

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

**UNIVERSITE DE BLIDA -1-  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**



## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention d'un Diplôme de  
Master II en science de la nature et de vie  
Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

### Thème

**Apport de la cytogénétique classique et  
moléculaire dans l'exploration du syndrome de  
Turner**

Présenté par :

Soutenu le : 11/07/2019

Mme **MEDJEK Samia**

Devant le jury composé de :

Mme KANANE. A	MAA	USDB1	Présidente
Mr BENYAHYA .N	MAA	USDB1	Examineur
Mme SAADI. L	MCA	USDB1	Promotrice
Mlle AISSANI. R	MCB	USDB1	Co-promotrice

Année Universitaire : 2018-2019

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

***J'aimerais tout d'abord adresser mes vifs remerciements à la personne qui a cru en moi et de m'avoir intégré à L'UNIVERSITE de BLJDA-1,***

***Mm SAADJ.L. Merci de m'avoir soutenue et encadrée durant la meilleur période Universitaire que j'ai passée, a cotée de mes meilleurs enseignants tous sans exception***

***Un grand merci à vous, Pour m'avoir encadré. Merci pour votre disponibilité, votre bonne humeur et votre gentillesse et Pour les personnes adorables que vous êtes.***

***Je tiens à exprimer toute Reconnaissance et mon profond respect pour ma Co-promotrice Mme AJSSANJ.R pour son encadrement et pour ses précieux conseils, ses orientations scientifiques.***

***Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude au Pr Ait Abdelkader Belaid Qui m'a fait confiance et m'a permis d'intégrer l'équipe de cytogénétique qu'il dirige au Centre Pierre et Marie Curie d'ALGER***

***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.***

***Je remercie Mme KANANE.A d'avoir Accepté de présider le jury de notre soutenance***

***Je remercie Mr BENYAHYA.N d'avoir Accepté d'examiner notre travail***

***Je remercie tous les enseignants du Département de Biologie***

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

Les anomalies chromosomiques affectent les autosomes et les gonosomes. Elles peuvent porter soit sur le nombre total de chromosomes, soit modifier le chromosome sur le plan structural. Le phénotype qui en résulte est variable d'un cas à l'autre, en particulier quand cela concerne les gonosomes : chromosome sexuelle X. Ce dernier, essentiellement représentée par le syndrome de Turner, est causée par divers types d'anomalies des chromosomes diagnostiquées grâce aux techniques qu'offre la cytogénétique.

Nous avons réalisé une étude rétrospective sur le syndrome de Turner. Ce travail a concerné un effectif total de 489 patients, adressés au laboratoire de génétique pour suspicion du syndrome de Turner. Des caryotypes et de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), ont été réalisés à partir du sang périphérique des patients, afin de vérifier leur formule caryotypique et la présence ou l'absence du gène *SHOX*. Les résultats de cette étude montrent que 23.92% des patients était diagnostiqués turnériens. La moyenne d'âge au diagnostic était de 15ans et les motifs de consultation étaient essentiellement liés au phénotype turnérien (76.12%) au retard staturo-pondéral et une aménorrhée (13.67-9.40%). Les résultats du caryotype ont montré une prévalence des monosomies et des mosaïques (46.15%). Nous avons aussi retrouvé des isochromosomes (3.41%), des délétions, des chromosomes surnuméraires (1.70%) et enfin un chromosome X en anneau (0.85%). La FISH fut positive pour 43 des cas où l'on a noté l'absence du gène *SHOX*.

Le caryotype se révèle être la technique de choix pour déceler ce syndrome, mais étant donné son pouvoir de résolution limité, l'avènement de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui est plus résolutive, a permis d'allier ces deux techniques afin de poser un diagnostic de certitude de ce syndrome.

**Mots clés:** Syndrome de Turner, anomalies chromosomiques, cytogénétique, caryotype, FISH.

Chromosomal abnormalities affect autosomes and gonosomes. They can relate either to the total number of chromosomes or to modify the chromosome structurally. The resulting phenotype is variable from case to case, especially when it concerns gonosomes: sex chromosome X, which mainly represented by Turner syndrome, is caused by various types of chromosome abnormalities diagnosed by cytogenetic techniques.

We performed a retrospective study on Turner's syndrome. This work involved a total of 489 patients who were admitted to the genetic laboratory for suspicion of Turner's Syndrome. Karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH) were performed on patients' peripheral blood to test their karyotypic formula and the presence or absence of the SHOX gene. The results of this study shows that 23.92% of patients were diagnosed turnerians. The average age at diagnosis was 15 years and the reasons for consultation were mainly related to the turnerian phenotype (76.12%) to the stool-length delay and amenorrhea (13.67-9.40%). The karyotype results showed a prevalence of monosomies and mosaics (46.15%). We also found isochromosomes (3.41%), deletions, supernumerary chromosomes (1.70%) and finally a ring X chromosome (0.85%). FISH was positive for 43 cases where the absence of SHOX gene was noted.

The karyotype appears to be the technique of choice to detect this syndrome, but given its limited resolution, the advent of fluorescence in situ hybridization (FISH), which is more resolute, allowed to combine these two techniques. to make a diagnosis of certainty of this syndrome.

**Key words :** Turner syndrome, chromosomal abnormalities, cytogenetics, karyotype, FISH.

تشوهات الكروموسومات تؤثر على الجينات الجسمية والجينات الجنسية. يمكن أن ترتبط إما بالعدد الكلي للصبغيات أو بتعديل الهيكلية للكروموسوم. يتغير النمط الظاهري الناتج من حالة إلى أخرى، لا سيما عندما يتعلق الأمر بالكروموسوم الجنسي، وهذا الأخير X، يمثل بشكل رئيسي في متلازمة تيرنر، يحدث بسبب أنواع مختلفة من تشوهات الكروموسومات التي تم تشخيصها بفضل التقنيات التي تقدمها علم الوراثة الخلوية.

أجرينا دراسة بأثر رجعي على متلازمة تيرنر. شمل هذا العمل ما مجموعه 489 مريضا أحيلوا إلى مختبر الوراثة للاشتباه في متلازمة تيرنر. تم إجراء تنميط نووي ومضان في التهجين الموضعي (FISH) على الدم المحيطي للمرضى لاختبار تركيبة النمط النووي ووجود أو غياب جين SHOX. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن 23.92% من المرضى تم تشخيصهم بمتلازمة تيرنر. تم إجراء تنميط نووي ومضان في التهجين الموضعي (FISH) على الدم المحيطي للمرضى لاختبار تركيبة النمط النووي ووجود أو غياب جين SHOX. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن 23.92% من المرضى تم تشخيصهم بمتلازمة تيرنر. كان متوسط العمر عند التشخيص 15 عامًا وكانت أسباب التشاور مرتبطة بشكل أساسي بالنمط الظاهري (76.12%) لمعدل الفشل وزيادة الوزن وانقطاع الطمث (13.67-9.40%). وأظهرت نتائج النمط النووي انتشار الأحاديات والفسيفساء (46.15%). وجدنا أيضًا متساوي الكروموسومات (3.41%)، عمليات الحذف، الكروموسومات الزائدة (1.70%) وأخيراً كروموسوم الحلقة (0.85%). كان FISH إيجابيا لمدة 43 حالة حيث لوحظ عدم وجود جين SHOX.

**الكلمات المفتاحية:** متلازمة تيرنر، تشوهات الكروموسومات، الوراثة الخلوية، النمط النووي، التهجين الموضعي.

## Liste des abréviations

**AS** : Ambiguïté Sexuelle.

**Bandes G** : Bandes colorées par le Giemsa.

**Bandes R** : Bandes Reverse.

**CGH-array** : Comparative Genomic hybridization array.

**CPMC**: Centre Pierre et Marie Curie

**DAPI**: 4',6-diamino-2-phénylindole.

**DS** : Diviation standard.

**EARL** : Earle's balanced salt solution. **FISH**:

Fluorescence In Situ Hybridization. **FrdU**:

FormodéoxyUridine.

**FSH**: Follicule Stimulating Hormone.

**GAD**: Glutamic Acid Décarboxylase. **GRS**:

Growth hormone Research Society.

**i(Xq)**: isochromosome du bras long du chromosome X.

**ISCN**: International System for human Cytogenetic Nomenclature.

**LH**: luteinizing Hormone.

**RPMI**: Roswell Park Memoriel Institute.

**RSP**: Retard Staturo-Pondéral.

**SHOX**: Short statue Homeobox containing gene.

**SK**: Syndrome de Klinefelter

**SRY**: Sex determinating Region of Y

**SSC**: Saline-Sodium Citrate.

**ST**: Syndrome de Turner.

**STAT**: Signal Transducer and Activator of Transcription.

**TC**: milieu de culture des lymphocutes T.

**VC**: Vitesse de Croissance.

**Liste des figures**

**Figure 1** : Mécanisme de formation des Délétions .....6

**Figure 2** : Mécanisme de formation d'un Chromosome en anneau .....7

**Figure 3** : Mécanisme de formation des inversions .....7

**Figure 4** : Mécanisme de formation des duplications .....8

**Figure 5** : Mécanisme de formation d'un isochromosome. ....9

**Figure 6** : Mécanisme de formation d'une insertion.....9

**Figure 7** : Mécanisme de formation d'une translocation réciproque .....10

**Figure 8** : Translocation robertsoniennes entre le chromosome 13 et le chromosome 14.....11

**Figure 9** : Chromosome X et Y .....12

**Figure 10** : Chromosomes X et Y. PAR = régions pseudoautosomales.....16

**Figure 11** : Sonde Xp 22 qui couvre l'extrémité télométrique du *gène SHOX*, .....23

**Figure 12** : Répartition des patientes turnériennes selon l'âge lors du diagnostic.....26

**Figure 13** : Répartition des patientes selon le motif de consultation. ....27

**Figure 14** : Répartition des différentes anomalies caryotypiques .....28

**Figure 15** : Caryotype de la patiente N°1... ..... 31

**Figure 16** : Caryotype de la patiente N°2... ..... 32

**Figure 17** : Caryotype de la patiente N°3... ..... 33

**Figure 18** : Caryotype de la patiente N°4... ..... 34

**Figure 19** : Caryotype de la patiente N°5... ..... 35

**Liste des tableaux**

**Tableau I** : Résultats du diagnostic génétique .....25

**Tableau II** : Formules du caryotype des patientes turnériennes.....28

**Tableau III** : Caryotypes des patientes choisies pour l'analyse cytogénétique... .....30

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I. Caractéristiques des chromosomes</b> .....	<b>2</b>
<b>I. 1. Structure, organisation et caractéristiques des chromosomes eucaryotes</b> .....	<b>2</b>
<b>I. 2. Division cellulaire</b> .....	<b>3</b>
<b>II. Anomalies chromosomiques</b> .....	<b>4</b>
<b>II. 1. Anomalies chromosomiques de nombre</b> .....	<b>4</b>
<b>II. 2. Anomalies chromosomiques de structure</b> .....	<b>5</b>
<b>II. 3. Nomenclature</b> .....	<b>11</b>
<b>III. Techniques d'études des anomalies chromosomiques</b> .....	<b>12</b>
<b>III.1. Cytogénétique conventionnelle</b> .....	<b>12</b>
<b>III.2. Cytogénétique moléculaire</b> .....	<b>13</b>
<b>IV. Syndrome de Turner</b> .....	<b>14</b>
<b>IV. 1. Épidémiologie</b> .....	<b>14</b>
<b>IV.2. Diagnostic</b> .....	<b>15</b>
<b>IV.3. Etiologie et physiopathologie</b> .....	<b>15</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>17</b>
<b>I. Matériels</b> .....	<b>17</b>
<b>I.1. Matériels biologique</b> .....	<b>17</b>
<b>I.2. Matériels non biologiques</b> .....	<b>17</b>
<b>II. Méthodes</b> .....	<b>17</b>
<b>II.1. Culture cellulaire</b> .....	<b>18</b>

<b>II.2.</b>		Caryotype
standard.....		22
<b>II.3.</b>	Hybridation <i>in situ</i> fluorescente ou FISH7.....	21
<b>Résultats</b>		<b>et</b>
<b>discussions</b> .....		<b>24</b>
<b>I.</b>	Caractéristiques générale de population.....	24
<b>I.1.</b>	Répartition des patients selon le diagnostic cytogénétique et moléculaire.....	25
<b>I.2.</b>	Répartition des Turnériennes en fonction de l'âge à la consultation.....	26
<b>I.3.</b>	Répartition des turnériennes selon le motif de consultation.....	26
<b>I.4.</b>	Répartition des patientes selon la formule du caryotype .....	27
<b>II.</b>	Analyse cytogénétique .....	29
<b>II.1.</b>		Caryotype
mosaïque.....		30
<b>II.2.</b>	Délétion.....	31
<b>II.3.</b>	Chromosome en anneau.....	32
<b>II.4.</b>	Chromosome surnuméraire.....	32
<b>II.5.</b>	Iso chromosome.....	32
<b>Conclusion</b> .....		<b>33</b>

Depuis la découverte en 1956 du nombre de chromosomes chez l'espèce humaine et la mise au point du caryotype, les techniques de cytogénétique n'ont cessé de progresser afin d'explorer le génome humain (**Tjio et Levan, 1956**).

