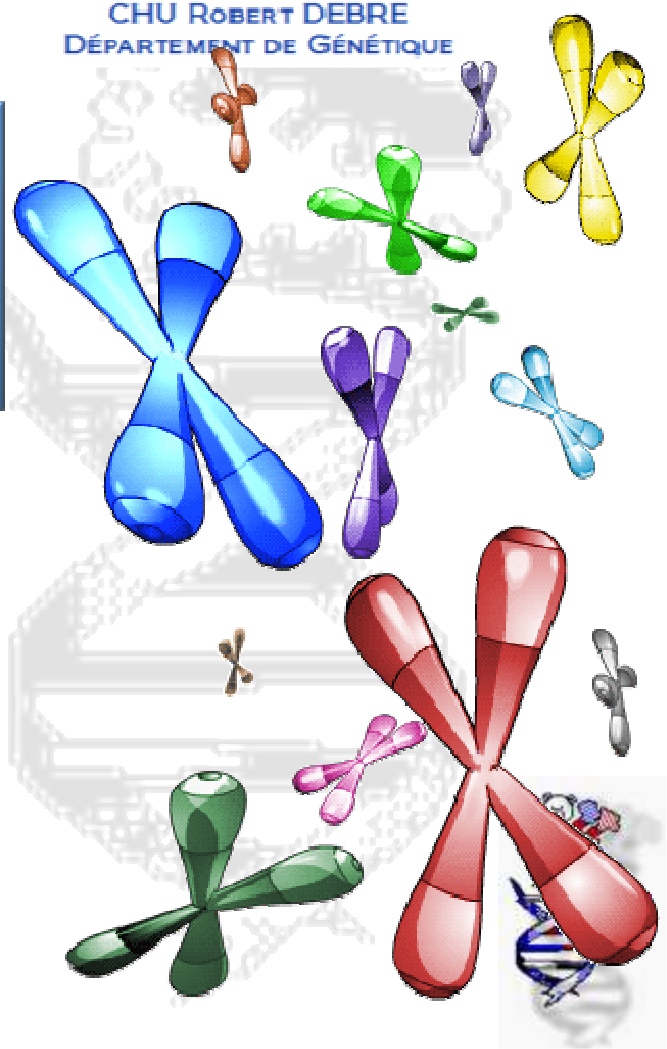
CENTRE DE REFERENCE
Anomalies du développement
et syndromes malformatifs

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS

CHU Robert DEBRE
Département de Génétique

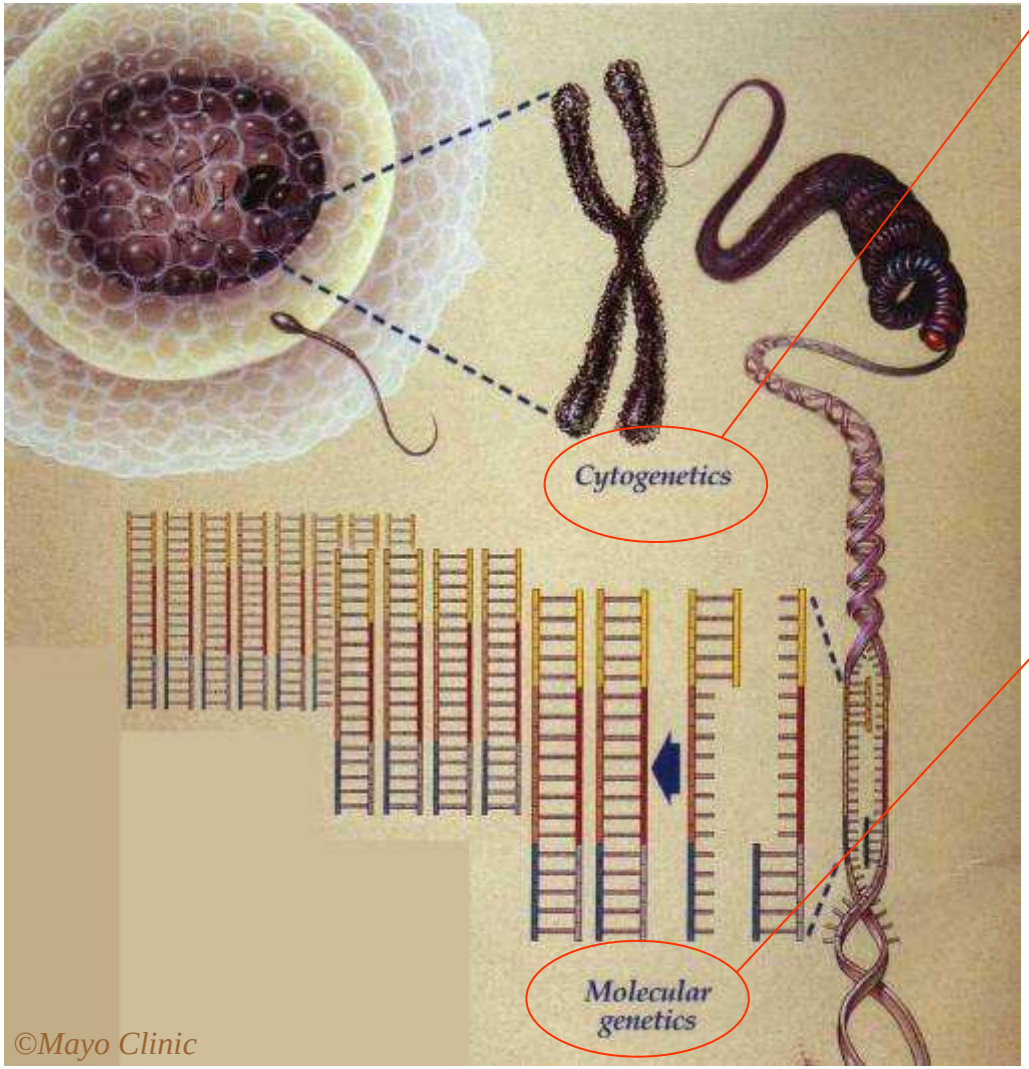
L3 - P7
Cytogénétique (1)



A Verloes

Inserm
U676

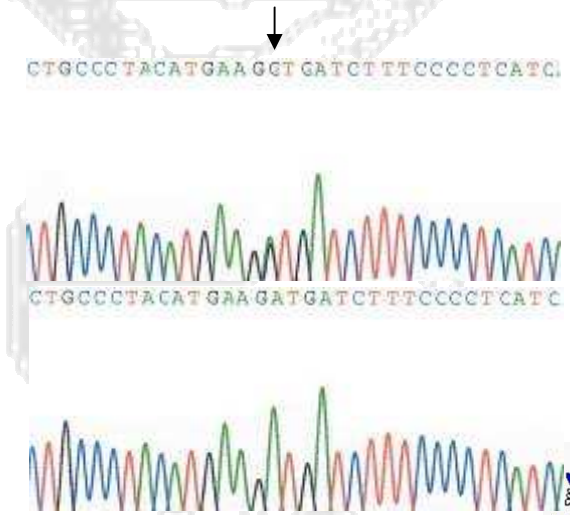
Les 2 niveaux d'analyse du génome humain



Caryotype conventionnel

techniques intermédiaires : arrays

Séquençage



c. 2566A→G

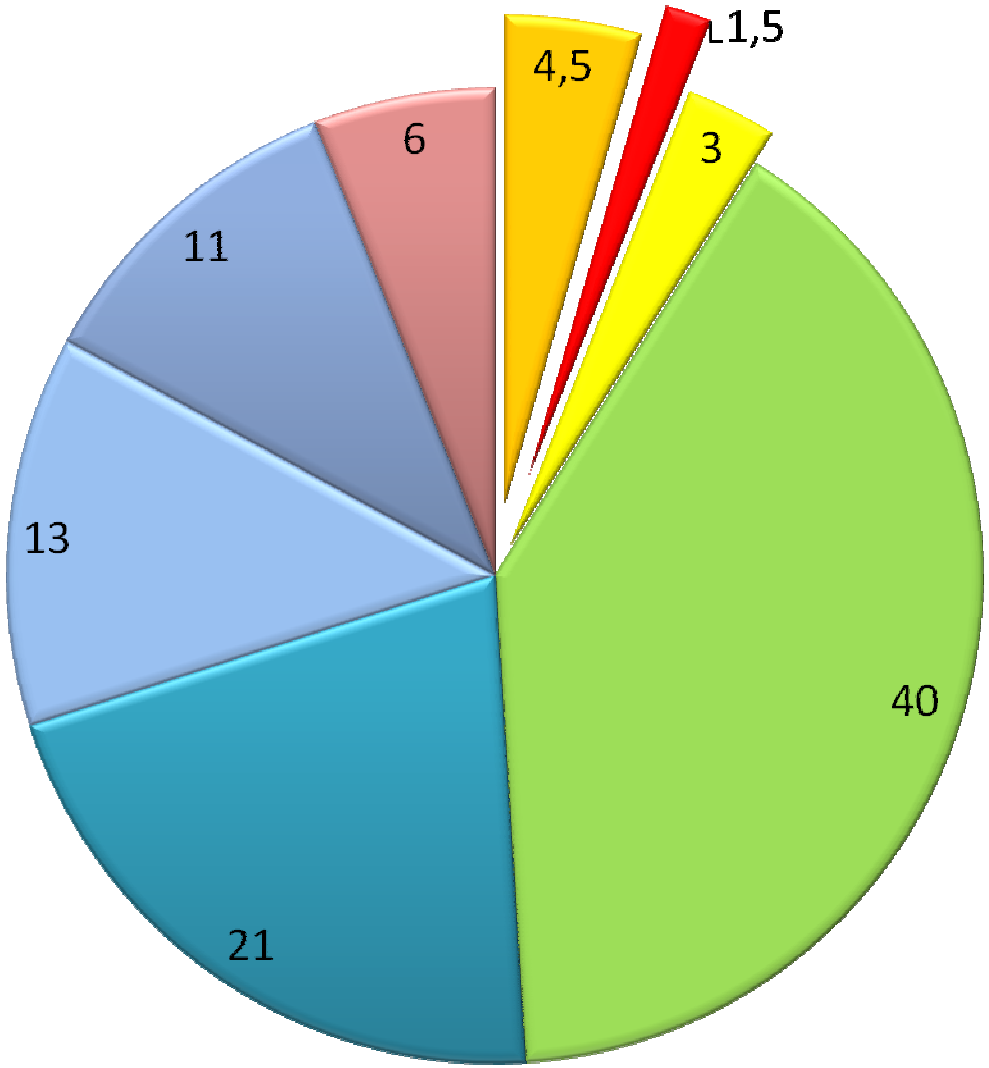
Génome (haploide) = 3.000.000.0000 nucléotides

Le génome

- Les chiffres de base
  - 2 X 23 molécules d'ADN – 2.2m X 4 nm
  - 3 10^9 bases

- 22-24000 gènes, soit env. 200000 exons
  - 20%: séquences codant pour des ARN fonctionnels
    - > 15000 ARNm → protéines
    - > 8000 ARN fonctionnels → fonction propre sans traduction
      - ARNt, ARNr, microARN…
  - 80%: introns: séquences non codantes intragénique

- Le reste…
  - Séquences « non codantes » conservées entre les espèces
  - Séquences répétées non codantes non conservées (LINE, SINE, autres)
  - Séquences non répétées non codantes non conservées
  - Hétérochromatine centromérique



- ADN non codant (introns)
- ADN codant (exons)
- ADN non codant (?) conservé
- ADN non codant, non répétitif intergénique
- ADN répétitif LINE
- ADN répétitf SINE
- ADN répétitif autres
- ADN hétérochromatique péricentromérique

Le génome

- Séquence typique (« canonique »)
  - Etablie en 2001 à partir d'un pool d'ADNs
  - 99% de la séquence totale est établie

- Très nombreux variants individuels
  - >10% du génome est variable
    - Qualitatifs: variation de séquence
    - Quantitatifs: absence ou duplication de segments
  - Personne ne possède la séquence canonique
    - Tous mutants !
- Ces variants sont au coeur des approches diagnostiques pangénomiques (CGH array et séquençage d'exome)

Les variations qualitatives du génome normal

- Variations qualitatives
  - **SNP**: single nucléotide polymorphism
  - Fréquence de l'allèle rare (par définition) > 1%


```
  1 gaattcattt cacagcttca ttgccctggc caggttgaac catgtcaagg aaactgtgag
 61 cagcatattc aaaacacaaa cattgcttgg cactttggca ctgttttttt tttttttttt
121 tttttttcc aagcttgtct cccagttagg aacagcctgg aagtcactag tccagactgt
181 gacaagtggt ggaacccggc tcccaggcat tgtggaaata cggttcattg tcacagccac
241 gccaggcctc ggcggagaac tgcgcagcca ggtctgagcg gcaatgcgct ggctcttctg
301 ctgcagctgg ggaccacgtg caggcagctg ggaggtagat tcctgtacct gctgctctgt
361 gcttagtgct ggcttgtcat ggggctagag gttactagtg tggatgataa aaaatattcg
421 ttctgacatt agtagttctg caaatacaca cgctatagcc catgtatcag cagctctgga
481 ataatgtctt gcctcgataa gtagctctgg gactcggaat gttgcagctg ctagatccag
541 atctgcccaa ggcttcaaag gtgaacaaaa aaatagagtg ccactcatat cagtgatttg
601 gactcgaatt tactcaggat ctttactcat agttaaaata ttggcaggtt ctacatacct
661 atgcaactcc cagtggtcat gcaggcagca aactgcatct aggatgggag gtgatgatga
721 cctcactatc ccccaaggta actgagctgg cttcttgttt gttagtagct ctgcaccact
781 agattataag tcagaggtca cacagaagcc ctacttccat gtcagcatga gacagaaaga
841 ctttccgaag agggagggcc cgtgggtgct caagcttgtg aaggaaccac ctttcctctt
901 ggctttgtag acacgacccc aagtgcctca gcctactttg cagtcctcag attcaaacag
961 gtcctcaagc ggctcccact tgctggacag cttcagttta aagtcacagt ccatggtcac
```

t

allèle 1

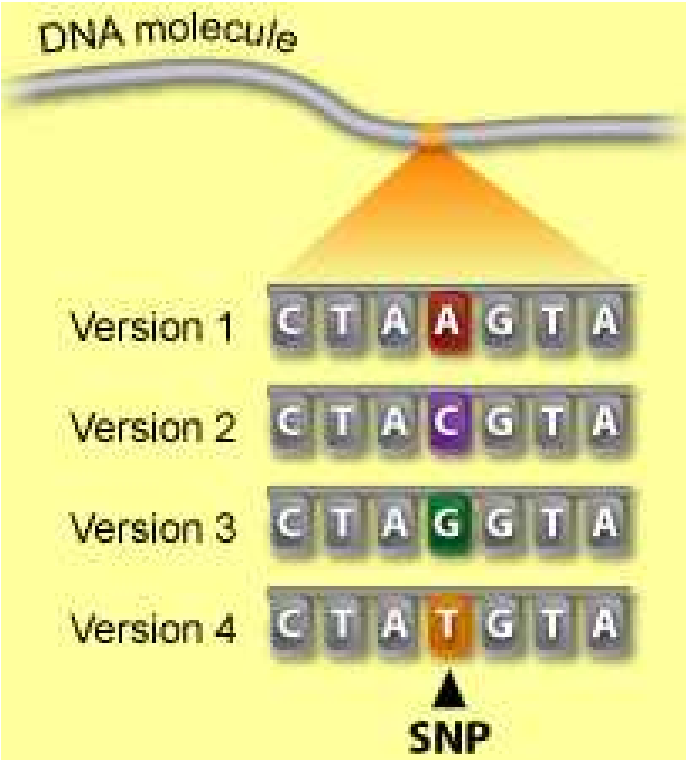
```
  1 gaattcattt cacagcttca ttgccctggc caggttgaac catgtcaagg aaactgtgag
 61 cagcatattc aaaacacaaa cattgcttgg cactttggca ctgttttttt tttttttttt
121 tttttttcc aagcttgtct cccagttagg aacagcctgg aagtcactag tccagactgt
181 gacaagtggt ggaacccggc tcccaggcat tgtggaaata cggttcattg tcacagccac
241 gccaggcctc ggcggagaac tgcgcagcca ggtctgagcg gcaatgcgct ggctcttctg
301 ctgcagctgg ggaccacgtg caggcagctg ggaggtagat tcctgtacct gctgctctgt
361 gcttagtgct ggcttgtcat ggggctagag gttactagtg tggatgataa aaaatattcg
421 ttctgacatt agtagttctg caaatacaca cgctatagcc catgtatcag cagctctgga
481 ataatgtctt gcctcgataa gtagctctgg gactcggaat gttgcagctg ctagatccag
541 atctgcccaa ggcttcaaag gtgaacaaaa aaagagagtg ccactcatat cagtgatttg
601 gactcgaatt tactcaggat ctttactcat agttaaaata ttggcaggtt ctacatacct
661 atgcaactcc cagtggtcat gcaggcagca aactgcatct aggatgggag gtgatgatga
721 cctcactatc ccccaaggta actgagctgg cttcttgttt gttagtagct ctgcaccact
781 agattataag tcagaggtca cacagaagcc ctacttccat gtcagcatga gacagaaaga
841 ctttccgaag agggagggcc cgtgggtgct caagcttgtg aaggaaccac ctttcctctt
901 ggctttgtag acacgacccc aagtgcctca gcctactttg cagtcctcag attcaaacag
```

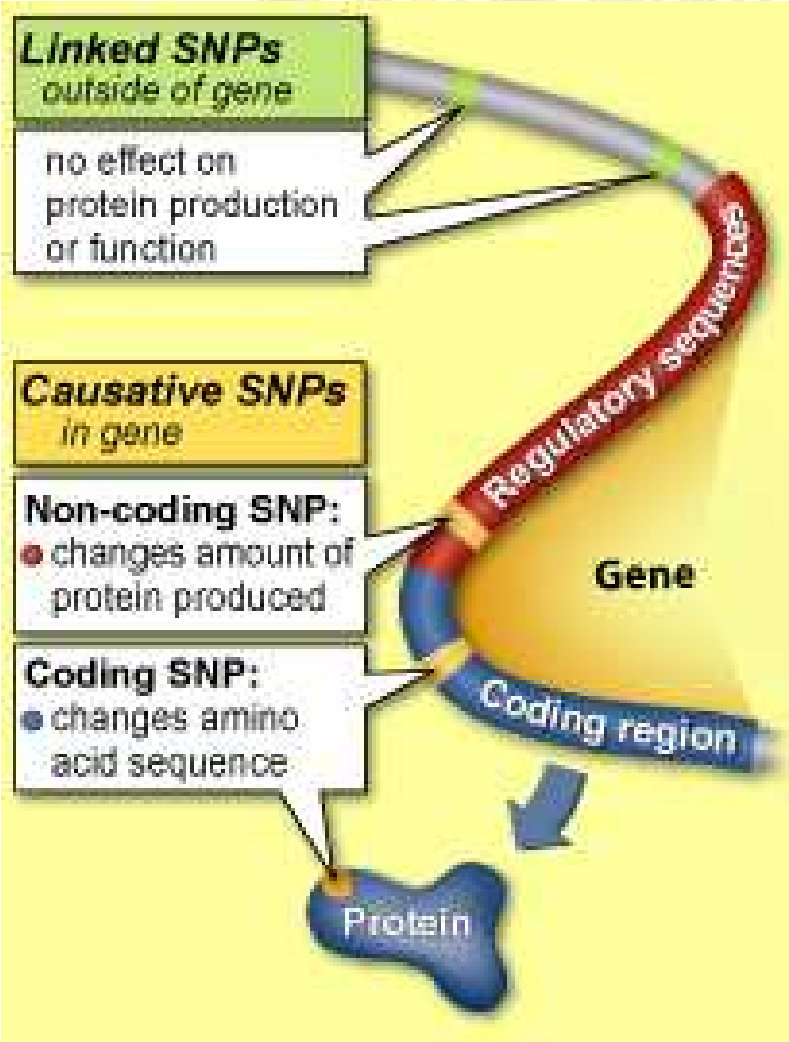
g

allèle 2

SNP

- SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)
  - Dans les gènes ou dans l'ADN non codant
  - Fonctionnels où non

