

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de
Master en science de la nature et de la vie
Filière : science biologique
Option : Génétique –physiologie
Thème

Apport de la cytogénétique moléculaire dans le diagnostic des syndromes microdélétionnels

Présenté par :

Soutenu le : 15 /06/2015

M^{elle} : YALAOUI kahina

Devant le jury composé de :

M ^f MOHAMED SAID.R	MAA	(UB1) Président.
P ^R AIT ABELKADER.B	Pr	(CPMC) promoteur.
M ^{me} AISSANI.R	MAA	(UB1) co-promotrice
M ^{me} CHERRALLAH.A	MAA	(UB1) Examinatrice.

Promotion : 2014 - 2015

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à Remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour terminer ce travail.

On aimerait tout d'abord adresser nos vifs remerciements au **Pr Ait Abdelkader. B** qui nous a fait confiance et nous a permis d'intégrer l'équipe de cytogénétique qu'il dirige au Centre Pierre et Marie Curie.

Merci infiniment pour votre aide inestimable, vos précieux conseils et vos encouragements.

C'est extrêmement enrichissant de travailler aux côtés d'une personne de votre valeur.

Un grand merci à Widad, Kenza, Tania pour nous avoir encadrés durant les techniques. Merci pour votre disponibilité, votre aide enthousiaste et vos suggestions bien venues.

Merci à madame Merselabe pour votre bonne humeur et votre gentillesse et à Nadia pour la personne adorable que vous êtes.

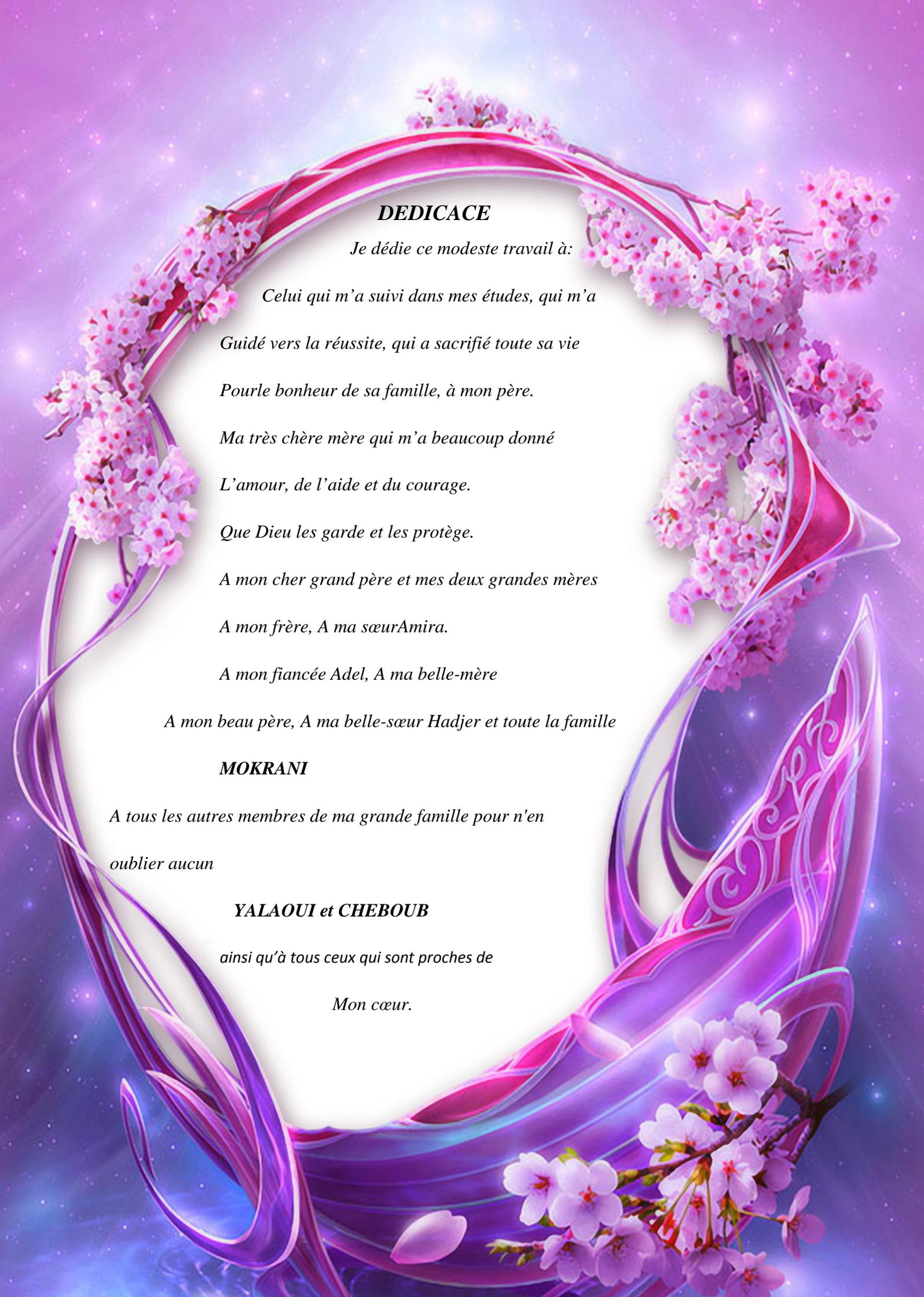
Nous tenons à exprimer toute notre Reconnaissance et notre profond respect pour notre Co-promotrice **M^{me} AISSANI.R** pour son Encadrement et pour ses précieux conseils, Ses orientations scientifiques.

Nous remercions **M^r MOHAMEDSAID.R** d'avoir Accepté de présider le jury de notre soutenance.

Nous remercions **M^{me} CHERRALLAH.A** d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions également tous les enseignants du Département de Biologie

A tous ceux qui ont contribué dans le près ou de loin à la réalisation de ce travail.



DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à:

Celui qui m'a suivi dans mes études, qui m'a

Guidé vers la réussite, qui a sacrifié toute sa vie

Pour le bonheur de sa famille, à mon père.

Ma très chère mère qui m'a beaucoup donné

L'amour, de l'aide et du courage.

Que Dieu les garde et les protège.

A mon cher grand père et mes deux grandes mères

A mon frère, A ma sœur Amira.

A mon fiancée Adel, A ma belle-mère

A mon beau père, A ma belle-sœur Hadjer et toute la famille

MOKRANI

A tous les autres membres de ma grande famille pour n'en

oublier aucun

YALAOUI et CHEBOUB

ainsi qu'à tous ceux qui sont proches de

Mon cœur.

RESUME

Résumé

Les retards mentaux isolés ou syndromiques sont dus majoritairement à des aberrations chromosomiques dont la détection se fait par caryotype. Cependant, cette technique est limitée de part son pouvoir résolusif. Les techniques de cytogénétique moléculaire (FISH et CGH-array) ont révolutionné le diagnostic des retards mentaux syndromiques, en particulier ceux résultant d'une anomalie de structure chromosomique. Notre travail est une étude retrospective et prospective des syndômes microdélétionnels.

L'unité de cytogénétique, laboratoire d'hormonologie, au Centre Pierre et Marie Curie, a reçu, en l'espace de quatre années, 622 patients avec un retard mental, une dysmorphie et/ ou retard psychomoteur. Afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic posé par le praticien spécialiste, un caryotype standard a été effectué pour l'ensemble de ces patients.

Les syndromes microdélétionnels, objet de notre étude, ont été identifiés par une analyse FISH sur préparation chromosomique. Sur 124 suspicions de microdélétions avec caryotype standard non pathologique, seules 29 d'entre elles ont pu être confirmés par FISH. Ceci attire notre attention sur les limites de cette technique malgré un pouvoir résolusif inférieur à 5Mb.

Mots clés : Microdélétion, Retard mental, Chromosome, Cytogénétique

Abstract

Isolated or syndromic mental retardation is mainly caused by chromosomal aberrations that are detected by karyotype. However this technique has a limited resolution. The molecular cytogenetic techniques (FISH and CGH-array) have revolutionized the diagnosis of the syndromic mental retardations, in particular those resulting from a structural abnormality. Our work is a study retrospective and prospective of microdélétionnels syndromes.

The unit of cytogenetics, endocrinology laboratory at Centre Pierre and Marie Curie, received, in the space of four years, 622 patients with mental retardation, dysmorphic features and / or psychomotor retardation. To confirm or refute the diagnosis made by the specialist doctor, a standard karyotype was performed for all patients.

The microdeletion syndromes, object of our study, are displayed by FISH analysis within the “Centre Pierre et Marie Curie”, Medical Biochemistry Laboratory, Cytogenetics Unit. There have been 124-suspected microdeletions, but only 29 confirmed ones by FISH analysis. This fact draws our attention to the FISH’s efficiency threshold despite a resolving power less than 5 Mb.

Key words: Microdeletion, Mental retardation, Chromosome, Cytogenetic

المتخلفين عقليا المعزولين أو المتلازمين أغلبهم بسبب الانحرافات الكروموزومية الذي كشف عنه عن طريق النمط النووي. ومع ذلك، هذه التقنية محدودة بسبب حل السلطة لها.

أحدثت التقنيات الوراثية الخلوية الجزيئية في تشخيص التخلف العقلي المتلازمة ، وخاصة الذي نتجوا عن خلل في بنية الصبغي. عملنا هو دراسة استعادية ومستقبلية لتناذر ميكروديليسيونال.

وحدة علم الوراثة الخلوية، مختبر علمالهرمونات في مركز بيار وماري كوري، وردت في غضون أربع سنوات، 622 مريض الذين يعانون من التخلف العقلي، وميزات تشوه و / أو التخلف النفسي لتأكيد أو ابطال التشخيص الذي أدلى بهالطبيب المختص، تم إجراء النمط النووي القياسي لجميع المرضى

التناذر ميكروديليسيون هو هدف دراستنا، حددت من خلال تحاليل من اعداد كروموزوم على 124 يشتبه ميكروديليسيون مع النمط النووي لغير المصابين ، تم تأكيد فقط 29 منهم بواسطة التهجين في الموقع فلوري.

هذا يلفت الانتباه إلى حدود التقنية على الرغم من قوة أقل حل ، ل5 ميغا باز.

Table de matière

Introduction	1
Généralité	2
I. Organisation structurale des chromosomes	2
I.1. Chromosome interphasique.....	2
I.2. Chromosome métaphasique.....	3
II. Organisation de l'ADN non codant	4
II.1. ADN répété.....	4
II.1.1. ADN répété de séquence simple.....	4
II.1.2. ADN mobile.....	5
II.1.3. Séquence LCR.....	6
III. Anomalies chromosomiques	6
IV. Mécanisme de réparation de l'ADN remanié	7
IV.1. Recombinaison homologue non allélique.....	8
IV.1.1. Remaniements chromosomiques liés aux duplicons.....	8
IV.1.2. Mécanisme de recombinaison homologue.....	10
IV.1.3. Mécanisme d'appariement des ADN simple-brin.....	10
IV.2. Recombinaison non homologue.....	11
IV.2.1. Raccordement d'extrémités non homologues.....	11
V. Aspect moléculaires des syndromes microdélétionnels	12
V.1. Microdélétion 22q11.....	15
V.2. Syndrome de Williams-Beuren.....	15
V.3. Syndrome de Wolf-Hirschhorn.....	15
V.4. Syndrome de cri du chat.....	15
V.5. Neurofibromatose de type 1.....	16
V.6. Syndrome de Langer-Giedion.....	16
V.7. Syndrome de PraderWilli et syndrome d'Angelman.....	16
V.8. Syndrome de Rubinstein-Taybi.....	18
V.9. Syndrome de Miller Dieker.....	18
V.10. Syndrome de Smith Magenis.....	18
V.11. Syndrome de Phelan Mc Dermid.....	18
V.12. Syndrome de Mowat Wilson.....	18
V.13. Délétion 1p36.....	19
V.14. Syndrome SaethreChotzen.....	19
Matériel et méthode	20
Résultats et discussion	28
Conclusion	50
Références bibliographique	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau N°1 : classification des syndromes microdélétionnels selon le nombre de gène délétères et la localisation de ces derniers.....	14
Tableau N°2 : Répartition des résultats du caryotype standard selon l'orientation clinique.....	31
Tableau N°3 :Microremaniements identifiés par FISH chez 124 patients adressés pour suspicion de syndrome microdélétionnel.....	32
Tableau N°4 : Diagnostic final des 29 cas de microdélétion.....	33-34

Liste des figures

Figure 1 : Remaniement chromosomique liés aux duplicons.....	09
Figure 2 : Mécanismes de réparation des cassures double brin	12
Figure 3 : exemple des sondes utilisées dans la FISH	27
Figure 4 : Répartition des patients selon l'origine géographique	28
Figure 5 : Répartition des patients selon le sexe	29
Figure 6 : Répartition des patients selon l'âge	30
Figure 7 : Une FISH du patient illustrant la délétion 15q11.....	35
Figure 8 : Une FISH du patient illustrant la délétion 15q11-13.....	37
Figure 9 : Une FISH du patient illustrant la délétion 22q11.....	38
Figure 10 : Une FISH du patient illustrant la délétion 7q11.....	40
Figure 11 : caryotype standard du patient en bande R montrant une délétion 5p13.....	41
Figure 12 : Une FISH du patient illustrant la délétion 5p15.....	42
Figure 13 : Une FISH du patient illustrant la délétion 4p16.....	44
Figure 14 : caryotype standard montrant un remaniement de structure touchant une région télomérique du chromosome 22.....	46
Figure 15 : Une FISH du patient illustrant la délétion 22q13.....	46

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

AS :Syndrome d' Angelman

Bandes R : Bandes Reverse

BP :BreakPoint

BrdU:BromodéoxyUridine

DAPI: 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole

FISH :Hybridation In Situ par Fluorescence

FrdU :Formo-Déoxy-Uridine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

Kb :Kilobase

LTR: Long Terminal Repeat

LINE: Long Interspersed Nuclear Elements

LCR: Low Copy Repeats

Mb:Mégabases

MDS :Syndrome de Miller Dieker

NAHR: Non AllelicHomologousRecombination

NHEJ: Non Homologous End Joining

nm: nanomètre

NF1 :NeuroFibromatose de type 1

P : Bras court du chromosome

Pb :Paire de base

PWS: Syndrome de PraderWilli

q : Bras long du chromosome

QI : Quotient Intellectuel

RM: Retard Mental

RPMI : Roswell Park Memorial Institute quantitative

RTS:Syndrome de Rubinstein-Taybi

SCS :Syndrome de Saethre-Chotzen

SINE: Short InterspersedNuclearElements

SLG: Syndrome de Langer-Giedion

SNRPN: Small NuclearRibonucleoProtein N

SSA: Single Strand Annealing

SMS: Syndrome de Smith-Magenis

SWB : Syndrome de Williams-Beuren

SVF : Sérum de Veau Fœtal

STR: Short Tandem Repeat

TC : milieu de Culture des lymphocytes

tr/min : Tours par minute

VNTR: Variable Number Tandem Repeat

VCF: Vélo-Cardio-Facial

WHS : Syndrome du Wolf-Hirschhorn

INTRODUCTION

INTRODUCTION

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

La cytogénétique moléculaire d'apparition relativement récente est une discipline frontière entre la cytogénétique et la génétique moléculaire qui a révolutionné l'approche traditionnelle de la cytogénétique. Actuellement, ses outils principaux sont l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur préparation chromosomique et l'hybridation génomique comparative sur puces d'ADN (CGHarray).

De nombreux syndromes décrits cliniquement, depuis les années soixante, ont été rattachés, grâce à ces techniques, à des microremaniements, alors qu'à l'inverse, la description de nouvelles microdélétions a permis d'identifier de nouveaux tableaux cliniques.

Ces syndromes, dits microdélétionnels représentent des entités cliniques, associant généralement : un retard mental, une dysmorphie avec des malformations d'organes et des troubles du comportement. Il s'agit d'un syndrome de gènes contigus le plus souvent de novo par perte de fragment chromosomique de petite taille infra-microscopique (< 5 mégabases) non visible sur un caryotype standard.

A l'heure actuelle, la recherche de ces microdélétions justifie le recours à des marqueurs spécifiques de chaque région avec des techniques adaptées. Il est donc indispensable d'avoir une orientation clinique préalable, facilitée par l'amélioration des connaissances de l'expression phénotypique de ces syndromes, étudiés sur des cohortes de patients et à différents âges de vie.

Les deux syndromes les plus étudiés, diagnostiqués et suivies sont : le syndrome de la délétion 22q11 et le syndrome de Williams.

A travers ce travail, nous mettrons à jour les dernières actualités scientifiques sur ces syndromes ainsi que l'intérêt d'une approche multidisciplinaire :

- ✓ En définissant les syndromes microdélétionnels les plus connus,
- ✓ En rappelant les aspects cytogénétiques et moléculaires de ces syndromes,
- ✓ En citant les principaux outils pour le diagnostic ainsi que l'intérêt de la cytogénétique moléculaire dans l'approche de ces syndromes,

GENERALITE

GENERALITES

Le génome, support de l'information génétique est propre à chaque individu cependant il ne diffère que de 0.1% environ de celui d'une personne non apparentée. La longueur totale de l'ADN équivalent à plus de 100000 fois la taille de la cellule. Pour cette raison, l'empaquetage de l'ADN associé à des protéines en chromosome est essentiel dans l'architecture cellulaire. L'ADN humain est constitué de trois grandes classes de séquences : les gènes codant des protéines et des ARN fonctionnels, de l'ADN répété et de l'ADN intercalaire [1].

I. Organisation structurale des chromosomes :

Au cours du cycle cellulaire, le génome se décline sous deux états fonctionnels. L'un décondensé pendant l'interphase sous forme de chromatine qui permet la transcription des gènes. L'autre condensé au moment de la division cellulaire sous forme de chromosome [2].

I.1. Chromosome interphasique :

I. 1. 1. Chromatine :

Dans la cellule eucaryote, le matériel génétique est organisé en une structure complexe baptisée chromatine (du grec *khroma*: couleur et *sôma*: corps). A partir d'observations histologiques, il est apparu que la chromatine avait une structure hétérogène faite d'un enchevêtrement de fibres dont le diamètre varie non seulement au cours du cycle cellulaire mais aussi en fonction des régions chromosomiques observées [2, 3,4]. Au sein du noyau interphasique, la chromatine est organisée en territoires fonctionnels et divisée en : Euchromatine et Hétérochromatine.

En microscope électronique, la chromatine isolée a une structure en «collier en perle». Dans sa forme étirée, le collier est constitué d'ADN de liaison (ADN linker) qui relie des structures en forme de perle de 10 nm de diamètre appelées nucléosomes. Ces derniers représentent l'unité structurale de la chromatine. La formation du nucléosome débute par mise en place sur l'ADN d'un tétramère d'histones (H3-H4)₂ auquel s'adjoint deux dimères H2A-H2B. Le nucléosome ainsi formé est composé de 146 pb d'ADN enroulés selon environ 1.7 tour autour d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B [1,2].

La chromatine est constituée de protéines (histones 35% et non histones 10 à 25%) et d'ADN (35%) condensé dans un noyau de quelques µm de diamètre. En plus de cet énorme degré de compaction, l'ADN doit être rapidement accessible afin de permettre son interaction avec les machineries protéiques régulant les fonctions de la chromatine : la réplication, la réparation et la recombinaison [2,5].

I.1. 2. Euchromatine :

Elle est localisée à l'intérieur du nucléoplasme et représente la forme transcriptionnellement active de l'ADN. Elle représente la majeure partie du génome et contient les gènes structuraux (gènes codant pour les protéines et les ARN non traduits). L'euchromatine est décondensée pendant l'interphase du noyau et peut se présenter sous deux formes :

- ✓ **Formes actives (transcriptionnellement) :** Elle est alors constituée d'une fibre dont le diamètre est de 10 à 11 nm (diamètre du nucléosome).
- ✓ **Formes inactives :** Elle s'enroule en un solénoïde sous la contrainte de l'histone H1 qui relie deux nucléosomes consécutifs. Son diamètre est de 30 nm [3,4].

I.1.3. Hétérochromatine :

L'hétérochromatine a été définie comme une structure qui ne change pas d'état de condensation au cours du cycle cellulaire. Il est localisé principalement en périphérie du noyau et du nucléole. On distingue :

- ✓ **Hétérochromatine constitutive :** formée principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères et des télomères.
- ✓ **Hétérochromatine facultative :** qui prend la forme de chromosomes entiers qui sont inactifs, le meilleur exemple est celui du chromosome X.

I.2. Chromosome métaphasique :

Un être humain possède 23 paires de chromosomes, donc deux jeux complets d'instructions génétiques, chacun hérité d'un de ses parents. En terme fonctionnel, les chromosomes représentent le niveau de condensation le plus élevé. Cependant, ils intègrent les structures indispensables à une séparation équilibrée du matériel génétique entre les deux cellules à l'anaphase.

Le chromosome métaphasique est constitué de deux chromatides, chaque chromatide représentant une des deux molécules d'ADN identiques issues de la réplication en phase S.

Ces deux chromatides sont étroitement associées au niveau du centromère. Cette constriction centromérique est un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court (par convention situé au-dessus du centromère) et un bras long (en-dessous du centromère). En fonction de la taille respective des bras courts et longs, on reconnaît trois groupes morphologiques de chromosomes :

- ✓ **Chromosomes métacentriques,** dont les bras courts et longs sont de taille semblable. Exemple : chromosomes 1, 2, 3, 16, 19, 20, X.
- ✓ **Chromosomes submétacentriques,** dont les bras courts sont franchement plus courts que les bras longs. Exemples : chromosomes 4, 5, 6 à 12, 17, 18, Y.
- ✓ **Chromosomes acrocentriques,** dont le bras court est peu ou pas visible. La particularité essentielle de ce groupe de chromosomes est qu'ils hébergent sur leurs bras courts les mêmes gènes, de structure identique. Il s'agit des gènes responsables

de la synthèse des ARN ribosomiques, présents à plusieurs centaines d'exemplaires dans la cellule. Exemple : 13, 14, 15, 21, 22 [2].

