

Caryotype

Le caryotype consiste en l'étude des chromosomes.

Les chromosomes ne sont visibles que dans les cellules en division, au stade métaphasique.

On fait donc appel soit à des tissus riches en divisions cellulaires spontanées, soit à des cellules en culture. On distingue les cultures *in situ* utilisées pour des cellules adhérentes (exemple : amniocytes) ou les cultures en suspension.

Les tissus les plus couramment utilisés sont :

- pour le diagnostic constitutionnel postnatal : les lymphocytes stimulés par la phytohématagglutinine (culture en 72 heures) et beaucoup plus rarement les fibroblastes à partir d'une biopsie tissulaire (peau essentiellement) ;
- pour le diagnostic constitutionnel prénatal : les cellules du liquide amniotique (culture en environ 10–15 jours), les villosités chorales (divisions cellulaires spontanées pour les cellules trophoblastiques ou culture en 10–15 jours pour le stroma villositaire) ou les lymphocytes fœtaux à partir d'une ponction de sang fœtal (culture en 72 heures) ;
- pour le diagnostic tumoral : les anomalies chromosomiques sont principalement étudiées dans le cadre de l'oncohématologie à partir de moelle osseuse, de sang ou de biopsie ganglionnaire, plus rarement de tissus tumoraux.

Principes techniques

Les cellules sont bloquées en métaphase par de la colchicine, soumises à un choc hypotonique pour disperser les chromosomes, fixées par un mélange alcool-acide acétique puis étalées sur lame en cas de culture en suspension.

On applique ensuite différentes techniques de banding permettant d'obtenir un marquage spécifique de chaque chromosome (traitement par la chaleur, par la tryphine...).

Les mitoses sont capturées sur un logiciel analyseur d'images et les chromosomes sont alors classés par paire.

La sensibilité du caryotype dépend du degré d'étirement des chromosomes défini en nombre de bandes par génome haploïde neutre (23 chromosomes X). Un caryotype standard comporte de 150 à 500 bandes. Au-dessus (850 bandes), on parle de caryotype haute résolution nécessitant l'utilisation d'agents synchronisants

(BrDU, thymidine...). Le niveau de résolution nécessaire dépend de l'indication du caryotype.

Les techniques de cytogénétique moléculaire (FISH, CGH, PRINS...) permettent de compléter ces techniques conventionnelles afin de préciser des remaniements chromosomiques ou de rechercher des anomalies chromosomiques inframicroscopiques : syndromes microdélétionnels (syndrome de DiGeorge, de Smith-Magenis...) ou remaniements des télomères (extrémités des chromosomes, riches en gènes et souvent impliquées dans l'étiologie des retards mentaux).

Caryotype normal

Chaque chromosome est constitué de deux chromatides sœurs reliées par le centromère ou constriction primaire qui définit un bras court (p) et un bras long (q). La taille du chromosome, la position centromérique et les différentes bandes permettent son identification.

Le caryotype normal comporte 46 chromosomes identiques 2 à 2, répartis en 22 paires d'autosomes numérotés de 1 à 22 par ordre de taille décroissante et une paire de chromosomes sexuels (gonosomes) XY chez l'homme et XX chez la femme.

La formule chromosomique s'écrit : nombre de chromosomes, formule gonosomique, anomalie chromosomique éventuelle, soit pour un sujet normal : 46,XY ou 46,XX.

Définitions des anomalies cytogénétiques les plus fréquentes

L'anomalie chromosomique peut être homogène (présente dans l'ensemble des cellules du patient) ou en mosaïque (avec plusieurs lignées cellulaires ayant des formules chromosomiques différentes).

Les anomalies chromosomiques peuvent être équilibrées ou déséquilibrées.

Les anomalies déséquilibrées, c'est-à-dire avec perte ou gain de matériel codant, sont responsables d'un phénotype anormal (retard mental, malformations congénitales, syndrome dysmorphique...). Les anomalies équilibrées, c'est-à-dire sans perte ni gain de matériel codant (exemple : échange de fragments chromosomiques entre deux chromosomes différents), n'ont en règle générale pas d'expression phénotypique mais peuvent avoir pour conséquence, en cas de malségrégation ou d'anomalie de recombinaison lors de la méiose, la formation de gamètes déséquilibrés à l'origine de troubles de la reproduction (infertilité, fausses couches spontanées précoces et parfois récidivantes) ou de la naissance d'enfants anormaux porteurs d'une anomalie déséquilibrée.

Les anomalies chromosomiques sont à différencier des variants chromosomiques (fréquence de l'ordre de 1 %). Il s'agit de polymorphismes de taille intéressant le plus souvent des régions hétérochromatiques non codantes ou des régions répétées codant les organisateurs nucléolaires (constituants du nucléole), plus rarement des régions euchromatiques. Ces variants n'ont aucune conséquence sur le phénotype ou la reproduction et se transmettent de génération en génération. Leur étude fait appel à des techniques particulières de banding (Bandes C, AgNor...).

Une anomalie chromosomique peut survenir *de novo* (caryotypes des parents du sujet porteur normaux). Le risque de récurrence lors des grossesses ultérieures est faible. Inversement, une anomalie peut être héritée de l'un des parents, lui-même constitutionnellement porteur d'un remaniement chromosomique, en règle équilibré. Il existe alors à chaque grossesse du parent porteur un risque de récurrence de l'anomalie qui dépend du type de remaniement, des chromosomes impliqués et du parent porteur.

On distingue les anomalies chromosomiques de nombre et de structure.

— Anomalies chromosomiques de nombre

Toutes les cellules vivantes sont diploïdes (46 chromosomes) à l'exception des gamètes qui sont dits haploïdes (23 chromosomes).