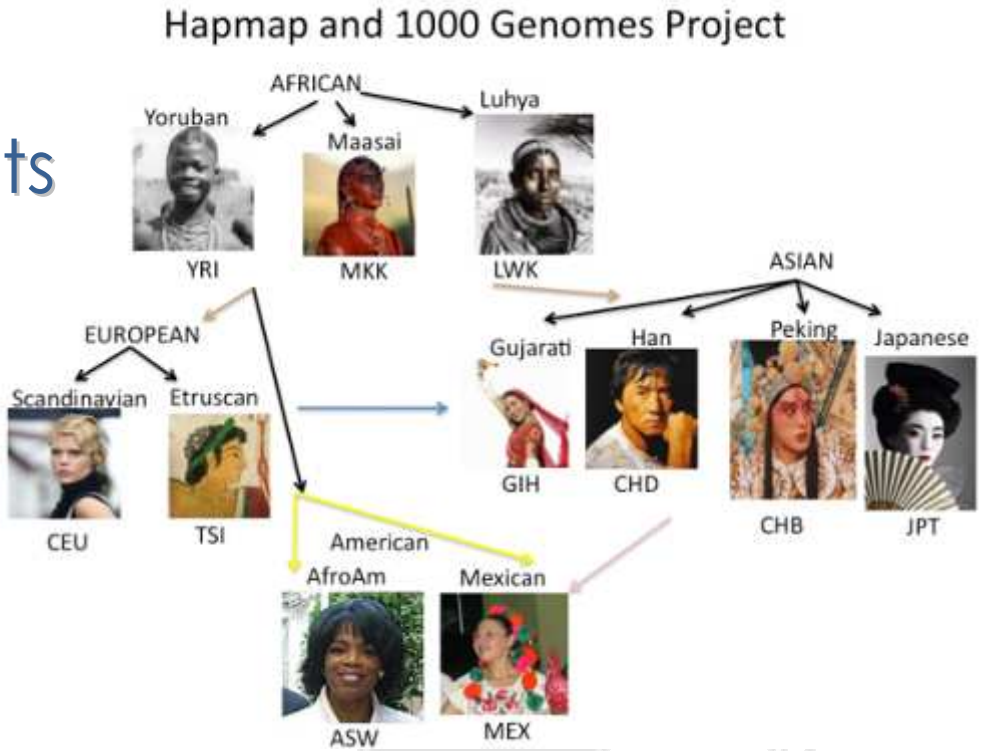




Les variations qualitatives du génome normal

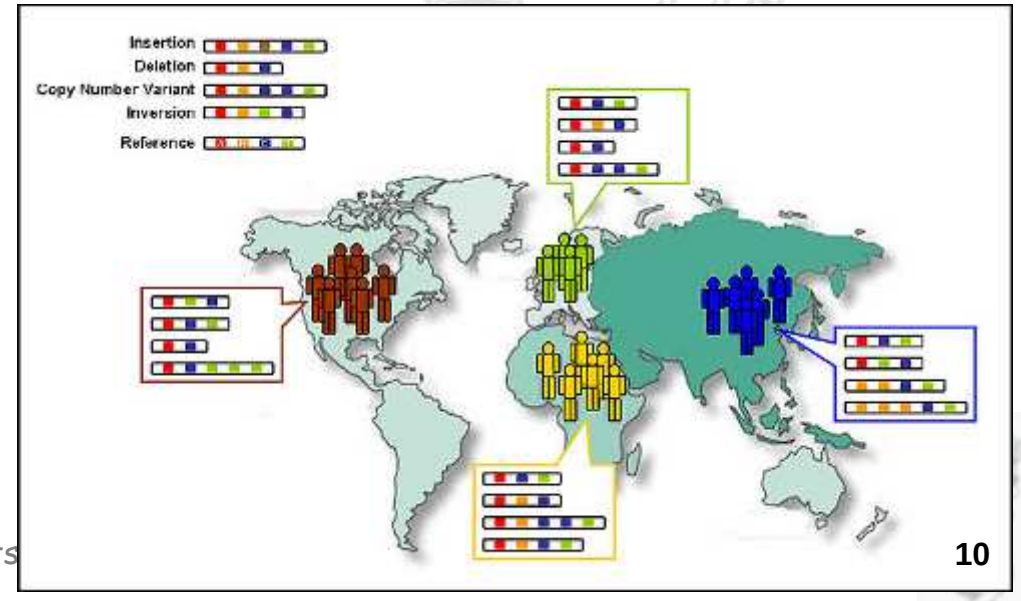
- **SNP**
- Dans le génome
  - 1 base / 400 (> 10^7 SNP)
- Pour 1 individu:
  - 1 base / 1000, soit
    - > 3 10^6 SNP par individu
    - Env. 25.000 SNP localisés dans les exons
    - Avec ou sans modif de la protéine correspondante
- Apporte >80% de la variabilité d'expression génétique

- Catalogue des variants du génome



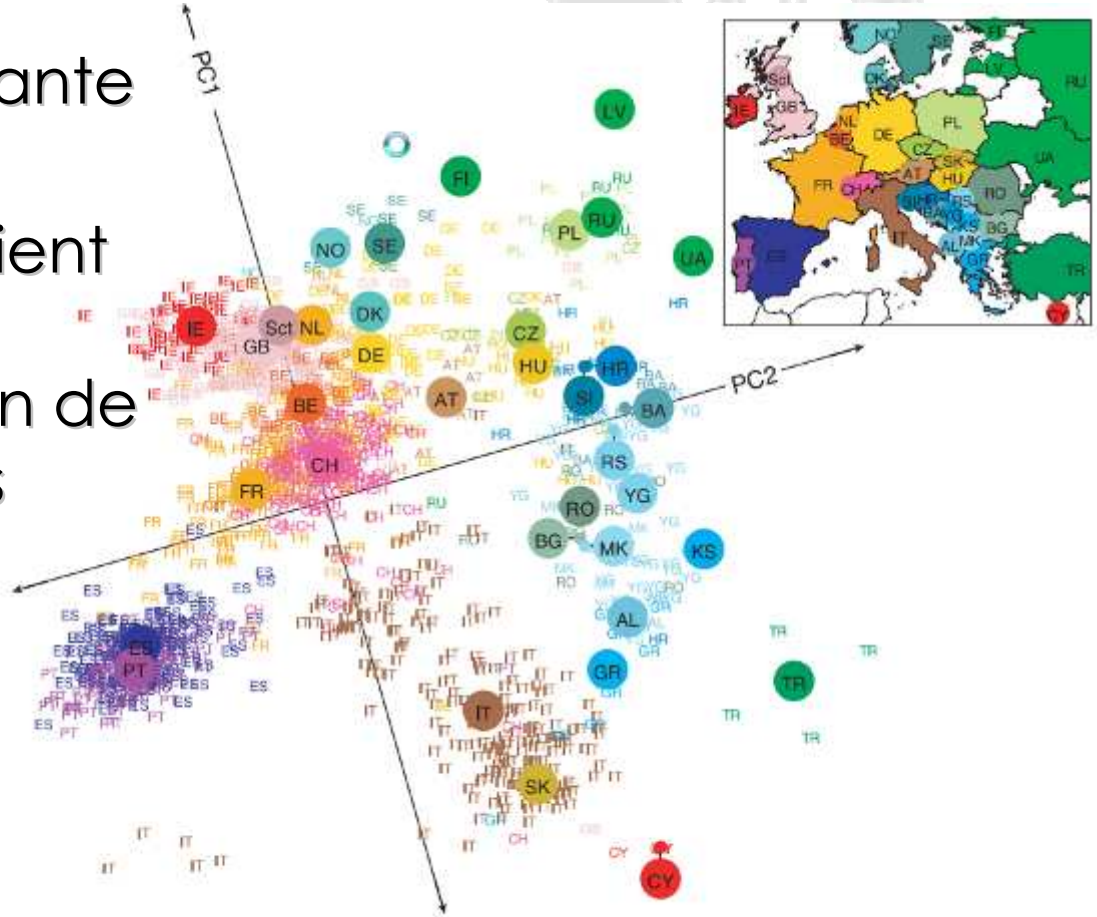
- Projet 1000Genomes
  - Séquençage complet de > 2500 individus
  - Représentatifs de la population mondiale (14 « ethnies »)

- Résultats préliminaires (1000 sujets)
  - > 38.000.000 variants SNP
  - Pour un individu:
    - Plusieurs milliers de variants dans les séquences non codantes conservées
    - > 2500 mutations non synonymes / individu, dont 250-400 rares
    - > 150 variants certainement délétères (stop, frameshift…) dont 10 à 30 variants rares (< 0.5%)



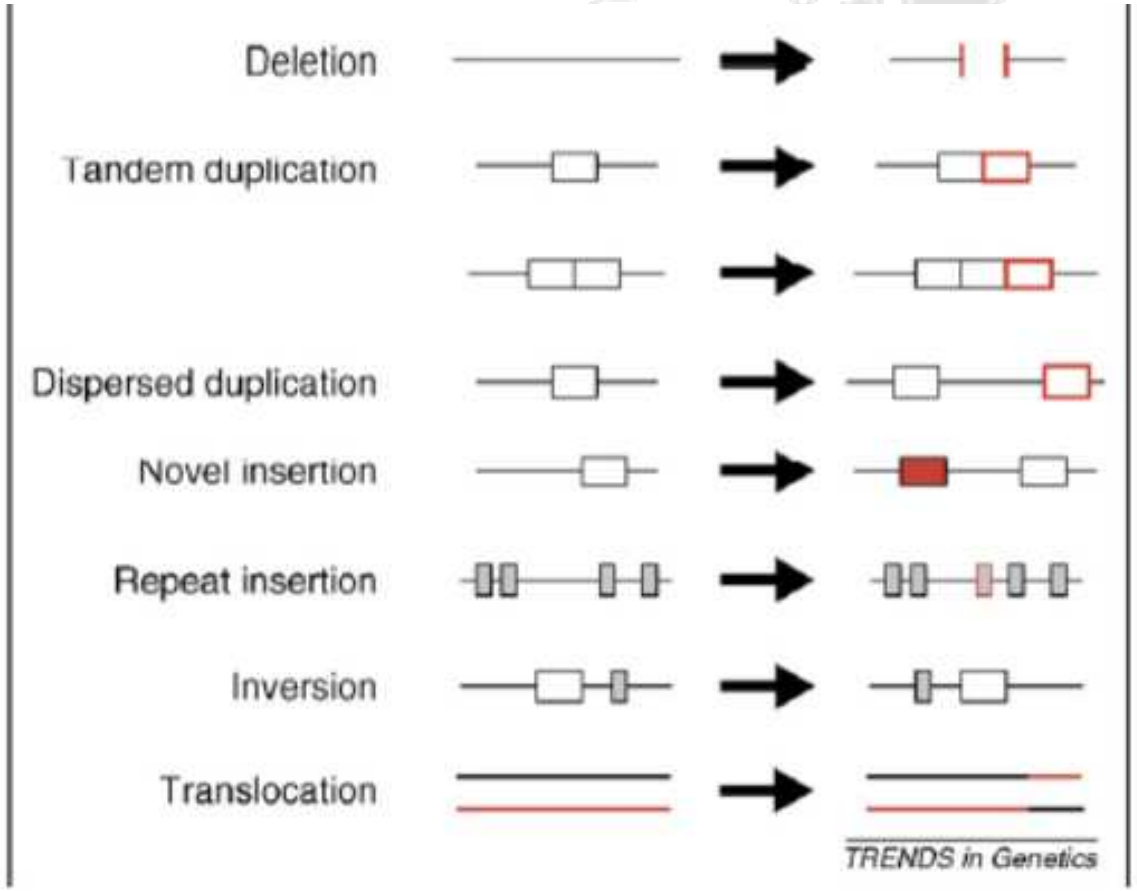
Génomique des populations

- 1339 Européens génotypés pour 500 k loci
  - Analyse en composante principale
  - Les variations identifient des populations d'Europe en fonction de leur position (« profils régionaux)



Les variations qualitatives du génome normal

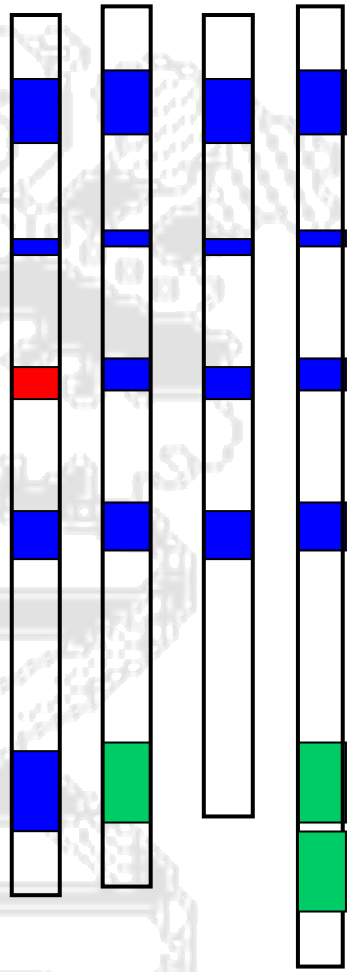
- Le génome de chaque individu contient de très nombreux remaniements de structure (comparé à la séquence canomique)



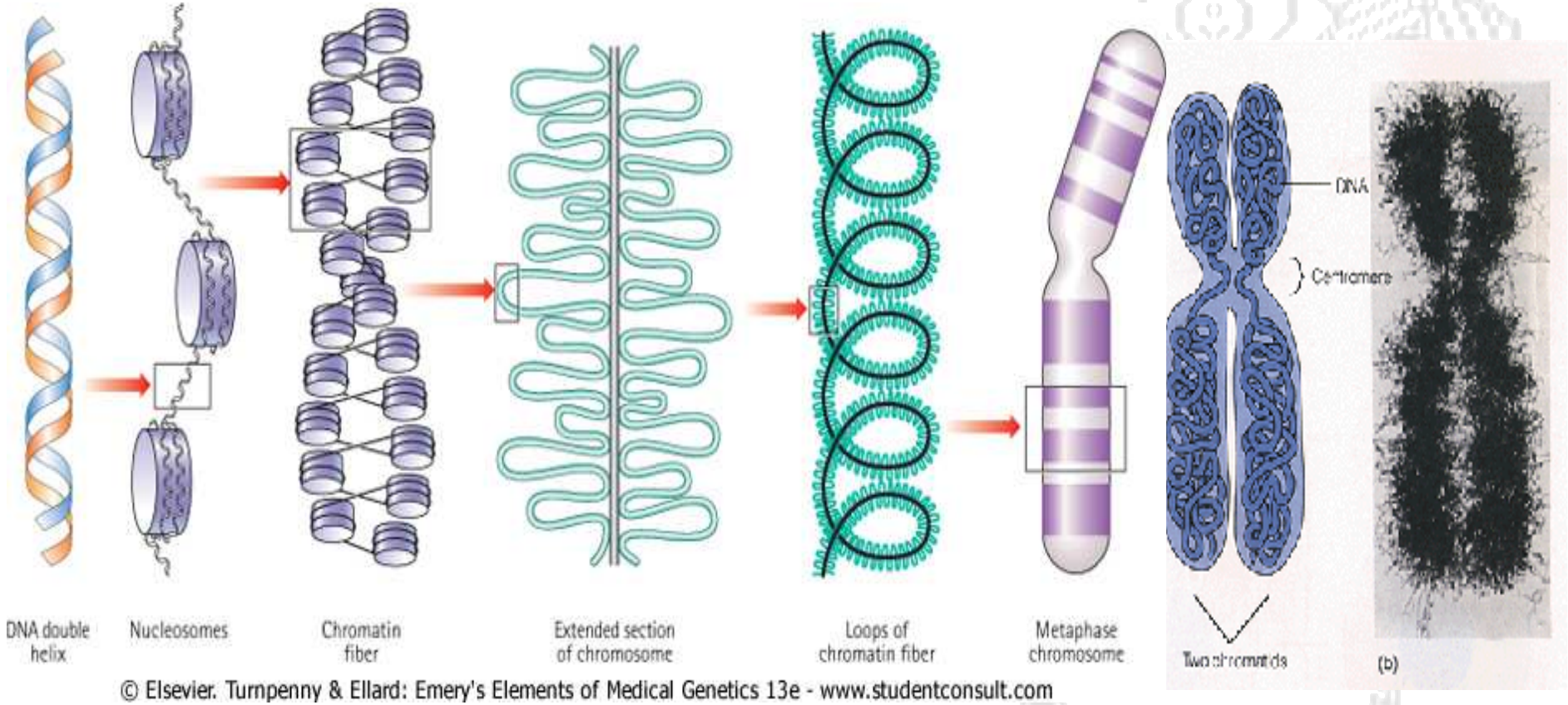
Les variations qualitatives du génome normal

- **Indels** (insertion/délétions): < 1000 nt
  - > 1.500.000 indels dans 1000génomes
  - Pour 1 individu:
    - 350.000 indels
    - dont 500 impliquent des gènes

- **CNV**: copy number variation
  - Segments > 1000 nt (→ 9 Mb) dupliqués ou délétés
  - > 66000 CNVs répertoriés (16000 loci)
  - Pour 1 individu:
    - env. 700 délétions CNV + ? duplications
    - dont 40 impliquent des gènes
- Au total
  - Concerne > 10% du génome
  - 2 à 3 Mb / individu



L'ADN subit plusieurs ordre de spiralisation

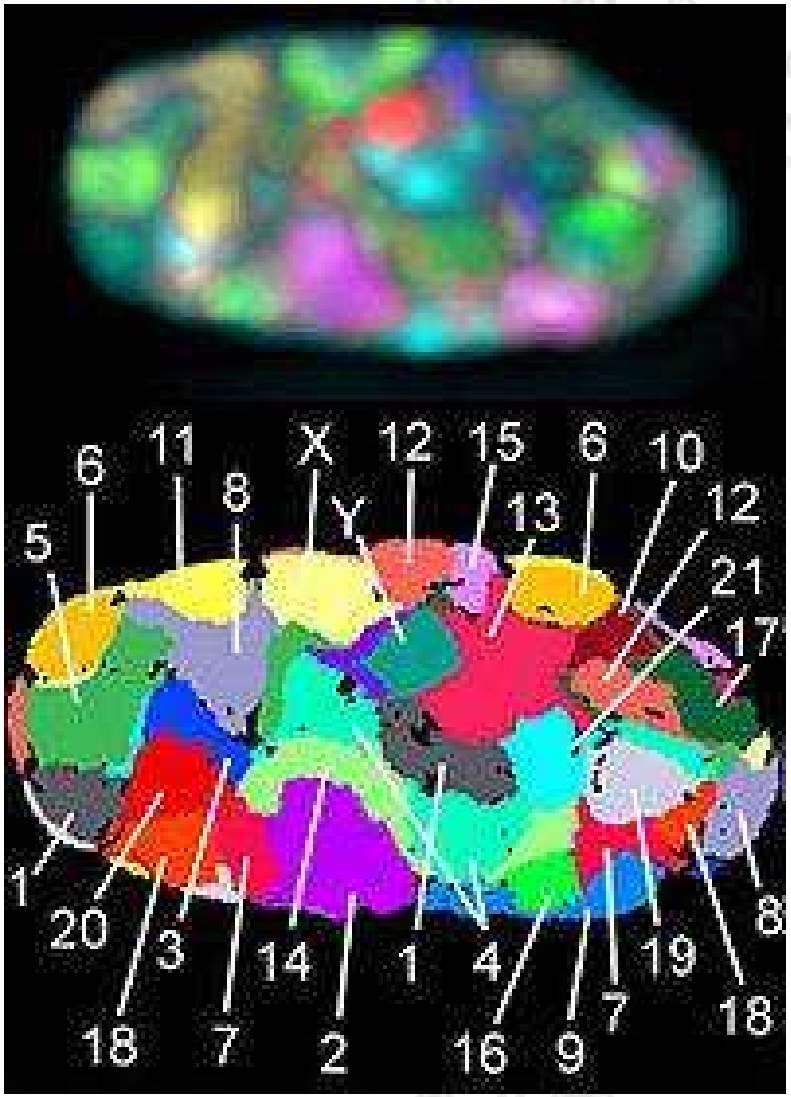


© Elsevier. Turnpenny & Ellard: Emery's Elements of Medical Genetics 13e - www.studentconsult.com