II. Organisation de l'ADN non codant :

Le génome de vertébrés contiennent de nombreuses séquences qui ne codent aucun ARN et ne remplissent aucune fonction structurale ni régulatrice [1]. Elles sont structurellement polymorphe, très variables selon les familles et les sujets : tant qualitativement que quantitativement. La plus grande partie de ces ADN non fonctionnel est constituée de séquences répétée [1]. Les empreintes génétiques s'intéressent précisément à ces régions d'ADN non codantes aux motifs répétitifs.

II. 1. ADN répété :

Il représente 70% du génome. Les principaux types d'ADN répétitif sont résumés dans ce qui suit :

II.1.1. ADN répété de séquence simple :

L'ADN satellite est constitué de séquences répétitives courtes d'environ 14 à 500 Pb organisées en tandem de 20 à 100 Kb et localisées près des centromères et des télomères. Le motif répété est conservé parmi les individus contrairement aux nombres de répétitions et ce en raison des « crossing over inégaux » lors de la duplication au niveau des régions contenant des satellites. Parmi les ADN répétés nous retrouvons :

✓ ADN mini satellite :

Les ADN mini satellite ou « Variable Number Tandem Repeat » (VNTR) sont des séquences courtes de 1 à 5 kb contenant 15 à 100 Pb, répétées 20 à 50 fois et très polymorphes dans leur séquence et le nombre de répétitions. Cette dernière propriété est à la base de technique de prise d'empreintes d'ADN.

✓ ADN micro satellite :

Les ADN micro satellite ou « Short Tandem Repeat » (STR) sont des séquences de 1 à 5 Pb répétées une dizaine de fois. Le motif le plus courant est « CA repeats ». Ils résulteraient du glissement du brin fils sur le brin matrice lors de la réplication de telle sorte que la même séquence soit copiée deux fois [1].

II.1. 2. ADN mobile :

Ce sont des séquences d'ADN moyennement répétées, dispersées dans le génome avec la capacité unique de se déplacer et de s'insérer dans différentes régions du génome. Les éléments mobiles qui se transposent directement sous forme d'ADN sont dit « transposons d'ADN », tandis que ceux qui sont d'abord transcrits en une copie d'ARN de l'élément puis subissent une transcription inverse en ADN sont appelés « rétrotransposons » [1]. Il existe deux types de rétroéléments :

II.1.2.1. Rétrotransposons à LTR :

Ce sont des éléments de 5 à 9 kb encadrés de longues séquences terminales répétées en orientation directe « Long Terminal Repeat » (LTR), contenant des séquences régulatrices et des séquences codantes de l'élément. Ces rétroéléments codent pour des transcriptases inverses et des ligases [1].

II.1.2.2. Rétrotransposons sans LTR :

Ils englobent les séquences SINE « Short Interspersed Nuclear Elements » et LINE « Long Interspersed Nuclear Elements ». Les différentes études indiquent qu'ils se transposent par le biais d'intermédiaire d'ARN bien qu'ils ne contiennent pas de LTR. Ces séquences moyennement répétées possèdent des sites riches en A/T à une de leurs extrémités [1].

✓ Les LINEs :

Ces séquences constituent 21% du génome et sont représentées par trois grandes familles L1, L2, L3 mais seuls les membres de la famille L1 se transposent dans le génome humain et sont à l'origine de maladies graves [1].

✓ Les SINEs :

Ce sont des séquences dont la longueur varie entre 100 à 400 Pb, Les éléments « Alu » sont les SINE les plus courants chez l'homme. Ces derniers contiennent 282 nucléotides rencontrés en moyenne toutes les 4000 Pb qui ne codent pour aucune protéine. [1]

II.1.3. Séquences LCR :

Les séquences LCR ou « Low Copy Repeats » sont des répétitions segmentaires appelées duplons, elles constituent 5% du génome et sont à la base de remaniements intrachromosomiques. Les duplons reproduisent complètement ou partiellement la structure des gènes et sont localisés dans les régions péri-centromériques et sub-télomériques.

L'hybridation *in situ* sur différents génomes a montré qu'ils se sont formés par transposition duplicative tout au long de l'évolution des primates. Ce sont des blocs d'ADN de 1 à 400 Kb formés de segments génomiques ayant une identité de séquence importante ce qui en fait des substrats moléculaires pour la recombinaison homologe non allélique. Cette recombinaison anormale entre segments répétés spécifiques d'une région ou d'un chromosome entraîne la perte ou la duplication du segment intermédiaire entre les deux duplons ce qui explique la récurrence de certains syndromes de gènes contigus comme les syndromes microdélétionnels [6].

III. Anomalies chromosomiques :

On appelle anomalie chromosomique, toute modification du nombre ou de la structure des chromosomes. On reconnaît par ailleurs les anomalies dites :

- **Homogène :** quand toutes les cellules examinées portent l'anomalie. Elle se produit durant la gamétogenèse.

- **Mosaïque** : quand une fraction seulement des cellules est anormale.

Les conséquences de ces modifications sont variables en fonction du remaniement considéré :

- ✓ **Remaniements équilibrés** : c'est à dire sans perte ni gain de matériel génétique codant, n'ont habituellement pas de conséquence phénotypique mais peuvent avoir pour conséquence, en cas de mal ségrégation ou d'anomalie de recombinaison lors de la méiose, la formation des gamètes déséquilibrés à l'origine de troubles de la reproduction, ou de la naissance d'enfants anormaux porteurs d'une anomalie déséquilibrée.
- ✓ **Remaniements déséquilibrés** : ils se traduisent par des manifestations cliniques d'autant plus graves que la perte ou le gain de matériel est plus important (7,8).
- ✓ **Microdélétions** : Il s'agit, comme leur nom le suggère, d'une catégorie particulière de délétions de toute petite taille dont la caractéristique principale est de ne pas être visible sur le caryotype standard. Ces pertes de matériel chromosomique concernent en effet au plus une sous-bande chromosomique (perte inférieur à 5 Mb) et ne sont dépistées qu'avec les techniques de haute résolution ou actuellement par hybridation *in situ* fluorescente avec des sondes moléculaires spécifiques. Cette dernière approche est à la fois plus sensible et plus spécifique que le caryotype haute résolution, mais elle n'est applicable que quand la clinique est suffisamment évocatrice de tel ou tel syndrome pour orienter le choix de la région chromosomique à explorer et donc de la sonde à utiliser (4).

IV. Mécanismes de réparation de l'ADN remanié :

Les anomalies de dosage génique, ou aneusomies, dues à des amplifications, des duplications ou des délétions de segments chromosomiques plus ou moins grands, sont à l'origine de nombreuses maladies dont certains cancers mais aussi des syndromes génétiques liés à des anomalies du développement embryonnaire. Ces réarrangements peuvent concerner les régions subtélomériques (dans 8% à 10% des cas), mais aussi des régions chromosomiques interstitielles réparties sur l'ensemble du génome. Ils sont le résultat de mécanismes de recombinaison chromosomiques de différentes origines [9,10]. Les anomalies de dosage génique apparaissent après un remaniement chromosomique, lui-même consécutif d'une cassure double-brin de l'ADN. Les deux principaux mécanismes permettant à une cellule de réparer les cassures double-brin sont :

- ✓ Recombinaison homologue non allélique ou **NAHR** pour « Non Allelic Homologous Recombination » [11,12].
- ✓ Raccordement d'extrémités non homologues ou **NHEJ** pour « Non Homologous End Joining » [13].

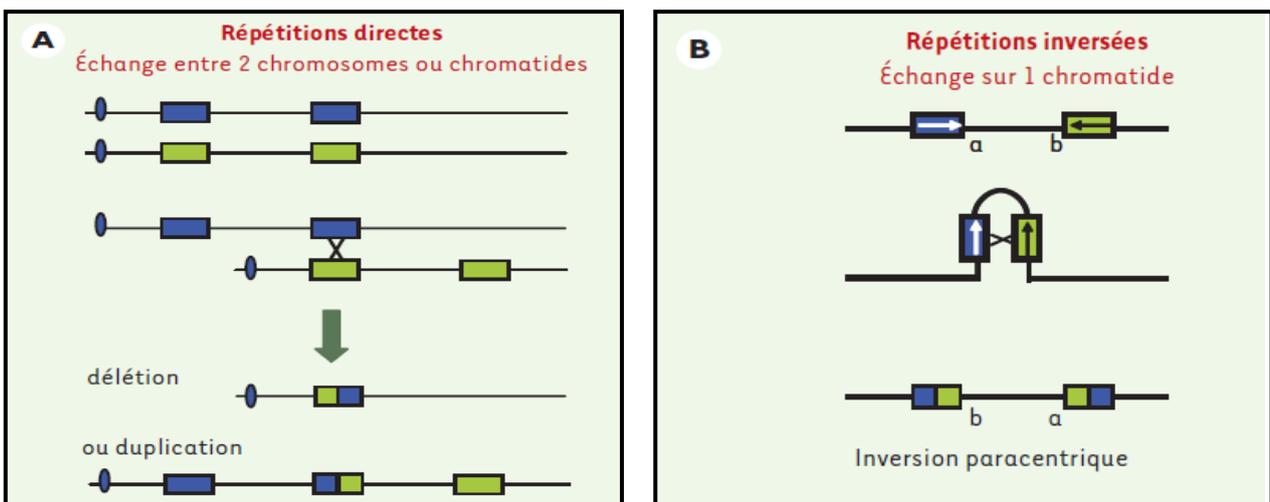
IV. 1. Recombinaison homologue non allélique :

Les réarrangements apparaissant selon le mécanisme NAHR, sont dus aux séquences LCR ou duplications segmentaires ou encore duplicons. Ces éléments très particuliers représentent au moins 5 % de notre génome et constituent la base moléculaire des remaniements intrachromosomiques récurrents [14].

IV. 1. 1. Remaniements chromosomiques liés aux duplicons :

La forte homologie de séquence fait des duplications segmentaires des substrats moléculaires de recombinaison homologue non-allélique. Cette recombinaison anormale entre des segments répétés spécifiques d'une région ou d'un chromosome entraîne la perte ou la duplication du segment génomique compris entre les deux duplicons et explique la récurrence de certaines pathologies (**Figure 1**).

Différents facteurs incluant la taille des répétitions, l'intervalle qui les sépare, leur degré d'homologie et leur orientation relative influencent la probabilité de mésappariement et le type de remaniement généré. D'une façon générale, plus les segments sont grands et plus leur degré d'homologie est élevé, plus la probabilité de survenue d'un échange anormal est grande. Par exemple, le syndrome microdélétionnel le plus fréquent correspondant à la délétion 22q11 responsable du syndrome de DiGeorge ou syndrome vélo-cardio-facial (VCF), est engendré par des blocs de répétitions de taille supérieure à 300 kb et dont l'identité de séquence atteint 99,7 % [15]. Une NAHR entre deux répétitions segmentaires intrachromosomiques de même orientation va entraîner une délétion ou une duplication du segment intermédiaire avec une fréquence théoriquement égale. En fait, on détecte beaucoup plus de délétions que de duplications délétères, peut-être du fait d'un retentissement moindre des duplications sur le phénotype pathogène d'un individu. Si les séquences sont en orientation opposée, une NAHR peut entraîner une inversion du segment intermédiaire. Ces inversions sans conséquence phénotypique sont effectivement retrouvées dans la population générale et chez les parents des enfants porteurs de déséquilibres de la même région [6].



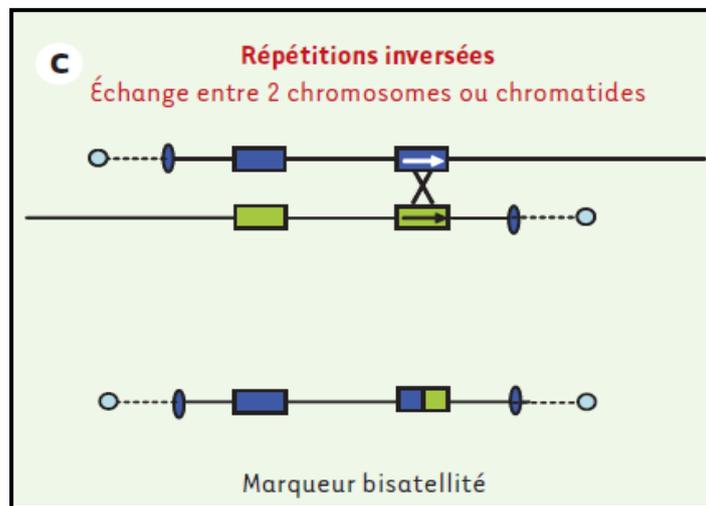


Figure 1 : Remaniements chromosomiques liés aux duplicons(Turleau et Vekemans, 2005).

A. Un échange entre des séquences homologues nonalléliques en orientation directe, distantes de quelques kilobases à plusieurs mégabases, entraîne une délétion ou une duplication du segment intermédiaire.

B. Un échange entre des séquences homologues non-alléliques en orientation inverse sur une même chromatide entraîne la formation d'une inversion paracentrique.

C. Un échange entre des séquences en orientation inverse entre deux chromatides entraîne la formation d'un chromosome dicentrique. Si les chromosomes impliqués sont des acrocentriques, l'élément formé sera porteur d'un satellite à chaque extrémité.

IV. 1. 2. Mécanisme de recombinaison homologue :

Le mécanisme de recombinaison homologue a été largement étudié au sein du modèle de la réparation d'une cassure de l'ADN double-brin. La réparation est basée sur l'invasion des brins provenant du chromosome endommagé dans ceux d'un chromosome homologue intact. La lésion ADN double-brin est transformée en deux lésions simple-brin par le complexe nucléasique Mre11/Rad50/NBS1 qui résèque les extrémités des brins cassés, afin de générer un ADN coupé en 3'. La protéine Rad52 protège l'extrémité du brin d'ADN coupé en 3' et facilite la formation de l'hétéroduplex qui nécessite Rad51 et d'autres protéines associées (RPA, Rad52, Rad54, Rad55 et Rad 57). Ces protéines forment des filaments sur ces protubérances simple-brin, puis de longues extrémités protubérantes 3' sont générées par des exonucléases digérant partiellement les brins 5'. L'invasion du brin homologue se fait par la partie parfaitement homologue du brin cassé et la queue non homologue est éliminée par les endonucléases Rad1 et Rad10 assistées par les protéines de réparation des mésappariements : Msh2 et Msh3 [16]. On a ensuite formation d'une structure entrecroisée appelée "jonction de Holliday". Une extension est effectuée par l'ADN polymérase, avec pour matrice, la séquence homologue appropriée. Une boucle est ainsi formée pour permettre l'hybridation et la polymérisation du fragment 3'. Des hélicases assurent la migration de cette boucle. La réparation se termine après ligation et disparition de la jonction [17](**Figure 2. A**).

IV. 1. 3. Mécanisme d'appariement des ADN simple-brin :

Le mécanisme d'appariement des ADN simple-brin ou SSA pour « Single Strand Annealing », débute comme une recombinaison homologue, à la différence que la protéine Rad52 seule cherche de courtes séquences homologues de part et d'autre de la cassure. Dans ce cas particulier, il en résulte la perte d'un des deux éléments répétés ainsi que de la région intermédiaire, et le point de cassure se trouve dans ou proche de l'élément répété restant. L'endonucléase FEN-1 se débarrasse des séquences inutiles et la ligation peut se produire. Comme le NHEJ, ce mécanisme conduit à une perte d'information génétique [18], car il s'agit d'un mécanisme de dégradation-hybridation n'impliquant pas de recherche d'homologie active entre un ADN simple brin et un duplexe homologue, mais une hybridation de séquences complémentaires(**Figure 2. B**).

IV. 2. Recombinaison non homologue ou raccordement d'extrémités non homologues:

Bien que moins fidèle que la recombinaison homologue, le NHEJ est le mode de réparation des cassures double-brin d'ADN prédominant chez les mammifères, car il est rapide et peut intervenir quel que soit l'état de répllication de l'ADN (alors que la recombinaison homologue est limitée aux phases S tardive et G2 du cycle cellulaire). Les recombinaisons médiées par le mécanisme NHEJ sont dues à des séquences répétées plus petites comme les SINEs ou LINEs [12]. Ce mécanisme de réparation induit plus volontiers des erreurs entraînant des anomalies du nombre de copies ou réarrangements non récurrents liés à des maladies [19].

IV. 2. 1. Raccordement d'extrémités non homologues :

Il s'agit de la réparation par jonction des extrémités non-homologues. C'est une ligation d'extrémité à extrémité d'ADN, utilisée majoritairement chez les mammifères. Après survenue d'une cassure chromosomique, les extrémités de l'ADN ne sont pas immédiatement dégradées et restent intactes pendant environ deux heures en l'absence de réplication. Les extrémités de l'ADN cassé sont reconnues par le complexe Ku70/Ku80, qui va interagir avec les deux extrémités de la cassure double brin. Pour cela, Ku70 possède plusieurs activités :

- ✓ Activité terminale transférase permet l'ajout de nucléotides à l'extrémité 3' sans matrice.
- ✓ Activité nucléase détruit ce qui vient d'être synthétisé si l'hybridation n'est pas possible.

Le complexe Ku70/Ku80 recrute la sous-unité catalytique de DNA-PK, puis l'hétérodimère XRCC4/ligase IV dirige la ligation. Dans cette voie, l'information contenue dans le morceau d'ADN dégradé par la cassure double brin est perdue. La séquence initiale a ainsi été réparée mais elle est modifiée par cette réparation biochimique : il y a donc mutation(**Figure 2. C**).

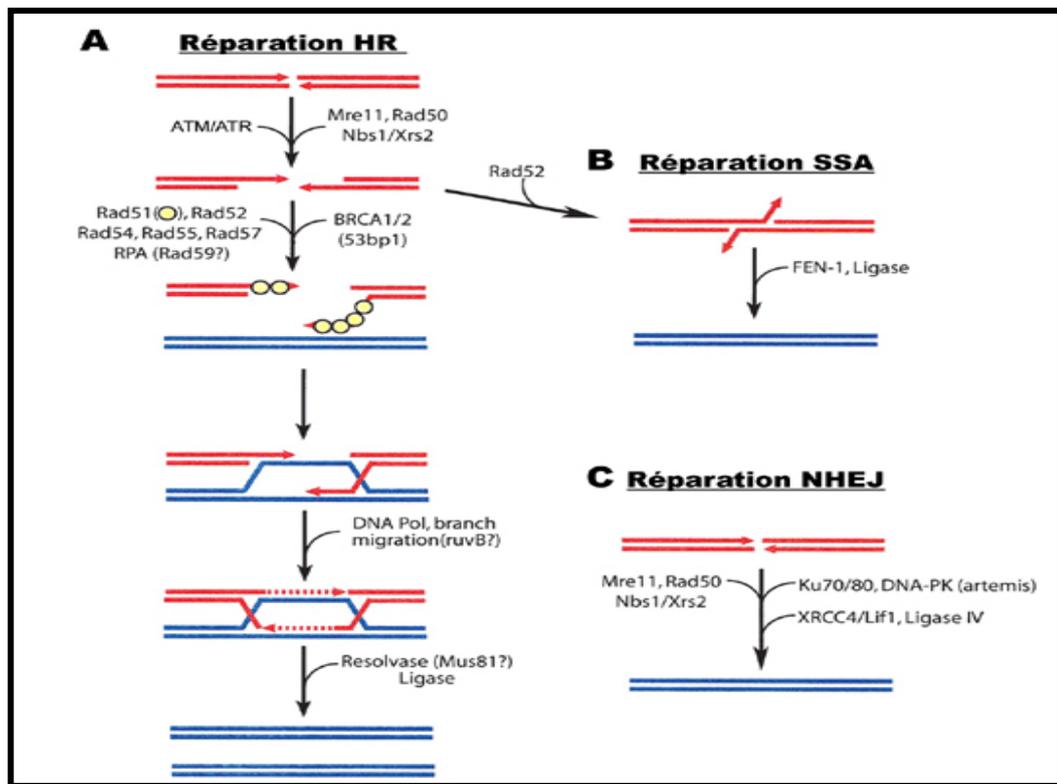


Figure 2 : Mécanismes de réparation des cassures double brin (Modifié de Peterson et Cote, 2004).

Les pertes de séquences et/ou les mutations introduites sont courantes avec le NHEJ, comparativement au NAHR. Cependant, le mécanisme NHEJ peut être un processus fiable car les mammifères ont deux copies de chaque gène et la majorité du génome est constituée de séquences non codantes [17,20].

V. Aspects moléculaires des Syndromes microdélétionnels :

Les syndromes microdélétionnels représentent des syndromes cliniques, associant généralement : un retard mental, une dysmorphie avec des malformations d'organes et des troubles du comportement. Ils sont liés à une microdélétion particulière, non visible sur un caryotype standard. Il s'agit d'un syndrome de gènes contigus le plus souvent *de novo* par perte de fragment chromosomique de petites tailles infra-microscopiques (< 5 mégabases).

Les premiers syndromes par microdélétion/duplication ou syndromes de gènes contigus (**Schmicke, 1986**) ont été décrits dès 1978 grâce aux techniques de cytogénétique de haute résolution. Ces remaniements de petite taille, le plus souvent, sont associés de façon spécifique à des syndromes cliniques décrits indépendamment de l'anomalie chromosomique.

