



HAL
open science

Étude de remaniements chromosomiques apparemment équilibrés associés à des phénotypes anormaux

Anouck Schneider

► **To cite this version:**

Anouck Schneider. Étude de remaniements chromosomiques apparemment équilibrés associés à des phénotypes anormaux. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTT033 . tel-01344094

HAL Id: tel-01344094

<https://theses.hal.science/tel-01344094>

Submitted on 11 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Délivré par **Université de MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale de
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche U844
Cellules Souches Mésoenchymateuses.
Environnement Articulaires et Immunothérapie de la Polyarthrite Rhumatoïde

Spécialité : **GÉNÉTIQUE**

Présentée par **Mademoiselle Anouck SCHNEIDER**

Née le 22 Juillet 1974

**ÉTUDE de REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES
APPAREMMENT ÉQUILIBRÉS
ASSOCIÉS À DES PHÉNOTYPES ANORMAUX**

Soutenue le 10 Décembre 2015 devant le jury composé de

M. D. GENEVIEVE, PUPH, CHU de Montpellier
M. J.M. DUPONT, PUPH, APHP- Hôpitaux Universitaire Paris Centre
M. B. KEREN, PH, Pitié Salpêtrière de Paris XIII
M. D. SANLAVILLE, PUPH, CHU de Lyon
M. F. VIALARD, PUPH, CHI de Poissy - St Germain

Directeur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Rapporteur



Délivré par **Université de MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale de
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche U844
Cellules Souches Mésenchymateuses.
Environnement Articulaires et Immunothérapie de la Polyarthrite Rhumatoïde

Spécialité : **GÉNÉTIQUE**

Présentée par **Mademoiselle Anouck SCHNEIDER**

Née le 22 Juillet 1974

**ÉTUDE de REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES
APPAREMMENT ÉQUILIBRÉS
ASSOCIÉS À DES PHÉNOTYPES ANORMAUX**

Soutenue le 10 Décembre 2015 devant le jury composé de

M. D. GENEVIEVE, PUPH, CHU de Montpellier
M. J.M. DUPONT, PUPH, APHP- Hôpitaux Universitaire Paris Centre
M. B. KEREN, PH, Pitié Salpêtrière de Paris XIII
M. D. SANLAVILLE, PUPH, CHU de Lyon
M. F. VIALARD, PUPH, CHI de Poissy - St Germain

Directeur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Rapporteur



Résumé (français)

La déficience intellectuelle (DI) est définie par un $QI < 70$. La DI, répartie en formes non syndromiques et en formes syndromiques, est observée dans 3 % de la population. Des anomalies chromosomiques sont identifiées dans 15 % des DI syndromiques. Les translocations chromosomiques réciproques (TR) apparemment équilibrées sont observées chez 1 individu sur 1000 et seul 6 % des patients avec une TR *de novo* apparemment équilibrée ont une DI. Plusieurs mécanismes chromosomiques peuvent expliquer la DI syndromique associée à une TR : (i) un microremaniement déséquilibré identifié par l'utilisation de techniques plus résolutive, (ii) la formation d'un gène de fusion, (iii) un effet de position, (iv) la modification d'une région soumise à une empreinte parentale, (v) une interruption d'un gène au niveau d'un ou des deux points de cassure, (vi) une mutation génique sans rapport avec la TR, (vii) ou encore une cause acquise ou multifactorielle.

Nous rapportons l'étude de 12 patients avec DI et porteurs d'une TR *de novo* apparemment équilibrée. L'analyse systématique par puces à ADN de ces individus a été réalisée avec une résolution de 25 kb. Un déséquilibre infracytogénétique au niveau des points de cassure ou ailleurs dans le génome a été observé chez 3/12 patients. Chez les 9 patients sans anomalies sur puces à ADN, nous avons étudié les points de cassure des remaniements *de novo* apparemment équilibrés. En dehors de la technique de marche sur le chromosome par FISH, deux autres approches ont été mises en œuvre : (i) l'Array-Painting qui correspond à l'hybridation sur puces à ADN de chacun des dérivés chromosomiques préalablement séparés par Cytométrie en Flux, (ii) et le séquençage haut débit (WGS - Whole Genome Sequencing). Grâce à l'Array-Painting, nous avons identifié (i) chez 2 patients, des interruptions de gènes pouvant expliquer leur phénotype, à savoir les gènes : *KIF1A*, *AUTS2* et *EPHA6* ; (ii) et chez 1 patiente, un point de cassure entraînant une dérégulation de la transcription du gène *MEF2C*. L'étude par WGS a permis (i) chez 1 patiente, de diagnostiquer un déséquilibre plus complexe que celui observé par puce à ADN ; (ii) chez 2 patients, de mettre en évidence un *chromothripsis*, qui pourrait avoir un impact dans les pathologies constitutionnelles par interruption de gènes et/ou par effet de position ; (iii) et chez 2 autres patients, de caractériser précisément les points de cassure.