La cytogénétique moléculaire d'apparition relativement récente est une discipline frontière entre la cytogénétique conventionnelle et la génétique moléculaire. Actuellement, ses principaux outils sont l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et l'hybridation génomique comparative sur puces (CGH-array).

Grâce à la cytogénétique, de nombreux syndromes décrits cliniquement ont pu être identifiés, alors qu'à l'inverse, la description de certaines anomalies a permis d'identifier de nouveaux tableaux cliniques. Parmi ces syndromes, on distingue ceux causés par les anomalies affectant les autosomes (autosomies), dont la plus fréquente est trisomie 21 (syndrome de Down). L'autre catégorie d'anomalies est celle affectant les chromosomes sexuels (gonosomies) représentée entre autres par : l'ambiguïté sexuelle, le syndrome de Klinefelter et le syndrome Turner.

Le syndrome de Turner est une affection génétique rare liée à l'absence totale ou partielle du chromosome X.

Le tableau clinique est très hétérogène associant une petite taille, une dysgénésie gonadique avec hypogonadisme hypergonadotrophique et une dysmorphie souvent modérée voire absente et d'autres pathologies associées très diverses.

Le syndrome de Turner a par ailleurs de nombreuses répercussions cliniques qu'il faut dépister, expliquer et traiter, de manière à améliorer la qualité de vie et de prévenir les complications.

Le diagnostic de certitude est établi après la réalisation de techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH).

Dans ce travail nous rapportons une étude rétrospective, ayant intéressé 489 patientes présentant un syndrome de Turner, adressées au Laboratoire de cytogénétique du CPMC d'ALGER, pour confirmer le diagnostic de Syndrome de Turner.

# ***Synthèses Bibliographiques***



## **I. Caractéristiques des chromosomes**

Les chromosomes sont le support de l'information génétique, de l'hérédité et de l'organisation de la vie cellulaire. Chez les procaryotes, le chromosome est majoritairement une unique double hélice d'ADN, généralement circulaire, et à laquelle relativement peu de protéine sont associées. Il est localisé dans une région spécifique du cytoplasme qu'on appelle nucléoïde. Ce dernier est dépourvu de membrane. La réplication de l'ADN est bidirectionnelle et se fait à partir d'une seule origine. Les eucaryotes ont, généralement, plusieurs chromosomes différents, de structure linéaire et contenus dans un organite pourvu de membrane : le noyau. Les molécules d'ADN sont associées à de nombreuses protéines (particulièrement de compaction), dont les histones qui ont des rôles fonctionnelles et structuraux très importants. Contrairement aux procaryotes, l'ADN des eucaryotes possède de multiples origines de réplication sur chaque chromosome.

### **I. 1. Structure, organisation et caractéristiques des chromosomes eucaryotes**

Le chromosome eucaryote est caractérisé par la présence d'un centromère à partir duquel naissent deux segments ou bras ; un bras long (q) et un bras court (p). A l'extrémité de chaque bras sont retrouvés les télomères. L'emplacement du centromère par rapport aux télomères constitue un critère de classification morphologique des chromosomes. Nous retrouvons ainsi les chromosomes acrocentriques, métacentriques et submetacentriques. A certains stades du cycle cellulaire, le chromosome se dédouble sur toute sa longueur, excepté au centromère. Les deux moitiés ainsi constituées sont nommées chromatides (**Beaudry, 1985**).

Les chromosomes d'une cellule somatique ou gonadique sont classés selon des critères définis par des techniques de cytogénétique classique (taille, position du centromère, bandes chromosomiques) et sont numérotés, chez l'homme, de 1 à 22, ou groupés également en catégories de A à G.

Toutes les régions de la chromatine ne sont pas impliquées de la même manière dans la transcription des gènes. De ce fait deux types de chromatine sont retrouvés : une chromatine dite « active » ou « euchromatine » et une chromatine « inactive » ou « hétérochromatine ». Il existe toutefois dans l'ADN des régions de chromatine qui sont tantôt inactives tantôt actives ; on parle alors d'hétérochromatine facultative. Les femelles mammifères ont deux chromosomes. L'un d'eux est majoritairement inactif d'un point de vue transcriptionnel, assurant une sorte de compensation entre femelles et mâles (**Hart et Jones, 2003 ; Winter et al., 2006**).

## **I. 2. Division cellulaire**

### **I. 2. 1. Division somatique ou mitose**

L'organisme se développe et renouvelle ses tissus à travers des divisions cellulaires successives. Avant la division, une cellule doit ainsi d'abord dupliquer son contenu en ADN au cours de l'étape d'interphase, dont l'alternance avec la mitose est qualifiée de "cycle cellulaire". Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites en quiescence ou en phase G<sub>0</sub>, mais sous l'effet de signaux mitogènes, elles entament alors leur cycle de division qui est classiquement divisé en quatre phases : G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M. A la fin de la mitose, deux cellules filles sont obtenues ; elles sont génétiquement identiques à la cellule mère.

### **I. 2. 2. Division gamétique ou méiose :**

Il s'agit d'une division cellulaire qui permet la formation de gamètes haploïdes, ovules et spermatozoïdes à partir de cellules diploïdes. Ce processus aboutit à la production de quatre cellules-filles génétiquement différentes entre elles et différentes de la cellule-mère. La méiose se déroule en deux étapes de divisions successives après une seule réplication de l'ADN. La première division (Méiose I) est qualifiée de réductionnelle et la seconde (Méiose II) d'équationnelle.

La prophase I de la Méiose I est assez longue et plus complexe que celle de la mitose, puisqu'elle est subdivisée en cinq sous-étapes : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Durant la prophase I, les chromosomes homologues s'individualisent et s'apparient, côte à côte, en formant des tétrades (bivalents). Ceci rend alors possible le processus de "crossing-over", durant lequel les chromosomes homologues peuvent échanger du matériel génétique grâce à la formation de chiasmata (structures en forme de croix et résultant de liaisons entre chromosomes homologues).

Lors de la métaphase I, les bivalents, qui sont toujours liés au niveau des chiasmata, se positionnent au niveau de la plaque équatoriale. L'anaphase I se caractérise essentiellement par la séparation et la migration des chromosomes homologues, composés chacun de deux chromatides jointes par un centromère non divisé, vers les pôles du fuseau en sens opposés.

A la fin de la méiose I, chacune des deux cellules filles contient un nombre de chromosomes réduit par 2 ; elles sont haploïdes. La méiose II permet la séparation des chromatides sœurs aboutissant à la formation de quatre cellules haploïdes génétiquement différentes (**Strachand et Read, 1998 ; Hart et Jores, 2003 ; Meijer, 2003 ; Jorde et al., 2001**).



## **II. Anomalies chromosomiques**

Tout changement de structure ou du nombre de chromosomes peut altérer le fonctionnement d'un organisme (**Harry, 2008**). Chez l'homme, chaque cellule somatique contient un nombre  $2n$  égale à 46 chromosomes soit 23 paires, dont 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes (XX et XY respectivement chez la femme et l'homme sains) (Stewart, 2010). Si la cellule somatique est diploïde parce qu'elle contient deux lots de chromosomes ( $2n = 46$ ), les gamètes, ovules et spermatozoïdes, contiennent un seul lot de chromosomes ( $n = 23$ ) et sont dits haploïdes (**Stewart, 2010**).

### **II. 1. Anomalies chromosomiques de nombre**

#### **II. 1. 1. Anomalies chromosomiques homogènes**

Si une erreur se produit au cours de l'une des deux divisions méiotiques, toutes les cellules dérivées du zygote sont porteuses de l'anomalie ; cette anomalie est dite homogène (**Razavi-encha et al., 1988**). On distingue chez l'homme, deux grandes catégories d'anomalies chromosomiques homogènes : la polyploïdie et l'aneuploïdie.

La polyploïdie correspond à la présence de plus de deux lots de chromosomes chez un individu. On rencontre chez l'homme, les triploïdies ( $3n$ ) et les tétraploïdies ( $4n$ ). Ces cas sont incompatibles avec une survie prolongée et sont responsables d'environ 20% des avortements spontanés (**Jambon et al., 1998 ; Storchova et Kuffer, 2008**).

L'aneuploïdies ne concerne qu'une partie du lot de chromosomes. Il s'agit d'un changement du nombre de chromosomes dû à un gain ou à une perte d'un ou de plusieurs chromosomes. Chez l'homme, on distingue les trisomies ( $2n + 1$ ) et les monosomies ( $2n - 1$ ), qui impliquent aussi bien les autosomes que les gonosomes.

La monosomie de l'X, à l'origine du syndrome de Turner, est la seule monosomie homogène viable chez l'homme. En effet, les embryons porteurs d'une monosomie autosomique sont éliminés dès les premiers stades du développement. Concernant les trisomies, seules les trisomies autosomiques 13 (syndrome de Patau), 18 (syndrome d'Edwards) et 21 (syndrome de Down) sont viables à l'état homogène. Trois trisomies gonosomiques homogènes sont également viables rencontrées dans le syndrome du triple X (Fille 47, XXX), le syndrome de Klinefelter (Garçon 47, XXY) et le syndrome de Jacob (Garçon 47, XYY) (**Briard et Morichon-Delvallez, 2006 ; Harton et Tempest, 2012**).

### **II. 1. 2. Anomalies chromosomiques en mosaïque**

Si une erreur survient lors des premières divisions mitotiques de l'embryogenèse, l'anomalie de nombre est en mosaïque c'est-à-dire que deux ou plusieurs populations cellulaires différentes par leurs constitutions chromosomiques coexistent (**Razavi-encha et al., 1988**). Ces mosaïques peuvent ne concerner que des lignées toutes aneuploïdes, mais le plus souvent une lignée diploïde normale existe, voire prédomine. On estime que 10% des trisomies autosomiques sont en mosaïque (**Briard et Morichon-Delvallez, 2006**).

### **II. 1. 3. Cas particuliers**

Il existe des cas particuliers d'anomalies du nombre tels que les chimères et les chromosomes marqueurs surnuméraires. On parle de chimère quand les cellules de l'organisme proviennent de la fusion post-zygotique de deux œufs. Si parmi les deux types de cellules les unes portent deux chromosomes X et les autres un chromosome X et un Y, le phénotype est très variable et une ambiguïté sexuelle peut être observée (**Briard et Morichon-Delvallez, 2006**).

Les chromosomes marqueurs sont des petits fragments chromosomiques observés occasionnellement dans les cellules en culture en plus du nombre diploïde normal, généralement en mosaïque. Il s'agit d'une anomalie de nombre mais aussi d'un réarrangement de structure. Le retentissement clinique des marqueurs chromosomiques est variable selon leur composition génétique (hétérochromatine ou euchromatine). En effet, ils peuvent être responsables de malformations congénitales ou d'un retard mental mais ils sont parfois présents chez des individus normaux et ségrégent sur plusieurs générations (**Jambon et al., 1998**).

