



## Cytogénétique et génétique moléculaire constitutionnelles Caryotypage, FISH et puce d'hybridation génomique comparative (aCGH)

La cytogénétique est l'étude du matériel génétique au niveau cellulaire ; la génétique moléculaire étudie la structure et la fonction des gènes au niveau moléculaire (ADN). Les diverses techniques utilisées varient de par leur application clinique. Cet article présente sommairement les indications des techniques les plus souvent utilisées. Il est essentiel d'utiliser la technique adéquate pour une présentation clinique ou une pathologie suspectée donnée, au risque de faire d'importantes erreurs de diagnostic.

### Caryotypage

Cette technique implique la mise en culture de lymphocytes du sang périphérique et l'utilisation de mitogènes pour stimuler la transformation de ces lymphocytes en cellules mitotiquement actives. Le moment du prélèvement des cellules est déterminé de manière à trouver le plus possible de cellules au stade de la métaphase. Les cellules sont alors fixées, puis étalées sur une lame. Les chromosomes sont colorés à l'aide de divers colorants, généralement le Giemsa (bandes G et bandes R), qui produisent des motifs de bandes sur les chromosomes avec une résolution de 400 à 650 bandes par lot haploïde de chromosomes. Les chromosomes et leurs bandes sont ensuite examinés au

microscope à la recherche d'anomalies, par exemple la perte ou le gain de chromosomes entiers, des translocations de tout un bras (ou d'une partie de celui-ci) d'un chromosome à un autre ou des changements plus subtils dans les motifs des bandes associés à divers syndromes génétiques. Les chromosomes sont photographiés et appariés en vue de leur examen (caryogramme).

Les avantages du caryotypage sont les suivants :

1. Possibilité de visualiser la totalité du génome.
2. Possibilité de visualiser des cellules ou des chromosomes individuels.

Les limites du caryotypage sont les suivantes :

1. La résolution est limitée à environ 5 Mb (millions de bases).
2. Il est nécessaire de disposer d'une source de cellules en croissance active.

Il convient de noter que le caryotypage classique est long, la préparation des cellules en vue de leur examen pouvant prendre plusieurs jours. De plus, les lymphocytes doivent être vivants, ce qui signifie que, pour réussir la culture cellulaire, les échantillons sanguins doivent parvenir au laboratoire tout au plus

48 heures (de préférence moins) après le prélèvement.



*Fig. 1 : Caryogramme humain normal (montrant à la fois un caryogramme féminin et un caryogramme masculin, ce qui ne se produit évidemment pas dans la pratique).*



*Fig. 2 : Caryogramme d'une patiente présentant une trisomie 21.*

## Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Le caryotypage classique se limite à la détection de réarrangements impliquant plus de 5 Mb d'ADN. La méthode FISH permet de détecter des séquences de 100kb à 1 Mb. Cette technique implique l'hybridation de sondes de séquences d'ADN spécifiques couplées à un marqueur fluorescent avec de l'ADN du patient, puis la détection ultérieure au microscope de la présence, de l'absence, du nombre anormal d'exemplaires ou d'emplacements pathologiques d'un signal de fluorescence donné. La disponibilité de sondes de locus spécifiques pour de nombreux défauts génétiques connus a grandement accru

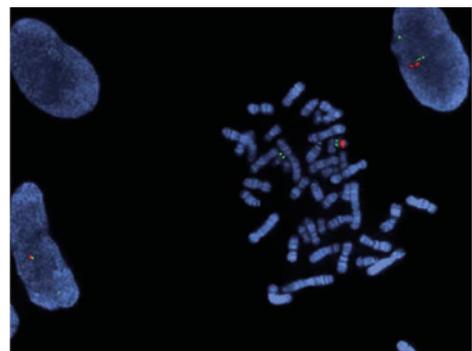
la précision de la détection de syndromes de microdélétion et de duplication. Cette grande spécificité des sondes constitue cependant aussi la principale limite de la méthode FISH : elle ne peut détecter que les séquences d'ADN spécifiques dont elles sont complémentaires et auxquelles elles peuvent s'hybrider.

Avantages de la technique FISH :

1. Elle peut faire une sonde à partir de quasiment tout type d'ADN.
2. Sa résolution est bien supérieure à celle du marquage des bandes G pour identifier les délétions, les insertions et les points de cassure des translocations.
3. Elle peut utiliser des tissus archivés et des cellules, quel que soit leur stade du cycle cellulaire.
4. Elle peut analyser les résultats cellule par cellule.
5. Ses délais plus rapides, étant donné qu'il n'est pas nécessaire de mettre les cellules en culture pour obtenir des cellules en métaphase.