La polypléidie, par exemple la triploïdie (69 chromosomes) et la tétraploïdie (92 chromosomes), se définit par la présence d'un nombre total de chromosomes multiple entier supérieur à 2 du lot haploïde (23 chromosomes, X). Ces anomalies sont létales (*in utero* le plus souvent).

L'aneuploïdie (monosomie ou trisomie) se définit par la présence d'un nombre total de chromosomes anormal mais différent d'un multiple entier du lot haploïde. Les monosomies homogènes sont le plus souvent létales, sauf la monosomie X responsable du syndrome de Turner. Les trisomies libres se définissent par la présence d'un chromosome surnuméraire (caryotype à 47 chromosomes). Elles constituent les anomalies chromosomiques les plus fréquentes. Elles sont le plus souvent *de novo* et sporadiques. Parmi les trisomies libres et homogènes, seule la trisomie 21 est viable à long terme.

— Anomalies chromosomiques de structure

Il s'agit de cassures chromosomiques suivies ou non d'une réparation aberrante. Les anomalies de structure les plus fréquentes sont les translocations. On distingue :

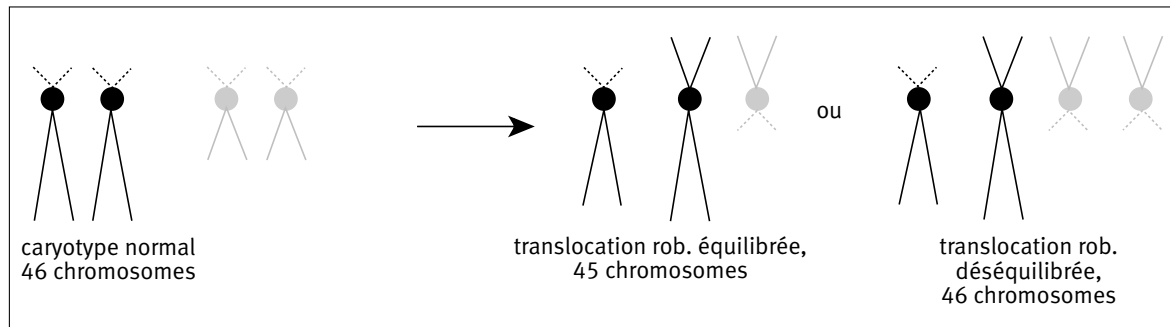
- les translocations réciproques : cassure au niveau de deux chromosomes non homologues, suivie d'un échange segmentaire réciproque. Il s'agit d'anomalies équilibrées dans plus de 90 % des cas ;
- les translocations robertsoniennes : elles intéressent les chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) dont les bras courts sont constitués d'ADN répétitif codant les organisateurs nucléolaires, ADN dont la perte ou le gain sont sans conséquence phénotypique. Une translocation robertsonienne est une fusion de deux chromosomes acrocentriques au niveau de leur centromère, avec perte des bras courts. La plus fréquente intéresse les chromosomes 13 et 14 (der(13;14)). Elle peut être équilibrée (caryotype à 45 chromosomes) ou déséquilibrée (caryotype à 46 chromosomes) (figure 3) ;
- les autres anomalies chromosomiques, de structure moins fréquentes, qui sont les délétions (perte d'un fragment chromosomique terminal ou interstitiel), les anneaux (deux cassures situées de part et d'autre du centromère avec perte des segments distaux et recollement des segments proximaux), les inversions péri-centriques ou paracentriques, les insertions, les isochromosomes, les duplications...

— Fréquence des anomalies chromosomiques

- Dans les produits de fausses couches du 1^{er} trimestre : 60 %, essentiellement trisomies autosomiques : trisomies 16,18,13, 21... (50 %), monosomie 45 X (20 %), triploïdies (17 %), monosomies autosomiques...
- Chez les enfants mort-nés (> 28 semaines d'aménorrhée) : 6 %, trisomies 21, 13 ou 18, anomalies des chromosomes sexuels ou anomalies de structure déséquilibrées...
- Chez les nouveau-nés vivants : 0,6 %.
- Chez l'enfant et l'adulte :
 - retard mental : 3 à 10 % (15 à 20 % en associant les techniques de cytogénétique moléculaire) ;
 - stérilité masculine : 1 à 10 % ;
 - fausses couches à répétition : 2 à 5 % (essentiellement anomalies équilibrées) ;
 - anomalie de la différenciation sexuelle (femme) : 25 %.

Les anomalies chromosomiques constituent l'anomalie génétique la plus fréquente avec, pour la trisomie 21, 1/700 naissances.

Figure 3



Trisomie 21

– *Trisomie 21 libre et homogène*
(47,XX,+21 ou 47,XY,+21) : 92 %

Le mécanisme est une non-disjonction des chromosomes 21 survenant lors de la première ou de la deuxième division méiotique maternelle ou paternelle (première division méiotique maternelle le plus souvent), aboutissant à un gamète disomique pour le chromosome 21. L'âge maternel avancé augmente le risque de survenue d'une non-disjonction maternelle des chromosomes 21.

Le risque de récurrence est estimé à 1 % pour les femmes de moins de 38 ans et reste celui de l'âge maternel pour une femme de plus de 38 ans.

– *Trisomie 21 par translocation*
(caryotype à 46 chromosomes) : 5 %

Le chromosome 21 surnuméraire est transloqué sur un autre chromosome :

- le plus souvent sur un chromosome acrocentrique, par translocation robertsonienne (95 % des cas) ;
- plus rarement sur un autre chromosome par translocation réciproque, souvent héritée. La trisomie est alors partielle (ne concerne que la partie distale du chromosome 21) et associée à une monosomie partielle de l'autre chromosome intéressé par la translocation. Le tableau peut être moins typique.