Le phénotype anormal résulte d'un dosage inapproprié de certains gènes dans une région critique. Ce déséquilibre peut résulter d'un mécanisme structurel (délétion ou duplication) ou fonctionnel (empreinte ou disomie uniparentale). Les exemples les plus connus des syndromes microdélétionnels incluent le syndrome de Prader-Willi (PWS) en 15q11-q13, le syndrome de Williams en 7q11, le syndrome de Smith-Magenis (SMS) en 17p11.2, ou le syndrome de DiGeorge/vélocardiofacial (DG/VCFS) en 22q11.2. La

découverte de ces déséquilibres spécifiques a ouvert un champ nouveau de la pathologie chromosomique entraînant le développement de nouvelles techniques diagnostiques fondées sur l'hybridation in situ révélée par fluorescence (FISH) et ouvrant de nouvelles voies de recherche(6). Ces microdélétions/duplications surviennent habituellement de novo avec un taux de mutation élevé dans la population générale. Cette observation suggérait fortement l'existence de facteurs favorisant leur survenue. Le clonage des points de cassure de certains de ces syndromes microdélétionnels a mis en évidence des répétitions d'un type particulier que l'on a appelé *CMT1A-REP* et *SMS-REP* sur le chromosome 17, BP1-4 sur le 15, LCR sur le 22...(Emanuel et Shaikh, 2001). Ces éléments très particuliers, appelés répétitions segmentaires, duplions ou encore LCR (low-copy repeats) représentent au moins 5 % de notre génome et constituent la base moléculaire de ces remaniements intrachromosomiques récurrents. La classification des syndromes microdélétionnels est résumée dans le **tableau I**.

Tableau N° 1 : Classification des syndromes microdélétionnels selon le nombre de gènes délétères et la localisation de ces derniers.

Locus	Syndrome	Classification selon le nombre de gènes délétères	Classification selon la localisation du/des gènes délétères
4p16.3	Syndrome de Wolf-Hirschhorn	Syndromes de type multigénique Gènes en cause : WHSC1, FGFRL1, LETM1 (entre autres)	Microdélétion subtélomérique
5p15.2	Cri du chat	Syndromes de type multigénique Gènes en cause : SEMAF, CTNND2	Microdélétion subtélomérique
7q11.2	Williams et Beuren	Syndromes de type multigénique Gènes en cause : ELN (entre autres)	Microdélétion interstitielle
8q24.1	Langer-Giedion	Syndromes de type multigénique Gène en cause : TRPS1 (entre autres)	Microdélétion interstitielle
15q11-q13	Prader-Willi	Syndromes de type monogénique Gène en cause : SNRPN	Microdélétion interstitielle
15q11-q13	Angelman	Syndromes de type monogénique Gène en cause : UBE3A	Microdélétion interstitielle
16p13.3	Rubinstein Taybi	Syndromes de type monogénique Gène en cause : CREBBP	Microdélétion interstitielle
17p13.3	Miller-Diecker	Syndromes de type monogénique Gène en cause : LIS1	Microdélétion subtélomérique
17p11.2	Smith-Magenis	Syndromes de type monogénique Gènes en cause : RAI1	Microdélétion interstitielle
17q11.2	Neurofibromatose de type 1	Syndromes de type multigénique Gènes en cause : NF1 (entre autres)	Microdélétion interstitielle
22q11.2	DiGeorge	Syndromes de type multigénique Gènes en cause : TBX1, N25, TUPLE1	Microdélétion interstitielle

V. 1. Microdélétion 22q11 :

La microdélétion 22q11 représente la deuxième cause de retard de développement et de cardiopathies congénitales après le syndrome de Down. Son incidence est estimée à 1/4000 naissances [21,22]. Cette délétion de 3Mb environ survenant *de novo* dans 90% des cas, a été mise en évidence dans plusieurs syndromes proches (syndrome de Di George, cardio-vélo-facial « VCF », cardiofacial de Cayler) [22, 23,24]. Une haplo-insuffisance impliquant une vingtaine de gènes est à l'origine des différents phénotypes. Les meilleurs candidats semblent être, le gène *HIRA* ou *TUPPLE 1* (Histone cell cycle Regulation. *Cerevisiaehomolog-like A*) et le gène *TBX1* (T-Box transcription Factor gene) ; facteurs de transcription exprimés durant le développement du cœur et des crêtes neurales.

V. 2. Syndrome de Williams-Beuren :

Le syndrome associé à la micro délétion 7q 23 a été décrit en 1961 par les cardiologues Williams et Beuren d'où l'appellation « **SWB** ». C'est une maladie génétique rare puisque l'incidence des formes typiques est de 1/20000 [25,26]. Une délétion de plus de 500 Kb sur la bande 7q11.23 a été mise en évidence. Cette microdélétion entraîne la perte mono allélique de 28 gènes dont les mieux connus sont les gènes *ELN*, *LIMK*[27,28]. Par ailleurs, il a pu être établi que l'hémizygotie des gènes *CYLN2*, *GTF2I* et *GTFIRD1* interviendrait dans le développement cardiofacial et donc dans le profil cognitif [26].

V. 3. Syndrome de Wolf-Hirschhorn:

Le syndrome du Wolf-Hirschhorn (WHS) est un syndrome poly malformatif assez rare avec une incidence de 1 pour 50000 naissances, touchant 2 filles pour un garçon [29,30]. Il résulte d'une délétion de taille variable du bras court du chromosome 4 (4p-) et est de ce fait considéré comme un syndrome de gènes contigus [31]. Une délétion de la région 4p16.3 est nécessaire pour la pleine expression du phénotype. La plus petite région de superposition des délétions observées dans le WHS (Aux régions critiques *WHSCR1-WHSCR2*), a été limitée à une région de 165 Kb encadrant les marqueurs D4S166 et D4S3327. Cette région contient une série de gènes impliqués dans le phénotype [32].

V. 4. Syndrome du Cri Du Chat ou monosomie 5p :

La délétion du bras court du chromosome 5(5p-) varie entre 5 et 40 Mb. son incidence dans la population générale est de 1/20 000 à 1/50 000 [33]. Lorsqu'elle inclut une région critique située en p15.2 d'environ 2 Mb, elle est responsable d'un syndrome bien caractérisé appelé le syndrome du cri du chat. Les premières observations cliniques datent de 1963. Le signe le plus remarquable est un cri plaintif aigu rappelant le miaulement d'un chaton. Ce dernier est présent au cours des premières semaines de vie [34,35].

De récentes études révèlent une haplo insuffisance impliquant des gènes contigus [34]. La délétion en 5p15.2 du gène *SEMAF* (Semaphorin F) responsable de la migration des neuromédiateurs [36] et du gène *CTNND2* (human δ -catenin) impliqué dans le développement neuronal seraient potentiellement associés au déficit intellectuel chez les patients [37]. La délétion du gène de la télomérase reverse transcriptase *hTERT* localisé en

5p15.33 pourrait contribuer aux manifestations phénotypiques observées chez les patients [38].

V. 5. Neurofibromatose de type 1:

La neurofibromatose de type 1 de Von Recklinghausen est une affection à transmission autosomique dominante, qui atteint une personne sur 3500. Elle est habituellement causée par une mutation dans le gène *NFI* mais environ 5-10% des cas sont le résultat d'une microdélétion en 17q11.2 [39]. Environ 80% des microdélétions *NFI* sont d'origine maternelle et ont une taille de 1,5 Mb [40] englobant le gène *NFI* et d'autres gènes contigus flanquant la région 17q11.2 [41]. Une haplo insuffisance impliquant six gènes (*SLC6A4*, *OMG*, *RHBDL4*, *ZNF207*, *CDK5R1*, et *ACCNI*) codant des protéines fortement exprimés dans le système nerveux central, semblent à l'origine du retard mental [42].

V. 6. Syndrome de Langer-Giedion :

Ce syndrome « SLG » de gènes contigus est dû à une délétion en 8q 24.11- q 24.12 d'environ 8.09 Mb. Parmi les gènes impliqués, on retrouve le gène *TRPS1* et *EXT1* qui semblent à l'origine du développement des exostoses. D'autres gènes délétés ont été retrouvés chez divers patients présentant le SLG comme le gène *MED30* (*THRAP6*) et le gène *SLC30A8* (*ZNT8*) codant pour un auto-antigène du diabète de type I rapportés dans quelques cas de LGS [43].

V. 7. Syndrome de Prader-Willi et syndrome d'Angelman :

Les syndromes de Prader-Willi « PWS » et d'Angelman « AS » sont des syndromes de gènes contigus, liés à la région chromosomique 15q11-q13. Ces gènes sont regroupés sur une distance de deux millions de paires de bases (2Mpb), ce qui représente environ la moitié de cette région [44]. Cette dernière fut la première pour laquelle le phénomène d'empreinte parentale a été démontré [45, 46]. Ce phénomène correspond à un processus biochimique de contrôle épigénétique de l'expression de certains gènes [47].

Le syndrome de Prader-Willi (PWS) est une maladie génétique rare dont l'incidence à la naissance est estimée à 1/25 000 [48,49]. Ce sont les médecins suisses A. Prader, H. Willi et A. Labhart qui ont les premiers décrit ce syndrome, en 1956 [50]. Le gène en cause est le « *small nuclear ribonucleoprotein N* » (*SNRPN*), localisé dans l'intervalle minimal du PWS [51].

Le syndrome d'Angelman « AS » est une maladie neurogénétique caractérisée par un déficit intellectuel sévère et des traits dysmorphiques. Il a été décrit pour la première fois en 1965 par le pédiatre anglais Harry Angelman. Sa prévalence mondiale est estimée de 1/20 000 à 1/10 000 [52,53]. Les enfants atteints ont une apparence normale à la naissance. C'est au cours de l'enfance qu'apparaissent les premiers signes cliniques caractéristiques du syndrome tels que : difficultés alimentaires, hypotonie, retard du développement, déficit intellectuel sévère, absence de langage... Le gène en cause est le gène « *UBE3A* ». L'hypopigmentation observée chez certains malades est liée au fait que

la délétion dans la région 15q11-q13 englobe le gène *OCA2* localisé près du gène *UBE3A*. Sa délétion complète est responsable des manifestations de l'albinisme [52].

Les mécanismes à l'origine de ces syndromes sont divers :

- ✓ délétions interstitielles touchant la région 15q11-q13 du chromosome 15, observées dans 70 % des cas : Lorsque la délétion concerne l'allèle paternel, il en résultera un PWS et si la délétion concerne l'allèle maternel, il en résultera un AS.
- ✓ Disomie uniparentale observée dans 25 % à 30 % des cas : Lorsque l'enfant reçoit les deux allèles maternels, il en résultera un PWS et si l'enfant reçoit les deux allèles paternels, il en résultera un AS.
- ✓ dans un très faible nombre de cas, on retrouve une mutation d'empreinte (1 à 2 %) non visible en FISH ou en biologie moléculaire, ou une translocation impliquant cette région du chromosome 15 : il s'agit de microdélétions indétectables en cytogénétique qui affectent un domaine appelé « centre de l'empreinte ». Ce domaine joue un rôle crucial dans le contrôle au niveau des gènes cibles de la région 15q11-q13 du mécanisme de l'empreinte. Ces anomalies sont souvent accidentelles et sporadiques et n'ont pas de risque de récurrence pour une autre grossesse ; les cas familiaux sont très rares. Le risque de récurrence est élevé dans les cas de mutation d'empreinte et de translocation si celles-ci sont transmises par le père [54].

V. 8. Syndrome de Rubinstein-Taybi :

Le syndrome de Rubinstein-Taybi « **RTS** » est une maladie génétique caractérisée par des anomalies congénitales, un déficit intellectuel et un comportement atypique. Sa prévalence est estimée à une personne sur 100 000 à 125 000 [26,55]. Le RTS est dû à une microdélétion au niveau du gène *CREBBP* (*CBP*), localisé sur la région p13.3 du chromosome 16 dont le rôle dans le développement du fœtus est encore mal connu. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une anomalie survenant « *de novo* ».

V. 9. Syndrome de Miller Dieker ou syndrome agyrie-pachygyrie :

Le syndrome de Miller Dieker ou syndrome agyrie-pachygyrie « **MDS** » est grave et aboutit au décès avant l'âge de deux ans. Son incidence est de 1 sur 100 000 naissances. Le MDS est dû à une délétion chromosomique située en 17p13.3 incluant le gène *LIS1*. La microdélétion est souvent un accident chromosomique *de novo* [56,57].

V. 10. Syndrome de Smith Magenis :

Le syndrome de Smith-Magenis « **SMS** » est une maladie génétique. Il a été décrit pour la première fois en 1982 par deux généticiennes, les Dr. Ann Smith et Hélène Magenis. Sa prévalence est estimée entre 1/15 000 et 1/25 000 sans différence ethnique mais il est probablement sous-diagnostiqué. Il touche aussi bien les garçons que les filles. Le SMS est typiquement dû à la survenue *de novo* soit d'une délétion 17p11.2 (90 %) emportant le gène *RAI1*, soit d'une mutation du gène (10 %). Cette

microdélétion contient plusieurs gènes (25 à 40 gènes selon les cas). On parle donc d'un syndrome des gènes contigus. Les gènes perdus ne sont pas encore tous identifiés [58,59].

V. 11. Syndrome de Phelan Mc Dermid :

La monosomie 22q13 résulte le plus souvent d'une délétion de 70 Kb à 10Mb intéressant la bande terminale 22q13 [60]. Plus rarement, la délétion 22q13 est liée à des translocations déséquilibrées ou encore à un chromosome en anneau [61].

V. 12. Syndrome de Mowat Wilson :

C'est l'association fréquente de cette anomalie à la maladie d'Hirschprung qui a permis le diagnostic d'une centaine de cas pour la délétion 2q22-q23. Les études moléculaires de cette délétion hétérozygote ont mis en cause le gène *ZEB2* (Zinc finger E-box-binding homeobox 2), appelé auparavant *ZFH1B* (SIP1) responsable de l'ensemble des signes cliniques de cette entité syndromique et de sa variabilité [62].

V. 13. Délétion 1p36 :

Le syndrome de délétion 1p36 représente un des plus fréquents syndromes microdélétionnelstélomériques, avec une prévalence estimée de 1/5 000 [63]. La délétion souvent non visible sur le caryotype est de taille variable allant de 1,5 à 10,5 Mb. Elle est le plus souvent pure et terminale mais peut également être interstitielle (7 %) ou résulter d'une translocation déséquilibrée (15 %) [63]. A ce jour aucune zone critique ni aucun gène n'a pu être mis en cause et la monosomie 1p36 est donc considérée comme un syndrome de gènes contigus [64].

V. 14. Syndrome saethre-chotzen:

Ce syndrome a été baptisé du nom de deux médecins qui, indépendamment, l'ont rapporté au début des années 30 ; il s'agit de Haakon Saethre, un psychiatre norvégien, et de F. Chotzen, un psychiatre allemand (65, 66). Le syndrome de Saethre-Chotzen ou « SCS » résulte d'une fusion prématurée de la suture coronale ou lambdoïdal. Il se produit avec une fréquence d'un cas pour 25,000-50,000 nouveau-nés. Il est de transmission autosomique dominante, et est le résultat d'une mutation du gène *TWIST1* sur le chromosome 7p21 (67), ou de microdélétions comportant le gène *TWIST1* entier (68,69). Ce dernier joue un rôle clé dans le développement précoce du crâne, du visage et des membres. Les signes et les symptômes du SCS varient considérablement, même parmi les personnes affectées dans la même famille. Les signes cliniques les plus fréquents chez plus d'un tiers des patients incluent : synostose coronale, brachycéphalie, implantation basse des cheveux, asymétrie faciale, hypertélorisme, élargissement des gros orteils, et clinodactylie(67).

MATERIEL
ET
METHODE

MATERIEL ET METHODE

Notre travail est une étude rétrospective et perspective qui concerne 622 patients adressés au laboratoire d'hormonologie, unité de Cytogénétique du Centre Pierre et Marie Curie, pour retard mental, dysmorphie et/ ou retard psychomoteur.

Notre étude consistait donc en l'évaluation clinique et cytogénétique des dossiers des différents patients reçus sur une période de 4 ans et 3 mois (Janvier 2010- Mars 2015) ; à la recherche de cas de syndromes microdélétionnels avérés qui sont l'objet de notre mémoire.

Notre travail a nécessité l'étroite collaboration de nombreux cliniciens référents et de généticiens.

I. Recrutement des patients :

L'unité de cytogénétique reçoit des patients envoyés pour consultation génétique, afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic posé par le praticien spécialiste, ou alors de déceler l'anomalie chromosomique à l'origine du retard mental.

Les critères cliniques de sélection de nos patients reposent essentiellement sur la présence d'un retard mental mais aussi sur d'autres critères établis par De Vries[70] énumérés ci-après:

- ✓ Antécédents familiaux de retard mental rapportés par les parents du patient lors de la consultation génétique.
- ✓ Retard staturo-pondéral.
- ✓ Retard psychomoteur (retard des acquisitions)
- ✓ Malformations congénitales : cardiopathies, anomalies viscérales, malformations génitales...etc.
- ✓ Crises convulsives.
- ✓ Troubles comportementaux : agressivité, stéréotypie...etc.
- ✓ Troubles alimentaires et troubles du sommeil.

Il est important de préciser que les examens biochimiques des patients retenus pour une analyse cytogénétique n'ont révélés aucune anomalie, excluant ainsi une étiologie métabolique au retard mental. Cependant l'imagerie médicale et autres examens cardiologiques et neurologiques ont aidé à compléter le tableau clinique et ainsi à mieux orienter le clinicien généticien dans son choix diagnostique.

II. Matériel :

I.1. Matériel biologique :

Le protocole utilisé au sein du laboratoire d'hormonologie, unité de cytogénétique du Centre Pierre et Marie Curie, concerne uniquement le prélèvement de sang veineux périphérique. Le prélèvement est accompagné du canevas (**Annexe 1**) qui est constitué des différents formulaires de demande d'examen cytogénétique. 5 ml de sang veineux périphérique sont prélevés stérilement dans un tube contenant de l'héparinate de lithium. Le sang peut être conservé 15 jours au réfrigérateur (+4°C).

II. 2. Matériel non biologique :

I.2.1. Milieux de culture :

Nous avons utilisé divers appareils, de la verrerie, des réactifs et des solutions qui sont compilés dans les **l'annexe 2 et 3**. Concernant la culture cellulaire, nous avons utilisé différents milieux de culture dont la composition et la préparation seront résumées dans ce qui suit.

- **Milieu TC 199 :**

Le TC 199+ Glutamax complet sera utilisé dans la préparation des milieux de culture des lymphocytes. Pour ce faire, il faut mélanger dans un flacon stérile 50 ml de TC, 12.5 ml de sérum de veau fœtal et 313 µl de pénicilline/streptomycine. Le milieu TC complet peut être conservé à +4°C (pour 7 tubes).

- **Milieu RPMI:**

Ce milieu est obtenu en mélangeant 50 ml du milieu RPMI à 10 ml de sérum de veau, 1 ml de pénicilline/streptomycine et 5 ml de L-glutamine. Le milieu RPMI complet est conservé à +4°C (pour 7 tubes).

- **Préparation des tubes pour la mise en culture :**

Dans un Erlen Meyer stérile contenant un barreau aimanté, 120 ml de milieu TC complet, 0,25 ml de phytohémagglutinine P, 0,6 ml de phytohémagglutinine M et 0,2 ml d'héparine sont mélangés. Un second Erlen Meyer est utilisé pour mélanger 120 ml de milieu RPMI complet, 0,25 ml de phytohémagglutinine P, 0,6 ml de phytohémagglutinine M et 0,2 ml d'héparine.

Le contenu des Erlen Meyer est homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant au moins 5 minutes. Sous hotte à flux laminaire, préparer 2 fois 15 tubes coniques de 15 ml, puis répartir 8 ml par tube du contenu des Erlen Meyers. Les tubes sont fermés hermétiquement et conservés à +4°C au moins une heure avant la mise en culture. Les tubes sont préparés le jour de la mise en culture et peuvent être conservés une semaine à +4°C.

III. Méthodes :

La cytogénétique classique est basée sur l'analyse de la constitution chromosomique de l'individu à la recherche d'anomalies chromosomiques de nombre et de structure. L'outil le plus courant dont elle dispose est le caryotype développé vers la fin des années 50 [71].

Cependant la résolution de ce dernier demeure insuffisante pour la détection des microremaniement dont la taille est inférieure à 5 MB d'où l'intérêt de faire appel à une technique de cytogénétique moléculaire qui est l'hybridation in situ par fluorescence FISH indispensable pour le diagnostic des syndromes microdeletionnels

III. 1. Culture cellulaire :

La culture cellulaire est commune à la réalisation du caryotype standard et de la FISH. Le protocole s'étale sur plusieurs jours, les étapes sont résumées dans ce qui suit :

- **Premier jour, mise en culture :**

Cette étape de la technique demande des conditions de stérilité parfaites. En effet, des microorganismes pourraient altérer la culture cellulaire. Le travail se fait sous hotte, avec port de gants stériles. Dans les tubes coniques préalablement préparés (Étiquetés : nom et prénom, date du prélèvement), ajouté 700µl de sang du patient (pour chaque patient, 2 tubes coniques sont préparés). Le contenu des tubes sont homogénéisés par retournement, puis incubés en position inclinée à 37°C pendant 48h.