ADN: 2 X 23 molécules = 2 mètres → 2 X 23 chromosomes = 400 µm

Organistion spatiale du noyau

- L'ADN de chaque chromosome occupe un espace délimité du noyau



Les parties d'un chromosome

Bras court p - Bras long q

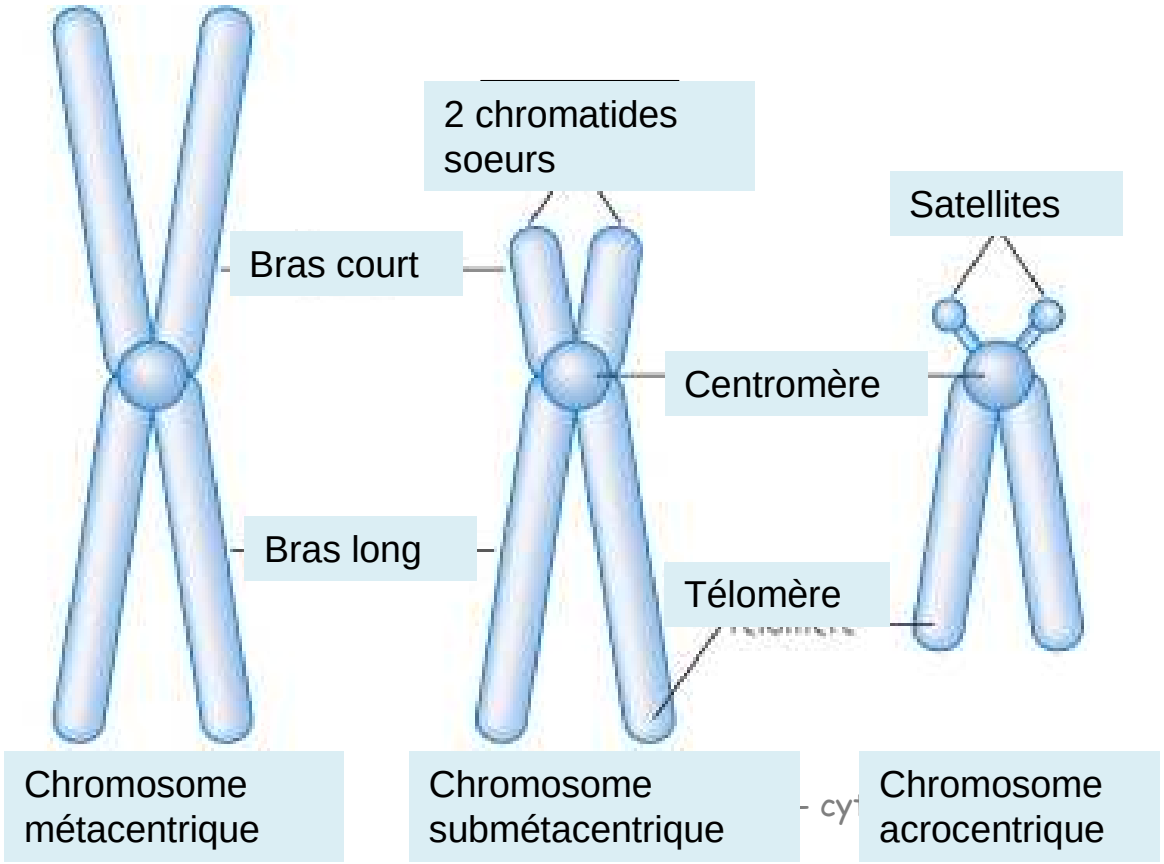
1 centromère

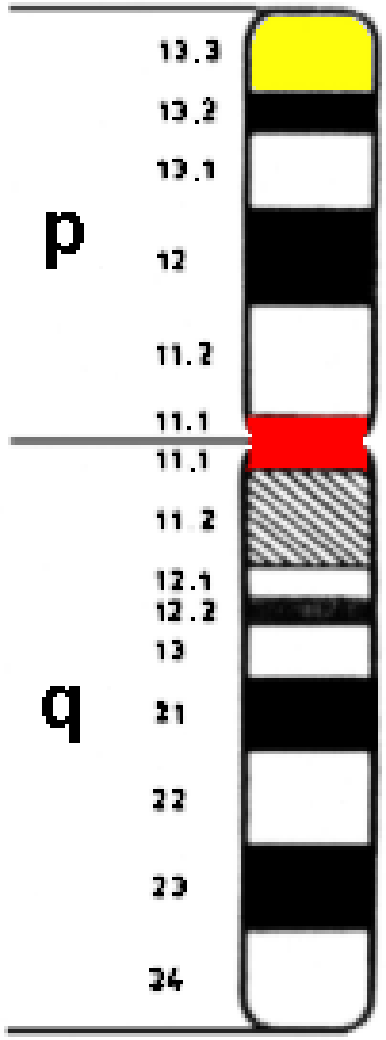
1 « région télomérique » par bras

Télomère s.str. : ne contient pas de gènes

Subtélomère: région riche en gènes

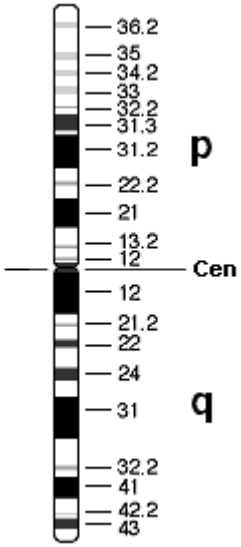
Pattern de bandes claires/sombres spécifiques



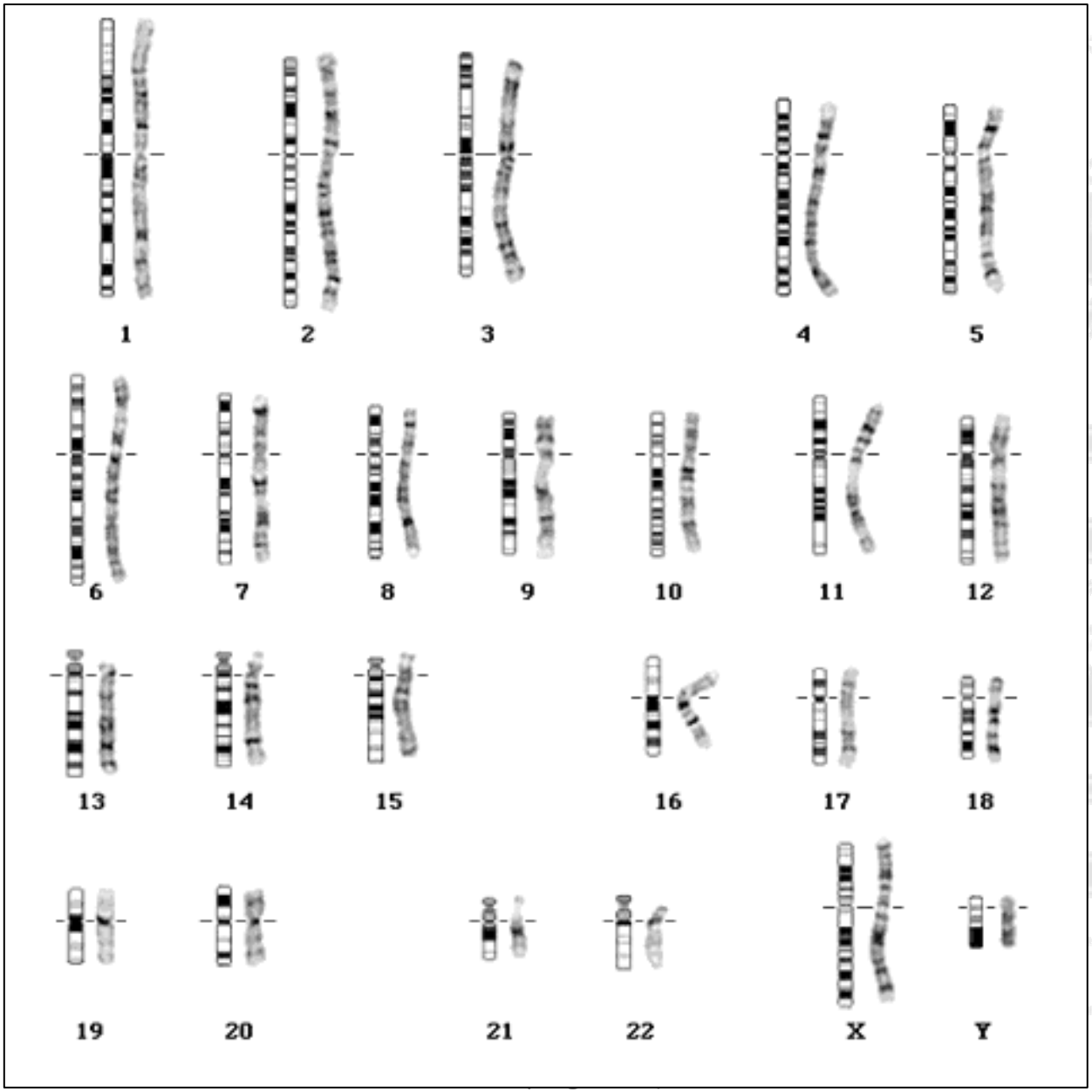


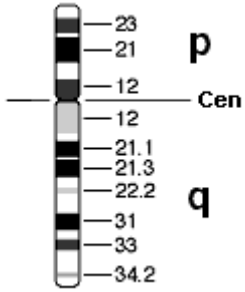
16

Idéogrammes chromosomiques

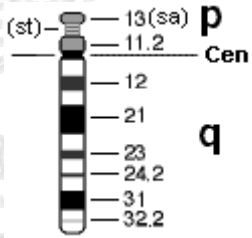


Métacentrique
(chrom 1)



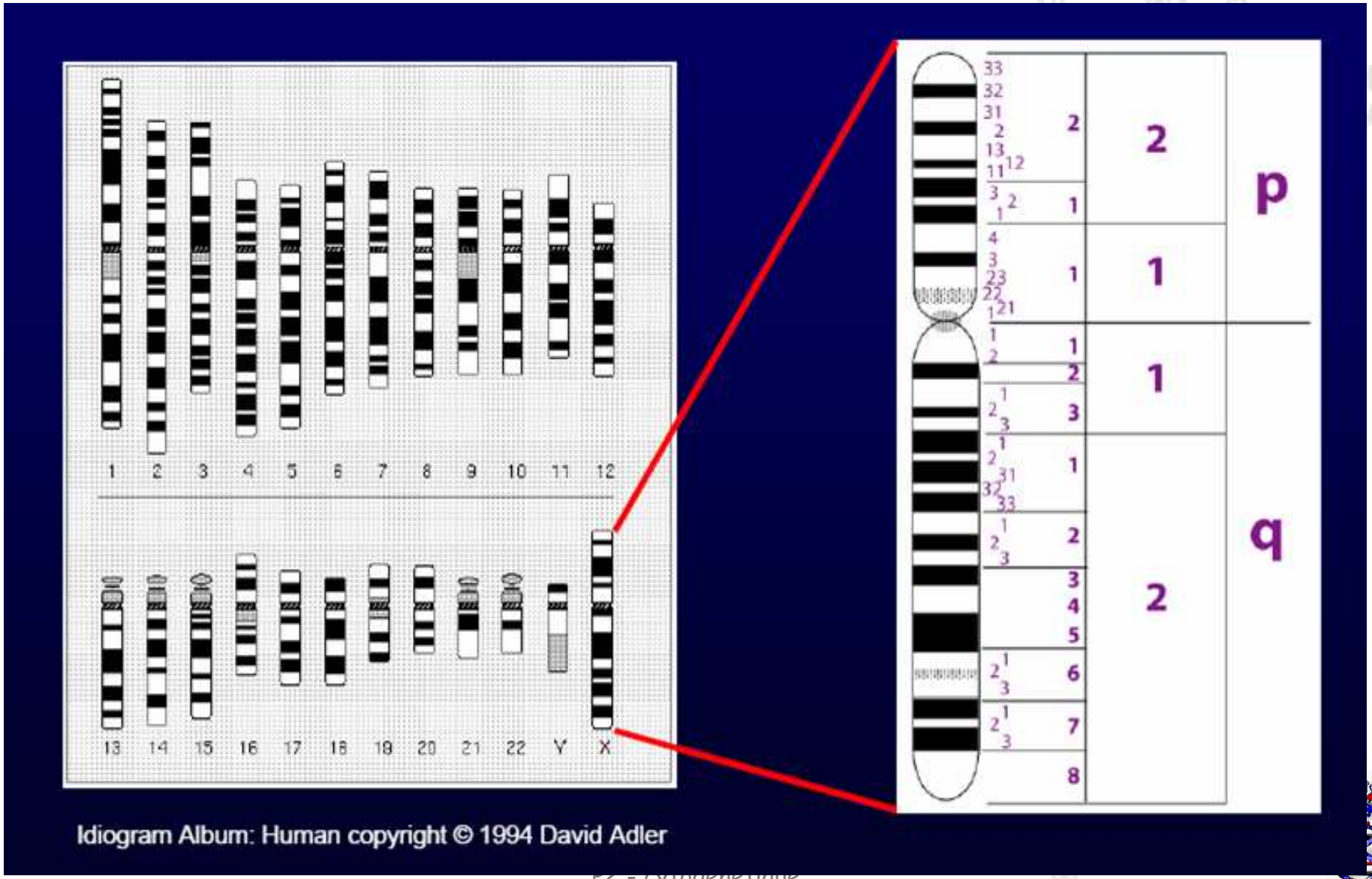


Submétacentrique
(chrom 9)



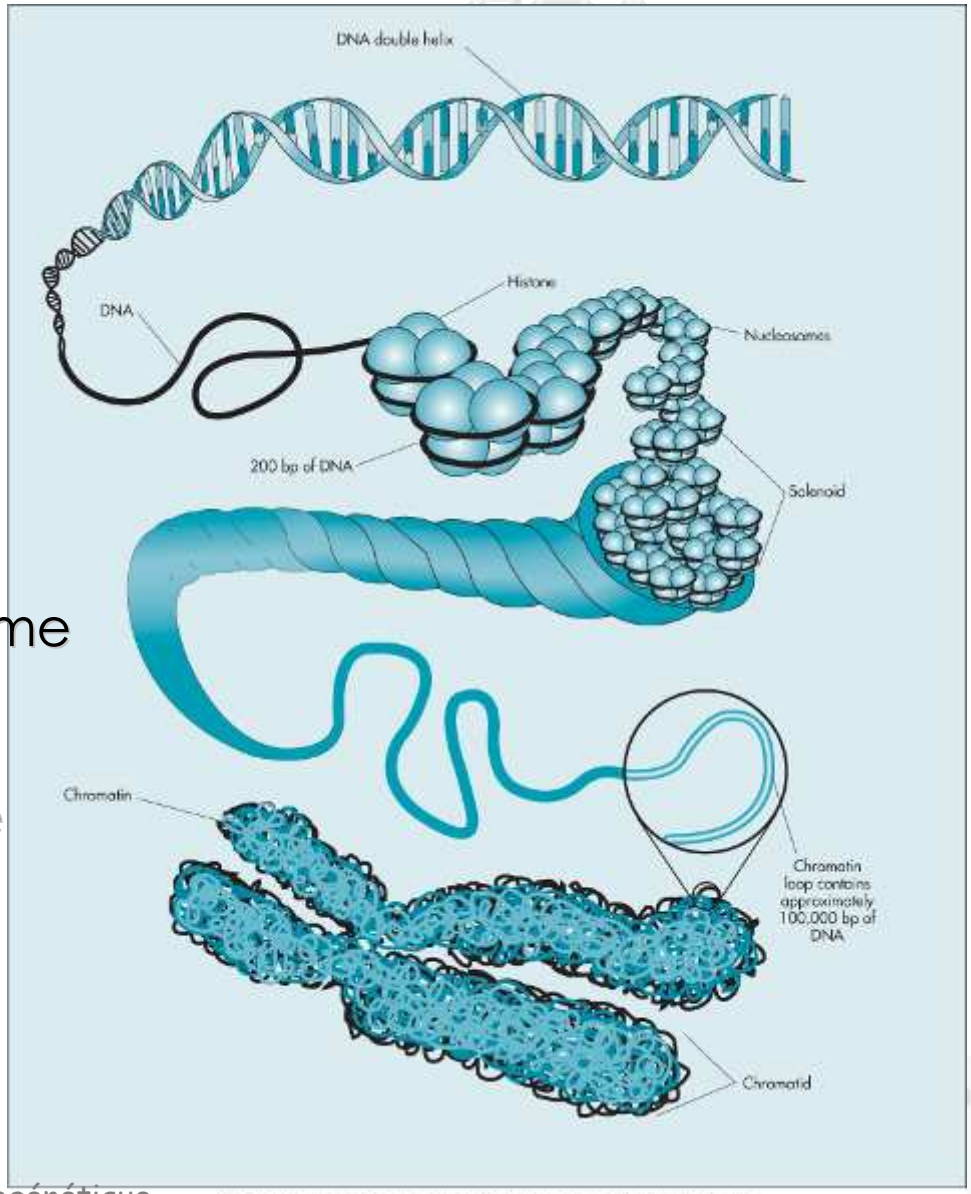
Acrocentrique
(chrom 14)