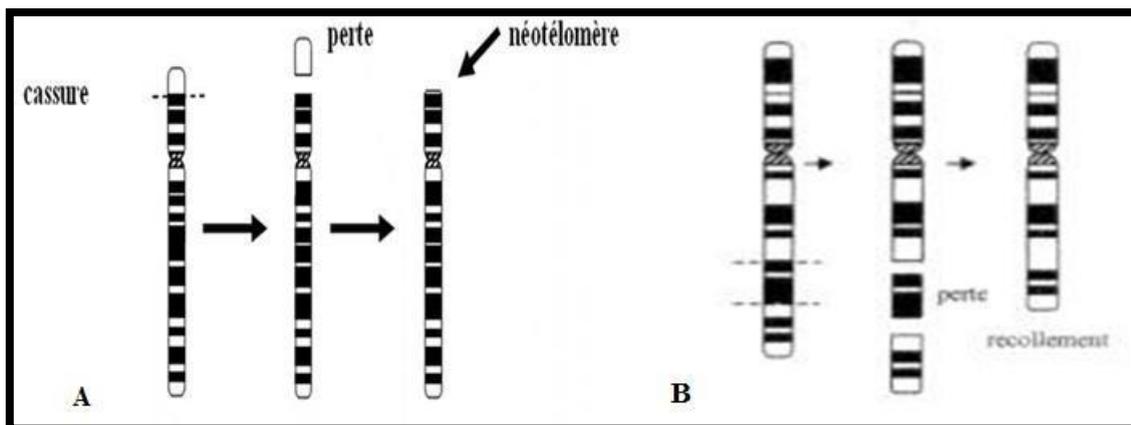
## **II. 2. Anomalies chromosomiques de structure**

Les anomalies de structures sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies d'un ou de plusieurs recollements anormaux. Elles sont équilibrées lorsqu'il n'y a pas de gain ou de perte du matériel chromosomique, ou déséquilibrées s'il existe un gain ou une perte du matériel chromosomique. Ces anomalies peuvent affecter un ou deux chromosomes, voire plus (**Harry, 2008**).

## II. 2. 1. Anomalies affectant un chromosome

### - Délétions

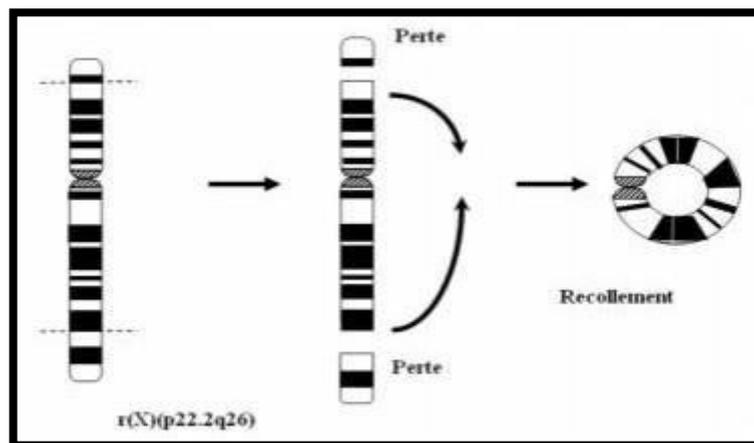
Il s'agit de pertes de matériel chromosomique, entraînant une monosomie partielle (par perte de gènes). Elles peuvent être terminales (**Figure 1A**), affectant l'extrémité distale d'un bras chromosomique, ou interstitielles (**Figure 1B**) résultant de deux cassures avec perte du segment chromosomique intercalaire (**Harry, 2008**). Certaines délétions sont classiques chez l'homme, c'est le cas de la délétion d'un fragment du bras court du chromosome 4 ou du chromosome 5 responsable respectivement du syndrome de Wolf-Hirschhorn et du syndrome du cri du chat (**Briard et Morichon-Delvallez, 2006**).



**Figure 1** : Mécanisme de formation des Délétions (A) Délétion terminale, (B) Délétion interstitielle  
(Jeanpierre et *al.*, 2004).

### - Chromosome en anneau

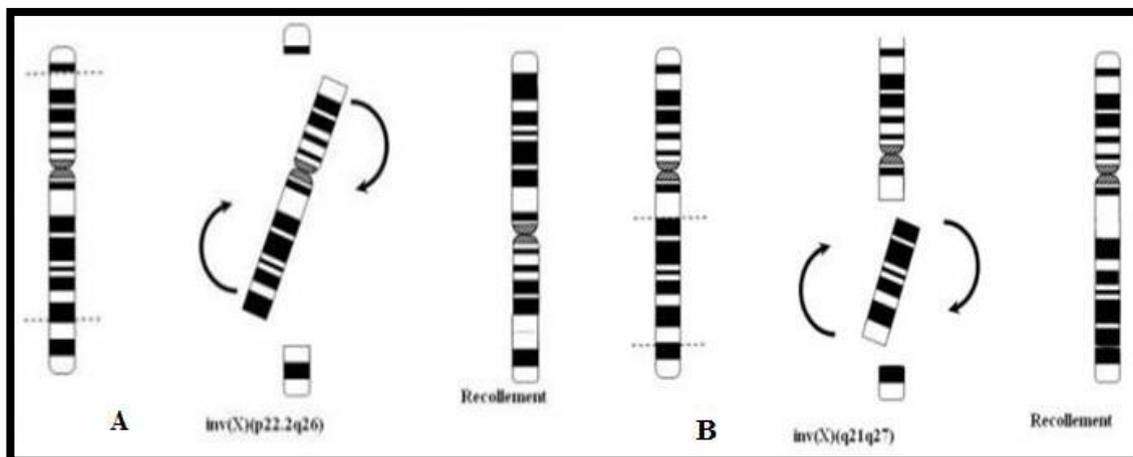
Le chromosome en anneau a été identifié pour la première fois en 1956 dans des cellules tumorales. C'est le résultat de deux cassures, une sur chaque bras chromosomique, avec perte des fragments distaux et fusion des extrémités libres (**Figure 2**). On sait actuellement qu'il concerne tous les chromosomes, aussi bien les autosomes que les gonosomes (**Ahzaad et al. 2010 ; Briard et Morichon-Delvallez, 2006**).



**Figure 2** : Mécanisme de formation d'un Chromosome en anneau (Jeanpierre et al., 2004).

- **Inversions**

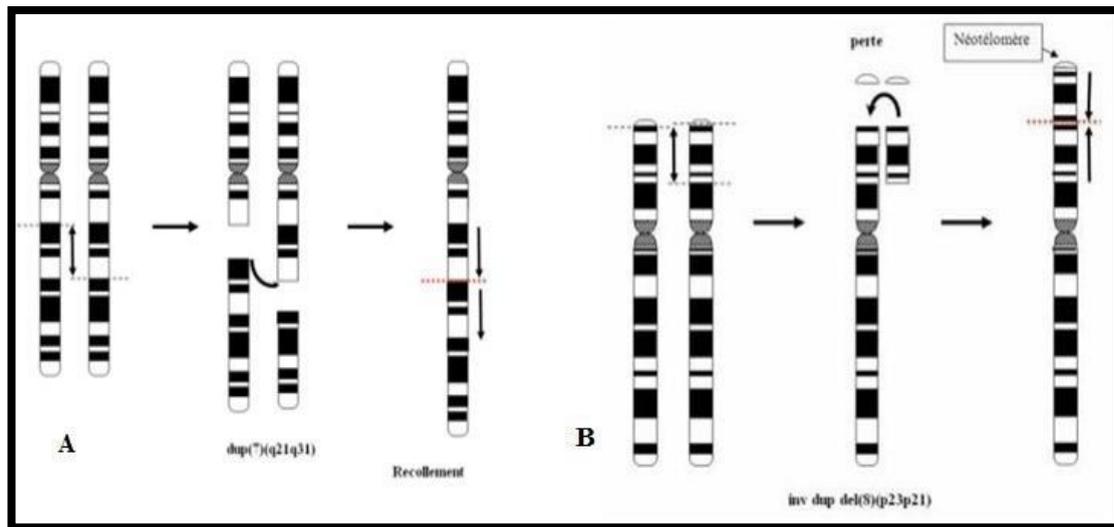
Elles sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après inversion du segment intercalaire. Elles sont dites péricentriques (**Figure 3A**) si le fragment inversé contient le centromère, ou paracentriques (**Figure 3B**) si les deux cassures sont produites sur le même bras (**Beaudry, 1985**). Ces inversions sont des remaniements équilibrés mais elles entraînent au moment de la méiose des difficultés d'appariement.



**Figure 3** : Mécanisme de formation des inversions : (A) inversion péricentrique, (B) inversion paracentrique (Jeanpierre et al., 2004).

- **Duplications**

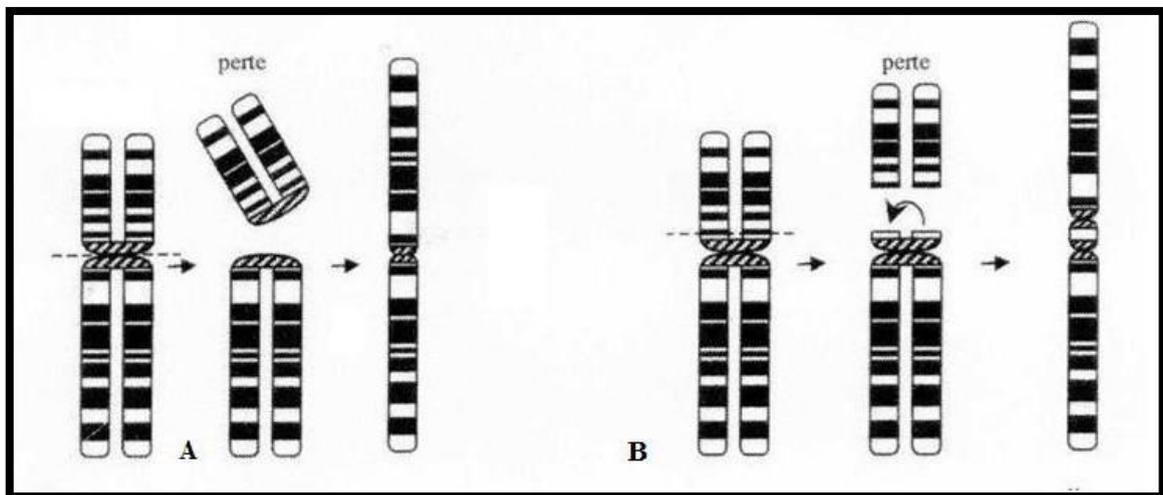
C'est la présence en double exemplaire d'une région chromosomique. La duplication est dite directe ou en tandem si le fragment dupliqué conserve la même orientation que le fragment d'origine (**Figure 4A**). Elle peut être inversée ou en miroir, si le fragment dupliqué à une orientation inverse (**Figure 4B**) (**Harry, 2008**).



**Figure 4** : Mécanisme de formation des duplications : (A) Duplication en tandem, (B) Duplication en miroir (**Jeanpierre et al., 2004**).

- **Isochromosomes**

Un iso chromosome est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec perte de l'autre bras suite à une cassure transversale au niveau du centromère (**Harry, 2008**). On en distingue deux types selon le plan de cassure ; monocentriques (**Figure 5A**) si la cassure se fait au niveau du centromère, et dicentriques (**Figure 5B**) si la cassure est décalée du centromère. L'isochromosome le plus souvent rencontré est l'isochromosome pour le bras long du chromosome X qui constitue une variante cytogénétique du syndrome de Turner (**Koumbaris et al., 2011**).

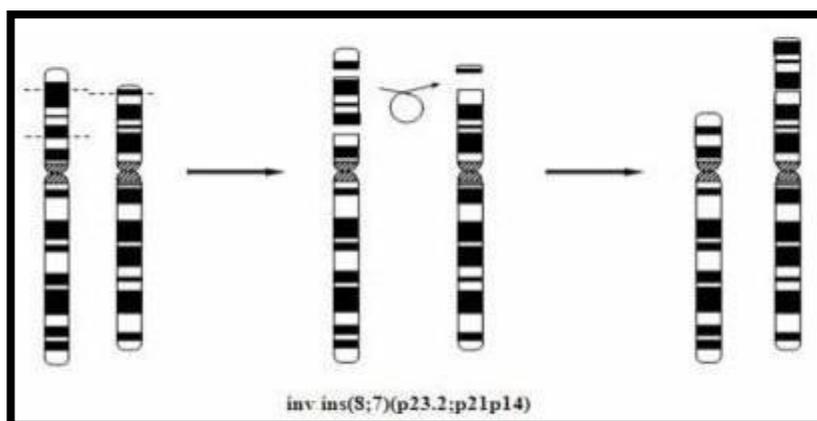


**Figure 5** : Mécanisme de formation d'un isochromosome. (A) isochromosome monocentrique, (B) isochromosome dicentrique (Jeanpierre et al., 2004).

