clathrin-coated vesicles and could be involved in

synaptic vesicle recycling.¹⁶ The Down's syndrome critical region protein *RCAN1* regulates long-term potentiation and memory by inhibition of phosphatase signalling.¹⁷ *CLIC6*, a member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine D(2)-like receptors.¹⁸

Finally, inherited thrombocytopenia associated with mental retardation is an uncommon condition. The Jacobsen syndrome (OMIM 147791) with the Paris-Trousseau syndrome (OMIM 188025), the thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome (OMIM 274000) and the 22q11.2 deletion syndrome (OMIM 192430) have additional distinct clinical anomalies. Patients with Jacobsen syndrome have trigonocephaly, facial dysmorphism, cardiac defects and Paris-Trousseau-type platelet defects, ie mild thrombocytopenia with a subpopulation of platelets containing giant α -granules. TAR syndrome is characterized by severe isolated thrombocytopenia at birth that spontaneously improves after the first year of life. The absence of radii with retention of normal thumbs is characteristic and can be associated with renal and cardiac defects. In the chromosome 22q11.2 deletion syndrome, mental retardation can be associated with thrombocytopenia with large platelets in addition to conotruncal cardiac anomalies, facial dysmorphism and immunodeficiency. On the basis of these observations, 21q22.11q22.12 microdeletion could be a novel cause of mental retardation, in which a platelet disorder (thrombocytopenia and/or abnormal platelet aggregation) would be a distinctive phenotypic manifestation.

Acknowledgements

This work was supported by the regional PHRC 2002 of the Ministère de la Santé. We thank the Cytogenetics staff at the Nancy University hospital for their expert technical assistance.

References

- 1 Ho CY, Otterud B, Legare RD *et al*: Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1–22.2. *Blood* 1996; **87**: 5218–5224.
- 2 Song WJ, Sullivan MG, Legare RD *et al*: Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999; **23**: 166–175.
- 3 Buijs A, Poddighe P, van Wijk R *et al*: A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Blood* 2001; **98**: 2856–2858.
- 4 Michaud J, Wu F, Osato M *et al*: *In vitro* analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood* 2002; **99**: 1364–1372.
- 5 Walker LC, Stevens J, Campbell H *et al*: A novel inherited mutation of the transcription factor *RUNX1* causes thrombocytopenia and may predispose to acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2002; **117**: 878–881.
- 6 Sun L, Mao G, Rao AK: Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC- θ and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood* 2004; **103**: 948–954.
- 7 Heller PG, Glembofsky AC, Gandhi MJ *et al*: Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood* 2005; **105**: 4664–4670.
- 8 Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R: Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol* 1995; **89**: 117–123.
- 9 Wall J, Buijs-Wilts M, Arnold J *et al*: A flow cytometry assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995; **89**: 380–385.
- 10 Maquat LE: Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 89–99.
- 11 Korshunov A, Sycheva R, Golanov A: Genetically distinct and clinically relevant subtypes of glioblastoma defined by array-based comparative genomic hybridization. *Acta Neuropathol* 2006; **111**: 465–474.
- 12 Chettouh Z, Croquette MF, Delobel B *et al*: Molecular mapping of 21 features associated with partial monosomy 21: involvement of the APP-SOD1 region. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 62–71.
- 13 Theodoropoulos DS, Cowan JM, Elias ER, Cole C: Physical findings in 21q22 deletion suggest critical region for 21q-phenotype in q22. *Am J Med Genet* 1995; **59**: 161–163.
- 14 Hoyer J, Dreweke A, Becker C *et al*: Molecular karyotyping in patients with mental retardation using 100K single-nucleotide polymorphism arrays. *J Med Genet* 2007; **44**: 629–636.
- 15 Lee SY, Wenk MR, Kim Y *et al*: Regulation of synaptojanin 1 by cyclin-dependent kinase 5 at synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 546–551.
- 16 Evergren E, Gad H, Walther K *et al*: Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. *J Neurosci* 2007; **27**: 379–390.
- 17 Hoeffler CA, Dey A, Sachan N *et al*: The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling. *J Neurosci* 2007; **28**: 13161–13172.
- 18 Griffon N, Jeanneteau F, Prieur F *et al*: CLIC6 a member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine D(2)-like receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; **117**: 47–57.

Translocation t(3;18)(p12.3;q23)dn et dystonie syndromique

Sommaire

4.1	La dystonie	60
4.1.1	Définition	60
4.1.2	Prévalence	60
4.1.3	Classification	60
4.1.4	Physiopathologie	61
4.1.5	Bases génétiques	62
4.1.6	Traitements	66
4.2	Description du cas clinique étudié	66
4.2.1	Clinique de la patiente	66
4.2.2	Examens complémentaires	67
4.2.3	Cartographie des points de cassure	69
4.3	Détermination de l'origine parentale du chromosome 3 transloqué	77
4.4	Etude de la région encadrant le point de cassure sur le chromosome 3	78
4.4.1	Cartographie de la région 3p12	78
4.4.2	ROBO1 : roundabout, homologue 1 (<i>Drosophila</i>)	81
4.4.3	Etude de ROBO1	87
4.5	Etude de la région du point de cassure sur le chromosome 18	98
4.5.1	Etude d'un gène hypothétique au point de cassure	98
4.5.2	Recherche d'un effet de position	100
4.6	Discussion	103
4.6.1	Translocations équilibrées et pathologies	103
4.6.2	Conséquences de l'interruption de <i>ROBO1</i>	104
4.6.3	Impact phénotypique de l'interruption de séquence sur le chromosome 18?	114

4.1 La dystonie

4.1.1 Définition

La dystonie est un syndrome caractérisé par des contractions musculaires involontaires et prolongées affectant une ou plusieurs régions du corps, causant fréquemment des mouvements répétés de torsion et des postures anormales [Fahn 1987], [Fahn 1988] et [Fahn 1998]. Ces mouvements s'aggravent au cours de l'action alors qu'ils s'améliorent avec la relaxation ou le sommeil.

4.1.2 Prévalence

La prévalence de la dystonie est de **3,4 et 29,5 pour 100 000** pour la dystonie généralisée et la dystonie focale respectivement [Nutt 1988]. Chez les Juifs Ashkenazes, sa fréquence est cinq fois supérieure à celle de la population générale [Bressman 2000]. D'après une étude épidémiologique de la dystonie en Europe (2000), la prévalence annuelle de la dystonie primaire est de 15,2 pour 100 000, parmi lesquels, 11,7 personnes pour 100 000 sont atteintes de dystonie focale. La dystonie cervicale touche 5,7 personnes pour 100 000, le blépharospasme 3,6 pour 100 000 et la crampe de l'écrivain 1,4 pour 100 000.

4.1.3 Classification

Le terme de dystonie regroupe des syndromes très **hétérogènes** et des pathologies variées. La classification est basée sur la distribution topographique, l'âge d'apparition des symptômes ou l'étiologie [Bressman 2004].

4.1.3.1 Age d'apparition

On distingue la dystonie à début précoce ou tardif selon que les symptômes sont apparus **avant ou après 26 ans**.

4.1.3.2 Distribution topographique

La dystonie est **focale** si une seule région du corps est touchée : par exemple, la crampe de l'écrivain (bras), le blépharospasme (œil), la dystonie cervicale (cou) ou la dystonie laryngée.

Elle est **segmentaire** à partir de deux régions contiguës touchées (par exemple crânio-cervicale) ou **multifocale** à partir de deux régions non contiguës affectées.

La dystonie **généralisée** correspond quant à elle à l'atteinte des genoux, du tronc et d'une autre partie du corps.

Enfin, l'**hémidystonie** touche un seul côté du corps.

4.1.3.3 Classification étiologique

Dystonie primaire

C'est la forme la plus fréquente. Un certain nombre est associé à une **anomalie**

génétique mais la caractérisation génétique de ces formes reste encore très incomplète. Elle survient chez des patients sans anomalie neurologique associée ni signe d'anomalie structurale du système nerveux central à l'IRM : elle est soit généralisée (dystonie idiopathique de torsion) soit focale.

« Dystonie-plus »

La dystonie est alors associée à d'autres signes neurologiques tels que des troubles parkinsoniens (dystonie sensible à la levodopa) ou des myoclonies.

Dystonie secondaire

En fonction de la **cause** identifiée, les dystonies secondaires sont de 3 types.

- Elles peuvent être causées par un agent **exogène** tel qu'un médicament (levodopa, agoniste dopaminergique, antipsychotique, anticonvulsivant, inhibiteur de la recapture de la sérotonine).
- Elles peuvent faire suite à des désordres **dégénératifs** ou **métaboliques** [Fahn 1998].
- Elles peuvent être induites par une **lésion cérébrale acquise**, en particulier des ganglions de la base impliquant le putamen et le thalamus [Marsden 1985], survenant à la suite d'un traumatisme périnatal, d'ictère nucléaire, d'infarctus, d'hémorragie, d'infection, de traumatisme, d'anoxie, de sclérose multiple, de tumeurs cérébrales [Calne 1988].

La présentation **clinique** de ces dystonies secondaires varie alors selon le siège des lésions.

- Les dystonies secondaires aux lésions **striato-pallidales** sont caractérisées par des spasmes dystoniques soutenus. Les lésions touchent alors le territoire sensori-moteur de cette structure.
- Les dystonies secondaires aux lésions **thalamiques** se présentent comme des dystonies myocloniques avec un myoclonus prédominant et une main « thalamique » associés à des postures dystoniques et des mouvements lents, pseudo-athétoïdes. Les lésions sont centrées sur les noyaux Vim (qui reçoit les afférences cérébelleuses), Vc (qui reçoit les afférences somatosensorielles) et à un moindre degré sur le noyau Vo (qui reçoit les afférences pallidales) du thalamus [Lehéricy 2001].

4.1.4 Physiopathologie

Les symptômes sont causés par la contraction simultanée de muscles agonistes et antagonistes, exacerbée au cours des mouvements volontaires [Yanagisawa 1971].

Les symptômes observés sont liés à une perte d'inhibition à différents niveaux du système nerveux.

Des études basées sur l'utilisation de l'imagerie cérébrale, de modèles animaux ainsi que les données de génétique ont permis de mieux appréhender la physiopathologie complexe de cette entité clinique : des dysfonctionnements au niveau corticostriatal, cérébelleux et du système dopaminergique (en particulier des déficits en tyrosine hydroxylase responsable de la synthèse de L-DOPA) ont ainsi été mis en cause dans la dystonie [Vidailhet 2009].

4.1.5 Bases génétiques

Les dystonies représentent un groupe hétérogène de pathologies pour lesquelles plusieurs loci et gènes responsables ont été identifiés [Schwarz 2009], [Vidailhet 2009], contribuant ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués et donc de la physiopathologie. Le tableau 4.1 résume les connaissances génétiques actuelles sur ce syndrome.

4.1.5.1 *DYT1*

La majorité des cas familiaux de dystonie primaire d'apparition **précoce** est liée à la délétion d'un trinuécléotide GAG dans l'exon 5 du gène ***DYT1*** (9q32q34) conduisant à la perte d'un acide glutamique dans la partie C-terminale de la protéine. D'autres variations de séquences de ce gène ont été identifiées mais leur implication formelle dans la dystonie n'est pas prouvée à ce jour, si ce n'est un SNP (résidu 216) qui modifie l'expression clinique des porteurs de la délétion GAG de *DYT1* et diminue la pénétrance de la dystonie associée à *DYT1*.

Ce gène code la **torsine A**, une protéine appartenant à la famille des adénosine triphosphatases [Gasser 1998], [Ozelius 1997]. Les membres de cette famille de protéines chaperonnes interviennent dans la dégradation des protéines, le trafic membranaire, la fusion de vésicules et le mouvement des organelles, la dynamique du cytosquelette et le repliement des protéines. La torsine A, quant à elle, a une expression ubiquitaire. Au niveau cérébral, elle est préférentiellement exprimée au niveau du cervelet par les cellules de Purkinje, au niveau du thalamus, du globus pallidum, de l'hippocampe et du cortex. Son expression est exclusivement neuronale, au niveau du réticulum endoplasmique. La mutation décrite dans la dystonie entraîne une relocalisation de la protéine au niveau de l'enveloppe nucléaire et une morphologie cellulaire anormale. La torsine A régule le trafic cellulaire du transporteur de la dopamine et interfère avec le cytosquelette, affectant ainsi le développement des voies neuronales dans le cerveau.

Le modèle murin (knock-in et knock-down) montre un **déficit de contrôle moteur et de la voie dopaminergique**.

La dystonie liée à cette délétion se caractérise par une **pénétrance de 25 à 30%** et un phénotype pouvant aller de la dystonie généralisée à une atteinte focale modérée

Désignation	Type de dystonie	Mode de transmission	Locus	Gène/Protéine
DYT1	Dystonie de torsion précoce généralisée	Autosomique dominant	9q	Déletion GAG dans DYT1, codant la torsine A
DYT2	Dystonie de torsion autosomique récessive	Autosomique récessif	Inconnu	Inconnu
DYT3	Dystonie liée à l'X-parkinsonisme (syndrome de Iubag)	Récessif lié à l'X	Xq	TAF1/DYT3
DYT4	Dystonie de torsion "non DYT1", dysphonie	Autosomique dominant	Inconnu	Inconnu
DYT5-DYT14	Dystonie sensible à la L-Dopa (syndrome de Segawa)	Autosomique dominant	14q	GTP-cyclohydrolase
DYT6	Dystonie de torsion de type mixte apparaissant à l'adolescence	Autosomique récessif	11p	Tyrosine hydroxylase
DYT7	Dystonie de torsion locale de l'adulte	Autosomique dominant	8p	Inconnu
DYT8	Dyskinésie paroxysmique non kinésigénique	Autosomique dominant	18p	Inconnu
DYT9	Chéiroathétose paroxysmique avec épisodes d'ataxie et spasticité	Autosomique dominant	2q	Myofibrillo-genesis regulator 1
DYT10	Choréathétose paroxysmique kinésigénique	Autosomique dominant	1p	Inconnu
DYT11	Myoclonie-dystonie	Autosomique dominant	16p-q	Inconnu
DYT12	Dystonie-parkinsonisme d'apparition brutale	Autosomique dominant	7q	Epsilon-sarcoglycan
DYT13	Dystonie multifocale/segmentaire	Autosomique dominant	19q	Na/K ATPase alpha 3
DYT15	Myoclonie-dystonie	Autosomique dominant	1p	Inconnu
DYT16	Dystonie-parkinsonisme	Autosomique dominant	18p	Inconnu
DYT17	Dystonie locale	Autosomique récessif	2q31	PRKRA
		Autosomique récessif	20p11.22q13.12	Inconnu

TAB. 4.1 – Classification moléculaire des dystonies. D'après [Schwarz 2009].

[Bressman 1994], [Opal 2002]. Il existe cependant des caractéristiques communes : la survenue précoce de la dystonie, une première atteinte touchant le bras ou la jambe, progressant dans 65% des cas vers une atteinte généralisée ou multifocale. L'incidence de la mutation est de 1/12 000 dans le sud-est de la France. Par ailleurs, cette mutation est associée à un risque de dépression précoce, indépendamment de l'apparition de signes dystoniques, d'où l'importance du dépistage familial quand un sujet est atteint de dystonie DYT1.

L'imagerie par tomographie par émission de positons montre une répartition d'utilisation du glucose caractéristique (augmentation du métabolisme au niveau des ganglions de la base, du cervelet et du cortex moteur). En outre, sont notés un défaut de liaison des récepteurs dopaminergiques D2 du striatum et des anomalies de la microstructure de la substance blanche du cortex sensori-moteur.

4.1.5.2 Dystonie précoce non DYT1

Les loci en cause sont **DYT6**, **DYT13** et **DYT7**. La transmission est autosomique dominante (DYT6 et 13) ou récessive (DYT7). La dystonie apparaît à l'**adolescence** et prédomine au niveau de la face et du cou. Pour DYT6 et DYT7, la progression vers une dysphonie sévère et une dysarthrie est décrite.

En ce qui concerne la dystonie DYT6, le gène **THAP1** a été identifié. Une insertion/délétion conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré ainsi que des mutations ponctuelles ont été décelées. THAP1 régule la prolifération cellulaire endothéliale. La mutation provoque l'altération de la liaison à l'ADN et de la régulation transcriptionnelle.

4.1.5.3 La dystonie sensible à la L-DOPA (DYT5)

Elle survient dans l'**enfance** (5-6 ans) et se traduit par une dystonie touchant les membres inférieurs conduisant à une démarche avec rigidité de la jambe. Elle peut aussi toucher les bras, le tronc et plus rarement le cou. Elle est marquée par des variations diurnes, s'aggravant au cours de la journée. Elle se traduit par une hypereflexie, un parkinsonisme avec bradykinésie et une instabilité posturale. Les signes cliniques peuvent être variés. Elle est sensible à de faibles doses de L-DOPA et répond aux anticholinergiques.

Des mutations hétérozygotes du gène **GCH1** sont responsables de cette pathologie. La pénétrance est plus élevée chez les femmes. La GTP-cyclohydroxylase est la première enzyme et le facteur limitant de la synthèse de tetrahydrobioptérine, cofacteur de la tyrosine-hydroxylase. Elle intervient donc dans la **biosynthèse de la dopamine**. Dans certains cas, cette dystonie peut être due à une mutation hétérozygote composite ou homozygote de **GCH1** ou à des mutations hétérozygotes d'autres enzymes intervenant dans la synthèse de la dopamine comme la **tyrosine-hydroxylase**, la 6-pyruvoyltetrahydroptérine-synthase (**6-PTS**) et la **sepiapterine réductase**. Les phénotypes plus sévères sont liés à un déficit en sérotonine, norépinephrine et dopamine.

La dystonie sensible à la L-DOPA se distingue des formes DYT1 et de celles associées à un parkinsonisme juvénile dues à une mutation homozygote ou hétérozygote composite du gène de la parkine.

4.1.5.4 La dystonie-myoclonie (DYT11, DYT15)

Cette forme se caractérise par des mouvements brusques et rapides. La transmission est autosomique dominante, à pénétrance incomplète.

DYT11

Cette dystonie est liée à des mutations perte de fonction du gène **SGCE** (sarcoglycan-epsilon, 7q21), ou à des délétions hétérozygotes qui peuvent emporter tout le gène. Ce gène est soumis à empreinte parentale. Un cas de disomie uniparentale a été rapporté.

Cette famille de gènes code les constituants du **complexe dystrophine-glycoprotéine** : les mutations de l'alpha, bêta, gamma et delta sarcoglycan entraînent une dystrophie musculaire. SGCE est largement exprimé au niveau des neurones du cortex cérébral, des ganglions de la base, de l'hippocampe, du cervelet et du bulbe olfactif. Sa fonction est inconnue.

DYT15

Un second locus, DYT15 en 18p, est associé à cette forme clinique. La myoclonie est le symptôme prédominant associé ou non à une dystonie modérée. La dystonie seule est rare (crampe de l'écrivain). Elle survient dans la première ou deuxième décade et touche le cou et les bras, parfois le tronc. Après une période de progression, les symptômes tendent vers un plateau. Des troubles compulsifs et une alcoolodépendance sont fréquemment observés. La myoclonie a une origine sous-corticale.

4.1.5.5 La dystonie associée à un parkinsonisme d'apparition précoce (DYT12)

Elle se traduit par la survenue soudaine d'une dystonie persistante et d'un parkinsonisme dans l'**enfance** ou chez l'**adulte jeune**. La transmission est autosomique dominante, des mutations *de novo* sont observées. Le gène responsable est localisé en 19q13 et code une sous-unité catalytique **Na⁺/K⁺-ATPase α 3** de la pompe sodium-potassium.

4.1.5.6 Dystonie-parkinsonisme liée à l'X, DYT3

Il s'agit d'une forme héritée récessive liée à l'X. Le gène en cause est **TAF1** (TATA binding protein-associated factor 1). Elle survient chez les garçons aux Philippines. Elle associe une dystonie à un parkinsonisme, voire un parkinsonisme pur. Le phénotype peut être large. Les femmes hétérozygotes peuvent présenter une dystonie modérée ou une chorée.

Les études neuropathologiques montrent une gliose du putamen, du striatum et du noyau caudé. Au niveau du néostriatum, le striosome est impliqué.

4.1.6 Traitements

La connaissance des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la dystonie a conduit à la mise en place de thérapeutiques adaptées. Cependant, le traitement reste symptomatique [Balash 2004].

Il convient en premier lieu d'éliminer par des investigations appropriées les causes de dystonie secondaire et celles répondant au traitement par levodopa.

Parmi les traitements pharmacologiques, sont à noter, l'apport de la **toxine botulique** dans le traitement de la dystonie cervicale et du blépharospasme et celui du **trihexyphénydyl** à forte dose dans le traitement de la dystonie segmentaire et généralisée chez l'enfant et les adultes de moins de 30 ans.

Récemment, la **stimulation cérébrale profonde** a été mise en place afin d'améliorer les troubles dystoniques. La stimulation du globus pallidus interne par stimulation cérébrale profonde chronique inhibe les décharges neuronales dans les cellules les plus proches de l'électrode et provoque une activité excitatrice au niveau des populations neuronales plus éloignées [Pralong 2007]. Ainsi, la modification de l'activité oscillatoire par une stimulation à haute fréquence normalise le tonus musculaire par désynchronisation de certaines ondes de fréquence [Liu 2008].

4.2 Description du cas clinique étudié

4.2.1 Clinique de la patiente

Cette patiente, née au terme d'une grossesse sans particularités, à 40 semaines d'aménorrhée, est eutrophique (taille de 48cm, poids de 3360g et périmètre crânien de 34cm) et a présenté une bonne adaptation néonatale. Il s'agit de la troisième enfant d'une fratrie de trois, aucun antécédent familial n'est rapporté, les parents ne sont pas apparentés.

Les premiers signes sont apparus à l'âge de quatre mois : les parents notent des mouvements anormaux des bras et du tronc.

A six mois, elle présente en plus des épisodes d'opisthotonos sans acquisition du port de tête ni développement des acquisitions psychomotrices. Le contact oculo-moteur est bon, le sourire réponse est présent. On note une **hypotonie axiale** globale.

A neuf mois, les acquisitions psychomotrices stagnent, les **mouvements dystoniques des membres, du tronc et de la tête** gênent considérablement toute tentative de mouvements volontaires. S'y associent par ailleurs des mouvements **myocloniques** à chaque stimulation sonore. Le test à la L-Dopa s'est révélé négatif.

A douze mois, l'introduction de trihexyphénydyl a permis une amélioration de la composante douloureuse de la dystonie. La tenue assise a été acquise à 32 mois.

A quatre ans, il n'y a pas de langage (émission de voyelles mais pas de syllabes). Les

mouvements brusques choréiques persistent, en particulier en situation de fatigue et de stress.

A sept ans, le **retard psychomoteur** est manifeste, **sans acquisition du langage ni de la marche**. Elle bénéficie du soutien du SESSAD (service d'éducation spéciale et de soins à domicile) et d'une prise en charge en orthophonie, ergothérapie et kinésithérapie.

4.2.2 Examens complémentaires

Devant ce tableau clinique, et en particulier la dystonie précoce et sévère, des explorations complémentaires ont été entreprises afin de rechercher une étiologie aux troubles observés chez cette patiente.

4.2.2.1 Explorations cérébrale et métabolique

A l'âge d'un an, l'**IRM cérébrale et l'électroencéphalogramme** sont normaux. La **spectroscopie IRM** a montré un pic de lactates au niveau des noyaux gris centraux, faisant suspecter un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale. Des biopsies musculaire et hépatique n'ont cependant pas mis en évidence de déficit d'activité de la chaîne respiratoire dans ces deux tissus.

Le **bilan métabolique** (ammoniémie, point redox, céruléoplasmine, chromatographie des acides aminés sanguins et urinaires, chromatographie des acides organiques) est sans particularité. Il n'y a pas de déficit en vitamine E, les enzymes leucocytaires sont normales.

4.2.2.2 Caryotype

Il montre une **translocation réciproque** apparemment équilibrée de survenue **de novo** (caryotypes parentaux normaux) entre le bras court du chromosome 3 et le bras long du chromosome 18, les points de cassure étant localisés en p12.3 sur le chromosome 3 et en q23 sur le 18 (figure 4.1).

L'absence d'un autre chromosome partenaire de la translocation a été vérifiée par FISH à l'aide de sondes totales des chromosomes 3 et 18 : les chromosomes dérivés de la translocation étaient marqués en totalité par ces 2 sondes.

4.2.2.3 Elimination d'une cause génétique autre que la translocation

Hybridation génomique comparative en microréseau (array-CGH)

Les pathologies de point de cassure sont des événements exceptionnels. Il a ainsi été montré grâce à la technique d'hybridation génomique comparative en microréseau qu'un déséquilibre génomique submicroscopique était retrouvé dans 40% des cas de translocations apparemment équilibrées [De Gregori 2007]. Cette analyse a donc été réalisée chez notre patiente à l'aide d'une puce à oligonucléotides 105K

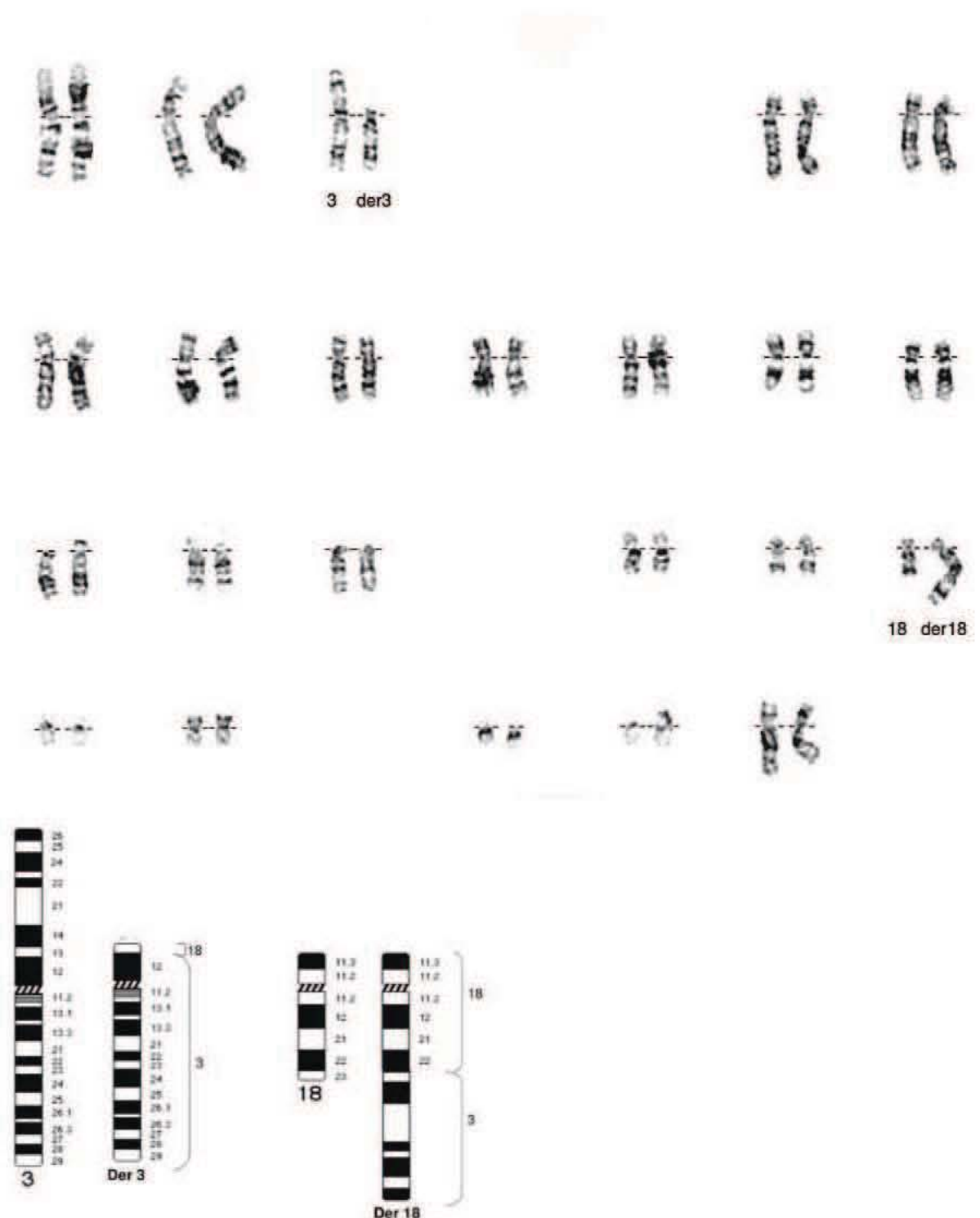


FIG. 4.1 – Caryotype de la patiente : 46,XX,t(3;18)(p12.3;q23)dn et idéogramme des paires chromosomiques 3 et 18.

(Agilent) et n'a montré **aucun déséquilibre génomique** à un seuil de sensibilité estimé à 60kb.

Etude du gène *DYT1*

Dans un premier temps, la délétion 946delGAG (delE302/303) du gène *DYT1*, qui a été impliquée dans la dystonie primaire d'apparition précoce [Ozelius 1997], a été recherchée et écartée.

Par la suite, nous avons séquencé la totalité de la région codante (5 exons) de *DYT1* chez la patiente dans l'hypothèse qu'une variation de séquence autre que celle décrite dans la littérature puisse être à l'origine d'une altération de la torsine A et donc de la dystonie observée chez cette patiente. Après comparaison à un témoin, **aucune variation de séquence** n'a été révélée.

4.2.3 Cartographie des points de cassure

En présence de ce réarrangement de survenue *de novo* et en l'absence d'autre altération génomique évidente à l'origine du phénotype de cette patiente, l'étude de la translocation a été poursuivie afin d'établir si elle pouvait expliquer les signes cliniques observés.

La caractérisation du point de cassure sur les deux chromosomes partenaires de la translocation a donc été entreprise : elle a pour objectif de déterminer si des gènes sont interrompus et dans quelle mesure ils constituent des gènes candidats de la dystonie.

Dans un premier temps, la cartographie physique des régions correspondant aux points de cassure de la translocation est réalisée à l'aide de BAC localisés en 3p12 et 18q23 par FISH.

Une fois les BAC chevauchant les points de cassure déterminés, la cartographie a été précisée grâce à plusieurs techniques de biologie moléculaire (Southern blot, amplification du fragment de jonction par PCR longs fragments) jusqu'au séquençage du point de cassure.

4.2.3.1 FISH

A partir des informations fournies par le caryotype sur la localisation des points de cassure, une cartographie physique par une stratégie de marche sur les chromosomes 3 et 18 a été entreprise.

Dans un premier temps, des BAC localisés en 3p12 et 18q23 ont été sélectionnés *via* les sites UCSC genome browser et Ensembl. Ils constituent autant de sondes pour la réalisation d'une technique de FISH sur chromosomes métaphasiques de la patiente.

Localisation du point de cassure sur le chromosome 3

Vingt BAC localisés sur le bras court du chromosome 3 ont été extraits à partir de cultures bactériennes, leur ADN marqué et hybridé sur les chromosomes métaphasiques de la patiente : leur localisation chromosomique et leur position par rapport

au point de cassure sont résumées dans le tableau 4.2 et la figure 4.2. Le BAC **RP11-1029A24**, s'hybridant à la fois sur les dérivés du 3 et du 18, chevauche le point de cassure sur le chromosome 3. Le signal fluorescent sur le dérivé du chromosome 18 est plus faible voire non visible sur certaines mitoses, ce qui laisse supposer que le point de cassure peut se situer dans la partie 5' du BAC RP11-1029A24 (figure 4.4a). D'autre part, le BAC RP11-113N7 ne semble pas s'hybrider sur les dérivés de la translocation, ce dernier chevauchant partiellement le BAC RP11-1029A24, il est toutefois possible que le point de cassure se situe au niveau de l'extrémité 3' de RP11-113N7. Les BAC encadrant le point de cassure sont RP11-588D3 (proximal) et RP11-26M20 (distal), ce qui réduit à **41,6kb** la région d'incertitude sur le point de cassure sur ce chromosome. Le gène **ROBO1** est en partie contenu dans cet intervalle : le point de cassure se situerait **entre les introns 8-9 et 20-21** de ce dernier (entre 78 777 601 à 78 819 202pb).

Le transcrit de référence utilisé est le transcrit NM_002941, l'exon 1 correspondant au premier exon codant. Par la suite, la numérotation des exons et introns de **ROBO1** font référence à ce transcrit.