Bras, bandes et sous-bandes



Echelles

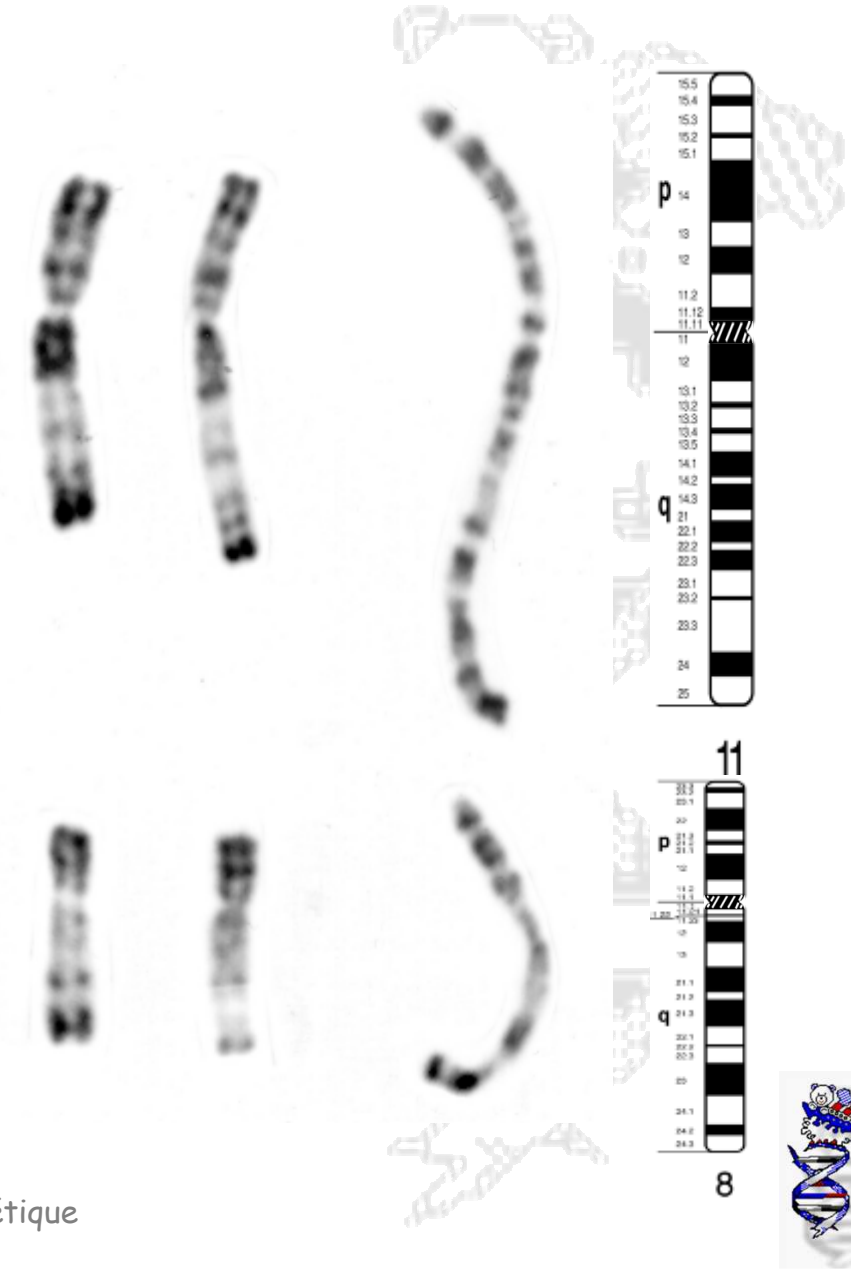
- 2 X 23 chromosomes
  - 3 000 000 000 bases (3000 Mb)
  - 24000 gènes
  - 600 bandes
- 1 chromosome
  - Moyenne : 150 Mb
  - 250 à 4100 gènes / chromosome
- Dans une bande chromosomique, en moyenne
  - 50 gènes
  - 5 Mb



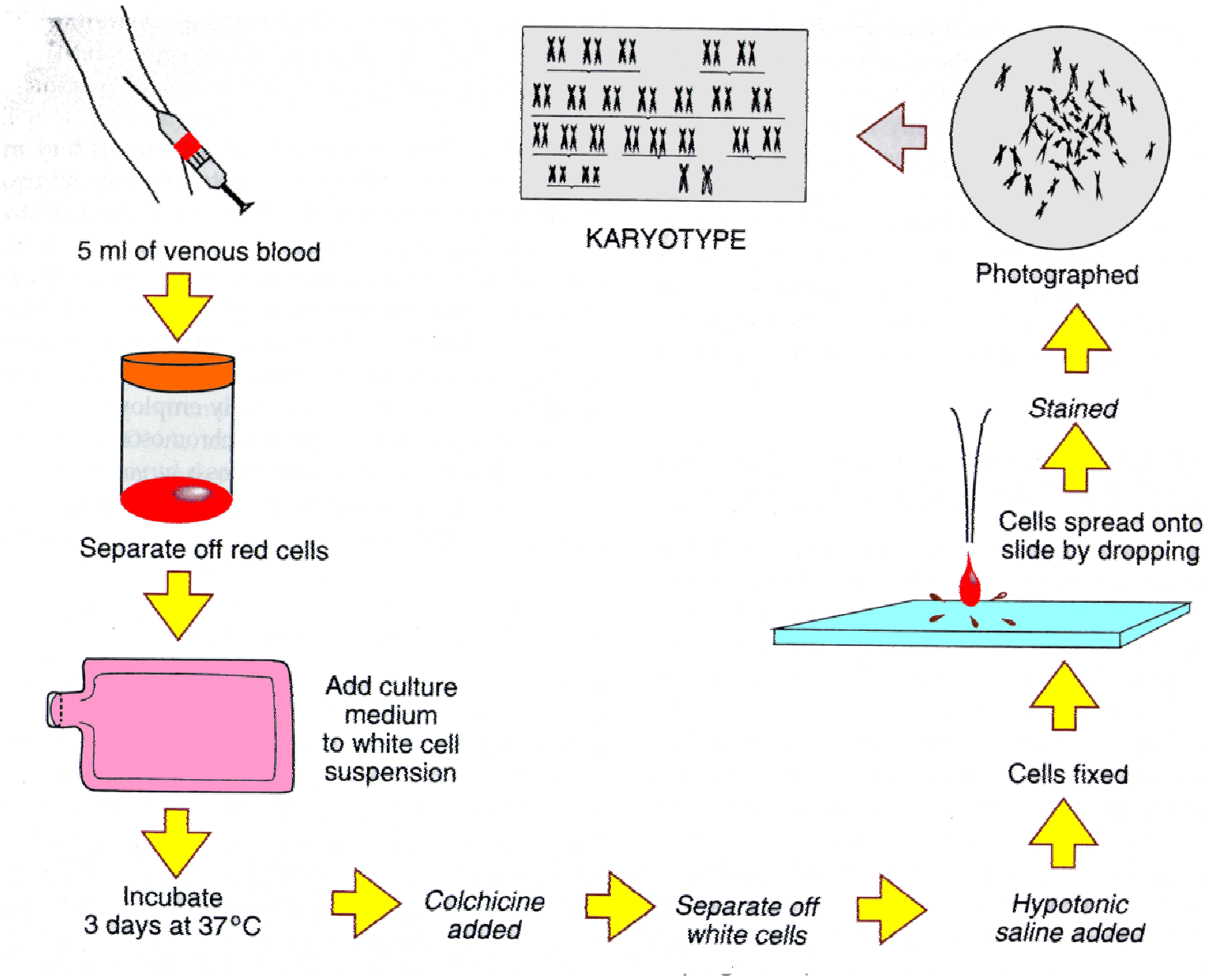
© Elsevier Ltd. Jorde et al: Medical Genetics 3E www.studentconsult.com

Techniques utilisées en cytogénétique

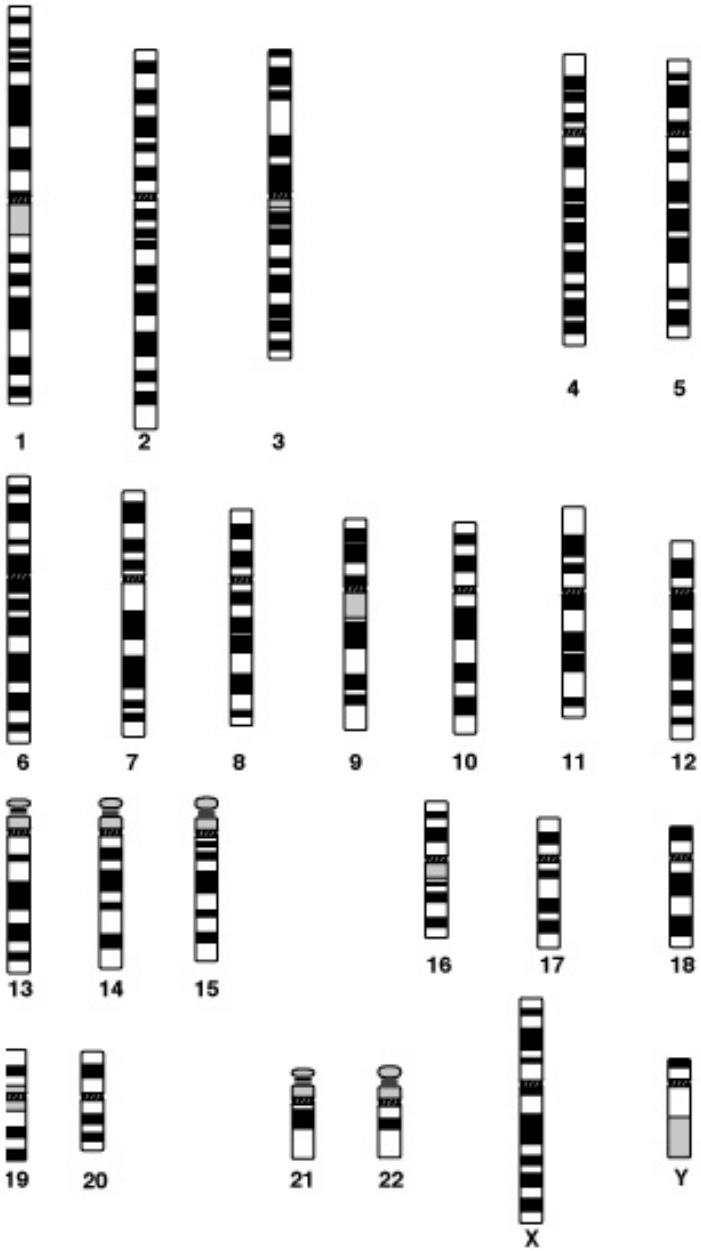
- Cyto. conventionnelle
  - Caryotype standard
    - Arrêt en fin de métaphase
    - 300-450 bandes
  - Caryotype standard haute résolution
    - Culture synchronisée
    - Arrêt avant la fin de la métaphase
    - 550 à 650 bandes, ou +
- Cyto. moléculaire
  - Hybridation in situ fluorescente (FISH)
  - CGH array (puces à ADN)

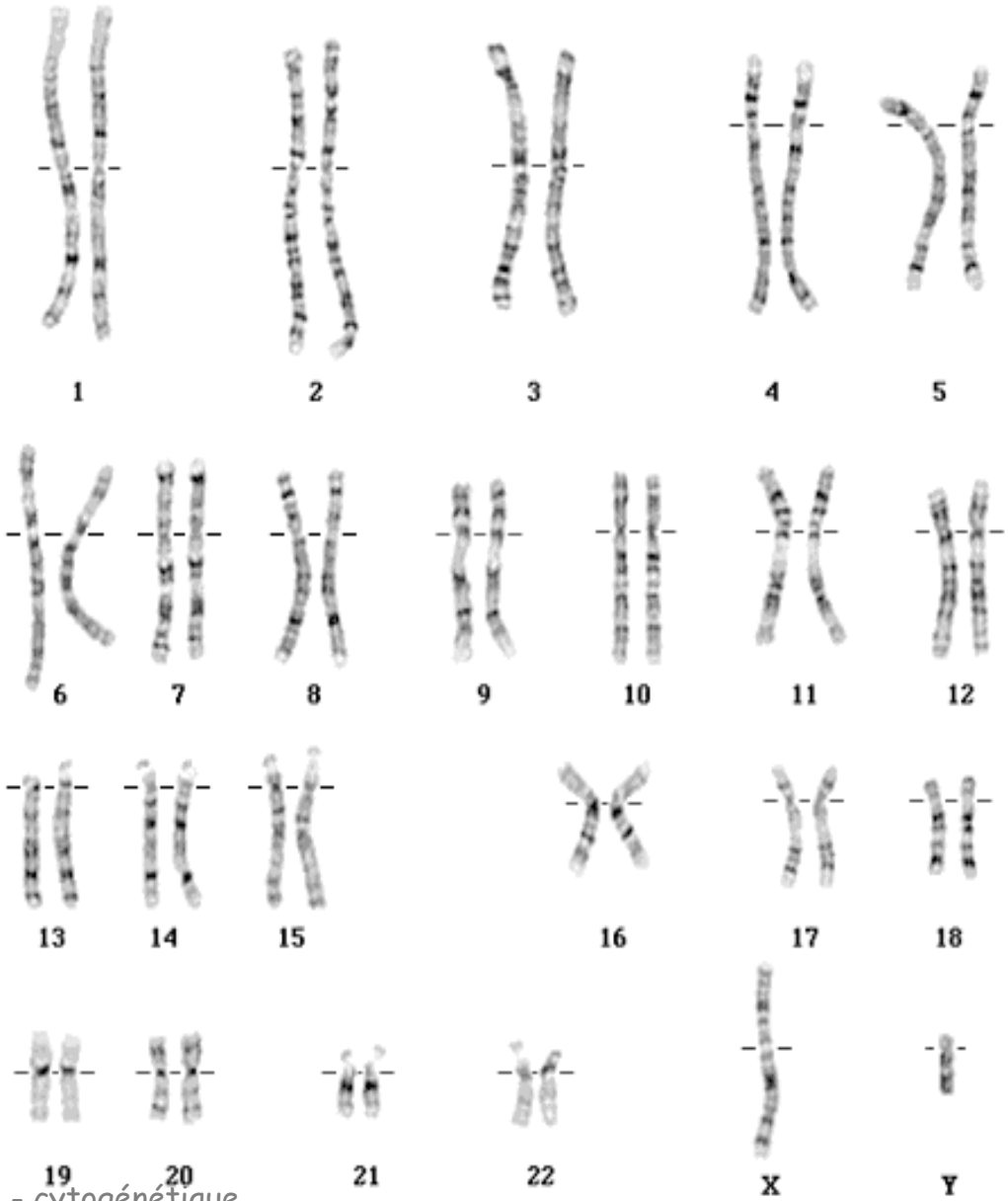


Comment prépare-t-on un caryotype sanguin ?

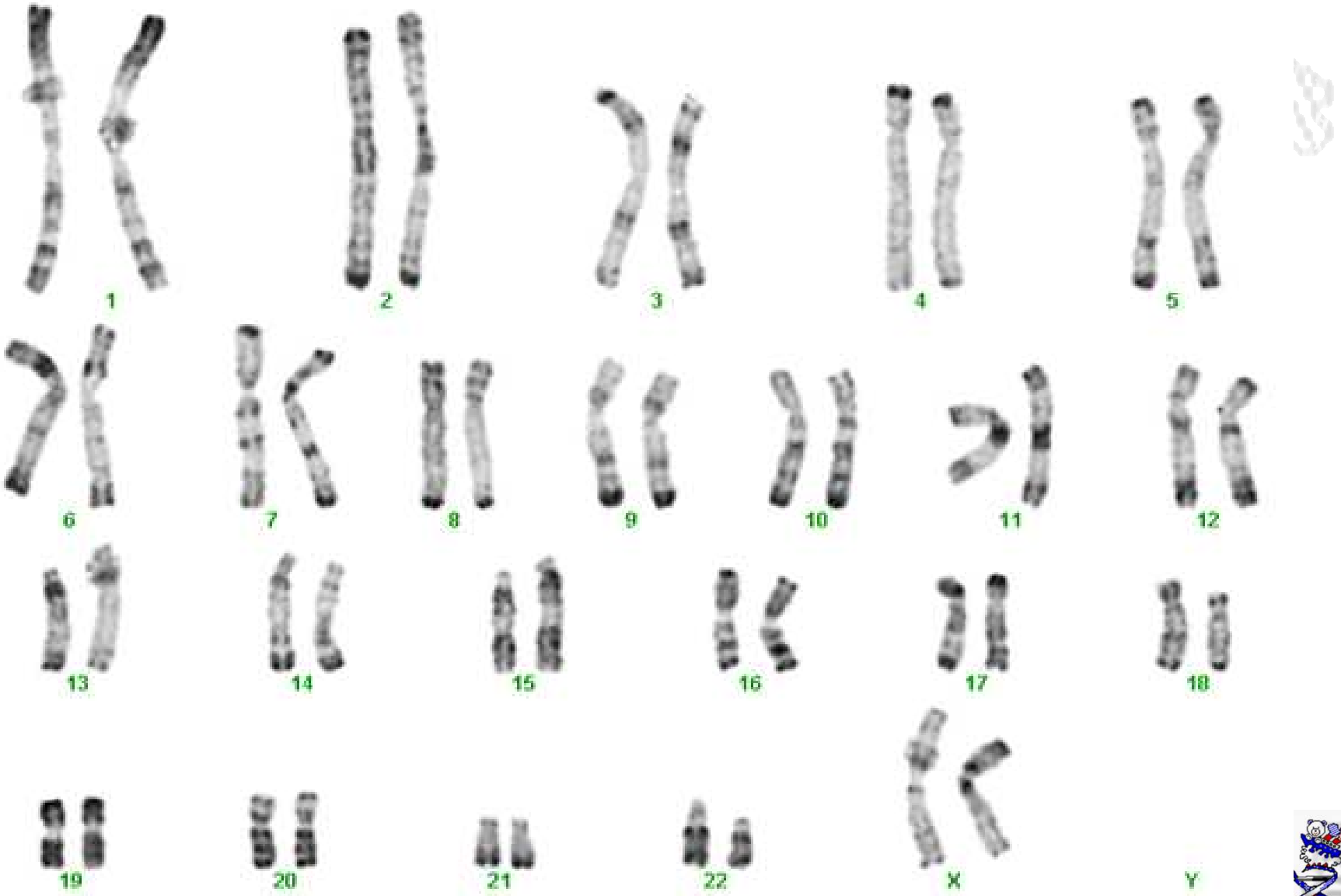


Caryotype haute résolution en bande G





Caryotype haute résolution en bandes R



Quelques définitions…

- Anomalies
  - **Constitutionnelle** : présente à la naissance
  - **Acquise:** anomalie (transformation maligne p ex)

  - **homogène** :dans toutes les cellules examinées
  - **en mosaïque** : plusieurs populations cellulaires à caryotype différents issues d'un zygote unique

  - **Équilibrée** : ni perte ni gain de matériel génétique
  - **Déséquilibrée**: perte ou gain de matériel

Aneuploidie et polyploidie

- Haploïdie n=23 (gamètes)
- Diploïdie 2n=46 (somatique)
- Aneuploïdie 2n +/- 1,2,3
  - ex. 2n+1=47 : trisomie
    ex. 2n-1=45 : monosomie
    ex. 2n+2=48 : tétrasomie
- Polyploïdie
  - 3n=69 triploïdie
  - 4n=92 tétraploïdie