## II. 2. 2. Anomalies affectant deux chromosomes

### - Insertions :

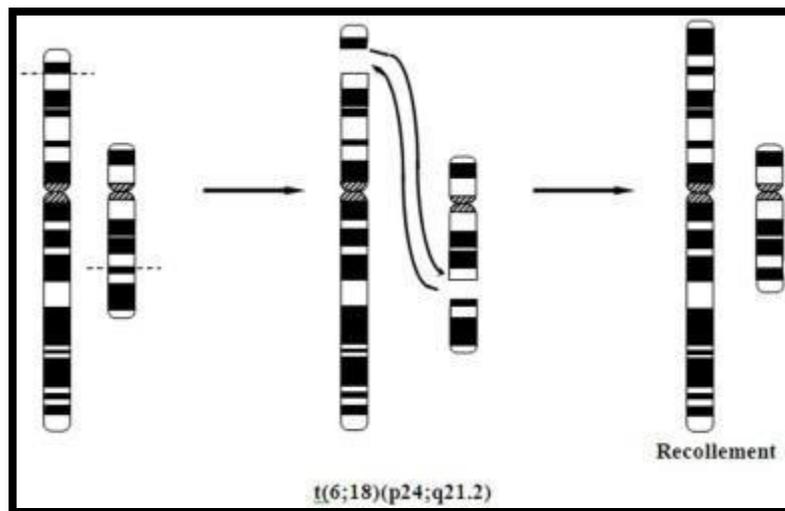
Elles se traduisent par le transfert d'un segment intercalaire à l'intérieur d'un autre bras chromosomique. Elles résultent d'un mécanisme de trois cassures, deux sur le chromosome donneur et une sur le chromosome receveur. Rares en pathologie humaine, elles peuvent produire des anomalies déséquilibrées viables par recombinaison (monosomie ou trisomie partielle) (Figure 6) (Briard et Morichon-Delvallez, 2006).



**Figure 6** : Mécanisme de formation d'une insertion (Jeanpierre et al., 2004)

- **Translocations réciproques**

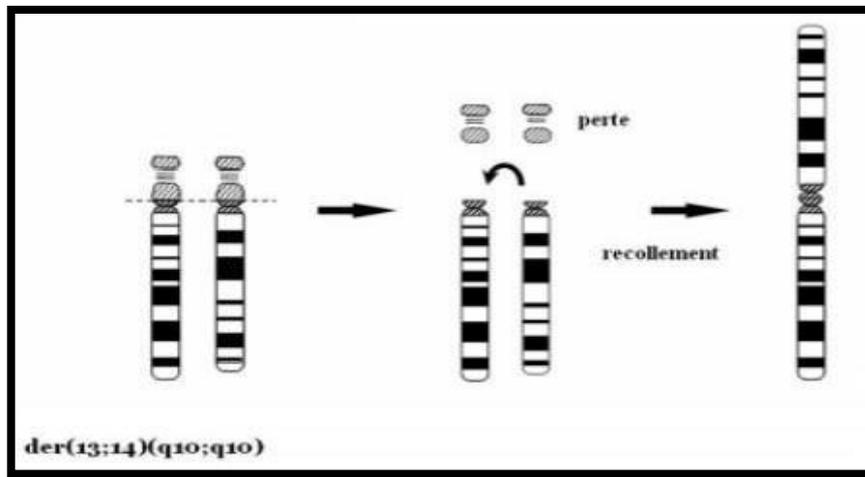
Elles sont liées à un échange de matériel entre deux chromosomes non homologues ; à la suite d'une cassure sur un bras de chaque chromosome, les fragments chromosomiques distaux aux points de cassure échangent leur position (**Harton et Tempest, 2012**). Quand de tels remaniements ne s'accompagnent d'aucune perte de matériel (translocation équilibrée) ou de dysfonctionnement génétique, le phénotype du sujet porteur de l'anomalie à l'état hétérozygote est normal. Cependant, il y a un risque important de produire des gamètes déséquilibrés. Après la fécondation, les zygotes peuvent être porteurs de monosomie ou trisomie partielle pour les segments impliqués dans la translocation (**Figure 7**) (**Briand et Mornchon-Delvalles, 2006**).



**Figure 7** : Mécanisme de formation d'une translocation réciproque (**Jeanpierre et al., 2004**).

- **Translocations robertsoniennes**

Elles résultent de la fusion centrique de deux chromosomes acrocentriques, le plus souvent les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 (**Harton et Tempest, 2012**). Les patients porteurs d'une translocation robertsonienne ont un caryotype à 45 chromosomes et un phénotype normal. En effet, la perte du bras court des chromosomes transloqués n'a pas de traduction clinique. Lors de la méiose, il existe un risque de formation de gamètes déséquilibrés donnant des zygotes trisomiques ou monosémiques pour la totalité d'un chromosome (**Figure 8**) (**Briard et Morichon-Delvallez, 2006**).



**Figure 8** : Translocation robertsoniennes entre le chromosome 13 et le chromosome 14

(Jeanpierre et *al.*, 2004)

### **// 3. Nomenclature**

D'après l'International System for Human Cytogénétique Nomenclature ou ISCN, la formule chromosomique comporte toujours en premier le nombre total de chromosomes (chromosomes sexuels compris) suivi d'une virgule puis, sans espace, de l'énumération des chromosomes sexuels.

Pour la description des remaniements, les anomalies des gonosomes sont toujours présentées en premier suivies des anomalies des autosomes qui sont répertoriées dans l'ordre croissant des numéros qui leur sont attribués, indépendamment du type de l'aberration. Pour chaque chromosome, les anomalies de nombre sont présentées avant les anomalies de structure.

La formule chromosomique est écrite d'un seul tenant, sans espace, ponctuée par des virgules. Les régions et les bandes sont numérotées du centromère vers le télomère. Pour désigner un point précis sur un chromosome il faut écrire le numéro du chromosome, le symbole du bras (p ou q), le numéro de la région, le numéro de la bande dans cette région, et éventuellement, le numéro de la sous-bande et celui de la sous-sous-bande. Dans ce cas le numéro de la bande et celui de la sous-bande sont séparés par un point (**Figure 9**) (ISCN, 2009).



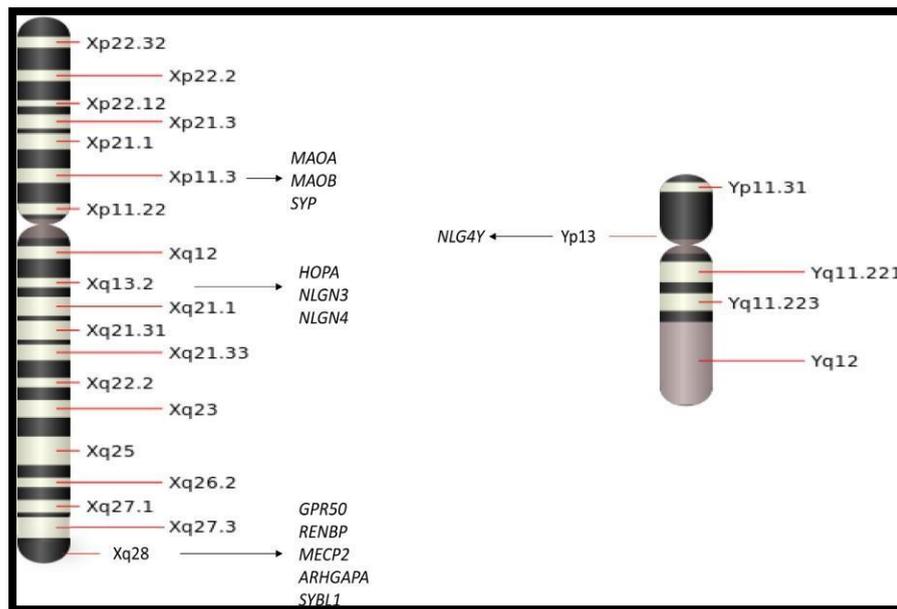


Figure 9 : Chromosome et Y (zhang et al., 2016).

### III. 4. Techniques d'études des anomalies chromosomiques

#### III.1. Cytogénétique conventionnelle

##### - Le caryotype

Le caryotype représente la technique la plus ancienne pour étudier les anomalies de nombre et de structure des chromosomes. Développé vers la fin des années 1950, le caryotype permet dans un premier temps de séparer les chromosomes et de les ranger par paires, en fonction de leur taille (7 groupes de A à G) et de la position de leur centromère (Figure 9) (Razavi-encha et al., 1988 ; Siffroi et Christin-maitre, 2006). La formule chromosomique à 46 chromosomes chez l'homme a pu ainsi être précisée par Tjio et Levan en 1956 (Tjio et Levan, 1956) et la première anomalie chromosomique a été décrite par Lejeune et al. En 1959 (Lejeune et al., 1959).

Au début des années 1970, l'utilisation des techniques de marquage ou binding a permis de révéler le long des chromosomes une alternance de bandes transversales, faiblement ou fortement colorées, dont la disposition topographique est spécifique de chaque paire chromosomique.

Parmi les techniques couramment utilisées, on peut citer le marquage en bandes G obtenu par digestion enzymatique et le marquage en bandes R obtenu par dénaturation thermique. Les bandes G correspondraient sur l'ADN à des régions riches en bases adénine-thymine, les bandes R correspondraient à des régions riches en bases cytosine-guanine (Razavi-Encha et al., 1988).

Le caryotype, comme toute analyse morphologique, est un examen très consommateur de temps et peu automatisable. Par ailleurs, lorsque l'anomalie chromosomique est de très petite taille, elle peut passer inaperçue, malgré l'observation attentive du cytogénéticien. Il y a donc un niveau de résolution au pouvoir d'observation incompressible des techniques de bandes qui est de l'ordre de 4 à 5 méga bases (Malan et al., 2007).

### **III. 2. Cytogénétique moléculaire**

La cytogénétique moléculaire est apparue au début des années 1990 pour pallier les problèmes rencontrés avec la cytogénétique conventionnelle. Les principales techniques utilisées actuellement sont l'hybridation *In situ* en fluorescence (FISH) et l'hybridation génomique comparative sur puces (CGH array).

#### **III. 2. 1. Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)**

La FISH est une technique qui permet de détecter sur une préparation cytogénétique un hybride entre une séquence d'ADN simple brin marquée, appelée sonde et sa séquence chromosomique complémentaire. Le choix du type de sondes dépend de l'application pratique et des objectifs diagnostiques. En effet, celles qui marquent les centromères permettent de compter des chromosomes dans des noyaux de cellule et par exemple, de chiffrer rapidement les mosaïques comme celles qu'on observe couramment dans le syndrome de Klinefelter. Les sondes dites de peinture marquent par définition la totalité d'un chromosome donné et permettent de préciser des remaniements chromosomiques complexes. Les sondes locus- spécifiques, quant à elles, vont pouvoir détecter des anomalies chromosomiques invisibles au caryotype standard et sont à l'origine de la description d'un nombre croissant de pathologies liées à des micro délétions ou des microduplications chromosomiques (Abdelmoula, 2004 ; Siffroi et Christin-maitre, 2006).

#### **III. 2. 2. Hybridation génomique comparative sur puces (CGH array)**

Le principe de la technique de CGH array consiste à cohybrider la même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin, marqué chacun par un fluorochrome différent, sur une lame de ver sur laquelle sont déposées des séquences d'ADN (sondes), dont la séquence et la position sur le génome sont connues. L'ensemble du dispositif est appelé puce à ADN ou microarray.



Après hybridation, les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés et un rapport de leur intensité respective (reflet du rapport de la quantité d'ADN du patient par rapport à celle du témoin) est établi au niveau de chaque fragment d'ADN fixé. Des logiciels dédiés effectuent un traitement statistique des données puis les résultats sont présentés sous forme de représentation graphique. La résolution de la puce dépend du nombre de sondes utilisées ainsi que de leur localisation sur le génome. Les premières puces furent construites avec environ 3000 fragments d'ADN d'une taille de 150 à 250, ces puces avaient une résolution d'une mégabase, soit cinq à dix fois celle du caryotype.

Aujourd'hui, les puces sont fabriquées en fixant sur les lames de verre de petites séquences d'ADN simple brin (appelées oligonucléotides). Le nombre d'oligonucléotides fixés peut atteindre des millions, générant ainsi des puces d'une résolution de moins d'un kilobase (**Malan et al., 2007 ; Malan et Romana, 2012**).