BAC	Localisation du BAC en pb à partir de l'extrémité du bras court (hg18)	Taille du BAC en pb	Position du BAC par rapport au point de cassure
RP11-237K2 (AC130004.4)	77 020 165-77 138 863	118 699	distal
RP11-54A6 (AC138974.2)	77 261 842-77 292 316	30 475	distal
RP11-88K11 (AC131005.3)	77 290 313-77 481 543	191 231	distal
RP11-342C2 (AC133040.3)	77 652 533-77 781 873	129 341	distal
RP11-33G11	78 075 136-78 227 458	152 323	distal
RP11-354H21	78 125 060-78 271 856	146 797	distal
RP11-314M24	78 353 006-78 520 746	167 740	distal
RP11-347G18	78 520 512-78 684 942	164 431	distal
RP11-77C5	78 601 397-78 754 813	153 417	distal
RP11-26M20	78 628 016-78 775 281	147 266	distal
RP11-113N7	78 672 830-78 829 803	156 973	?
RP11-1029A24	78 777 601-78 963 298	185 698	chevauchant
RP11-588D3 (AC055731.22)	78 819 202-78 971 738	152 537	proximal
RP11-392P21	78 837 732-78 994 782	157 051	proximal
RP11-95L24	78 930 945-79 091 816	160 872	proximal
RP11-30H24	78 949 935-79 102 388	152 454	proximal
RP11-268F24 (AC016946.15)	79 036 422-79 197 544	161 123	proximal
RP11-539J20 (AC123565.6)	79 195 541-79 351 703	156 163	proximal
RP11-168E23 (AC125815.6)	79 715 929-79 755 919	39 991	proximal
RP11-26H10	80 133 805-80 297 110	163 306	Mal localisé

TAB. 4.2 – Liste des BAC hybridés localisés sur le chromosome 3, leur localisation chromosomique et leur position par rapport au point de cassure sur le der3.

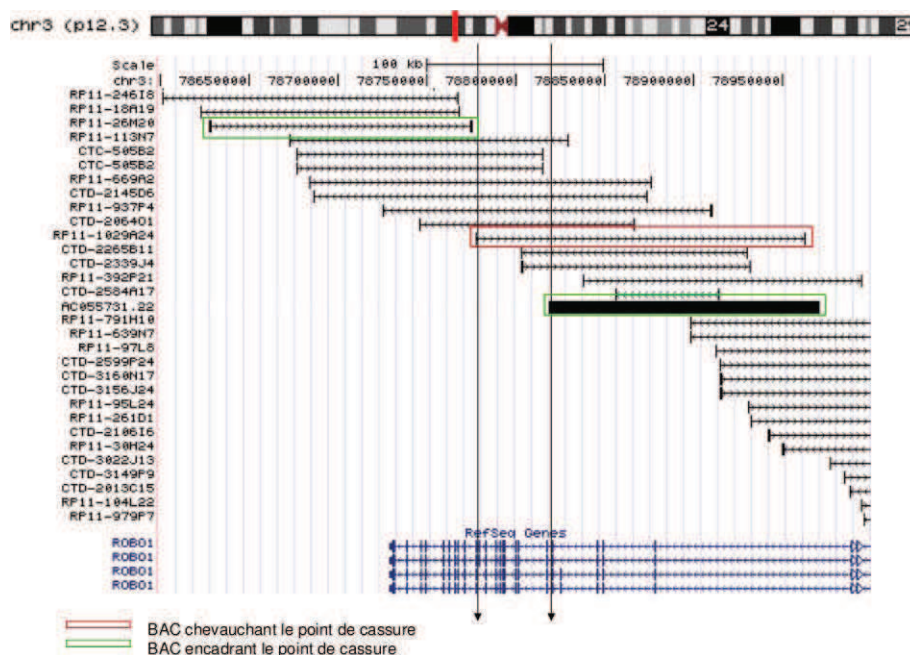


FIG. 4.2 – Cartographie du point de cassure sur le chromosome 3 à l'aide de sondes BAC. La région d'incertitude est entre les deux flèches. Source : UCSC genome browser.

Localisation du point de cassure sur le chromosome 18

Dix BAC localisés sur le chromosome 18 ont été hybridés (tableau 4.3). Le BAC chevauchant le point de cassure sur ce chromosome et s'hybridant par conséquent sur les deux dérivés de la translocation est **RP11-1O5** (figure 4.4b). Les BAC flanquants sont RP11-153A9 (proximal) et RP11-97B19 (distal) (figure 4.3), d'où une incertitude d'environ **77kb** (de 74 513 019 à 74 590 814pb).

Aucun gène connu n'est inclus dans cet intervalle.

BAC	Localisation du BAC en pb à partir de l'extrémité du bras court (hg18)	Taille du BAC en pb	Position du BAC par rapport au point de cassure
RP11-427K14	74 125 464- 74 285 900	160 437	proximal
RP11-153A9	74 370 014- 74 513 019	143 006	proximal
RP11-1O5	74 446 524- 74 590 814	144 291	chevauchant
RP11-97B19	74 608 135- 74 790 135	182 001	distal
RP11-62G9	74 608 123-74 791 284	183 162	distal
RP11-1057F2	74 751 831- 74 914 669	162 839	distal
RP11-344D12	74 827 322-75 009 191	181 863	distal
RP11-345O15	74 859 536-75 017 098	157 563	distal
RP11-298P14	74 922 639-75 091 266	168 628	distal
RP11-676O1	75 520 078- 75 703 532	183 455	distal

TAB. 4.3 – Liste des BAC hybridés localisés sur le chromosome 18 et leur position par rapport au point de cassure.

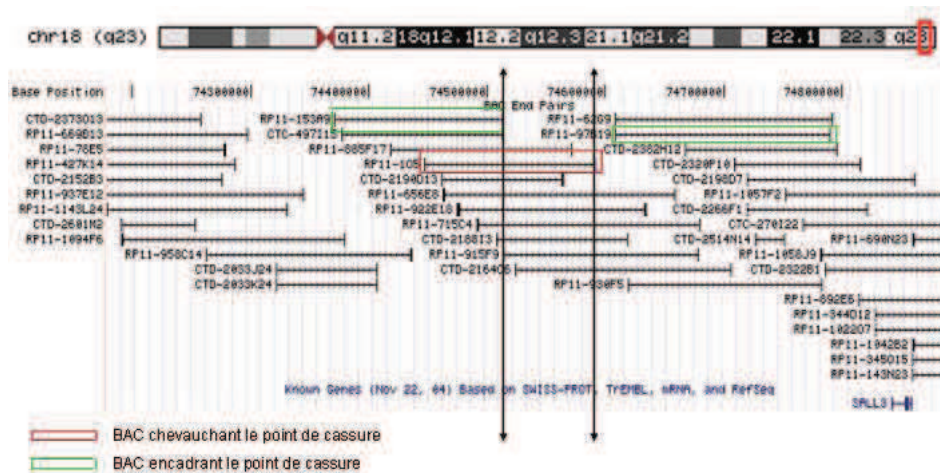


FIG. 4.3 – Cartographie du point de cassure sur le chromosome 18 à l'aide de sondes BAC. La région d'incertitude est entre les deux flèches. Source : UCSC genome browser.

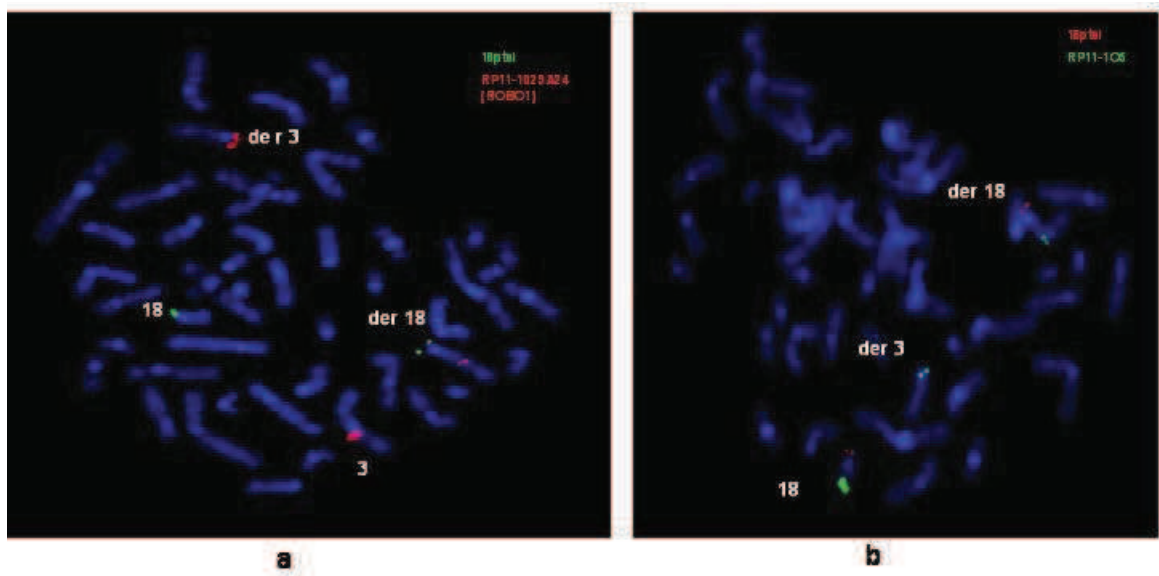


FIG. 4.4 – FISH sur chromosomes métaphasiques de la patiente.

(a) BAC RP11-1029A24 (chromosome 3) chevauchant le point de cassure avec un signal sur le chromosome 3 et 2 signaux plus faibles sur les dérivés de la translocation.

(b) BAC RP11-105 (chromosome 18) chevauchant le point de cassure avec un signal sur le chromosome 18 et 2 signaux sur les dérivés de la translocation.

Une sonde subtélomérique en 18ptel est utilisée comme sonde témoin.

4.2.3.2 Southern blot

Cette translocation aboutit à l'interruption d'un gène connu uniquement sur le chromosome 3, c'est pourquoi la recherche d'un fragment de jonction a tout d'abord été entreprise par Southern blot à partir de sondes localisées dans le gène *ROBO1* en 3p12.

Les enzymes de restriction reconnaissent une séquence spécifique de l'ADN et le coupent à ce niveau, conduisant à la détection de fragments d'ADN de tailles définies, par Southern blot. La modification de la séquence génomique sur le chromosome 3 transloqué entraîne l'apparition ou la disparition de sites de restriction et donc une modification du profil de restriction. Des sondes d'ADNc synthétisées par RT-PCR, d'une taille d'environ 600 à 720pb, ont été choisies de façon à couvrir la région d'incertitude du point de cassure sur le chromosome 3, soit entre les exons 6 et 22. Dans un premier temps, les sondes localisées entre les exons 6 et 10 (sonde A), et 10 et 14 (sonde B) ont été utilisées : seule la sonde B a montré une modification du profil de restriction chez la patiente par rapport aux 2 témoins, avec l'apparition d'une bande supplémentaire pour 4 enzymes sur 6 (*XbaI*, *EcoRI*, *HindIII* et *BamHI*). Afin de restreindre d'avantage la région du point de cassure, la sonde C, couvrant les exons 11 à 13 de *ROBO1*, a été utilisée : une bande supplémentaire est observée chez la patiente par rapport aux témoins pour les mêmes enzymes de restriction (figure 4.5).

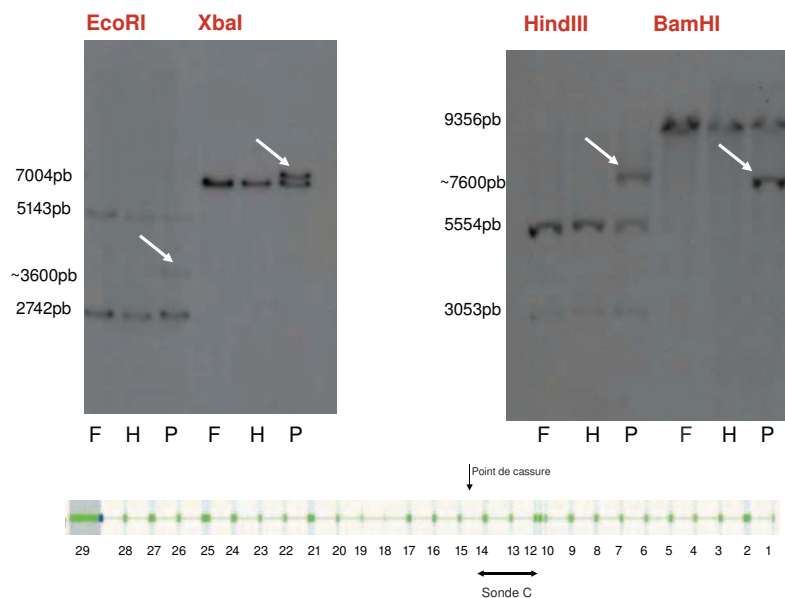


FIG. 4.5 – Southern blot avec la sonde C : Profil de restriction des enzymes *EcoRI*, *XbaI*, *HindIII* et *BamHI* après digestion des ADN de 2 témoins (F et H) et celui de la patiente (P). Les fragments supplémentaires chez la patiente sont indiqués par les flèches. Le marqueur de taille utilisé est λ HindIII.

L'estimation du point de cassure sur le chromosome 3 a été déduite de l'étude du profil de restriction de l'enzyme *EcoRI*. En effet, des sites de restriction de cette enzyme ont été localisés grâce au logiciel RestrictionMapper¹ dans l'intron 9, dans l'exon 12 et dans l'intron 13 de *ROBO1*, conduisant à 2 fragments de 2742 et 5143pb. L'étude du profil de restriction d'*EcoRI* après marquage par la sonde C chez la patiente a mis en évidence ces derniers ainsi qu'un fragment supplémentaire d'une taille estimée à 3600pb dû à l'apparition d'un nouveau site de restriction du fait de la translocation : il apparaît donc que **le point de cassure se situe dans l'intron 13, au maximum 3600pb après le début de celui-ci** (figure 4.6).

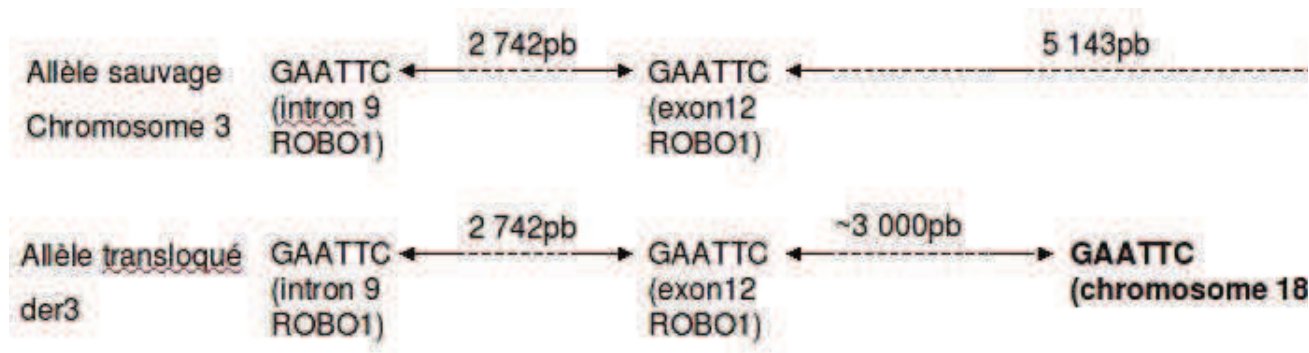


FIG. 4.6 – Positions des sites de restriction d'*EcoRI* (GAATTC) au niveau du point de cassure sur le chromosome 3 et le der3 et taille des fragments observés : le site apparu suite à la translocation est en gras.

4.2.3.3 Isolement et séquençage du fragment de jonction

Si l'incertitude sur la position du point de cassure sur le chromosome 3 est relativement faible, elle est encore de 70kb sur le chromosome 18. La technique de PCR longs fragments a alors été entreprise afin d'amplifier et d'isoler un fragment de jonction sur le dérivé du chromosome 3 d'une taille maximale d'environ 10kb dans le but de procéder au séquençage de la région de part et d'autre du point de cassure. L'amorce sens utilisée pour la PCR est localisée dans l'exon 11 de *ROBO1*, alors que les 9 amorces anti-sens testées sont localisées tous les 10kb dans la séquence du BAC RP11-1O5 chevauchant le point de cassure sur le chromosome 18.

Un fragment d'une taille approximative de 9kb a ainsi été amplifié, purifié et séquencé à partir du dérivé du chromosome 3 dans un premier temps. Ce résultat a ensuite été confirmé par séquençage à partir d'une amorce localisée sur le dérivé du chromosome 18. Le point de cassure est donc situé en position **78 799 194** sur le chromosome 3 (base 529 de l'intron 13 de *ROBO1*) et en position **74 534 358** sur le chromosome 18 (construction génomique hg18).

¹<http://www.restrictionmapper.org>

Les jonctions sont les suivantes :

- jonction 18-3 (du télomère vers le centromère) sur le dérivé du chromosome 3 : insertion d'une paire de bases et délétion de 9pb de l'intron 13 de *ROBO1*
- jonction 18-3 (du centromère vers le télomère) sur le dérivé du chromosome 18 : insertion de 11pb (figures 4.7 et 4.8).

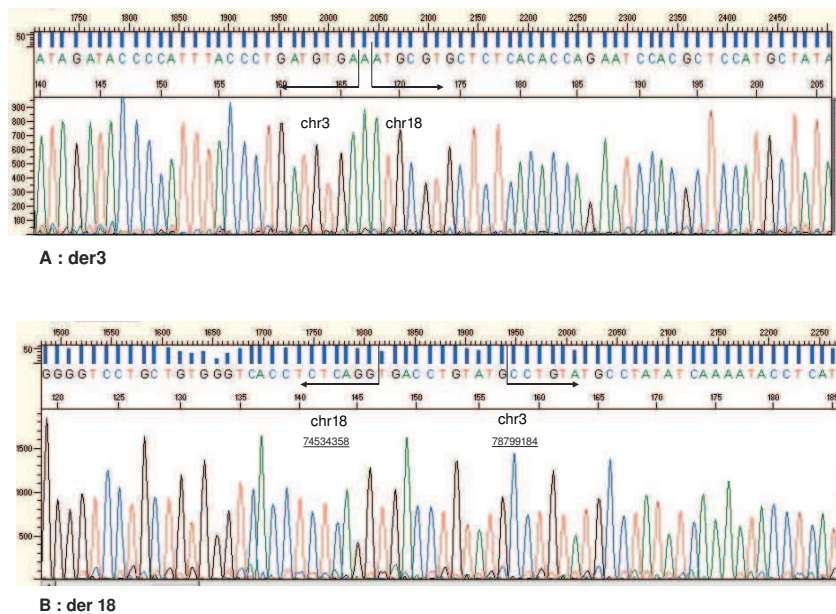


FIG. 4.7 – Séquençage de la région entourant les points de cassure. (A) à partir du dérivé du chromosome 3. (B) à partir du dérivé du chromosome 18)

Il est à noter qu'une deuxième approche a été envisagée en parallèle afin de réduire l'incertitude sur la position du point de cassure sur le chromosome 18 par marche sur le chromosome à l'aide de sondes de FISH de 10kb synthétisées par PCR, couvrant le BAC RP11-105. Ceci n'a cependant pas abouti, en raison de l'absence de signal de fluorescence spécifique après hybridation sur les chromosomes métaphasiques de la patiente. Ce problème pourrait s'expliquer d'une part par la difficulté de visualisation des signaux de fluorescence de sondes de taille relativement faible et d'autre part par les difficultés rencontrées lors de la synthèse de ces sondes et de leur purification.

Ceci a donc montré que le gène *ROBO1* était interrompu par la translocation sur le chromosome 3, alors qu'aucun gène connu n'est décrit au point de cassure sur le chromosome 18.

4.3. Détermination de l'origine parentale du chromosome 3 transloqué

Dérivé 3

```
GTGGCCTCGTCTTAACTCACTGATGGCATTGATGGCCCTGTTTCCAAAAGTCACATCCCT
GGCACAGTGGGTAGGACGTCCACACATCTCTTTGGGGAACACGGCTCTGTCTATAGCATG
GAGCGTGGATTCTGGGTGAGAGCACGCAT]T]
GCATAATAA
TCACATCAGGGTAAATGG
GGTATCTATCACCTCAATCATTIATCCTTTGTTTGTGTTACAAACATTCCAGTTATACTTTA
TTTAAAAATGTACAATAAATTATTATTGACTGCAGTCACCTTGTGCTAT
```

Dérivé 18

```
GCACCTCCCACTTCTCTGTCCGCACAGCAAACCTTCTCTGGAGAAGCCTGAGTTCACATGTG
GAGCCCGTGCCTCCCGGATTCTGCACGGTGGGTCTCTTCCAGCCCCCTCTGCTCCCTTAGG
CTGGGTGCCGTGGCCCCCACCAGCCCTTGGGGTCTGCTGTGGGTACCTCTCAGG]TGA
CCTGTATG[CCTGTATGCCATATCAAAAATACCTCATGTACCCATAAATATATACACCTGTT
AGTACCCATAAATTTTAAAAATATGTGAATATTGTGTATTCTATTCATTTCCCTGAATTTT
AAATATGGTAACATGTAGGTGTACAATCTTAATCATATTATAATTGTATTTAAATTAACC
AAATTTTATTATTATAAGTTCAGTACTCACAACTTCTG
```

FIG. 4.8 – Séquences aux points de cassure sur les 2 dérivés de la translocation. En rouge : séquence du chromosome 18, en bleu : séquence du chromosome 3, en noir : bases insérées, en vert : bases délétées sur le dérivé 3.

4.3 Détermination de l'origine parentale du chromosome 3 transloqué

La recherche d'un SNP de *ROBO1* à l'état hétérozygote chez la patiente et à l'état homozygote chez l'un de ses parents a pour but de définir l'origine parentale du chromosome 3 transloqué.

Ainsi, le séquençage de l'**ADN génomique** de l'exon 12 de ce gène pour mettre en évidence le **SNP rs2271151** situé dans cet exon donne les résultats suivants :

- ADN_g de la patiente : A/G
- ADN_g de la mère : A/G
- ADN_g du père : G/G

La patiente a donc hérité de l'allèle portant le nucléotide A de sa mère et de l'allèle portant le nucléotide G de son père.

Après retrotranscription, le séquençage de l'**ADNc** de la patiente (amorces dans les exons 10 et 14) révèle la présence de l'allèle maternel (A) uniquement.

En parallèle, le séquençage de ce même exon chez un témoin hétérozygote pour ce SNP, à partir d'ADN_g et d'ADN_c après rétrotranscription des ARNm, a révélé l'expression des 2 allèles.

Ceci est donc en faveur d'une absence d'expression de l'ARNm d'un allèle chez la patiente en raison d'une absence de transcription due à l'interruption de la séquence de *ROBO1*. L'allèle paternel étudié ici par un fragment de PCR chevauchant le point de cassure (amorces dans les exons 10 et 14) ne s'exprime pas du fait de la translocation qui interrompt *ROBO1* (figure 4.9). Le chromosome transloqué est

donc le chromosome 3 d'origine **paternelle**.

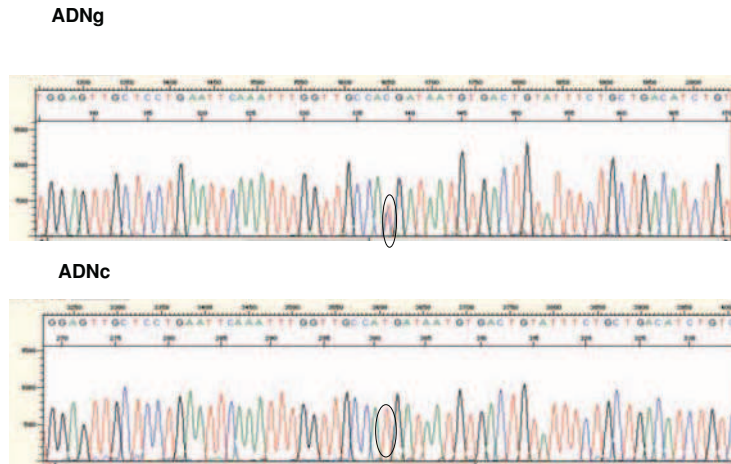


FIG. 4.9 – Séquençage de l'exon 12 de *ROBO1* contenant le SNP rs2271151 (entouré en noir) à partir d'ADNg et d'ADNc de la patiente.
ADNg : T/C, ADNc : T (brin anti-sens).

Une fois les points de cassure sur les 2 chromosomes partenaires de la translocation précisés, l'étude *in silico* des régions 3p12.1 et 18q23 dans un intervalle de 1Mb de part et d'autre des points de cassure a été réalisée dans l'objectif d'établir :

1. quels sont les gènes candidats pour la dystonie en fonction de leurs actions physiologiques et de leur profil d'expression,
2. si l'interruption de gènes candidats est à l'origine des troubles observés ou si un effet de position sur des gènes à proximité du point de cassure peut être envisagé.

Dans un second temps, une étude fonctionnelle de ces gènes est envisagée afin de les relier éventuellement au phénotype pathologique de cette enfant.

4.4 Etude de la région encadrant le point de cassure sur le chromosome 3

4.4.1 Cartographie de la région 3p12

Hormis *ROBO1*, aucun gène n'a été décrit dans un intervalle de 1Mb de part et d'autre du point de cassure.

La cartographie de cette région est représentée avec les gènes les plus proches de part et d'autre du point de cassure, leur distance par rapport à celui-ci, les 2 ARN non codants décrits par [Angeloni 2006] et [Ghosh 2009] et les séquences hautement conservées non codantes dans la région proximale au point de cassure, dans un intervalle d'1Mb (figure 4.10).

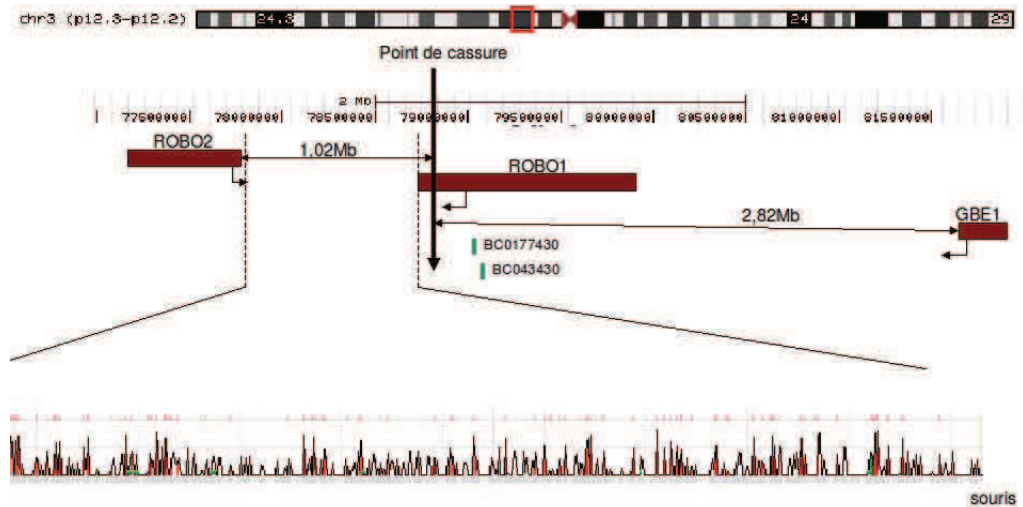


FIG. 4.10 – Gènes les plus proches du point de cassure (rectangles rouges, sens de transcription indiqué par une flèche), ARN non codants décrits par [Angeloni 2006] (rectangles verts) et séquences hautement conservées entre l'homme et la souris (en rouge : séquences de plus de 350pb présentant plus de 77% d'homologie) en 3p12.

4.4.1.1 Recherche d'un effet de position

Les **séquences hautement conservées** intergéniques dans un intervalle de 1Mb de part et d'autre du point de cassure sur le chromosome 3 ont été recherchées.

Si le seuil d'homologie est fixé à plus de 77% sur plus de 350pb entre l'homme et la souris [Ovcharenko 2004], plus de 90 séquences hautement conservées sont localisées dans l'intervalle séparant les gènes des 2 récepteurs *ROBO1* et 2.

Par contre, aucune séquence de plus de 100pb présentant 100% d'homologie entre l'homme et la souris et plus de 97% d'homologie entre l'homme et le poulet (critères identiques à ceux qui ont permis l'identification de séquences régulatrices sur le chromosome 18 par [Rizzolio 2008]) n'est répertoriée dans la base de données ECR browser².

A l'issue de cette analyse *in silico* et sans indication d'études fonctionnelles apportant la preuve de l'existence de séquences régulatrices dans cette région, il est difficile de se positionner quant à leur existence ou non.

L'effet de position lié à ces séquences, de par leur rapprochement avec un gène putatif situé sur le chromosome 18 pourrait avoir un effet sur celui-ci. Par contre, les séquences régulatrices situées sur le chromosome 18, se retrouvant à proximité de *ROBO2*, gène localisé sur le der18 suite à la translocation pourraient réguler son expression.

La localisation des gènes sur les 2 dérivés de la translocation est indiquée sur la figure 4.11.

²<http://ecrbrowser.dcode.org>

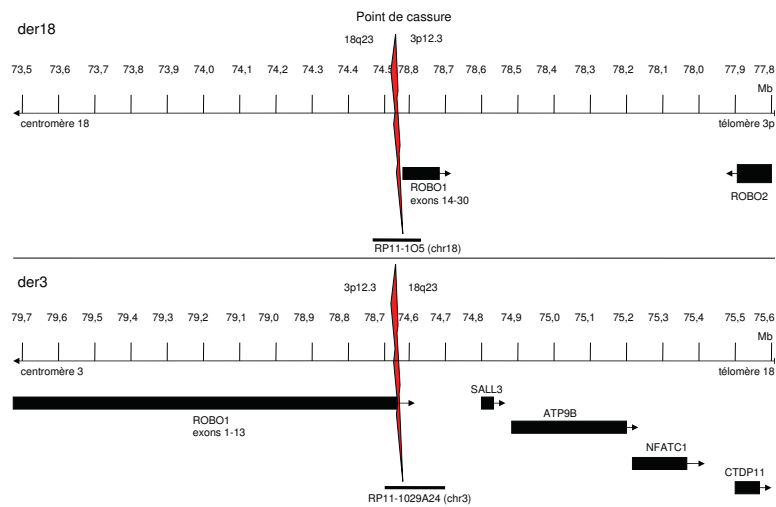


FIG. 4.11 – Représentation des gènes 1Mb de part et d'autre des points de cassure sur les chromosomes transloqués (sens de transcription indiqué par une flèche)

ROBO2

L'analyse de l'ARNm de *ROBO2*, gène le plus proche du point de cassure sur le der18, pourrait apporter des arguments pour appuyer ou réfuter la thèse d'un effet de position à ce niveau.

Ce gène est un récepteur membranaire de la même famille que *ROBO1*. Il est impliqué, au même titre que *ROBO1*, dans le guidage axonal.

L'interruption de ce gène suite à une translocation et la mise en évidence de mutations faux-sens ségrégeant avec la maladie ont par ailleurs conduit à le mettre en cause dans la survenue d'un reflux vésicourétéral [Lu 2007].

Afin d'évaluer l'effet de la translocation sur l'expression de ce gène, nous avons voulu déterminer si le niveau d'expression d'ARNm de *ROBO2* chez la patiente était modifié par rapport à un témoin.

Malheureusement, la quantification par RT-QPCR n'a pas abouti (aucune amplification n'a été décelée à partir des 2 couples d'amorces sélectionnés) très probablement en raison de son faible taux d'expression dans le sang.

GBE1

Le gène le plus proche du point de cassure sur le chromosome 3 dans la région proximale est *GBE1* (enzyme branchante du glycogène) (MIM 607839). Il intervient dans la voie de biosynthèse du glycogène. Un déficit en *GBE1* est responsable de la glycogénose de type 4 (MIM 232500) de transmission autosomique récessive et de la maladie à corps de polyglucosan (MIM 263570) de l'adulte.

Etant situé à plus de 2,8Mb du point de cassure, il est peu probable que son expression soit affectée par un effet de position, de plus les conséquences d'un déficit

ne correspondent pas aux signes cliniques observés chez la patiente de cette étude. Il n'a donc pas été étudié.

4.4.2 ROBO1 : roundabout, homologue 1 (*Drosophila*)

Ce gène est interrompu du fait de la translocation, il apparaît donc comme le gène candidat le plus probable pour la dystonie syndromique.

4.4.2.1 Le gène *ROBO1* (MIM 602430)

Ce gène a été initialement cloné et caractérisé chez la *Drosophile* par [Kidd 1998]. Des séquences homologues et une expression d'ADNc au niveau du cerveau fœtal chez l'homme ont par ailleurs été mis en évidence, ce qui a conduit à la découverte de *ROBO1* chez l'homme.

Il est localisé sur le bras court du chromosome 3, en 3p12.3 et couvre 1170,76kb (79 899 837-78 729 080pb) (NCBI36, mars 2006).

4.4.2.2 Les transcrits de *ROBO1*

Quatre transcrits différents ont été identifiés, référencés dans RefSeq et annotés suite au projet ENCODE. Ils comportent de 28 à 31 exons. La transcription se fait à partir du brin anti-sens.

- Le variant 1 (NM_002941.3) (transcrit de 6925pb) code le plus grand des isoformes (a) (1651 acides aminés)
- Le variant 2 (NM_133631.2) (transcrit de 7509pb) code l'isoforme b (1612 acides aminés)
- Le variant 3 (NM_001145844.1) (transcrit de 5227pb) code l'isoforme c (1606 acides aminés)
- Le variant 4 (NM_001145845.1) (transcrit de 4838pb) code l'isoforme d (1551 acides aminés).