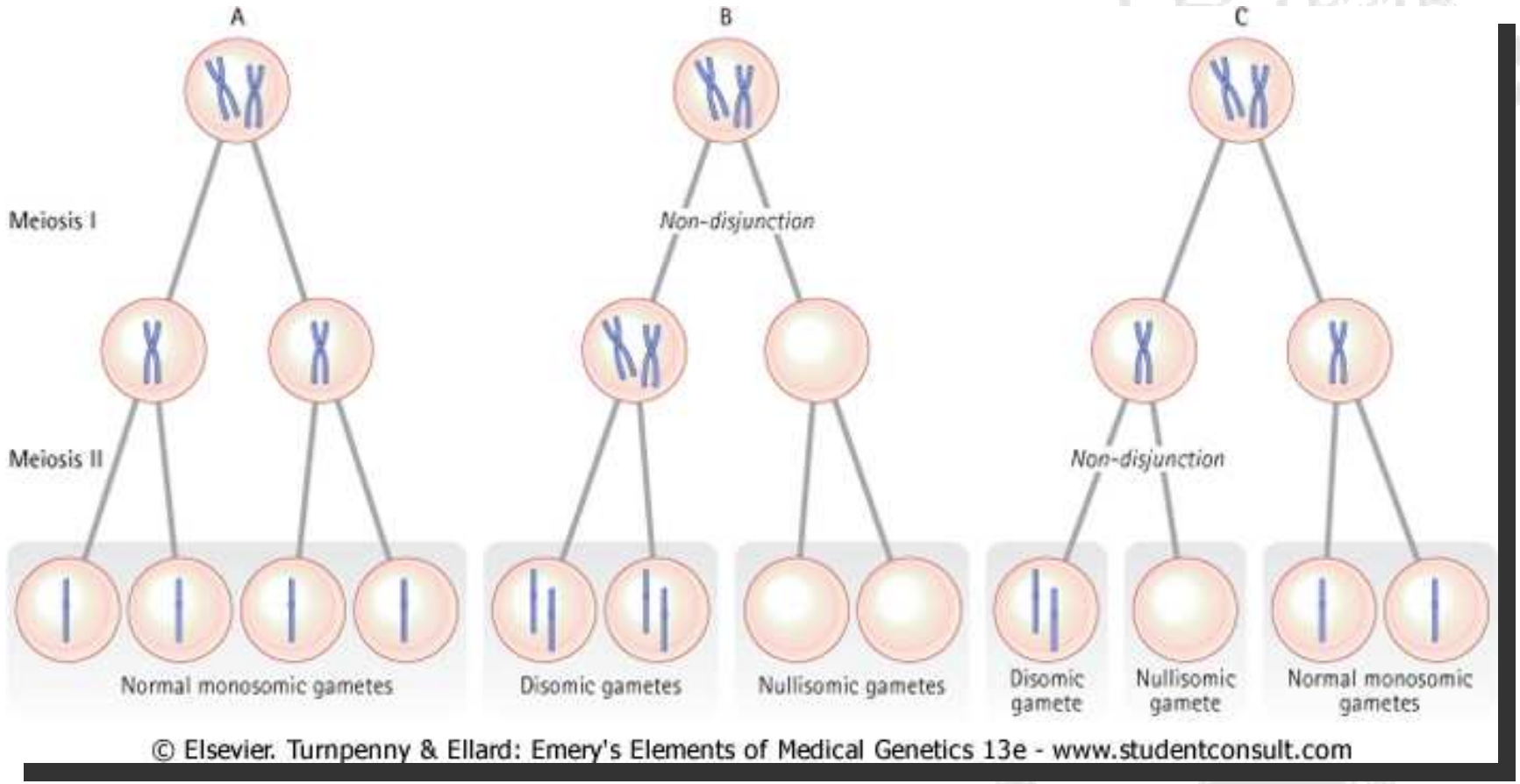
Les grands groupes d'anomalies

- Anomalies de fécondation : polyploidies : 3n, 4n

- Anomalies de ségrégation méiotique (anomalies de nombre : monosomie, trisomie, …)
  - 2n – 1
  - 2n + 1, 2 ou 3

- Anomalies de structure

Anomalies de nombre : erreur de ségrégation



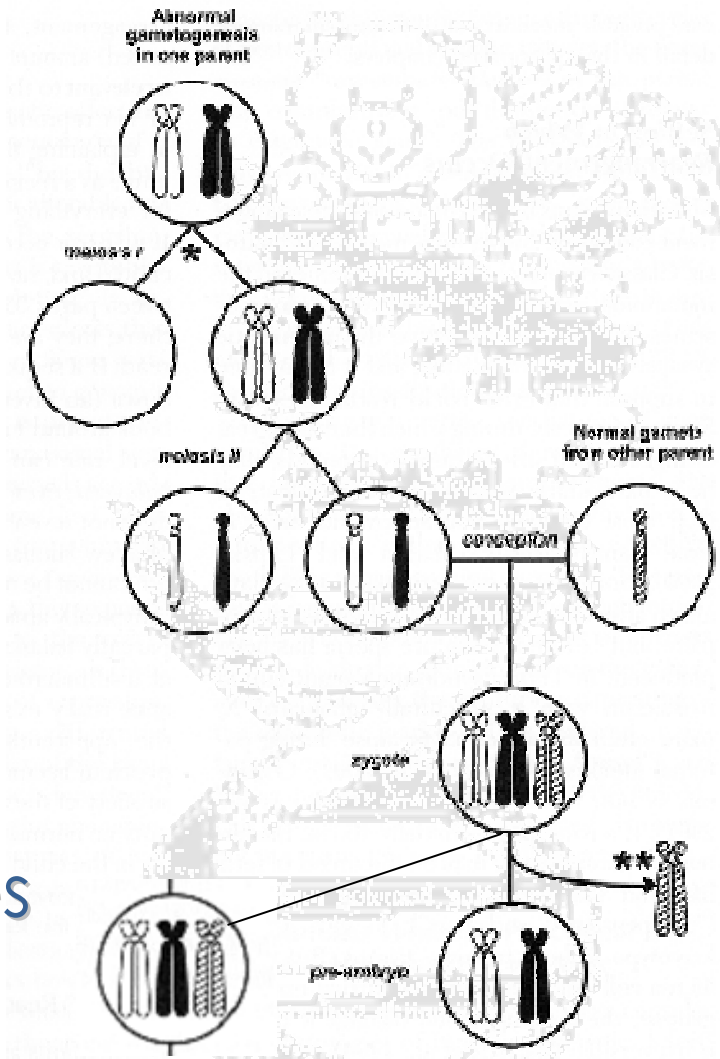
Anomalies de ségrégation: aneuploidies

- Accidents de la ségrégation méiotique
- Le + souvent létal au 1er trimestre
- **Aneuploïdie homogène viables**
  - Autosomes
    - trisomies 13, 18, 21
    - monosomie : non compatible
  - Gonosomes
    - trisomies X (XXX)
    - disomie Y (XYY)
    - monosomie X
    - tétra et pentasomies X et Y : compatibles si au moins 1 X
    - NB: 47,XXX et 47,XYY = variants de la normale
- L'inactivation des chromosomes X et le faible contenu génique du chromosome Y expliquent la survie des aneuploïdies des gonosomes

Aneuploidies en mosaique

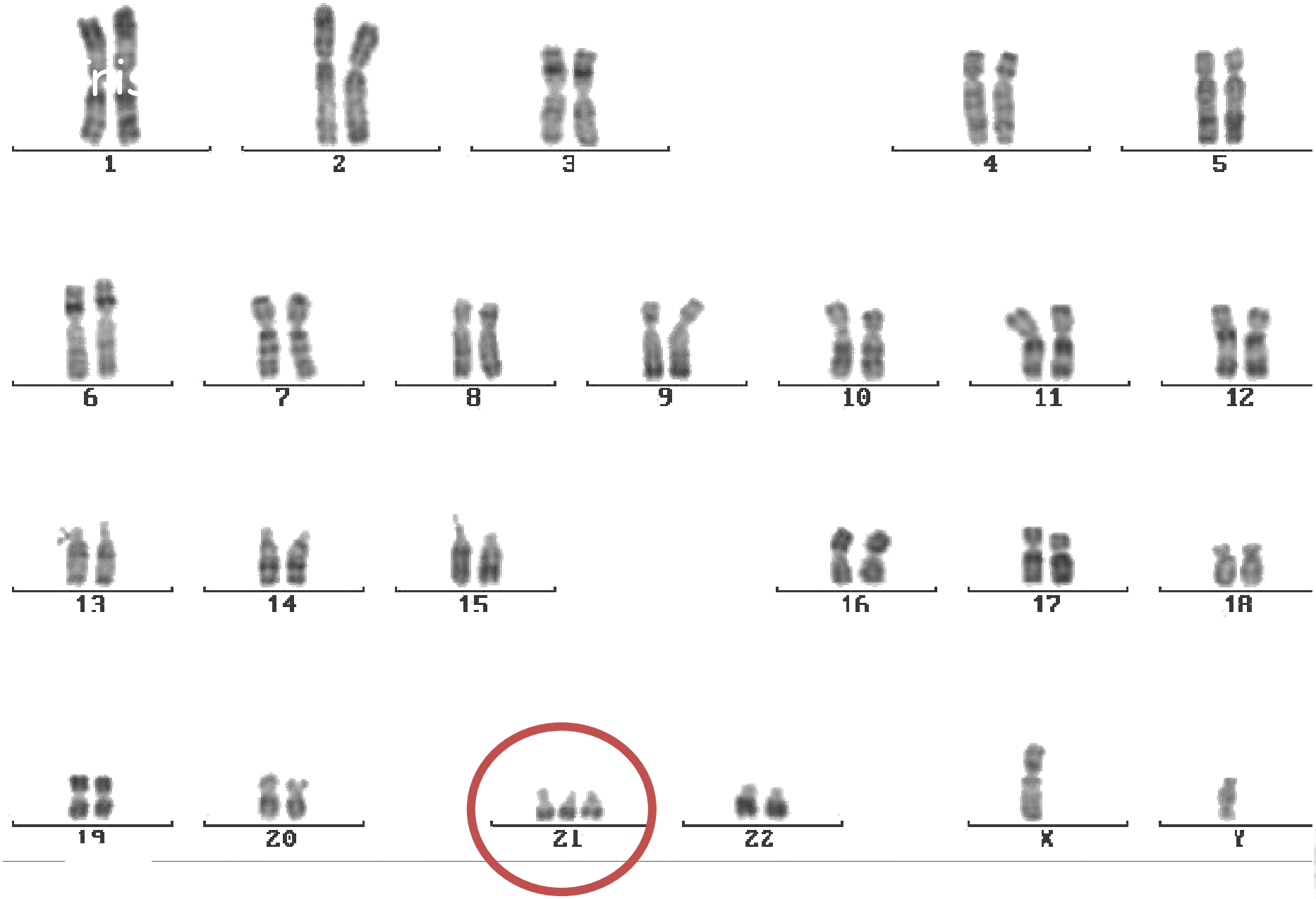
- **Aneuploïdie en mosaïque (non homogène)**
  - Accident de ségrégation lors des premières mitoses post-zygotiques (stade morula)
  - « Correction » spontanée d'une trisomie

- Les trisomies mosaïques 8,9,20,22,... sont compatibles avec la survie

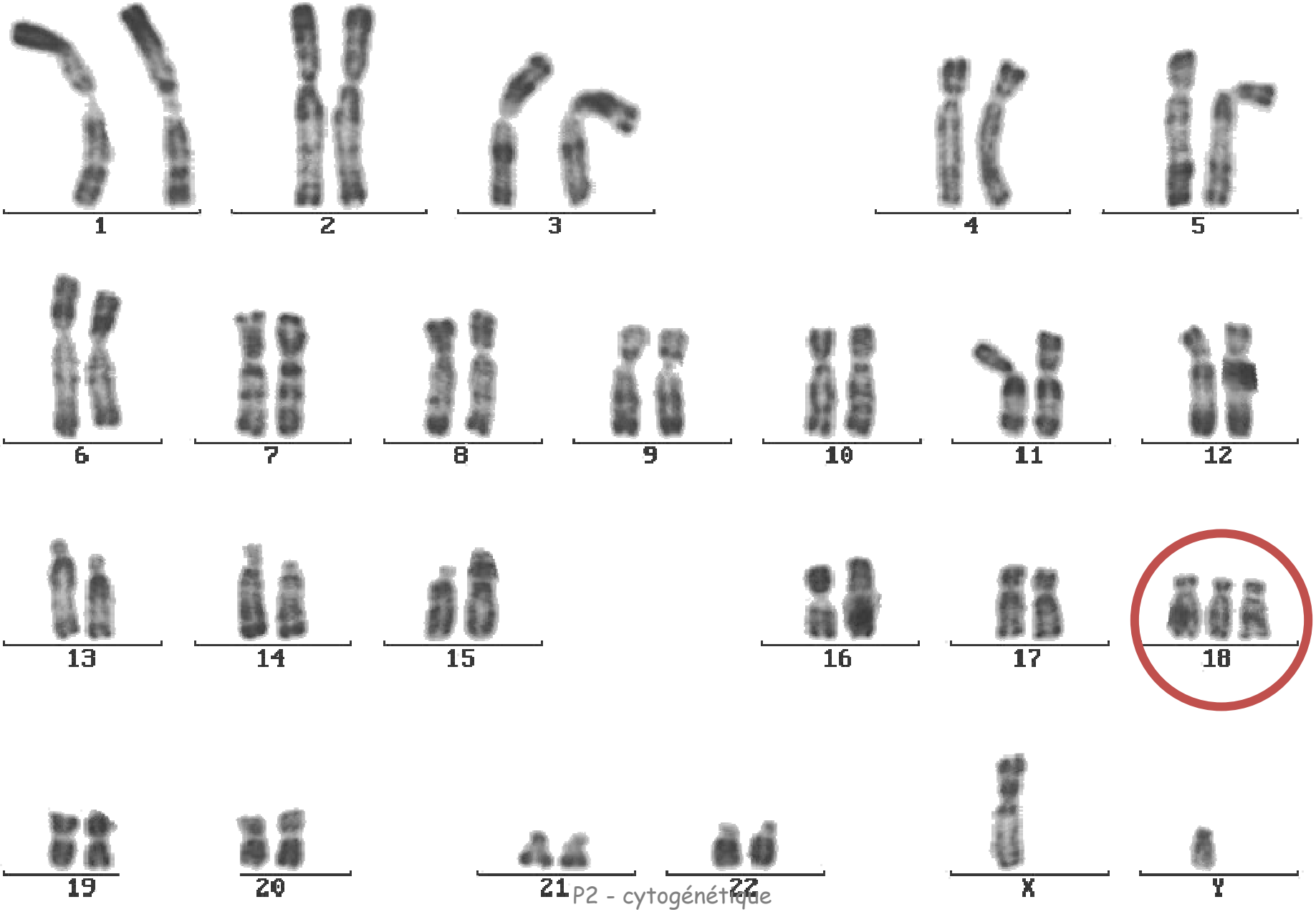


Lignée normale

Lignée trisomique



P2 - cytogénétique



P2 - cytogénétique

Anomalies de structure

- Une ou plusieurs cassure(s) de l'ADN pendant la phase S précédent la méiose
  - suivie d'une réparation anormale
  - Avec ou sans perte de matériel chromosomique
  - Aléatoire mais il existe certaines régions préférentielles (anomalies récurrentes)
  - … qui impliquent **1 chromosome**
    - Plusieurs types: duplication, délétion, inversion
  - … qui impliquent **2 chromosomes**
    - Translocation réciproque
    - Translocation robertsonnienne
- Visibles à l'examen standard ou « cryptiques » (microremaniement < 10 Mb)

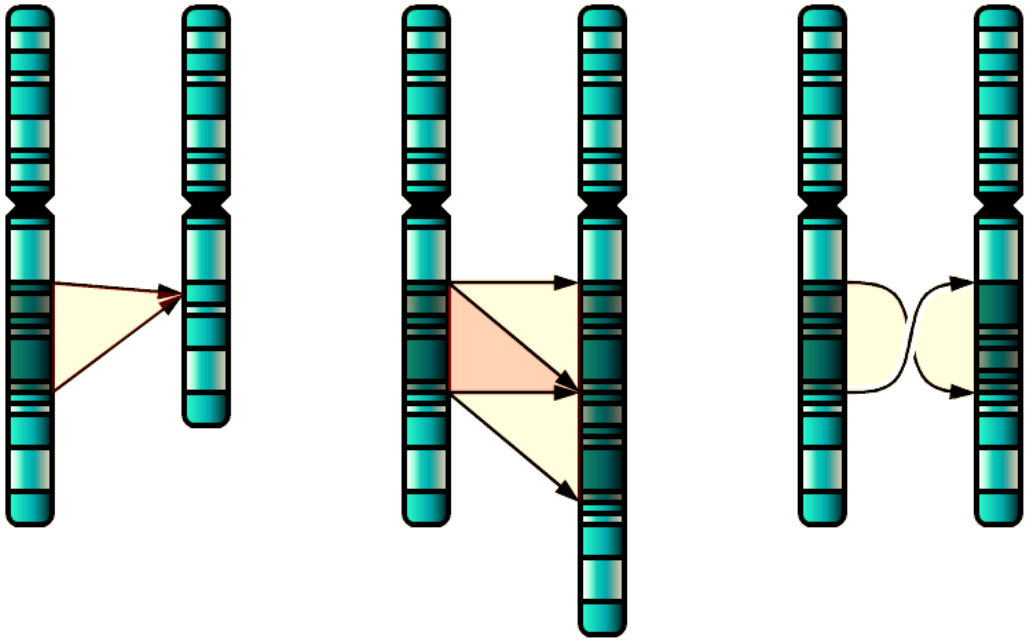
Anomalies de structure

- Déséquilibrée
  - matériel génétique présent …
    - 3 copies (= duplication)

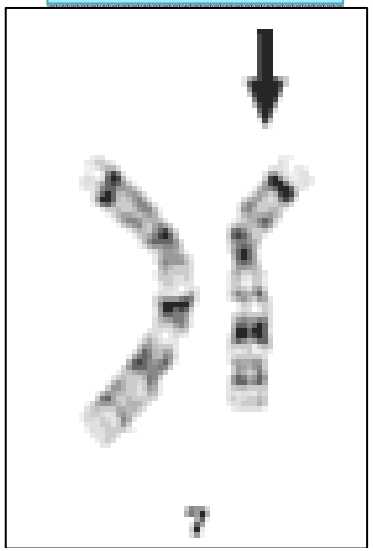
      et/ou
    - 1 copie (= délétion)
- Equilibrée
  - Phénotype normal (2 copies)
  - Risque de ségrégation déséquilibrée à la méiose → risque pour la descendance (selon le détail de l'anomalie)
    - de 0-5% si le père est porteur de la translocation
    - de 0-10% si la mère est porteuse de la translocation
  - Conséquences: stérilité, fausses couches répétées, enfant polymalformé

- Héritée ou de novo

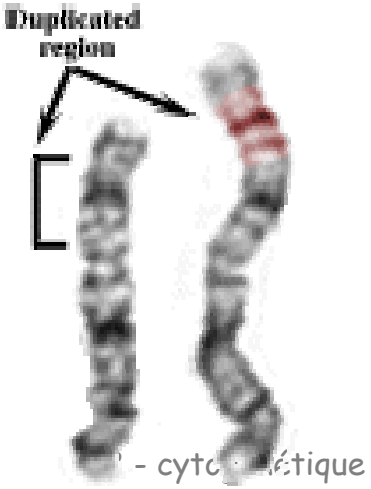
Les 3 types d'anomalies de structure pour 1