- **Deuxième jour, synchronisation :**

Cette étape sert à stopper la division cellulaire au-delà d'un certain stade, en l'occurrence le milieu de la phase « S ». Cet arrêt va permettre aux cellules de rejoindre les premières dans leur développement. Ainsi toutes les cellules sont bloquées en milieu de la phase de réplication. La synchronisation se fait sous hotte à flux laminaire en rajoutant dans chaque tube 500µl de FrdU (Formo-Déoxy-Uridine) qui agit alors sur la thymidine synthétase, enzyme intervenant dans la transformation de l'uridine en thymidine monophosphate. Le contenu des tubes sont homogénéisés par retournement, puis incubés à 37°C.

- **Troisième jour:**

Dans un premier temps la croissance est relancée par ajout de 100µl de thymidine dans chaque tube, ceci permettra la reprise du cycle cellulaire. Le contenu des tubes sont homogénéisés par retournement, puis incubés à 37°C pendant 5h.

Dans un deuxième temps, la division cellulaire est bloquée par ajout 65µl de Colcemid®, Ce dernier étant équivalent synthétique de la colchicine. La colchicine est un agent antimitotique, agissant en inhibant la polymérisation des microtubules nécessaires à l'édification du fuseau mitotique, et empêche ainsi l'évolution de la mitose vers l'anaphase. Le contenu des tubes sont homogénéisés par retournement, puis incubés à 37°C pendant 1h, durant laquelle il faut préparer le sérum de choc.

- **Choc hypotonique :**

Après l'incubation, les tubes sont agités à l'aide d'un vortex, puis centrifugés à 1200 tr/min pendant 8 minutes. Le surnageant est éliminé puis remplacé par le sérum de choc (sérum hypotonique). Ce dernier étant moins concentré que le cytoplasme cellulaire, va provoquer la turgescence puis l'éclatement des cellules. Ainsi à la fin du choc, il ne reste plus que les débris cytoplasmiques et les chromosomes jusqu'alors présents dans les noyaux des lymphocytes.

Le contenu des tubes est homogénéisé vigoureusement à l'aide d'une pipette pasteur (jusqu'à apparition d'une mousse) puis à l'aide d'un vortex. Les tubes sont remis dans l'étuve pendant 15 minutes à 37°C, mais sans mettre le bouchon. Durant ce temps, il faut préparer le fixateur « Carnoy ».

▪ **Préfixation :**

Après avoir sorti les tubes de l'étuve, ajouter 2ml de Carnoy dans chaque tube et vortexer. Le Carnoy permet l'arrêt du choc hypotonique par acidification du milieu. Il est composé d'un mélange d'acide acétique et de méthanol (1V/3V). Les tubes sont centrifugés à 1200tr/min pendant 4minutes, afin d'obtenir un culot blanchâtre contenant le matériel biologique.

- **Fixation :**

Le surnageant de chaque tube est éliminé puis remplacé par le Carnoy. Le mélange est vortexé puis centrifugé à 1200tr/min pendant 4 minutes. La fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique préserve les chromosomes d'une détérioration que les étapes suivantes (étalement, coloration, observation) risquent d'entraîner. Cette étape est répétée 3 fois. Les tubes sont conservés à une température de -20°C jusqu'à étalement.

III. 2. Caryotype standard :

Le caryotype est la représentation obtenue par microphotographie de l'aspect morphologique de l'ensemble des chromosomes d'une cellule en métaphase. Son obtention nécessite une culture cellulaire à partir de prélèvements biologiques comme le sang, le liquide amniotique ou encore les villosités chorales en période prénatale. Un blocage des cellules en métaphase et un choc hypotonique permettant la dispersion des chromosomes. Enfin, des méthodes de dénaturation avant coloration permettent d'obtenir un marquage en bandes [71]. Le protocole est le suivant :

- **Etalement :**

Des lames sont plongées dans un bac rempli d'eau distillée, puis conservées à -20°C. Le surnageant est éliminé, le culot accompagné d'une petite quantité de Carnoy par-dessus est gardé. Le culot est homogénéisé délicatement à l'aide d'une pipette pasteur. Après avoir marqué les lames au nom du patient, 2 gouttes de cette préparation sont déposées sur la lame. Ceci permettra d'éclater les membranes fragilisées, libérant ainsi les chromosomes qui restent toutefois groupés. Le surplus de liquide est éliminé à l'aide de papier absorbant. Les lames sont incubées à température ambiante, sur un plateau recouvert d'un papier filtre, durant une nuit.

Il faut compter 2 lames par patient pour un caryotype standard, 2 à 3 lames par patient pour un caryotype à haute résolution et 1 lame pour la FISH.

- **Dénaturation :**

Pour obtenir un caryotype en bandes R, la chromatine est dénaturée par la chaleur. Les lames sont d'abord rincées à l'eau distillée avant d'être placées dans une boîte à coloration de Hellendhal remplie de tampon Earl à pH 6,5. Ce dernier est plongé dans un bain marie à 87°C pendant 20 minutes. Pour arrêter la dénaturation, les lames sont ensuite rincées avec l'eau distillée froide.

- **Coloration :**

Une simple coloration au Giemsa permet de compter et de classer les chromosomes en fonction de leur taille et de leur indice centromérique. Les méthodes de marquage ou «

banding » révèlent le long des chromosomes une alternance de bandes transversales, faiblement ou fortement colorées, dont la disposition topographique est spécifique de chaque paire chromosomique. Pour ce faire, il faut plonger les lames dans le colorant Giemsa préalablement préparé (3ml de tampon phosphate à pH 6,7 et 3ml de Giemsa, qu'on ajuste jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée), pendant 18 minutes. Les lames sont rincées à l'eau du robinet puis séchées à l'air libre.

▪ **Lecture :**

La qualité de marquage des chromosomes est contrôlée, à l'aide d'un microscope optique, en observant à faible grossissement (x10). Il faut repérer les mitoses puis ajouter de l'huile d'immersion et passer au fort grossissement (x100). La capture se fait par un logiciel d'acquisition d'image méta système IKAROS.

III. 1. Hybridation *in situ* fluorescente :

Le principe de l'hybridation *in situ* fluorescente « FISH » met à profit la propriété d'hybridation des acides nucléiques. Elle repose sur l'association spécifique d'une molécule d'ADN simple brin marquée (sonde) avec sa séquence complémentaire ; l'acide nucléique cible étant dans sa situation originelle au sein d'un chromosome en métaphase ou dans la chromatine du noyau en interphase (cible) [72]. Après une étape de culture cellulaire, les sondes spécifiques de la région à étudier, sont dénaturées (cas des sondes d'ADN double brin) et hybridées sur les deux chromosomes partenaires de l'hybridation ayant été rendus monocaténares. Une ultime étape consiste à révéler l'hybridation de manière directe ou indirecte grâce à des protéines spécifiques (molécules « signal ») couplées à des fluorochromes et à la contre-coloration du support chromosomique en utilisant le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) comme fluorophore. Les lames hybridées sont lues avec un photomicroscope à épifluorescence équipé de filtres spécifiques aux différents fluorochromes, et couplé à une caméra de capture d'image [73]. Le Protocole de la FISH est le suivant:

- **Préparation de la lame échantillon :**

L'échantillon cellulaire, issu de la culture précédemment décrite, est déposé sur une lame propre puis est laissé sécher. La lame est plongée dans du SSC 2x pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation. Une déshydratation est réalisée suite à une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante. Laisser sécher.

- **Pré-dénaturation :**

La sonde, conservée à -20°C , est décongelée à température ambiante, puis homogénéisée. 10 μl sont prélevés et placés dans un micro-tube à centrifugation. La lame échantillon et la sonde sont préchauffées sur une plaque chauffante à 37°C pendant 5 minutes. La sonde est déposée sur la lame échantillon puis couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

- **Dénaturation :**

La dénaturation de la sonde et l'échantillon se fait simultanément en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) pendant 2 minutes.

- **Hybridation :**

Elle repose sur la propriété d'association spécifique des acides nucléiques avec des bases complémentaires. L'hybridation de la sonde est spécifique à sa séquence cible, selon des conditions précises de température, de salinité et de pH. Pour ce faire, incuber la lame pendant une nuit à 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

Dans **la figure 3** un exemple de sonde utilisée dans la FISH pour mettre en évidence des microdélétions à l'origine du syndrome.

- **Lavages post-hybridation :**

Les lames sont lavées, en premier lieu, dans du tampon SSC 0.4x pH 7.0 à 72°C pendant 2 minutes, et en deuxième lieu dans du tampon SSC 2x, 0.05% Tween-20 pH 7.0 à température ambiante pendant 30 seconde sans agitation. Les lames sont séchées, puis on applique 10 μl de DAPI sur chaque échantillon. Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

- **Stabilité des lames :**

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et /ou au-dessous de la température ambiante.

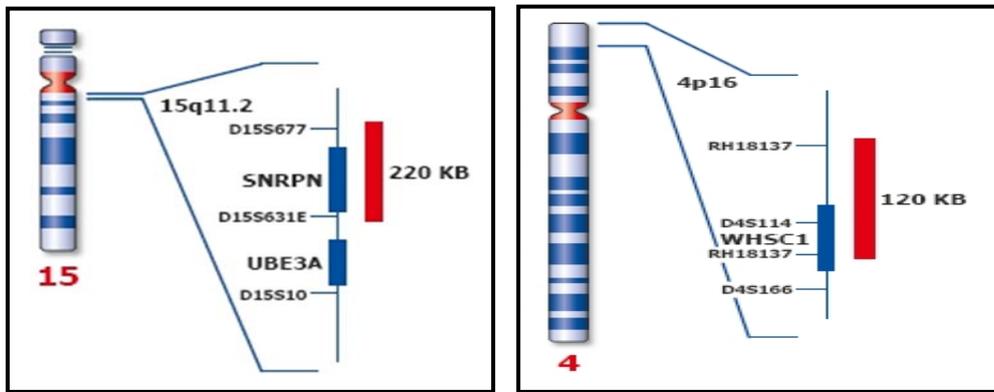


Figure 3 : Exemple de sondes utilisées dans la FISH.

A. Sonde Kreatech® “SNRPN” utilisée pour le diagnostic du syndrome de Prader-Willi.

B. Sonde Kreatech® “WHSCR 1” utilisée pour le diagnostic de Wolf Hirschorn

RESULTATS
ET
DISCUSSION

I. Origine géographique des patients :

Notre cohorte comporte 622 patients avec RM et dont le recrutement s'est fait par des neurologues, pédiatres et psychiatres répartis sur tout le territoire national (Alger, Blida, Médéa, Boumerdes, Tizi Ouzou, Bejaïa, Ain Defla, Chlef, Sétif, Oran, Skikda, M'sila Biskra, Ouargla...etc).

Parmi les 622 patients présentant le RM, il y a 124 suspicions de syndromes microdeletionnels. Notre étude portera uniquement sur les syndromes microdeletionnels suspects

La **figure 4**, nous permet de constater que les patients sont majoritairement originaires du centre avec un pourcentage de 63.18%. Quant à l'origine du reste des patients, celle-ci ne représente que 36.82% (Est, Ouest et Sud confondus). Ces chiffres reflètent un biais de recrutement et non une concentration plus élevée de RM dans le centre comparativement au reste du pays.

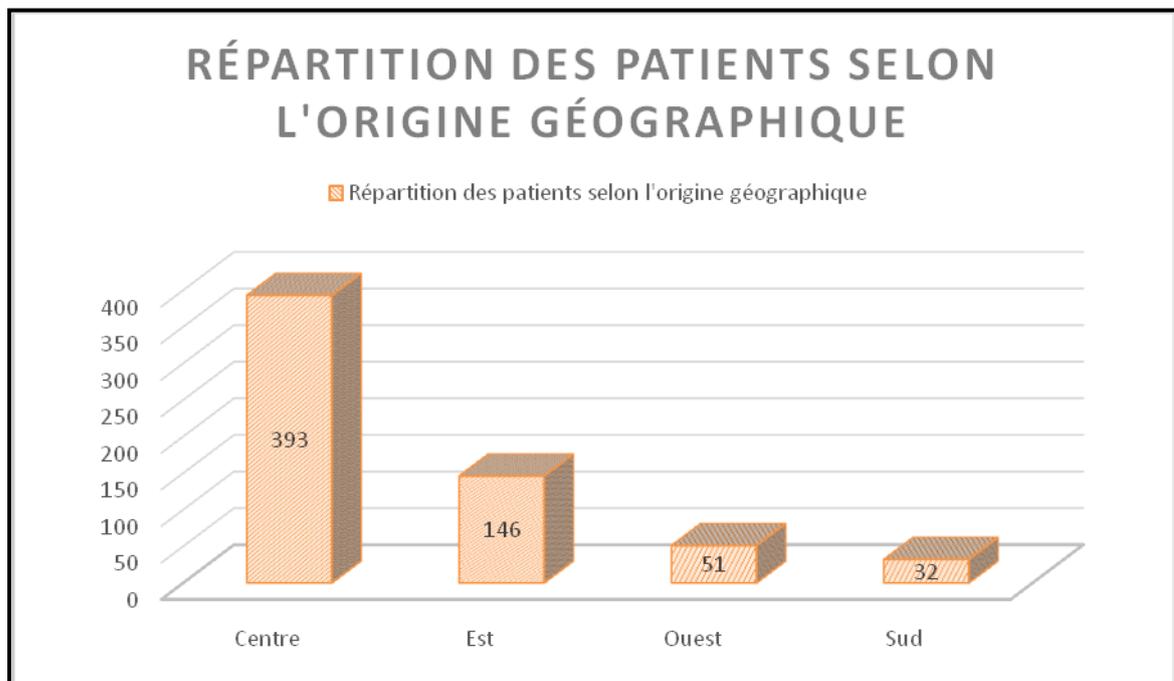


Figure 4 : Répartition des patients selon l'origine géographique.

II. Caractéristiques démographiques des patients :

II. 1. Répartition des patients selon le sexe :

Le ratio homme/femme de notre cohorte est de 1,14 avec 331 patients de sexe masculin et 291 de sexe féminin (**Figure 5**). Cette légère prédominance masculine reflète une incidence plus élevée chez l'homme par rapport à la femme concernant certaines maladies, entre autres : les maladies liées à l'X, la trisomie 21 (syndrome de Down) et certains syndromes microdélétionnels. Ces données concordent avec ce qui a été décrit dans la littérature (74), concernant la trisomie 21, où le ratio H/M est de 3/2.

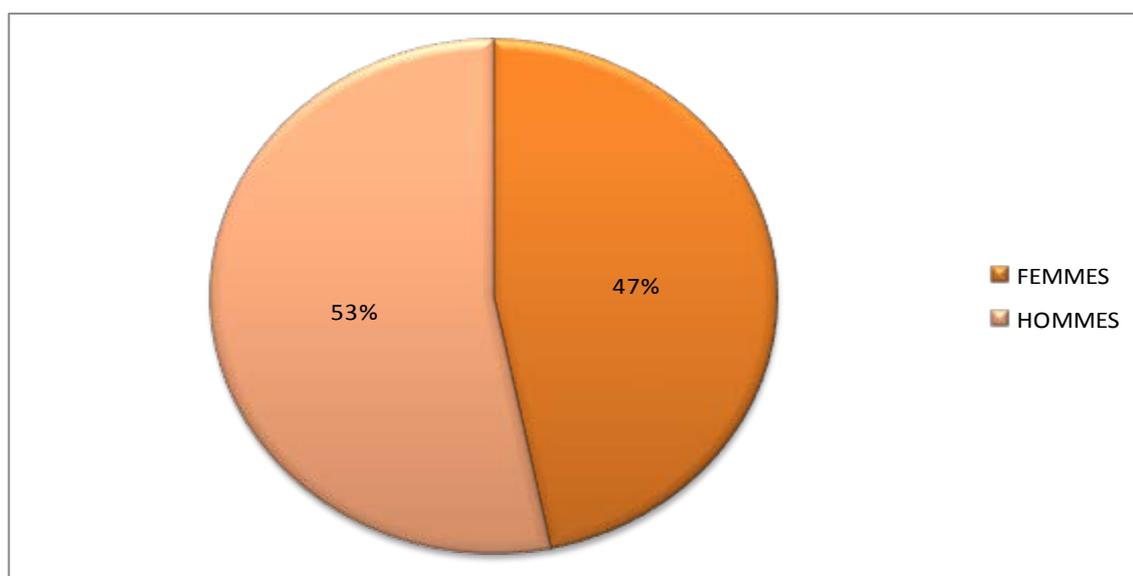


Figure 5 : Répartition des patients selon le sexe.

II. 2. Répartition des patients selon l'âge :

L'âge moyen de nos patients est de 6 ans et 4 mois. Le patient le plus âgé auquel on a eu affaire avait 30 ans, et le plus jeune en avait à peine un mois (**Figure 6**). L'analyse de l'histogramme révèle que plus de la moitié de nos patients (53,38 %) consultent à un âge relativement précoce. Ceci étant dû à l'attention particulière portée à l'enfant aussi bien par les parents que par le personnel éducatif des crèches. Grâce à cette vigilance, les enfants peuvent être rapidement diagnostiqués, ce qui permet une prise en charge dans les meilleurs délais et donc assurera une meilleure qualité de vie à l'enfant.

Les enfants dont l'âge est compris entre 5 et 10 ans représentent 30,71 % de notre cohorte. A cet âge-là, l'enfant devrait normalement créer des liens avec les autres enfants, mais au lieu de ça il rencontre des difficultés d'adaptation sociale et scolaire qui peut constituer des motifs de consultation.

Les deux tranches d'âges restantes, à savoir 10-15 ans et 15 ans et plus représentent respectivement 9,81 % et 6,11 %. Ces chiffres reflètent la difficulté de poser un diagnostic en raison des moyens limités disponibles en Algérie en plus des difficultés d'accès à ce type d'examen.

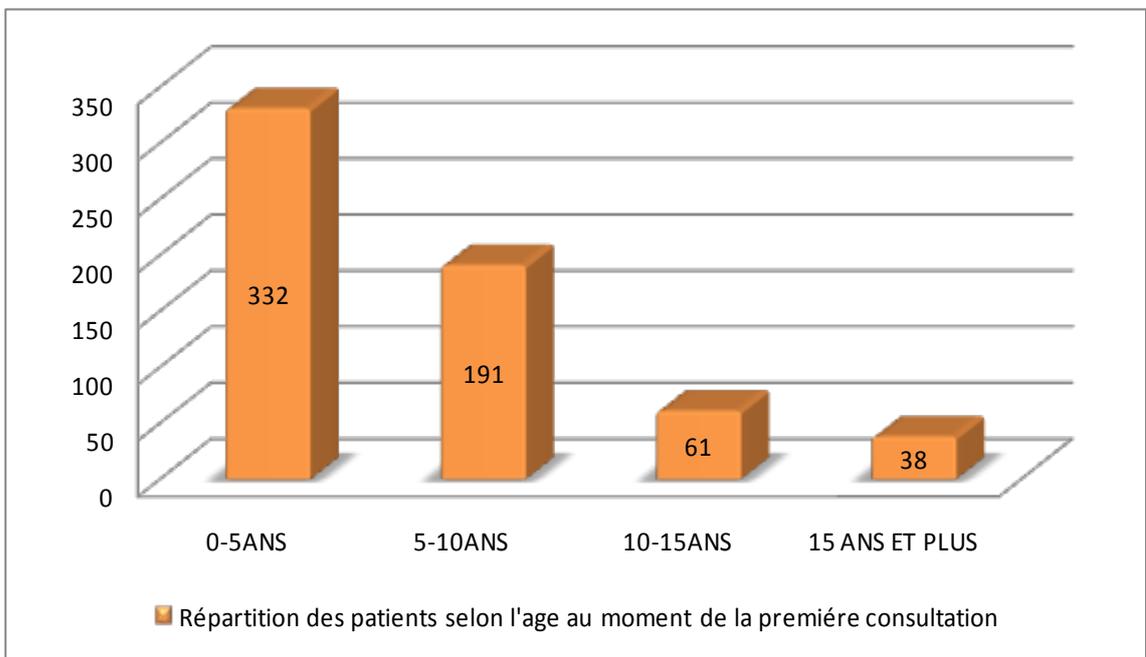


Figure 6 : Répartition des patients selon l'âge.

III. Analyse cytogénétiques :

Le caryotype standard a été effectué pour l'ensemble des patients adressés au service, avec (303/622 ; 48.8%) ou sans orientations cliniques précises (319/622 ; 51.3%). Cette analyse a révélé 191/622 soit 30.7% de caryotypes pathologiques. En effet, nous avons mis en évidence des trisomies 21 (175/191 ; 91.6%) qui représentaient la quasi-totalité des caryotypes pathologiques, des trisomies 18 (4/191 ; 2.1%), des tétrasomies (3/191 ; 1.6%), des duplications (3/191 ; 1.6%), des translocations (2/191 ; 1.04%) et des chromosomes en anneau (4/191 ; 2.1%) (Tableau II et tableau III).

Tableau II : Répartition des résultats du caryotype standard selon l'orientation clinique.

	Orientation clinique	Sans orientation clinique	Total (n, %)
Caryotype non pathologique	124	307	<u>431</u>
Caryotype pathologique	179	12	191
Total (n, %)	303 (48.8%)	319 (51.3%)	622

Répartition des résultats de la FISH pour les caryotypes normaux.

Nous allons réaliser une FISH sur 431 patients avec un caryotype non pathologique, on a obtenu les résultats suivantes : 402 patients normale avec une formule chromosomique 46, XX ou 46, XY et 29cas pathologiques.

IV. Apport de la FISH dans le processus diagnostique des syndromes microdélétionnels :

Devant un caryotype normal et une clinique en faveur d'un syndrome microdélétionnel donné, une analyse par FISH s'imposait, afin de mettre en évidence le microremaniement à l'origine de la pathologie. La population concernée est composée de 124 patients, pour lesquels une orientation clinique précise en faveur d'un syndrome a été donnée. La FISH a révélé 29 cas de microdélétions(**Tableau III**).