Ces transcrits diffèrent par leur promoteur et la région 5'UTR. Leur site d'initiation de la traduction est donc différent, ce qui aboutit à des isoformes plus courts comportant une région N-terminale distincte de celle de l'isoforme a. La région 5'UTR des variants 2, 3 et 4 comporte en outre un cadre de lecture ouvert (uORF) de 55 acides aminés. Les transcrits 3 et 4 possèdent respectivement 2 et 3 exons internes différents par rapport au 1.

- Ils possèdent un exon supplémentaire de 9pb entre les exons 8 et 9 du transcrit 1,
- l'exon 23 du transcrit 1 est différent pour le transcrit 4,
- l'exon 20 du transcrit 1 est absent des transcrits 3 et 4.

Ces différents transcrits sont représentés sur la figure 4.12 ci-dessous.

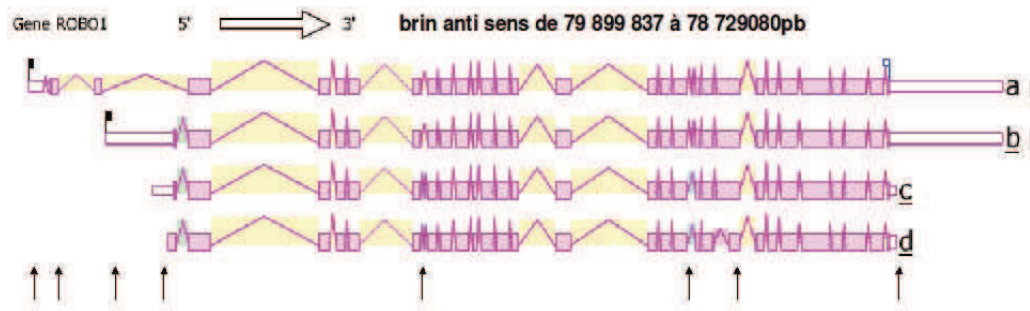


FIG. 4.12 – Transcrits de *ROBO1* (RefSeq). Les exons codants sont représentés par les rectangles roses pleins proportionnels à la taille, les régions 5'UTR (à gauche) et 3'UTR (à droite) par des rectangles roses vides, les introns par les lignes roses. Les flèches indiquent les exons variant entre les différents transcrits. Source : AceView (NCBI).

4.4.2.3 Structure de la protéine ROBO1

ROBO1 est un récepteur transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Il est fortement conservé entre les espèces (drosophile, nématodes et mammifères) et présente ainsi plus de 95% d'homologie entre le rat et l'homme [Kidd 1998], [Zallen 1998].

Cette protéine de 181kDa est constituée de 1551 à 1651 acides aminés selon les isoformes et comporte **5** domaines **immunoglobulines** (IgD) et **3** domaines **fibronectine de type III** (FNIII) extracellulaires, un domaine **transmembranaire** et une région **cytoplasmique** de 457 acides aminés.

Les **deux premiers domaines Ig**, les plus conservés, sont nécessaires à la **liaison** de ce récepteur à son ligand **SLIT2** : l'absence de l'un ou l'autre de ces domaines entraîne en effet un défaut de liaison de SLIT2 à son récepteur et altère son activité [Liu 2008], même si la liaison physique à SLIT2 se fait par le biais du domaine Ig1 [Morlot 2007].

Par ailleurs, les domaines **Ig** ainsi que les domaines **fibronectine** interviennent dans la **liaison homophile** de ce récepteur, sans que l'un d'eux ne joue toutefois un rôle critique comme le montre la perte seulement partielle de liaison en cas d'absence d'un de ces domaines [Liu 2008] (figure 4.13).

La région **intracytoplasmique** comporte 4 domaines conservés (CC0 à CC3) qui participent à la **régulation de l'action répulsive de SLIT** : CC0 et CC1 comportent des résidus tyrosine qui peuvent être phosphorylés par la protéine kinase Abelson, le motif CC2 se lie à la protéine Enable (chez la drosophile) qui participe à la transduction du signal, alors que le motif riche en proline CC3 se lie avec le

domaine SH3 des protéines srGAP (Slit-Robo Rho GTPase activating proteins) pour assurer la transduction du signal [Wong 2001].

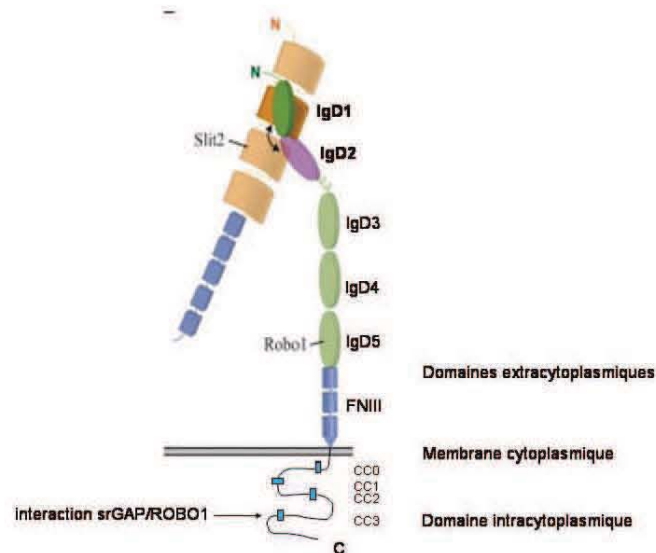


FIG. 4.13 – Structure du récepteur transmembranaire ROBO1 et interaction avec son ligand SLIT2. Le domaine IgD1 est responsable de la liaison avec SLIT2. Les 4 domaines conservés intracellulaires sont représentés par des rectangles bleus. D'après [Morlot 2007].

4.4.2.4 Expression de ROBO1

Le profil d'expression de l'ARNm de *ROBO1* chez l'homme, déterminé à partir de puces d'expression, montre une expression ubiquitaire avec toutefois une prédominance au niveau du système nerveux central, surtout au niveau du **cerveau fœtal** [Su 2004].

Au niveau périphérique, l'expression est la plus forte est retrouvée dans les **lymphoblastes** (constituant donc un bon modèle d'étude de ce point de vue) alors qu'elle est faible au niveau des autres cellules sanguines. Puis par ordre d'importance, on retrouve les muscles lisses avec les cardiomyocytes (figure 4.14).

Le profil d'expression chez l'animal, en particulier chez la souris, est identique.

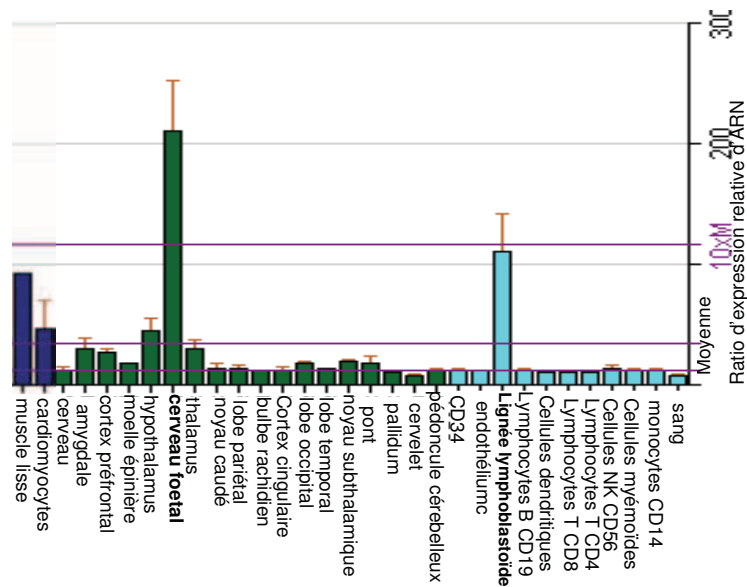


FIG. 4.14 – Expression relative de l'ARNm de *ROBO1* chez l'homme au niveau des 3 systèmes pour lesquels le niveau d'expression est le plus élevé (muscle lisse, système nerveux central et cellules sanguines). Source : BioGPS (<http://biogps.gnf.org>).

4.4.2.5 Fonctions

ROBO1 est un récepteur membranaire présentant des homologies avec la famille des molécules d'adhérence cellulaire neuronale (ou NCAM : neural cell adhesion molecules).

Il intervient, au cours du développement du système nerveux central, dans le guidage axonal et la migration des précurseurs neuronaux *via* l'interaction avec son ligand SLIT.

Le guidage axonal

Le guidage axonal est un mécanisme qui intervient au cours du **développement embryonnaire** du système nerveux central. Durant cette période, la croissance axonale est orientée par des molécules de leur environnement cellulaire pour leur permettre d'atteindre leur cible finale et d'établir des synapses de contact.

Les axones des neurones ipsilatéraux ont une cible située du même côté du corps alors les axones des neurones controlatéraux doivent franchir la ligne médiane (ou axe longitudinal séparant le système nerveux en deux moitiés symétriques) pour atteindre leur cible.

Cette décision binaire et irréversible repose sur des **informations** directionnelles **attractives ou répulsives** issues soit de molécules produites par les tissus de leur environnement soit de molécules diffusibles établissant un gradient de concentration. Les axones commissuraux, capables de traverser la ligne médiane sous l'influence de molécules attractives telles que la nétrine sécrétée par les cellules gliales du plancher

du tube neural, sont ensuite soumis à des signaux répulsifs faisant intervenir notamment **SLIT** sécrété par les cellules gliales, et son récepteur **ROBO1** qui **empêchent les passages successifs de la ligne médiane** [Tessier-Lavigne 1996] (figure 4.15).

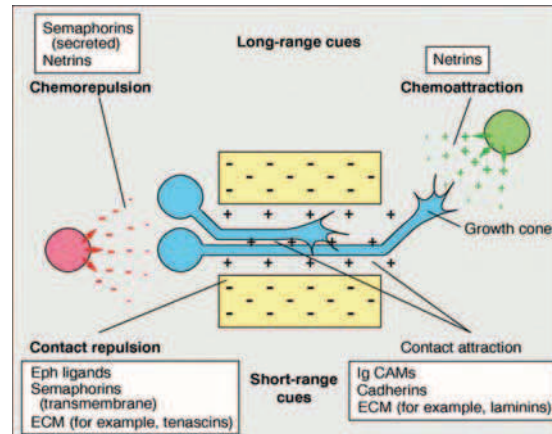


FIG. 4.15 – Mécanismes contrôlant le guidage des cônes de croissance axonaux : attraction (+) ou répulsion (-) par contact, chimioattraction (vert) et chimiorépulsion (rouge). D'après [Tessier-Lavigne 1996].

Chez la Drosophile, le récepteur Robo1 contrôle, *via* son interaction avec son ligand Slit, la **décussation de la ligne médiane ventrale** au niveau de la moëlle épinière. Il empêche le passage de la ligne médiane par les axones à projection ipsilatérale ainsi que les passages successifs de la ligne médiane par les axones commissuraux une fois la ligne médiane franchie. Ceci a été montré par l'étude de mutants *Robo1*^{-/-} qui présentent des anomalies du passage de la ligne médiane : tous les axones croisent la ligne médiane, et les axones commissuraux la traversent à plusieurs reprises [Kidd 1998].

Chez les mammifères, en particulier chez le rat et la souris, les récepteurs Robo1 et Robo2 jouent le même rôle aux niveau des axones commissuraux de la moëlle épinière comme en témoigne leur niveau d'expression plus élevé à la surface de ces derniers après passage de la ligne médiane [Kidd 1998], [Long 2004]. Les souris knock-out *Robo1*^{-/-} sans expression protéique de ce récepteur présentent en outre une croissance aberrante, un envahissement du plancher dorsal et une défasciculation des axones avec soit un blocage des axones à ce niveau soit des passages successifs de la ligne médiane au moment où ces axones effectuent normalement leur passage de celle-ci. Par contre, avant le franchissement de la ligne médiane, la localisation des axones commissuraux est normale, confirmant le rôle de Robo1 dans le **guidage axonal au niveau de la moëlle épinière** [Long 2004].

Rôle au niveau du prosencéphale

Chez la souris, Robo1 est également exprimé au niveau des **commissures cérébrales** et des axones décussés au niveau du **corps calleux**, du **chiasma optique** et de l'**axe corticospinal** [Sundaresan 2004]. A partir d'un modèle murin knock-out *Robo1*^{-/-}, [Andrews 2006] ont mis en évidence les fonctions de Robo1 au niveau du prosencéphale.

- Il est nécessaire à la formation du corps calleux et de la commissure de l'hippocampe.
En son absence, les axones forment des faisceaux serrés ou qui se projettent de façon ectopique. Il permet en outre de maintenir une certaine distance entre les axones du corps calleux et ceux de la commissure de l'hippocampe.
- Il intervient dans la régulation temporelle de la migration des projections corticothalamiques et thalamocorticales.
Ces projections atteignent en effet leur cible prématurément lorsque Robo1 est absent.
- Il affecte la migration des interneurons corticaux à partir du télencéphale ventral.
Une augmentation du nombre d'interneurons entrant dans le cortex cérébral à partir de l'encéphale antérieur ventral durant la corticogénèse a été observée chez les souris knock out *Robo1*^{-/-}.
- Robo1 serait nécessaire à la répulsion des interneurons à la périphérie du striatum : en l'absence de Robo1, ces neurones migrent à travers le striatum et ne sont pas repoussés par lui [Andrews 2006].

Chez la souris, Robo1 est donc impliqué à la fois dans la **migration cellulaire**, **la croissance des axones et le guidage axonal**.

Interactions ROBO1/ROBO2

L'intervention du système Slit-Robo dans le guidage axonal passe par le biais de la liaison de Slit à son récepteur Robo1, mais ce mécanisme répulsif s'exerce également par le biais d'autres récepteurs Robo. Il semble en particulier que Robo1 et Robo2 coopèrent pour assurer leurs fonctions.

Robo1 et Robo2 agissent en effet en collaboration pour assurer le guidage axonal au niveau du tractus latéral olfactif [Fouquet 2007] mais également au niveau du prosencéphale [López-Bendito 2007].

A partir d'un modèle knock-out *Robo1/2*, [Tamada 2008] ont montré que ces 2 récepteurs jouent un rôle dans la traversée de la ligne médiane par les axones cérébellifuges, sans toutefois pouvoir établir lequel de ces 2 récepteurs avait un rôle prépondérant.

Autres fonctions de ROBO1

ROBO1 intervient également dans la **migration cellulaire** au niveau **périphérique**.

SLIT **inhibe le chimiotactisme leucocytaire**, en partie *via* son interaction avec ROBO1 [Wu 2001].

Slit et Robo (1 et 2) participent, chez la Drosophile, à la **morphogénèse cardiaque** : les mutants *Robo1* présentent des défauts d'alignement des cellules cardiaques au cours du développement embryonnaire [Qian 2005].

Slit2 est régulé positivement à la suite d'une sensibilisation à un allergène au niveau de la peau et inhibe la migration des cellules de Langherans, conduisant à une perte de l'hypersensibilité de contact. Il agit alors comme un facteur anti-inflammatoire au cours de l'initiation de la **réponse immunitaire** [Guan 2003].

ROBO1 est impliqué dans l'apparition de différents **cancers** : l'hyperméthylation de son promoteur a été retrouvée dans le carcinome mammaire, rénal et pulmonaire. Elle est associée à la délétion du second allèle dans le cancer du sein et les carcinomes rénaux, en faisant un bon candidat en tant que gène suppresseur de tumeur [Dallol 2002]. Une inactivation biallélique est également retrouvée dans le cas de lésions dysplasiques de la tête et du cou [Ghosh 2009]. Par contre, une surexpression de *ROBO1* est rapportée dans le carcinome hépatocellulaire [Ito 2006].

4.4.3 Etude de ROBO1

Au vu de ces données, *ROBO1* est apparu comme un bon gène candidat de la dystonie et de l'altération des fonctions cognitives chez cette enfant. C'est pourquoi nous avons cherché à évaluer les conséquences de l'interruption de ce gène par la translocation sur :

- la **transcription** (par étude de l'expression de l'ARN messenger (ARNm) par northern blotting et quantification par PCR quantitative en temps réel),
- la **quantité de protéine** produite (par western blotting),
- la **fonction** de cette dernière (par étude indirecte de l'inhibition du chimiotactisme leucocytaire).

L'hypothèse de départ était que le phénotype observé était lié à une haploinsuffisance de ce gène et donc que la présence d'une seule copie n'était pas suffisante pour assurer sa fonction normale.

Dans un premier temps, les études ont été menées à partir de cellules issues d'une **lignée lymphoblastoïde** après immortalisation des lymphocytes B de la patiente par le virus d'Epstein Barr, ceci présentant l'avantage d'avoir à disposition de quantités importantes de matériel biologique.

Dans un second temps, les mêmes expériences ont été réalisées à partir de matériel biologique issu d'un **prélèvement sanguin** de la patiente afin de déterminer si la transformation lymphoblastoïde avait une influence sur l'expression de *ROBO1*.

4.4.3.1 Etudes fonctionnelles de *ROBO1*

Le transcrit de référence utilisé pour la numérotation des exons de *ROBO1* est le transcrit NM_002941.

Etude protéique

La quantification de la protéine *ROBO1* par western blotting a été réalisée après séparation des fractions cytoplasmique et nucléaire par centrifugation différentielle. L'actine, présente dans la fraction cytoplasmique, est utilisée comme contrôle interne afin de normaliser les quantités de protéine au niveau cytoplasmique.

La poly-ADP ribose polymérase (PARP), spécifique de la fraction nucléaire est par ailleurs utilisée comme contrôle de l'enrichissement de cette fraction.

La révélation à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal de lapin reconnaissant un épitope de la partie COOH terminale de la protéine correspondant au dernier exon des différents isoformes et d'un anticorps secondaire anti IgG de lapin montre la présence d'une bande spécifique correspondant à une protéine de 181kDa.

Etude à partir de cellules de lignée lymphoblastoïde

La quantité de protéine synthétisée a été comparée entre un témoin féminin et la patiente, au niveau des compartiments nucléaire et cytoplasmique, après extraction protéique à partir de cellules lymphoblastoïdes.

La présence d'une bande correspondant à l'actine (45kDa) uniquement dans la fraction cytoplasmique et d'une bande correspondant à la PARP (116kDa) exclusivement dans le compartiment nucléaire est le gage d'une bonne séparation de ces fractions.

Cette expérience confirme par ailleurs l'expression du récepteur membranaire *ROBO1* uniquement au niveau du cytoplasme : chez le témoin, la protéine n'est en effet détectée qu'au niveau de cette fraction.

Par contre, une **absence quasi complète** de cette protéine est observée chez la patiente, contrairement à ce qui aurait pu être attendu dans l'hypothèse d'une haploinsuffisance. C'est pourquoi, cette expérience a été renouvelée à partir d'un prélèvement sanguin de la patiente, afin de valider ce premier résultat ou d'éliminer un éventuel biais lié à la culture de la lignée cellulaire du fait de l'expression monoallélique de ce gène [Gimelbrant 2007].

Etude à partir d'un prélèvement sanguin

Une étude par western blotting a été réalisée après extraction des protéines totales à partir des lymphocytes sanguins isolés par gradient de densité sur FicollTM, chez la patiente et 3 témoins (un sujet contrôle féminin, le père et la mère de la patiente). L'expérience a été répétée 3 fois et montre une bonne reproductibilité. L'analyse

de l'expression de la protéine ROBO1 dans le compartiment cytoplasmique montre une **diminution** significative de l'ordre de **80%** chez la patiente par rapport aux sujets contrôles ($p < 0,001$, test de Mann-Whitney).

L'expression est donc supérieure à celle observée à partir de la lignée mais ce résultat ne va pas non plus dans le sens d'une haploinsuffisance de ROBO1 : dans ce cas, la diminution de la synthèse protéique serait de l'ordre de 50% (figure 4.16).

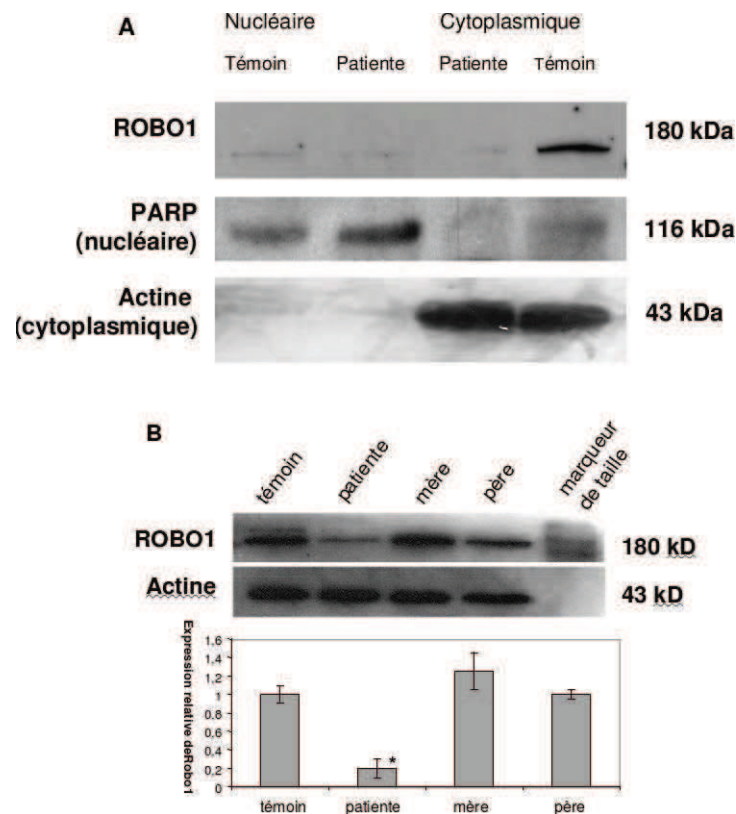


FIG. 4.16 – Western blotting de ROBO1. (A) à partir de lignée lymphoblastoïde. Comparaison de l'expression de ROBO1 entre un témoin et la patiente dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique.

(B) à partir de sang. Comparaison de l'expression de ROBO1 entre un témoin, la patiente et ses parents dans le compartiment cytoplasmique. L'expérience a été répétée 3 fois, la moyenne ainsi que les écarts entre les 3 expériences sont représentés sur le graphique.

Marqueur de taille : Precision Plus Protein (BioRad)

Les hypothèses envisagées pour expliquer ces résultats sont les suivantes :

1. **un effet dominant négatif** : l'interruption du gène *ROBO1* par la translocation peut conduire à un ARNm non stable par absence de queue polyA ou à l'apparition d'un codon stop prématuré reconnu par le système de dégrada-

tion des ARN non sens (NMD ou nonsense-mediated mRNA decay) aboutissant alors à sa dégradation et empêchant la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Cependant, il se peut que la modification de séquence liée à la translocation débouche sur la synthèse d'un transcrit chimérique. Il convient donc de vérifier la présence d'une protéine chimère à l'aide d'un anticorps reconnaissant un épitope dans la partie N-terminale de *ROBO1*, c'est-à-dire dans la région proximale au point de cassure sur le chromosome 3. En outre, pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, l'étude de l'ARNm de *ROBO1* a été menée.

2. une altération du second allèle non transloqué telle qu'une **mutation ponctuelle hypomorphe** pourrait conduire à la synthèse d'une protéine en quantité plus faible que celle attendue et une perte de fonction partielle. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé le séquençage de l'allèle non transloqué.

Etude de l'ARNm

La translocation interrompant *ROBO1*, nous avons voulu apprécier les conséquences sur l'expression de l'ARNm afin d'expliquer les résultats précédents. Pour ce faire, 2 techniques ont été mises en oeuvre :

- la RT-PCR quantitative en temps réel,
- le northern blotting.

RT-PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR)

Trois couples d'amorces chevauchant chacun 2 exons consécutifs de *ROBO1* (afin de s'affranchir d'une contamination potentielle par de l'ADN génomique) ont été sélectionnés. Afin de détecter la présence d'un ARNm potentiel issu de la transcription des exons 1 à 13 de *ROBO1* sur l'allèle transloqué, ils sont localisés dans la région proximale au point de cassure (exons 9 et 10), chevauchant celui-ci (exons 13 et 14) et dans la région distale (exons 15 et 16).

Deux gènes de référence différents, à savoir *ESD* (estérase D, 13q14.2) et *ABL1* (abelson, 9q34.12) ont été utilisés. Le gène *ESD* est celui dont le niveau d'expression se rapproche le plus de celui de *ROBO1* dans la lignée, alors que les niveaux d'expression d'*ESD* et *ABL1* sont comparables dans le sang.

1. Quantification relative de l'ARNm de *ROBO1* extrait à partir de leucocytes

Elle a été réalisée par comparaison de la quantité d'ARNm de la patiente par rapport à 4 échantillons d'ARNm issus soit d'un témoin unique (T1 à T3) soit d'un pool de 5 témoins (T4) de même sexe.

Chez la patiente, on note une **diminution d'environ 40%** de la quantité d'ARNm détectée grâce aux amorces distales au point de cassure par rapport à la quantité d'ARNm détectée grâce aux amorces proximales au point de cassure, contrairement aux témoins (figure 4.17).

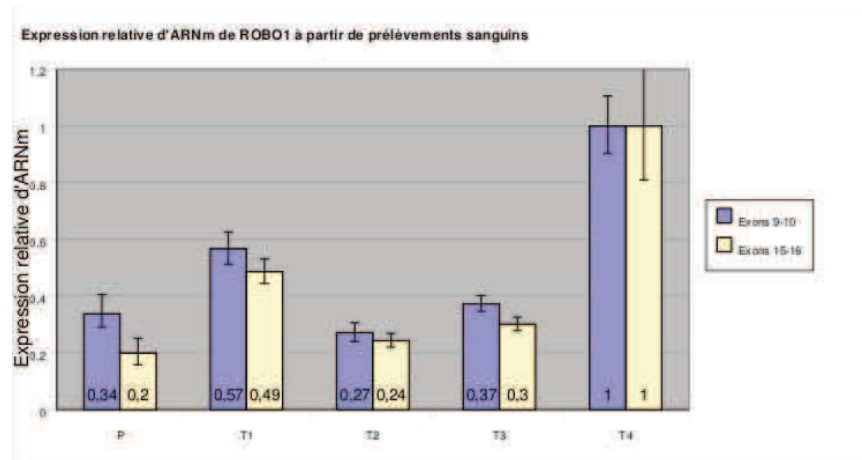


FIG. 4.17 – RT-QPCR de *ROBO1* : quantification relative de l'expression de l'ARNm de *ROBO1* de la patiente (P) et de 4 témoins à partir d'échantillons sanguins avec des amorces proximales et distales au point de cassure sur le der3.

Gène de référence : *ESD*.

La quantité d'ARNm de la patiente et des témoins 1 à 3 est comparée à celle de T4.

Ce résultat a été obtenu après une seule RT-QPCR : des réplicats n'ont pas pu être réalisés faute de disponibilité suffisante de matériel biologique.

Il faut noter que l'expression de l'ARNm de *ROBO1* est variable dans les leucocytes chez les différents témoins, d'où la nécessité de comparer l'expression de ce gène chez la patiente par rapport à celle de plusieurs témoins, voire à un pool d'ARNm de témoins. Malgré cela, il reste difficile d'établir une comparaison du niveau d'expression entre les sujets.

Ces **variations importantes inter-individuelles** ont également été notées par [Hannula-Jouppi 2005] dans une étude comparant l'expression de l'ARNm de ce gène entre 4 sujets dyslexiques et 4 témoins.

Par ailleurs, le **faible niveau d'expression dans les lymphocytes** (comme en témoignent les valeurs élevées de cycles seuil (Ct) obtenues lors de l'amplification, y compris chez les témoins (figure 4.18), rend plus difficile la détection de variations minimales. Enfin, l'utilisation de gènes de référence dont le niveau d'expression est plus important que celui du gène testé rend également plus difficile l'interprétation des résultats. La différence de niveau d'expression est visualisée par la différence de Ct entre les gènes de référence et le gène cible *ROBO1* qui traduit une différence de niveau d'expression d'un facteur 10 (figure 4.18).

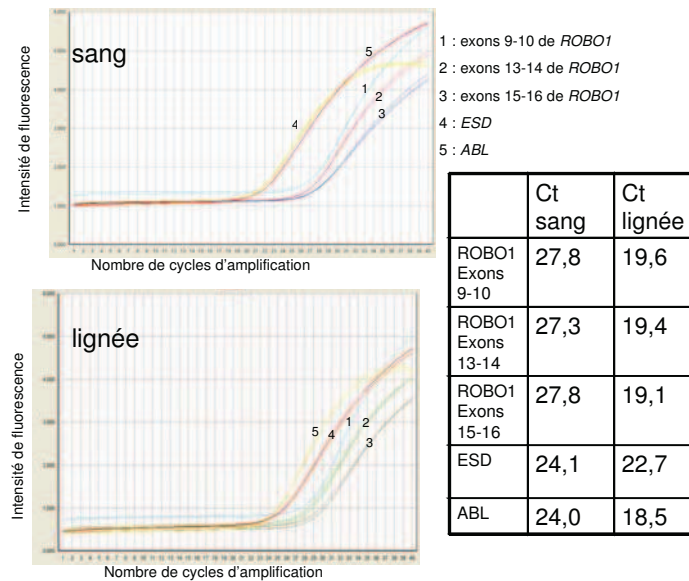


FIG. 4.18 – Courbes d’amplification en temps réel des 5 amplicons dans les gènes de référence *ESD* et *ABL* ainsi que dans le gène *ROBO1* pour un témoin à partir d’ARN de leucocytes sanguins et de cellules lymphoblastoïdes en culture. Tableau des cycles seuil (Ct) d’amplification pour un témoin.

Afin de s’affranchir de ce biais, le gène *PGK-1* (phosphoglycérate kinase 1, Xq21.1), décrit comme ayant un faible niveau d’expression de l’ARNm au niveau des lymphocytes [Seiler 2004], a été testé mais il s’est avéré que son niveau d’expression était comparable à celui d’*ABL1* à en juger par les Ct obtenus (autour de 23 en moyenne à partir de 100ng d’ARN rétrotranscrit, pour 2 échantillons différents) lors de la quantification par PCR quantitative en temps réel.

2.Quantification relative de l’ARNm de *ROBO1* extrait à partir de lignée lymphoblastoïde

L’ARNm de *ROBO1* chez la patiente a été quantifié par rapport à 5 témoins, à partir de 2 transcriptions inverses de l’ARN de la patiente.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Etant donné les fortes variations individuelles d’expression dans les échantillons issus de lignées lymphoblastoïdes, il n’est pas possible de comparer le niveau d’expression d’ARNm de la patiente à celui des témoins.
- Si l’on compare, chez la patiente, la quantité d’ARNm de *ROBO1* avant et après le point de cassure, on observe une diminution de moitié du taux d’ARNm de *ROBO1*. Par contre, chez les témoins, ce taux reste stable, quelque soit la position de l’amplicon.
- Les mêmes résultats sont obtenus quelque soit le gène de référence utilisé.

Ces résultats sont illustrés par la figure 4.19.

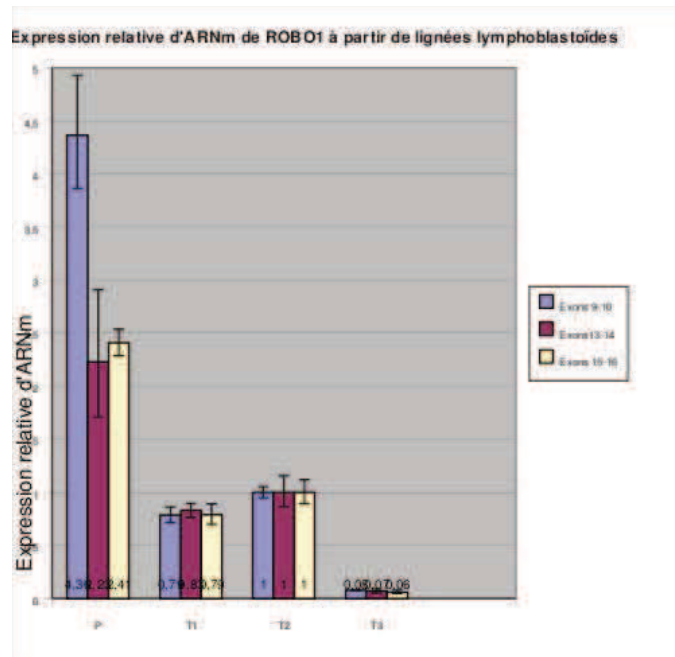


FIG. 4.19 – RT-QPCR de *ROBO1* : quantification relative de l'expression de l'ARNm de *ROBO1* de la patiente (P) et de 3 témoins à partir de lignées lymphoblastoïdes avec des amorces proximales et distales au point de cassure sur le der3.

Gène de référence : *ESD*.

La quantité d'ARNm de la patiente et des témoins 1 et 3 est comparée à celle de T2.

Les amorces localisées dans la région proximale au point de cassure permettent la détection des transcrits issus des 2 allèles (normal et transloqué), alors que dans la région distale au point de cassure, seul le transcrit issu de l'allèle normal est détecté. Ces résultats ne sont pas, *a priori*, en accord avec ceux de l'analyse par western blotting qui ne met pas en évidence d'expression protéique de *ROBO1* dans la lignée lymphoblastoïde à l'aide d'un anticorps reconnaissant un épitope dans la région distale au point de cassure. La différence de sensibilité de ces techniques explique cette divergence.