Délétion

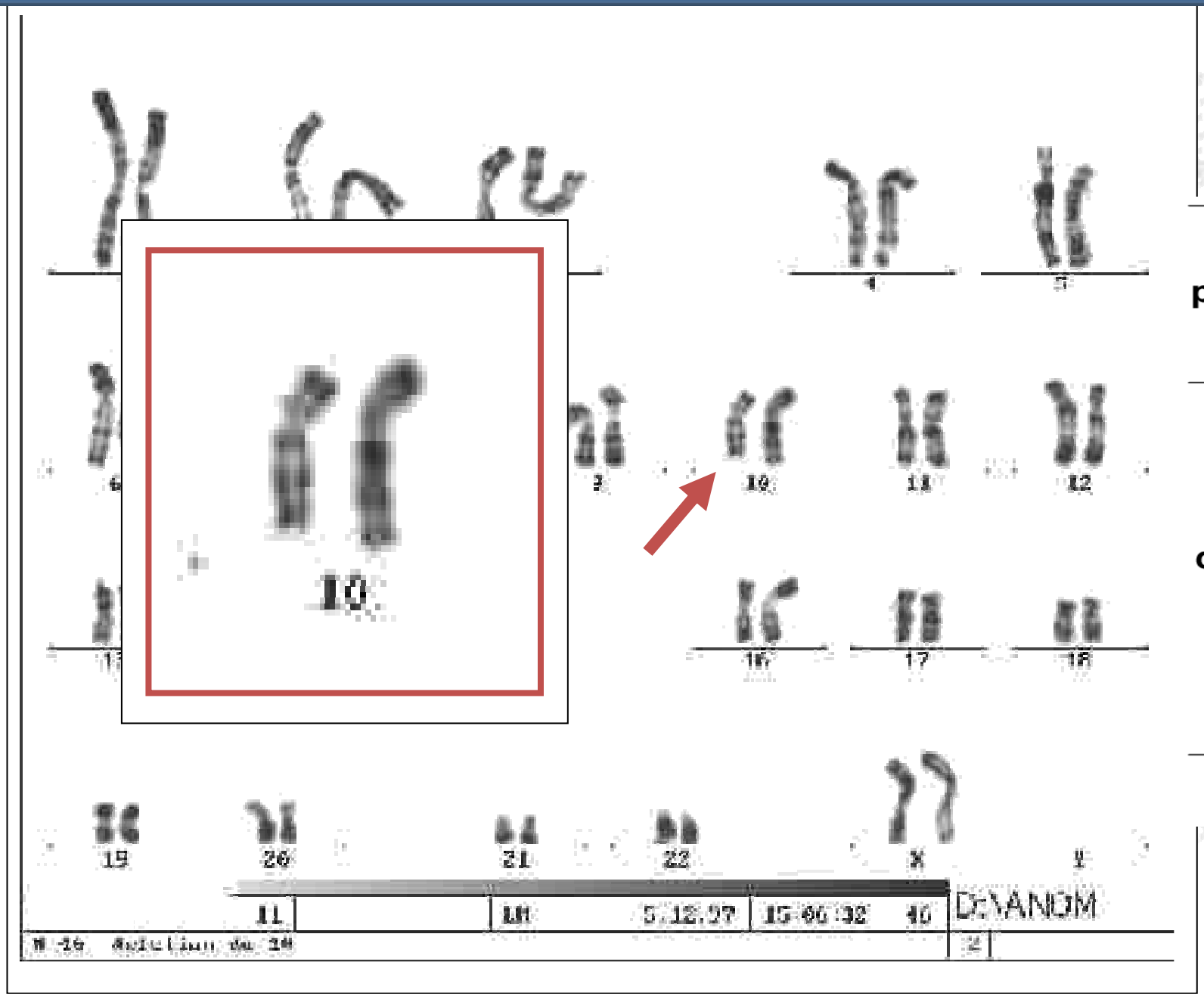


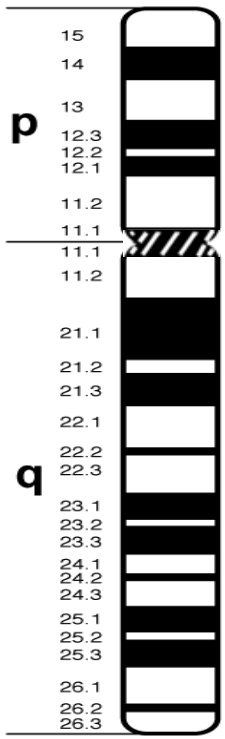
Duplication



Inversion

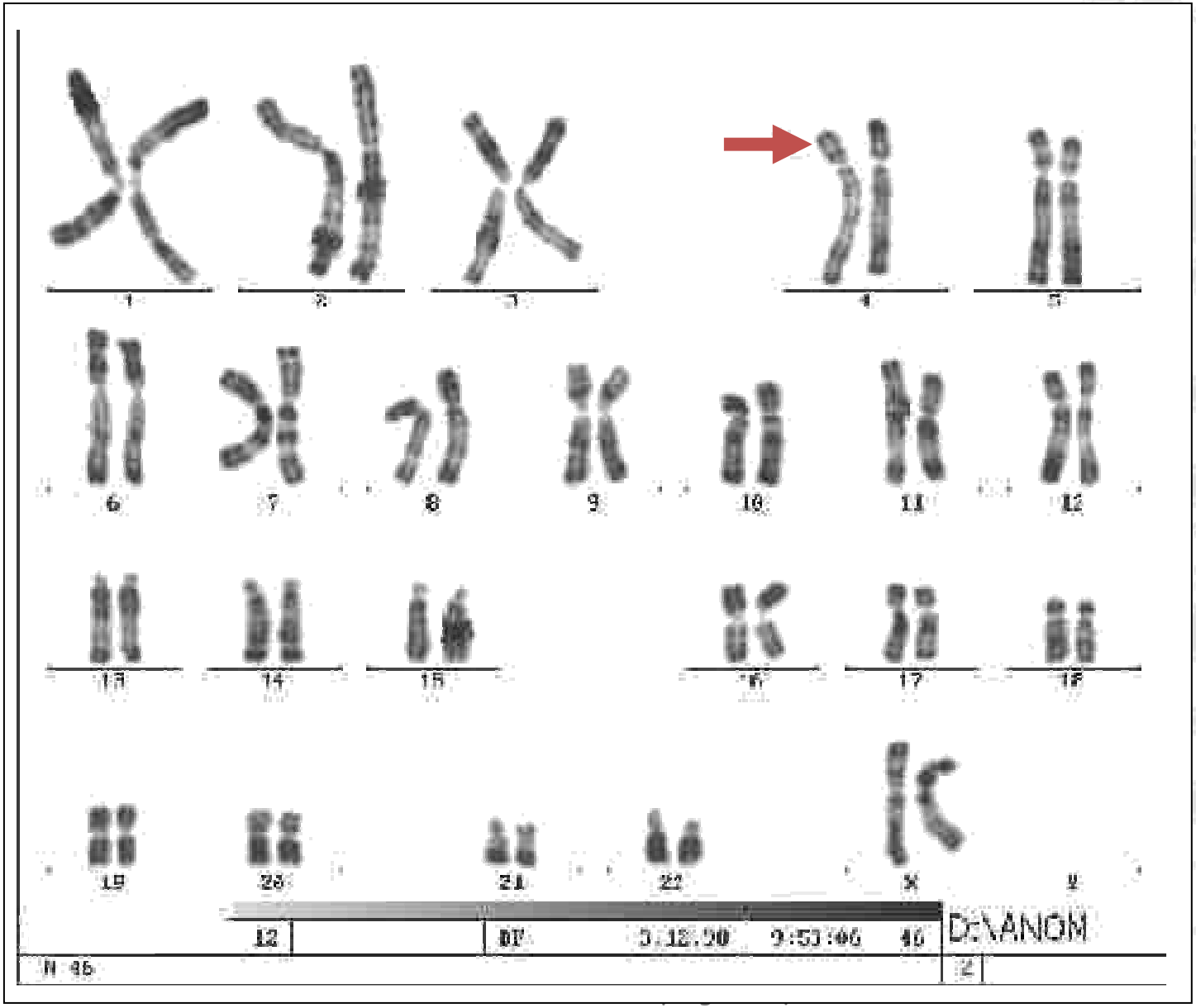
Délétion: 46, XX, del (10) (q25 ter)

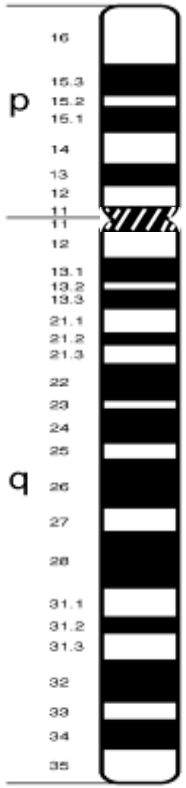




10

Délétion : 46, XX, del (4) (p16pter)



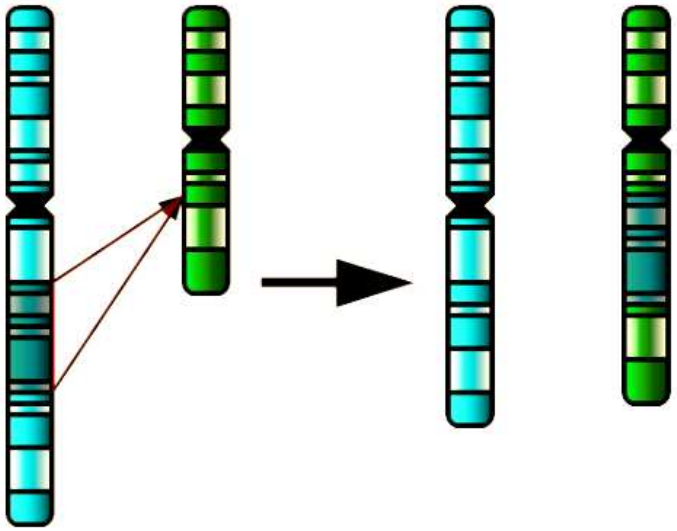


Les microremaniements

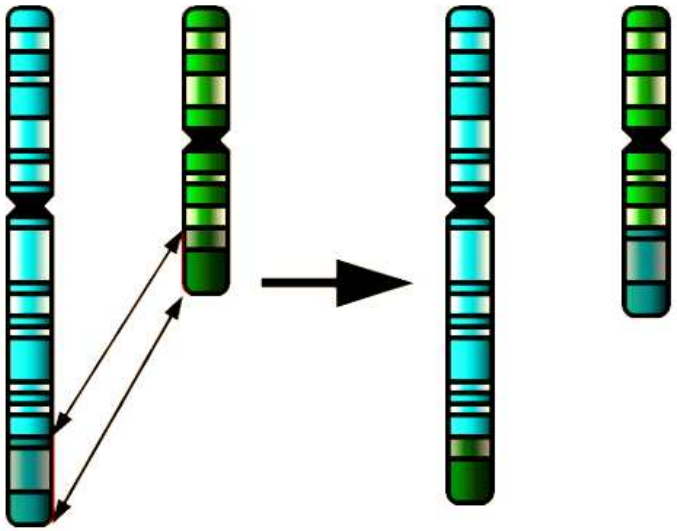
- La majorité des délétions/duplications ont une taille < à 5-10 Mb
  - « microdélétions » / « microduplication »

- Certaines microdélétions interstitielles sont très fréquentes, en particulier
  - Délétion 22q11

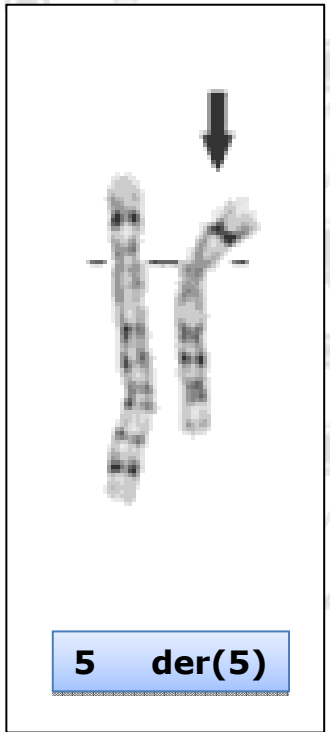
Echanges de matériel entre 2 chromosomes

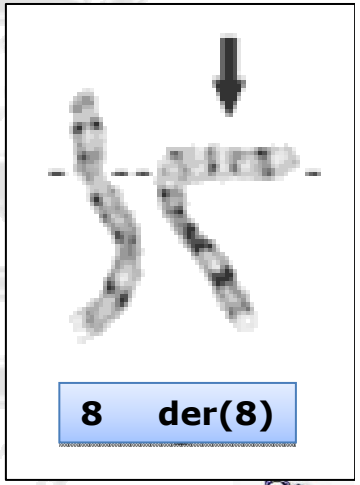


Insertion



Translocation réciproque

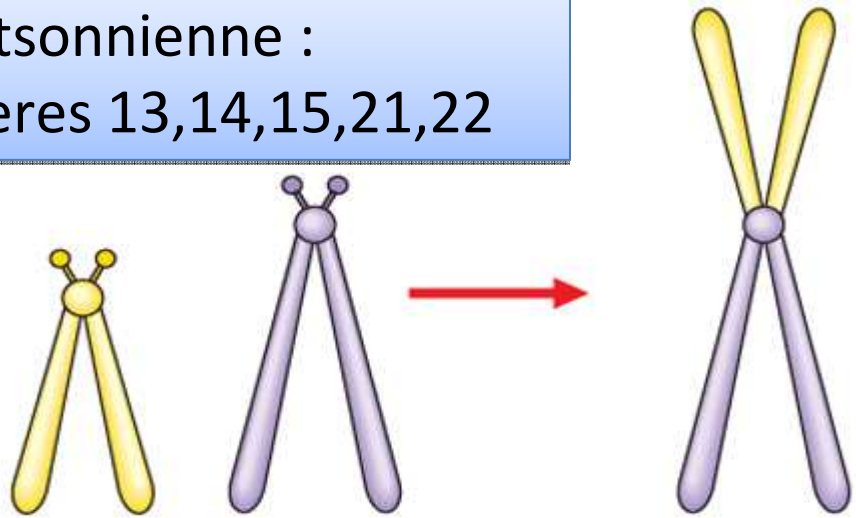


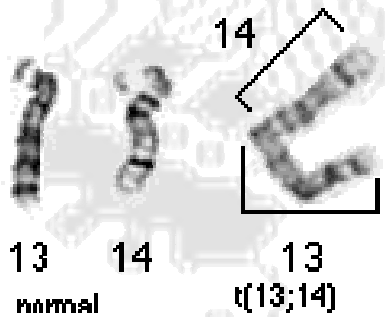


2 types de translocation

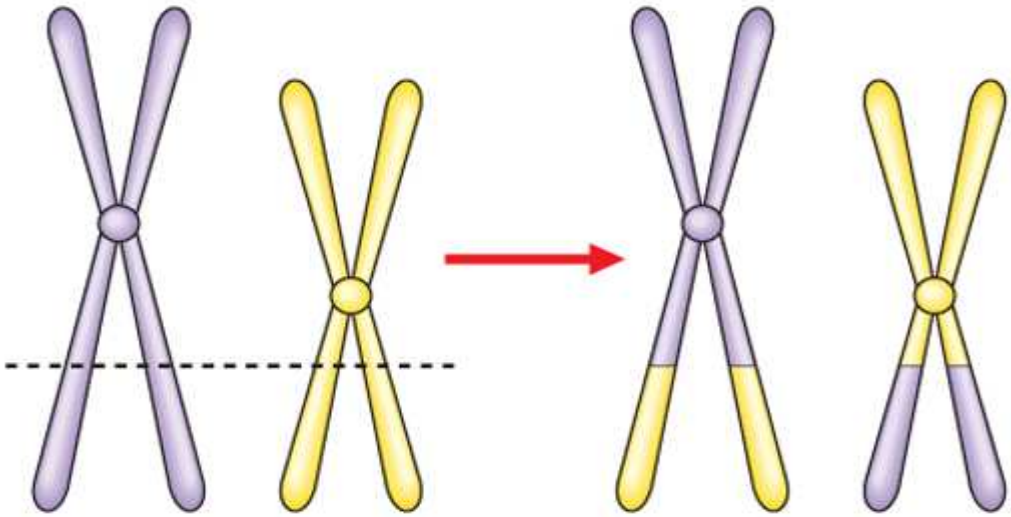
Translocation robertsonnienne :
fusion des centromères 13,14,15,21,22

➔caryotype équilibré à 45 chromosomes



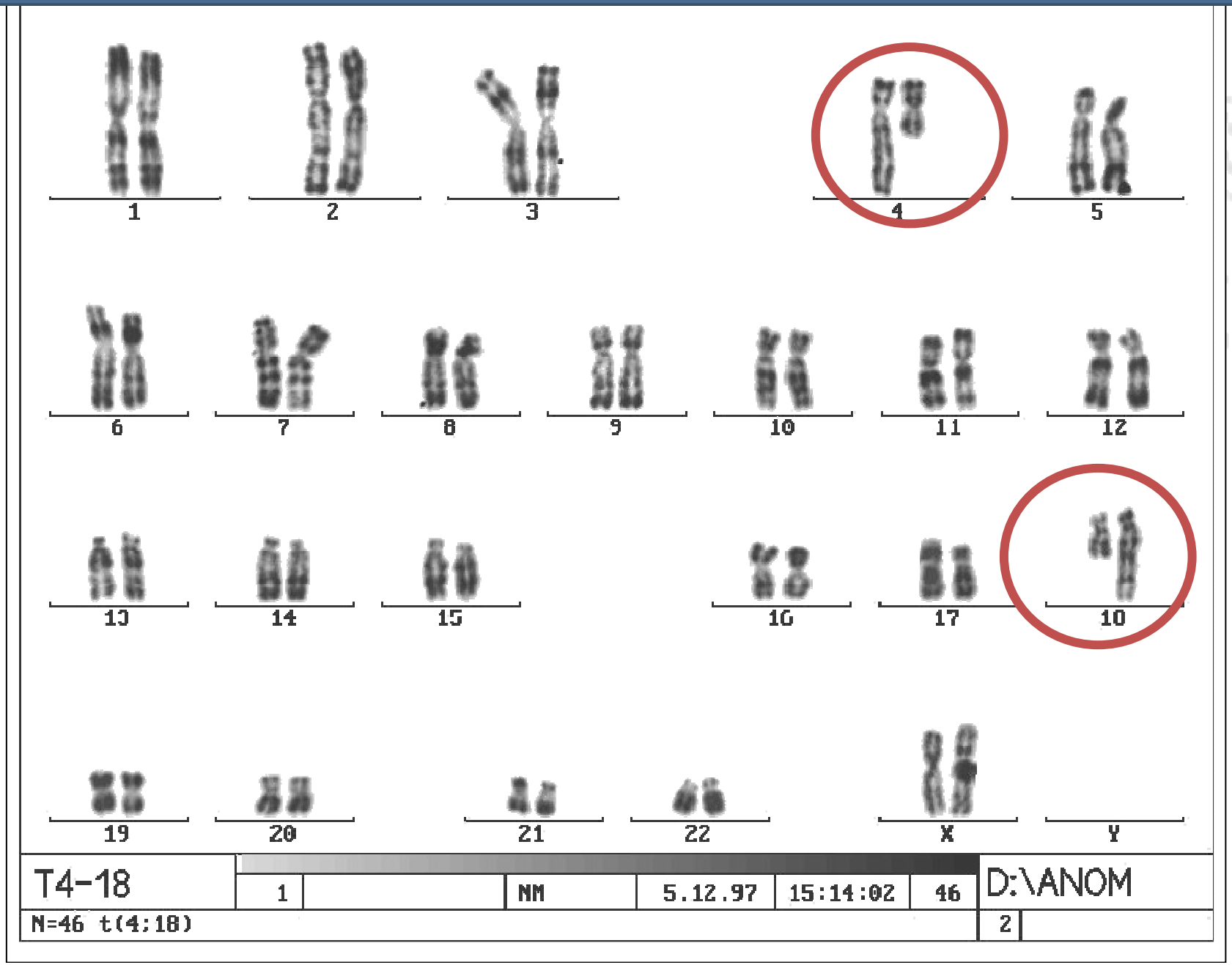


Translocation réciproque : 2 points de cassure, 2 chromosomes

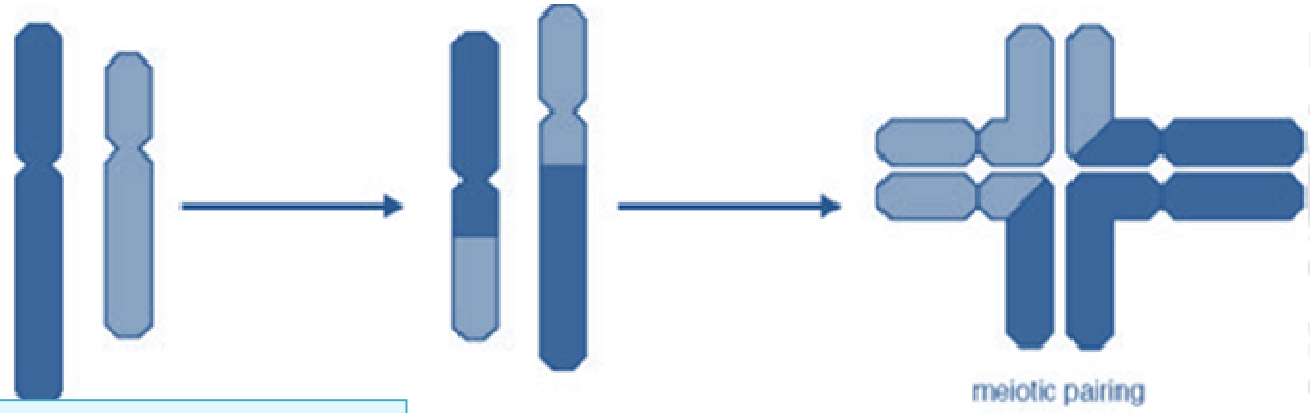


© Elsevier. Turnpenny & Ellard: Emery's Elements of Medical Genetics 13e - www.studentconsult.com