#### **IV. Syndrome de Turner**

La description du syndrome de Turner (ST) faite en 1938 par Henry Turner, associait une petite taille, un ptérygium colli, un cubitus valgus et un impubérisme. Ce n'est qu'en 1957 que C. F. Ford a découvert l'anomalie chromosomique qui est une monosomie de l'X représentée par la formule 45, X. Par la suite, d'autres anomalies ont été décrites telles que délétion, isochromosome, chromosome dicentrique et mosaïque de l'X et de l'Y. Le tableau clinique s'est donc diversifié.

Le ST atteint essentiellement les filles, cependant des anomalies chromosomiques similaires peuvent se rencontrer chez le garçon par une mosaïque 45, X, associées à une délétion du bras court du chromosome Y ou un chromosome Y en anneau). Certains d'entre eux, présentant une malformation importante des organes génitaux, sont élevés comme des filles.

##### **IV. 1. Épidémiologie**

A la naissance, la prévalence du ST est de 1/2500 nouveau-nés de sexe féminin. Durant la grossesse, la quasi-totalité des embryons atteints de ST est éliminée *in utero* et représente 10 à 20 % des avortements spontanés précoces. On estime qu'environ 1 % seulement des monosomies de l'X sont viables et l'on peut se demander si les patientes 45, X ne sont pas en fait des mosaïques non détectées. Différentes études ont montré qu'en diversifiant les tissus analysés (lymphocytes, fibroblastes) et les techniques utilisées, la proportion de mosaïques mise en évidence augmente et le pourcentage de mosaïque diffère d'un tissu à un autre. Il reste cependant des patientes chez lesquelles on ne retrouve que des cellules 45, X (**Cabrol, 2006**).

## **IV.2. Diagnostic**

Le diagnostic anténatal du ST est possible durant la grossesse. Il est évoqué devant des anomalies échographiques, principalement une augmentation de l'épaisseur de la clarté nucale ou un aspect d'hygroma, un œdème plus ou moins généralisé, voire une anasarque et confirmé par un caryotype.

Le diagnostic de ST doit donc être systématiquement évoqué devant toute fille de petite taille inexplicée au cours d'un bilan classique de retard statural quelles que soient les tailles parentales. La présence de signes mineurs peut aider à évoquer le diagnostic thorax large, mamelons écartés, cou court, anomalies osseuses, pathologie ORL.

Il est important de noter qu'un ST peut être transmis d'une mère à sa fille en cas d'anomalie du chromosome X, telle qu'une délétion ou un X en anneau. Seul le petit chromosome X en anneau a un caractère péjoratif sur le développement intellectuel.

Dans tous les cas, l'anomalie chromosomique doit être confirmée après la naissance par un caryotype avec FISH et les conséquences de cette anomalie doivent être réévaluées.

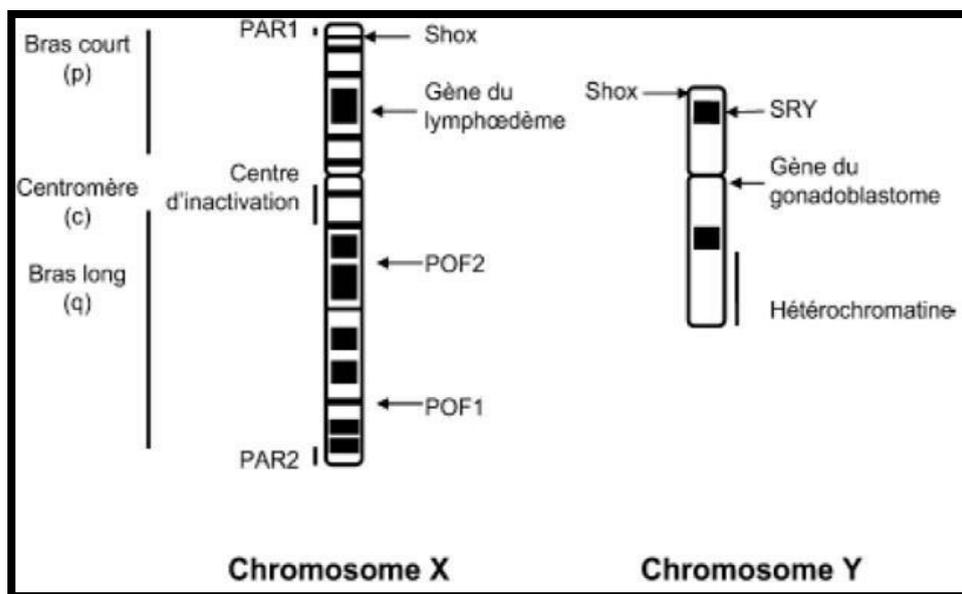
L'âge au diagnostic et le pourcentage des anomalies caryotypiques se sont modifiés avec le temps. Actuellement, les monosomies sont moins fréquentes à l'inverse des anomalies de l'X et des mosaïques (**Cabrol, 2006**).

## **IV.3. Etiologie et physiopathologie**

Le ST est lié soit à une monosomie de l'X (45, X), à une anomalie de structure du chromosome X ou à une mosaïque. Le phénotype des patientes présentant un ST résulterait de l'absence d'un chromosome sexuel ou d'une haploinsuffisance de gènes échappant au mécanisme de l'inactivation de l'X (**Figure 10**). L'analyse des différents phénotypes cliniques comparés aux variations observées en génétique et en biologie moléculaire (délétion, point de cassure) a permis de préciser des zones du chromosome X impliquées, notamment dans la taille et dans la fonction ovarienne :

- La perte de la partie distale de l'X entraîne une petite taille ainsi que des anomalies squelettiques typiques du ST liées à l'haploinsuffisance du gène *SHOX* situé dans la région pseudo-autosomale de l'X (Xp11-22) et de l'Y (Yp11). La petite taille serait dû aussi à l'aneuploidie.

- Le maintien de la fonction ovarienne est lié à l'existence de gènes *POF1* et *POF2*, situés en Xq26 et Xq13-21 respectivement. D'autres gènes sont présents sur le bras court et en dont la délétion implique une puberté spontanée, avec possibilité de grossesse et une ménopause précoce. Seule une délétion distale du bras court est compatible avec une fonction ovarienne normale.
- Le lymphœdème congénital serait lié à la région Xp11.4. Les malformations cardiaques et la coarctation de l'aorte sont plus fréquentes en cas de monosomie (45X).
- La délétion du gène *SRY* (testis-determining factor) sur le bras court du chromosome Y peut entraîner un phénotype typique de ST. En effet, 7 à 12 % des ST ont une mosaïque du chromosome Y. Ces patientes sont à risque de gonadoblastome, estimé entre 7 et 30 %. La recherche de matériel Y est conseillée dans tous les cas de monosomie de l'X.



**Figure 10 :** Chromosomes X et Y. PAR = régions pseudoautosomales. Le gène SHOX est commun à l'X et à l'Y. POF = primary ovarian failure. SRY = testis-determining factor



Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de cytogénétique du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC) d'Alger, du mois de février au mois de mai 2019. Nous avons réalisé une étude rétrospective et prospective concernant des patientes adressées, à cette unité, pour suspicion d'un syndrome de Turner. Le diagnostic est confirmé ou infirmé par une analyse cytogénétique classique (caryote en bande R) ou moléculaire (FISH).

Concernant l'étude rétrospective, nous avons pris en compte tous les patients, orientés au laboratoire, par les différents hôpitaux algériens aussi bien du secteur privé que publique. Nous avons travaillé sur un effectif total de 489 patients, colligés durant une période de 8 ans, du 1 Janvier 2010 au 31 Décembre 2018.

## **I. 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 d'un 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 héparinate de lithium. Le sang peut être conservé 15 jours à +4°C.

### **I.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 sont résumées dans l'annexe 3.

## **II. 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.

Cependant la résolution de ce dernier demeure insuffisante pour la détection des microremaniements 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.

## **II. 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 :

### **▪ Préparation des tubes pour la mise en culture :**

Dans un Erlen Meyer stérile contenant un barreau aimanté, 120 ml de milieu TC complet, 250µL 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 0,2ml 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 tubes coniques de 15 ml pour chaque échantillon, 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.

### **▪ 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 : prénom, nom et date du prélèvement), ajouté 700ul 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 500ul 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 100ul 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 65ul 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 sortie les tubes de l'étuve, ajouter 2ml de Carnoy (1/3 acide acétique et 2/3 méthanol) dans chaque tube et vortex er. Le Carnoy permet l'arrêt du choc hypotonique par acidification du milieu. Les tubes sont centrifugés à 1200 tr/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 vortex puis centrifugé à 1200 tr/min pendant 4minutes. 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 -20°C jusqu'à étalement.

- **Étalement**

Des lames sont plongées dans un bac rempli d'eau distillée, puis conservé 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.

## **II. 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 choriales 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. Le protocole est le suivant :

- **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 100 ml 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.

### **II. 3. Hybridation *in situ* fluorescente ou FISH**

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). 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. 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 Homogénéiser. 10ul 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 rober ciment et laisser sécher.

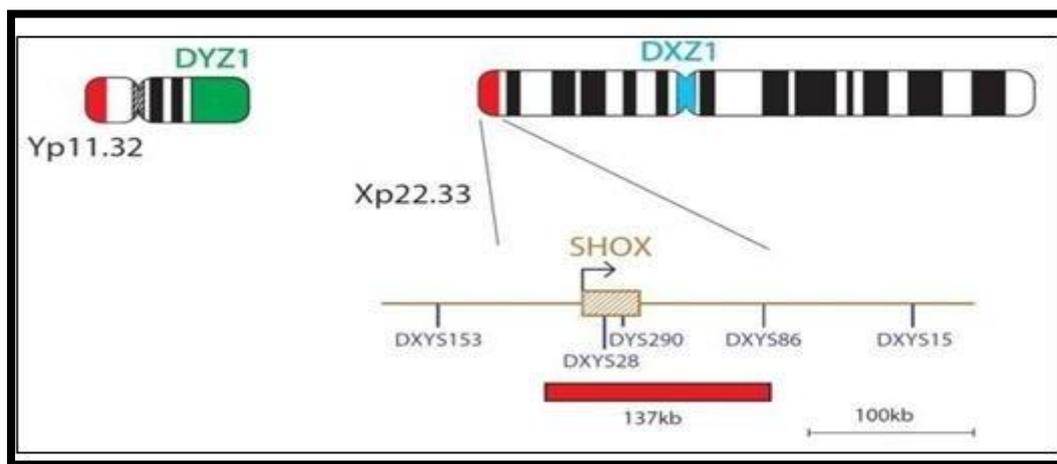
- **Dénaturation**

La dénaturation de la sonde et l'échantillon se fait simultanément en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

- **Hybridation**

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, la lame est incubée pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

La sonde est fournie prête à l'emploi (50µl ou 100µl par tube) dans le tampon d'hybridation (formamide sulfate de Dextran SSC). Dans notre étude, nous avons utilisé la sonde Xp22



**Figure 11** : Sonde Xp 22 qui couvre l'extrémité télomérique du gène *SHOX*,

Le gène *SHOX* est situé sur le bras court du chromosome X en rouge, la région DXZ1 en bleu, et la région DYZ1 en vert qui servent de contrôle.

- **Lavages post-hybridation**

Les lames sont lavées, en premier lieu, avec du tampon SSC 0.4x pH 7.0 à 72°C pendant 2 minutes, deuxièmement avec du tampon SSC 2x, 0.05 % Tween-20 pH 7.0 à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation. Les lames sont séchées, puis on applique 10µl 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 température ambiante.

## **I. Caractéristiques générales de population**

### **I.1. Répartition des patients selon le diagnostic cytogénétique et moléculaire**

Dans notre série, nous avons 489 patientes avec suspicion de syndrome de Turner, qui ont été adressées au laboratoire de génétique pour un caryotype. Les résultats de cette recherche montrent que parmi les 489 patientes, 76.02% (n=372) d'entre elles présentaient une formule chromosomique féminine normale (46, XX), après réalisation d'un caryotype et une FISH. 23.92% des patientes présentaient une formule caryotypique anormale en faveur d'un Turner (n=117) (**Tableau I**).