Les résultats de la quantification relative de l'ARNm de la patiente après normalisation par le gène de référence *ESD* (qui a un niveau d'expression plus proche de celui de *ROBO1*) sont illustrés sur la figure 4.19. Ils laissent supposer l'existence d'un **transcrit chimérique de *ROBO1***.

Northern blotting

Deux sondes d'ADNc ont été synthétisées par RT-PCR et hybridées successivement sur les ARN totaux d'un témoin de sexe féminin et de la patiente. L'une (sonde A utilisée également pour le Southern blot), entre les exons 6 et 10, est proximale par rapport au point de cassure sur le der3 doit détecter à la fois le

transcrit issu de l'allèle normal et un éventuel transcrit chimérique. La seconde, R13, distale par rapport au point de cassure (entre les exons 14 et 18) détecte uniquement le transcrit issu de l'allèle normal. L'hybridation avec une sonde correspondant à la β -actine sert de contrôle interne pour la quantification des ARN.

1. A partir d'ARN de cellules lymphoblastoïdes

L'analyse a été réalisée à partir de 20 μ g d'ARN totaux. Chez le témoin, un transcrit d'une taille approximative de 5,6kb correspondant à la taille des transcrits de *ROBO1* a été mis en évidence alors qu'aucun transcrit n'a été décelé chez l'enfant porteuse de la t(3;18) quelque soit la sonde utilisée pour le détection (figure 4.20). Il n'y aurait donc pas d'expression de l'ARNm de l'allèle non transloqué chez cette enfant. Ce résultat confirme donc celui de l'étude protéique à partir d'une lignée. Par contre, ceci laisse supposer l'absence d'un ARNm correspondant à la transcription des exons 1 à 13, en amont du point de cassure de la translocation sur le chromosome 3, ce qui va à l'encontre du résultat obtenu par RT-QPCR. Cette discordance apparente pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de transcrit de *ROBO1* chez la patiente est faible par rapport à celle du témoin, comme en témoignent les résultats de RT-QPCR. Les transcrits de *ROBO1* ne seraient donc pas mis en évidence par cette technique.

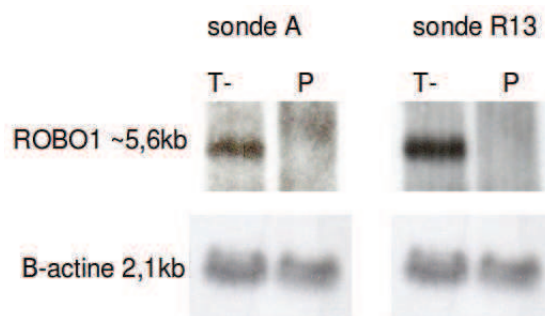


FIG. 4.20 – Northern blotting à partir d'ARN de lignée lymphoblastoïde d'un témoin (T-) et de la patiente (P) : hybridation avec les sondes A et R13 et la β -actine.

2. A partir d'ARN issu d'un prélèvement sanguin

L'analyse a été réalisée après hybridation de 10 μ g microgrammes d'ARN totaux. Aucun transcrit n'a été détecté chez le témoin et chez l'enfant de cette étude. Ceci peut s'expliquer par le fait que le gène *ROBO1* est faiblement exprimé dans le sang.

Etude du chimiotactisme leucocytaire

Outre son rôle au niveau du système nerveux central, SLIT2, le ligand de ROBO1, intervient dans la régulation de la migration des leucocytes par inhibition de leur chimiotactisme induit par les chimiokines. Cet effet est en partie médié par son interaction avec ROBO1 [Wu 2001].

Dans l'objectif d'évaluer les conséquences fonctionnelles de l'interruption de *ROBO1*, l'étude du chimiotactisme des polynucléaires a été menée. Elle vise à apprécier l'action de SLIT2 sur le chimiotactisme des polynucléaires de la patiente par rapport à un témoin.

Dans un premier temps, le chimiotactisme des polynucléaires de la patiente a été comparé à celui du témoin, en présence de zymosan, un chimioattractant constituant la paroi de levure : aucune différence n'a été observée entre les 2 individus.

Dans un second temps, l'effet de SLIT2 sur le chimiotactisme a été testé. Dans cette optique, ce chimiorépulsif a été ajouté soit aux polynucléaires de la patiente et du témoin (cas 1) soit au chimioattractant (cas 2).

- Dans le premier cas, la présence de SLIT2 n'a pas d'effet sur le chimiotactisme, ni chez la patiente ni chez le témoin.
- Dans le second cas, on note une action inhibitrice de SLIT2 chez le témoin contrairement à la patiente : ceci se traduit par une diminution de l'index chimiotactique (ratio de la migration par chimiotactisme/la migration spontanée) chez cette dernière par rapport au témoin. Les index chimiotactiques sont respectivement de 1,49 et 2,04.

Le schéma de l'expérience et les index chimiotactiques sont présentés sur la figure 4.21 ci-dessous.

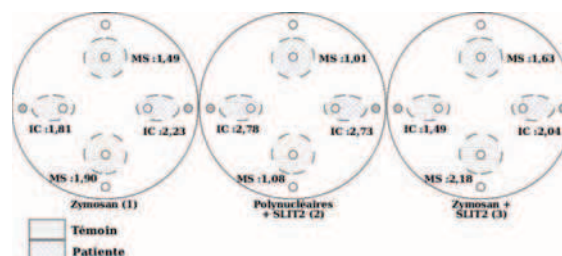


FIG. 4.21 – Etude du chimiotactisme des polynucléaires : les polynucléaires sont déposés dans les puits les plus internes et migrent vers les puits les plus externes où est déposé le zymosan. MS : Migration spontanée (absence de zymosan), IC : index chimiotactique.

La différence d'effet de SLIT2 sur le chimiotactisme leucocytaire dans les 2 expériences réalisées **ne permet pas de conclure quant à une éventuelle altération fonctionnelle de ROBO1** qui compromettrait l'action chimiorépulseuse de SLIT2. Toutefois, même si une détérioration de sa fonction sur les leucocytes serait un argument en faveur d'une perte de fonction à d'autres niveaux, en particulier le système nerveux central, il ne peut être exclu qu'une altération fonctionnelle spécifique du tissu cérébral soit en relation avec le phénotype neurologique de cette enfant.

4.4.3.2 Séquençage de *ROBO1*

Le séquençage des 30 exons de *ROBO1* et des jonctions exon-intron a été mis au point et réalisé à la fois chez la patiente de cette étude et chez 20 sujets dystoniques. L'interprétation du caractère pathogène des variations de séquence a été réalisée en se basant sur les données de dbSNP build 130 (NCBI) qui répertorie les polymorphismes connus et sur les données de prédiction de sites d'épissage sur le logiciel Alamut 1.5 (Interactive Biosoftware).

Patiente de cette étude

Devant les résultats issus des études protéiques, le séquençage de *ROBO1* chez la patiente de cette étude avait pour objectif de rechercher une éventuelle mutation faux-sens hypomorphe qui pourrait expliquer le taux de protéine non nul (20%) mais ne correspondant pas à celui attendu en cas d'haploinsuffisance (50%) du gène *ROBO1*.

Aucune mutation de la séquence codante ou aux jonctions intron-exon, non décrite comme polymorphe, n'a été détectée. Deux polymorphismes exoniques synonymes et 3 introniques ont été mis en évidence et sont répertoriés dans le tableau 4.4 (en gras et en rouge).

L'absence d'homozygotie pour un variant rare ne laisse pas supposer l'existence d'une délétion qui pourrait passer inaperçue au séquençage.

Patients dystoniques

Par ailleurs, dans le but d'impliquer formellement l'altération de *ROBO1* dans la survenue de cette dystonie syndromique, l'étude a été étendue à 20 patients présentant un phénotype similaire à celui de cette enfant, à savoir une dystonie précoce généralisée d'étiologie inconnue. La recherche d'une mutation ponctuelle pouvant conduire à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle a donc été réalisée chez 20 patients recrutés par le biais d'un partenariat national ³.

Le séquençage n'a mis en évidence **aucune mutation ponctuelle décalant le cadre de lecture ou entraînant l'apparition d'un codon stop**.

Des polymorphismes exoniques synonymes ou faux-sens ainsi que des polymorphismes introniques déjà décrits ont été retrouvés à l'état homozygote ou hétérozygote.

Deux variations introniques et 2 exoniques dont une faux-sens à l'état hétérozygote, non répertoriées dans la base de données dbSNP130 ont été mises en évidence chez 4 patients.

- Une variation de séquence dans l'**intron 7** de *ROBO1* située 25pb avant le début de l'exon 8 (NM_02941.2 :c.[1046-25][=]). D'après les données *in silico*, son **effet sur l'épissage** serait **faible** : elle ne modifie pas le

³M. Claustres au CHU de Montpellier, M. Tardieu au CHU de Bicêtre, N. Bahi-Buisson à l'hôpital Necker, L. Burglen à l'hôpital A. Trousseau, L. Van Maldergem au CHU de Liège.

site accepteur, seul un site potentiel de fixation à un ISE (intronic splicing enhancer) (SF2/AFM(IgM/BRCA1) prédit est supprimé.

- Une substitution **C>G 137pb avant le début de l'exon 1** du transcrit alternatif NM_133631 de *ROBO1* (NM_133631.1 :c.[138G>C]+[=]), dans une **région non conservée** entre les espèces et ne correspondant pas à des îlots CpG caractéristiques des séquences promotrices.
- Une substitution **synonyme** NM_002941.2 :c.[699A>G]+[=] dans l'**exon 5** de *ROBO1*, **non délétère**.
- Une substitution **faux-sens G>T hétérozygote** dans l'**exon 22** de *ROBO1* (NM_02941.2 :c.[3184G>A]+[=]) conduisant au remplacement d'un résidu arginine en cystéine en position 1062.
Il s'agit d'un acide aminé très conservé jusqu'au Xénope (chez 12 espèces). Cet acide aminé est situé dans un domaine intracytoplasmique conservé de la protéine ROBO1 mais non conservé entre les différents membres de cette famille de récepteurs transmembranaires.
Il est à noter en outre que les propriétés physico-chimiques de ces 2 acides aminés sont différentes : l'arginine est basique alors que la cystéine est hydrophobe. Ces différents éléments sont en faveur du caractère potentiellement délétère de cette variation. Toutefois, chez le tétraodon, l'acide aminé à cette position est une cystéine, ce qui n'oriente pas vers une variation délétère.

Afin d'évaluer la pathogénicité de ces variations de séquence, il convient d'en déterminer le **caractère hérité ou de novo**.

La transmission par un parent non atteint serait en faveur d'un polymorphisme (toutefois une pathologie récessive avec une délétion du second allèle ne peut pas être exclue).

En cas de survenue *de novo*, le séquençage d'une population de sujets contrôles s'avère nécessaire pour exclure le caractère polymorphe de ces variations. S'il s'agit d'un variant rare, la taille de cette cohorte doit être importante. Cette étude n'a pas encore été menée.

Enfin, si cette variation n'est pas retrouvée dans la population contrôle, une étude fonctionnelle pourrait être envisagée pour évaluer son impact.

La détermination du caractère délétère des 2 variations **introniques** passe par l'étude de l'**effet sur l'épissage** : ceci nécessite une étude par séquençage de l'ARNm de *ROBO1* chez ces patients afin de rechercher un transcrit aberrant conduisant à une protéine non fonctionnelle.

L'ensemble des variations mises en évidence est répertorié dans le tableau 4.4 ci-dessous.

Variations exoniques					
nombre de patients	position dans le gène <i>ROBO1</i>	SNP décrit	Statut	Nomenclature ADNC	Effet sur la protéine
1	exon 5		hétérozygote	NM_002941.2:c.[699A>G]+[=]	p.[=]
1	exon 9	rs35506479	hétérozygote	NM_002941.2:c.[1206C>T]+[=]	p.[=]
3	exon 12	rs2271151	hétérozygote	NM_002941.2:c.[1740G>A]+[=]	p.[=]
1	exon 12	rs2271151	homozygote	NM_002941.2:c.[1740G>A]+[1740G>A]	p.[=]
4	exon 18	rs6795556	hétérozygote	NM_002941.2:c.[2793C>A]+[=]	p.[=]
3	exon 18	rs6795556	homozygote	NM_002941.2:c.[2793C>A]+[2793C>A]	p.[=]
2	exon 22	rs35456279	hétérozygote	NM_002941.2:c.[3272G>A]+[=]	NP_002932.1:p.[Ser1091Asn]+[=]
1	exon 22	rs35456279	homozygote	NM_002941.2:c.[3272G>A]+[3272G>A]	NP_002932.1:p.[Ser1091Asn]+[Ser1091Asn]
1	exon 22		hétérozygote	NM_002941.2:c.[3184G>A]+[=]	NP_002932.1:p.[Arg1062Cys]+[=]
1	exon 28	rs35148826	hétérozygote	NM_002941.2:c.[4704A>C]+[=]	p.[=]
Variations introniques					
nombre de patients	position dans le gène <i>ROBO1</i>	SNP décrit	Statut	Nomenclature ADNC	Effet sur la protéine
1	5'UTR		hétérozygote	NM_133631.1:c.[138G>C]+[=]	p.?
10	intron 3	rs2304503	hétérozygote	NM_002941.2:c.[500-28C>A]+[=]	p.?
6	intron 3	rs2304503	homozygote	NM_002941.2:c.[500-28C>A]+[500-28C>A]	p.?
1	intron 7		hétérozygote	NM_002941.2:c.[1046-25C>T]+[=]	p.?
5	intron 7	rs967454	hétérozygote	NM_002941.2:c.[1046-40G>A]+[=]	p.?
5	intron 11	rs2255164	hétérozygote	NM_002941.2:c.[1631-56C>T]+[=]	p.?
3	intron 11	rs2255164	homozygote	NM_002941.2:c.[1631-56C>T]+[1631-56C>T]	p.?
2	intron 18	rs58872086	hétérozygote	NM_002941.2:c.[2812+44G>A]+[=]	p.?
21	intron 25	rs7636043	homozygote	NM_002941.2:c.[3675+4A>G]+[3675+4A>G]	p.?
7	intron 23	rs6548592	hétérozygote	NM_002941.2:c.[3282-123T>C]+[=]	p.?
4	intron 23	rs6548592	homozygote	NM_002941.2:c.[3282-123T>C]+[3282-123T>C]	p.?
8	intron 26	rs9839790	hétérozygote	NM_002941.2:c.[4282+20T>C]+[=]	p.?
6	intron 26	rs9839790	homozygote	NM_002941.2:c.[4282+20T>C]+[4282+20T>C]	p.?

TAB. 4.4 – Variations de séquence identifiées par séquençage des exons de *ROBO1* chez la patiente (en gras et en rouge) et 20 autres sujets dystoniques. Les variations non décrites comme polymorphes sont surlignées et en gras.

4.5 Etude de la région du point de cassure sur le chromosome 18

Parallèlement à l'étude de *ROBO1*, la région du point de cassure sur le chromosome 18 a été étudiée dans le but de déterminer si l'interruption de séquence en 18q23 pouvait contribuer à expliquer la symptomatologie observée chez cette patiente. Deux hypothèses ont été envisagées :

1. l'**interruption d'un gène** sur le chromosome 18, non décrit à ce jour et dont l'expression et/ou la fonction seraient altérées,
2. un **effet de position** entraînant une modification de la régulation des gènes localisés à proximité du point de cassure sur ce chromosome.

4.5.1 Etude d'un gène hypothétique au point de cassure

La première approche a été de rechercher un gène candidat à partir des bases de données bioinformatiques et de tester son expression éventuelle. L'étude *in silico* à partir de la base de données du site UCSC genome browser et du logiciel de prédiction de gènes Geneid Genes a montré la présence, au niveau

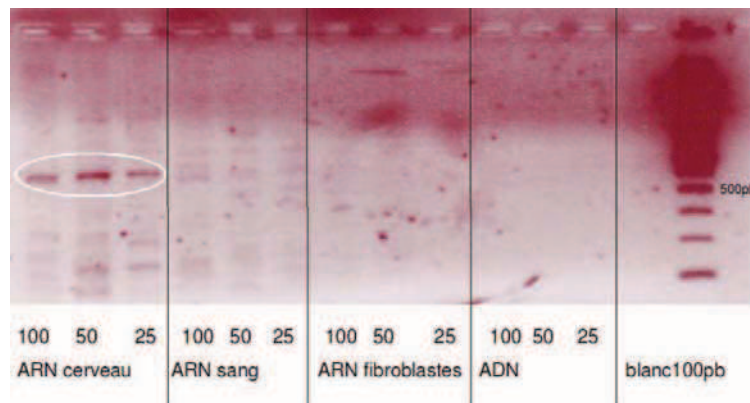


FIG. 4.22 – Contrôle électrophorétique (gel d'agarose à 2%) de la PCR à partir d'ARN de cerveau humain, de sang, de fibroblastes et à partir d'ADNg (contrôle négatif) pour isoler un ARNm du gène hypothétique chr18_703.1/ Amplification de 100, 50 et 25ng d'ARN rétrotranscrit. Marqueur de taille 100pb (Invitrogen). Un fragment de 600pb environ a été isolé à partir de l'ARN de cerveau.

du point de cassure, d'une séquence pouvant correspondre à la structure d'un gène, référencé **chr18_703.1** (74 532 877 à 74 551 009pb). Ce logiciel est basé sur la prédiction de sites d'épissage, de codons start et stop et la construction d'exons.

Afin de vérifier la présence de séquence codante, la recherche d'**expression d'ARNm** dans plusieurs tissus a été conduite par RT-PCR.

L'ARN a été extrait à partir de 4 échantillons lymphocytaires différents et de 2 échantillons de fibroblastes en culture. Nous avons également testé des ARN totaux de cerveau humain adulte commerciaux (Ambion).

La rétrotranscription a été réalisée à partir de 1 μ g d'ARN : la qualité de l'ARNm et de la rétrotranscription ont été vérifiées par PCR en temps réel à l'aide d'amorces exoniques du gène *ABL1*. Les cycles seuils de détection de fluorescence entre 23 et 25, se situent dans l'intervalle de valeurs attendues.

Deux couples d'amorces ont été sélectionnés dans des exons supposés successifs. Les PCR ont été réalisés à des températures d'hybridation comprises entre 50 et 62°C à partir de quantités d'ADNc correspondant à 100, 50 et 25ng d'ARN rétrotranscrit. Les tailles des produits de PCR attendus étaient de 195 et 159pb.

Un fragment d'une taille approximative de 600pb a été isolé à partir de l'ARN issu de cerveau (figure 4.22). Il a ensuite été séquencé : après alignement, il s'est avéré qu'il s'agissait d'une séquence correspondant au chromosome 15.

Le gène hypothétique prédit avec le logiciel Geneid ne semble donc pas correspondre à un transcrit exprimé dans les tissus testés. Un faible niveau de transcription ne peut cependant être exclu. En outre, l'absence de témoin positif ne permet pas de s'assurer que les conditions de PCR sont adéquates, mêmes si différentes conditions d'amplification ont été testées.

4.5.2 Recherche d'un effet de position

4.5.2.1 Recherche de régions non codantes hautement conservées

Un effet de position lié à l'interruption ou à la séparation physique d'un élément régulateur de gènes situés à distance du point de cassure sur le chromosome 18 ne peut être exclu *a priori*. La recherche de séquences non codantes hautement conservées au cours de l'évolution a donc été entreprise puisque la conservation entre les espèces est un argument en faveur de leur fonction régulatrice.

La séquence de l'ADN dans un intervalle de 2Mb autour du point de cassure montre la présence de nombreuses séquences de ce type, même si aucune d'entre elles n'est interrompue du fait de la translocation.

[Rizzolio 2008] notent la présence de 11 séquences répétées hautement conservées entre *GALR1* et *SALL3*, qui présentent 100% d'homologie sur plus de 100pb entre l'homme et la souris, plus de 97% entre l'homme et le poulet et plus de 85% entre l'homme et le tétraodon pour 3 d'entre elles (figure 4.23B). Ces auteurs ont montré, par analyse de l'activation ou de l'extinction d'un gène rapporteur dans des lignées cellulaires et par mise en évidence de modifications de la chromatine au cours du développement embryonnaire chez la souris, que certains d'entre eux constituaient des éléments régulateurs intervenant au cours du développement embryonnaire. Ils peuvent ainsi moduler l'expression des gènes avoisinants.

Dans cette étude, une altération de la régulation des gènes *SALL3* et *ATP9B* par réduction de la modification de l'histone H4 acétylé (qui joue un rôle important dans la fixation des facteurs de transcription) suite à la translocation, a été mise en évidence.

4.5.2.2 Etude des gènes situés autour du point de cassure

En fonction de ces données, nous avons cherché à établir quels étaient les gènes de cette région susceptibles de subir un effet de position. Les gènes les plus proches de part et d'autre du point de cassure ainsi que les séquences non codantes hautement conservées sont représentés sur la figure 4.23.

Dans la région proximale au point de cassure, le gène le plus proche est *GALR1*, alors que dans la région distale, 4 gènes sont situés à moins de 1Mb du point de cassure : *SALL3*, *ATP9B*, *NFATC1* et *CTDP1*. Les 3 derniers gènes n'ont pas été étudiés :

- *ATP9B* code une ATPase de fonction inconnue.
- *NFATC1* (MIM 600489) code le composant nucléaire inductible du facteur nucléaire des lymphocytes T activés. Ce facteur de transcription intervient dans la transcription de gènes au cours de la réponse immune. Il n'est pas exprimé dans le cerveau.
- *CTDP1* code le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II qui interagit avec le facteur de transcription TFIIF régulant l'élongation et l'initiation de la transcription. Il est impliqué dans la cataracte congénitale associée à une dys-

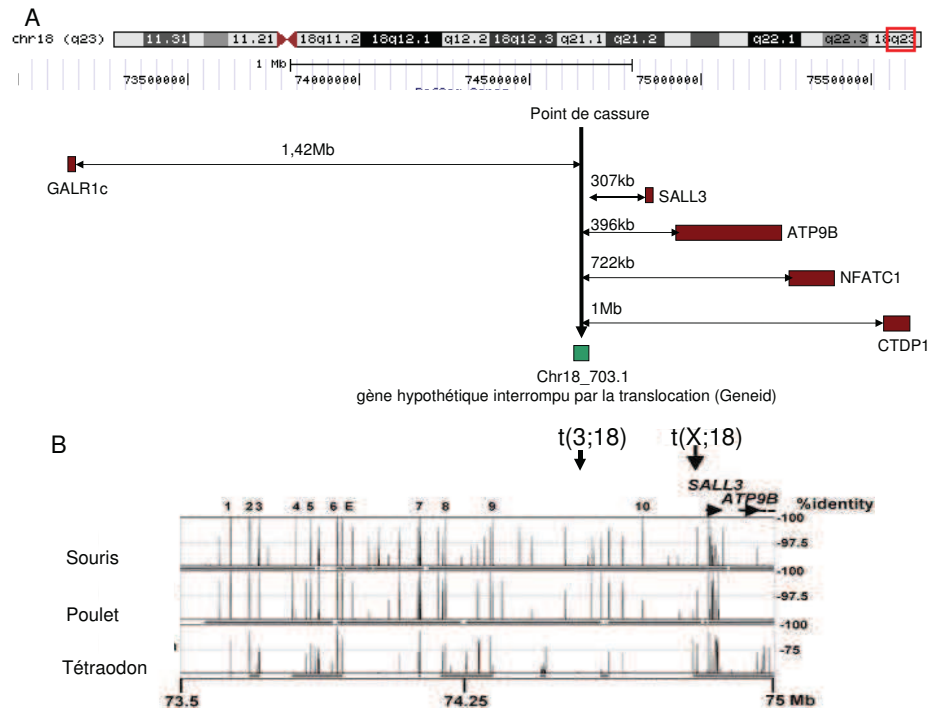


FIG. 4.23 – Cartographie de la région en 18q23.

(A) gènes les plus proches et distance par rapport au point de cassure.

(B) séquences hautement conservées en 18q23 entre l'homme et 3 espèces animales, décrites par [Rizzolio 2008]. Le pourcentage d'homologie entre l'homme et les 3 espèces est indiqué à droite. Les positions des points de cassure de la $t(3;18)$ et de la $t(X;18)$ décrite par Rizzolio sont indiquées par les flèches.

morphie et une neuropathie, pathologie autosomique récessive (MIM 604168).

SALL3

Le gène le plus proche, situé à 307kb, dans la région **distale** au point de cassure, est *SALL3* (sal-like 3, NM_171999 : 74 841 263-74 859 181pb). Il appartient à une famille de gènes codant des **facteurs de transcription**, impliqués dans le développement des membres, du coeur, du rein et du système nerveux.

Des mutations de 2 des gènes de cette famille, *SALL1* et *SALL4*, ont été impliquées dans des pathologies humaines, à savoir le syndrome de Townes-Brocks caractérisé par une polydactylie préaxiale et des pouces triphalangés, des anomalies des oreilles et un surdité, une imperforation anale ainsi que des anomalies rénales et cardiaques (MIM 107480) pour *SALL1* et le syndrome d'Okhiro associant des anomalies des membres supérieurs, oculaires et rénales (MIM 607323) pour *SALL4* [Sweetman 2006].

Sall3 est quant à lui fortement exprimé, chez la souris, au cours du développement embryonnaire et dans le cerveau et le rein des animaux adultes [Rizzolio 2008]. Il

participe à la **différenciation et la maturation des interneurons du bulbe olfactif** [Harrison 2008]. Il est impliqué dans le **développement crânio-facial** : les mutants *Sall3*^{-/-} présentent des malformations du palais, de l'épiglotte et de la langue, des anomalies des nerfs crâniens, en particulier du nerf glossopharyngé et décèdent en période périnatale [Parrish 2004].

Chez l'homme, ce gène est localisé dans la **région critique du syndrome délétionnel 18q-** dont le phénotype, variable, se caractérise par un retard mental, une hypotonie, une petite taille, une hypoplasie de l'étage moyen de la face, des troubles de l'audition et des déformations des pieds (MIM 601808). Cependant, d'après une étude de [Feenstra 2007], il ne peut pas être impliqué formellement dans le retard mental observé chez ces patients, puisque 10 sujets présentant une délétion incluant ce gène présentent un retard mental léger voire une absence de retard mental.

***GALR1* (NM_001480)**

Ce gène est situé à 1,42Mb dans la région **proximale** au point de cassure (73 090 996-73 111 084pb). Il code un **récepteur à la galanine**, couplé à une protéine Gi, modulant ainsi la transduction du signal par inhibition de l'adénylate cyclase.

Il est fortement exprimé chez les mammifères au niveau du système nerveux central mais aussi de l'intestin grêle et du cœur. Ainsi, chez la souris et le rat, son expression est élevée dans les structures olfactives, les noyaux de l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus, la protubérance annulaire et la moëlle épinière. Il a été détecté au niveau de la zone subventriculaire et du flux migratoire rostral, régions impliquées dans la neurogénèse.

La galanine est un neuropeptide qui régule de nombreuses fonctions au niveau du système nerveux central, telles que les cycles veille-sommeil, la reproduction, l'homéostasie énergétique et osmotique, la nociception et les fonctions cognitives [Lang 2007].

GalR1 est quant à lui impliqué dans ces 4 dernières fonctions.

Il interviendrait, tout comme le récepteur GalR2, en particulier dans l'**altération de la consolidation de la mémoire et des fonctions cognitives** par inhibition de la potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe, processus de renforcement synaptique par augmentation de la réponse post-synaptique. *Via* son inhibition de l'adénylate cyclase, il conduit à une inhibition de la phosphorylation de la protéine CREB qui intervient dans la transcription de gènes et augmente l'efficacité synaptique. Selon [Kinney 2009], GalR1 serait impliqué dans les fonctions de mémorisation chez le rat (expériences *in vivo*), alors que les résultats de Badie-Mahdavi (2005), à partir de l'étude de coupes d'hippocampe de souris, sont en faveur d'un effet lié à GalR2.

L'étude de souris GalR1 knock-out montre enfin le rôle de ce récepteur dans l'**action anticonvulsivante** (par diminution de la susceptibilité à l'épilepsie induite) et neuroprotectrice de la galanine chez l'animal [Mazarati 2004].

Expression de l'ARNm de *SALL3* et *GALR1*

En fonction des données de la littérature mettant en évidence la présence de séquence répétées régulatrices au niveau du point de cassure sur le chromosome 18, et afin de démontrer un éventuel effet de position lié à la translocation, la quantification des ARNm des gènes *SALL3* et *GALR1* qui sont les plus proches du point de cassure a été entreprise. En outre, leur fonction pourrait laisser supposer que leur altération serait en relation avec le phénotype neurologique de l'enfant de cette étude. La comparaison du taux l'ARNm de ces gènes chez la patiente et 4 témoins a ainsi été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel à partir de cellules issues de lignées lymphoblastoïdes mais aucun résultat interprétable n'a été obtenu jusqu'à présent.

4.6 Discussion

La mise en évidence d'une translocation équilibrée *de novo* chez une enfant présentant une dystonie précoce généralisée associée à un retard de développement psychomoteur a été le point de départ d'une étude de cartographie physique précise à la recherche d'un gène candidat pour cette dystonie syndromique.

4.6.1 Translocations équilibrées et pathologies

Les réarrangements apparemment équilibrés sont retrouvés chez 0,5% de patients avec retard mental [Rauch 2006]. Il est toutefois à souligner la difficulté d'établir une relation de cause à effet entre ce type de réarrangement et un phénotype délétère. Ainsi, l'étude d'une cohorte de 31 sujets sans particularités phénotypiques porteurs d'une translocation apparemment équilibrée a montré l'interruption d'un gène chez 16 sujets sur 31 [Baptista 2008]. Cependant, seuls 2 des gènes interrompus par la translocation présentaient un intérêt particulier en raison de leur implication éventuelle dans une pathologie dominante.

Dans l'un des cas les données cliniques n'étaient pas disponibles, alors que dans le second cas, après un nouvel examen du dossier clinique, il est apparu qu'il existait bien une corrélation entre les données fonctionnelles sur le gène et le phénotype rapporté (interruption du gène suppresseur de tumeur *FAT*->prolactinome).

Afin d'établir un lien causal entre la translocation et le phénotype, il convient donc d'étudier le profil d'expression ainsi que la fonction des gènes interrompus par la translocation et d'apprécier les éventuelles conséquences fonctionnelles de leur interruption.

Enfin, l'implication formelle de l'altération d'un gène dans la dystonie est renforcée par la mise en évidence d'autres types d'altérations ponctuelles clairement délétères chez des individus ayant un phénotype similaire.

4.6.2 Conséquences de l'interruption de *ROBO1*

Dans le cas présent, le gène *ROBO1* interrompu par le point de cassure sur le chromosome 3 est apparu comme un bon gène candidat, non seulement de par son profil d'expression au niveau du système nerveux central au cours du développement embryonnaire, mais aussi de par sa fonction en tant que récepteur de molécules chimiorépulives SLIT impliquées dans le guidage axonal, fonction conservée chez les vertébrés.

Un modèle murin a par ailleurs montré que les animaux knock-out *Robo1*^{-/-} décédaient à la naissance et présentaient des défauts importants de migration des interneurons corticaux et de guidage axonal [Andrews 2006].

4.6.2.1 Impact fonctionnel de l'interruption de *ROBO1*

A partir de ces données, ce travail a eu pour objectif d'apprécier les conséquences de son interruption. L'étude de *ROBO1*, aussi bien au niveau des transcrits que de la protéine a été menée afin d'estimer si la translocation conduisait à une haploinsuffisance de ce gène, entraînant le phénotype observé. Elles ont tout d'abord été réalisées à partir de cellules lymphoblastoïdes immortalisées obtenues à partir de lymphocytes B de la patiente puis à partir d'un prélèvement lymphocytaire sanguin.

De façon surprenante, l'étude protéique réalisée à partir des cellules de la **lignée lymphoblastoïde** a révélé une **absence totale d'expression** de la protéine ROBO1 chez la patiente, alors que l'étude à partir du **sang** montre la persistance d'un **taux résiduel de l'ordre de 20%** par rapport aux témoins.

Ces résultats n'allaient donc pas dans le sens d'une haploinsuffisance de *ROBO1*. D'autre part, la discordance entre le taux de protéine mesuré à partir d'un prélèvement sanguin et celui mesuré après culture peut être sujet à question.

L'hypothèse qui a alors été avancée pour rendre compte de cette discordance fait intervenir la notion d' **expression monoallélique aléatoire** de l'allèle maternel ou paternel. [Gimelbrant 2007] ont en effet montré que ce gène est soumis à un tel phénomène.

D'une manière générale, le mécanisme d'expression monoallélique touche 3 classes de gènes : les gènes soumis à empreinte parentale, ceux soumis à l'inactivation du chromosome X ainsi que des gènes autosomiques.

D'après cette étude, par extrapolation, le nombre de gènes autosomiques soumis à une expression monoallélique aléatoire serait supérieur à 1000. Ce groupe inclut des gènes de récepteurs olfactifs, des gènes impliqués dans la réponse immunitaire ou exprimés au niveau du système nerveux.