Tableau III :Microremaniements identifiés par FISH chez 124 patients adressés pour suspicion de syndrome microdélétionnel.

Syndromes microdélétionnels	Locus	Orientation clinique pour une FISH	Résultat de la FISH
Prader-Willi	15q11-q13	23	10 MD
Angelman	15q11-q13	12	03 MD
DiGeorge	22q11.2	22	03 MD
Williams et Beuren	7q11.23	12	03 MD
Miller-Diecker	17p13.3	02	00 MD
Rubinstein Taybi	16p13.3	05	00 MD
Cri du chat	5p15.2	06	03 MD
Smith-Magenis	17p11.2	09	01 MD
Wolf Hirschhorn	4p16.3	07	03MD
Phelan Mc Dermid	22q13	09	01 MD
Sotos	5q35	12	01 MD
1p36	1p36	04	00 MD
Saethre-chotzen	7p21.1	01	01 MD
Total (n, %)		124	<u>29</u>

Ces chiffres mettent la lumière sur l'efficacité de cette approche diagnostique, estimée à (23.39%). Une valeur supérieure à celle retrouvée dans la littérature qui est de 20%(75). Le tableau ci-dessus met aussi clairement en évidence les limites de la FISH qui reste tout de même une technique ciblée nécessitant une orientation clinique pertinente et une connaissance préalable de ce que l'on recherche. Toutefois l'absence d'informativité de la FISH pour (76.61%) cas de suspicion de microremaniements syndromiques ne doit pas systématiquement remettre en cause la fiabilité et l'efficacité de la FISH ni même les compétences du clinicien généticien dans l'orientation de celle-ci. L'hypothèse d'un remaniement cryptique non décelable par FISH ou encore des pathologies incriminant un seul gène doit être évoquée devant un tel résultat.

Même si le diagnostic des syndromes microdélétionnels a bénéficié d'extraordinaires progrès techniques, l'expertise clinique à l'affût de petits signes d'orientation, reste essentielle pour le choix des examens nécessaires au diagnostic étiologique.

Notre étude souligne également la fréquence des syndromes de Prader-Willi et de DiGeorges qui constituent une grande partie des demandes d'examens cytogénétiques. Ces derniers reviennent positifs dans 28,89 %. Ceci confirme le caractère sporadique des syndromes microdélétionnels et leur importance en termes de fréquences qui en fait un véritable problème de santé publique d'autant plus que la prise en charge de ces maladies chroniques et invalidantes est coûteuse.

D'après les résultats obtenus, 29 cas présentaient une microdélétion sur différentes chromosomes qui sont responsables au plusieurs syndromes (**Tableau IV**)

Tableau IV : Diagnostic final des 29 cas de microdélétions.

Patient	Diagnostic clinique suspecté	Délétion	Diagnostic après FISH
P1	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P2	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P3	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P4	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P5	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P6	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P7	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P8	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P9	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P10	Praderwilli	15q11-q13 (SNRPN)	Praderwilli
P11	Angelman	15q11-q13 (UBE3A)	Angelman
P12	Angelman	15q11-q13 (UBE3A)	Angelman
P13	Angelman	15q11-q13 (UBE3A)	Angelman
P14	Di George	22q11.2	Di George
P15	Di George	22q11.2	Di George
P16	22q11 ou 22q13	22q11.2	Di George
P17	T21	7q11.23	Williams-Beuren
P18	Williams-Beuren	7q11.23	Williams-Beuren
P19	Williams-Beuren	7q11.23	Williams-Beuren
P20	Cri Du Chat	5p15.2	Cri Du Chat
P21	Cri Du Chat	5p15.2	Cri Du Chat
P22	T18	5p15.2	Cri Du Chat
P23	Smith Magenis	17p11.2	Smith Magenis
P24	Wolf Hirschorn	4p16.3	Wolf Hirschorn
P25	Wolf Hirschorn	4p16.3	Wolf Hirschorn
P26	Wolf Hirschorn	4p16.3	Wolf Hirschorn
P27	22q13 ou 22q11	22q13	Phelan Mc Dermid
P28	Sotos	5q35	Sotos
P29	Williams-Beuren	7p21.1	Saethrehotzen

IV. Le syndrome de Prader-Willi

Le syndrome de Prader-Willi a été diagnostiqué pour 10 patients (P1, P2 ; P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10), dont 04 de sexe féminin et 06 de sexe masculin. Ces individus présentaient un phénotype typique du syndrome de Prader-Willi. En effet, leur

morphologie est caractéristique (lèvre supérieure assez fine, yeux en amande, anomalies génitales), ils présentent une hypotonie, des infections respiratoires, des troubles alimentaires, une obésité (et ses complications), des troubles de la croissance, des troubles musculaires, une perturbation du développement pubertaire, des difficultés d'apprentissage. Sont présents aussi des troubles du sommeil, des problèmes visuels, une tendance à se gratter de façon excessive, des problèmes de régulation de la température du corps, des problèmes dentaires, une sensibilité moindre à la douleur ainsi que des convulsions[76].

L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure rejetant ainsi l'hypothèse diagnostique. En effet la formule chromosomique montre la présence de 46 chromosomes. Devant une clinique en faveur d'un PWS et un caryotype normal, une FISH a été réalisée afin de s'assurer du diagnostic. Elle s'est faite sur des mitoses métaphasiques de lymphocytes du patient. Une sonde locus spécifique a été utilisée. Cette dernière donne un signal rouge pour la région critique 15q11 incriminée dans le PWS. La sonde 15q24 (PML : ProMyelocytic Leukemia probe) y a été ajoutée pour faciliter l'identification du chromosome, elle donne un signal vert, c'est la sonde témoin.

La présence de deux signaux verts indique que le patient possède les deux chromosomes constituant la paire d'autosome N°15. Quant à la présence uniquement d'un seul signal rouge nous renseigne sur l'absence de la région *SNRPN* au niveau du chromosome 15 n'ayant pas de signal (**Figure 7**). La formule chromosomique de cette FISH est : **46, XY. ish Del (15) (q11) (SNRPN⁻)**. On en conclut donc que le patient est effectivement atteint du PWS et a comme étiologie une microdélétion au niveau de la région q11 du chromosome 15. Cette dernière est retrouvée dans 70% des cas de PWS.

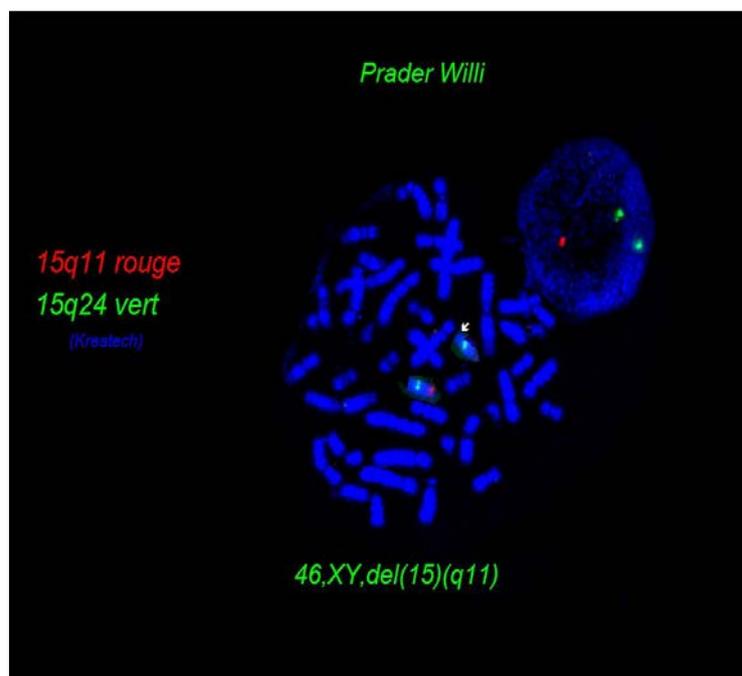


Figure 7 : Résultat d'une FISH illustrant la délétion 15q11

Les individus avec un PWS dont l'origine est une microdélétion ont au niveau de la région 15q11.2-q13 un des deux points de cassures proximaux BP1 ou BP2 (breakpoint) et un point de cassure distal BP3. Ceci étant dû à la présence d'extrémités de la région délétée, ce qui peut entraîner une recombinaison aberrante du LCR flanquant les deux segments durant la méiose. Les sujets atteints de la délétion de type 1, à savoir BP1 à BP3 sont atteints d'une forme de PWS plus sévère que ceux atteints de la délétion de type 2 (BP2 à BP3).

Concernant le rôle de chaque gène délété dans la maladie, le débat reste ouvert sur l'implication du gène *SNRPN* dans le déterminisme phénotypique du PWS. Quant aux autres gènes, la recherche en est encore au stade de suppositions :

➤ Le gène *NECDIN* est probablement impliqué dans le phénotype du SPW. Il s'exprime dans les tissus neuronaux différenciés, en particulier au niveau hypothalamique, et son expression n'est pas retrouvée chez les sujets atteints du PWS.

➤ *MAGEL 2* est un gène de la même famille que *NECDIN* et code pour une protéine qui s'exprime dans le système nerveux central.

➤ Les gènes codant pour les petits ARN nucléolaires (snoARN) pourraient jouer un rôle majeur par leur propriété de modifier les isoformes de certains récepteurs de la sérotonine et leur expression génique [77].

IV. 2. Angelmen :

Le syndrome d'Angelmen a été diagnostiqué pour 3 patients (P11, P12, P13) dont 01 de sexe féminin et 02 de sexe masculin qui présentaient un phénotype caractéristique du SA. En effet, les enfants atteints ont une apparence normale à la naissance, puis commencent à apparaître des difficultés alimentaires, une hypotonie, un retard du développement, un déficit intellectuel sévère, une absence de langage, des éclats de rires avec battements des mains, une microcéphalie, une macrostomie, une hypoplasie maxillaire, un prognathisme, une hypopigmentation irienne et choroïdienne, des troubles locomoteurs, des troubles neurologiques avec démarche « en pantin », une ataxie et crises épileptiques, une hyperactivité sans agressivité, une attention réduite, une hyperexcitabilité, des troubles du sommeil (moindre besoin de sommeil), une hypersensibilité à la chaleur, ainsi qu'une attraction et une fascination par l'eau (49).

Leur caryotype était non pathologique le nombre et la structure des chromosomes étaient d'apparence normale. Devant la présence de signes évoquant le phénotype clinique du syndrome d'Angelman, le clinicien généticien a orienté le diagnostic dans ce sens. Une analyse ciblée par FISH en utilisant deux sondes, l'une spécifique de la région critique du AS correspondant au locus 15q11-13 marquée par un fluorochrome rouge et une autre sonde spécifique de la région télomérique du chromosome 15, utilisée comme témoin et marquée en vert. Les résultats montrent (**Figure8**) :

- la présence de deux signaux verts correspondant aux deux chromosomes de la paire 15.
- la présence d'un seul signal rouge indiquant la présence d'une délétion du locus 15q11-13 compatible avec le syndrome d'Angelman.

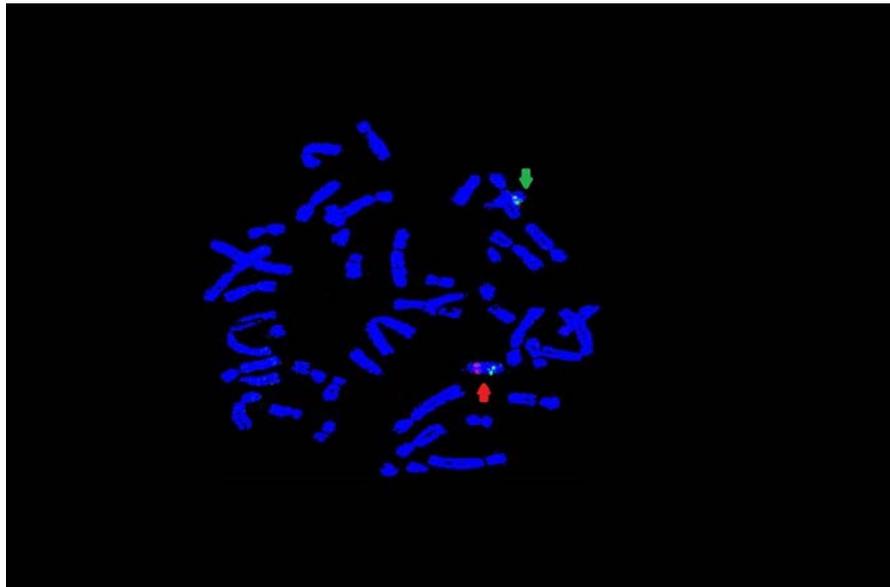


Figure 8 : Résultat d'une FISH illustrant la délétion 15q11

IV. 3. Di George :

Le syndrome de DiGeorge a été diagnostiqué pour 3 patients (P14, P15, P16) qui présentaient un phénotype caractéristique. En effet, une dysmorphie faciale comparable, une cardiopathie de type conotruncale (tétralogie de Fallot, interruption de l'axe aortique), un possible retard des acquisitions sont observés [47, 11, 46].

Le phénotype le plus récurrent est le syndrome de Di Georges, caractérisé par une anomalie du développement des 3^{ème} et 4^{ème} arcs branchiaux, responsables du développement des gros vaisseaux du cœur, du thymus, des parathyroïdes ce qui expliquerait son expression variable. Il associe le plus souvent un faciès particulier avec un nez tubulaire saillant à la racine et des oreilles rondes et décollées ; une cardiopathie congénitale ; une agénésie thymique et une absence de parathyroïdes entraînant une hypocalcémie souvent transitoire [46]. Des anomalies néphro-urologiques ainsi qu'une insuffisance vélo-pharyngées en partie responsable du retard de langage peuvent également être retrouvées dans le syndrome VCF [14].

L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure. Devant la présence de signes évoquant le phénotype clinique du syndrome de DiGeorge, le clinicien généticien a orienté le diagnostic dans ce sens. Une analyse ciblée par FISH en utilisant deux sondes, l'une spécifique de la région critique du DiGeorge correspondant au locus 22q11.2 marquée par un fluorochrome vert et une autre sonde spécifique de la région critique correspondant au locus 22q13.3, utilisée comme témoin et marquée en rouge. Les résultats montrent (**Figure9**) :

- La présence de deux signaux rouge correspondant aux deux régions correspondant au locus 22q13.3.
- La présence d'un seul signal vert indiquant la présence d'une délétion du locus 22q11.2 compatible avec le syndrome de DiGeorge.

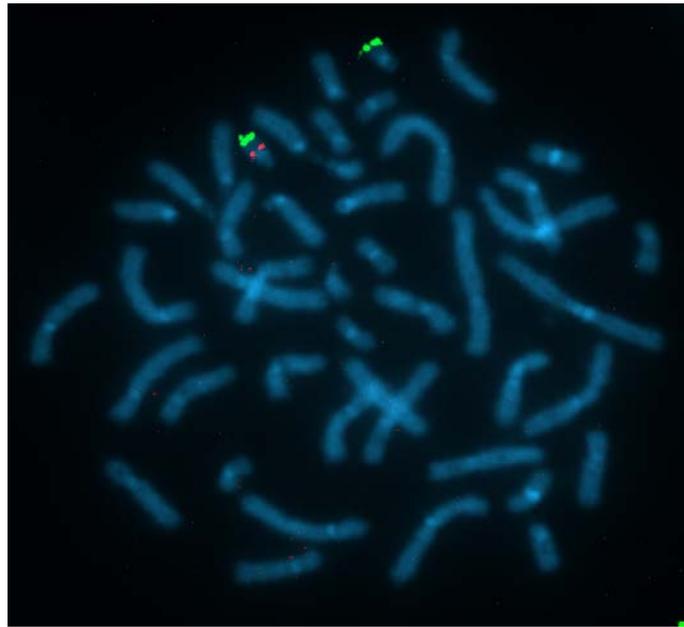


Figure 9: Résultat d'une FISH illustrant la délétion 22q11

Cette délétion de 3Mb environ survenant *de novo* dans 90% des cas, a été mise en évidence dans plusieurs syndromes proches (syndrome de Di George, cardio-vélo-facial « VCF », cardiofacial de Cayler). Une haplo-insuffisance impliquant une vingtaine de gènes est à l'origine des différents phénotypes. Les meilleurs candidats semblent être, le gène *HIRA* ou *TUPPLE 1* (Histone cell cycle Regulation *S. cerevisiae* homolog-like A) et le gène *TBX1* (T-Boxtranscription Factor gene); facteurs de transcription exprimés durant le développement du cœur et des crêtes neurales (78).

IV. 4. Williams-Beuren :

Le syndrome WBS est une pathologie de développement, de transmission autosomique dominante touchant le tissu conjonctif et le système nerveux central. C'est une maladie qui touche à égalité les deux sexes sans dominante ethnique. Ce syndrome a été diagnostiqué pour 3 patients (P17, P18, P19) dont 01 de sexe féminin et 02 de sexe masculin. Le faciès dysmorphique dit « faciès d'elfe » est un élément diagnostique après l'âge de 2 ans. En période néonatale il se manifeste par un front large et bombant [5]. Avec l'âge le visage devient plus étroit et décharné par perte de tissu sous cutané mais conserve ses traits grossiers. La prévalence des caries est augmentée, parfois associée à une hypoplasie de l'émail [79].

La maladie est dominée dans 50% des cas par l'atteinte vasculaire avec sténoses artérielles souvent à l'origine d'accidents ischémiques cérébraux ou cardiaque [39] et hypertension artérielle [80]. Devant la découverte d'un souffle cardiaque, une échographie cardiaque a été réalisée révélant une sténose. Ceci a conforté le clinicien généticien dans son diagnostic. L'hyperacousie est fréquente et confère aux sujets atteints du syndrome de grandes compétences musicales. On dit qu'ils ont « L'oreille absolue ». Toute une gamme de phénotypes s'observe dans l'expression du WBS aux plans tant physiques que mental. Le retard mental est léger (QI entre 40 et 60), diagnostiqué dans 75% des cas. Le QI verbal étant supérieur au QI de performance.

L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure rejetant ainsi l'hypothèse diagnostique. En effet la formule chromosomique montre la présence de 46 chromosomes. Devant la présence de signes évoquant le phénotype clinique du syndrome de Williams Beuren, le clinicien généticien a orienté le diagnostic dans ce sens. Une analyse ciblée par FISH en utilisant deux sondes, l'une spécifique de la région critique du WBS correspondant au locus 7q1.1 marquée par un fluorochrome rouge et une autre sonde spécifique de la région télomérique du chromosome 7, utilisée comme témoin et marquée en vert. Les résultats montrent (**Figure 10**) :

- La présence de deux signaux verts correspondant aux deux chromosomes de la paire 7.
- La présence d'un seul signal rouge indiquant la présence d'une délétion du locus 7q1.1 compatible avec le syndrome de Williams Beuren.

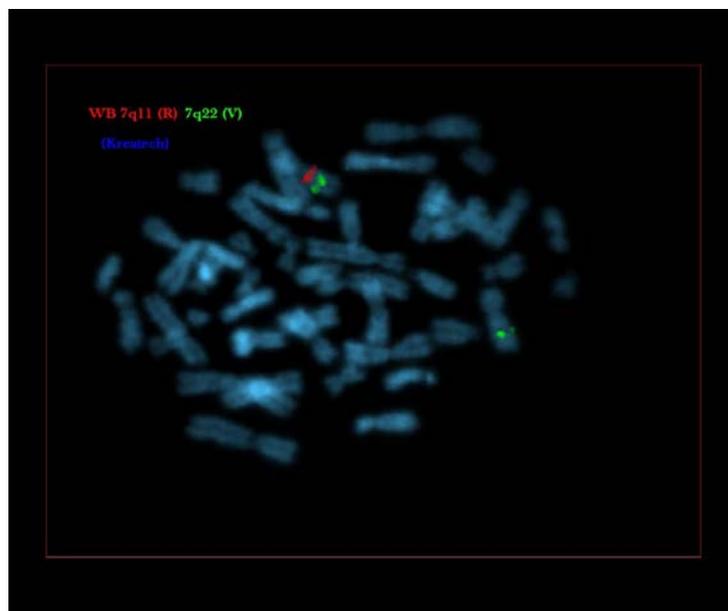


Figure 10 : Résultat d'une FISH illustrant la délétion 7q11

Le diagnostic par FISH est posé lors de la présence d'une microdélétion de l'ordre d'1,5 Mb [60], due à la présence dans cette région de 2 séquences LCR [81]. Qui sont à l'origine, au cours de la méiose, de défauts d'appariement conduisant (NAHR) à la formation de gamètes contenant un chromosome 7 présentant soit une délétion, soit une duplication réciproque de la région 7q11.23. Des techniques plus résolutes ont mis en évidence des points de cassures situés en D7S1870 et D7S489A.

Parmi les gènes impliqués dans le phénotype du WBS, le gène *ELN* (Elastine) présent en une seule copie, est impliqué dans l'atteinte cardio-vasculaire et la dysmorphie et le vieillissement prématuré. Des modèles murins d'haplo-insuffisance de l'élastine *Eln*^{+/-} ont permis de confirmer son rôle dans le modelage de la paroi vasculaire [82]. Des examens histologiques ont révélé la présence de fibres élastiques fragmentées et désorganisées, avec des CMLV orientées de façon plus aléatoire. Ceci contraste avec le haut degré d'organisation régnant normalement dans la paroi artérielle [83].