<b>Effectif total</b>	<b>Turner</b>	<b>Non Turner</b>
<b>489</b>	<b>117</b>	<b>372</b>
<b>100%</b>	<b>23.92%</b>	<b>76.02%</b>

**Tableau 1** : Résultats du diagnostic génétique

Les analyses cytogénétiques et moléculaires ont donc permis de mettre en évidence 117 cas de syndrome de Turner. Un diagnostic posé devant le résultat :

- Un caryotype anormal concernant 63.24% des cas (n=74)
- Un caryotype normal et une FISH positive concernant 36.75% des cas (n=43)

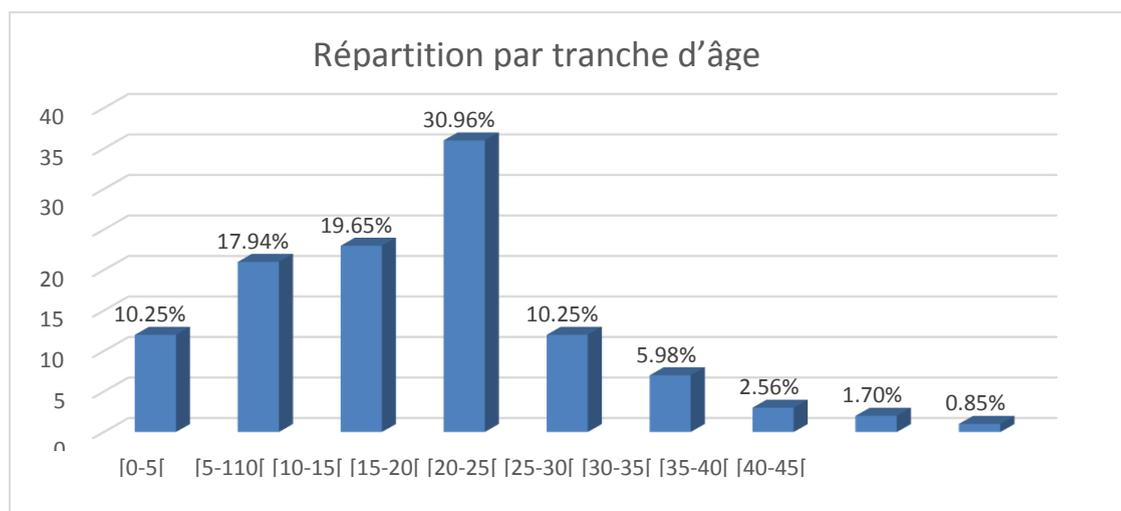
L'analyse moléculaire par FISH est établie dans les cas suivants :

- Complément à l'étude cytogénétique
- Eliminer une mosaïque dans le cas du syndrome.
- Dépistage d'anomalie chromosomique spécifique.
- Phénotype suggérant une micro-délétion chez le malade (la présence ou non du gène (*SHOX* dans RSP).

Nous constatons que devant un caryotype normal et une clinique en faveur d'une anomalie pathologique, une analyse par FISH s'impose. Les résultats obtenus mettent la lumière sur l'efficacité de cette approche diagnostique.

## I.2. Répartition des Turnériennes en fonction de l'âge à la consultation

La moyenne d'âge des patientes, diagnostiquées pour un syndrome de Turner est de 15 ans. La patiente la plus âgée avait 45ans et la plus jeune 3 mois. Ceci dit la fourchette d'âge s'étale de la période néonatale à l'âge adulte passant par la période pubère (**Figure 12**).



**Figure 12** : Répartition des patientes turnériennes selon l'âge lors du diagnostic

L'analyse de l'histogramme révèle que :

- 10,25% des patientes turnériennes ont bénéficié d'un diagnostic précoce avant l'âge de 5 ans.
- 68,37% des patientes turnériennes ont consulté pendant la période pubère, entre 5 et 20 ans.
- 16,23% des patientes turnériennes ont consulté entre 20 et 30 ans, période de problèmes de fertilité du couple.

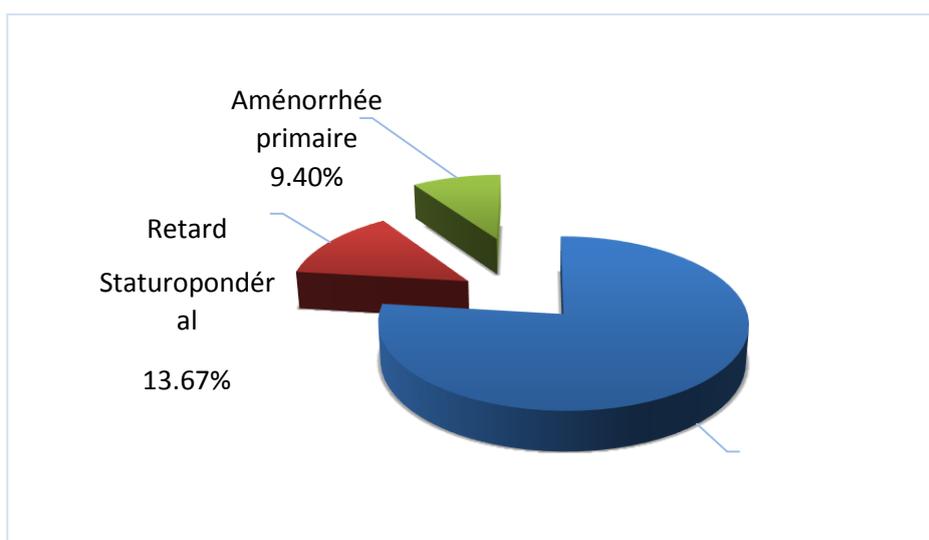
Ces résultats, elle paraît similaire à l'étude européennes (**Gravholt, 2004**), si on considère tous les cas colligés au CPMC d'Alger de 2010 jusqu'à 2018. Actuellement grâce à exploration précoce des retards de croissance chez les enfants le chiffre a nettement diminué (**Massa et al., 2005**).

Le constat fait que les patientes turnériennes consultent à des âges différents selon les signes cliniques. Cependant, nos données montrent également que dans cette cohorte, environ 76.92% des filles atteintes de TS sont diagnostiquées au-delà de 15ans, la plupart d'entre elles présentant un déficit de taille élevé. Ces patients ont manqué l'opportunité d'un traitement précoce par la GH, permettant une normalisation de la taille pendant l'enfance et une induction appropriée de la puberté (**Massa et al., 2003**), probablement plus de patients sont actuellement diagnostiqués plus tôt. Par ailleurs, des études ont montré qu'un nombre important de patients atteints de TS étaient diagnostiqués à l'âge adulte (**Ostberg, 2003**).

### **I. 3. Répartition des turnériennes selon le motif de consultation**

La consultation en génétique avec suspicion du syndrome de Turner, a pour principal motif un retard de croissance ou un syndrome dysmorphique chez les enfants. Chez les patientes âgées de plus de 20 ans la principale motivation pour l'étude du caryotype est la présence d'une anomalie de la reproduction. Le diagnostic tardif se fait sur le retard statural avec insuffisance ovarienne périphérique et possibilité de démarrage spontané de la puberté (Zhdour-Neffous *et al.*, 2014).

La répartition des patientes turnériennes selon le motif de consultation est illustrée dans la figure 13. Il ressort de l'analyse de cette figure que :



**Figure 13** : Répartition des patientes selon le motif de consultation.

Dans notre population, le syndrome de Turner est le motif de consultation principal, avec un pourcentage de 76.92%, le retard staturo-pondéral existe chez 13.67 % alors que sa fréquence est estimée à 95 à 100% dans d'autres études. Cela est lié à la présence de nombreux cas de mosaïque faible chez des patientes de taille normale (Massa *et al.*, 2005).

### **I.4. Répartition des patientes selon la formule du caryotype**

Les résultats du caryotype révèlent que la majorité des patientes avaient un caryotype en mosaïque (47%). Il s'agissait d'une monosomie 45, X dans 32 % des cas. Les anomalies de structure représentaient 21 % des cas étudiées (Figure 13 et tableau II).

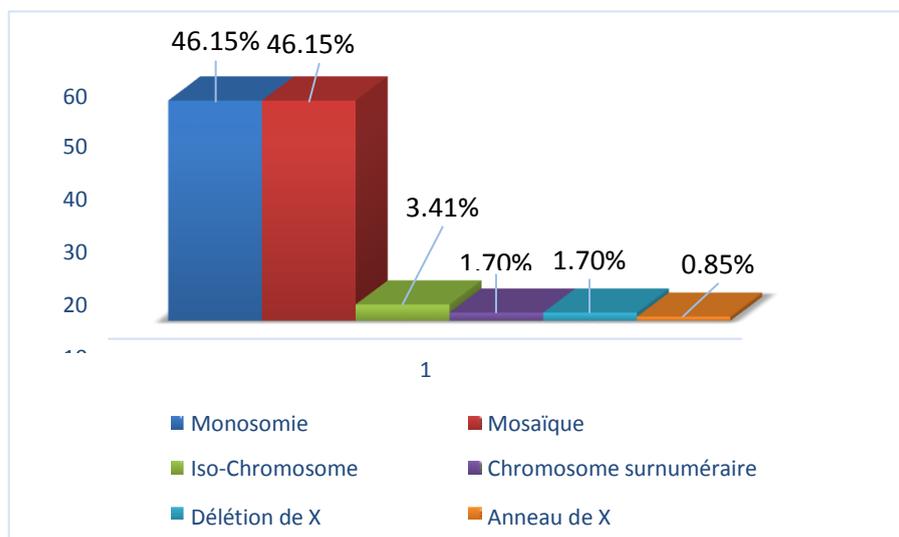


Figure 14 : Répartition des différentes anomalies caryotypiques.

Formule de caryotype		Nombre de cas	Pourcentage	
Monosomie 45X	45X	54	46.15%	
Mosaïque	46, XX/45, X	47	40.17%	46.15%
	47, XXX/45, X	1	0.85%	
	46, XY/45, X	1	0.85%	
	46, XX/46, XY/45, X	2	1.70%	
	47, X XX/46, XX/45, X	3	2.56%	
Délétion de X	46, <u>XXdel X</u> (p22)	1	0.85%	1.70%
	45, X/46, X <u>del X</u> (q 10)	1	0.85%	
Iso-chromosome de X	45,X/46,XXisoX(q10)/46,XX/45,XisoX(q10)	1	0.85%	3.41%
	46,XXisoX/45X	2	1.70%	
	46, XX/45, X /46, <u>XisoX</u>	1	0.85%	
Anneau de X	46, X, r(X)/45, X	1	0.85%	
Chromosome Surnuméraire	46, XX /47, <u>XX+Xq</u>	1	0.85%	1.70%
	46, XX /47, <u>XX+Xq</u> /45, X	1	0.85%	
Totale		117	100%	

**Tableau 2 :** Formules du caryotype des patientes turnériennes.

L'analyse du tableau nous permet de distinguer deux types d'anomalies chromosomiques : les anomalies de nombre et les anomalies de structure. Dans notre étude, les différentes formules chromosomiques concernant les anomalies du nombre étaient hétérogènes. En effet :

- 54 patientes, soit 46.15 % présentaient une formule chromosomique typique du syndrome de Turner, une monosomie 45, X. La littérature avance des proportions de l'ordre de 50 à 60% (Masson).
- 54 patientes présentent une formule chromosomique en mosaïque, avec des anomalies de nombre et de structure du chromosome X et même du chromosome Y soit 46.15% La mosaïque la plus fréquente est 45, X/46, XX avec une fréquence de 40.17% les proportions respectives des deux clones détermineraient en principe un phénotype intermédiaire entre la turnérienne et la fille normale (Zhdour-Neffous *et al.*, 2014).

Le caryotype typique est 45, X. Il s'agit d'un caryotype homogène et il représente 42-48 % des anomalies chromosomiques décrites dans selon la littérature (Gravholt, 2004). Les taux que nous avons retrouvé sont dans la fourchette décrite. La fréquence des anomalies de structure retrouvées dans notre étude (21 %) est semblable à celle rapportée par Chaabouni (2001).

Cependant il ne faut pas compter sur une telle corrélation car les pourcentages des cellules normales notés dans les tissus accessibles ne correspondant pas forcément à ceux des autres tissus. Ainsi il est intéressant chez les turnériennes d'étudier un second tissu notamment les fibroblastes de la peau, et ceci à chaque fois qu'une discordance est observée entre le phénotype et le caryotype (Kesler, 2007). Concernant les anomalies de structure, nous avons obtenu :

- 04 patientes présentent un iso-chromosome pour le bras long du chromosome X, soit 3.41%.
- 02 cas ont une délétion du bras long et du bras court du chromosome X, soit 1.70%.
- 02 cas ont un chromosome X surnuméraire, soit 1.70%.
- 01 cas de chromosome X en anneau a été identifié, correspondant à la fréquence de 0.85%.