Il s'agit de gènes codant des protéines dont les fonctions et la spécificité tissulaire sont variées, avec toutefois une surreprésentation de gènes codant des protéines de surface telles que les **récepteurs transmembranaires** (comme *ROBO1*).

Les 4/5 de ces gènes autosomiques ont par ailleurs une **expression mono et**

biallélique en mosaïque. Selon les gènes, la proportion de cellules présentant une expression monoallélique ainsi que la spécificité tissulaire de l'expression est variable.

Pour un gène donné, le choix de l'allèle exprimé est clonal, conduisant ainsi à une mosaïque d'expression de l'allèle maternel ou paternel dépendant du moment au cours du développement où a lieu l'extinction de l'un des allèles. Le mécanisme de régulation à l'origine de cette expression monoallélique correspond généralement à une méthylation de l'ADN spécifique d'un allèle [Wang 1996].

Concernant *ROBO1*, on peut supposer que le choix de l'expression d'un allèle s'est fait précocément au cours du développement embryonnaire aussi bien au niveau du cerveau qu'au niveau périphérique au profit de l'allèle transloqué.

Bien que les lignées lymphoblastoïdes B soient polyclonales, il est envisageable que dans le cas présent, la culture cellulaire ait conduit à un **biais de sélection de l'allèle exprimé en faveur de l'allèle transloqué**.

A partir de l'exemple du gène *APP* (précurseur du peptide amyloïde), [Gimelbrant 2007] ont montré que l'allèle actif pouvait avoir un taux d'expression 50 fois supérieur à celui de l'allèle inactif, ce qui nous conforte dans notre hypothèse puisque dans le cas présent l'allèle paternel est transloqué, ce qui ne peut aboutir à la synthèse d'une protéine normale.

Ce postulat pourrait être vérifié par FISH sur ARN dans les noyaux de cellules de la lignée cellulaire en utilisant une sonde dans *ROBO1* localisée après le point de cassure de la translocation. Ainsi, les cellules pour lesquelles l'expression monoallélique serait en faveur de l'allèle transloqué ne montreraient pas d'expression de transcrit. Il serait ainsi possible d'évaluer la proportion de cellules exprimant cet allèle.

Par ailleurs, l'étude protéique par western blotting à partir d'un prélèvement sanguin de la patiente n'a pas confirmé le résultat obtenu à partir de la lignée, ce qui est bien en faveur d'un biais lié à l'immortalisation des lymphocytes dans la lignée cellulaire.

La constitution d'une lignée cellulaire et l'utilisation de ce matériel cellulaire permet certes d'avoir à disposition une quantité importante de matériel biologique en vue d'expériences multiples, mais dans le cas présent, l'interprétation des résultats obtenus à partir de celle-ci s'est avérée délicate en raison de l'expression monoallélique du gène étudié.

Les résultats de l'étude menée à partir de lymphocytes de la patiente sont donc plus fiables puisque toute dérive liée à la transformation cellulaire et la clonalité sont éliminées.

La diminution de plus de 50% de la synthèse protéique remet cependant en cause l'hypothèse d'un mécanisme d'haploinsuffisance.

A nouveau, l'**expression monoallélique** de *ROBO1* peut être évoquée pour

tenter d'interpréter ce résultat : un biais d'expression, certes moindre que celui supposé dans la lignée, peut avoir eu lieu précocément au cours du développement embryonnaire en faveur de l'allèle transloqué incapable d'exprimer la protéine normale. Cette hypothèse demanderait à être vérifiée par FISH sur ARN à partir de lymphocytes de la patiente.

La présence d'une **mutation hypomorphe** sur le second allèle serait une seconde hypothèse expliquant ce phénomène : le séquençage des exons de *ROBO1* chez la patiente n'a décelé aucune mutation non polymorphe ponctuelle, toutefois, une mutation intronique dans une séquence régulatrice de ce gène ou une délétion partielle du gène ne peuvent être exclues.

Une troisième hypothèse repose sur un mécanisme de régulation par des **ARN non codants**.

[Angeloni 2006] ont isolé 2 transcrits dans la même orientation que ceux de *ROBO1* dans l'intron 2 de ce gène et qui correspondent aux ARN non codants BC017743 et BC043430.

Dans l'hypothèse où la translocation entraînerait une variation de leur expression par un effet de position, ceci pourrait conduire à une modification de leur fonction régulatrice. En se fixant à leur cible spécifique, ces transcrits peuvent moduler la transcription ou la traduction de leur cible, pour en altérer leur fonction [Wilusz 2009]. Si cette action s'exerce sur une cible intervenant dans la voie de régulation de *ROBO1*, il pourrait s'ensuivre un effet indirect sur *ROBO1*.

L'étude des conséquences de la translocation sur l'expression de ces ARN non codants (par RT-QPCR) n'a pas été réalisée.

La dernière hypothèse serait celle de l'existence d'un **transcrit de fusion** du fait de la translocation. Il pourrait aboutir à la synthèse d'une protéine anormale dont le mode d'action serait à préciser.

- Une protéine tronquée défectueuse peut agir par **effet dominant négatif** en interférant avec la protéine normale par diminution de son activité globale voire par inhibition. Dans le cas de ce récepteur transmembranaire, la protéine anormale peut inhiber en *trans* l'activité de *ROBO1* en altérant sa liaison homophile [Hivert 2002].

[Lu 2007] ont ainsi mis en évidence un effet dominant négatif d'une protéine codée par transcrit de fusion *ROBO2-PCDH11Y* suite à une translocation t(Y;3)(p11;p12)dn interrompant ces 2 gènes. Par des études de migration neuronale *in vitro*, ces auteurs ont montré que la protéine de fusion inhibait l'effet chimiorépulsif de *SLIT2* sur des explants de la zone antérieure sub-ventriculaire. Ce même modèle pourrait être appliqué dans notre cas afin d'apporter la preuve de l'altération fonctionnelle de la voie de signalisation *SLIT-ROBO* chez cette enfant dystonique.

- Cette fusion peut également induire un **gain de fonction** de la protéine

chimère comme c'est le cas par exemple lors de la fusion des gènes *BCR* et *ABL1* suite à la translocation t(9;22) récurrente dans les hémopathies malignes. Dans ce cas, l'activité enzymatique tyrosine-kinase d'ABL1 est constitutivement activée, à l'origine de la pathologie par perturbation de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

L'existence d'un tel **transcrit de fusion** aboutissant à la synthèse d'une protéine peut être envisagée dans le cas présent. L'étude *in silicio* de la séquence nucléotidique de part et d'autre du point de cassure sur le der3 montre en effet la présence d'une séquence consensus pour un site accepteur fort de l'épissage en aval du point de cassure associé à des séquences correspondant à des sites de fixation potentiels d'ESE (exon splicing enhancers) et ISE (intron splicing enhancers). La comparaison de ce site accepteur potentiel avec le site sauvage au niveau de l'exon 14 montre des similitudes concernant la force des motifs des sites accepteurs et des sites de fixation des ESE, avec la présence d'au moins 4 sites de fixation potentiels des ESE au niveau de ce site accepteur potentiel (figure 4.24). De plus, l'analyse de la séquence au point de cassure à l'aide du logiciel Transeq⁴ qui prédit la séquence protéique à partir de la séquence d'acides nucléiques identifie la séquence d'une protéine chimère possible de 695 acides aminés par ajout de 40 acides aminés aux 655 correspondant aux exons 1 à 13 de *ROBO1*.

⁴<http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/transeq/index.html>



FIG. 4.24 – Etude *in silico* de sites accepteurs potentiels d'épissage après le point de cassure sur le der3 et comparaison avec la modélisation du site sauvage au niveau de l'exon 14 de *ROBO1*.

(A) Séquence génomique de part et d'autre du point de cassure sur le der3 avec indication des séquences consensus au niveau des sites d'épissage donneur de l'exon 13 de *ROBO1* (surligné en rouge) et accepteur potentiel sur le chromosome 18 (surligné en vert).

Les rectangles de couleur indiquent les sites de liaison potentiels des ESE et ISE au niveau de ce dernier. La force du motif pour la fixation de l'ESE ou ISE est indiquée dans chaque rectangle (échelle de 0 à 100).

La séquence de l'exon 13 de *ROBO1* est en bleu majuscule, celle de l'intron 13 de *ROBO1* en noir minuscule et celle du chromosome 18 en rouge.

(B) Modélisation des interactions protéiques aux sites d'épissage entre les exons 13 et 14 de *ROBO1* (d'après Alamut).

Sources : Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF>) (prédiction de sites accepteurs et de site de fixation potentiels des ESE) et Alamut (modélisation des sites donneur et accepteur sauvages au niveau des exons 13 et 14 de *ROBO1*)

Si les résultats de RT-QPCR vont dans ce sens, et malgré la discordance avec le northern blotting qui ne détecte aucun transcrit de *ROBO1* chez la patiente, la preuve de l'existence d'un tel transcrit peut être apportée par sa détection par **3'RACE-PCR** (Rapid Amplification of cDNA End).

Cette technique repose sur l'amplification d'un éventuel transcrit de fusion à partir de son extrémité 5' connue (ici l'extrémité 5' du transcrit de *ROBO1*) à l'aide d'une amorce localisée dans un exon de *ROBO1* en amont du point de cassure.

Puis le **séquençage** de ce dernier donnerait lieu à l'identification de son extrémité 3'.

La mise en évidence d'une protéine tronquée nécessite quant à elle la réalisation d'un **western blotting avec un anticorps reconnaissant un épitope dans la partie N-terminale de la protéine ROBO1**.

Si une telle protéine existe, on peut penser qu'elle pourrait conserver sa capacité de liaison à son ligand SLIT2 étant donné que les 13 premiers exons nécessaires à la synthèse des domaines Ig (en particulier Ig1 et 2 impliqués dans la liaison à SLIT2) seraient présents.

Par contre, les domaines fibronectine codés par les exons suivants ne seraient plus présents, d'où une **altération de la liaison homophile** de *ROBO1*. Les études de [Liu 2008] ont en effet montré que cette capacité de liaison est diminuée sans être toutefois abolie, en cas d'absence de ces domaines.

Par ailleurs, le domaine riche en proline correspondant à un domaine conservé intra-cytoplasmique impliqué dans la **transduction du signal** ne serait plus présent, ce qui pourrait contribuer à l'altération de la fonction de *ROBO1* (figure 4.25).

Si les études menées chez cette patiente font de *ROBO1* un gène candidat de la dystonie, la mise en évidence de **mutations ponctuelles** de ce gène chez des patients présentant un phénotype similaire constituerait une preuve de son rôle dans cette pathologie.

Le séquençage des exons de ce gène chez 20 patients présentant une dystonie précoce a mis en évidence 2 variations de séquence introniques et une exonique faux-sens à l'état hétérozygote, non décrites comme polymorphes. Des études complémentaires sont nécessaires en vue d'évaluer leur caractère potentiellement délétère (recherche de la variation chez les parents et une cohorte de sujets contrôles, recherche d'un effet sur l'épissage pour les variations introniques).

Il est à noter qu'il s'agit d'altérations hétérozygotes qui peuvent conduire à la synthèse d'une protéine anormale. Si celle-ci est non fonctionnelle, l'effet peut être celui d'une haploinsuffisance, qui ne semble pas suffisante pour expliquer le phénotype observé, en particulier la dystonie.

La protéine synthétisée à partir de l'allèle muté peut également voir sa fonction altérée. Les conséquences peuvent alors être semblables à celles évoquées dans le cas de la translocation t(3;18). Une étude protéique pourrait alors être envisagée afin de comparer le taux de protéine *ROBO1* chez ces sujets avec celui observé chez

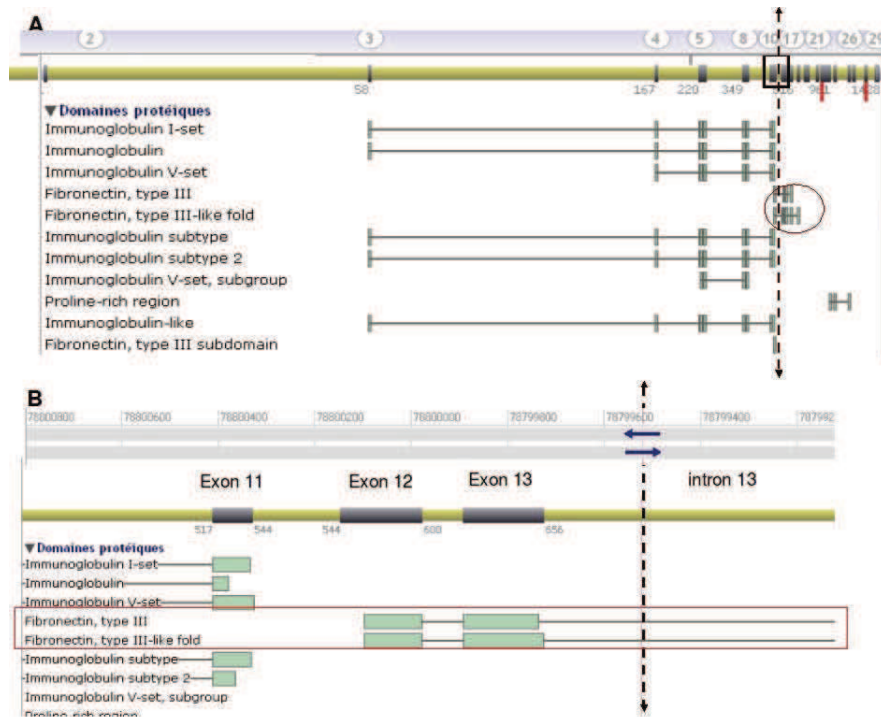


FIG. 4.25 – Structure génomique de *ROBO1* et domaines fonctionnels de la protéine. (A) Représentation des domaines fonctionnels de *ROBO1* : les exons codant les domaines fibronectine le domaine riche en proline ne sont pas transcrits, alors que les domaines Ig sont codés par les exons en amont du point de cassure sur le chromosome 3.

(B) Structure génomique partielle de *ROBO1* : agrandissement de la région encadrée en (A).

La position du point de cassure sur le *der3* est indiquée par la ligne en pointillés. Source : Alamut

notre patiente afin de réfuter formellement l'hypothèse d'une haploinsuffisance. Si ce taux se révélait être inférieur à 50%, l'hypothèse d'une expression monoallélique en faveur de l'allèle muté serait à contrôler (par RT-QPCR quantitative).

A ce stade, même si cela semble moins probable, l'hypothèse d'une pathologie récessive ne peut pas être écartée : l'altération du second allèle telle qu'un grand réarrangement de type délétions partielles, en particulier exoniques, de ce gène (par MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) ou QMPSF (Quantitative de PCR of Short Fluorescent Fragments)) pourrait être recherchée.

4.6.2.2 Impact phénotypique de l'interruption de *ROBO1* : implication en pathologie humaine

Les données de la littérature montrent que *ROBO1* peut être impliqué dans des pathologies humaines.

Dyslexie

ROBO1 a été considéré comme un gène candidat de la dyslexie par [Hannula-Jouppi 2005] suite à la mise en évidence d'une translocation t(3;8)(p12;q11) interrompant le premier intron de ce gène chez un sujet dyslexique. Par la suite, ces auteurs ont montré une diminution de l'expression de l'ARNm chez 4 dyslexiques.

Cependant, l'implication de ce gène dans la dyslexie a été remise en cause :

- l'une des sœurs du sujet porteur de la translocation présentait les mêmes troubles de la lecture mais sans translocation,
- l'expression de l'ARNm de *ROBO1* n'a été quantifiée que chez 4 sujets dyslexiques sur 21 dans une même famille, posant la question de la représentativité de ce nombre restreint de sujets,
- aucune données ne permet d'affirmer que l'expression lymphocytaire reflète l'expression cérébrale.

De plus, l'interruption de *ROBO1* ne conduit pas à un phénotype similaire à celui de l'enfant de cette étude. Ceci s'explique probablement par le fait que, dans le cas décrit par [Hannula-Jouppi 2005], l'**interruption dans le premier intron** ne compromet pas l'expression des variants issus de l'épissage alternatif, alors que dans le cas de la t(3;18), le point de cassure dans l'intron 13 interrompt tous les transcrits alternatifs.

Troubles du comportement

L'étude du niveau d'expression de l'ARNm au sein d'un groupe de 19 sujets autistes et 20 contrôles a révélé une **diminution significative de l'expression de *ROBO1* et *ROBO2*** dans le premier groupe par rapport au second. Une diminution non significative du taux d'ARNm de *ROBO3* et *ROBO4* chez les autistes est

par ailleurs observée [Anitha 2008]. Ces auteurs font également état d'une corrélation positive entre les taux d'expression pour ces 4 gènes alors qu'il n'y a pas de corrélation entre le quotient intellectuel et leur expression.

Retard de développement

Des délétions incluant ce gène ont été décrites chez 3 sujets présentant un retard de développement.

- [Petek 2003] rapportent le cas d'un enfant de 22 mois porteur d'une délétion interstitielle **de novo** de **15Mb** en 3p13p11 bornée par FISH. Il présente un **retard psychomoteur associé à une dysmorphie crânio-faciale** incluant une fente labiale, des fentes palpébrales orientées vers le bas, un visage carré, un front large, une hypoplasie des arcades sourcilières, des sourcils arqués, un nez court, des oreilles bas implantées à bascule postérieure, un cou court, des épaules étroites, un pectus carinatum. Un hypospadias est noté.

Le retard psychomoteur avec **retard de langage** s'accompagne par ailleurs de troubles du comportement à type d'**aggressivité**.

l'IRM cérébrale montre un élargissement de l'espace arachnoïdien bilatéral au niveau du lobe frontal. Il présente un anévrisme du septum auriculaire.

- Un second cas de délétion de **11,18Mb** en 3p12.1p13 dont l'origine parentale n'est pas connue, chevauchant la précédente, a été retrouvée chez un sujet de 19 ans chez lequel est décrit un **retard mental et une hypotonie** associés à une surdité de perception, une malrotation intestinale avec constipation, une dislocation de la hanche et des pieds bot (patient DECIPHER 2059). Dans ce cas, 13 gènes sont délétés, y compris *ROBO1* et *ROBO2*.
- Un troisième sujet porteur d'une délétion de **9,95Mb** en 3p11.1q11.1, chez lequel est décrit un **retard mental/ retard de développement** associé à des **troubles autistiques** est également rapporté dans la base de données DECIPHER (patient 1933). Cette délétion, **héritée de son père** décrit comme normal, emporte 7 gènes dont les 2 récepteurs *ROBO1* et *ROBO2*.

Etant donné la taille des délétions décrites, le fait qu'elles soient en partie chevauchantes et que plusieurs gènes soient en déséquilibre, il est difficile, à partir de ces 3 observations, d'impliquer l'haploinsuffisance de *ROBO1* seul dans le retard psychomoteur observé.

D'autre part, **aucun de ces 3 sujets ne présente de dystonie**.

Dans le troisième cas, le fait que le père du sujet décrit soit également porteur de la délétion porte à discussion : dans le cas d'une hypothèse d'haploinsuffisance, cette délétion étant la plus petite des 3, il est possible que le(s) gène(s) responsable(s) du retard mental se situe(nt) dans la région délétée commune aux 2 premiers cas uni-

quement. La différence phénotypique entre les 2 individus pourrait-elle s'expliquer par une pénétrance incomplète ou par un déséquilibre d'une taille différente, voire plus complexe chez le fils que chez son père ?

Enfin, ceci peut remettre en cause un mécanisme d'haploinsuffisance des gènes de cette région délétée, en particulier *ROBO1*, pour expliquer le retard mental.

Altération de la voie de signalisation SLIT-ROBO et retard mental

Un argument indirect en faveur du rôle de *ROBO1* dans le retard mental est fourni par l'identification du gène *MEGAP/srGAP3* (mental disorder-associated GAP protein/Slit-Robo Rho GTPase activating protein 3) et la mise en évidence de son implication dans ce type de troubles.

Ce gène localisé en 3p25 est interrompu à la suite d'une translocation **t(X;3)(p11.2;p25)** équilibrée *de novo* chez une patiente de 16 ans présentant un **retard psychomoteur sévère** avec une **démarche ataxique**, des **mouvements saccadés des bras**, de « faibles performances mentales » et une **absence de langage**. Des troubles du comportement à type d'autoagressivité périodique et déficit de l'attention sont notés. Y sont associés une **hypotonie** et une dysmorphie faciale (face triangulaire, arête du nez haute, micrognathie, philtrum court, palais haut et étroit, mains fines). Des épisodes épileptiques ont été signalés.

Une **délétion** de ce gène a par ailleurs été retrouvée chez 11 patients porteurs d'une délétion terminale 3p avec retard mental [Endris 2002].

MEGAP/srGAP3 code une RhoGAP (Rho-GTPase activating protein) qui comporte un domaine SH3 identifié comme nécessaire à la liaison des protéines srGAP au récepteur Robo1. La liaison de Slit à son récepteur Robo1 augmente l'interaction de ce dernier avec les protéines srGAP impliquées dans la transduction du signal, en particulier srGAP1, conduisant à leur activation [Wong 2001].

Par analogie, l'interaction entre Robo1 et srGAP3 aboutirait à une activation de celui-ci. Or srGAP3 inhibe les GTPases Rac1 et dans une moindre mesure Cdc42 *in vitro* [Endris 2002]. Ces dernières intervenant dans la régulation de la polymérisation d'actine et le guidage axonal, l'altération de ces voies de signalisation conduit à une perturbation de la voie de signalisation SLIT-ROBO.

L'enfant décrite par [Endris 2002] présente des similitudes phénotypiques avec notre patiente, à savoir un retard de développement sévère, une absence de langage et des troubles locomoteurs, laissant supposer que l'altération de la voie de signalisation SLIT-ROBO est bien impliquée dans les troubles observés chez notre patiente.

ROBO1 et dystonie syndromique ?

La dystonie représente une entité clinique avec une grande hétérogénéité génétique : différents gènes ou loci ont en effet été reliés à ce syndrome.

Aucune étude à l'heure actuelle ne fait état d'une relation entre l'altération de

ROBO1 et la dystonie. Des délétions de ce gène, se traduisant par une haploinsuffisance, ne sont pas responsables de ce syndrome. Les études rapportant les cas de 3 patients porteurs de ces délétions ne mentionnent cependant pas de détermination du taux de la protéine *ROBO1* synthétisée.

Dans notre cas, l'altération d'un allèle de *ROBO1* par la translocation t(3;18) pourrait conduire non pas à l'absence de transcrit et donc à une haploinsuffisance mais à la synthèse d'un **transcrit de fusion** et donc à un effet sur la synthèse voire la fonction de la protéine normale. Ce mécanisme (si la présence du transcrit de fusion est démontrée) peut expliquer le phénotype plus sévère décrit chez notre patiente et notamment la dystonie.

La mise en évidence d'altération de *ROBO1* chez d'autres sujets dystoniques et surtout de conséquences fonctionnelles identiques à celles de notre patiente serait un argument en faveur de l'implication de ce gène dans la dystonie. Une variation de séquence exonique non décrite comme polymorphe conduisant à une substitution d'acide aminé a été mise en évidence chez un sujet dystonique au cours de cette étude : sa pathogénicité reste à établir.

Il faut noter que toutes les études d'expression de *ROBO1* chez notre patiente ont été menées à partir de prélèvements sanguins. Il faut donc rester prudent quant à l'extrapolation de ces résultats au niveau du système nerveux central, d'autant plus que l'expression monoallélique de *ROBO1* peut être variable d'un tissu à l'autre (le taux d'inactivation de l'allèle non transloqué ne peut pas être estimé à ce niveau).

4.6.3 Impact phénotypique de l'interruption de séquence sur le chromosome 18 ?

En parallèle, l'étude du point de cassure sur le chromosome 18 a été entreprise : **aucun gène connu** à ce jour n'est **interrompu** par le point de cassure de la translocation, n'évoquant pas un effet sur le phénotype lié à l'altération de la séquence d'un gène.

Dans un second temps, l'**hypothèse d'un effet de position** a donc été posée : l'éloignement de séquences régulatrices d'un gène en raison de la translocation peut altérer l'expression de celui-ci. Ce mécanisme a ainsi permis d'expliquer la présence d'une séquence de Pierre Robin à partir de l'étude 3 familles porteuses de translocations impliquant la région 17q24 : une séquence régulatrice a pu être identifiée en amont des points de cassure et l'altération de la régulation du gène *SOX9* a été mise en cause dans le phénotype observé [Benko 2009].

Dans le cas présent, il existe des **séquences régulatrices** non codantes hautement conservées entre les espèces à proximité du point de cassure sur le chromosome 18. De plus, les gènes de part et d'autre du point de cassure codent d'une part un facteur de transcription potentiel exprimé au niveau cérébral au cours du

développement embryonnaire, *SALL3*, et d'autre part un récepteur *GALR1* de la galanine, neuropeptide impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions au niveau du système nerveux central.

L'étude de l'expression de l'ARNm des gènes les plus proches du point de cassure sur ce chromosome (*SALL3* et *GALR1*) est en cours.

Cependant, les données de la littérature ne font pas état d'un effet de position conduisant à un phénotype similaire.

[Rizzolio 2008] rapportent le cas d'une femme porteuse d'une translocation $t(X;18)$ dont le point de cassure sur le chromosome 18 est proche de celui décrit chez cette enfant (moins de 300kb de différence) : cependant, le phénotype est sans rapport avec celui observé dans le cas présent. Il s'agit en effet d'une femme de petite taille avec hypertrophie du tissu adipeux au niveau du tronc, présentant une posthypophyse ectopique associée à un déficit en hormone de croissance et gonadotropines. Par ailleurs, sur le plan morphologique, sont notées des bosses frontales et des arêtes du nez minces.

Ceci n'est donc **pas en faveur de la mise en cause de l'interruption de séquence sur le chromosome 18 dans la pathologie observée dans notre cas.**

Même si aucune preuve formelle de l'implication de l'altération *ROBO1* dans la dystonie n'a pu être apportée suite à son étude chez la patiente porteuse de la translocation $t(3;18)$ et chez 20 sujets dystoniques, il représente un gène candidat pour lequel le mécanisme d'action à l'origine de la dystonie serait un effet dominant négatif ou gain de fonction qui reste à démontrer à ce jour.

Discussion générale

Sommaire

5.1	Importance de la caractérisation moléculaire des remaniements chromosomiques et apport des techniques de cytogénétique moléculaire	117
5.1.1	Cartographie précise et recherche de gènes candidats	117
5.1.2	Compréhension du mécanisme moléculaire du réarrangement	118
5.2	Conséquences phénotypiques des remaniements : difficultés d'interprétation	119
5.2.1	Variations de nombre de copies et polymorphismes	119
5.2.2	Expressivité variable/pénétrance incomplète	121
5.2.3	Translocations équilibrées	122
5.3	Perspectives	123

5.1 Importance de la caractérisation moléculaire des remaniements chromosomiques et apport des techniques de cytogénétique moléculaire

La recherche de gènes candidats responsables d'anomalies du développement a pour but d'une part la compréhension du mécanisme physiopathologique à l'origine du phénotype pathologique et d'autre part la mise en place d'un conseil génétique approprié. Cette recherche passe par la mise en évidence de remaniements chromosomiques et par leur caractérisation moléculaire.

5.1.1 Cartographie précise et recherche de gènes candidats

Un gène candidat peut être dégagé suite à la découverte d'une anomalie déséquilibrée (délétion ou amplification) ou équilibrée (translocation réciproque).

5.1.1.1 Déséquilibres génomiques

Les avancées technologiques de ces dernières années ont donné lieu à la détection de microremaniements submicroscopiques.

Le développement des techniques de cytogénétique moléculaire telles que la **array-CGH**, permettant une étude pangénomique avec une **résolution** sans cesse accrue

(de l'ordre du kilobase actuellement), a ainsi conduit à la découverte de nouveaux microremaniements dont la taille est inférieure à celle correspondant à la limite de résolution d'un caryotype standard (environ 10Mb).

Par ailleurs, cette technique offre l'avantage de **borner** rapidement et précisément les déséquilibres génomiques. Elle évite ainsi la mise en place d'une stratégie de marche sur le chromosome par FISH plus longue et fastidieuse et permet une comparaison (par la localisation des points de cassure et la détermination de la taille) de déséquilibres touchant une même région chromosomique. Il est ainsi plus aisé de mettre en évidence des gènes candidats dont l'altération serait à l'origine du phénotype observé.

Les exemples des **délétions 20q13.33 et 21q22** traités ici illustrent ces propos.

5.1.1.2 Translocations équilibrées

Dans le cas de remaniements équilibrés tels que les translocations réciproques, il est important d'établir une cartographie précise des points de cassure afin de définir le mécanisme en cause dans l'apparition de la symptomatologie.

En effet, l'utilisation complémentaire de techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire allant jusqu'au séquençage débouche sur la mise en évidence d'un gène interrompu par la translocation ou de séquences régulatrices. Il est alors possible de s'orienter soit vers une pathologie de point de cassure, en fonction des caractéristiques du gène interrompu, soit vers un mécanisme correspondant à un effet de position. Des études fonctionnelles complémentaires sont alors nécessaires pour tester ces hypothèses.

C'est la démarche qui a été suivie au cours de l'étude de la translocation **t(3;18)** associée à une dystonie syndromique.

D'autre part, comme mentionné dans le chapitre d'introduction, l'impact phénotypique d'une translocation apparemment équilibrée peut être en relation avec un déséquilibre génomique non décelé par les techniques de cytogénétique conventionnelle. Lorsqu'une translocation apparemment équilibrée est mise en évidence chez un sujet à phénotype pathologique, il apparaît donc nécessaire de la caractériser plus précisément afin de déterminer son implication dans le phénotype observé et d'orienter le conseil génétique.

C'est dans cette optique qu'a été recherché un déséquilibre par array-CGH chez l'enfant porteuse de la translocation t(3;18).

5.1.2 Compréhension du mécanisme moléculaire du réarrangement

La localisation précise des points de cassure d'un déséquilibre génomique débouche sur l'étude de l'architecture génomique au niveau de ces derniers, avec notamment la recherche de séquences répétées de type duplications segmentaires laissant supposer une recombinaison allélique non homologue (NAHR) en cas de

remaniements récurrents.

Ainsi, pour les délétions décrites dans cette étude, aucune séquence de ce type n'est retrouvée aux points de cassure, écartant le mécanisme de NAHR et expliquant de ce fait l'absence de bornes récurrentes des délétions décrites dans la littérature.

5.2 Conséquences phénotypiques des remaniements : difficultés d'interprétation

L'évolution rapide de la technique d'array-CGH et des plateformes de génotypage des SNP a abouti à la mise en évidence de nombreux déséquilibres génomiques jusqu'alors méconnus en raison de la limite de résolution du caryotype, définissant pour certains de « nouveaux syndromes microdélétionnels » [Slavotinek 2008]. Elle a ainsi contribué à améliorer le diagnostic étiologique chez des patients présentant un retard mental et/ou des anomalies congénitales multiples.

Cependant, l'affirmation du caractère délétère ou non du déséquilibre n'est pas toujours aisée. L'étude de 3 remaniements chromosomiques met en exergue la difficulté d'établir des corrélations génotype-phénotype dans un certain nombre de cas, que le réarrangement soit déséquilibré ou équilibré.

Ceci peut avoir plusieurs explications listées ci-dessous.

5.2.1 Variations de nombre de copies et polymorphismes

Un grand nombre de déséquilibres génomiques correspond à des variations de nombre de copies (CNV) considérés comme polymorphes car décelés chez des individus sains et qui sont répertoriés sur le site Database of Genomic Variants (DGV).

Ils doivent donc être pris en compte pour interpréter la signification clinique de tout déséquilibre génomique. Il convient en effet de comparer le déséquilibre retrouvé chez un patient à la base de données afin d'éliminer toutes les régions polymorphes. Cette démarche a été suivie lors de l'étude des 2 délétions rapportées ici : aucune d'elles ne s'est révélée correspondre à un polymorphisme connu.

Cependant, dans 7,74% des cas (d'après DGV), ces variations décrites comme polymorphes touchent des gènes associés à une pathologie décrite dans OMIM¹, pouvant être récessive.

Si un déséquilibre décrit comme polymorphe est mis en évidence dans l'un de ces gènes, il faut bien sûr mettre en relation le phénotype de l'individu avec le déséquilibre afin de rechercher une éventuelle altération (de type mutation ponctuelle) sur le second allèle si le phénotype est évocateur de la pathologie décrite. Ce même principe est appliqué à tout gène candidat en déséquilibre.

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

L'interprétation de la signification clinique d'un déséquilibre génomique repose sur un ensemble de critères de pathogénicité décrits par [Lee 2007] et qui sont résumés dans le tableau 5.1 ci-dessous.

Ils tiennent compte de la présence de gènes et de leur implication éventuelle dans une pathologie ainsi que de leur transmission et de la population dans laquelle le déséquilibre a pu être décrit (sujets atteints ou sains).