Le risque de récurrence dépend du type de translocation parentale et du parent porteur.

Trisomie 21 libre en mosaïque : 3 %

Le phénotype qui en résulte (syndrome malformatif et retard mental) est très variable.

Le mécanisme le plus souvent évoqué est celui d'une correction mitotique d'une trisomie 21 homogène. Le

risque de récurrence est donc identique à celui d'une trisomie 21 homogène.

Caryotype constitutionnel postnatal

Le caryotype constitutionnel postnatal est réalisé à partir de 10 ml de sang total veineux périphérique (5 ml chez l'enfant) prélevé sur tube stérile vacutainer à héparinate de lithium.

La réalisation d'un caryotype peut être motivée par différents tableaux :

- un retard psychomoteur, un retard mental, des malformations viscérales et/ou squelettiques, une dysmorphie craniofaciale, une hypotonie axiale ou une hypotrophie chez le nouveau-né font rechercher une anomalie chromosomique de nombre ou une anomalie de structure déséquilibrée. C'est dans ce type d'indication que l'examen standard peut être complété par un caryotype en haute résolution ou de la FISH ;
- une ambiguïté sexuelle doit faire établir le sexe chromosomique de l'enfant et faire rechercher plus particulièrement des anomalies des gonosomes. Celles-ci sont aussi volontiers retrouvées dans un contexte de retard pubertaire ou de retard de croissance staturopondérale chez le grand enfant ou l'adolescent. Une croissance staturale inférieure à -2 DS chez la fillette ou l'adolescente, une aménorrhée primaire (absence de survenue des premières règles) chez l'adolescente et la jeune fille évoquent un syndrome de Turner : monosomie X ou variant cytogénétique fréquent ;
- chez l'adulte, les principales indications sont les échecs de reproduction, l'hypofertilité ou l'infertilité :
 - les avortements spontanés précoces à répétition (plus de deux fausses couches spontanées [FCS] au 1^{er} trimestre de la grossesse) indiquent la réalisation du caryotype chez le couple. Une anomalie de structure équilibrée est trouvée chez l'homme ou la femme dans 1 cas sur 300 couples testés. Il s'agit le

plus souvent d'une translocation réciproque équilibrée, d'une translocation robertsonienne ou d'une inversion péricentrique. Les FCS répétées peuvent être, dans ce cas, la conséquence d'un déséquilibre méiotique de l'anomalie de structure équilibrée parentale (malsegrégation d'une translocation réciproque ou robertsonienne ; aneusomie de recombinaison d'une inversion péricentrique). La découverte d'une anomalie équilibrée parentale implique un conseil génétique avec évaluation du risque de déséquilibre du conceptus (syndrome polymalformatif et/ou retard mental à terme). Ce risque varie de 1 à 40 % selon l'anomalie et le parent porteur du remaniement. Un caryotype fœtal est proposé en cas de grossesse, et une enquête familiale est réalisée ;

- l'infertilité masculine par oligospermie ou azoospermie d'origine sécrétoire est associée à une anomalie chromosomique constitutionnelle dans 10 % des cas. L'anomalie chromosomique la plus fréquente (20 %) est la formule 47,XXY et ses variantes cytogénétiques en mosaïque, associées au syndrome de Klinefelter avec azoospermie sécrétoire constante. Les autres anomalies sont des anomalies des gonosomes et des anomalies autosomiques de structure équilibrées ;
- l'infertilité féminine avec insuffisance ovarienne (aménorrhée secondaire, ménopause précoce) fait rechercher plus particulièrement les anomalies du chromosome X, anomalie de nombre le plus souvent en mosaïque ou anomalie de structure ;
- le bilan biologique d'un couple infertile avant procréation médicalement assistée (FIV, ICSI) comporte en général un caryotype sanguin constitutionnel. Le caryotype est également réalisé chez les personnes « donneuses » dans les dons de gamètes ;
- les enquêtes familiales font établir le caryotype de sujets apparentés à un cas index porteur d'une anomalie de structure équilibrée ou déséquilibrée connue : on réalise d'abord les caryotypes des parents du sujet index, afin de préciser si l'anomalie est héritée ou *de novo*, puis, le cas échéant, le caryotype des descendants et collatéraux. Cela apporte une aide précieuse au conseil génétique. Il est à noter que la recherche d'une anomalie chromosomique chez un sujet phénotypiquement normal ne peut être réalisée que chez des sujets majeurs ;
- plus rarement, le caryotype est établi à partir de fibroblastes de peau cultivés : c'est le cas en particulier lorsque la mise en évidence sur lymphocytes sanguins d'une mosaïque faible (coexistence de cellules normales et de cellules anormales minori-

taires) nécessite une confirmation sur un autre tissu. Certains phénotypes sont également évocateurs d'anomalies limitées aux fibroblastes, comme le syndrome de Pallister-Killian.

Caryotype constitutionnel prénatal

Un diagnostic prénatal est proposé lorsqu'il existe une augmentation significative du risque d'anomalies chromosomiques déséquilibrées chez le fœtus susceptibles d'entraîner des troubles du développement suffisamment graves et/ou létaux (malformations, retard psychomoteur) pour proposer une interruption médicale de grossesse. L'anomalie chromosomique la plus fréquemment dépistée est la trisomie 21. Le conseil génétique est particulièrement difficile lors de la découverte d'anomalies de pronostic plus incertain en l'absence de signes d'appel échographiques : anomalies de nombre ou de structure des gonosomes, anomalies de structure apparemment équilibrées *de novo*, petit marqueur sur-numéraire *de novo*.