Le gène *LIMK1* (*LIM kinase-1*), localisé immédiatement après le gène *ELN* semble à l'origine des déficits visuels spatiaux. Récemment, le rôle de la protéine LIMK1 est devenu plus clair. Cette dernière interagit avec la portion cytoplasmique du récepteur transmembranaire « Neuregulin » au niveau des synapses neuromusculaires [21].

Le gène *NCF1* réduit l'HTA que présentent 50% des patients. Ce gène code pour une protéine p47phox qui intervient dans le stress oxydatif. Lorsque ce gène est délété, les patients semblent protégés de l'HTA par une diminution de la capacité à développer un stress oxydatif [84]. Un autre gène *RFC2* (*Replication factor complex subunit 2*) est incriminé. Il code pour la 2^{ème} plus grande protéine d'un complexe multi-protéique essentiel à l'élongation de l'ADN au cours de la réplication [85]. Une haplo insuffisance de ce gène contribue aux anomalies de développement et de croissance des sujets atteints du WBS.

Ce syndrome de gènes contigus implique plus de 28 gènes. De manière surprenante, des études récentes suggèrent que des gènes situés à proximité de la délétion, mais qui ne sont pas délétés, pourraient aussi jouer un rôle dans le phénotype, ce qui augmente encore le nombre de gènes.

IV. 5. Cri Du Chat :

Le syndrome de Cri Du Chat a été diagnostiqué pour 3 patients (P20, P21, P22) dont 02 de sexe féminin 01 de sexe masculin. Un caryotype métaphasique a été réalisé sur un prélèvement sanguin de nos patients. Il a permis de mettre en évidence une délétion homogène du bras court du chromosome 5 (5p-) (**Figure 11**), sur l'ensemble des dix mitoses analysées. Devant un tableau clinique non spécifique du syndrome du cri du chat et le résultat du caryotype, une analyse par FISH a été réalisée, afin d'identifier avec précision la région délétée. Pour cela on a utilisé une sonde spécifique de la région critique en 5p15.2, de 580Kb, marquée en rouge et une sonde témoin spécifique du locus 5q31 marquée en vert.

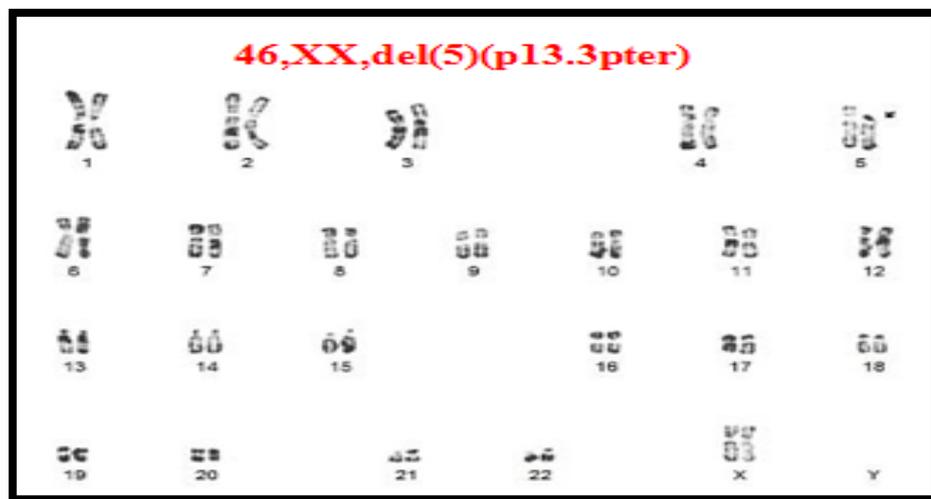


Figure 11: Caryotype standard en bandes R montrant une délétion 5p13, avec la formule chromosomique 46, XX,del5 (p13pter)

Les images d'analyse par FISH objectivent la présence de deux signaux verts confirmant la présence des deux chromosomes homologues et d'un seul signal rouge qui indiquant une délétion de la région 5p15 (**Figure 12**).

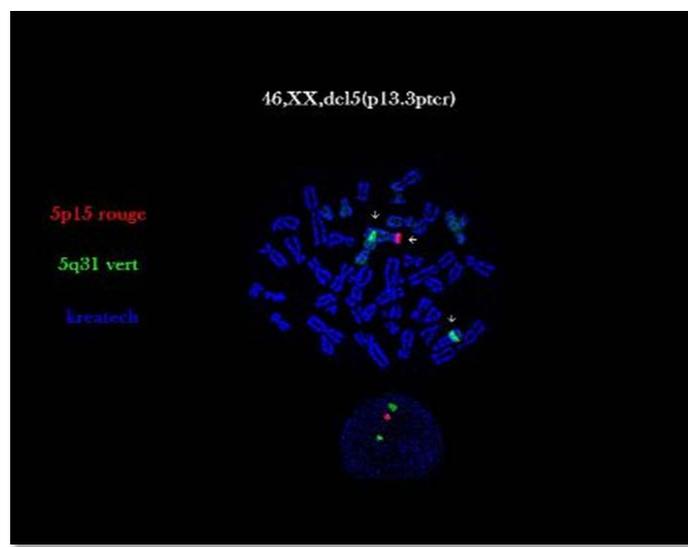


Figure 12 :Résultat d'une FISH illustrant la délétion 5p15

Lorsqu'elle inclut une région critique située en p15.2 d'environ 2 Mb, elle est responsable d'un syndrome bien caractérisé appelé le syndrome du cri du chat. Les premières observations cliniques datent de 1963. Le signe le plus remarquable est un cri plaintif aigu rappelant le miaulement d'un chaton. Ce dernier est présent au cours des premières semaines de vie [26, 86]. D'autres signes évocateurs comme une microcéphalie, une macrogнатhie, une hypotonie constante, un hypertélorisme sont retrouvés chez le nourrisson. Avec l'âge le visage devient long et mince avec un nez large à racine plate. Les cardiopathies et les anomalies viscérales sont rares et s'observent en cas de translocation équilibrée. Cependant quelques cas d'anomalies urogénitales représentées par une cryptorchidies, un hypogonadisme et des reins en fer à cheval ont été rapportés [86, 87]. Le retard mental est profond et est associé à des tendances à l'automutilation [20]. L'hyperactivité quant à elle semble être un trait spécifique du cri du chat comparé au Prader-Willi et Smith Magenis[88].

De récentes études révèlent une haplo insuffisance impliquant des gènes contigus [30]. La délétion en 5p15.2 du gène *SEMAF* (*Semaphorin F*) responsable de la migration des neuromédiateurs [118] et du gène *CTNND2* (*human δ -catenin*), impliqué dans le développement neuronal seraient potentiellement associés au déficit intellectuel chez les patients [54]. La délétion du gène de la télomérase reverse transcriptase (*hTERT*), localisé en 5p15.33 pourrait contribuer aux manifestations phénotypiques observées chez les patients [89].

IV. 6. Smith-Magenis :

Le syndrome de Smith-Magenis a été diagnostiqué pour un seul patient (P23). Les signes cliniques les plus caractéristiques sont : un déficit intellectuel, des troubles du comportement (hyperactivité, déficit de l'attention, auto et hétéro-agressivité), des troubles du sommeil, des traits particuliers du visage pouvant être évocateurs pour un spécialiste. Ce syndrome peut aussi parfois s'accompagner d'anomalies diverses (des yeux, des

oreilles, du cœur, du système urinaire) dont la sévérité varie beaucoup d'une personne à l'autre [90].

Sur le plan moléculaire, le SMS est typiquement dû à la survenue *de novo* soit d'une délétion 17p11.2 (90 %) emportant le gène *RAI1*, soit d'une mutation du même gène (10 %). Cette microdélétion contient plusieurs gènes (25 à 40 gènes selon les cas). On parle donc d'un syndrome des gènes contigus. Les gènes perdus ne sont pas encore tous identifiés [90, 91].

La plupart des manifestations de ce syndrome restent inexplicables, à l'exception des troubles du sommeil qui ont été récemment élucidés. Il s'agit d'une sécrétion inappropriée, diurne, de la mélatonine. Cette sécrétion accrue pendant la journée explique pourquoi ces enfants sont facilement somnolents, s'endorment souvent brutalement, en plein milieu d'une activité, et font de nombreuses siestes. Les colères apparaissent quand la quantité de mélatonine augmente et que les enfants luttent contre le sommeil [44, 90, 92].

L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure. Devant la présence de signes évoquant le phénotype clinique du syndrome de Smith Magenis, le clinicien généticien a orienté le diagnostic dans ce sens. Une analyse ciblée par FISH a été réalisée, en utilisant deux sondes, l'une spécifique de la région critique du Miller Dieker correspondant au locus 17p13.3 marquée par un fluorochrome rouge, et une autre sonde spécifique de la région critique du Smith Magenis correspondant au locus 17p11.2, utilisée comme témoin et marquée en vert. Les résultats montrent :

- la présence de deux signaux rouge correspondant aux deux régions critiques du Miller Dieker.
- la présence d'un seul signal vert indiquant la présence d'une délétion du locus 17p11.2 compatible avec le syndrome de Smith Magenis.

IV. 7. Wolf Hirschhorn :

Le syndrome de Wolf Hirschhorn a été diagnostiqué pour 3 patients (P24, P25, P26) dont 01 de sexe féminin 02 de sexe masculin. Le WHS se manifeste par des signes constants : un retard de croissance sévère à début anténatal, un retard des acquisitions, des crises d'épilepsie, une hypotonie, une microcéphalie, associée à une dysmorphie faciale caractéristique [93]. Cette dernière évoque un casque de « guerrier grec » avec une arrête nasale large, un front haut, un hypertélorisme, et une dépression des commissures des lèvres [94]. D'autres manifestations incluent les anomalies oculaires (strabisme, nystagmus), les défauts de fermetures (bec de lièvre, défaut septal cardiaque), agénésie du corps calleux, un hypospadias et une hypoplasie rénale.

L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure rejetant ainsi l'hypothèse diagnostique .En effet la formule chromosomique montre la présence de 46 chromosomes.Une FISH a été réalisée sur des mitoses métaphasiques de lymphocytes des patients. Une sonde spécifique du locus a été utilisée. Cette dernière donne un signal rouge pour la région critique 4p16. La sonde SE4 (The Chromosome 4 Satellite Enumeration (SE) probe) y a été ajoutée pour faciliter l'identification du chromosome, elle donne un signal vert.La présence de deux signaux verts indique que le patient possède les deux chromosomes constituant la paire d'autosome N°4. Quant à la présence uniquement d'un seul signal rouge, ceci nous renseigne sur l'absence de la région *WHSCR*, au niveau du chromosome n'ayant pas de signal (**Figure 13**). La formule chromosomique de cette FISH est : **46, XY. ish Del (4) (p16) (WHSCR)**.

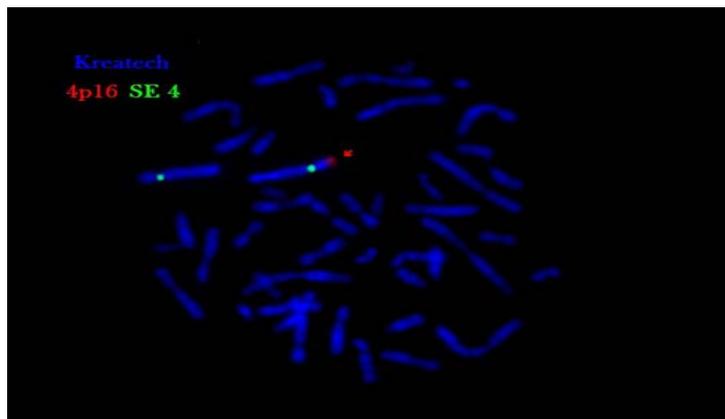


Figure 13: Résultat d'une FISH illustrant la délétion 4p16

Une délétion de la région 4p16.3 est nécessaire pour la pleine expression du phénotype. La plus petite région de superposition des délétions observées dans le WHS, a été limitée à une région de 165 Kb dont la région critique est située entre les marqueurs *D4S166* et *D4S3327*. Cette région contient une série de gènes impliqués dans le phénotype [95]. Parmi eux, le gène *SWHCI* (le gène candidat 1 pour le WHS) dont la délétion est responsable de la dysmorphie faciale et du retard de développement [94]. Cependant de récentes études sur des patients SWH manifestant un phénotype modéré et montrant une délétion de la région 4p16.3, n'incluant pas le gène *WHSC1* ; suggèrent qu'un autre gène contribuerait aux caractéristiques faciales [96]. Il s'agit du gène *FGFRL1* (*Fibroblast Growth Factor Receptor-Like 1*), exprimé au niveau des muscles squelettiques particulièrement au niveau du nez, des maxillaires et des côtes [97].

La délétion du gène *LETMI* (*leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1*) codant pour une protéine active au niveau de la mitochondrie, potentiellement impliquée dans le transport membranaire des ions calcium. Un déficit de cette protéine entraîne des anomalies de structures des mitochondries dont la corrélation avec les signes cliniques du WHS avec n'a pas encore été établie. Par ailleurs, la délétion du gène *LETMI* serait associée à des anomalies de l'activité électrique du cerveau et serait donc responsable des crises d'épilepsies[25].

Enfin l'haploinsuffisance du gène *MSX1* (*mshhomeobox 1*), localisé en 4p16.2 en dehors des régions critiques (*WHSCR 1-WHSCR2*) perturbe la régulation des gènes responsables du développement de la cavité buccale et serait à l'origine des anomalies dentaires (10, 98).

IV. 8. Phelan Mc Dermid:

Le syndrome de Phelan Mc Dermid a été diagnostiqué pour un seul patient (P27). Un remaniement de structure touchant une région télomérique du chromosome 22 (22qter) a été révélé lors de la réalisation d'un caryotype en bandes R chez le patient (**Figure 14**). Devant le comportement autistique de notre patient et la découverte d'une délétion télomérique du chromosome 22, le clinicien généticien suspecte le syndrome de Phelan Mc Dermid et décide de lancer une analyse par FISH. Deux sondes ont été utilisées : Une sonde (TBX1) spécifique du locus 22q11 et une autre, sonde témoin du syndrome VCF, spécifique du locus 22q13.

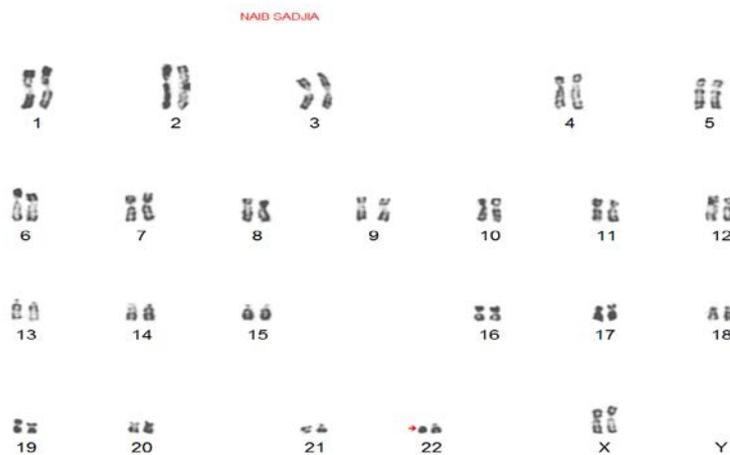


Figure 14 : Caryotype standard montrant un remaniement de structure touchant une région télomérique du chromosome 22

L'analyse par FISH était suffisamment concluante puisqu'elle a révélé une absence de signal correspondant à la région 22q13 confirmant ainsi le diagnostic posé par le clinicien généticien. La formule chromosomique est donc : 46 XX, ishdel (22) (q13) (*SHANK 3*) (**Figure 15**).

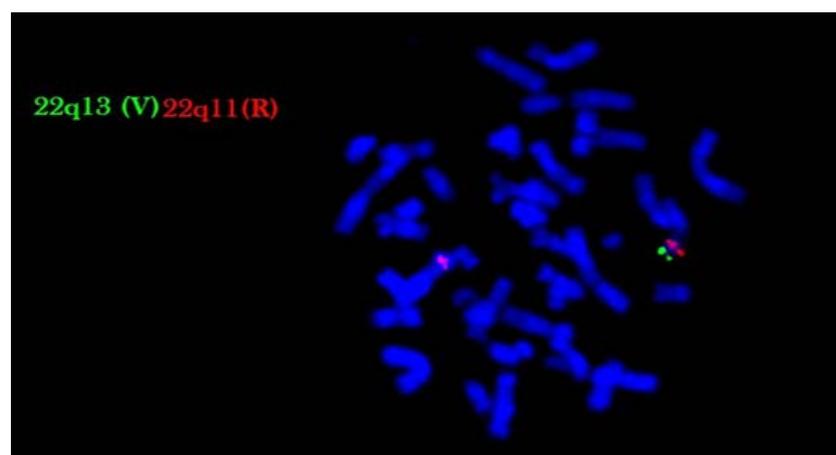


Figure 15: Résultat d'une FISH illustrant la délétion 22q13

Les résultats de caryotype et de la FISH du patient a permis d'objectiver une simple délétion qui cause ce syndrome, en écartant l'éventualité d'un chromosome en anneau ou d'une translocation déséquilibrée comme étiologie possible de ce syndrome.

L'autisme est défini comme un trouble du développement apparaissant avant l'âge de trois ans, caractérisé par des difficultés de communication et d'interaction sociale associées à des activités stéréotypées et des intérêts restreints[99]. Depuis les années 1990, les origines génétiques de l'autisme sont mises en avant. Malgré les investissements scientifiques et financiers très importants, moins de 20 % des cas d'autisme ont été attribués à des anomalies génétiques[100].

Une large étude de **Phelan et al., 2001**, sur 37 nouveaux patients et 24 de la littérature, a permis de préciser le phénotype clinique qui décrit une dolichocéphalie (39 à 57 %), un ptôsis, un nez bulbeux avec racine large, une micrognathie, des oreilles dysplasiques (47 à 65 %), des mains larges et enfin une syndactylie 2-3 des orteils[101]. L'hypotonie, le retard psychomoteur et le retard mental sont des symptômes communs à de nombreux syndromes, et la dysmorphie est discrète voire absente et peu spécifique. Cependant leur présence concomitante suffit à faire évoquer le diagnostic d'une monosomie 22q13[102].

Des anomalies rénales et cardiaques ainsi que des problèmes gastro-intestinaux ont été rapportés chez les personnes ayant la délétion 22q13[103]. La surdité ainsi que la tolérance accrue à la douleur peuvent être observés même si ils restent occasionnels[63]. Une épilepsie est également notée dans un tiers des cas. Elle est présente également dans le nôtre.

Des recherches d'études américaines avaient identifié, en 2003, une délétion du gène *SHANK3* et ont mis en évidence son rôle dans l'apparition des signes neurologiques mais pas nécessairement autistiques. La protéine SHANK intervient dans les synapses glutamatergiques par son interaction avec les neurologines et les neurexines[102].

IV. 9. Sotos:

Le syndrome Sotos a été diagnostiqué pour un seul patient (P28) qui présentait un phénotype caractéristique. En effet, le syndrome de Sotos est un syndrome d'hypercroissance et est à rechercher chez des individus atteints d'autisme et d'une macrocéphalie (grosse tête). Les individus atteints de ce syndrome ont souvent un déficit intellectuel, des difficultés d'apprentissage et un retard du langage. Ils peuvent présenter certains voire tous les critères diagnostiques de l'autisme. Les caractéristiques cliniques du syndrome de Sotos comprennent une macrocéphalie congénitale, un front proéminent avec une démarcation des cheveux apparemment reculée, une croissance pré- et postnatale accélérée, un âge osseux avancé et des mains et des pieds larges(103).

En 2002, il a été découvert que des mutations du gène *NSDI*, situé sur le chromosome 5 (5q35), sont responsables d'un grand nombre de cas du syndrome de Sotos. Les micro-délétions de la région chromosomique 5q35 peuvent également être à l'origine du syndrome.

L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure. Devant la présence de signes évoquant le phénotype clinique du syndrome de Sotos, le clinicien généticien a orienté le diagnostic dans ce sens. Une analyse ciblée par FISH fut réalisée, en utilisant deux sondes, l'une spécifique de la région critique du Sotos, correspondant au locus 5q35 marquée par un fluorochrome vert et une autre sonde spécifique de la région critique du cri du chat correspondant au locus 5p15 marqué par un rouge et vert. Les résultats montrent :

- La présence de deux signaux rouge et deux signaux vert correspondant à la région critique du Cri Du Chat.
- La présence d'un seul signal vert indiquant la présence d'une délétion du locus 5q35 compatible avec le syndrome de Sotos.

IV. 10. SaethreChotzen:

Le syndrome de saethre-Chotzen a été diagnostiqué pour un seul patient (P29). Ce syndrome se traduit par une carniosténose coronale unique ou bilatérale, une dysmorphie du visage et des anomalies de la main et du pied. La face est asymétrique avec une déviation de la cloison, un hypertélorisme, un ptosis et parfois un blépharophimosis, une implantation basse des cheveux sur le front. L'angle naso-frontale est effacé, les oreilles sont petites, très ourlées et l'hélix est barré par un pli traversant la conque appelé le "CruxCymbae", enfin, le prognathisme est très net. Les mains sont courtes avec des syndactylies membraneuses des 2^{ème} et 3^{ème} doigts, voire du 4^{ème}. Les orteils sont également affectés. Le gros orteil est large et la dernière phalange est souvent dupliquée. Des anomalies de dermatoglyphes sont fréquentes, en particulier un pli palmaire unique, le triradius axial plus distal. Une cryptorchidie est souvent présente.

L'affection n'est habituellement pas associée à un retard mental et se transmet sous le mode dominant autosomique, de pénétrance importante mais d'expressivité variable. L'analyse caryotypique se révèle normale et ne montre aucune anomalie de nombre ni de structure(67).