Si un déséquilibre *de novo* semble *a priori* délétère, la signification clinique d'un déséquilibre hérité peut être plus délicate à établir. Par ailleurs, en cas de doute sur le caractère délétère d'un déséquilibre familial, l'étude de la fratrie et des apparentés peut s'avérer utile pour déterminer si le déséquilibre ségrège avec la pathologie.

<u>Critères majeurs</u>	Caractéristiques des CNV pathogènes	Caractéristiques des CNV bénins
hérité d'un parent sain		X
hérité d'un parent atteint	X	
identique chez un apparenté sain		X
identique chez un apparenté atteint	X	
chevauche un CNV décrit dans une population saine		X
chevauche un CNV décrit dans une population atteinte	X	
contient des gènes OMIM associés à une pathologie	X	
riche en gènes	X	
pauvre en gènes		X
<u>Critères mineurs</u>		
délétion	X	
délétion homozygote	X	
duplication		X
amplification	X	
>3Mb	X	
région dépourvue d'éléments régulateurs		X

TAB. 5.1 – Critères de pathogénicité des CNV d'après [Lee 2007].

Les critères en faveur du caractère délétère du CNV sont en gras.

Cependant, ces critères ne sont pas immuables, il faut en effet tenir compte de notions telles que l'expressivité variable et la pénétrance incomplète pour expliquer les variabilités phénotypiques rencontrées au décours de la découverte de remaniements chromosomiques *a priori* identiques, en particulier au sein d'une même famille.

5.2.2 Expressivité variable/pénétrance incomplète

L'**expressivité variable** se définit comme la variabilité dans la survenue de manifestations cliniques d'un même gène chez des individus différents (aspect **qualitatif**).

Les délétions subtélomériques 20q13.33 traitées plus haut en sont une illustration. L'épilepsie est décrite de façon inconstante dans les différents cas rapportés alors que ces délétions incluent toutes le gène *KCNQ2* dont l'altération conduit à une épilepsie de transmission autosomique dominante. De même, l'haploinsuffisance de *KCNQ2* associée à celle de *CHRNA4*, gène également en cause dans la survenue d'épilepsie, ne se traduit pas par cette symptomatologie dans un cas.

La **pénétrance** correspond au nombre d'individus phénotypiquement atteints/le nombre d'individus porteurs de l'altération du gène (aspect quantitatif). Dans le cas de pathologies autosomiques dominantes, elle est dite incomplète lorsqu'une partie seulement des individus porteurs de l'anomalie génétique présente un phénotype délétère (aspect **quantitatif**).

On peut citer l'exemple de la microdélétion récurrente en **15q13.3** initialement décrite par [Sharp 2008] avec une fréquence estimée à 0,29% des retards mentaux (9/2082 sujets présentant un retard mental). Le phénotype clinique associait un retard mental léger à modéré, une dysmorphie faciale variable, des anomalies des extrémités et une épilepsie (7/9) pour laquelle le gène candidat était *CHRNA7*. Par la suite, [Miller 2009] retrouvent ce même réarrangement chez des sujets avec un retard mental modéré ou des troubles d'apprentissage, des troubles du spectre autistique et des troubles du comportement. Par contre, l'épilepsie n'est retrouvée chez aucun de ces sujets.

Cette délétion a ensuite été considérée comme un facteur de risque de schizophrénie [Stefansson 2008] et [Consortium 2008] et d'épilepsie [Helbig 2009] et [Dibbens 2009].

Enfin, 2 autres études [van Bon 2009] et [Ben-Shachar 2009], portant respectivement sur 18 et 20 sujets avec une délétion 15q13.3, font état d'une très grande **variabilité phénotypique intra et inter-familiale**. Sont décrits aussi bien des individus sans phénotype pathologique que des sujets présentant un déficit cognitif variable (difficultés d'apprentissage à retard mental), un autisme, une épilepsie, des troubles bipolaires ou une schizophrénie, alors qu'il s'agit d'un **réarrangement récurrent** dont les bornes sont identiques chez tous les sujets. Par ailleurs, aucun des signes cliniques ne semble constant.

Se pose alors la question de d'un **remaniement délétère ou d'un facteur de susceptibilité**. Différentes hypothèses peuvent être posées pour expliquer ce phénomène.

1. L'haploinsuffisance de certains gènes inclus dans la région remaniée ou interrompus n'est pas suffisante pour induire le phénotype observé. Il peut alors s'agir d'une **pathologie récessive** liée à la présence d'une mutation

ou d'un polymorphisme fonctionnel sur le second allèle, transmis par l'un des parents. Dans ce cas, la perte ou la diminution de l'activité du variant associée à la perte d'activité liée au remaniement chromosomique peut rendre compte du phénotype.

Cette hypothèse a été envisagée dans le cadre de l'étude de la translocation $t(3;18)$ et nous a amené à séquencer les exons du second allèle de *ROBO1*.

2. L'influence de facteurs **épigénétiques** peut être évoquée : un mécanisme d'empreinte est envisageable dans certains cas.
3. Des facteurs **environnementaux** peuvent également intervenir dans la variabilité phénotypique.

Ces notions sont importantes car la mise en évidence d'un remaniement chromosomique chez un sujet peut avoir des répercussions sur la prise en charge familiale, notamment dans le cadre d'un diagnostic prénatal.

Ces exemples montrent qu'une interprétation fiable des conséquences phénotypiques d'un déséquilibre génomique passe par des études de cohortes importantes ou tout du moins par la comparaison de cas cliniques présentant des remaniements similaires afin de délimiter une région minimale critique, à partir des données de la littérature et de regroupements de patients par le biais d'études collaboratives et la mise en commun des données collectées et consultables grâce aux bases de données telles que DECIPHER.

C'est la démarche que nous avons voulu adopter lors de l'étude des délétions 20q13.33 en particulier, fruit d'un travail collaboratif. De la même façon, un gène candidat du retard mental a pu être dégagé en 21q22 suite à la publication et au recoupement de différents cas, dont celui de la patiente rapportée dans cette étude.

5.2.3 Translocations équilibrées

La mise en évidence de translocations réciproques équilibrées a été à la base d'identification de gènes responsables de pathologies.

La présence d'une translocation $t(3;18)(p12.3;q23)$ *de novo* associée à une dystonie syndromique a été le point de départ d'une étude visant à identifier un gène candidat de la dystonie, dans l'hypothèse d'une pathologie de point de cassure.

Cependant, il est souvent difficile d'établir une relation de cause à effet entre une translocation équilibrée et la symptomatologie observée. C'est ce que démontrent [Vandeweyer 2009]. A partir du recensement de tous les cas de translocations équilibrées identifiées chez des patients présentant un retard mental, les auteurs en distinguent 4 catégories :

- les translocations équilibrées qui ont aidé à identifier des gènes impliqués dans le phénotype d'un syndrome microdélétionnel (17 translocations pour 14 gènes identifiés),

- les translocations qui ont identifié des gènes dont l'implication dans le retard mental a été confirmée par une autre technique (15 translocations correspondant à 12 gènes),
- les translocations interrompant des gènes dont le rôle dans le retard mental n'a pas été confirmé (21 translocations impliquant 17 gènes)
- les translocations n'interrompant pas de séquence codante et sans gène candidat (39 translocations).

Ces données traduisent le fait que la signification clinique d'une translocation n'est pas établie avec certitude dans 2/3 des cas en fonction des connaissances actuelles.

Cependant, même si aucun gène candidat n'est interrompu par la translocation, d'autres mécanismes de régulation peuvent être à l'origine du phénotype : il peut en effet s'agir d'un effet de position ou de l'altération de la régulation par un ARN non codant par exemple.

L'implication d'un gène identifié par le biais d'une translocation, dans une pathologie donnée, repose souvent sur un faisceau d'arguments dont la mise en évidence de mutations délétères chez d'autres individus présentant un phénotype similaire ou la description de plusieurs cas de remaniements impliquant le même gène (translocation ou délétion) et responsable d'un phénotype semblable.

5.3 Perspectives

Les différentes études qui font état de la mise en évidence de translocations réciproques équilibrées soulignent toutes la difficulté d'impliquer formellement un gène dans une pathologie donnée. Le cas de la translocation t(3;18) décelée chez une patiente présentant une dystonie syndromique en est un exemple supplémentaire. Dans ce cas, suite à l'étude de l'expression de l'ARNm et de la protéine ROBO1, plusieurs hypothèses s'offrent à nous. Parmi celles-ci, celle de l'existence d'un transcrit de fusion semble probable, d'autant plus que les données *in silicio* vont dans ce sens. Il convient néanmoins de tester cette hypothèse par la réalisation d'une technique de 3'RACE-PCR.

Si un transcrit de fusion est identifié, il serait alors nécessaire de mettre en œuvre des tests fonctionnels afin de vérifier que la protéine chimère a un effet sur le développement cérébral. Il serait alors intéressant de disposer d'un modèle murin pour évaluer l'effet de ce type de remaniement chez l'animal knock-in après introduction de la séquence génomique issue de la translocation t(3;18).

Matériels et méthodes

Sommaire

6.1	Matériel biologique	125
6.2	Culture cellulaire	125
6.3	Extraction des acides nucléiques	126
6.3.1	ADN génomique	126
6.3.2	ARN totaux	126
6.3.3	Contrôle de la quantité et qualité des acides nucléiques	126
6.4	Cytogénétique et cytogénétique moléculaire	127
6.4.1	Préparation des chromosomes métaphasiques	127
6.4.2	Caryotype en bandes GTG (bandes G, Trypsine, Giemsa)	127
6.4.3	FISH	127
6.4.4	Array-CGH	128
6.5	Techniques de biologie moléculaire	129
6.5.1	Polymerase Chain Reaction (PCR)	129
6.5.2	PCR longs fragments	130
6.5.3	Séquençage	131
6.5.4	Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR)	132
6.5.5	Southern blot	133
6.5.6	Northern blotting	134
6.5.7	Western blotting	135
6.6	Chimiotactisme des polynucléaires	135

6.1 Matériel biologique

Le matériel génétique étudié a été extrait à partir de prélèvements sanguins ou à partir de lignées de cellules lymphoblastoïdes (patiente porteuse de la translocation t(3;18)). Pour chaque patient prélevé, un consentement libre et éclairé est signé pour permettre l'utilisation de l'ADN et/ou l'ARN.

6.2 Culture cellulaire

Les lignées continues sont établies à partir de sang veineux prélevé sur héparine-lithium. La transformation lymphoblastoïde est réalisée sous l'action du virus d'Epstein Barr. Les cellules sont conservées dans l'azote liquide à -196°C dans un milieu

de congélation contenant 20% de sérum de veau fœtal, 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde). Les lymphoblastes sont cultivés dans un milieu RPMI 1640 avec 20% de sérum de veau fœtal, antibiotiques et antifongiques (GIBCO™).

6.3 Extraction des acides nucléiques

6.3.1 ADN génomique

L'extraction est réalisée à partir d'un prélèvement sanguin ou de cellules lymphoblastoïdes à l'aide du kit Nucleon BACC3™(Amersham) selon les instructions du fournisseur. Après précipitation par l'éthanol, l'ADN est resuspendu dans du tampon TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH8).

6.3.2 ARN totaux

6.3.2.1 A partir de lignées lymphoblastoïdes

L'extraction est effectuée le lendemain du changement de milieu pour être en phase de croissance exponentielle.

Les ARN totaux de la patiente porteuse de la translocation t(3;18) et ceux des témoins pour la réalisation ultérieure de RT-QPCR et analyse par northern blotting sont extraits à l'aide du RNeasy kit™(Qiagen).

Après comptage (2 à $3 \cdot 10^6$ cellules sont nécessaires pour ne pas saturer la colonne), les cellules sont lavées dans 10mL de phosphate buffer saline (PBS) pour éliminer les protéines et le milieu de culture inhibiteur de l'extraction.

L'extraction sur colonne de silice est réalisée selon le protocole préconisé par le fournisseur.

6.3.2.2 A partir de sang

Les prélèvements sanguins sont effectués sur tubes PAXGene™(PreanalytiX) afin d'assurer la stabilité des ARN. Les ARN sont extraits avec le kit d'extraction PAXGene blood RNA isolation kit™(PreAnalytiX) en accord avec le protocole du fournisseur.

6.3.3 Contrôle de la quantité et qualité des acides nucléiques

Le contrôle de la qualité et la quantification d'ADN et d'ARN ont été réalisés par spectrophotométrie (ND-100 Nanodrop™).

Les ARN utilisés pour northern blotting sont contrôlés avant hybridation à l'aide du 2100 Bioanalyzer™(Agilent) avec le kit RNA 6000 Nano Assay™(Agilent).

6.4 Cytogénétique et cytogénétique moléculaire

6.4.1 Préparation des chromosomes métaphasiques

Les techniques de cytogénétiques sont réalisées soit à partir d'un prélèvement sanguin soit à partir de lignées lymphoblastoïdes.

A partir d'un prélèvement sanguin, les lymphocytes T stimulés par la phytohémaglutinine sont mis en culture pendant 72 heures à 37°C.

Les lignées lymphoblastoïdes sont décongelées et remises en culture. Les cellules sont traitées 24 heures après le changement de milieu, en phase de croissance exponentielle.

Les cellules sont bloquées en métaphase par 45µL de colchicine (20mg/mL) pendant 45min à 37°C en présence de 200µL de bromure d'éthidium (0,7mg/mL). Après centrifugation (1200t/min, 5min), un choc hypotonique est appliqué (KCl à 0,0075M) pendant 17min à 37°C. La préfixation est obtenue par ajout de 1mL de fixateur (3 volumes d'éthanol absolu pour 1 volume d'acide acétique). Après centrifugation (1200t/min, 5min), suivent 3 lavages dans 12mL de fixateur (1200t/min, 5min) et la remise en suspension du culot dans du fixateur. Après étalement, les lames sont traitées pour la réalisation du caryotype ou la réalisation d'une technique de FISH. Dans ce cas, elles sont vieillies 24 à 48 heures à l'abri de la lumière.

6.4.2 Caryotype en bandes GTG (bandes G, Trypsine, Giemsa)

Les lames sont vieillies une nuit à 65°C. Elles sont ensuite incubées dans une solution de trypsine à 37°C pendant 10 secondes, rincées dans 2 bains de PBS et colorées dans une solution contenant 9mL de Giemsa (Biolyon), 9mL d'acide citrique (3M) et 9mL de méthanol (1M). Les lames sont ensuite rincées et analysées.

6.4.3 FISH

6.4.3.1 Préparation des sondes : culture bactérienne, extraction d'ADN et marquage des sondes

Les BAC utilisés comme sondes pour cartographier le point de cassure de la translocation t(3;18) et pour borner les délétions 21q22 et 20q13.33 ont été sélectionnés à partir du site UCSC genome browser et fournis par le Wellcome Trust Sanger Institute ¹.

Après culture bactérienne d'une nuit en milieu liquide LB Broth Miller à 37°C en présence de chloramphénicol (20µg/mL) et centrifugation (20min à 40000t/min), les sondes BAC sont obtenues à partir des culots bactériens par extraction de l'ADN du BAC avec le kit NucleoBond PC 100TM (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant.

Le marquage par incorporation de fluorophore (fluorescéine isothiocyanate ou rhodamine) est réalisé par nick translation à l'aide du kit nick translationTM (Vysis)

¹<http://www.sanger.ac.uk>

selon les recommandations du fournisseur.

6.4.3.2 Hybridation et lavages

Les cellules obtenues après culture de lymphocytes T ou de lignée lymphoblastoïde sont étalées sur une lame et ensuite prétraitées par une solution de HCl à 0,01M, 0,01% de pepsine à 37°C, lavées 2 fois 5min dans du PBS 1X et fixées par une solution de formaldéhyde à 3% pendant 2min à température ambiante et déshydratées dans 3 bains d'éthanol de concentration croissante (70, 85 et 100%). Après dénaturation 3min à 72°C et hybridation une nuit à 37°C avec la sonde marquée, les lames sont lavées 2min dans une solution de SSC 0,4X/0,3% NP40 à 72°C puis 15 secondes dans une solution de SSC 2X/0,1%NP40 à température ambiante. Les cellules sont contre-colorées au DAPI. Les signaux sont visualisés par microscopie à épifluorescence (Axioplan 2 imaging, Zeiss).

6.4.4 Array-CGH

6.4.4.1 Puce Genosensor Array 300 (Abbott)

Elle a été utilisée pour mettre en évidence la délétion 21q22 chez la patiente 2 décrite dans le chapitre 3.

La lame possède 287 clones, en majorité des BACs avec quelques PACs et P1s. Les séquences représentées sur la lame correspondent à des oncogènes (68 clones) ou des gènes suppresseurs de tumeur (26 clones) présumés ou connus, à des régions de perte d'hétérozygotie (40 clones). Des régions subtélomériques (74 loci) ou interstitielles (29 loci) connues comme étant le siège de syndromes microdélétionnels ou de microduplications sont représentées. On dénombre au minimum 3 clones par bras chromosomique pour une couverture moyenne de 40 Mb par chromosome.

Le protocole est celui préconisé par le fabricant. L'analyse des déviations décelées est réalisée à l'aide du logiciel Genosensor 300TM(Abbott).

6.4.4.2 Puce Genosystem 1MB (Spectral Genomics)

Ce type de puce a été utilisé pour la mise en évidence de la délétion 20q13.33 chez la patiente 2 (chapitre 2).

Les sondes sont constituées par 2632 BACs non chevauchants issus de RPCI BAC library (Roswell Park Cancer Institut), répartis sur l'ensemble du génome. La résolution est de l'ordre de 1Mb.

L'hybridation est réalisée selon les recommandations du fournisseur.

L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel SpectralWareTM(Spectral Genomics).

6.4.4.3 Pucés 44K et 105K (Agilent)

Les sondes sont représentées par des oligonucléotides de 60 bases, permettant une couverture de l'ensemble du génome. La distance moyenne entre 2 sondes consécu-

tives, déterminant la résolution, est respectivement de 35kb et 15kb pour les puces 44K et 105K. La puce 44K a été utilisée pour le bornage des délétions 21q22 et 20q13.33, alors que la puce 105K a été utilisée pour rechercher un déséquilibre chez la patiente porteuse de la translocation t(3;18).

Un microgramme d'ADN extrait à partir de cellules de lignée lymphoblastoïde de la patiente a été hybridé contre l'ADN d'un témoin de même sexe sur une lame Human Genome CGH microarrayTM (Agilent Technologies). L'hybridation est mise en œuvre selon les recommandations du fabricant.

Les ADN sont digérés par *AluI* (5 unités) et *RsaI* (5 unités) (Promega) pendant 2 heures à 37°C. Le contrôle de la digestion est réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (observation d'une trainée entre 200 et 1000pb).

Les ADN sont marqués par random priming pendant 2 heures à 37°C (ADN de la patiente par la cyanine 5-dCTP et celui du témoin par la cyanine 3-dCTP). Le contrôle du taux d'incorporation des cyanines par mesure de l'activité spécifique (1000 X concentration d'ADN (ng/ μ L)/324,5 X concentration en cyanine (pmol/ μ L)) et le dosage des ADN sont réalisés par spectrophotométrie (ND-100 NanodropTM). L'activité spécifique doit être inférieure à 45 pour une hybridation ultérieure de qualité. L'hybridation a lieu à 65°C pendant 40 heures suivie de lavages à l'aide des solutions fournies par Agilent.

Après avoir scanné les lames, les données de fluorescence sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Feature ExtractionTMv9.1. La visualisation des déséquilibres génomiques se fait grâce au logiciel CGH analyticsTMv3.4 (Agilent). L'algorithme d'analyse utilisé est ADM2, avec un seuil fixé à 6 et un minimum de 3 sondes consécutives déviantes pour considérer une déviation comme significative.

6.5 Techniques de biologie moléculaire

6.5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Elle a été mise en œuvre pour le séquençage des exons des gènes *ROBO1* et *DYT1* mais aussi pour la synthèse de sondes d'ADNc utilisées pour les techniques de Southern blot, northern blotting et western blotting ainsi que pour la recherche d'un gène putatif en 18q23 dans le cas de l'étude de la translocation t(3;18).

La composition du mélange réactionnel est la suivante, dans un volume final de 25 μ L :

- 100ng d'ADN génomique total,
- 0,4 μ M d'amorces sens et anti-sens,
- 0,2mM de dNTP,
- 2mM de MgCl₂,
- 2U de Taq polymérase,
- 2,5 μ L de tampon spécifique de la Taq utilisée.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- dénaturation initiale : 5min à 95°C
- 30 cycles comprenant chacun :
 - une étape de dénaturation : 30sec à 95°C,
 - une étape d'hybridation des amorces : 30 à 45sec à une température spécifique pour chaque couple d'amorces,
 - une étape d'élongation : 30 à 45sec selon le fragment à amplifier à 72°C,
- une extension finale : 7min à 72°C.

La qualité et la quantité des produits de PCR sont contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TBE (Tris borate 0,9mM, EDTA 20mM, pH8,2) en présence de 0,5mg/mL de bromure d'éthidium. La taille des produits de PCR est évaluée à l'aide d'un marqueur de taille approprié.

6.5.2 PCR longs fragments

Cette technique a été utilisée pour isoler le fragment de jonction issu de la translocation t(3;18)(p12.2;q23).

Le kit Expand Long template PCR SystemTM(Roche) permet l'amplification de fragment d'ADN dont la taille peut aller jusqu'à 30kb grâce à l'utilisation d'un mélange réactionnel contenant une Taq DNA polymérase et une Tgo polymérase, ADN polymérase thermostable.

Neuf couples d'amorces anti-sens localisés tous les 10kb dans la séquence du BAC RP11-105 chevauchant le point de cassure sur le chromosome 18 ont été testées avec une amorce sens localisée dans l'exon 11 de *ROBO1*.

Des mises au point ont été réalisées. Elles ont consisté à faire varier :

- la composition du tampon des Taq polymérases (concentration en MgCl₂ entre 1,75 et 2,75mM et présence ou non de détergent),
- la température d'hybridation des amorces,
- le temps d'élongation,
- le nombre de cycles de PCR.

Elles ont finalement abouti à la détermination des conditions optimales d'amplification pour l'obtention du fragment de jonction.

Le mélange réactionnel est le suivant, dans un volume final de 50μL :

- 250ng d'ADN
- 0,3μM d'amorces sens et anti-sens
- 0,35mM de dNTP
- 5μL du tampon de l'enzyme (MgCl₂ à une concentration de 1,75mM)
- 3,75U d'enzymes

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- une dénaturation initiale : 4min à 94°C
- 10 cycles comprenant chacun :

- une étape de dénaturation : 10sec à 94°C,
- une étape d'hybridation des amorces : 30sec à 54°C,
- une étape d'élongation : 10min à 68°C,
- 25 cycles comprenant chacun :
 - une étape de dénaturation : 15sec à 94°C,
 - une étape d'hybridation des amorces : 30sec à 54°C,
 - une étape d'élongation : 10min+20sec/cycle à 68°C,
- une extension finale : 7min à 68°C.

Après migration électrophorétique sur un gel d'agarose à bas point de fusion à 2%, le fragment est découpé dans le gel et purifié avec le kit Nucleospin Extract IITM (Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant.

6.5.3 Séquençage

Il a permis de connaître la séquence au niveau des points de cassure sur les der3 et 18 de la translocation t(3;18).

En outre, la séquence codante des gènes *ROBO1* et *DYT1* a été analysée dans le cadre de l'étude de la translocation t(3;18).

Les amorces introniques localisées en bordure des exons ont été choisies à l'aide du logiciel ExonPrimer².

L'ADN double brin est séquençé selon la méthode de Sanger.

Une première PCR permet d'amplifier le fragment d'ADN correspondant à l'exon. Les produits de PCR sont purifiés par l'ExoSAP (USB Corporation) afin d'éliminer les dNTP non incorporés au cours de l'amplification et l'excès d'amorces (15min à 37°C suivi d'une dénaturation enzymatique de 15min à 80°C).

Le séquençage est réalisé dans les 2 directions à l'aide du BigDye Terminator Cycle Sequencing kitTM (Applied Biosystems).

Trente cycles de PCR sont réalisés : une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes est suivie de l'hybridation des amorces à 50°C pendant 5 secondes et de l'élongation à 60°C pendant 5min.

L'électrophorèse capillaire est réalisée avec l'analyseur génétique Applied Biosystems 3130.

La position et la nature des variations de séquence sont rapportées selon les recommandations de l'Human Genome Variation Society (HGVS). La séquence de référence utilisée est celle du transcrit NM_002941.2 en prenant la base A du codon ATG d'initiation comme base +1.

L'analyse des variations de séquences est réalisée à l'aide du logiciel Alamut 1.5TM (Interactive Biosoftware) qui compile les informations de différentes bases de données bioinformatiques.

²<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>

6.5.4 Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR)

6.5.4.1 Transcription inverse

La réaction de transcription inverse est réalisée à partir de 1 μ g d'ARN totaux dans un volume de 20 μ L. Le mélange réactionnel contient 4 μ L de tampon de la Superscript, 0,01M de dithiotreitol (DTT), 5ng/ μ L d'hexanucléotides, 20U d'inhibiteur de RNase, 0,5mM de dNTP et 200U de superscript reverse transcriptase (Invitrogen Corp.). Elle est réalisée selon le protocole fourni par le fabricant.

6.5.4.2 PCR quantitative en temps réel (QPCR)

Cette technique a été mise en œuvre, après transcription inverse, pour quantifier l'ARNm des gènes dont l'expression aurait pu être modifiée suite à la translocation t(3;18), à savoir *ROBO1*, *ROBO2*, *SALL3* et *GALR1*.

La quantité d'ADN double brin synthétisée est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification grâce à l'utilisation d'une molécule fluorescente, le SYBR greenTM, qui a la propriété de s'intercaler entre les bases d'ADN double brin.

Le cycle seuil (ou threshold cycle Ct), cycle d'amplification à partir duquel la fluorescence est significativement différente de la fluorescence liée au bruit de fond, reflète le taux d'expression d'ARNm. Il est inversement proportionnel à la quantité initiale de cible présente dans l'échantillon.

Choix des amorces

Les amorces, localisées dans des exons consécutifs pour s'affranchir d'une amplification de l'ADN génomique contaminant, sont sélectionnées à l'aide du logiciel Primer Express 2.0.0 ABI Prism oligo designTM (Applied Biosystems).

La spécificité du produit de PCR est contrôlée sur le site de l'UCSC genome browser.

L'absence de polymorphisme de type SNP dans les amorces est également contrôlé sur le site NGRL (National Genetics Reference Laboratory)³.

Contrôle de l'efficacité et de la spécificité de la PCR

Pour pouvoir réaliser une quantification relative basée sur la méthode d'analyse des $\Delta \Delta C_t$ [Livak 2001], il est nécessaire de contrôler au préalable l'efficacité et la spécificité des PCR pour les transcrits cibles et ceux des gènes de référence.

L'amplification est réalisée dans les conditions suivantes : dans un volume final de 20 μ L, le mélange réactionnel contient 0,4 μ M d'amorces sens et anti-sens, 10 μ L de 2X Power SYBR Master MixTM (Applied Biosystems) et 5 μ L de solution d'ADNc correspondant à des dilutions successives de la cible de 100, 50, 10, 1 et 0,1ng pour réaliser une courbe d'étalonnage.

³<http://ngrl.org.uk/Manchester/snpcheck.html>

La PCR, réalisée sur ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (SDS), comprend un cycle de dénaturation à 95°C pendant 10min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 15sec et 60°C pendant 1min. La pente de la droite d'étalonnage traduit l'efficacité de la PCR ($E = 10^{-p} - 1$, où E est l'efficacité et p la pente de la droite) qui doit être comprise entre 0,9 et 1,1.

La spécificité des amorces et l'absence de dimères d'amorces sont vérifiées par une étape de dissociation mise en œuvre à la fin de l'amplification et qui consiste en une dénaturation (15 secondes à 95°C) suivie d'un refroidissement rapide à 60°C et d'une ascension progressive et lente en température jusqu'à 95°C.

La dérivée de la courbe de fusion (quantité de fluorescence émise en fonction de la température) montre la présence d'un pic unique pour chaque amplification si celle-ci est spécifique.

Quantification relative

Chaque échantillon est traité en triplicat. La quantité d'ADNc correspond à 100ng d'ARN totaux rétrotranscrits.

Les conditions d'amplification sont les mêmes que précédemment.

La quantité d'ARNm du gène cible chez les patients est comparée à celle d'un témoin. Les gènes de référence *ESD* et *ABL1* sont utilisés pour normaliser les résultats (correction des variations liées à la quantité d'ARN de départ et l'efficacité de la transcription inverse).

Les résultats sont analysés avec le logiciel ABI Prism 7500 SDS version 1.4TM(Applied Biosystems).

6.5.5 Southern blot

6.5.5.1 Synthèse des sondes d'ADNc

Synthèse

Les amorces nécessaires à la synthèse des sondes ont été dessinées par le logiciel Primer3⁴. Les sondes sont synthétisées par PCR en prenant pour matrice de l'ADNc obtenu par transcription inverse à partir d'ARN total.

L'ADNc est ensuite purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract IITM(Macherey Nagel) selon les recommandations du fabricant.

Ces sondes sont contrôlées par séquençage avant hybridation.

Marquage des sondes

Vingt cinq nanogrammes d'ADNc sont marqués par incorporation de dCTP marqués au ³²P par une réaction de random priming avec le Random Primed DNA labeling kitTM(Roche Diagnostics).

Elles sont ensuite purifiées sur colonne de type Nick ColumnsTM(Amersham Biosciences) selon les recommandations du fournisseur.

⁴<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

6.5.5.2 Digestion de l'ADN

Dix microgrammes d'ADN de la patiente obtenu à partir de cellules de lignée lymphoblastoïde et d'ADN de deux témoins ont été digérés avec 20U des six enzymes de restriction *BglIII*, *EcoRV*, *XbaI*, *BamHI*, *EcoRI* et *HindIII* pendant 4 heures à 37°C.

6.5.5.3 Hybridation

Après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 0,8% pendant une nuit à 40V, l'ADN est transféré sur membrane Hybond N+ (Amersham Biosciences) en conditions dénaturantes (NaOH 0,4N). L'hybridation est réalisée dans une solution d'Hybond une nuit à 65°C. Après lavages à 65°C (2 fois 15min dans une solution de SSC 2X, 30min dans une solution de SSC 2X/SDS 0,1%, 10min dans une solution de SSC 0,1X/SDS 0,1%), la révélation se fait après exposition de la membrane à un film photographique à -80°C.

6.5.6 Northern blotting

6.5.6.1 Synthèse et marquage des sondes d'ADNc

La synthèse des sondes d'ADNc, leur marquage et purification sont identiques à ceux utilisés pour le Southern blot.

6.5.6.2 Hybridation

Le northern blotting a été réalisé avec le kit Northern MaxTM(Ambion). La qualité et la quantité des ARN hybridés ont été contrôlées avec le BioanalyzerTM(Agilent).

Dix microgrammes d'ARN totaux ont été séparés par migration électrophorétique (50V pendant 10 heures) sur gel d'agarose à 1% en conditions dénaturantes (formaldéhyde 1%).

Après transfert d'une nuit sur une membrane Hybond-XL (Amersham Biosciences) dans un tampon alcalin, la membrane est préhybridée 1 heure dans le tampon d'hybridation à 42°C avant l'hybridation réalisée à 42°C pendant une nuit.

La membrane est ensuite lavée 2 X 5min à température ambiante sous agitation dans une solution de faible stringence (2X SSC, 0,1% SDS). S'ensuivent 2 lavages de 15min à 42°C sous agitation dans une solution stringente (0,1X SSC, 0,1% SDS). La révélation se fait après exposition de la membrane à un film photographique à -80°C.

La β -actine est utilisée comme ARNm de référence pour contrôler la migration et le transfert et quantifier les transcrits.

6.5.7 Western blotting

Les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites (NE-PER Nuclear and cytoplasmic Extraction kitTM, Pierce Biotechnology) à partir de culots leucocytaires obtenus après centrifugation en gradient de ficollTM.

Les protéines sont quantifiées à l'aide du BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology) par spectrophotométrie à 562nm.

Dix μ g de protéines sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (1h30 à 100V) et transférés sur une membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène) (Amersham) par application d'un courant électrique de 15V pendant 1 heure.

Le blocage des sites antigéniques non spécifiques sur l'immunoblot est réalisé avec une solution de PBS, 5% BSA.

La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire polyclonal de lapin (ab7279, Abcam), dilué au 1/5000 dans une solution de PBS, 5% BSA, 0,05% Tween 20 pendant 1 heure. Cet anticorps reconnaît un épitope correspondant aux acides aminés VLGGYERGEDNNE de la protéine ROBO1, localisés dans la partie C-terminale des différents isoformes (NM_002941.3 : acides aminés 1632 à 1644, NM_133631.2 : acides aminés 1593 à 1605, NM_001145845.1 : acides aminés 1532 à 1544, NM_001145844.1 : acides aminés 1587 à 1599).

Après 3 lavages de 5 minutes dans une solution de PBS-Tween 20 (0,05%), la membrane est mise en contact avec un anticorps secondaire anti IgG de lapin (ab6721, Abcam), couplé à l'HRP (Horseradish Peroxidase) et dilué au 1/10 000, dans une solution de PBS, 5% BSA, 0,05% Tween 20 et incubée pendant 1 heure.