Limites de la technique FISH :

1. Il n'est possible de visualiser que la région du génome complémentaire de la sonde utilisée.



*Fig. 3 : Analyse FISH de cellules d'un porteur d'aplasie thymique en métaphase. La sonde verte indique deux chromosomes 22 (sonde standard). La sonde rouge est spécifique à la région critique de l'aplasie thymique et est uniquement présente dans l'un des chromosomes 22, indiquant une délétion sur l'autre chromosome.*

## Puce d'hybridation génomique comparative (aCGH) et polymorphisme nucléotidique (ou puce SNP)

La méthode d'hybridation génomique comparative compare le génome du patient à un génome de référence (témoin normal ou standard) pour identifier des différences entre les deux génomes et localiser des régions de déséquilibre génomique (variation du nombre de copies [VNC]) chez le patient. Une VNC est définie comme un segment d'ADN de 1 000 bases ou plus présent dans un nombre variable de copies comparé à l'ADN standard. Pour faciliter l'analyse, l'ensemble du génome est fragmenté en de nombreuses petites régions et la puce à ADN est disposée de manière à pouvoir identifier l'emplacement précis de chaque fragment au sein du génome global. Il est ensuite possible d'établir le contenu génique de tout déséquilibre et d'évaluer les gènes contre le phénotype du patient. Figure 1 : séquence d'apparition des marqueurs biologiques

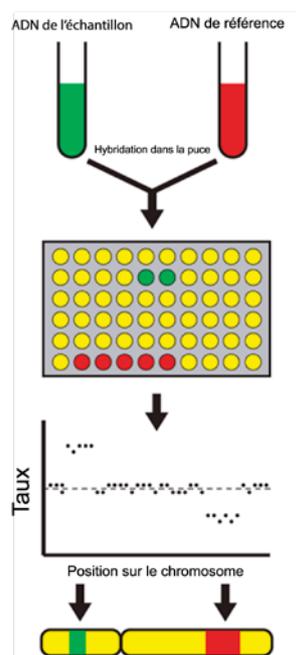


Fig. 4 : Technique de principe de l'aCGH

En principe, pour déterminer de la différence entre le nombre de copies du patient et celui de l'échantillon de référence (témoin), il faut suivre les étapes suivantes :

1. L'ADN de l'échantillon et celui de référence sont marqués avec des sondes de couleur différente (rouge et verte).
2. Les deux échantillons sont soumis à l'ADN immobilisé dans une puce et les séquences complémentaires se lient. Un scanner recueille des informations relatives à la couleur et à l'intensité.
3. En l'absence d'un changement dans le nombre de copies de la séquence dans l'échantillon (le patient) analysé, on observera une liaison similaire de l'ADN de l'échantillon et de l'ADN de référence avec des quantités de fluorescence égales de chaque couleur, ce qui générera une couleur d'émission nette (jaune).
4. Dans les séquences qui présentent une duplication dans l'échantillon analysé, la fluorescence verte sera supérieure à la rouge et l'émission globale sera de couleur verte ; inversement, des délétions entraîneront une diminution du niveau de la fluorescence verte par rapport à la fluorescence rouge de l'échantillon de référence et l'émission nette sera de couleur rouge.

### Puce SNP :

Le polymorphisme nucléotidique (ou SNP pour single nucleotide polymorphism), une variation de l'ADN sur un seul site, est le type de variation de génome le plus fréquent. Par exemple, on a identifié près de 50 millions de SNP dans le génome humain. La plupart d'entre eux ne sont pas pathologiques. Les principes et techniques de base de la puce SNP sont semblables à ceux de l'aCGH, mais l'utilisation du SNP permet de recueillir des informations

de génotypage en plus des données d'intensité standards.

Ainsi, les principaux avantages de la puce SNP par rapport à l'aCGH sont qu'elle permet de déterminer à la fois les VNC et la perte d'hétérozygotie (perte de matériel génétique de l'un des deux parents) et de détecter des aneuploïdies et des triploïdies, qui représentent environ 5 % des anomalies chromosomiques responsables des fausses couches.