Translocation réciproque équilibrée 46, XX, t (4;18) (q13; q22)



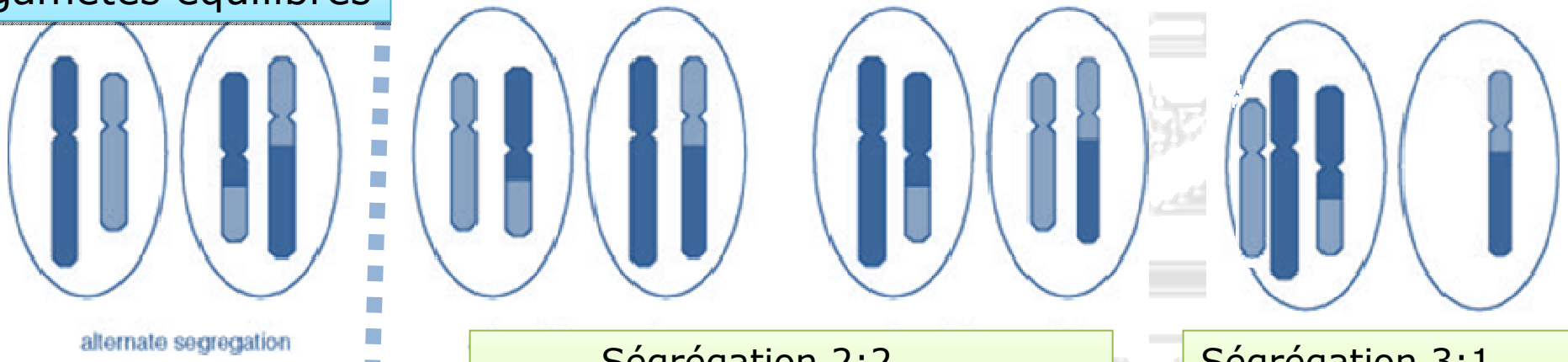
La ségrégation d'une translocation équilibrée est complexe



Appariement obligatoire des chromosomes à la méiose

Ségrégation 2:2
gamètes équilibrés

Gamètes déséquilibrés



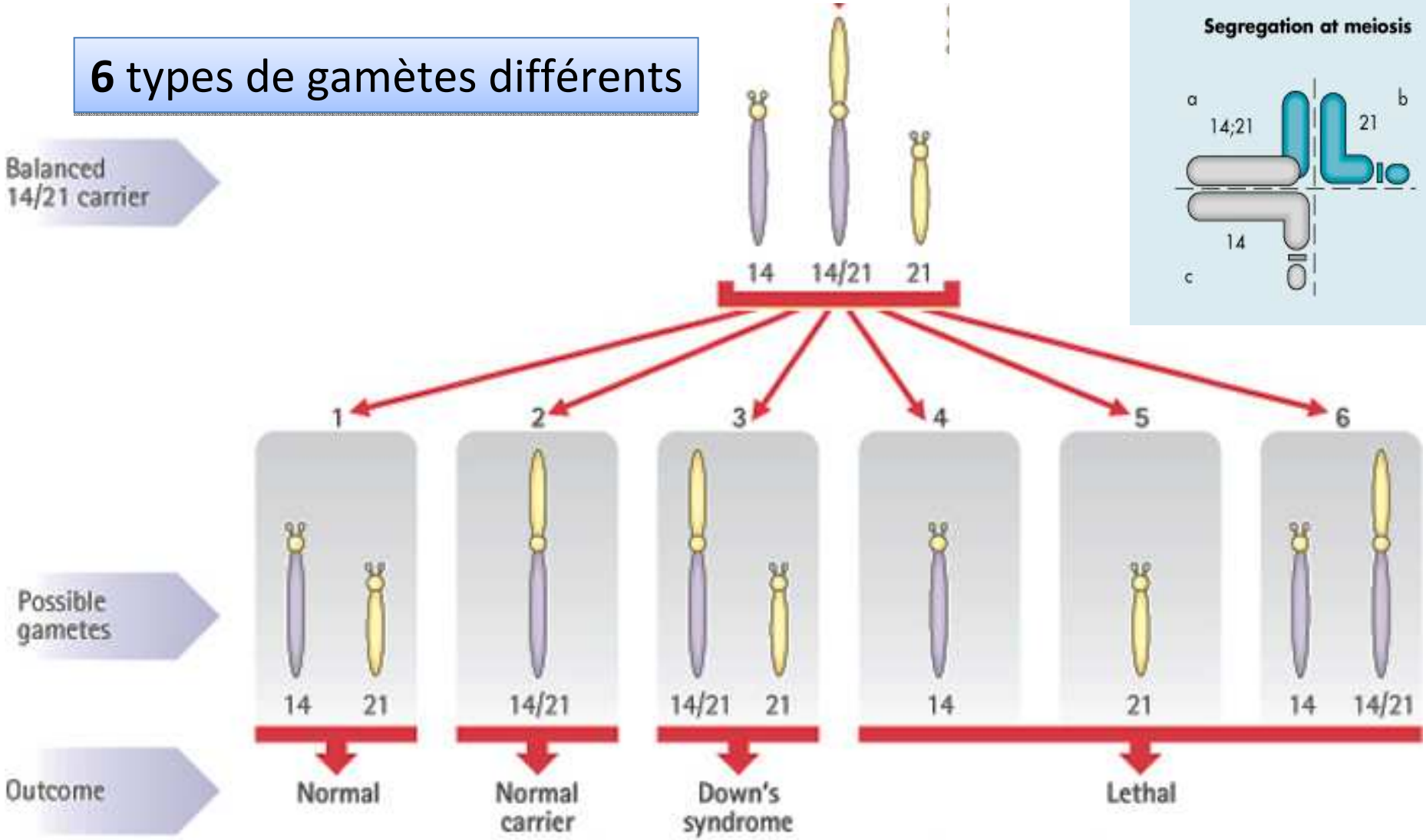
Ségrégation 2:2
Gamètes déséquilibrés

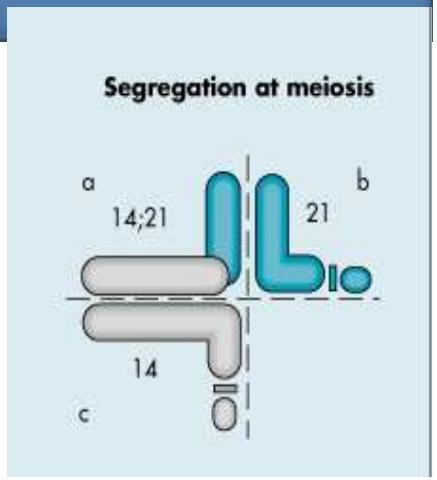
Ségrégation 3:1
(plusieurs possibilités)

Ségrégation la plus fréquente = 2:2 → 6 types de gamètes

Ségrégation d'une translocation robertsonnienne

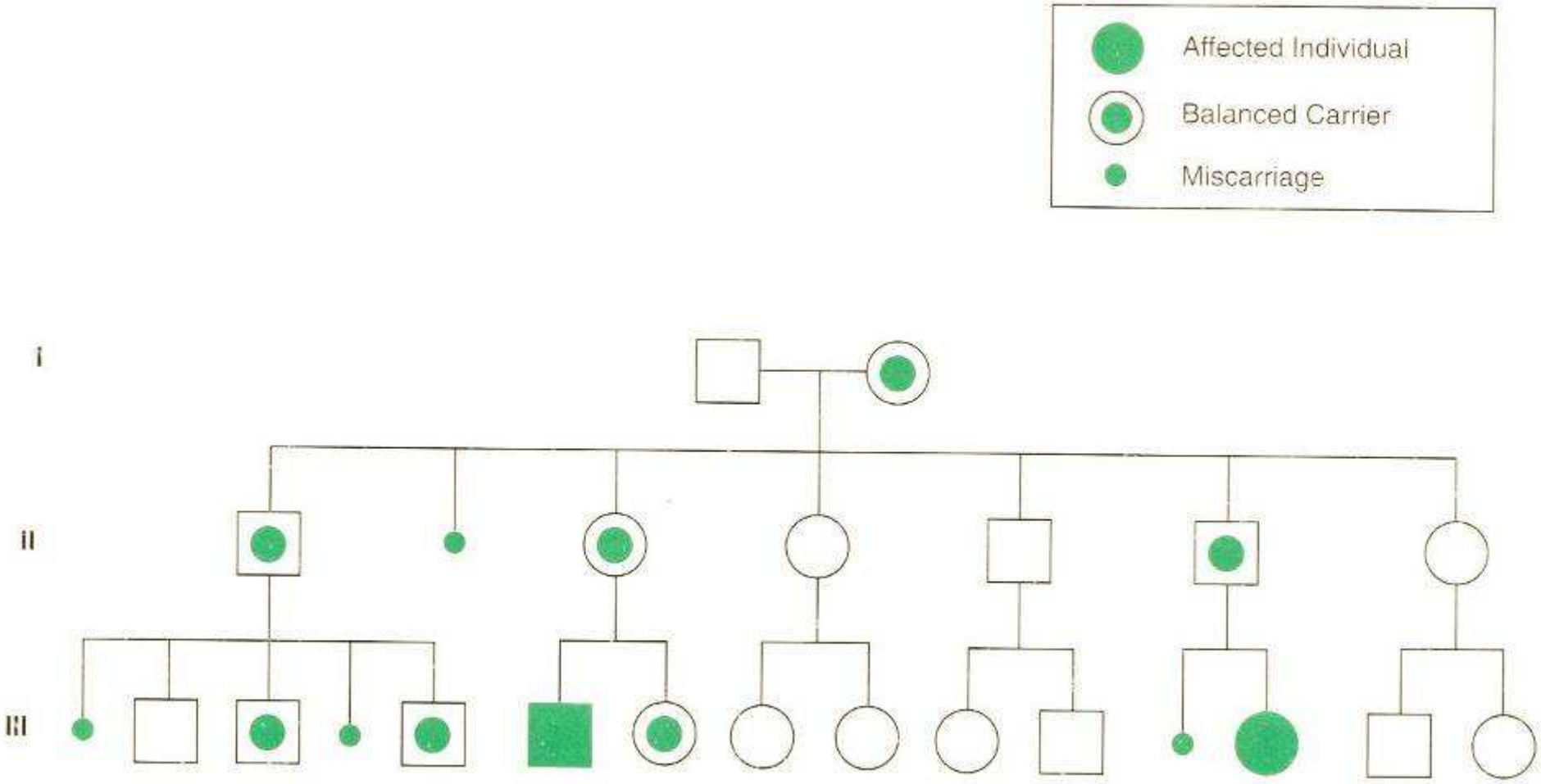
6 types de gamètes différents





© Elsevier. Turnpenny & Ellard: Emery's Elements of Medical Genetics 13e - www.studentconsult.com

Arbre généalogique typique d'une translocation familiale



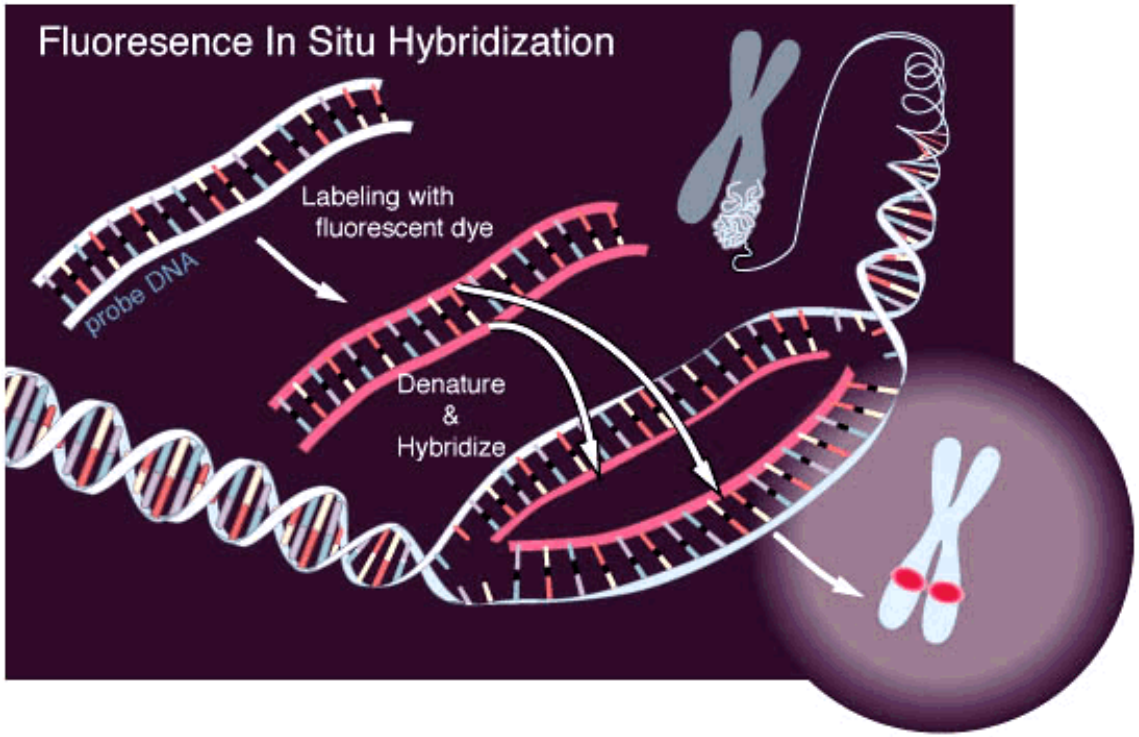
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

- Hybridation d'une sonde d'ADN
  - rendue fluorescente
  - Copie exacte d'une région d'environ 100.000 à 200.000 pb
  - sur une préparation chromosomique

- IL FAUT un point d'appel clinique pour le choix de la sonde

- OU : on peut tester toutes les régions subtélomériques

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization



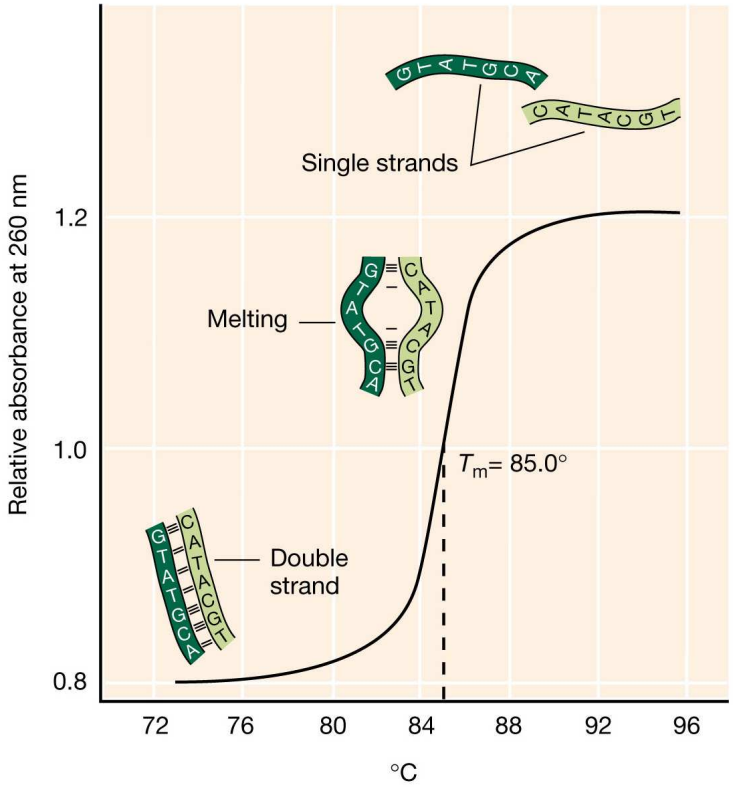
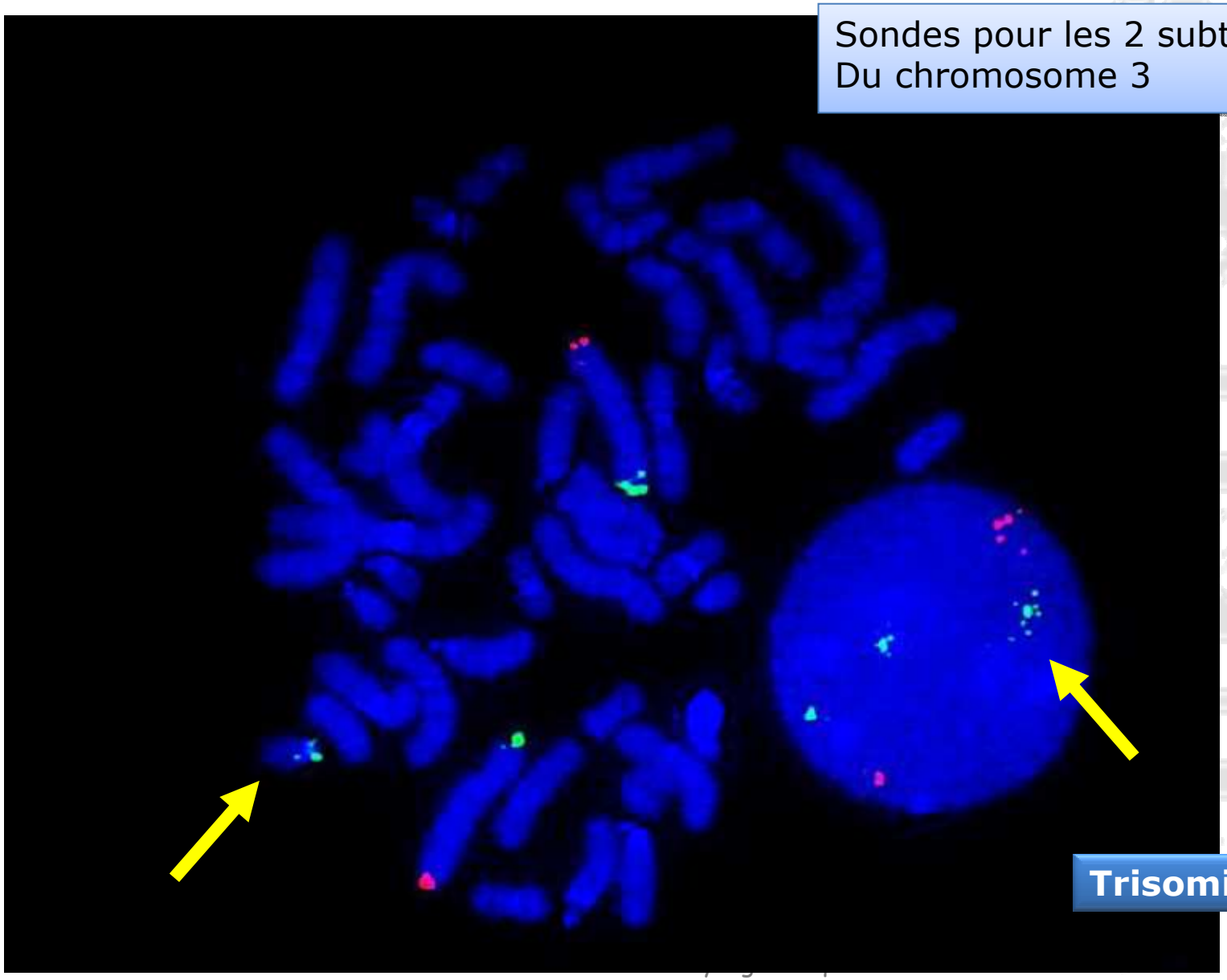


Image de FISH métaphasique et interphasique

Sondes pour les 2 subtélomères
Du chromosome 3



Trisomie 3p

CGH-array OU « Puce à ADN »

- Comparative genomic hybridization
- *Array* : rangée (de sondes)
- Principe
  - Co-hybrider un ADN témoin et l'ADN du malade
    - colorés avec 2 fluorochromes différents (V et R)
    - Compétitivement, sur des sondes ADN déposées sur 1 lame (spot)
- Sonde
  - BAC (*bacterial artificial chromosome*)
    - Fragment d'ADN génomique de 200.000 pb environ
  - Oligonucléotides de synthèse (60 paires de bases < séquence unique du génome humain)
- De 5.000 à >2.000.000 spots par test !!!!