Après 4 lavages de 5 minutes dans une solution de PBS-Tween 20 (0,05%) la révélation se fait grâce au kit de chimioluminescence ECL Plus Western Blotting Detection kitTM (Amersham) sur film photographique.

6.6 Chimiotactisme des polynucléaires

Ce test mesure la capacité des cellules à se déplacer vers un chimioattractant (zymosan).

Il a été utilisé afin de déceler une éventuelle modification du chimiotactisme des polynucléaires par rapport à un témoin chez la patiente porteuse de la délétion t(3;18).

A partir d'un prélèvement sanguin, les polynucléaires sont isolés par sédimentation sur dextran. 2.10^5 polynucléaires (solution à 2.10^4) sont déposés en milieu gélosé (mimimum essential medium (Gibco) supplémenté en sérum de veau fœtal), dans les puits internes. La migration s'effectue pendant 24 heures à 37°C/5% de CO₂. Les polynucléaires migrent par chimiotactisme vers les puits externes dans lesquels est déposé le zymosan. En l'absence de chimioattractant, la migration spontanée s'effectue dans toutes les directions. Après fixation au méthanol et formol, les polynucléaires sont colorés par la fuschine.

Les distances de migration spontanée et par chimiotactisme sont alors mesurées en mm (figure 6.1).

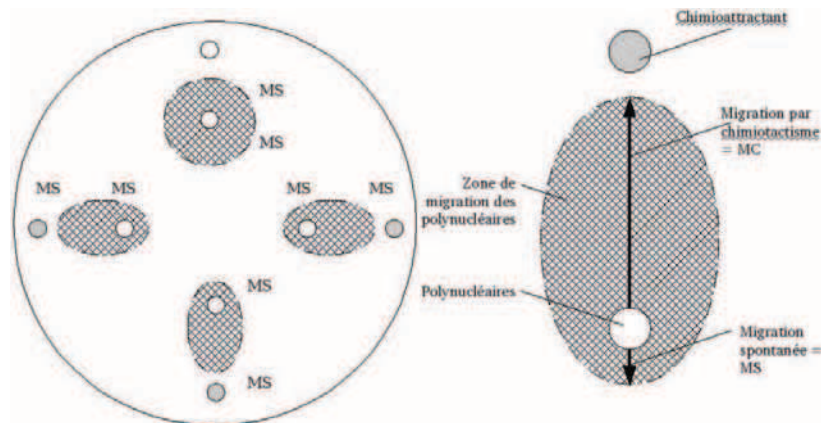


FIG. 6.1 – Chimiotactisme des polynucléaires : les polynucléaires sont déposés dans les puits les plus internes et migrent vers les puits les plus externes où est déposé le zymosan

L'index chimiotactique évalue la migration par chimiotactisme : c'est le ratio de la distance de migration par chimiotactisme/distance de migration spontanée.

Dans cette expérience, SLIT2 (100pM) est ajouté soit dans le puits contenant les polynucléaires soit dans le puits contenant le chimioattractant.

Toutes les migrations chez la patiente sont comparées à celles chez un témoin.

[?] [Angeloni 2006] [Anitha 2008] [Ardalan 2005] [Baala 2007]
[Badie-Mahdavi 2005] [Ballarati 2009] [Balash 2004] [Baptista 2008] [Bashaw 1999]
[Bauters 2008] [Beck 2009] [Ben-Shachar 2009] [Béna 2007] [Benko 2009]
[Béri-Dexheimer 2007] [Béri-Dexheimer 2007] [Béri-Dexheimer 2007] [?]
[Bressman 1994] [Bressman 2000] [Bressman 2004] [Bugge 2000] [Buijs 2001]
[Buijs 2009] [Calne 1988] [Cans 1999] [Chen 1997] [Cho 2003] [Ciccone 2005]
[Dallol 2002] [de Bruijn 2004] [De Gregori 2007] [?] [Des Portes 2002]
[Dermitzakis 2005] [de Vree 2009] [De Vries 2003] [Dibbens 2009] [Edelmann 1999]
[Endris 2002] [Ensenauer 2003] [Fahn 1988] [Feenstra 2007] [Fisher 2006]
[Flint 1995] [Flint 1995] [Fouquet 2007] [Fraisie 1981] [Ganly 2004] [Gasser 1998]
[Ghosh 2009] [Gilles 2008] [Gong 2008] [Griffon 2003b] [Gu 2008] [Guan 2003]
[Hannula-Jouppi 2005] [Harrison 2008] [Hastings 2009] [Helbig 2009] [Heller 2005]
[Hiebert 2001] [Hoeffler 2007] [Hoyer 2007] [Ichikawa 2004] [Inoue 2002]
[Consortium 2008] [Irrthum 2003] [Ito 2006] [Jakobsson 2008] [Kinney 2009]
[Kiritto 2008] [Kroepfl 2008] [Lang 2007] [Lee 2007] [Levanon 2001] [Lindsay 2001]
[Liu 2008] [López-Bendito 2007] [Lu 2007] [Lupski 1998] [Madan 1997]
[Malacombe 2006] [Matheny 2007] [Mazarati 2004] [Michaud 2002] [Mink 2003]
[Miller 2009] [Miyoshi 1991] [Miyoshi 1993] [Moosavi 2009] [Nucifora 1995]
[Nutt 1988] [Ovcharenko 2004] [Okuda 1996] [Opal 2002] [Osato 2004] [Owen 2008]
[Parrish 2004] [Patsalis 2004] [Pfaffl 2001] [Petek 2003] [Pinkel 1986] [Potocki 2000]
[Pralong 2007] [Preudhomme 2000] [Preudhomme 2009] [Pucharcos 1999]
[Pucharcos 2000] [Qian 2005] [Rauch 2006] [Ravnan 2006] [Roberts 2004]
[Romana 1995] [Roumier 2003] [Rudd 2009] [Sharp 2008] [Schluth-Bolard 2009]
[Schwarz 2009] [Sheldon 2009] [Seiler 2004] [Sharp 2008] [Shinawi 2008]
[Slavotinek 2008] [Song 1999] [Turnbull 2005] [?] [Stefansson 2008] [Su 2004]
[Tamada 2008] [van Bon 2009] [Vandeweyer 2009] [Wang 1996] [Wang 2007]
[Wentzel 2008] [Wilusz 2009] [Wong 2001] [Wong 2007] [Woodward 2005]
[Xian 2001] [Yang 2003] [Yu 2008] [Zhang 2009] [Anderson 1997] [Gimelbrant 2007]
[Grant 2008] [Hivert 2002] [Jacobs 1992] [Keleman 2002] [Kidd 1998] [?]
[Kleinjan 1998] [Knight 1997] [Knight 1999] [Koolen 2004] [Long 2004]
[Marsden 1985] [Marillat 2001] [Menten 2006] [?] [Monfort 2006] [Morlot 2007]
[Niebuhr 2008] [Obeso 1988] [Ozelius 1997] [Parnavelas 2000] [Rauch 2006]
[Popovici 2009] [Rizzolio 2008] [Shaffer 2006] [Slavotinek 2008] [Stankiewicz 2007]
[Sun 2004] [Sundaresan 2004] [Tessier-Lavigne 1996] [Vidailhet 2009]
[Warburton 1991] [Xu 2003] [Yanagisawa 1971] [Zallen 1998] [Andrews 2006]
[Elagib 2003] [Lehéricy 2001] [Wu 2001]

Bibliographie

- [Anderson 1997] SA Anderson, DD Eisenstat, L Shi et JL Rubenstein. *Interneuron migration from basal forebrain to neocortex : dependance of Dlx genes*. Science, vol. 278, pages 474–6, 1997.
- [Andrews 2006] W Andrews, A Liapi, C Plachez, L Camurri, J Zhang, S Mori, F Murakami, JG Parnavelas, V Sundaresan et LJ Richards. *Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain*. Development, vol. 133, no. 11, pages 2243–52, 2006.
- [Angeloni 2006] D Angeloni, A ter Elst, MH Wei, AY van der Veen, EA Braga, EA Klimov, T Timmer, L Korobeinikova, MI Lerman et Buys CH. *Analysis of a new homozygous deletion in the tumor suppressor region at 3p12.3 reveals two novel intronic noncoding RNA genes*. Genes Chromosomes Cancer, vol. 45, no. 7, pages 676–91, 2006.
- [Anitha 2008] A Anitha, K Nakamura, K Yamada, S Suda, I Thanseem, M Tsujii, Y Iwayama, E Hattori, T Toyota, T Miyachi, Y Iwata, K Suzuki, H Matsuzaki, M Kawai, Y Sekine, K Tsuchiya, G Sugihara, Y Ouchi, T Sugiyama, K Koizumi, H Higashida, N Takei, T Yoshikawa et N Mori. *Genetic analyses of roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet., vol. 147B, no. 7, pages 1019–27, 2008.
- [Ardalan 2005] A Ardalan, M Prieur, A Choiset, C Turleau, F Goutieres et Girard-Orgeolet S. *Intrachromosomal insertion mimicking a pericentric inversion : molecular cytogenetic characterization of a three break rearrangement of chromosome 20*. Am J Med Genet A., vol. 138A, no. 3, pages 288–93, 2005.
- [Baala 2007] L Baala, S Briault, HC Etchevers, F Laumonnier, A Natiq, J Amiel, N Boddaert, C Picard, A Sbiti, A Asermouh, T Attie-Bitach, F Encha-Razavi, A Munnich, Sefiani A et S Lyonnet. *Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis*. Nat Genet., vol. 39, no. 4, pages 454–6, 2007.
- [Badie-Mahdavi 2005] H Badie-Mahdavi, X Lu, MM Behrens et T Bartfai. *Role of galanin receptor 1 and galanin receptor 2 activation in synaptic plasticity associated with 3',5'-cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation in the dentate gyrus : studies with a galanin receptor 2 agonist and galanin receptor 1 knockout mice*. Neuroscience, vol. 133, no. 2, pages 591–604, 2005.
- [Balash 2004] Y Balash et N Giladi. *Efficacy of pharmacological treatment of dystonia : evidence-based review including meta-analysis of the effect of botulinum toxin and other cure options*. Eur J Neurol., vol. 11, no. 6, pages 361–70, 2004.

- [Ballarati 2009] L Ballarati, MP Recalcati, MF Bedeschi, F Lalatta, C Valtort, M Bellini, P Finelli, L Larizza et D Giardino. *Cytogenetic, FISH and array-CGH characterization of a complex chromosomal rearrangement carried by a mentally and language impaired patient*. Eur J Med Genet, vol. 52, no. 4, pages 218–23, 2009.
- [Baptista 2008] J Baptista, C Mercer, E Prigmore, SM Gribble, NP Carter, V Maloney, NS Thomas, PA Jacobs et JA Crolla. *Breakpoint mapping and array CGH in translocations : comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort*. Am J Hum Genet, vol. 82, pages 927–36, 2008.
- [Bashaw 1999] GJ Bashaw et CS Goodman. *Chimeric axon guidance receptors : the cytoplasmic domains of Slit and Netrin receptors specify attraction versus repulsion*. Cell, vol. 97, pages 917–26, 1999.
- [Bauters 2008] M Bauters, H Van Esch, MJ Friez, O Boespflug-Tanguy, M Zenker, AM Vianna-Morgante, C Rosenberg, J Ignatius, M Raynaud, K Hollanders, K Govaerts, K Vandenreijt, F Niel, P Blanc, RE Stevenson, JP Fryns, P Marrynen, CE Schwartz et G Froyen. *Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair*. Genome Res, vol. 18, no. 6, pages 847–58, 2008.
- [Beck 2009] R Beck, F Adolf, C Weimer, B Bruegger et FT Wieland. *ArfGAP1 activity and COPI vesicle biogenesis*. Traffic, vol. 10, no. 3, pages 307–15, 2009.
- [Ben-Shachar 2009] S Ben-Shachar, B Lanpher, JR German, M Qasaymeh, L Potocki, SC Nagamani, LM Franco, A Malphrus, GW Bottenfield, JE Spence, S Amato, JA Rousseau, B Moghaddam, C Skinner, SA Skinner, S Bernes, N Armstrong, M Shinawi, P Stankiewicz, A Patel, SW Cheung, JR Lupski, AL Beaudet et T Sahoo. *Microdeletion 15q13.3 : a locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders*. J Med Genet, vol. 46, no. 6, pages 382–8, 2009.
- [Benko 2009] S Benko, JA Fantes, J Amiel, DJ Kleinjan, S Thomas, J Ramsay, N Jamshidi, A Essafi, S Heaney, CT Gordon, D McBride, C Golzio, M Fisher, P Perry, V Abadie, C Ayuso, M Holder-Espinasse, N Kilpatrick, MM Lees, A Picard, IK Temple, P Thomas, MP Vazquez, M Vekemans, HR Crollius, ND Hastie, A Munnich, HC Etchevers, A Pelet, PG Farlie, DR Fitzpatrick et S Lyonnet. *Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence*. Nat Genet., vol. 41, no. 3, pages 359–64, 2009.
- [Bressman 1994] SB Bressman, D de Leon, PL Kramer, LJ Ozelius, MF Brin, PE Greene, S Fahn, XO Breakefield et NJ Risch. *Dystonia in Ashkenazi Jews : clinical characterization of a founder mutation*. Ann. Neurol., vol. 36, page 771–7, 1994.
- [Bressman 2000] SB Bressman. *Dystonia update*. Clin Neuropharmacol, vol. 23, page 239–51, 2000.

- [Bressman 2004] SB Bressman. *Dystonia genotypes, phenotypes and classification*. Adv Neurol., vol. 94, pages 101–7, 2004.
- [Bugge 2000] M Bugge, G Bruun-Petersen, K Brøndum-Nielsen, U Friedrich, J Hansen, G Jensen, PK Jensen, U Kristoffersson, C Lundsteen, E Niebuhr, KR Rasmussen, K Rasmussen et N Tommerup. *Disease associated balanced chromosome rearrangements : a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man*. J Med Genet, vol. 37, no. 11, pages 858–65, 2000.
- [Buijs 2001] A Buijs, P Poddighe, R van Wijk, W van Solinge, E Borst, L Verdonck, A Hagenbeek, P Pearson et H Lokhorst. *A novel CBFA2 single-nucleotide mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies*. Blood, vol. 98(9), pages 2856–8, 2001.
- [Buijs 2009] A Buijs, E van Binsbergen, M Ausems, M Poot, S Bierings et S van der Crabben. *Constitutional RUNX1 deletion in non-syndromic thrombocytopenia with myelodysplasia ; 21q22 ITSN1 as a candidate gene in mental retardation*. Chromosome Research, vol. 17, no. suppl 1, pages S123–S124, 2009.
- [Béna 2007] F Béna, A Bottani, F Marcelli, LD Sizonenko, B Conrad et S Dahoun. *A de novo 1.1-1.6 Mb subtelomeric deletion of chromosome 20q13.33 in a patient with learning difficulties but without obvious dysmorphic features*. Am J Med Genet Part A, vol. 143A, pages 1894–9, 2007.
- [Béri-Dexheimer 2007] M Béri-Dexheimer, C Bonnet, P Chambon, K Brochet, MJ Grégoire et P Jonveaux. *Microarray-based comparative genomic hybridization in the study of constitutional chromosomal abnormalities*. Pathol Biol (Paris), vol. 55, no. 1, pages 13–8, 2007.
- [Calne 1988] DB Calne et AE Lang. *Secondary dystonia*. Adv Neurol, vol. 50, pages 9–33, 1988.
- [Cans 1999] C Cans, L Wilhelm, MF Baille, C du Mazaubrun, H Grandjean et C Rumeau-Rouquette. *Aetiological findings and associated factors in children with severe mental retardation*. Dev Med Child Neurol, vol. 41, pages 233–239, 1999.
- [Chen 1997] KS Chen, P Manian, T Koeuth, L Potocki, Q Zhao, Chinault, AC, CC Lee et JR Lupski. *Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome*. Nat Genet, vol. 17, no. 2, pages 154–63, 1997.
- [Cho 2003] YW Cho, GK Motamedi, I Laufenberg, SI Sohn, JG Lim, H Lee, SD Yi, JH Lee, DK Kim, R Reba, WD Gaillard, WH Theodore, RP Lesser et OK Steinlein. *A Korean kindred with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and mental retardation*. Arch Neurol, vol. 60, no. 11, pages 1625–32, 2003.
- [Ciccone 2005] R Ciccone, R Giorda, G Gregato, R Guerrini, S Giglio, R Carrozzo, MC Bonaglia, E Priolo, C Laganà, R Tenconi, M Rocchi, T Pramparo, O Zuffi

- fardi et E Rossi. *Reciprocal translocations : a trap for cytogenetists ?* Hum. Genet, vol. 117, page 571–82, 2005.
- [Consortium 2008] International Schizophrenia Consortium. *Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia*. Nature, vol. 11, no. 455(7210), pages 237–41, 2008.
- [Dallol 2002] A Dallol, E Forgacs, A Martinez, Y Sekido, R Walker, T Kishida, P Rabbitts, ER Maher, JD Minna et F Latif. *Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers*. Oncogene, vol. 21, no. 19, pages 3020–8, 2002.
- [de Bruijn 2004] MF de Bruijn et NA Speck. *Core-binding factors in hematopoiesis and immune function*. Oncogene, vol. 23, no. 24, pages 4238–48, 2004.
- [De Gregori 2007] M De Gregori, R Ciccone, P Magini, T Pramparo, S Gimelli, Messa.J, F Novara, A Vetro, E Rossi et P Maraschio. *Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements : a study of 59 patients*. J. Med. Genet, vol. 44, page 750–762, 2007.
- [de Vree 2009] P de Vree, ME Simon, MF van Dooren, GH Stoevelaar, JT Hilkmann, MA Rongen, GC Huijbregts, AJ Verkerk et PJ Poddighe. *Application of molecular cytogenetic techniques to clarify apparently balanced complex chromosomal rearrangements in two patients with an abnormal phenotype : case report*. Mol Cytogenet, vol. 13, no. 2(1) :15, 2009.
- [De Vries 2003] BB De Vries, R Winter, A Schinzel et C Ravenswaaij-Arts. *Telomeres : a diagnosis at the end of the chromosomes*. J Med Genet, vol. 40, page 385–98, 2003.
- [Dermitzakis 2005] ET Dermitzakis, A Reymond et SE Antonarakis. *Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes*. Nat Rev Genet, vol. 6, no. 2, pages 151–7, 2005.
- [Des Portes 2002] V Des Portes, MO Livet et L Vallee. *A practical diagnostic approach to mental deficiency in 2002*. Arch Pediatr, vol. 9, pages 709–25, 2002.
- [Dibbens 2009] LM Dibbens, S Mullen, I Helbig, HC Mefford, MA Bayly, S Bellows, C Leu, H Trucks, T Obermeier, M Wittig, A Franke, H Caglayan, Z Yapici, Consortium EPICURE, T Sander, EE Eichler, IE Scheffer, JC Mulley et SF Berkovic. *Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in Idiopathic Generalized Epilepsy : Precedent for Disorders with Complex Inheritance*. Hum Mol Genet, vol. 18, no. 19, pages 3626–31, 2009.
- [Edelmann 1999] L Edelmann, RK Pandita, E Spiteri, B Funke, R Goldberg, N Palanisamy, RS Chaganti, E Magenis, RJ Shprintzen et BE Morrow. *A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11*. Hum Mol Genet, vol. 8, no. 7, pages 1157–67, 1999.

- [Elagib 2003] KE Elagib, FK Racke, M Mogass, R Khetawat, LL Delehanty et AN Goldfarb. *RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation*. Blood, vol. 101, no. 11, pages 4333–41, 2003.
- [Endris 2002] V Endris, B Wogatzky, U Leimer, D Bartsch, M Zatyka, F Latif, ER Maher, G Tariverdian, S Kirsch, D Karch et GA Rappold. *The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 18, pages 11754–9, 2002.
- [Ensenauer 2003] RE Ensenauer, A Adeyinka, HC Flynn, VV Michels, NM Lindor, DB Dawson, EC Thorland, CP Lorentz, JL Goldstein, MT McDonald, WE Smith, E Simon-Fayard, AA Alexander, AS Kulharya, RP Ketterling, RD Clark et SM Jalal. *Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome : clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients*. Am J Hum Genet, vol. 73, no. 5, pages 1027–40, 2003.
- [Evergren 2007] E Evergren, H Gad, K Walther, A Sundborger, N Tomilin et O Shupliakov. *Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse*. J Neurosci, vol. 27, no. 2, pages 379–90, 2007.
- [Fahn 1987] S Fahn, CD Marsden et DB Calne. Movement disorders 2, chapitre Classification and investigation of dystonia, pages 332–58. London, butworths édition, 1987.
- [Fahn 1988] S Fahn. *Concept and classification of dystonia*. Adv. Neurol, vol. 50, pages 1–8, 1988.
- [Fahn 1998] S Fahn, SB Bressman et CD Marsden. Dystonia 3 : Adv neurol, volume 75, chapitre Classification of dystonias, pages 1–11. Philadelphia, lipincott édition, 1998.
- [Feenstra 2007] I Feenstra, LE Vissers, M Orsel, AG van Kessel, HG Brunner, JA Veltman et CM van Ravenswaaij-Arts. *Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH : an update of the phenotypic map*. Am J Med Genet A, vol. 15, no. 143A(16), pages 1858–67, 2007.
- [Fisher 2006] SE Fisher et C Francks. *Genes, cognition and dyslexia : learning to read the genome*. Trends Cogn Sci, vol. 10, no. 6, pages 250–7, 2006.
- [Flint 1995] J Flint, AO Wilkie, VJ Buckle, RM Winter, AJ Holland et HE McDermid. *The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation*. Nat Genet, vol. 9, page 132–140, 1995.
- [Flint 2003] J Flint et S Knight. *The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation*. Curr Opin Genet Dev, vol. 13, pages 310–316, 2003.
- [Fouquet 2007] C Fouquet, T Di Meglio, L Ma, T Kawasaki, H Long, T Hirata, M Tessier-Lavigne, A Chédotal et KT Nguyen-Ba-Charvet. *Robo1 and robo2*

- control the development of the lateral olfactory tract.* J Neurosci, vol. 14, no. 27(11), pages 3037–45, 2007.
- [Fraisie 1981] J Fraisse, MF Bertheas, F Frère, B Lauras, MO Rolland et CP Bri-
zard. *Partial monosomy 20q : a new syndrome. Regional assignment of the
adenosine deaminase (ADA) locus on 20q132.* Ann Genet, vol. 24, no. 4,
pages 216–9, 1981.
- [Ganly 2004] P Ganly, LC Walker et CM Morris. *Familial mutations of the trans-
cription factor RUNX1 (AML1, CBFA2) predispose to acute myeloid leuke-
mia.* Leuk Lymphoma, vol. 45, no. 1, pages 1–10, 2004.
- [Gasser 1998] T Gasser, K Windgassen, B Bereznai, C Kabus et AC Ludolph. *Phe-
notypic expression of the DYT1 mutation : a family with writer's cramp of
juvenile onset.* Ann. Neurol, vol. 44, page 126–8, 1998.
- [Ghosh 2009] S Ghosh, A Ghosh, GP Maiti, N Alam, A Roy, S Roychoudhury et
CK Panda. *Alterations of ROBO1/DUTT1 and ROBO2 loci in early dys-
plastic lesions of head and neck : clinical and prognostic implications.* Hum
Genet, vol. 125, no. 2, pages 189–98, 2009.
- [Gilles 2008] L Gilles, R Guïèze, D Bluteau, V Cordette-Lagarde, C Lacout, R Fa-
vier, F Larbret, N Debili, W Vainchenker et H Raslova. *P19INK4D links
endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-
1.* Blood, vol. 111, no. 8, pages 4081–91, 2008.
- [Gimelbrant 2007] A Gimelbrant, JN Hutchinson, BR Thompson et A Chess. *Wi-
despread monoallelic expression on human autosomes.* Science, vol. 318,
pages 1136–40, 2007.
- [Gong 2008] LW Gong et P De Camilli. *Regulation of postsynaptic AMPA responses
by synaptojanin 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 105, no. 45, pages 17561–6,
2008.
- [Grant 2008] SF Grant et H Hakonarson. *Microarray technology and applications
in the arena of genome-wide association.* Clin Chem, vol. 54, no. 7, pages
1116–24, 2008.
- [Griffon 2003a] N Griffon, F Jeanneteau, F Prieur, J Diaz et P Sokoloff. *CLIC6, a
member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine
D(2)-like receptors.* Brain Res Mol Brain Res, vol. 117, no. 1, pages 47–57,
2003.
- [Griffon 2003b] N Griffon, F Jeanneteau, F Prieur, J Diaz et P Sokoloff. *CLIC6, a
member of the intracellular chloride channel family, interacts with dopamine
D(2)-like receptors.* Brain Res Mol Brain Res, vol. 10, no. 117(1), pages
47–57, 2003.
- [Gu 2008] W Gu, F Zhang et JR Lupski. *Mechanisms for human genomic rearran-
gements.* Pathogenetics, vol. 3, no. 1(1), page 4, 2008.
- [Guan 2003] H Guan, G Zu, Y Xie, H Tang, M Johnson, X Xu, C Kevil, WC Xiong,
C Elmets, Y Rao, JY Wu et H Xu. *Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic*

- cell migration and the development of immune responses*. Immunol, vol. 15, no. 171(12), pages 6519–26, 2003.
- [Hannula-Jouppi 2005] K Hannula-Jouppi, N Kaminen-Ahola, M Taipale, R Eklund, J Nopola-Hemmi, H Kääriäinen et J Kere. *The axon guidance receptor gene ROBO1 is a candidate gene for developmental dyslexia*. PLoS Genet, vol. 1, no. 4, page e50, 2005.
- [Harrison 2008] SJ Harrison, M Parrish et AP Monaghan. *Sall3 is required for the terminal maturation of olfactory glomerular interneurons*. J Comp Neurol, vol. 507, pages 1780–94, 2008.
- [Hastings 2009] PJ Hastings, G Ira et JR Lupski. *A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation*. PLoS Genet, vol. 5, no. 1, page e1000327, 2009.
- [Helbig 2009] I Helbig, HC Mefford, AJ Sharp, M Guipponi, M Fichera, A Franke, H Muhle, C de Kovel, C Baker, S von Spiczak, KL Kron, I Steinich, AA Kleefuss-Lie, C Leu, V Gaus, B Schmitz, KM Klein, PS Reif, F Rosenow, Y Weber, H Lerche, F Zimprich, L Urak, K Fuchs, M Feucht, P Genton, P Thomas, F Visscher, GJ de Haan, RS Møller, H Hjalgrim, D Luciano, M Wittig, M Nothnagel, CE Elger, P Nürnberg, C Romano, A Malafosse, BP Koeleman, D Lindhout, U Stephani, S Schreiber, EE Eichler et T Sander. *15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy*. Nat Genet, vol. 41, no. 2, pages 160–2, 2009.
- [Heller 2005] PG Heller, AC Glembofsky, MJ Gandhi, CL Cummings, CJ Pirola, RF Marta, LI Kornblihtt, JG Drachman et FC Molinas. *Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation*. Blood, vol. 15, no. 105(12), pages 4664–70, 2005.
- [Hiebert 2001] S Hiebert, B Lutterbach et J Amann. *Role of co-repressors in transcriptional repression mediated by the $t(8;21)$, $t(16;21)$, $t(12;21)$, and $inv(16)$ fusion proteins*. Curr. Opin. Hematol, vol. 8, page 197–200, 2001.
- [Hivert 2002] B Hivert, Z Liu, CY Chuang, P Doherty et Sundaresan V. *Robo1 and Robo2 are homophilique binding molecules that promote axonal growth*. Mol Cell Neurosc, vol. 21, no. 4, pages 534–45, 2002.
- [Hoeffer 2007] CA Hoeffer, A Dey, N Sachan, H Wong, RJ Patterson, JM Shelton, JA Richardson, E Klann et BA Rothermel. *The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling*. J Neurosci, vol. 28, no. 27(48), pages 13161–72, 2007.
- [Hoyer 2007] J Hoyer, A Dreweke, C Becker, I Göhring, CT Thiel, MM Peippo, R Rauch, M Hofbeck, U Trautmann, C Zweier, M Zenker, U Hüffmeier, C Kraus, AB Ekici, F Rüschendorf, P Nürnberg, A Reis et A Rauch. *Molecular karyotyping in patients with mental retardation using 100K single-*

- nucleotide polymorphism arrays*. J Med Genet, vol. 44, no. 10, pages 629–36, 2007.
- [Ichikawa 2004] M Ichikawa, T Asai, T Saito, S Seo, I Yamazaki, T Yamagata, K Mitani, S Chiba, S Ogawa, M Kurokawa et H Hirai. *AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis*. Nat. Med, vol. 10, pages 299–304, 2004.
- [Inoue 2002] K Inoue, H Osaka, VC Thurston, JT Clarke, A Yoneyama, L Rosenbarker, TD Bird, ME Hodes, LG Shaffer et JR Lupski. *Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females*. Am J Hum Genet, vol. 71, no. 4, pages 838–53, 2002.
- [Irrthum 2003] A Irrthum, K Devriendt, D Chitayat, G Matthijs, C Glade, PM Steijlen, JP Fryns, MA Van Steensel et M Vikkula. *Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia*. Am J Hum Genet, vol. 72, no. 6, pages 1470–8, 2003.
- [Ito 2006] H Ito, S Funahashi, N Yamauchi, J Shibahara, Y Midorikawa, S Kawai, Y Kinoshita, A Watanabe, Y Hippo, T Ohtomo, H Iwanari, A Nakajima, M Makuuchi, M Fukayama, Y Hirata, T Hamakubo, T Kodama, M Tsuchiya et H Aburatani. *Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target*. Clin Cancer Res, vol. 1, no. 12(11 Pt 1), pages 3257–64, 2006.
- [Jacobs 1992] PA Jacobs, C Browne, N Gregson, C Joyce et H White. *Estimates of the frequency of chromosomal abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding*. J Med Genet, vol. 29, pages 103–8, 1992.
- [Jakobsson 2008] M Jakobsson, SW Scholz, P Scheet, JR Gibbs, JM VanLiere, HC Fung, ZA Szpiech, JH Degnan, K Wang, R Guerreiro, JM Bras, JC Schymick, DG Hernandez, BJ Traynor, J Simon-Sanchez, M Matarin, A Britton, J van de Leemput, I Rafferty, M Bucan, HM Cann, JA Hardy, NA Rosenberg et AB Singleton. *Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations*. Nature, vol. 45, no. 7181, pages 998–1003, 2008.
- [Keleman 2002] K Keleman, S Rajagopalan, D Cleppien, D Teis, K Paiha, LA Huber, GM Technau et BJ Dickson. *No Title*. Cell, vol. 110, pages 415–27, 2002.
- [Kidd 1998] T Kidd, K Brose, KJ Mitchell, RD Fetter, M Tessier-Lavigne, CS Goodman et G Tear. *Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors*. Cell, vol. 92, pages 205–15, 1998.
- [Kinney 2009] JW Kinney, M Sanchez-Alavez, AM Barr, JN Criado JR andCrawley, MM Behrens, SJ Henriksen et T Bartfai. *Impairment of memory consolida-*

- tion by galanin correlates with in vivo inhibition of both LTP and CREB phosphorylation. *Neurobiol Learn Mem*, vol. 14, pages 429–38, 2009.
- [Kirito 2008] K Kirito, K Sakoe, D Shinoda, Y Takiyama, K Kaushansky et N Komatsu. *A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies*. *Haematologica*, vol. 93, no. 1, pages 155–6, 2008.
- [Kleinjan 1998] D Kleinjan et V van Heyningen. *Position effect in human genetic disease*. *Hum Mol Genet*, vol. 7, no. 10, pages 1611–8, 1998.
- [Knight 1997] SJ Knight, SW Horsley, R Regan, NM Lawrie, EJ Maher, DL Cardy, J Flint et L Kearney. *Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres*. *Eur J Hum Genet*, vol. 5, page 1–8, 1997.
- [Knight 1999] SJ Knight, R Regan, A Nicod, SW Horsley, L Kearney, T Homfray, RM Winter, P Bolton et J Flint. *Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation*. *Lancet*, vol. 354, page 1676–81, 1999.
- [Koolen 2004] DA Koolen, WM Nillesen, MH Versteeg, GF Merkx, NV Knoers, M Kets, S Vermeer, CM van Ravenswaaij, CG de Kovel, HG Brunner, D Smeets, BB de Vries et EA Sistermans. *Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)*. *J Med Genet*, vol. 41, page 892–899, 2004.
- [Kroepfl 2008] T Kroepfl, E Petek, T Schwarzbraun, PM Kroisel et B Plecko. *Mental retardation in a girl with a subtelomeric deletion on chromosome 20q and complete deletion of the myelin transcription factor 1 gene (MYT1)*. *Clin Genet*, vol. 73, no. 5, pages 492–5, 2008.
- [Lang 2007] R Lang, AL Gundlach et B Kofler. *The galanin peptide family : receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease*. *Pharmacol Ther*, vol. 115, no. 2, pages 177–207, 2007.
- [Lee 2007] C Lee, AJ Iafrate et AR Brothman. *Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders*. *Nat Genet*, vol. 39, no. 7 Suppl, pages S48–54, 2007.
- [Lehéricy 2001] S Lehéricy, S Grand, P Pollak, F Poupon, JF Le Bas, P Limousin, P Jedynak, C Marsault, Y Agid et M Vidailhet. *Clinical characteristics and topography of lesions in movement disorders due to thalamic lesions*. *Neurology*, vol. 57, no. 6, pages 1055–66, 2001.
- [Levanon 2001] D Levanon, G Glusman, T Bangsow, E Ben-Asher, DA Male, N Avidan, C Bangsow, M Hattori, TD Taylor, S Taudien, K Blechschmidt, N Shimizu, A Rosenthal, Y Sakaki, D Lancet et Y Groner. *Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1*. *Gene*, vol. 262, no. 23-33, pages 23–33, 2001.