Ainsi, grâce aux résultats obtenus par ces différentes techniques, plusieurs mécanismes physiopathologiques responsables de DI sont mis en évidence permettant un conseil génétique adéquat. Cependant, aucun mécanisme chromosomique commun ne peut être identifié hormis le *chromothripsis* observé chez patients. Finalement, ce travail nous permet principalement de comparer les techniques mises en œuvre qui se sont avérées complémentaires. En conclusion, nous proposons une démarche diagnostique pour explorer un remaniement chromosomique apparemment équilibré chez des patients à phénotype anormal.

Mots clefs (français) : Phénotype anormaux, Remaniements chromosomiques apparemment équilibrés, Points de cassure, Translocations, Array-Painting, Séquençage haut débit

Title : Study of apparently balanced chromosomal rearrangements associated with abnormal phenotypes

Abstract :

Intellectual disability (ID) is defined by an IQ <70. ID, observed in 3% of the population, and displays heterogeneous origins, including acquired etiology (toxicologic, pathologic, traumatic) or genetic disorders with non-syndromic and syndromic forms. Numerical or structural chromosomal abnormalities are observed in 15% of patients with ID. Reciprocal balanced chromosomal translocations (RT) are observed in one individual in 1000. However, only 6% of patients carrying a *de novo* apparently balanced RT present ID. The relation between these balanced rearrangements and ID could be explained by different mechanisms namely (i) subtle rearrangement, (ii) gene fusion, (iii) position effect, (iv) disturbance of parental imprinting, (v) gene disruption at the breakpoints, (vi) mutation in gene unrelated to the translocation, (vii) or acquired or multifactorial cause.

We report a chromosomal study of 12 patients with DI and carrying a *de novo* apparently balanced reciprocal translocation. A systematic analysis by microarrays was performed in all individuals (using a resolution of 25 kb). For three patients, a microdeletion was observed at the breakpoints or elsewhere in the genome. For the 9 remaining cases, we hypothesize that the phenotype is due to a disruption of gene(s) located at the breakpoint(s). In this context, we studied the breakpoints of the apparently balanced *de novo* rearrangements in these patients. Outside FISH walking, two approaches have been implemented namely Array-Painting, which combines flow chromosome sorting in an attempt to isolate derivative chromosomes from each other and DNA microarrays as well as Whole Genome Sequencing (WGS).

Using Array-Painting, we identified (i) in 2 patients, a gene disruptions: in the *KIF1A*, *AUTS2* and *EphA6* genes; (ii) and in 1 patient, a breakpoint resulting in deregulation of transcription of the gene *MEF2C*. The WGS technology has permitted (i) in 1 patient, to diagnose more complex imbalance than that observed by micro-array; (ii) in 2 patients, to show a *chromothripsis*, (iii) and 2 other patients, to characterize precisely breakpoints.

In conclusion, taking together, these results highlight different physiopathological mechanisms responsible for DI allowing adequate genetic counseling. However, no common chromosomal mechanism can be identified except for *chromothripsis* observed in 2 patients. In addition, this work allows us especially to compare the used techniques which seem to be complementary. Finally, we propose a pipeline to elucidate the etiology of the abnormal phenotype in patients carrying an apparently balanced rearrangement.