Les puces ADN

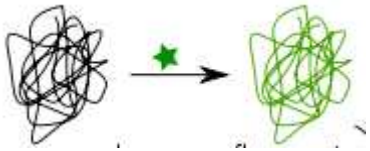
- Deux approches fondées sur les polymorphismes du génome

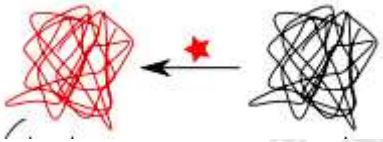
- CGH array
  - Comparaison malade/témoin entre le nombre de copies de loci non polymorpheq
  - Détecte les CNV
- SNP array
  - Génotypage de loci SNP
  - Permet de déterminer indirectement le nombre de copies présentes
- Une même puce peut combiner les 2 approches

Principe de la CGH-array

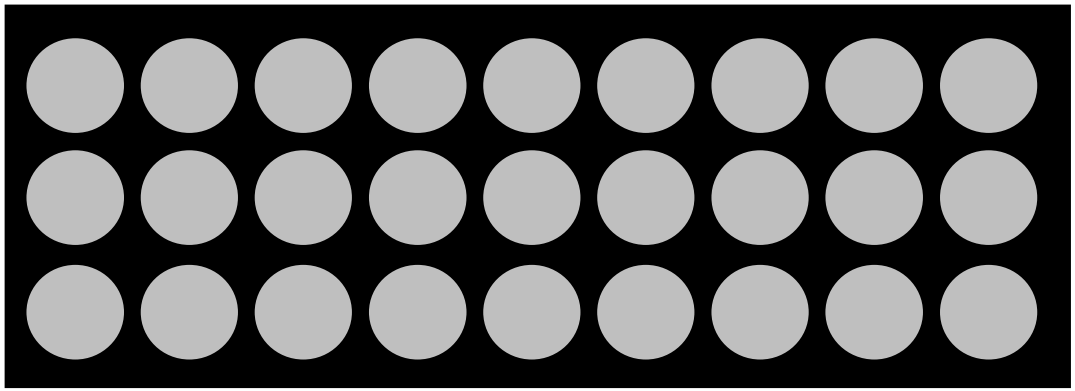
ADN à tester (marquage vert)

ADN témoin (marquage rouge)

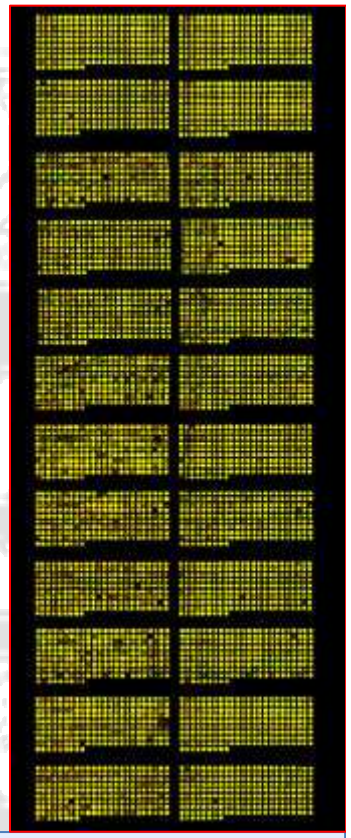




Mélange équimoléculaire



Puce (array)
Env. 200.000 sondes



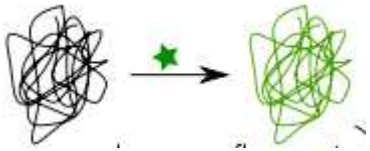
Fragments d'ADN génomique:
(< 100 nucléotides)

chaque spot =
1 région génomique distincte

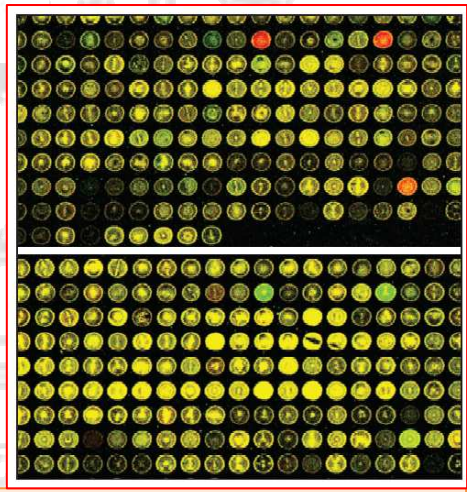
Principe de la CGH-array

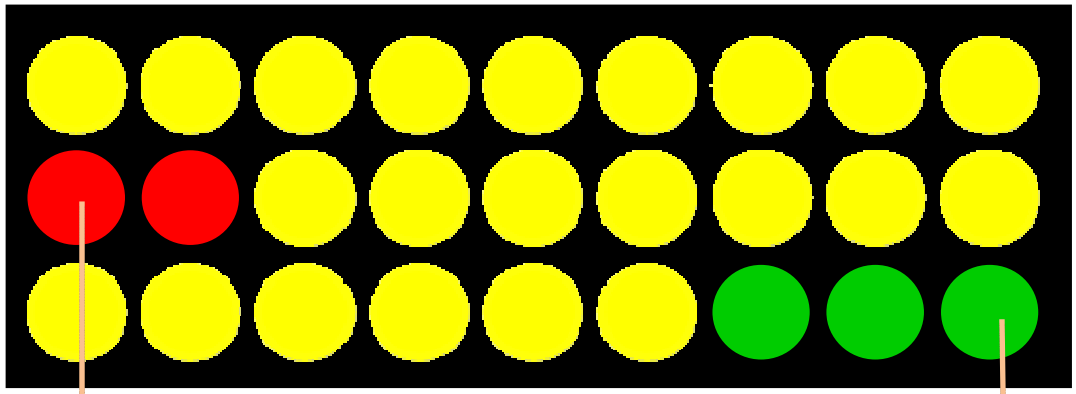
ADN à tester (marquage vert)

ADN témoin (marquage rouge)



Mélange équimoléculaire

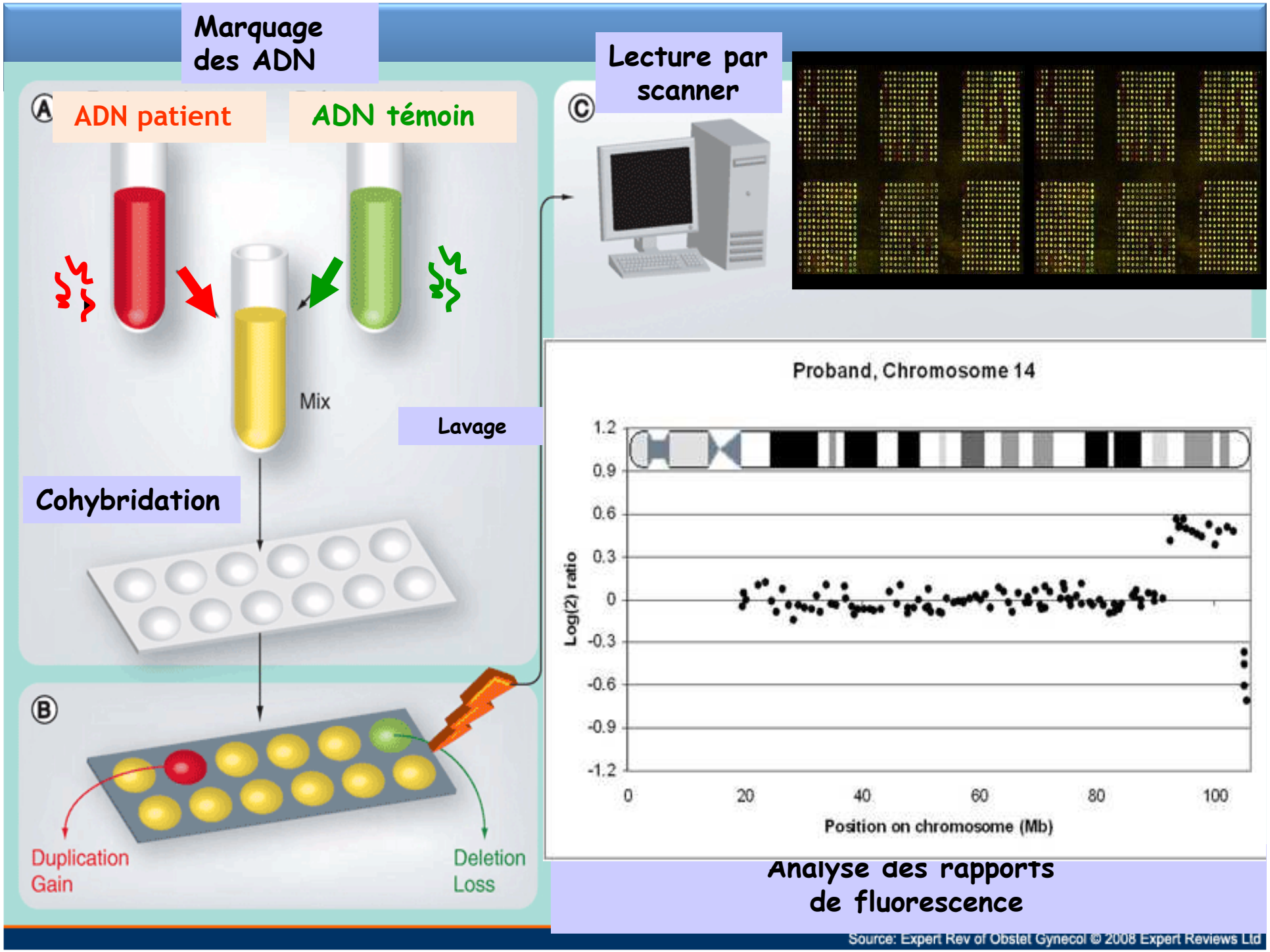




Normal (2copies)
2 ADN = 2 ADN

Délétion (1 copie)
2 ADN > 1 ADN

Amplification (3 copies)
2 ADN < 3 ADN

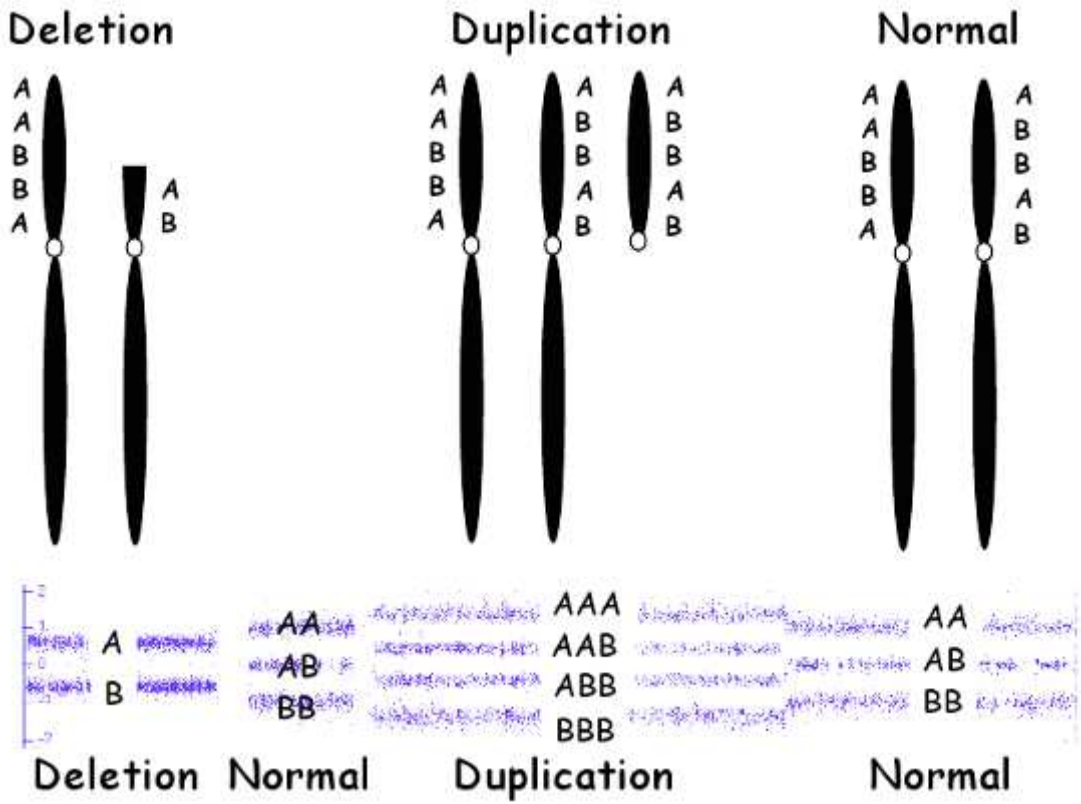

Marquage des ADN
A
ADN patient
ADN témoin
Mix
Lavage
Cohybridation
B
Duplication
Gain
Deletion
Loss
C
Lecture par scanner
Proband, Chromosome 14
Log(2) ratio
1.2
0.9
0.6
0.3
0
-0.3
-0.6
-0.9
-1.2
0
20
40
60
80
100
Position on chromosome (Mb)
Analyse des rapports de fluorescence
Source: Expert Rev of Obstet Gynecol © 2008 Expert Reviews Ltd

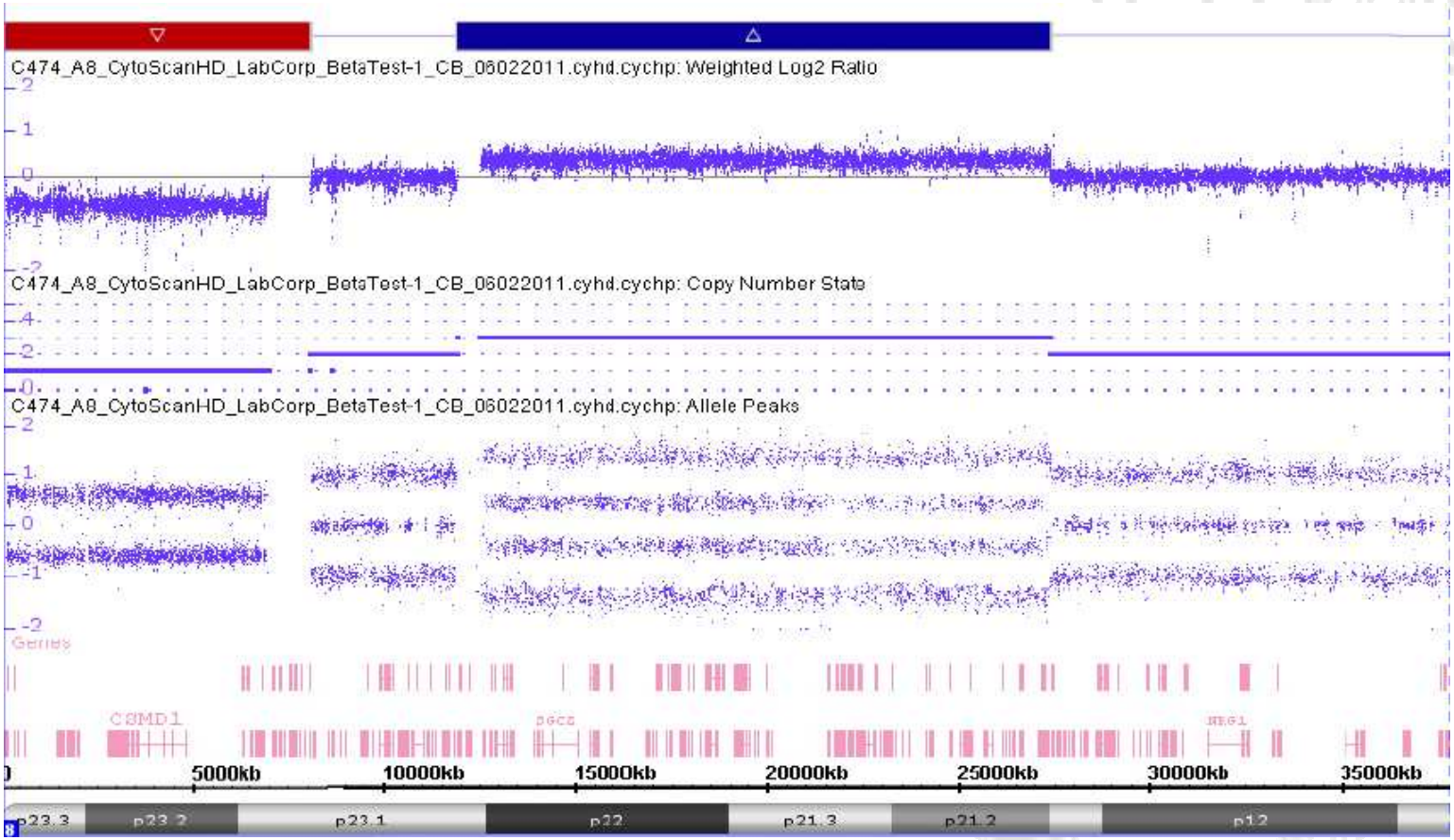
- Les puces SNP: techniquement plus complexes

- Mesurent l'intensité de chaque allèle (A ou B) pour un locus SNP donné

- Principe: il est très peu probable d'avoir plusieurs SNP homozygotes (AA ou BB) à la suite l'un de l'autre

- Chaque SNP est génotypé (AA /AB / BB)
  - Si une région est délétée, tous les SNP de cette région sembleront homozygotes (A ou B)
  - Si une région est dupliquée, on pourra observer 4 génotypes (AAA / AAB / ABB / BBB)


Deletion
Duplication
Normal
A
A
B
B
A
A
B
A
A
B
B
A
A
B
B
A
B
A
A
B
B
A
B
A
A
B
B
A


C474_A8_CytoScanHD_LabCorp_BetaTest-1_CB_06022011.cyhd.cychp: Weighted Log2 Ratio
C474_A8_CytoScanHD_LabCorp_BetaTest-1_CB_06022011.cyhd.cychp: Copy Number State
C474_A8_CytoScanHD_LabCorp_BetaTest-1_CB_06022011.cyhd.cychp: Allele Peaks
Genes
CSMD1
5000kb
10000kb
15000kb
20000kb
25000kb
30000kb
35000kb
p23.3
p23.2
p23.1
p22
p21.3
p21.2
p12

Nomenclature : principes

- Normal
  - 46, XY
  - 46, XX
- Anomalies de nombre
  - 45, X
  - 47, XX, +21
  - 47, XXY
  - 45, X / 46, XX
- Délétion
  - 46, XY,del(5)(p12pter) ou 46, XY, 5p-
- Translocation équilibrée
  - Robertsonnienne: 45, XY, t(15;21)(q10;q10)
  - Réciproque: 46,XY, t(5;20)(q12:p13)
- Translocation déséquilibrée
  - Robertsonnienne: 46,XX,der(14;21)(q10;q10) +21
  - Réciproque: 46, XX, der (5) t(5;20)(q12;p13)