- [Lindsay 2001] EA Lindsay, F Vitelli, H Su, M Morishima, T Huynh, T Pramparo, V Jurecic, G Ogunrinu, HF Sutherland, PJ Scambler, A Bradley et A Baldini. *Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice*. Nature, vol. 1, no. 410(6824), pages 97–101, 2001.
- [Liu 2008] X Liu, S Wang, J Yianni, D Nandi, PG Bain, R Gregory, JF Stein et TZ Aziz. *The sensory and motor representation of synchronized oscillations in the globus pallidus in patients with primary dystonia*. Brain, vol. 131, page 1562–73, 2008.
- [Long 2004] H Long, C Sabatier, L Ma, A Plump, W Yuan, DM Ornitz, A Tamada, F Murakami, CS Goodman et M Tessier-Lavigne. *Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance*. Neuron, vol. 42, pages 213–23, 2004.
- [Lu 2007] W Lu, AM van Eerde, X Fan, F Quintero-Rivera, S Kulkarni, H Ferguson, HG Kim, Y Fan, Q Xi, QG Li, D Sanlaville, W Andrews, V Sundaresan, W Bi, J Yan, JC Giltay, C Wijmenga, TP de Jong, SA Feather, AS Woolf, Y Rao, JR Lupski, MR Eccles, BJ Quade, JF Gusella, CC Morton et RL Maas. *Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux*. Am J Hum Genet, vol. 80, no. 4, pages 616–32, 2007.
- [Lupski 1998] JR Lupski. *Genomic disorders : structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits*. Trends Genet, vol. 14, page 417–22, 1998.
- [López-Bendito 2007] G López-Bendito, N Flames, L Ma, C Fouquet, T Di Meglio, A Chedotal, M Tessier-Lavigne et O Marín. *Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain*. J Neurosci, vol. 28, no. 27(13), pages 3395–407, 2007.
- [Madan 1997] K Madan, AW Nieuwint et Y van Bever. *Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations*. Hum Genet, vol. 99, no. 6, pages 806–15, 1997.
- [Malacombe 2006] M Malacombe, M Ceridono, V Calco, S Chasserot-Golaz, PS McPherson, MF Bader et S Gasman. *Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42*. EMBO J, vol. 25, no. 15, pages 3494–503, 2006.
- [Marillat 2001] V Marillat, O Cases, Nguyen-Ba, KT Charvet, M Tessier-Lavigne, C Sotelo et A Chedotal. *Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain*. J. Comp. neurol, vol. 442, pages 130–55, 2001.
- [Marsden 1985] CD Marsden, JA Obeso, JJ Zarranz et AE Lang. *The anatomical basis of symptomatic hemidystonia*. Brain, vol. 108, pages 463–83, 1985.
- [Matheny 2007] CJ Matheny, ME Speck, PR Cushing, Y Zhou, T Corpora, M Regan, M Newman, L Roudaia, CL Speck, TL Gu, SM Griffey, JH Bushweller

- et NA Speck. *Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles*. EMBO J, vol. 21, no. 26(4), pages 1163–75, 2007.
- [Mazarati 2004] A Mazarati, X Lu, S Shinmei, H Badie-Mahdavi et T Bartfai. *Patterns of seizures, hippocampal injury and neurogenesis in three models of status epilepticus in galanin receptor type 1 (GalR1) knockout mice*. Neuroscience, vol. 128, no. 2, pages 431–41, 2004.
- [Menten 2006] B Menten, N Maas, B Thienpont, K Buysse, J Vandesompele, C Melotte, T de Ravel, S Van Vooren, I Balikova, L Backx, S Janssens, A De Paepe, B De Moor, Y Moreau, P Marynen, JP Fryns, G Mortier, K Devriendt, F Speleman et JR Vermeesch. *Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies : a new series of 140 patients and review of published reports*. J Med Genet, vol. 43, page 625–633, 2006.
- [Michaud 2002] J Michaud, F Wu, M Osato, GM Cottles, M Yanagida, N Asou, K Shigesada, Y Ito, KF Benson, WH Raskind, C Rossier, SE Antonarakis, S Israels, A McNicol, H Weiss, M Horwitz et HS Scott. *In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia : implications for mechanisms of pathogenesis*. Blood, vol. 99, no. 4, pages 1364–72, 2002.
- [Miller 2009] DT Miller, Y Shen, LA Weiss, J Korn, I Anselm, C Bridgemohan, GF Cox, H Dickinson, J Gentile, DJ Harris, V Hegde, R Hundley, O Khwaja, S Kothare, C Luedke, R Nasir, A Poduri, K Prasad, P Raffalli, A Reinhard, SE Smith, MM Sobeih, JS Soul, J Stoler, M Takeoka, WH Tan, J Thakuria, R Wolff, R Yusupov, JF Gusella, MJ Daly et BL Wu. *Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders*. J Med Genet, vol. 46, no. 4, pages 242–8, 2009.
- [Mink 2003] JW Mink. *The basal ganglia and involuntary movements : impaired inhibition of competing motor patterns*. Arch. Neurol, vol. 60, page 1365–8, 2003.
- [Miyoshi 1991] H Miyoshi, K Shimizu, T Kozu, N Maseki, Y Kaneko et M Ohki. *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 1, no. 88(23), pages 10431–4, 1991.
- [Miyoshi 1993] H Miyoshi, T Kozu, K Shimizu, K Enomoto, N Maseki, Y Kaneko, N Kamada et M Ohki. *The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript*. EMBO J, vol. 12, no. 7, pages 2715–21, 1993.
- [Monfort 2006] S Monfort, C Orellana, S Oltra, M Rosello, M Guitart et F Martinez. *Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements*. J Lab Clin Med, vol. 147, page 295–300, 2006.

- [Moosavi 2009] SA Moosavi, J Sanchez et A Adeyinka. *Marker chromosomes are a significant mechanism of high-level RUNX1 gene amplification in hematologic malignancies*. Cancer Genet Cytogenet, vol. 189, no. 1, pages 24–8, 2009.
- [Morlot 2007] C Morlot, NM Thielens, RBG Ravelli, W Hemrika, RA Romijn, P Gros, S Cusack et AA McCarthy. *Structural insights into the Slit-Robo complex*. PNAS, vol. 104, no. 38, pages 14923–8, 2007.
- [Niebuhr 2008] B Niebuhr, M Fischer, J Cammenga et C Stocking. *Gatekeeper function of the RUNX1 transcription factor in acute leukemia*. Blood cells, Molecules, and diseases, vol. 40, pages 211–8, 2008.
- [Nucifora 1995] G Nucifora et JD Rowley. *AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia*. Blood, vol. 86, no. 1, pages 1–14, 1995.
- [Nutt 1988] JG Nutt, MD Muenster, A Aronson, LT Kurland et LJ Melton. *3rd Epidemiology of focal and generalized dystonia in Rochester, Minnesota*. Mov Disord 3, vol. 50, pages 361–5, 1988.
- [Obeso 1988] JA Obeso et S Giménez-Roldán. *Clinicopathological correlation in symptomatic dystonia*. Adv Neurol, vol. 50, pages 113–22, 1988.
- [Okuda 1996] T Okuda, J van Deursen, SW Hiebert, G Grosveld et JR Downing. *AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis*. Cell, vol. 84, pages 321–30, 1996.
- [Opal 2002] P Opal, R Tintner, J Jankovic, J Leung, XO Breakefield, J Friedman et L Ozelius. *Intrafamilial phenotypic variability of the DYT1 dystonia : from asymptomatic TOR1A gene carrier status to dystonic storm*. Mov. Disord, vol. 17, page 339–45, 2002.
- [Osato 2004] M Osato. *Point mutations in the RUNX1/AML1 gene : another actor in RUNX1 leukemia*. Oncogene, vol. 23, page 4284–4296, 2004.
- [Ovcharenko 2004] I Ovcharenko, L Stubbs et GG Loots. *Interpreting mammalian evolution using Fugu genome comparisons*. Genomics, vol. 84, no. 5, pages 890–5, 2004.
- [Owen 2008] CJ Owen, CL Toze, A Koochin, DL Forrest, CA Smith, JM Stevens, SC Jackson, MC Poon, GD Sinclair, B Leber, PR Johnson, A Macheta, JA Yin, MJ Barnett, TA Lister et J Fitzgibbon. *Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy*. Blood, vol. 1, no. 112(12), pages 4639–45, 2008.
- [Ozelius 1997] LJ Ozelius, JW Hewett, CE Page, SB Bressman, PL Kramer, C Shalish, D De Leon, MF Brin, D Raymond, DP Corey, S Fahn, NJ Risch, AJ Buckler, JF Gusella et XO Breakefield. *The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein*. Nature Genet, vol. 17, pages 40–8, 1997.
- [Parnavelas 2000] JG Parnavelas. *The origin and migration of cortical neurons : new vistas*. trends Neurosci, vol. 23, pages 126–31, 2000.

- [Parrish 2004] M Parrish, T Ott, C Lance-Jones, G Schuetz, A Schwaeger-Nickolenko et AP Monaghan. *Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves and perinatal lethality*. L. Mol Cell Biol, vol. 24, pages 7102–12, 2004.
- [Patsalis 2004] PC Patsalis, P Evangelidou, S Charalambous et C Sismani. *Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity*. Eur J Hum Genet, vol. 12, no. 8, pages 647–53, 2004.
- [Petek 2003] E Petek, C Windpassinger, B Simma, T Mueller, K Wagner et PM Kroisel. *Molecular characterisation of a 15 Mb constitutional de novo interstitial deletion of chromosome 3p in a boy with developmental delay and congenital anomalies*. J Hum Genet, vol. 48, no. 6, pages 283–7, 2003.
- [Pfaffl 2001] MW Pfaffl. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, vol. 29, no. 9, page 2002–7, 2001.
- [Pinkel 1986] D Pinkel, T Straume et JW Gray. *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 83, no. 9, pages 2934–8, 1986.
- [Popovici 2009] C Popovici, M Mathieu, J Andrieux, C Missirian, A Receveur, L Lecerf, A Moncla, M Goossens et N Philip. *Further delineation of the phenotype of the 21q22.11Q22.12 deletion encompassing the RUNX1 gene*. Eur J Hum Genet, vol. 17, no. sup2, pages 117–8, 2009.
- [Potocki 2000] L Potocki, KS Chen, SS Park, DE Osterholm, MA Withers, V Kimonis, AM Summers, WS Meschino, K Anyane-Yebo, CD Kashork, LG Shaffer et JR Lupski. *Molecular mechanism for duplication 17p11.2-the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion*. Nat Genet., vol. 24, page 84–7, 2000.
- [Pralong 2007] E Pralong, C Pollo, JG Villemure et D Debatisse. *Opposite effects of internal globus pallidus stimulation on pallidal neurons activity*. Mov Disord, vol. 22, page 1879–84, 2007.
- [Preudhomme 2000] C Preudhomme, D Warot-Loze, C Roumier, N Grardel-Duflos, R Garand, JL Lai, N Dastugue, E Macintyre, C Denis, F Bauters, JP Kerkckaert, A Cosson et P Fenaux. *High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in M0 acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21*. Blood, vol. 96, page 2862–9, 2000.
- [Preudhomme 2009] C Preudhomme, A Renneville, V Bourdon, N Philippe, C Roche-Lestienne, N Boissel, N Dhedin, JM André, P Cornillet-Lefebvre, A Baruchel, MJ Mozziconacci et H Sobol. *High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder*. Blood, vol. 113, no. 22, pages 5583–7, 2009.
- [Pucharcos 1999] C Pucharcos, JJ Fuentes, C Casas, S de la Luna, S Alcantara, ML Arbones, E Soriano, X Estivill et M Prichard. *Alu-splice cloning of*

- human intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome.* Europ. J. Hum. Genet, vol. 7, pages 704–12, 1999.
- [Pucharcos 2000] C Pucharcos, X Estivill et S de la Luna. *Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis.* FEBS Lett, vol. 478, pages 43–51, 2000.
- [Qian 2005] L Qian, J Liu et R Bodmer. *Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis.* Curr Biol, vol. 20, no. 15(24), pages 2271–8, 2005.
- [Rauch 2006] A Rauch, J Hoyer, S Guth, C Zweier, C Kraus, C Becker, M Zenker, U Hüffmeier, C Thiel, F Rüschendorf, P Nürnberg, A Reis et U Trautmann. *Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation.* Am. J. Med. Genet A, vol. 140, page 2063–74, 2006.
- [Ravnan 2006] JB Ravnan, JH Tepperberg, P Papenhausen, AN Lamb, J Hedrick, D Eash, DH Ledbetter et CL Martin. *Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases : an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities.* J Med Genet, vol. 43, no. 6, pages 478–89, 2006.
- [Rizzolio 2008] F Rizzolio, S Bione, C Sala, C Tribioli, R Ciccone, O Zuffardi, N Di Iorgi, M Maghnie et D Toniolo. *Hyghly conserved non-coding sequences and the 18q critical region for short stature : a common mechanism of disease ?* PloS ONE, vol. 3, no. 1, page e1460, 2008.
- [Roberts 2004] AE Roberts, GF Cox, V Kimonis, A Lamb et M Irons. *Clinical presentation of 13 patients with subtelomeric rearrangements and a review of the literature.* Am J Med Genet A, vol. 128A, no. 4, page 352–63, 2004.
- [Romana 1995] SP Romana, H Poirel, M Leconiat, MA Flexor, M Mauchauffe, P Jonveaux, EA Macintyre, R Berger et OA Bernard. *High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia.* Blood, vol. 86, no. 11, pages 4263–9, 1995.
- [Roumier 2003] C Roumier, P Fenaux, M Lafage, M Imbert, V Eclache et C Preudhomme. *New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies.* Leukemia, vol. 17, page 9–16, 2003.
- [Rudd 2009] MK Rudd, J Keene, B Bunke, EB Kaminsky, MP Adam, JG Mülle, DH Ledbetter et CL Martin. *Segmental duplications mediate novel, clinically relevant chromosome rearrangements.* Hum Mol Genet, vol. 18, no. 16, pages 2957–62, 2009.
- [Schaefer 1992] GB Schaefer et JB Bodensteiner. *Evaluation of the child with idiopathic mental retardation.* Pediatr Clin North Am, vol. 39, no. 4, pages 929–43, 1992.
- [Schinzel 2001] A Schinzel. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man.* Walter de Gruyter, Berlin, 2001. 2nd ed.

- [Schluth-Bolard 2009] C Schluth-Bolard, B Delobel, D Sanlaville, O Boute, JM Cuisset, S Sukno, A Labalme, B Duban-Bedu, G Plessis, S Jaillard, C Dubourg, C Henry, J Lucas, S Odent, L Pasquier, H Copin, P Latour, MP Cordier, G Nadeau, M Till, P Edery et J Andrieux. *Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements : Array CGH study of 47 unrelated cases*. Eur J Med Genet, vol. 146A, no. 1, pages 93–6, 2009.
- [Schwarz 2009] CS Schwarz et SB Bressman. *Genetics and treatment of dystonia*. Neurol Clin, vol. 27, no. 3, pages 697–718, 2009.
- [Seiler 2004] PU Seiler, J Stypmann, G Breithardt et E Schulze-Bahr. *Real-time RT-PCR for gene expression profiling in blood of heart failure patients-a pilot study : gene expression in blood of heart failure patients*. Basic Res Cardiol, vol. 99, no. 3, pages 230–8, 2004.
- [Shaffer 2006] LG Shaffer et BA Bejjani. *Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics*. Cytogenet Genome Res, vol. 115, page 303–309, 2006.
- [Sharp 2008] AJ Sharp, HC Mefford, K Li, C Baker, C Skinner, RE Stevenson, RJ Schroer, F Novara, M De Gregori, R Ciccone, A Broomer, I Casuga, Y Wang, C Xiao, C Barbacioru, G Gimelli, BD Bernardina, C Torniero, R Giorda, R Regan, V Murday, S Mansour, M Fichera, L Castiglia, P Failla, M Ventura, Z Jiang, GM Cooper, SJ Knight, C Romano, O Zuffardi, C Chen, CE Schwartz et EE Eichler. *A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures*. Nat Genet, vol. 40, pages 322–8, 2008.
- [Sheldon 2009] H Sheldon, M Andre, JA Legg, P Heal, JM Herbert, R Sainson, AS Sharma, JK Kitajewski, VL Heath et R Bicknell. *Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors*. FASEB J, vol. 23, no. 2, pages 513–22, 2009.
- [Shinawi 2008] M Shinawi, A Erez, DL Shardy, B Lee, R Naeem, G Weissenberger, AC Chinault, SW Cheung et SE Plon. *Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q*. Blood, vol. 112, no. 4, pages 1042–7, 2008.
- [Slavotinek 2008] AM Slavotinek. *Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays*. Hum Genet, vol. 124, no. 1, pages 1–17, 2008.
- [Song 1999] WJ Song, MG Sullivan, RD Legare, S Hutchings, X Tan, D Kufrin, J Ratajczak, IC Resende, C Haworth, R Hock, M Loh, C Felix, DC Roy, L Busque, D Kurnit, C Willman, AM Gewirtz, NA Speck, JH Bushweller, FP Li, K Gardiner, M Poncz, JM Maris et G Gilliland. *Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia*. Nat Genet, vol. 23, page 166–75, 1999.

- [Stankiewicz 2007] P Stankiewicz et AL Beaudet. *Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation*. Curr Opin Genet Dev, vol. 17, page 182–192, 2007.
- [Stefansson 2008] H Stefansson, D Rujescu, S Cichon, OP Pietiläinen, A Ingason, S Steinberg, R Fossdal, E Sigurdsson, T Sigmundsson, JE Buizer-Voskamp, T Hansen, KD Jakobsen, P Muglia, C Francks, PM Matthews, A Gylfason, BV Halldorsson, D Gudbjartsson, TE Thorgeirsson, A Sigurdsson, A Jonasdottir, A Jonasdottir, A Bjornsson, S Mattiasdottir, T Blondal, M Haraldsson, BB Magnúsdottir, I Giegling, HJ Möller, A Hartmann, KV Shianna, D Ge, AC Need, C Crombie, G Fraser, N Walker, J Lonnqvist, J Suvisaari, A Tuulio-Henriksson, T Paunio, T Touloupoulou, E Bramon, M Di Forti, R Murray, M Ruggeri, E Vassos, S Tosato, M Walshe, T Li, C Vasilescu, TW Mühleisen, AG Wang, H Ullum, S Djurovic, I Melle, J Olesen, LA Kieemeney, B Franke, GROUP, C Sabatti, NB Freimer, JR Gulcher, U Thorsteinsdottir, A Kong, OA Andreassen, RA Ophoff, A Georgi, M Rietschel, T Werge, H Petursson, DB Goldstein, MM Nöthen, L Peltonen, DA Collier, D St Clair et K Stefansson. *Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia*. Nature, vol. 11, no. 455(7210), pages 232–6, 2008.
- [Stranger 2007] BE Stranger, MS Forrest, M Dunning, CE Ingle, C Beazley, N Thorne, R Redon, CP Bird, A de Grassi, C Lee, C Tyler-Smith, N Carter, SW Scherer, S Tavaré, P Deloukas, ME Hurles et ET Dermitzakis. *Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes*. Science, vol. 315, no. 5813, pages 848–53, 2007.
- [Su 2004] AI Su, T Wiltshire, S Batalov, H Lapp, KA Ching, D Block, J Zhang, R Soden, M Hayakawa, G Kreiman, MP Cooke, JR Walker et JB Hogenesch. *A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 20, no. 101(16), pages 6062–7, 2004.
- [Sun 2004] C Sun et JR Downing. *Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing and increase in more mature progenitors*. Blood, vol. 104, pages 3565–72, 2004.
- [Sundaresan 2004] V Sundaresan, E Mambetisaeva, W Andrews, A Annan, B Knoll, G Tear et L Bannister. *Dynamic expression patterns of Robo (Robo1 and Robo2) in the developing murine central nervous system*. J. Comp. Neurol, vol. 468, pages 467–81, 2004.
- [Sweetman 2006] D Sweetman et A Münsterberg. *The vertebrate spalt genes in development and disease*. Dev Biol, vol. 293, no. 2, pages 285–93, 2006.
- [Tamada 2008] A Tamada, T Kumada, Y Zhu, T Matsumoto, Y Hatanaka, K Muruguma, Z Chen, Y Tanabe, M Torigoe, K Yamauchi, H Oyama, Nishida K et F Murakami. *Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellar axons and lack of their up-regulation after midline crossing*. Neural Dev, vol. 5, no. 3 :29, pages 3–29, 2008.

- [Tessier-Lavigne 1996] M Tessier-Lavigne et CS Goodman. *The molecular biology of axon guidance*. Science, vol. 274, pages 1123–33, 1996.
- [Turnbull 2005] J Turnbull, H Lohi, JA Kearney, GA Rouleau, AV Delgado-Escueta, MH Meisler, P Cossette et BA Minassian. *Sacred disease secrets revealed : the genetics of human epilepsy*. Hum Mol Genet, vol. 1, no. 14(17), pages 2491–500, 2005.
- [van Bon 2009] BW van Bon, HC Mefford, B Menten, DA Koolen, AJ Sharp, WM Nillesen, JW Innis, TJ de Ravel, CL Mercer, M Fichera, H Stewart, LE Connell, K Ounap, K Lachlan, B Castle, N Van der Aa, C van Ravenswaaij, MA Nobrega, C Serra-Juhé, I Simonic, N de Leeuw, R Pfundt, EM Bongers, C Baker, P Finnemore, S Huang, VK Maloney, JA Crolla, M van Kalmthout, M Elia, G Vandeweyer, JP Fryns, S Janssens, N Foulds, S Reitano, K Smith, S Parkel, B Loeys, CG Woods, A Oostra, F Speleman, AC Pereira, A Kurg, L Willatt, SJ Knight, JR Vermeesch, C Romano, JC Barber, G Mortier, LA Pérez-Jurado, F Kooy, HG Brunner, EE Eichler, T Kleefstra et BB de Vries. *Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes : a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome*. J Med Genet, vol. 46, no. 8, pages 511–23, 2009.
- [Vandeweyer 2009] G Vandeweyer et RF Kooy. *Balanced translocations in mental retardation*. Hum Genet, vol. 126, no. 1, pages 133–47, 2009.
- [Vidailhet 2009] M Vidailhet, D Grabli et E Roze. *Pathophysiology of dystonia*. Curr opinion neurol, vol. 22, pages 406–13, 2009.
- [Wang 1996] Q Wang, T Stacy, M Binder, M Marin-Padilla, AH Sharpe et NA Speck. *Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis*. Proc. Nat. Acad. Sci, vol. 93, pages 3444–9, 1996.
- [Wang 2007] J Wang, Z Valo, D Smith et J Singer-Sam. *Monoallelic expression of multiple genes in the CNS*. PLoS One, vol. 12, no. 2(12), page e1293, 2007.
- [Warburton 1991] D Warburton. *De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis : clinical significance and distribution of breakpoints*. Am J Genet, vol. 49, pages 995–1013, 1991.
- [Wentzel 2008] C Wentzel, M Fernström, Y Ohrner, G Annerén et AC Thuresson. *Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome*. Eur J Med Genet, vol. 51, no. 6, pages 501–10, 2008.
- [Wilusz 2009] JE Wilusz, H Sunwoo et DL Spector. *Long noncoding RNAs : functional surprises from the RNA world*. Genes Dev, vol. 1, no. 23(13), pages 1494–504, 2009.
- [Wong 2001] K Wong, XR Ren, YZ Huang, Y Xie, G Liu, H Saito, H Tang, L Wen, SM Brady-Kalnay, L Mei, JY Wu, WC Xiong et Y Rao. *Signal transduction in neuronal migration : roles of GTPase activating proteins and the small*

- GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway.* Cell, vol. 19, no. 107(2), pages 209–21, 2001.
- [Wong 2007] K Wong, RJ deLeeuw, NS Dosanjh, LR Kimm, Z Cheng, DE Horsman, C MacAulay, RT Ng, CJ Brown, EE Eichler et WL Lam. *A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome.* Am J Hum Genet, vol. 80, no. 1, pages 91–104, 2007.
- [Woodward 2005] KJ Woodward, M Cundall, K Sperle, EA Sistermans, M Ross, G Howell, SM Gribble, DC Burford, NP Carter, DL Hobson, JY Garbern, J Kamholz, H Heng, ME Hodes, S Malcolm et GM Hobson. *Heterogeneous duplications in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease suggest a mechanism of coupled homologous and nonhomologous recombination.* Am J Hum Genet, vol. 77, no. 6, pages 966–87, 2005.
- [Wu 2001] JY Wu, L Feng, HT Park, N Havlioglu, L Wen, H Tang, KB Bacon, Zh Jiang, Xc Zhang et Y Rao. *The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors.* Nature, vol. 410, no. 6831, pages 948–52, 2001.
- [Xian 2001] J Xian, KJ Clark, R Fordham, R Pannell, TH Rabbitts et PH Rabbitts. *Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the Dutt1/Robo1 gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 18, no. 98(26), pages 15062–6, 2001.
- [Xu 2003] Chen Z Xu J. *Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation.* Am. J. Med. Genet C, vol. 117, pages 15–24, 2003.
- [Yanagisawa 1971] N Yanagisawa et A Goto. *Dystonia musculorum deformans : Analysis with electromyography.* J Neurol Sci, vol. 13, no. 1, pages 39–65, 1971.
- [Yang 2003] Y Yang, BJ Beyer, JF Otto, TP O'Brien, VA Letts, HS White et WN Frankel. *Spontaneous deletion of epilepsy gene orthologs in a mutant mouse with a low electroconvulsive threshold.* Hum Mol Genet, vol. 1, no. 12(9), pages 975–84, 2003.
- [Yu 2008] Y Yu, PY Chu, DN Bowser, DJ Keating, D Dubach, I Harper, J Tkalcovic, DI Finkelstein et MA Pritchard. *ice deficient for the chromosome 21 ortholog Itsn1 exhibit vesicle-trafficking abnormalities.* M. Hum Mol Genet, vol. 17, no. 21, pages 3281–90, 2008.
- [Zallen 1998] JA Zallen, BA Yi et CI Bargmann. *The conserved immunoglobulin superfamily member Sax-3/Robo directs multiple aspects of axone guidance in C. Elegans.* Cell, vol. 92, pages 217–27, 1998.
- [Zhang 2009] F Zhang, W Gu, ME Hurles et JR Lupski. *Copy number variation in human health, disease, and evolution. Copy number variation in human health, disease, and evolution.* Annu Rev Genomics Hum Genet, vol. 10, pages 451–81, 2009.

Références Internet

- AceView (NCBI) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/AceView/>
- BioGPS (expression d'ARNm chez l'homme) : <http://biogps.org>
- Database of Genomic Variants (répertoire des polymorphismes de nombre de copies) : <http://projects.tcag.ca>
- DECIPHER : Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (répertoire des déséquilibres chromosomiques) : <https://decipher.sanger.ac.uk>
- dbSNP (NCBI) (répertoire de SNP) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/project/SNP>
- Ensembl (base de données de cartographie du génome) : <http://www.ensembl.org>
- ECR browser (recherche de séquences hautement conservées) : <http://ecr-browser.dcode.org>
- ExonPrimer (design d'amorces) : <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>
- Human Splicing Finder (prédiction de sites d'épissage) : <http://www.umd.be/HSF>
- NGRL (National Genetics Reference Laboratory) (recherche de SNP dans les séquences des amorces pour PCR) : <http://ngrl.org.uk/Manchester/snpcheck.html>
- OMIM (base de données sur les gènes et les phénotypes liés à une anomalie génétique) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Primer3 (design d'amorces) : <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
- RestrictionMapper (sites de restriction d'enzymes) : <http://www.restrictionmapper.org>
- Transeq (prédiction de séquence protéique à partir d'une séquence nucléotidique) : <http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/transeq/index.html>

- UCSC : University of California at Santa Cruz (base de donnée de cartographie du génome) : <http://genome.ucsc.edu/>
- Wellcome Trust Sanger Institute (fournisseur de BAC) : <http://www.sanger.ac.uk>

Publications scientifiques

Les travaux au cours de cette thèse ont fait l'objet de trois publications scientifiques.

- Publication numéro 1 :
Béri-Dexheimer M, Bonnet C, Chambon P, Brochet K, Grégoire MJ, Jonveaux P.
Microarray-based comparative genomic hybridization in the study of constitutional chromosomal abnormalities.
Pathol Biol (Paris) 2007 Feb;55(1) :13-8.
- Publication numéro 2 :
Béri-Dexheimer M, Grégoire MJ, Toutain A, Brochet K, Briault S, Schaff JL, Leheup B, Jonveaux P.
Genotype-phenotype correlations to aid in the prognosis of individuals with uncommon 20q13.33 subtelomere deletions : a collaborative study on behalf of the « association des cytogénéticiens de langue française ».
Eur J Hum Genet 2007 Apr; 15(4) : 446-52.
- Publication numéro 3 :
Béri-dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, Roth V, Grégoire MJ, Bordigoni P, Lecompte T, Leheup B, Jonveaux P.
Clinical Phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency from point mutations to large genomic deletions.
Eur J Med Genet 2008 Aug; 16(8) : 1014-8.

Candidate genes retrieval for developmental abnormalities by molecular characterization of chromosomal rearrangements

Abstract : Positional candidate gene approach and molecular characterization of chromosomal abnormalities can elucidate the genetic basis of many human developmental diseases. Mapping of such rearrangements allows the identification of disease candidate genes by using cytogenetic and molecular biology approaches. Array-CGH serves the critical need for identification of causal genes related to disease by detection of unknown chromosomal imbalances.

We report here the results of mapping and molecular characterization of two unbalanced chromosomal rearrangements related to mental retardation : 20q13.33 and 21q21 deletions. This study led to candidate genes identification and contributed to improve clinical monitoring and genetic counseling.

Moreover, the breakpoints characterization of a balanced *de novo* translocation t(3;18)(p12.3;q23) associated with an early-onset generalized dystonia and developmental delay revealed the disruption of *ROBO1*, a gene mediating axone guidance. Additional analysis including array-CGH, RNA and protein analysis, leukocyte chemotaxis and search for *ROBO1* mutations in 20 independent patients with syndromic dystonia were performed in order to evaluate the correlation between *ROBO1* disruption and dystonia. The results presented here underline the difficulties in elucidating the role of such rearrangements, and the need to provide further evidences in defining their involvement in the development of a genetic disease.

Keywords : chromosomal rearrangements, positional cloning, developmental abnormalities, candidate genes, ROBO1

Résumé : L'identification de gènes responsables d'anomalies du développement passe par des approches de clonage positionnel parmi lesquelles la caractérisation moléculaire d'anomalies chromosomiques. La cartographie précise de réarrangements chromosomiques permet de mieux cerner des gènes candidats impliqués dans les maladies génétiques, grâce à l'utilisation d'outils de cytogénétique et de biologie moléculaire. L'array-CGH a ainsi conduit à identifier des microremaniements chromosomiques jusqu'alors inconnus et à préciser les gènes candidats dans les affections étudiées.

Nous présentons dans une première partie, les résultats de la cartographie et de la caractérisation moléculaire de deux anomalies microcytogénétiques associées à un retard mental, une **délétion 20q13.33** et une **délétion 21q22**. Ces données ont contribué à la sélection de gènes candidats et à améliorer la prise en charge clinique et le conseil génétique.

Par ailleurs, la caractérisation moléculaire d'une **translocation réciproque t(3;18) (p12.3;q23) *de novo*** associée à une dystonie précoce généralisée avec retard de développement a été réalisée. Le gène ***ROBO1*** impliqué dans le guidage axonal s'est révélé interrompu. Des explorations complémentaires ont été conduites (array-CGH, étude de l'ARN, étude protéique, migration cellulaire et séquençage du gène *ROBO1* chez d'autres patients avec une dystonie syndromique) afin de mieux cerner les conséquences de cette anomalie sur la survenue de cette dystonie syndromique. Les résultats de ces études soulignent les difficultés d'interprétation liées à la découverte de tels réarrangements et la nécessité d'apporter la preuve de leur implication dans le phénotype observé par des moyens appropriés.

Mots clés : remaniements chromosomiques, clonage positionnel, anomalies du développement, gènes candidats, ROBO1