Keywords : Abnormal phenotypes, Apparently balanced chromosomal rearrangements, Breakpoint, Translocations, Array-Painting, Whole genome sequencing

Remerciements

A Monsieur le Professeur David Geneviève, Je te remercie pour l'ensemble de nos discussions constructives (qui ont hanté mes nuits) lors de la rédaction de ce manuscrit ainsi que de la confiance que tu m'accordes au quotidien. Trouve, ici, le témoignage de ma gratitude et mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Michel Dupont, Tu as guidé mes premiers pas dans le monde merveilleux de la Cytogénétique constitutionnelle. Pour ta compétence en Cytogénétique ainsi que ta disponibilité depuis le début de ma carrière de cytogénéticienne, je te suis reconnaissante. Tu me fais l'honneur de juger ce travail, je te remercie du temps que tu vas consacrer à le lire.

A Monsieur le Docteur Boris Keren, Je te remercie pour tes connaissances tant sur le plan clinique que sur le plan cytogénétique. Tu me fais l'honneur de juger ce travail, je te remercie du temps que tu vas consacrer à le lire.

A Monsieur le Professeur Damien Sanlaville, Pour ta disponibilité et tes conseils, notamment lors du choix de la technologie des puces, je te remercie. Tu me fais l'honneur de juger ce travail, d'avance je réclame ton indulgence.

A Monsieur le Professeur François Vialard, Lors des différentes manifestations de Cytogénétique, nous avons su lier découvertes scientifiques et découvertes touristiques comme la visite de la mosquée Sainte Sophie, lors du congrès de l'ECA à Istanbul. Tu me fais l'honneur de juger ce travail, je te remercie du temps que tu vas consacrer à le lire.

A Monsieur le Docteur Jacques Puechberty, Je te remercie pour l'ensemble de tes conseils ainsi que de ta disponibilité et ton aide sans lesquels ce travail n'aurait pas vu le jour. Tes mêmes ont permis une meilleure interprétation des résultats et tes yeux pétillants m'ont motivée pour poursuivre les analyses.

A Monsieur, le Docteur Franck Pellestor, En tant que spécialiste des mécanismes des réarrangements chromosomiques, je te remercie pour ton aide précieuse à la rédaction de ce manuscrit.

A toute l'équipe du Département de Génétique Médicale (Christine, Emmanuelle, Lucile, Marie-José, Marjolaine, Nicole, Patricia, M. Sarda), pour notre travail collaboratif et vos précieux conseils.

A Madame le Professeur Isabelle Touitou, pour ton accueil au sein de ton service, lors des techniques de Biologie Moléculaire.

A Guillaume, pour notre cohabitation de gel.

A Mouna, pour la compréhension des rouages de la Biologie Moléculaire.

A Vincent (alias Choupinou) pour nos discussions diverses et variées sur la Cytogénétique et la Biologie Moléculaire.

Au bureau du fond,

Magali, pour ton aide tant technique que rédactionnelle ;

Manon, pour ton fluide informatique, sans lequel mon ordinateur bugge.

Thomas, qui nous a rejoint dernièrement mais qui a bien récupéré le fluide informatique.

A toutes les équipes techniques des Laboratoires de Cytogénétique (Armandine, Jennifer, Marie, Marie-Claude, Patricia et Stéphanie), **de DPI** (Cendrine, Fatma, Izabel et Pascal) **et des MAI** (Aurélien et Déborah) **de l'hôpital Arnaud De Villeneuve**, pour avoir « fait de votre mieux » et y être arrivé et pour l'initiation au séquençage.

A Bruno, Mélanie et Pauline, pour votre aide essentielle dans les techniques.

A Analei, ma fille,

Grâce à tes pouvoirs héroïques, ma SuperKiki, tu as donné le jour à ce travail. Merci à toi qui illumine ma vie tous les jours non seulement avec tes déhanchements endiablés sur la musique mais aussi avec ton sourire de coquine.

A Stéphane,

Pour ton amour, ton écoute, ton soutien, tes encouragements et tous nos moments de complicité, de joie et de rires que nous partageons quotidiennement, je te dédie ce travail avec tout mon amour.

Que la réalisation de cette thèse soit le début de la réussite étudiante pour l'ensemble des membres de la famille.

A ma Mère,

Pour ta confiance, tes encouragements, ta disponibilité, ton affection qui te caractérisent, je te dédie ce travail avec tout mon attachement et ma profonde affection.

Que la réalisation de cette thèse soit le reflet de l'amour du travail que tu m'as transmis.

A Marie-Joëlle et Alain,

Votre disponibilité est inépuisable.

Pour votre affection, votre joie de vivre, votre spontanéité, votre patience et votre présence, je vous dédie cette thèse en témoignage de ma profonde affection.