Les indications du caryotype fœtal prises en charge par l'assurance maladie sont les suivantes :

- âge maternel supérieur à 38 ans : il existe une augmentation progressive avec l'âge maternel du risque de trisomies par non-disjonction chromosomique lors de la première division de méiose (risque d'anomalie chromosomique à 38 ans : 1 %, à 40 ans : 2 %) ;
- signes d'appel biologiques : une étude du caryotype fœtal est proposée pour un risque de trisomie 21 supérieur à 1/250 après dosage des marqueurs sériques maternels (β -hCG, estriol, alphafœtoprotéine) entre la 15^e et la 18^e SA (semaine d'aménorrhée). L'évaluation statistique de ce risque tient également compte de l'âge maternel ;
- mesure de la clarté nucale lors de l'échographie du 1^{er} trimestre entre la 11^e et la 13^e SA : elle est l'un des meilleurs marqueurs de trisomie 21 fœtale. Elle permet de définir un risque individuel, intégrant là aussi l'âge maternel, et d'avoir un diagnostic précoce sur villosités choriales ;
- signe(s) d'appel échographique(s) : l'échographie du 1^{er} trimestre pourra mettre en évidence un retard de croissance précoce, des anomalies du pôle céphalique motivant l'étude du caryotype. Lors de l'échographie morphologique (20–22 SA), le caryotype fœtal est indiqué en cas d'anomalie quantitative du liquide amniotique (volume insuffisant : oligoamnios, en excès : hydramnios), de malformation(s) fœtale(s), de retard de croissance intra-utérin. Le risque d'anomalies chromosomiques fœtales varie en fonction du signe d'appel et de son caractère isolé ou intégré dans une association malformative. La recherche attentive

de « petits signes » (fémur court, brièveté de la 5^e phalange, mesure des os propres du nez, focus mitral : calcifications...) fait partie de la stratégie de dépistage de la trisomie 21 (*genetic scan* des Anglo-Saxons). Chaque petit signe permet une évaluation statistique (méthode de vraisemblance) du risque chromosomique ;

- existence d'un remaniement chromosomique équilibré parental (translocations, inversions...) ;
- antécédent d'anomalie chromosomique.

Le diagnostic de sexe pour les maladies monogéniques liées à l'X n'est plus une indication de caryotype fœtal car il est dorénavant possible dès la 10^e SA, par génotypage à partir de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel, méthode non invasive supprimant le risque de fausse couche dû au prélèvement de cellules fœtales.

La valeur prédictive positive pour le dépistage de la trisomie 21 est de l'ordre de 1,5 à 2 % pour les deux principales indications du caryotype fœtal (âge maternel et signes d'appel biologique), soit 75 % environ des amniocentèses en France. Actuellement, en France, 10 % des femmes enceintes ont une amniocentèse avec un risque de perte fœtale de 1 %. De nouvelles stratégies sont en cours d'évaluation pour améliorer la sensibilité et la précocité du diagnostic prénatal de la trisomie 21 : marqueurs sériques maternels du 1^{er} trimestre, mais surtout calcul de risque intégré associant âge maternel, mesure de la clarté nucale et risque sérique maternel au premier trimestre (sensibilité 80 % pour 5 % de prélèvements ovulaires).

— Prélèvement de liquide amniotique par amniocentèse

C'est le prélèvement ovulaire le plus fréquemment choisi quelle que soit l'indication du caryotype fœtal. C'est une méthode simple, rapide, peu douloureuse, le risque de fausse couche est faible (1 %). La résolution chromosomique sur amniocytes permet une analyse cytogénétique de bonne qualité (environ 400 à 550 bandes). L'amniocentèse est réalisable à partir de 14 SA jusqu'à la fin de la grossesse. Le résultat est obtenu en 8–15 jours.

Le prélèvement, sous échoguidage, ramène de 15 à 20 ml de liquide amniotique qui sera mis en culture rapidement au laboratoire. Certaines conditions augmentent le risque d'échec de culture : quantité insuffisante de liquide prélevé (en cas d'oligoamnios...), prélèvement tardif au-delà de 32 SA (peu de cellules en mitose), liquide hémorragique notamment par ponction transplacentaire, ce qui augmente aussi le risque de contamination maternelle des cultures cellulaires.

— Prélèvement de sang fœtal par cordocentèse

Il n'est quasiment plus utilisé pour la réalisation du caryotype fœtal. La ponction de sang fœtal n'est réalisable qu'à partir de 20–21 SA, échoguidée, par un praticien expérimenté. La ponction a lieu dans le cordon, au niveau de son insertion placentaire ou en cordon libre ; elle ramène 1 à 2,5 ml de sang fœtal. La qualité de l'échantillon (absence de dilution par du liquide amniotique) et sa pureté (absence de contamination par des cellules maternelles) sont vérifiées par un comptage au Coulter Counter (VGM, Ht, GR et GB), détermination du pourcentage d'hémoglobine fœtale, dosage de l'hCG, ou typage des antigènes I,i. Le risque de fausse couche spontanée ou de mort *in utero* est de 2 %.