Concernant les anomalies de structure du chromosome X, l'iso chromosome, la délétion du X, chromosomes surnuméraires et la forme en anneau du X sont simplement acceptable au taux décrit dans la littérature (Zelinska *et al.*, 2018).

Les turnériennes ont souvent une petite taille arrivant à 20cm au-dessous de la moyenne de la taille adulte dans la population générale féminine (**Gravholt, 2004**). Il est admis que les délétions distales du bras court de l'X entraînent une insuffisance staturale (**Bondy, 2007**)

## II. Analyse cytogénétique

Le caryotype standard a été effectué pour l'ensemble des 489 patientes, parmi les caryotypes pathologiques nous avons choisi 5 patientes présentant différentes anomalies chromosomiques :

**Tableau 3** : Formule de caryotype des patientes choisies pour l'analyse cytogénétique

Age	Diagnostique	Anomalie Chromosomique et formule de caryotype
8 ans	ST	<b>Délétion</b> 46,XX,ish del(Xp22)SHOX- <i>FISH</i>
4 ans	ST	Chromosome Xen anneau 46,XX rX[05] /45,X[08] <i>FISH</i>
12 ans	ST	Isochromosome X 45,X[65]/46,XXisoX(q10)[28]/46,XX[8]/45,XisoX(q10)[3] <i>FISH</i>
8 ans	AM	Chromosome surnuméraire 46, XX [89] /47, XX+Xq [11]/47, XX+Xp[17]/45X[6]
11 ans	ST	Mosaïque 45,X[50]/46,XX[50]

## II. 1. Caryotype mosaïque

Patiente âgée de 11 ans avec formule caryotypique 45, X [50] /46, XX [50]

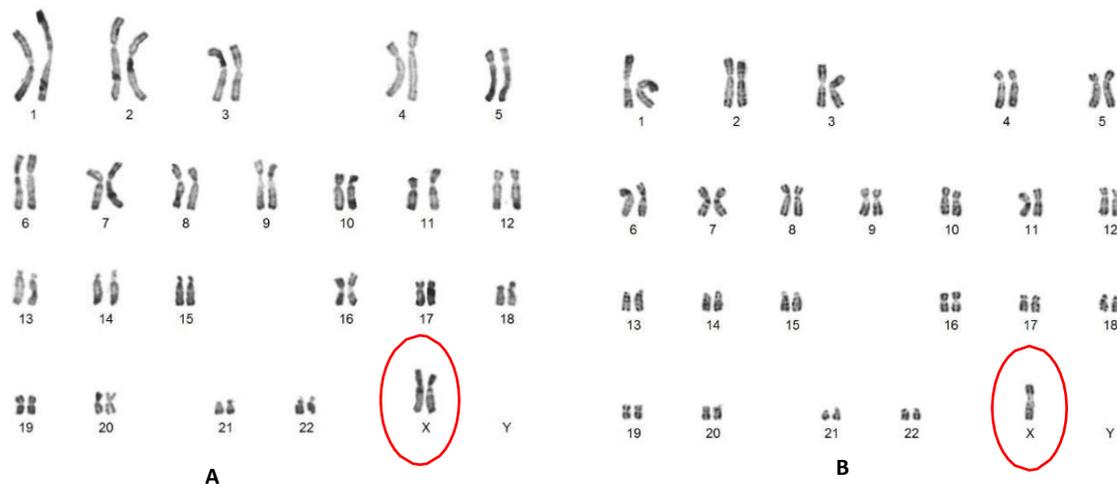


Figure 15 : Caryotype en mosaïque de la patiente N° 1.

(A) Caryotype normal ; (B) monosomie du X.

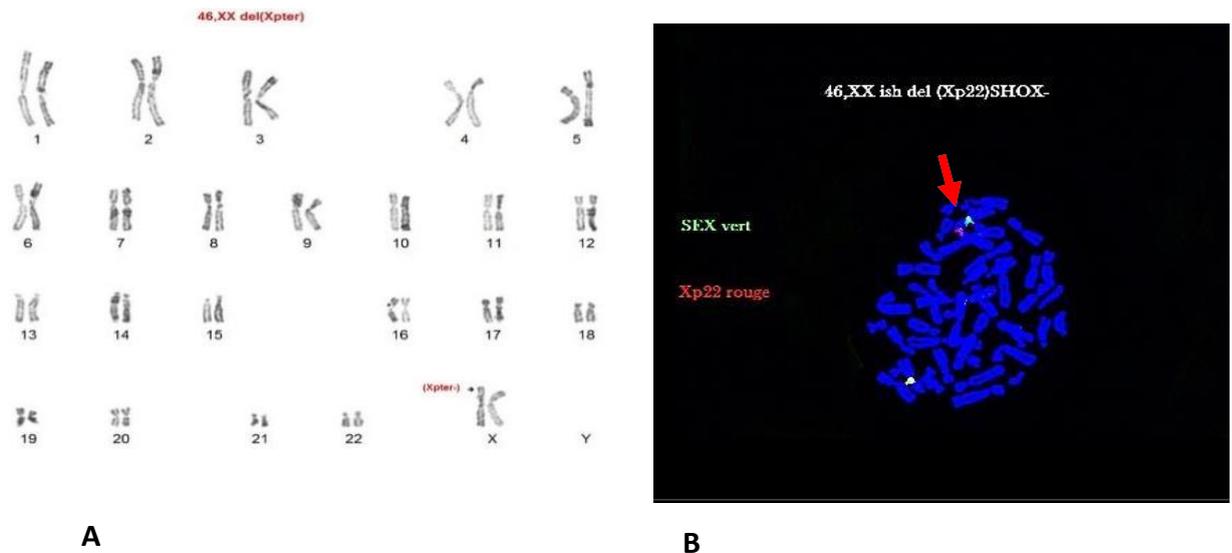
La patiente âgée de 11 ans a été adressée au service de génétique pour un retard stature-pondéral avec une dysmorphie en faveur d'un syndrome de Turner. Les résultats des différentes investigations médicales sont les suivants :

- Radiologie : Age osseux de 08 ans
- Échographie cardiaque : pas de cardiopathie
- Étude cytogénétique (**Figure 15**) : existence de deux populations de cellules ; cellules normales 46, XX et cellules anormales présentant une monosomie X dans 50/100 des cas

Ces résultats confirment le syndrome de Turner en mosaïque à 50/100.

## II. 2. Délétion

Patiente âgée de 8 ans dont le caryotype est 46, XX, ish del (Xp22) SHOX- [ST] (**Figure 16**).



**Figure 16** : Caryotype de la patiente N°2

(A) Caryotype standard montrant une délétion Xpter ; (B) Délétion du gène SHOX mis en Évidence par FISH

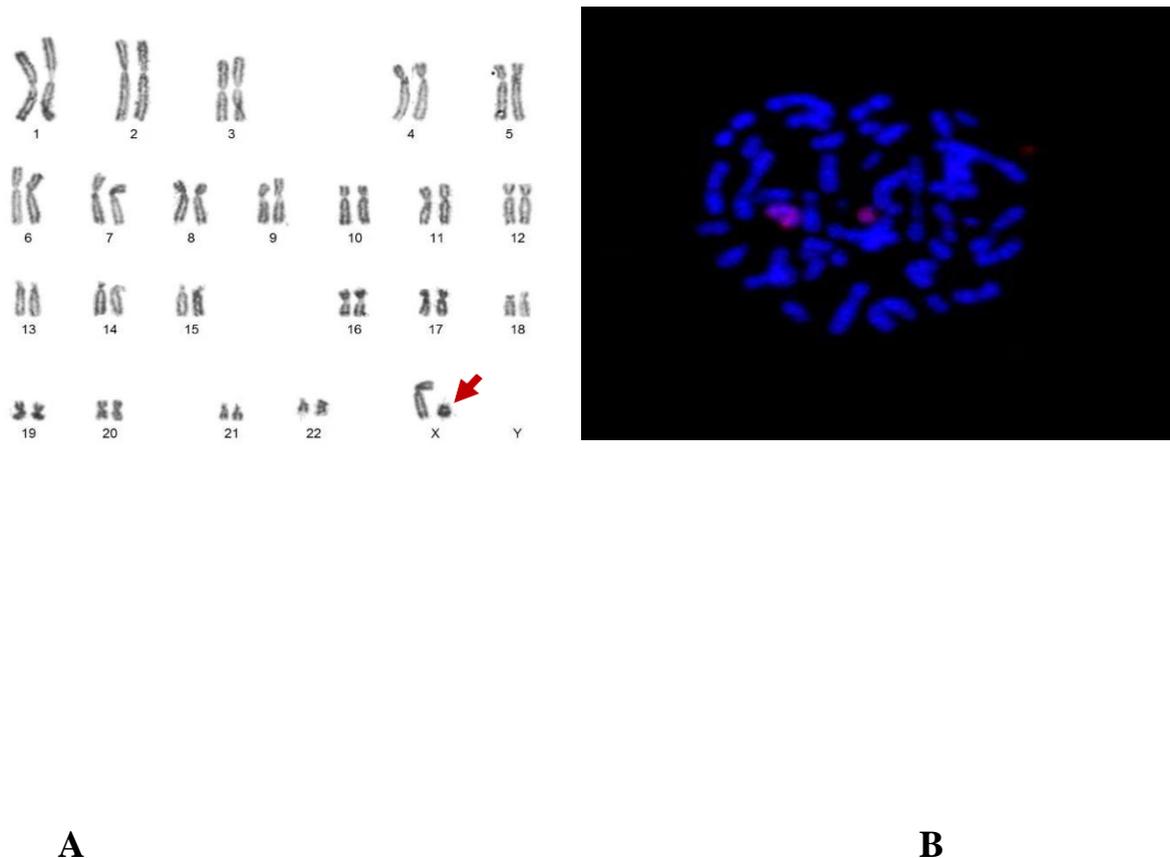
Cette patiente a été adressée au laboratoire de cytogénétique pour une suspicion d'un syndrome de Turner. Devant ces signes cliniques nous avons réalisé chez cette patientes un caryotype standard, l'analyse de 20 caryotypes en bandes R montre une délétion Xpter.

Nous avons réalisé l'hybridation in situ en utilisant une sonde Xp22 coloré en rouge qui nous renseigne sur l'existence du gène *SHOX* du chromosome X et SEX qui colore le centromère en vert qui nous confirme qu'on est sur le chromosome X.

La présence d'un seul signale rouge et de deux signaux verts, nous indique la délétion du gène SHOX (Xp22) qui est responsable de différents signes cliniques retrouvées chez la patiente.

### II. 3. Chromosome en anneau

Patiente âgée de 04 ans ayant un caryotype 46,XX Rxd(05) /45,X(08) [ST] (**Figure 17**)



**Figure 17 :** Caryotype de la patiente №3.

(A) Chromosome X en anneau; (B) FISH utilisant la sonde wholeX

La patiente K.S âgée de 04 ans a été adressée au laboratoire pour confirmer son diagnostic (ST). Une étude cytogénétique a été réalisée et a révélé l'existence d'un chromosome X en anneau sur toutes les cellules analysées.

Une étude par FISH a été réalisée en utilisant la sonde wholeX qui colore le chromosome X en rouge pour s'assurer de la forme en anneau du chromosome X.

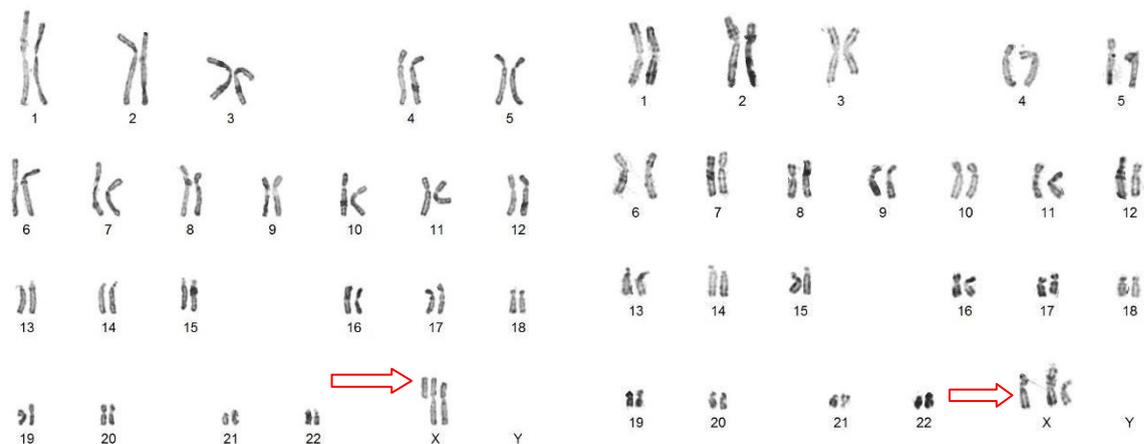
### II. 4. Chromosome surnuméraire

La patiente âgée de 8ans adressée à nos soins pour étude cytogénétique vu la symptomatologie qu'elle présente et qui évoque le syndrome de Turner avec un retard staturo-pondérale et une cardiopathie retrouvée à l'échocardiographie.