Devant la présence de signes évoquant le phénotype clinique du syndrome de Williams-Beuren, le clinicien généticien a orienté le diagnostic dans ce sens. Une analyse ciblée par FISH fut réalisée, en utilisant deux sondes, l'une spécifique de la région critique du WBS correspondant au locus 7q1.1 marquée par un fluorochrome vert et une autre sonde spécifique de la région critique du SCS correspondant au locus 7q21.1 marqué par un rouge. Les résultats montrent :

- La présence de deux signaux verts correspondant la région critique du WBS.
- La présence d'un seul signal rouge indiquant la présence d'une délétion du locus 7q21.1 compatible avec le syndrome de Saethre-Chotzen.

Le mécanisme à l'origine de cette microdélétion serait probablement dû à l'un des mécanismes cité dans la partie théorique à savoir Recombinaison homologue non allélique, Remaniements chromosomiques liés aux duplicons, Mécanisme de recombinaison homologue, Mécanisme d'appariement des ADN simple-brin, Recombinaison non homologue ou raccordement d'extrémités non homologues et Raccordement d'extrémités non homologues.

CONCLUSION

Conclusion :

Notre travail au sein du Centre Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'hormonologie, Unité de cytogénétique nous a permis de nous familiariser avec les techniques courantes utilisées pour le diagnostic des maladies d'éthologie génétique.

Nous nous sommes intéressées aux retards mentaux syndromiques et plus particulièrement aux syndromes microdélétionnels.

Une consultation génétique est indispensable à l'orientation diagnostique car une bonne connaissance des caractères phénotypiques de chaque syndrome est nécessaire au choix de la sonde adaptée.

Les résultats cytogénétiques (caryotype et FISH) de nos 124 patients qui nous ont été adressés pour suspicion de microdélétion ont révélé 100% de caryotype sans aucune anomalie, 23.39 % de FISH pathologiques et 76.61% de FISH normales.

Devant ces chiffres, force est de constater l'apport de la FISH dans le diagnostic des microdélétions. La maladie étant étiquetée, le conseiller génétique va apporter des éléments de réponses aux parents quant à la prise en charge de la maladie ainsi que la récurrence de l'anomalie chromosomique pour les futures grossesses. S'ajoute à cela son rôle dans l'orientation des parents vers une équipe pluridisciplinaire pour une prise en charge du patient.

Ces chiffres ne témoignent pas que de l'efficacité de la FISH mais aussi de ses limites.

En effet, elle est tributaire d'une clinique parlante car il faut savoir qu'avec cette technique on ne trouve que ce que l'on cherche. La taille de la sonde et l'incapacité à détecter les duplications ou encore les points de cassure avec précision, constituent également les limites de cette technique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIES

Reference bibliographies

1. Lodish Harvey, Berk Arnold, Matsudaira Paul, Kaiser Chris A., Darnell James. Biologie moléculaire de la cellule, chapitre 10 : structure moléculaire des gènes et des chromosomes. Première publication aux Etats unis par Freeman and Co., New York. 2004. 3^é édition. pp 406-426.
2. Ridgway P., Maison C., Almouzni G. Chromatine: Organisation Fonctionnelle du Géno. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. April 2002.
3. Marck Véronique. Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie, Chapitre 1 – Bases biologiques, anatomiques et physiologiques. Editions Masson 2010, 19 : 1-19.
4. Abbara Aly, Lexique de la Médecine foetale et de la morphologie humaine.
5. Lewin Benjamin. Gènes VI. Traduction de la 6^éme édition anglaise par christelle sanlaville. Chapitre 26 pages 760-761 / 753-754.
6. Turleau Catherine et Vekemans Michel. Nouvelles données en génétique chromosomique. M/S : médecine sciences, vol. 21, n° 11, 2005, p. 940-946.
7. Malan V., Romana S. Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention. Archives de Pédiatrie, Volume 19, Issue 4, April 2012, Pages 437-442.
8. Moeschler J.B., Shevell M. Rapport annuel – Bilan des activités 2005. Diagnostic sur l'embryon et le fœtus. Saint-Denis-la-Plaine : Agence de la Biomédecine, 2005 ; pp. 177-192.
9. Du Manoir S., Speicher M.R., Joos S., Schrock E., Popp S., Dohner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T., Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Hum Genet. 90 (1993) 590-610.
10. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D., Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 258 (1992) 818-821.
11. Lupski J.R., Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. Genome Biol. 5 (2004) 242.
12. Shaw C.J., Lupski J.R., Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. Hum Mol Genet. 13 Spec No 1 (2004) R57-64.
13. Lieber M.R., The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. J Biol Chem. 283 (2008) 1-5.
14. Weiss B.J., Kamholz J., Ritter A., Zackai E.H., McDonald -McGinn D.M., Emanuel B., Fischbeck K.H., Segmental spinal muscular atrophy and dermatological findings in a patient with chromosome 18q deletion. Ann Neurol. 30 (1991) 419-423.

15. Bailey J.A., Gu Z., Clark R.A., Reinert K., Samonte R.V., Schwartz S., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Eichler E.E., Recent segmental duplications in the human genome. *Science*. 297 (2002) 1003-1007.
16. Perrault Ronel, Wang Huichen, Wang Minli, Rosidi Bustanur and Iliakis George. *Journal of Cellular Biochemistry*. Volume 92, Issue 4, Article first published online: 20 MAY 2004.
17. Dasika G.K., Lin S.C., Zhao S., Sung P., Tomkinson A., Lee E.Y., DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*. 18 (1999) 7883-7899.
18. Peterson C.L., Cote J., Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev*. 18 (2004) 602-616.
19. Nobile C., Toffolatti L., Rizzi F., Simionati B., Nigro V., Cardazzo B., Patarnello T., Valle G., Danieli G.A., Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet*. 110 (2002) 418-421.
20. Colaiacovo M.P., Paques F., Haber J.E., Removal of one nonhomologous DNA end during gene conversion by a RAD1- and MSH2-independent pathway. *Genetics*. 151 (1999) 1409-1423.
21. Minier F., Carles D., Pelluard F., Alberti E.M., Stern L., Saura R., Syndrome de DiGeorge, étude rétrospective de 52 cas *Archives de Pédiatrie*, Volume 12, Issue 3, March 2005, Pages 254-257.
22. Wilson H.L., Wong A.A.C., Shaw S.R., Tse W.Y., Stapleton G.A., Phelan Mc., Hu S., Marshall H and Mc Dermid H.E.: Molecular characterization of the 22q13 deletion syndrome supports the role haploinsufficiency of SHANK3/ PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet* 2003, 40:575-584.
23. Levy-Mozziconacci A., Lacombe D., Leheup B., Wernert F., Rouault F., Philip N., La microdélétion du chromosome 22q11 chez l'enfant: à propos d'une série de 49 patients. *Archives de Pédiatrie*, Volume 3, Issue 8, August 1996, Pages 761-768.
24. Chafai Elaloui Siham, Ratbi Ilham, Cherkaoui Deqaqi Souad, Ouldin Karim, Sefiani Abdelaziz, Microdélétion 22q11.2 révélée par une hypocalcémie néonatale avec une dysmorphie faciale mineure. *Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2009, Issue 409, February 2009, Pages 83-85.
25. Gilbert-Dussardier Brigitte. Le syndrome de William Beuren. *Revue du praticien* décembre. *Rev Prat* 2006 ; 56 : 2102-6.
26. Lacombe Didier, Le syndrome de Rubinstein-Taybi, *Encyclopédie Orphanet Grand Public*, Août 2010 : 15.
27. Micale L., Fusco C., Augello B. et al. Williams-Beuren syndrome TRIM50 encodes an E3 ubiquitin ligase. *Eur J Hum Genet*. 2008 Apr 9. advance online publication, doi:10.1038/ejhg.2008.68.

28. Robichon Fabrice et Seigneuric Alix, Syndrome de Williams et Beuren : caractérisation biologique et psychologique. *Revue de neuropsychologie* 1999, Vol.9, n°2-3,183-199.
29. Magri, Schwetterle, Cousin, Oyono: DIAGNOSTIC ANTÉNATAL DU SYNDROME DE WOLF HIRSCHHORN. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* .Vol 33, N° 4 - juin 2004p. 362.
30. Sheth F., Akinde O. R., Datar C., Adeteye O. V., and Sheth J.: Genotype-Phenotype Characterization of Wolf-Hirschhorn syndrome confirmed by FISH: Case Reports. Volume 2012, Article ID 878796, 5 pages.
31. Battaglia A., Filippi T., and Carey J. C., "Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision," *American Journal of Medical Genetics, Part C*, vol. 148, no. 4, pp. 246–251, 2008.
32. Roger J., Bureau Michelle, Dravet Charlotte, Genton Pierre, Tassinari Carlo Alberto. *Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent. Chapitre 29 : Epilepsies et anomalies chromosomiques.* Page 467-468.
33. Ouldin Karim, Samri Imane, Bouguenouch Laila, Hamdaoui Hasna, El Otmani Ihsan, Hbib Mohamed, Chaouki Sana, et Hida Moustapha: le syndrome du cri du chat à propos d'une observation. *The Pan African Medical Journal* 2012; 11: 4.
34. Cerruti Mainardi P. Cri du Chat syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006- Sep 5; 1:33.
35. Kristoffersen K.E. Consonants in Cri du chat syndrome: a case study. *J Commun Discord.* 2008 May-Jun; 41(3):179–202.
36. Medina M., Marinescu R.C., Overhauser J., Kosik S.K. Hemizigosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics.* 2000;63: 157–164. doi: 10.1006/geno.1999.6090.
37. Simmons A.D., Pueschel A.W., Mc Pherson J.D., Overhauser J., Lovett M.: Molecular cloning and mapping of human Semaphorin F from the Cri-du-Chat candidate interval. *Biochem Biophys Res Com* 1998, 242:685-691.
38. Zhang A., Zheng C., Hou M., Lindvall C., Li K., Erlandsson F., Björkholm M., Gruber A., Blennow E., Xu D.: **Deletion of the telomerase reverse transcriptase gene and haploinsufficiency of telomere maintenance in Cri du chat syndrome.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**:940-948.
39. Venturin M., Guarnieri P., Natacci F., Stabile M., Tenconi R., Clementi M., Hernandez C., Thompson P., Upadhyaya M., Larizza L., Riva P.: Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in17q11.2. *J Med Genet* 2004; 41:35–41.
40. Riva P., Corrado L., Natacci F., Castorina P., Wu B.L., Schneider G.H., Clementi M., Tenconi R., Korf B.R., Larizza L. NF1 microdeletion syndrome: refined FISH

- characterization of sporadic and familial deletions with locus-specific probes. *Am J Hum Genet* 2000; 66:100–9.
41. Jenne D.E., Tinschert S., Reimann H., Lasinger W., Thiel G., Hameister H., Kehrer-Sawatzki H. Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2microdeletions. *Am J Hum Genet* 2001; 69:516–27.
 42. Garcia-Anoveros J., Derfler B., Neville-Golden J., Hyman B.T., Corey D.P. BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1459–64.
 43. Solomon Benjamin D., Lange Eileen and Stratakis Constantine A.: Deletion of 8q24 in an Adult with Mild Dysmorphic Features, Developmental Delay, and Ketotic Hypoglycemia. *American Journal of Medical Genetics part A*. June 2010; 152 (A): 1545- 1549.
 44. Diene G., Postel-Vinay A., Pinto G., Polak M., Tauber M. Le syndrome de Prader-Willi. *Encyclopédie Orphanet*. Juin 2007. *Annales d'Endocrinologie* 2007 ; 68 : 129-137.
 45. Goldstone AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:12-20.
 46. Nicolls RD., Knoll JH., Butler MG., Karam S., Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989; 342: 281-5.
 47. Chai J.H., Locke D.P., Grealley J., et al. Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 898-925.
 48. Smith A., Egan J., Ridley G., et al. Birth prevalence of Prader-Willi syndrome in Australia. *Arch Dis Child* 2003; 88:263–4.
 49. Vogels A., Van Den Ende J., Keymolen K., et al. Minimum prevalence, birth incidence and cause of death for Prader-Willi syndrome in Flanders. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:238–40.
 50. Prader A., Labhart A., Willi H. Ein syndrom von adipositas, klein-wuchs, kryptorchidismus und oligophrenie nach myotonieartigem zustand im neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenshr* 1956;86:1260–1.
 51. Gillissen-Kaesch G., Robinson W., Lohmann D., Kaya-Westerloh S., Passarge E, Horsthemke B. Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and non-deletion patients with Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 1995; 96:638–43.
 52. Moncla Anne, Le syndrome d'Angelman. Happy puppet syndrome, *Encyclopédie Orphanet Grand Public*, Mars 2011: 16.

53. VAN BUGGENHOUT Griet, Syndrome d'Angelman. Encyclopédie Orphanet pour professionnels, mai 2011 : 4.
54. Tauber Maïthé, Dienea Gwenaëlle, Glattard Mélanie, Bieth Eric: Le syndrome de Prader-Willi : mt pédiatrie, vol. 9, n° 4, juillet-août 2006 ; 8 : 251-258.
55. El Hafidi N., Ghanimi Z., Gaouzi A., Benhamou B., Alaoui-M'sseffer F., Syndrome de Rubinstein-Taybi : à propos d'une forme familiale. Archives de Pédiatrie, Volume 11, Issue 8, August 2004, Pages 978-979.
56. PILZ Daniela, Syndrome de Miller-Dieker, Encyclopédie Orphanet Grand Public Dernière mise à jour : Avril 2005.
57. Romana Serge, Malan Valerie, Cytogénétique moléculaire, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Service d'Histo-Embryo-Cytogenetique, Hopital Necker Enfants Malades, Paris, 2010.
58. ELSEA Sarah. Syndrome de Smith-Magenis. Encyclopédie Orphanet pour professionnels, août 2011. Dr S GIRIAJAN, éditeurs experts.
59. Hernandez Karen, De Leersnyder Hélène, Verloes Alain. Le syndrome de Smith-Magenis. Encyclopédie Orphanet Grand Public. Première édition : sept. 2012 : 19.
60. Phelan M.C., Rogers R.C., Saul R.A., et al. 22q13 deletion syndrome. Am J Med Genet 2001 ; 101 : 91-9.
61. Havens J.M., Visootsak J., Phelan M.C., Graham Jr. J.M. 22q13 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. Clin Pediatr (Phila) 2004; 43(1): 43-53.
62. PHELAN Mary C., Monosomie 22q13 ou Syndrome de Phelan-McDermid. Orphanet database. Dernière mise à jour : Mai 2008.
63. Heilstedt H.A., Ballif B.C., Howard L.A., et al. Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. Am J Hum Genet 2003; 72(5): 1200-12.
64. Afenjar Alexandra, Burglen Lydie: Nouveaux syndromes microdélétionnels. Médecine thérapeutique /Pédiatrie .Volume 11, Numéro 4, 224-9, Juillet-Aout 2008.
65. Saethre H., *Ein Beitrag zum Turmschadelproblem (Pathogenese, Erbllichkeit und Symptomologie)*, Dtsch. Z.Nervenheilkd., **117**, 533-55, 1931.
66. Chotzen F., *Eine eigenartige familiare Entwicklungsstörung. (Akrocephalosyndaktylie, Dystosis craniofacialis und Hypertelorismus)*, Monatschr. Kinderheilkd., **55**, 97-122,1932.
67. Reardon W., Winter R. M., *Saethre-Chotzen syndrome*, J. Med. Genet., **31**, 393-396, 1994.

68. D. Johnson, S.W. Horsley, D.M. Moloney, M. Oldridge, S.R. Twigg, S. Walsh, M. Barrow, P.R. Njolstad, J. Kunz, G.J. Ashworth, S.A. Wall, L. Kearney, A.O. Wilkie, A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1, *Am. J. Hum. Genet.* 63 (1998).
69. J. Cai, B.K. Goodman, A.S. Patel, J.B. Mulliken, L. Van Maldergem, G.E. Hoganson, W.A. Paznekas, Z. Ben-Neriah, R. Sheffer, M.L. Cunningham, D.L. Daentl, E.W. Jabs, Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening, *Hum. Genet.* 114 (2003).
70. Robichon Fabrice et Seigneuric Alix, Syndrome de Williams et Beuren : caractérisation biologique et psychologique. *Revue de neuropsychologie* 1999, Vol.9, n°2-3, 183-199.
71. Schrock, E., Du Manoir, S., Velman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Fergus, Ning, Y. (1996) Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science.* 273: 494-497
72. Liehr, Thomas. Fluorescence in situ hybridization (FISH): application guide 2009.
73. Wilkinson, D. G. In situ hybridization: a practical approach. 1998. Oxford University Press.
74. Senat MV. Le dépistage de la trisomie 21 et ses conséquences [thèse]. Le Kremlin-Bicêtre: université de Paris Sud; 2006.
75. Goldenberg A., Saugier-Veber P., et al. Retards mentaux d'origine génétique. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58(5):331-42.
76. Upadhyaya M., Ruggieri M., Maynard J., Osborn M., Hartog C., Mudd S., Penttinen M., Cordeiro I., Ponder M., Ponder B.A., Krawczak M., Cooper D.N.: Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet* 1998;102:591-7.
77. Cerruti Mainardi P., Calì A., Guala A., Perfumo C., Liverani M.E., Pastore G., Overhauser J., Zara F., Pierluigi M., Dagna Bricarelli F. Phenotype/genotype correlation in 7 patients with 5p/autosome translocations Risk for carriers of translocations involving 5p. *Am J Hum Genet.* 2000; A753:145.
78. Breg W.R., Steele M.W., Miller O.J., Warburton D., De Capoa A., Allderdice P.W. The cri du chat syndrome in adolescents and adults: clinical finding in 13 older

- patients with partial deletion of the short arm of chromosome No 5(5p). *Journal of Pediatric* . 1970;77:782–91.
79. Bahuau M., Vidaud M., Vidaud D.:Génétique et physiopathologie moléculaire : Médecine thérapeutique, Volume 3, Numéro 8,623-8, Octobre 1997 revue : Neurofibromatose.
 80. Chevassus-au-Louis Nicolas, FISH, la renaissance de la cytogénétique. *Biofutur*, Volume 2000, Issue 200, May 2000, Page 18.
 81. Bhasin S., Ma K., Sinha I., et al. The genetic basis of male infertility. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1998; 27: 783-805.
 82. Federman DD. The biology of human sex differences. *N Engl J Med* 2006; 354: 1507-14.
 83. Varela M.C., Kok F., Setian N., Kim C.A., Koiffmann C.P. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet* 2005;67:47–52.
 84. Delobel B., Cuvellier J.C., Vallée L., Boiddein F., Lemaître J.F., Bernard C., Loeville G.A., Fovet O., Francannet M.C., Boute O., Croquette M.F., Syndrome de SmithMagenis, à propos de huit observations: un phénotype comportemental. *Archives de Pédiatrie*, Volume 4, Issue 10, October 1997, Page 1056.
 85. Pagon R.A., Adam M.P., Bird T.D., et al., LIS1-Associated Lissencephaly/Subcortical Band Heterotopia, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014.
 86. Chae T., Kwon Y.T., Bronson R., Dikkes P., Li E., Tsai L.H. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, displays cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 1997;18:29–42.
 87. Butler M.G., Bittel D.C., Kibiryeva N., Talebizadeh Z., Thompson T. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* 2004;113:565–73.
 88. Claro A., Cornish K., Gruber R. Association between fatigue and autistic symptoms in children with cri du chat syndrome. *Am J Intellect Dev Disabil*. 2011 Jul;116(4):278–89.
 89. Zhang A., Zheng C., Hou M., Lindvall C., Li K., Erlandsson F., Björkholm M., Gruber A., Blennow E., Xu D.: Deletion of the telomerase reverse transcriptase gene and haploinsufficiency of telomere maintenance in Cri du chat syndrome.*Am J Hum Genet* 2003, 72:940-948.
 90. Hernandez Karen, De Leersnyder Hélène, Verloes Alain. Le syndrome de Smith-Magenis. *Encyclopédie Orphanet Grand Public*. Première édition : sept. 2012 : 19.
 91. ELSEA Sarah. Syndrome de Smith-Magenis. *Encyclopédie Orphanet pour professionnels*, août 2011. Dr S GIRIAJAN, éditeurs experts.

92. Livet M.O., Moncla A., Delobel B., Croquette M.F., Philip N., Vallée L., Le syndrome de Smith-Magenis Archives de Pédiatrie, Volume 4, Issue 12, December 1997, Pages 1231-1237.
93. BATTAGLIA Agatino, Syndrome de Wolf-Hirschhorn, Orphanet database. Dernière mise à jour : Mai 2012.
94. Engbers Hannelie, van der Smagt Jasper J, [...], and Martin Poot. Wolf–Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR 2 regions.European journal of human genetics Janvier 2009, 17(1): 129-132.
95. Roger J., Bureau Michelle, Dravet Charlotte, Genton Pierre, Tassinari Carlo Alberto. Les syndromes épileptiques de l'enfant et de l'adolescent. Chapitre 29 : Epilepsies et anomalies chromosomiques.Page 467-468.
96. Zollino M., Bova R., Neri G. From Pitt–Rogers–Danks syndrome to Wolf–Hirschhorn syndrome and back. Am J Med Genet. 1996; 66:113–115.
97. Trueb B., Taeschler S. Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. Int J Mol Med. 2006; 17:617–620.
98. Silva E. R., Reis-Filho C. R., Napimoga M. H., and Alves J. B., “Polymorphism in the Msx1 gene associated with hypodontia in a Brazilian family,” Journal of Oral Science, vol. 51, no. 3, pp.341–345, 2009.
99. Chamak B., Cohen D. L'autisme : vers une nécessaire révolution culturelle. Med Sci (Paris) 2003 ; 19 : 1152-9.
100. Chamak Brigitte. L'autisme : surestimation des origines génétiques. MEDECINE/SCIENCES 2010 ; 26 : 659-62.
101. Planchon Philippe, L'hybridation génomique comparative. Biofutur, Volume 1997, Issue 165, March 1997, Page 10A.
102. Wilson H.L., Wong A.A.C., Shaw S.R., Tse W.Y., Stapleton G.A., Phelan Mc., Hu S., Marshall H., Mc Dermid H.E.: Molecular characterization of the 22q13 deletion syndrome supports the role haploinsufficiency of SHANK3/ PROSAP2 in the major neurological symptoms. J Med Genet 2003, 40:575-584.
103. STEWART K., DEITZ J. Motor development in children with Sotos cerebral gigantism. Physical and occupational therapy in pediatrics, 1986, 6, 1, p41-53.