— Prélèvement de villosités choriales par choriocentèse

Il peut être effectué à partir de 11 SA. Il permet un diagnostic cytogénétique précoce, rapide en analyse directe (mitoses spontanées du cytotrophoblaste), devant être confirmé par des cultures en 8 à 15 jours (mitoses du mésenchyme extra-embryonnaire) en raison du risque de faux positifs et de faux négatifs lié à l'existence de mosaïques placentaires résultant de l'instabilité des premières mitoses blastomériques. L'analyse cytogénétique est de moins bonne résolution que sur les métaphases obtenues à partir des cellules du liquide amniotique. Il existe un risque de contamination de la culture par des cellules de la caduque maternelle nécessitant que le prélèvement soit trié sous loupe binoculaire avant mise en culture. De plus, dans 1 à 2 % des cas, des discordances entre la technique directe ou la culture rendent les résultats ininterprétables et impliquent la nécessité d'un deuxième prélèvement. Le prélèvement de villosités choriales est plus particulièrement indiqué lorsque le risque de déséquilibre chromosomique fœtal est important dans le cadre d'un remaniement de structure équilibré parental connu ou devant un épaississement de la nuque ou encore une anomalie échographique au 1^{er} trimestre.

Le risque de fausse couche spontanée est de 1 %.

Aspects juridiques et bioéthiques

Les conditions de réalisation du diagnostic prénatal ont été précisées par le décret 2006-1661 du 22 décembre 2006 modifiant le Code de la santé publique. Ces pratiques « sont soumises à des règles de bonnes pratiques définies par arrêté du ministre chargé de la santé sur proposition du Directeur général de l'Agence de la biomédecine après avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Ces règles tiennent

compte des recommandations de la Haute autorité de santé ».

Les analyses destinées à établir un diagnostic prénatal [...] doivent être précédées d'une consultation médicale adaptée à l'affection recherchée, permettant :

- d'évaluer le risque pour l'enfant à naître d'être atteint d'une maladie d'une particulière gravité ;
- d'informer la femme enceinte sur les caractéristiques de cette maladie, les moyens de la détecter, les possibilités thérapeutiques et sur les résultats susceptibles d'être obtenus au cours de l'analyse, ainsi que sur leurs éventuelles conséquences ;
- d'informer la femme enceinte sur les risques inhérents aux prélèvements, sur leurs contraintes et leurs éventuelles conséquences.

Le médecin consulté fournit à la femme enceinte les informations mentionnées ci-dessus. Il établit une attestation cosignée par la femme enceinte certifiant que ces informations lui ont été fournies et en conserve l'original. Lorsque la femme enceinte consent à la réalisation des analyses, son consentement est recueilli sur un formulaire conforme à un modèle fixé par arrêté du ministre chargé de la santé pris après avis du directeur général de l'Agence de la biomédecine. Le médecin en conserve l'original. Une copie de l'attestation et une copie du formulaire de consentement sont remises à la femme enceinte et au praticien qui effectue les analyses.

Les analyses [...] sont réalisées sous la responsabilité d'un ou plusieurs praticiens agréés. Ils sont seuls habilités à signer les comptes rendus d'analyses. L'agrément des praticiens est délivré par le directeur général de l'Agence de la biomédecine pour une durée de 5 ans.

L'autorisation d'exercice est délivrée à l'établissement public de santé ou au laboratoire d'analyses de biologie médicale par la commission exécutive de l'Agence régionale de l'hospitalisation pour une durée de 5 ans.

L'Agence de la biomédecine tient à jour la liste des praticiens agréés et la liste des établissements de santé et des laboratoires autorisés et les met à disposition du public.

Les conditions de réalisation du caryotype constitutionnel postnatal ont été précisées par l'arrêté du 25 novembre 2004.

« Les analyses de cytogénétique, incluant la cytogénétique moléculaire constitutionnelle, ne peuvent être réalisées que dans des laboratoires autorisés et par des praticiens agréés en application des articles L. 1131-1 à L. 1131-6 et R. 1131-1 à R. 1131-15 du code de la santé publique. »

« Le praticien agréé qui réalise l'examen doit être en possession de l'attestation du médecin consulté certi-

fiant qu'il a apporté à la personne concernée les informations réglementairement définies et qu'il a recueilli son consentement ou celui des titulaires de l'autorité parentale lorsque la personne est mineure ou celui du représentant légal s'il s'agit d'un majeur sous tutelle. »

Ce même arrêté de novembre 2004 précise les conditions de réalisation des examens de cytogénétique moléculaire.

Les actes de cytogénétique moléculaire peuvent être prescrits d'emblée dans les cas suivants :

- recherche d'un syndrome microdélétionnel (exemple : syndrome de Di George) ;
- diagnostic de sexe chromosomique en période post-natale ;
- signe d'appel échographique en période prénatale.

Ils peuvent être effectués à l'initiative du biologiste pour caractériser, si besoin, une anomalie chromosomique détectée lors de l'examen du caryotype. Ils sont dans ces indications pris en charge par l'Assurance Maladie.

Hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

Les récents développements des techniques d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) en ont largement étendu le champ d'application dans les différents domaines de la cytogénétique constitutionnelle et acquise.

Le principe de la FISH repose sur la dénaturation d'une préparation interphasique et/ou métaphasique sur lame et d'une sonde d'ADN spécifique d'une région chromosomique (obtention d'ADN monobrans) suivie d'une hybridation. La sonde étant marquée à l'aide d'un fluorochrome, l'analyse est réalisée au microscope à fluorescence équipé de filtres sélectifs : lecture de signaux spécifiques rouges, verts ou bleus « aqua » sur des noyaux et/ou des chromosomes préalablement colorés par un contre-colorant, en général DAPI.

La FISH permet le diagnostic rapide des principales anomalies de nombre des chromosomes. Elle est, par ailleurs, l'outil de référence pour l'exploration des remaniements complexes ou cryptiques ainsi que pour le diagnostic des syndromes microdélétionnels.