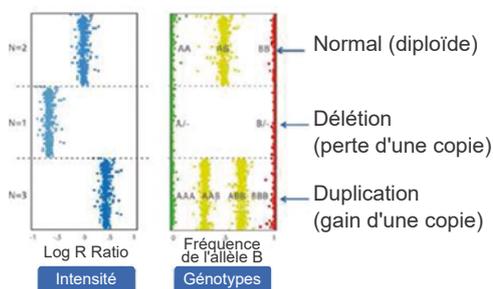


Fig. 5 : Profils obtenus par puce SNP : Analyse de l'intensité et du génotypage

## Caryotypage vs aCGH et puce SNP

En principe, tant le caryotypage que l'aCGH et la puce SNP sont des techniques pan-génomiques qui peuvent être utilisées pour évaluer la présence de déséquilibres génomiques de type variation du nombre de copies (VNC). Même si de prime abord ces techniques peuvent sembler très différentes, ce qui les différencie surtout est leur résolution, qui mesure le degré de grossissement du génome. La résolution d'un caryotype classique avec marquage des bandes G est d'environ 5 Mb (il peut détecter des modifications de plus de cinq millions de paires de bases). Les techniques modernes agissent comme un microscope plus puissant. En fonction de la technique et du nombre de sondes d'ADN utilisées, il est possible de déceler des changements de plus de 1 Mb (un million de paires de bases) à faible résolution ou des changements pouvant impliquer seulement 10 000 paires de bases à haute résolution.

Des VNC bien plus petites peuvent être détectées avec des techniques à résolution plus élevée, ce qui signifie que les techniques modernes permettent de déceler un nombre plus important de CNV pathogènes que le caryotypage.

Vu que les VNC sont relativement courants dans l'ensemble du génome, de nombreuses VNC bénignes sont aussi détectées, ce qui nécessite une interprétation minutieuse et la réalisation d'exams de contrôle.

## Utilisations cliniques du caryotypage, de l'analyse FISH et de l'aCGH/la puce SNP

Considérant les différences de résolution et les avantages et limites de chaque technique, la prudence est de mise au moment de décider du ou des examens à réaliser. L'examen adéquat dépend de l'état clinique ou du syndrome suspecté et de l'arbre généalogique de la maladie génétique. Il est conseillé de consulter un généticien clinique.

En général, le caryotypage est indiqué en première intention dans les cas suivants :

1. Évaluation d'une aneuploïdie courante, par ex., trisomies 21 et 18 ou aneuploïdie des chromosomes sexuels.
2. Présence d'organes génitaux ambigus ou genre indéterminé.
3. Retard de la puberté ou développement sexuel secondaire anormal.
4. Petite taille ou aménorrhée chez les femmes.
5. Présence de caractéristiques cliniques isolées, par ex., bec-de-lièvre ou maladie cardiaque.
6. Syndromes de cassure des chromosomes.
7. Infertilité.

L'analyse FISH à sonde unique est utile pour confirmer un diagnostic suspecté d'un syndrome bien décrit, comme le syndrome de Williams.

L'aCGH et la puce SNP sont indiqués en première intention dans les cas suivants :

1. Difficultés d'apprentissage inexplicables.
2. Déficience intellectuelle ou altération cognitive.
3. Retard du développement.
4. Problèmes du comportement, notamment troubles du spectre autistique.
5. Dysmorphisme/anomalies congénitales multiples suggérant une anomalie chromosomique.
6. Fausses couches (puce SNP)
7. Détection d'anomalies à l'échographie pendant la grossesse.

En matière de rendement diagnostique, dans le diagnostic du déficit mental :

MÉTHODE	RENDEMENT DIAGNOSTIQUE DE LA MÉTHODE
Caryotypage et analyse FISH	5 à 10 %
aCGH (puce BAC)	+ 16,7 % des cas inexplicables par caryotypage et analyse FISH
Puces SNP	+ 22,7 % des cas inexplicables par caryotypage et analyse FISH

Il convient de noter que les informations ci-dessus ne sont que des recommandations d'ordre général. Dans certains cas, plusieurs examens seront nécessaires pour poser le diagnostic, avec nécessité parfois d'exams de contrôles en fonction des résultats de la technique utilisée en première intention. Il est toujours conseillé de consulter un généticien clinique.

### References:

1. ACMG Practice Guidelines: Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. Manning, M et Hudgins, L. Genetics in Medicine Volume 12, Numéro 11, 742 – 745, Novembre 2010.
2. Human Cytogenetics: constitutional analysis. 3e édition. E. Rooney éd. Oxford University Press 2001
3. Levy, B. et al. Genomic Imbalance in Products of Conception: Single-Nucleotide Polymorphism Chromosomal Microarray Analysis. Obstetrics & Gynecology 124, 202–209 (2014).