ANNEXES

**Annexe N° 1: CANEVAS DU FORMULAIRE DE DEMANDE
D'EXAMEN CYTOGENETIQUE.**

FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

IMPORTANT

Cette fiche doit être : - *renseignée* avec la plus grande précision
- *accompagnée* :
- des résultats des explorations déjà réalisées
- de l'arbre généalogique

IDENTIFICATION DU PATIENT

NOM : PRENOM : Sexe :
Date de naissance : Lieu de naissance :
N° dossier : Date du prélèvement :

IDENTIFICATION DES PARENTS

PERE

NOM :
Prénom :
Date de naissance :
Lieu de naissance :
Profession :
Taille :
Origine géographique :
Origine ethnique :
Consanguinité :

MERE

NOM :
Prénom :
Date de naissance :
Lieu de naissance :
Profession :
Taille :
Origine géographique :
Origine ethnique :
Consanguinité :

MOTIF(S) DE LA DEMANDE

Retard staturo-pondéral
Dysmorphie
Malformations
Retard mental.
Troubles du comportement
Autres :
Diagnostic évoqué :

EXPLORATIONS EXAMENS ANTERIEURS : JOINDRE LES RESULTATS

Clinique :
Biologie :
Cytologie :
Imagerie Médicale :
Caryotype : OUI NON Lieu : Date :
Biologie Moléculaire : OUI NON Lieu : Date :

ANTECEDENTS FAMILIAUX

GRANDS PARENTS - paternels :
- maternels :
PARENTS - père :
- mère :
COLLATERAUX - paternels :
- maternels :

ANTECEDENTS PERSONNELS

GROSSESSE

Marqueurs sériques : MA fœtus :
Infection :
Prise de médicaments, toxiques :
Suivi échographique : Amniocentèse : oui / non

ACCOUCHEMENT :

Terme :
PN : TN : PCN

PERIODE NEONATALE

Hypotonie : Convulsions :
Difficultés alim : Hospitalisation :

DEVELOPPEMENT PSYCHOMOTEUR

Tenue de tête : Sourire réponse:
Assis : Debout avec appui : Marche :
Langage : 1^{iers} mots : 1^{ieres} phrases :
Propreté : Autonomie :
Scolarité :

COMPORTEMENT

Autoagressivité : Hétéroagressivité :
Agitation : Anxiété :
Colères : Jovial :
Rires inadéquats : Stéréotypies:
Troubles du sommeil : Troubles alimentaires :

CRISES CONVULSIVES

Occasionnelles : fréquentes :
Traitement :

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

Age : Poids : Taille : Périmètre Crânien :

CROISSANCE

ASPECT GENERAL

Longiligne : Trapu :
Maigreur : Obésité : Répartition des graisses :
Asymétrie corporelle : Disproportion tronc / membre:
Hirsutisme :
Autres :

CRANE

Normal : Dolichocéphalie : Trigonocéphalie : Plagiocéphalie : Brachycéphalie :
Implantation des cheveux :

VISAGE

- PROFIL

Oreilles : Position : Forme : Autres :
Menton : microrétrognathisme : prognathisme :
Cou :
Autres :

- ETAGE SUPERIEUR

Front :
Saillie de la métopique : Implantation des cheveux :

- ETAGE MOYEN

Yeux :
Fentes palpébrales : normales : étroites : longues : horizontales :
OBDH : OHDH :
Hypertélorisme : hypotélorisme : Epicanthus : Strabisme :
Sourcils :
Cils :

Nez :
Forme du nez : Columelle :
Racine du nez : Ailes du nez :

Joues :

- ETAGE INFERIEUR

Bouche : Lèvres :
Cavité endobuccale : Dents :
Philtrum :

EXTREMITES

- MAINS : Brachymétacarpie : Arachnodactylie :

- DOIGTS :

Longs : Courts : Fuselés :
Forme : Clinodactylie : Syndactylie : Camptodactylie : Hexadactylie :
Ongles :

- PIEDS

Malposition des orteils :
Syndactylie : Ongles :

- DERMATOGLYPHES :

THORAX

- ASPECT :

- STERNUM : Pectus excavatum : Carinatum :

- RACHIS : Scoliose : Cyphose : Lordose :

- SEIN : Volume : Forme : Mamelons :

ORGANES GENITO-EXTERNES

-

EXAMEN NEURO- MUSCULAIRE

Tonus : hypotonie : hypertonie : axiale : périphérique :
Autres :

EXAMEN DERMATOLOGIQUE / PHANERES

Anomalies de la pigmentation : Hyper / Hypopigmentation : Localisation :
Linéaire : oui non
Ligne de Blaschko : oui non

Ichtyose :

Hyperlaxité cutanée :

Lymphoedème :

MALFORMATIONS VISCERALES

DIVERS

Hyperlaxité ligamentaire :

Centre Pierre et Marie Curie Alger

Service de Biochimie Pr. Y. Oukaci

Cytogénétique Moléculaire

Autorisation d'utilisation de photographies médicales

Je, soussigné,

Nom :

Prénom :

autorise le Dr

à utiliser pour une publication médicale les photographies des membres de ma famille cités ci-dessous :

.....
.....
.....
.....

prises au cours de la consultation de cytogénétique.

L'objectif de cette publication est de participer à l'amélioration et à la diffusion des connaissances médicales. Le texte accompagnant ces photographies respectera totalement l'anonymat et ne comportera aucun élément d'identification tel que nom, prénom ou date de naissance.

Date

Signature

CENTRE PIERRE ET MARIE CURIE ALGER

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE
PR. Y. OUKACI & PR. L. GRIENE

EXAMEN DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES

IDENTIFICATION DU PATIENT

NOM :
Prénom :
Date de naissance :
Adresse :

IDENTIFICATION DU TITULAIRE DE L'AUTORITE PARENTALE

NOM :
Prénom :

CONSENTEMENT AUX EXAMENS DE GENETIQUE

Je, soussigné(e),

Nom :

Prénom :

reconnais avoir été informé(e) par le Dr....., sur
les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisés.

Je donne mon consentement pour effectuer les prélèvements et pratiquer les analyses
génétiques nécessaires pour confirmer ou infirmer le diagnostic de maladie génétique
:

- pour moi-même :

- et les membres de ma famille cités ci-dessous :

-
-
-
-

Fait à

, le

Signature

ATTESTATION

Je, soussigné(e), Dr....., certifie avoir informé le (la) patient(e)
susnommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les
possibilités de prévention et de traitement et avoir recueilli son consentement.

Signature et cachet

1. Locaux :

Un laboratoire spécialement aménagé pour la réalisation du caryotype et de la FISH comportant :

1. Une salle de culture pourvue d'un système d'épuration d'air performant pour assurer la stérilité des manipulations.
2. Une chambre noire dans laquelle se fait la technique FISH.
3. Des paillasses pour les différentes manipulations.

2. Matériel spécifique à la réalisation d'un caryotype standard:

1. Un incubateur pour culture cellulaire (avec apport de CO₂).
2. Une hotte à flux laminaire (classé Poste de Sécurité Microbiologique).
3. Une hotte pour la manipulation des produits toxiques.
4. Une centrifugeuse réfrigérée basse vitesse.
5. Un bain marie thermostaté.
6. Un réfrigérateur à +4°C et un congélateur à -20°C.
7. Un microscope photonique couplé à un ordinateur doté d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'image, relié à une imprimante.

2. A. Consommable de laboratoire :

1. Becher.
2. Erlen Meyer.
3. Etiquettes autocollantes.
4. Gants jetables.
5. Lames rodées et lames à plage dépolies.
6. Papier filtre.
7. Pipettes automatiques (100 et 1000 µl).
8. Pipettes pasteur stériles.
9. Pipettes pasteur stériles non cotonnées.

10. Pipettes stériles graduées de 1ml.

11. Pissettes.

12. Plateaux en inox et des supports de tubes.

13. Poires.

14. Portoirs à tubes.

3. Equipement nécessaire non fourni par les laboratoires Cytocell® nécessaire à la réalisation de la technique FISH:

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).

2. Micropipettes 1µl - 200µl.

3. Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.

4. Tubes à microcentrifugation (0.5ml).

5. Microscope à fluorescence couplé à un ordinateur doté d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'image, relié à une imprimante.

6. Jarres en plastique ou en verre.

7. Forceps.

8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.

9. Centrifugeuse de paillasse.

10. Lames de microscope.

11. Lamelles 24x24mm.

12. Chronomètre.

13. Incubateur à 37°C.

14. Colle Rubber cément.

-ANNEXE N° 2 : LE MATERIEL ET SA MARQUE

MATERIEL	LA MARQUE
Incubateur	NEW Brunswick
Une hotte à flux laminaire	JOUAN
Une hotte pour la manipulation des produits toxiques	FLORES VALLES
Une centrifugeuse	EPPENDORF
Un bain marie	MEMMERT
Microscope photonique	ZEISS

Annexe N° 3 : PREPARATION DES REACTIFS.

Condition générale

Pour chaque réactif préparé, il faut toujours inscrire la date de préparation sur les flacons.
Pour la préparation des réactifs, travailler stérilement sous la hotte à flux laminaire.

1. Préparation des réactifs :

1. A. Préparation des phytohémagglutinines :

1. A. 1. Préparation de la phytohémagglutinine M :

Le flacon contient 25 mg de poudre à reconstituer avec 12,5 ml d'eau distillée stérile.

-Réaliser 2 aliquotes dans des tubes type vacutainer sec de 7 ml.

-La concentration finale est de 2mg/ml.

-Noter sur les aliquotes 'phyto M'. les conserver à +4°C.

1. A. 2. Préparation de la phytohémagglutinine P :

Le flacon contient 5 mg de poudre à reconstituer avec 1 ml d'eau distillée stérile.

-Réaliser 1 aliquote dans un tube type vacutainer sec de 7 ml.

-La concentration finale est de 5mg/ml.

-Noter sur l' aliquote 'phyto p'. le conserver à +4°C.

1. B. Préparation du mélange FrdU/Uridine :

1°) Dans un flacon de 20 ml, peser 5mg de FrdU et ajouter à l'aide d'une pipette graduée, 20 ml de TC 199 et dissoudre le FrdU.

2°) Dans un flacon de 20 ml, peser 5mg d'Uridine Ajouter à l'aide d'une pipette graduée, 20 ml de TC199 et dissoudre l'Uridine.

3°) A l'aide d'une pipette de 25 ml, prélever 175 ml de TC 199 et les mettre dans le béccher de 200 ml.

4°) A l'aide d'une pipette de 10 ml prélever 8,6 ml de TC 199 et les mettre dans le béccher de 200 ml.

5°) A l'aide de la pipette automatique de 1000 µL (pointe bleue), prélever 400 µL de la préparation de FrdU et les mettre dans le béccher de 200 ml

6°) A l'aide d'une pipette graduée de 20 ml, prélever 16 ml de la préparation d'Uridine et les mettre dans le béccher de 200 ml.

7°) Homogénéiser la préparation finale à l'aide de l'agitateur magnétique.

8°) Préparer 20 tubes de cultures et les annoter "F+U" en y inscrivant également la date.

9°) A l'aide d'une pipette graduée de 10 ml, répartir la préparation dans les 20 tubes de

cultures (10 ml par tube).

10°) Placer les tubes au congélateur (- 20°C).

11°) Conserver le Frdu restant au congélateur.

1. C. Préparation de la Thymidine :

1°) Peser 10 mg de thymidine dans une flasque de 50 ml

2°) Sous la hotte ajouter 40 ml de TC 199, homogénéiser par retournement.

3°) Aliquoter par 2 ml dans les tubes vacutainer à l'aide d'une pipette graduée de 2 ml

4°) Conserver les tubes au congélateur

1. D. Préparation du BrdU :

1°) Préparer un tube type vacutainer (sans additif) de 7 ml

2°) Peser dans un petit bécher ou on aura placé le vacutainer stérile, 5 mg de BrdU (flacon au congélateur)

3°) Ajouter à l'aide d'une pipette graduée stérile, 5 ml de TC 199

5°) Homogénéiser le tube vacutainer par retournement

6°) Noter sur le vacutainer "BrdU 1 mg/ml" ainsi que la date du jour

7°) Conserver le tube au réfrigérateur à +4°C, deux semaines au maximum.

1. E. Préparation du sérum pour le choc hypotonique :

1°) Sortir un flacon de sérum préalablement décongelé du réfrigérateur et le placer sous la hotte.

2°) Préparer sous la hotte 1 ou 2 Erlenmeyers stériles (selon besoin), une éprouvette graduée également stérile et une bouteille d'eau distillée conservée au réfrigérateur.

3°) Compter le nombre de tubes en culture et multiplier par le volume de sérum qu'il faudra ajouter (en l'occurrence 8 ml).

Exemple: pour 14 tubes (14 X 8 = 112 ml). Il faut donc préparer un minimum de 112 ml de sérum.

4°) Regarder la table des préparations:

Volume du choc (ml)	20	40	60	80	100
Sérum de veau fœtal (ml)	3	6.5	10	13	16
Eau distillée stérile	17	33.5	50	67	84

Pour un besoin de 112 ml de sérum, il faudra en préparer 120 ml.

5°) Mettre dans l'Erlen, 20 ml de sérum à l'aide de l'éprouvette graduée.

6°) Ajouter 100 ml d'eau distillée stérile dans l'Erlen à l'aide de la même éprouvette (choc

au 1/6°).

7°) Recouvrir l'Erlen avec son capuchon d'aluminium et l'homogénéiser en lui imprimant un mouvement de rotations.

8°) Placer l'Erlen à l'étuve à 37 °C jusqu'à son utilisation.

1. F. Préparation du Earle :

1°) Préparer sur la paillasse un bécher de 2 litres contenant un barreau magnétique.

2°) Verser dans le bécher 2 flacons de EBSS (10X)

3°) Compléter jusqu'à 2 litres avec de l'eau distillée [conserver les 2 bouteilles car la préparation sera mise dedans].

4°) Poser le bécher sur l'agitateur magnétique.

5°) Vérifier avec le pH-mètre, le pH de la préparation

6°) Ajuster progressivement le pH de la préparation à 6,5 avec du di sodium hydrogenophosphate anhydre. Laisser le pH se stabiliser.

7°) Répartir la préparation dans les deux bouteilles vides d'eau distillée.

8°) Noter sur les bouteilles le nom de la préparation ("Earle") ainsi que la date.

9°) Les 2 bouteilles sont conservées au réfrigérateur.

1. G. Préparation du Giemsa tamponné et modifié pour coloration (Pour coloration en BANDE R) :

1°) Verser dans un flacon de 100 ml, 3 ml de Giemsa à l'aide du distributeur.

2°) Verser ensuite dans le même flacon, 3 ml de tampon phosphate pH 6,7 à l'aide du distributeur.

3°) Ajuster à 100 ml avec la bouteille d'eau distillée située sur la paillasse.

4°) Homogénéiser légèrement en remuant le flacon.

5°) Verser le contenu du flacon dans un pot en porcelaine.

6°) Mettre les lames dans le pot en porcelaine pendant 7 à 10 minutes.

8°) Rincer les lames sous l'eau du robinet plus ou moins longtemps en fonction du temps de coloration réalisé.

10°) Laisser sécher les lames à l'air libre.

11°) Rincer le flacon et le pot en porcelaine sous l'eau froide du robinet.

12°) Laisser sécher les lames à température ambiante.

1. H. Préparation du tampon Phosphate à pH 6,7 :

1) Peser 7,9 g de KH_2PO_4 dans un verre de montre et verser dans le bécher

2) Peser 16 g de Na_2HPO_4 , 12 H_2O dans un verre de montre et verser dans le bécher

3) Ajouter un litre d'eau distillée dans le bécher mettre le barreau magnétique et poser le bécher sur l'agitateur magnétique

4) Vérifier le pH de la préparation avec le pH-mètre

- 5) Ajuster progressivement le pH de la préparation à 6,7 avec du $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$
- 6) Verser la préparation dans la bouteille vide d'eau distillée
- 7) Noter sur la bouteille tampon phosphate pH 6,7

Conserver la bouteille au réfrigérateur

1. I. Préparation du Giemsa modifié : Traitement des lames en bandes G :

N.B. : Jeter la préparation après utilisation

1°) Verser dans un flacon gradué de 100 ml à l'aide de pipettes graduées stériles:

- Giemsa R: 1,5 ml
- Méthanol : 1,5 ml
- Acide Citrique à 0,1M : 2,0 ml (cf préparation de l'acide citrique)
- $\text{PO}_4\text{HNA}_2, 12 \text{H}_2\text{O}$ à 0,2M : 4,0 ml (cf préparation du tampon phosphate)

2°) Ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à la graduation 50 ml.

3°) Verser après une légère homogénéisation, le contenu du flacon dans un Borel.

1. J. Préparation de l'acide citrique 0,1 M (Pour préparation du Giemsa modifié) :

1°) Peser 2,1 g d'Acide Citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$) dans un verre de montre et le transférer dans un flacon.

2°) Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

3°) Agiter.

4°) Conserver le flacon au réfrigérateur à + 4°C.

1. K. Préparation du tampon phosphate (Pour préparation du Giemsa modifié) :

1°) Peser 7.18 g de dihydrogenophosphate de sodium dodeca hydraté ($\text{HNA}_2\text{O}_7\text{P}, 12\text{H}_2\text{O}$) dans un verre de montre et transférer dans un flacon.

2°) Compléter avec 100 ml d'eau distillée.

3°) Agiter.

4°) conserver au réfrigérateur à + 4 °C.

1. L. Préparation du PBS (Pour ttraitement des lames en bandes G) :

1°) Prélever 100 ml d'eau distillée stérile du flacon de 1l.

2°) Ajouter au 900 ml d'eau restante le contenue du flacon de DULBECCO Phosphate Buffer Saline *10.

3°) Indiquer sur le flacon la date de fabrication ainsi que la mention « PBS » et rayer la mention eau PPI (pour préparations injectables).

1. M. Préparation du SSC X2 (Pour traitement des lames en haute résolution) :

- 1°) Préparer un bécher d'un litre contenant un barreau magnétique. Placer le bécher sur l'agitateur magnétique.
- 2°) Verser dans le bécher 1 litre d'eau distillée stérile.
- 3°) Peser dans un verre de montre 17,5 g de NaCl et verser son contenu dans le bécher (inutile de rincer le verre de montre).
- 4°) Peser dans un verre de montre 10,7 g de Citrate Trisodique et verser son contenu dans le bécher (inutile de rincer le verre de montre).
- 5°) Laisser l'agitation pendant 10 à 15 minutes.
- 6°) Verser le contenu du bécher dans la bouteille d'un litre d'eau distillée.
Conserver la préparation au réfrigérateur (+ 4°C).

1. N. Préparation extemporanée du Hoescht (Pour traitement des lames en haute résolution) :

- 1°) Mesurer à l'éprouvette 100 ml d'eau distillée stérile
- 2°) Dans un verre de montre peser 1mg (0.0010g) de Hoescht
- 3°) Diluer le Hoescht dans le verre de montre avec un peu d'eau distillée à l'aide d'une pipette pasteur
- 4°) Verser dans un pot en porcelaine le Hoescht dilué avec le reste d'eau distillée
- 5°) Mélanger la solution avec la pipette pasteur.

2. Aliquotage :

2. A. Aliquotage du mélange pénicilline-streptomycine :

- 1°) Sortir le flacon de 100 ml de pénicilline-streptomycine du congélateur (-20°C) et le laisser décongeler au réfrigérateur.
- 2°) Noter 'PS' sur 40 vacutainers de 2 ml.
- 3°) Avec une pipette stérile graduée de 5 ml, répartir la totalité du flacon de pénicilline-streptomycine à raison de 2,5 ml par vacutainer.
- 4°) Ranger les tubes au congélateur (-20°C).

2. B. Aliquotage de la L-Glutamine :

- 1°) Sortir le flacon de 100 ml de L-Glutamine du congélateur et le laisser décongeler au réfrigérateur.
- 2°) Annoter 'G' sur 20 tubes coniques stériles de 15 ml.

3°) Avec une pipette stérile graduée de 5 ml, répartir la totalité du flacon de L-Glutamine à raison de 5 ml par tube.

4°) Ranger les tubes au congélateur (-20°C).

2. C. Aliquotage du sérum de veau fœtal (SVF) :

Pour : Préparation des milieux de culture pour lymphocytes

Préparation du sérum pour le choc

- 1°) Sortir le flacon de 500 ml de sérum de veau fœtal du congélateur et le laisser décongeler une nuit à température ambiante.
- 2°) Annoter 'SVF' sur 20 petits pots stériles à bouchons rouges.
- 3°) A l'aide d'une pipette stérile graduée de 25 ml, répartir 25 ml de sérum dans les petits pots stériles.
- 4°) Ranger les flacons au congélateur (-20° C).