— FISH interphasique

- Diagnostic prénatal des aneuploïdies

L'utilisation de sondes spécifiques des chromosomes 21, 13, 18, X et Y sur des noyaux interphasiques d'amniocytes non cultivés permet d'obtenir le diagnostic des anomalies chromosomiques les plus fréquentes en 24 à 48 heures alors qu'un caryotype conventionnel nécessitant une culture cellulaire requiert 8 à 15 jours.

Cent noyaux environ sont analysés en comptant le nombre de « spots » fluorescents : un minimum de 95 % de noyaux analysables comportant 2 signaux est requis pour qu'un résultat soit considéré normal ; de même 70 % des noyaux analysables doivent comporter 3 signaux pour accepter le diagnostic de trisomie. Dans le cas contraire, le résultat est considéré ininterprétable. Une double lecture est recommandée.

La sensibilité et la spécificité sont bonnes avec une corrélation entre les résultats de la FISH et ceux du caryotype classique supérieure à 99 % pour la plupart des séries publiées pour la recherche des aneuploïdies.

Les limites de la FISH interphasique sont d'ordre technique et clinique :

- 10 à 15 % des échantillons sont ininterprétables ou non informatifs (contamination maternelle, prélèvement hémorragique, liquide amniotique tardif...);
- seules sont analysées les régions chromosomiques reconnues par les sondes utilisées : les trisomies rares (trisomies 9, 8...) sont méconnues, de même que les anomalies de structure. Selon les indications, 20 à 30 % des anomalies cliniquement significatives ne peuvent être diagnostiqués par l'hybridation *in situ* ;
- la FISH ne permet pas de distinguer une trisomie 21 libre (accidentelle) d'une trisomie 21 par translocation robertsonienne comportant, lorsqu'elle est héritée, un risque de récurrence parfois élevé ;
- dans ce contexte de dépistage, l'interprétation d'une mosaïque est difficile.

Pour toutes ces raisons, l'étude du caryotype conventionnel doit compléter un résultat de FISH interphasique.

• Diagnostic des mosaïques

En permettant l'étude rapide d'un nombre important de noyaux, la FISH interphasique permet la mise en évidence de clones minoritaires dont la présence modifiera le pronostic. C'est essentiellement le cas des dysgonosomies : la présence d'une lignée 46,XY dans une monosomie X (syndrome de Turner) augmente le risque de gonadoblastome, la présence d'un petit anneau de l'X est, dans certains cas, associée à une déficience mentale...

Certaines trisomies confèrent à la cellule un désavantage sélectif en culture et seront plus aisément diagnostiquées sur des noyaux quiescents : tétrasomie 12p (syndrome de Pallister-Killian associant déficience mentale et malformations) qu'une sonde pour le centromère du chromosome 12 permettra de mettre en évidence sur les noyaux de cellules non cultivées.

– FISH métaphasique

- Caractérisation des anomalies de structure

Remaniements complexes ou cryptiques

Le degré de résolution d'un caryotype standard comportant de 300 à 450 « bandes chromosomiques » par génome haploïde neutre (23 autosomes + X) est de l'ordre de 5 à 10 millions de bases (Mb : mégabases), celui d'un caryotype en haute résolution atteint 3 Mb. La FISH permet de caractériser ou de localiser des segments chromosomiques de quelques dizaines de milliers de paires de bases, rendant possible le diagnostic des microremaniements infracytogénétiques : translocations cryptiques, microdélétions parfois cliniquement suspectées (cri du chat et délétion 5p, syndrome de Wolf-Hirschhorn et délétion 4p).

Elle permet également l'identification de segments ou de fragments non reconnaissables par les techniques conventionnelles, autorisant ainsi la caractérisation de remaniements complexes impliquant 3 voire 4 chromosomes.

Anomalies subtélomériques

Un intérêt particulier est porté aux régions télomériques depuis les publications de J. Flint et S. Knight rapportant 7,4 % d'anomalies télomériques, le plus souvent infracytogénétiques, chez des sujets présentant une déficience mentale modérée à sévère (QI inférieur à 50) idiopathique. La moitié de ces anomalies sont héritées et donc associées à un risque de récurrence.

La FISH pantélomérique permet le diagnostic des anomalies subtélomériques soit déséquilibrées, soit équilibrées telles que les translocations réciproques cryptiques familiales. Des sets de sondes spécifiques des régions subtélomériques identifient 41 des 46 télomères des chromosomes humains, à l'exclusion des télomères des bras courts des chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22) pour lesquels un déséquilibre est sans expression phénotypique. Une même sonde est utilisée pour les bras courts des chromosomes X et Y, ainsi que pour leurs bras longs (homologies de séquences). Cette technique est particulièrement longue, et nécessite une densité suffisante de métaphases qui la rend parfois d'application difficile dans le cadre du diagnostic prénatal. L'interprétation des résultats nécessite une bonne expertise. La résolution ne permet pas de dépister des remaniements inférieurs à 5 Mb.

Des techniques plus récentes de génétique moléculaire (MLPA, QMPSF...) permettent actuellement une étude des télomères automatisable, plus rapide et moins onéreuse. Il s'agit de techniques de PCR quantitative per-

mettant de mettre en évidence des déséquilibres au niveau de courtes séquences géniques (40 pb) situées dans les régions subtélomériques. Toute anomalie nécessite une confirmation en FISH. Les limites de ces techniques sont l'existence de polymorphismes (SNP, CNV : *copy number variation*) à l'origine de faux positifs, la localisation parfois imprécise des sondes rendant difficile la confirmation en FISH, la quasi-impossibilité de confirmer en FISH une duplication de petite taille. Elles ne permettent pas le diagnostic des remaniements subtélomériques équilibrés. Elles constituent néanmoins un outil précieux pour l'étude des télomères et font partie comme la FISH pantélomérique de la démarche recommandée entre autres par l'American College of Medical Genetics et l'American Academy of Neurology pour le diagnostic étiologique du retard mental.