Une étude cytogénétique a été réalisée et a montré l'existence de plusieurs formules

chromosome à des pourcentages différents confirmant le syndrome de Turner sous l'une de ses formes les plus rares (**Figure 18**) :

- ✓ 46, XX [89] /47, XX+Xq/47, XX+Xp [17] /45X [6]
- ✓ 46, xx cellules normales
- ✓ 47, xx+xq cellules présentant un bras long du chromosome x en plus
- ✓ 47, xx+xp cellules présentant un bras court du chromosome x en plus
- ✓ 45, x cellule présentant une monosomie x



**Figure 18** : Caryotype de la patiente N°4.

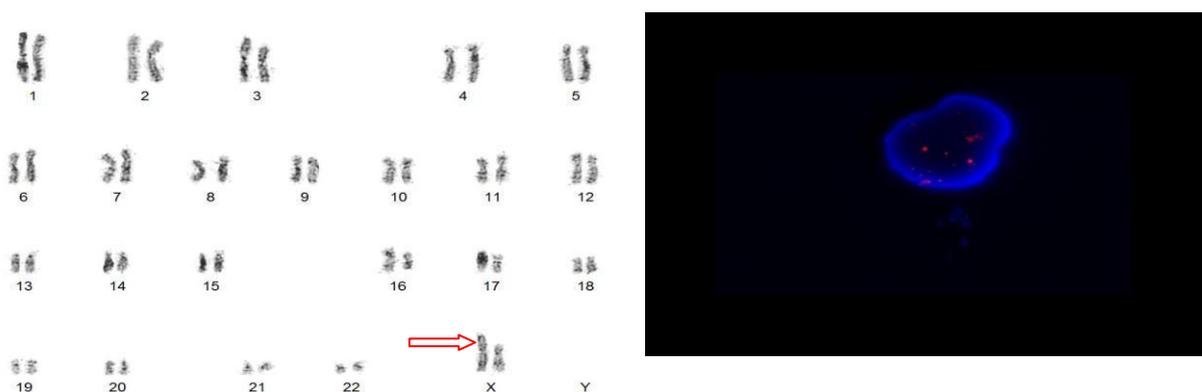
Chromosomes surnuméraires en (A) et en (B).

## II. 5. Iso chromosome

La patiente est âgée de 12 ans adressée au service pour retard staturo- pondéral avec dysmorphie un pterygium collie et une cardiopathie pour une étude cytogénétique. Le caryotype standard a été réalisé a retrouvé un iso chromosome X sur toute les cellules analysées (**Figure 19**) :

- ✓ 46, XXisoX (q10 ; q10), c'est à dire avec un chromosome X normale et le deuxième chromosome X ayant perdu son bras cours qui contient le gène *SHOX* mais qui a deux bras longs qui sont en iso c'est dire en miroir.

Une étude par FISH en utilisant la sonde Xqter montre l'existence de trois signaux aux lieux de deux signaux confirmant ainsi l'existence d'un iso chromosome.



**Figure 19** : Caryotype de la patiente N°5.



Le syndrome de Turner n'est pas rare dans notre population. Vu l'impact psycho-social qu'elles induisent chez les patientes atteintes, elles nécessitent un diagnostic précoce et une prise en charge particulière. L'étude cytogénétique est une étape incontournable pour poser le diagnostic devant une toute suspicion de ce syndrome. La mise en évidence d'une anomalie chromosomique permet d'instaurer une prise en charge adaptée et prodiguer un conseil génétique adéquat. Malgré la résolution limitée du caryotype, il reste à ce jour la technique de première intention pour diagnostiquer les malades qui présentent des signes d'appels d'anomalies gonosomiques.

L'étude rétrospective sur le syndrome de Turner que nous avons réalisé a montré qu'un diagnostic précis en faveur d'un syndrome de Turner a pu être posé pour 23.92% des patientes. Ces dernières avaient une moyenne d'âge de 15ans et ont été adressées en Génétique pour des motifs liés au phénotype turnérien (76.12%) au retard staturo-pondéral et une aménorrhée (13.67-9.40%).

Les monosomies et les mosaïques prévalaient dans notre étude et d'autres anomalies ont aussi été mises en évidence telles que les isochromosomes (3.41%), les délétions, les chromosomes surnuméraires (1.70%) et le chromosome X en anneau. Pour les patientes ayant un phénotype turnérien et un caryotype normal une FISH fut réalisée et l'on a noté l'absence du gène SHOX pour certaines de ces patientes.

Ces résultats mettent l'accent sur l'importance du diagnostic moléculaire par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Cette dernière nous renseigne sur les régions chromosomiques étudiées, soit en fonction d'un tableau clinique évocateur d'un syndrome, soit pour vérifier la présence ou l'absence d'une anomalie chromosomique suspectée après l'étude du caryotype en bandes. En effet, sans orientation clinique ou cytogénétique préalable, la FISH est peu informative.

Devant de telles situations, des techniques plus résolutes, comme la CGH Array et la biologie moléculaire pourraient être d'apport certain.

Finalement il est souhaitable de prévoir la création des centres agréés de dépistage prénatal des anomalies chromosomiques et l'introduction des nouvelles techniques de cytogénétique moléculaire serait d'un grand intérêt pour la mise en évidence des anomalies chromosomiques.

- Ahzade,H.,Ramli,S.F.,Loong,T.M.,Salahshourifar,I. ,Zilfalil,B.A.,&Yusoff,N.M.(2010 ).De novo ring chromosome 6in a child with multiple congenital anomalies.*The kobe journal of medical sciences*,56(2),E79-84.
- Baudry,J-R.(1985).*Génétique générale*.(Décarie & Maloine,Eds.)(p.501).Paris.
- Bergère,M.,Bailly,M.,Molina-gomes,D.,Vialard,F.,&Selva,J.(2006).Prise en charge actuelle du syndrome de Klinefelter en assistance médicale à la procréation.*mt médecine de la reproduction*,8 ,218-224.
- Bondy C., Baena N., Bakalov V.K., and al. Care of girls and women with Turner syndrome: A guideline of the Turner syndrome study group *J Clin Endocrinol Metab* (2007) 92 : 10-25
- Bondy, C.( 2014). Recent Developments in Diagnosis and Care for Girls in Turner Syndrome [WWW Document]. Adv. Endocrinol.
- Briard, M., &Morichon-Delvallez,N. (2006).Anomalies chromosomiques. *Elsevier Masson*, (353213) ,1-4.
- BUMED T(2013)AUGER\_JULIE.pdf, n.d.
- Cabrol,S.(2006).Syndrome de Turner .Encyclopédie Orphanet,
- Cabrol, S.(2008). Le syndrome de Turner. /data/revues/00034266/00680001/2/.
- Chaabouni H., Chaabouni M., Maazoul F., M'Rad R., Jemaa L.B., Smaoui N., and al. Prenatal diagnosis of chromosome disorders in Tunisian population *Ann Genet* (2001) ; 44 : 99-104
- Ganapathy, R., Guven, M., Sethna, F., Vivekananda, U., Thilaganathan, B. (2004). Natural history and outcome of prenatally diagnosed cystic hygroma. *Prenat. Diagn.* 24, 965–968.
- Gravholt, C.H. (2004). Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 151, 657–687.
- Harry,M.(2008).*Génétique moléculaire et évolutive*.(Maloine,Ed.)*Maloine* (2<sup>nd</sup> ed. , Vol.1,p.336).Paris.doi :2224029500
- Hartl,D-L.,&Jones,W-E.(2003).Génétique :Les grands principes.3eme éd.*Dunod*.(Paris)609,73-120.
- Harton, G.L., &Tempest,H.G.(2012).Chromosomal disorders and male infertility.*Asian journal of andrology*,14(1),32-9.
- Jambon,A.-C.,Tillouche,N.,Valat,A.-S.,Guionnet, B.,&Puech,F.(1998).*Les triploïdies* .*Gynécologie ,obstétrique & biologie de reproduction*,(510694),53-43.

- Jeanpierre, M. (2004). Génétique médicale: formelle, chromosomique, moléculaire, clinique. Elsevier Masson. Encyclopédie Orphanet Grand Public Maladies Rares
- Jorde, L-B., Watkin, W-S & Bamshad, M-J. (2001). Population genomics : a bridge from evolutionary history to genetic medicine . *Hum Mol Genet.* 10 :2199-2207.
- Kesler, S. (2007). Turner Syndrome. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 16, 709–722.
- Koumbaris, G., H. Hatzisevastou-Loukidou, A., A., Ioannides, M., Christodoulou, T., Fitzgerald et al. (2011). FoSTeS, MMBIR et NAHR dans la région Xp proximale humaine et les mécanismes de formation de l'isochromosome Xq humain. *Génétique moléculaire humaine*, 20 (10), 1925-1936.
- Lejeune, J., Turpin, R., & Gautier, M. (1959). Chromosomic diagnosis of the mongolism . *Arch. Fr. Pediatr* , 16, 962-963.
- Malan, V., Lapierre, J-M., Vekemans, M., & Romana, S.P (2007). La CGH array : un bouleversement de la pratique hospitalière en cytogénétique. *Irbm*, 28(5-6), 245-251.
- Malan, V., & Romana, S. (2012). Diagnostic des anomalies chromosomique par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la société française de pédiatrie*, 19(4), 437-42.
- Massa, G., Verlinde, F., Schepper, J.D., Thomas, M., Bourguignon, J.P., Craen, M., Zegher, F. de, François, I., Caju, M.D., Maes, M., Heinrichs, C. (2005). Trends in age at diagnosis of Turner syndrome. *Arch. Dis. Child.* 90, 267–268.
- Meijer, L., Jezequel, A & Roberge, M. (2003). Cell Cycle Regulators as Therapeutic Targets. *Progress in Cell Cycle Research. Life in Progress, Roscoff.* 5 :311-326
- Ravel, C., Chantot-Bastarud, S., & Siffroi, J.-P (2004). Aspects moléculaires du déterminisme sexuel : régulation génique et pathologie. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 32(7-8), 584-594.
- Ravel, C., & Siffroi, J.-P. (2009). Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner. *Gynécologie, obstétrique & fertilité*, 37(6), 511-8.
- Razavi-encha, F., Raoul, O., & Lescs, M. (1988). Caryotype : indications variations normales et pathologique. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 2, 81-87.

- Brothman, AR, personnes, DL, et Shaffer, LG (2009). Evolution de la nomenclature: Modifications de l'ISCN de l'édition 2005 à l'édition 2009. Recherche cytogénétique et génomique , 127 (1), 1-4.
- Siffroi, J., & Christin-maitre, S. (2006) Aspects moléculaire des anomalies génétiques rencontrées dans 1 \*infertilité humaine : des chromosomes aux gènes. *mt médecine de la reproduction*, 8,311-319
- Stewart,F.(2010).The anatomy of a chromosom.*TheUlster medical journal*,79(3),110-3.
- Storchova,Z.,&Kuffer,C.(2008).The consequences of tetraploidy and aneuploidy.*Journal of cell science*, 121(Pt23),3859-66.
- Tjio,J.,& Levan,A. (1956)The chromosome number in man.*Heritaas*,42,1-6 .
- Winter,G&Riechmann,L. (2006). Early proteine evolution : building domains from ligand-binding polypeptide segments.*G .J Mol Biol*.363(2) :460-8
- Zelinska, N., Shevchenko, I., Globa, E.(2018). Nationwide Study of Turner Syndrome in Ukrainian Children: Prevalence, Genetic Variants and Phenotypic Features. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 10, 256–263.