Identification des marqueurs chromosomiques

Il s'agit de chromosomes le plus souvent surnuméraires, homogènes ou en mosaïque, dont l'origine ne peut être définie par les différentes techniques de marquage chromosomique. Leur fréquence est estimée à 0,4/1 000 dans la population générale, 1/1 000 dans le cadre du diagnostic anténatal. Ils sont, dans 10 à 15 % des cas, associés à une déficience mentale. Leur pronostic dépend, outre de leur caractère hérité ou *de novo*, de leur origine chromosomique, et la FISH est une étape essentielle de leur identification.

La moitié des marqueurs satellités dérivent du chromosome 15 et appartiennent à deux catégories principales :

- type 1 ou classique invdup (15) : petit métacentrique composé essentiellement d'hétérochromatine correspondant à une duplication pter-q11::q11-pter de bon pronostic en l'absence de disomie uniparentale associée du chromosome 15 ;
- type 2 : duplication plus large (pter-q12::q12-pter) comportant la région Prader-Willi/Angelman, associée à une déficience mentale et à des convulsions.

Les autres marqueurs satellités dérivent des chromosomes 13, 14, 21 ou 22 : leur pronostic dépend là aussi de la présence ou de l'absence, souvent difficile à affirmer, de matériel codant.

Les marqueurs non satellités ont des origines diverses avec une fréquence particulière pour les iso (18p) associés le plus souvent à un retard mental.

Enfin les marqueurs non surnuméraires (caryotype à 46 chromosomes) ont le plus souvent pour origine les gonosomes : anneau ou fragment centrique de l'X, iso Yp...

Les sondes utilisées (alpha-satellite, peinture) préciseront l'origine du marqueur et l'éventuelle présence de matériel codant. Là aussi, la MLPA constitue un outil d'appoint en permettant la recherche de déséquilibre de séquences juxta-centromériques, limité cependant aux marqueurs homogènes. En revanche, les techniques d'exploration globale du génome (CGH, caryotype en multifuorescence) encore difficilement disponibles en

Tableau 7

Localisation chromosomique	Syndrome (fréquence)	Principaux signes cliniques	Fréquence des microdélétions chromosomiques	Délétions familiales	Autres mécanismes moléculaires
22q11.2	Di-George/VCF/Syndrome De Schprintzen (1/4 500)	<ul style="list-style-type: none"> - Dysmorphie - Cardiopathie conotruncale - Hypoplasie thymique - Hypocalcémie - Fente palatine, insuffisance vélaire - Anomalies rénales - Retard de développement - Troubles psychotiques 	90 %	10 %	
15q11q13 : délétion paternelle	Prader-Willi (1/10 à 15 000)	Cf. Prader-Willi (syndrome de)	70 %	< 1 %	Disomie uniparentale maternelle : 25 % Mutation d'empreinte
15q11q13 : délétion maternelle	Angelman (1/12 à 20 000)	Cf. Angelman (syndrome d')	70 %	< 1 %	Disomie uniparentale paternelle : 7 % Mutation du gène <i>UBE3A</i> : 11 % Mutation d'empreinte : 3 %

Localisation chromosomique	Syndrome (fréquence)	Principaux signes cliniques	Fréquence des microdélétions chromosomiques	Délétions familiales	Autres mécanismes moléculaires
7q11.23	Williams-Beuren (1/ 20 000)	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience mentale modérée, troubles du comportement - Sténose supra-auriculaire aortique ou pulmonaire - Hypercalcémie néonatale - Dysmorphie 	96 %	Rares	
17p13.3	Miller-Dieker (1/100 000)	<ul style="list-style-type: none"> - Dysmorphie - Microcéphalie - Tétraparésie - Déficience mentale sévère, convulsions - Lissencéphalie type 1 (IRM) 	99 %	20 %	Mutations de LIS1
11p13	WAGR (aniridie-tumeur de Wilms)	<ul style="list-style-type: none"> - Aniridie - Déficience mentale - Anomalies génito-urinaires - Tumeur de Wilms, gonadoblastome 	90 %	+	
8q23.3q24.13	Langer-Giedon	<ul style="list-style-type: none"> - Syndrome trichorhino-phalangien type 2 - Exostoses - Déficience mentale inconstante 	90 %	Rares	
20p11.23	Alagille (dysplasie artériohépatique) (1/70 000)	<ul style="list-style-type: none"> - Hypoplasie des canaux biliaires intra-hépatiques - Sténose pulmonaire - Embryotoxon postérieur - Vertèbres en ailes de papillon - Dysmorphie - Anomalies rénales 	7 %	?	Mutations du gène <i>JAG1</i> : 88 % Mutations de <i>NOTCH2</i> : < 1 %
16p13.3	Rubinstein-Taybi (3/100 000)	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience mentale - Dysmorphie (nez++), microcéphalie - Ponces, orteils larges 	10 %	Rares	Mutations du gène <i>CREBBP</i> : 40 à 60 % Mutations de <i>EP300</i> : 3 %
17p11.2	Smith-Magenis (1/25 000)	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience mentale, retard de langage, troubles du comportement (sommeil) - Brachydactylie - Dysmorphie, petite taille 	90 %	Rares	Mutations de <i>RAI1</i> : 5 à 10 %
Anomalies télomériques 3pter	Microdélétion 3p25	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience mentale sévère - Dysmorphie - BPES (blepharophimosis, ptosis, epicanthus, <i>situs inversus</i>) - RCIU 			Mutations de <i>FOXL2</i>
2q37.1	Pseudo-ostéodystrophie héréditaire d'Albright	<ul style="list-style-type: none"> - Polydactylie - Petite taille, obésité - Brachymétoparcarpie-tarsie - Pseudo-hypoparathyroïdie 		+	
22q13.3	Microdélétion 22q13.3	<ul style="list-style-type: none"> - Déficience mentale - Retard de langage sévère - Insensibilité à la douleur - Syndrome dysmorphique modéré 		+	
1p36	Microdélétion 1p36	<ul style="list-style-type: none"> - Retard mental, troubles du comportement, agressivité - Dysmorphie - Retard et anomalies de croissance - Épilepsie - Hypotonie, problèmes nutritionnels 		+	

routine sont réservées aux situations les plus complexes.

- Syndromes microdélétionnels (aneusomies segmentaires)

Ils sont définis par la présence d'un remaniement chromosomique de taille inférieure à 3 Mb et ont des critères en commun :

- leur identification clinique oriente le diagnostic (cytogénétique syndromique) ;
- le diagnostic n'est qu'exceptionnellement fait en cytogénétique conventionnelle ou en haute résolution mais nécessite le recours à la FISH ;
- certains relèvent de plusieurs mécanismes moléculaires (microdélétion, anomalie d'empreinte, mutation ponctuelle) et la FISH constitue avec la biologie moléculaire un des éléments du bilan étiologique.

Une vingtaine de syndromes microdélétionnels sont actuellement connus : les plus fréquents sont décrits dans le tableau 7.

Plusieurs de ces syndromes ont comme composante majeure des troubles du comportement fortement évocateurs et ont abouti à la notion de phénotype comportemental (syndromes de Prader-Willi, d'Angelman, de Williams-Beuren...).

Certains d'entre eux sont la conséquence du déséquilibre d'un remaniement chromosomique parental parfois cryptique imposant l'étude des caryotypes parentaux qui orientera le conseil génétique.

– FISH/BACs

L'analyse de déséquilibres infracytogénétiques répartis de façon aléatoire sur l'ensemble du génome a nécessité d'élargir le panel des sondes.

Depuis les années 1990, une nouvelle technique permet de fabriquer au sein du laboratoire de cytogénétique des sondes « maison » : il s'agit du système BAC (*bacterial artificial chromosome*).

- Principe

Un fragment d'ADN humain (> 300 kb) sélectionné dans une base de données pour sa localisation est inséré au sein du génome d'une bactérie (*E. coli*). Celle-ci est mise en culture, se multiplie et permet ainsi le clonage du fragment d'ADN humain inséré, c'est-à-dire l'obtention d'une quantité importante de cet ADN.

Après extraction de l'ADN, une technique de préparation et de marquage de l'ADN par *Nick-translation* (réaction de « coupure d'ADN ») est effectuée, permet-

tant alors la fabrication de sondes fluorescentes spécifiques de la région d'ADN humain cloné.

Avant toute utilisation, il est nécessaire de confirmer sur des métaphases la localisation du BACs spécifiée dans la base de données.

Les BACs sont applicables à la fois pour une hybridation en interphase (sur noyaux) et en métaphase.

- Applications

Dans le cadre de la recherche, cette technique était initialement et est encore utilisée à l'heure actuelle pour compléter la cartographie du génome humain (HapMap Project).


Elle a également contribué à la localisation et à la caractérisation de nombreux gènes par la stratégie dite du « clonage des points de cassure », c'est-à-dire l'étude fine des points de cassure d'un remaniement chromosomique (translocation, inversion...) associé à un phénotype d'intérêt.


Les applications diagnostiques des BACs se sont récemment développées avec l'émergence de la microcytogénétique :

- description de nouveaux syndromes microdélétionnels ou de syndromes rares associés à des microremaniements de loci pour lesquels les industriels n'ont pas développé de sondes commerciales (exemple : sonde de la région 20p12 remaniée dans le syndrome d'Alagille) ;
- nécessité de caractériser précisément un remaniement chromosomique apparemment équilibré associé à un phénotype anormal (translocation, inversion...) à la recherche, au niveau des points de cassure, d'un déséquilibre inframicroscopique méconnu par les techniques standard du caryotype. Seule une telle étude exhaustive permettra dans ces circonstances particulières un conseil génétique approprié ;
- confirmation des déséquilibres télomériques dépistés par les techniques récentes de PCR quantitative appliquées à l'étude des télomères (MLPA, QMPSF) pour laquelle la FISH reste la technique de référence.

Il s'agit dans tous les cas d'une technique complémentaire de la FISH classique, mais non de routine car elle est « cas-spécifique ». Les délais de fabrication des BACs peuvent varier de quelques semaines (pour 1 seule sonde) à plusieurs mois (pour le clonage de points de cassure), mais le développement par les industriels de kits plus conviviaux devrait contribuer à en élargir l'utilisation.

Les limites de la technique des BACs sont celles de la FISH.

 *Aneuploidie (diagnostic rapide)*

 Agence de la Biomédecine.

Rapport annuel – Bilan des activités 2005. Diagnostic sur l'embryon et le fœtus.

Saint-Denis-la-Plaine : Agence de la Biomédecine, 2005 ; pp. 177-192.

Moeschler JB, Shevell M.

Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays.

Pediatrics 2006 ; 117/6 : 2304-2316.

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M.

Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector.

Proc Natl Acad Sci, USA 1992 ; 89 : 8794-8797.