A mes grands parents, vous me manquez

A tous les copains du Sud et du Nord, je vous remercie pour votre soutien amical.

Enfin je dédie cette thèse **à tous ceux** avec qui j'ai partagé des émotions, parcouru un bout de chemin et/ou échangé un sourire.

Table des matières

<u>Abréviations</u>	<u>1</u>
<u>Nomenclature</u>	<u>5</u>
1- CYTOGÉNÉTIQUE	5
2- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	5
<u>Liste des Figures.....</u>	<u>6</u>
<u>Liste des tableaux</u>	<u>13</u>
<u>Liste des Graphiques</u>	<u>14</u>
<u>Sites Internet.....</u>	<u>15</u>
<u>Introduction</u>	<u>16</u>
1- LA DÉFICIENCE INTELLECTUELLE.....	16
1.1 La place des déficients intellectuels dans la société au cours de l'histoire.....	17
1.2 Définitions et classification de la déficience intellectuelle	17
1.2.1 Définition et classification selon l'American Psychiatric Association (APA)	17
1.2.2 Définition et classification selon l'American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD).....	18
1.2.3 Définition et classification selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ..	18
1.3 Prévalence de la déficience intellectuelle.....	19
1.4 Evaluation de la déficience intellectuelle.....	19
1.5 Etiologies de la déficience intellectuelle	19
1.5.1 Les étiologies acquises	20
1.5.2 Les étiologies génétiques	21
2- ÉVOLUTION DES TECHNIQUES MISES EN ŒUVRE EN CYTOGÉNÉTIQUE ET LEUR APPORT DANS LA DI.....	22
2.1 Développements techniques	22
2.2 Développements scientifiques.....	30
2.3 Développements médicaux	31
2.3.1 Micro-remaniement déséquilibré identifié par l'utilisation de techniques plus résolutives.....	32
2.3.2 Formation d'un gène de fusion	32
2.3.3 Effet de position	33
2.3.4 Modification d'une région soumise à une empreinte parentale	36
2.3.5 Interruption d'un gène au niveau d'un ou des deux points de cassure	36
2.3.6 Mutation génique sans rapport avec la translocation	37
2.3.7 Cause non génétique.....	37
2.3.8 Conclusion.....	38
<u>Objectifs</u>	<u>39</u>
<u>Présentation des patients étudiés</u>	<u>41</u>
1- PATIENTE 1	41
1.1 Clinique	41

1.1.1	Antécédents familiaux.....	41
1.1.2	Déroulement de la grossesse et naissance.....	41
1.1.3	Variations morphologiques.....	42
1.1.4	Développement psychomoteur.....	42
1.1.5	Développement statural.....	42
1.1.6	Malformations observées.....	42
1.1.7	Examens clinico-biologiques.....	42
1.2	Cytogénétique.....	43
2-	PATIENT 2.....	44
2.1	Clinique.....	44
2.1.1	Antécédents familiaux.....	44
2.1.2	Déroulement de la grossesse et naissance.....	44
2.1.3	Variations morphologiques.....	45
2.1.4	Développement psychomoteur.....	45
2.1.5	Développement statural.....	45
2.1.6	Malformations observées.....	45
2.1.7	Examens clinico-biologiques.....	45
2.2	Cytogénétique.....	46
3-	PATIENT 3.....	47
3.1	Clinique.....	47
3.1.1	Antécédents familiaux.....	47
3.1.2	Déroulement de la grossesse et naissance.....	47
3.1.3	Variations morphologiques.....	47
3.1.4	Développement psychomoteur.....	47
3.1.5	Développement statural.....	48
3.1.6	Malformations observées.....	48
3.1.7	Examens clinico-biologiques.....	48
3.2	Cytogénétique.....	48
4-	Patient 4.....	49
4.1	Clinique.....	49
4.1.1	Antécédents familiaux.....	49
4.1.2	Déroulement de la grossesse et naissance.....	49
4.1.3	Variations morphologiques.....	49
4.1.4	Développement psychomoteur.....	49
4.1.5	Développement statural.....	50
4.1.6	Malformations observées.....	50
4.1.7	Examens clinico-biologiques.....	50
4.2	Cytogénétique.....	50
5-	Patient 5.....	51
5.1	Clinique.....	51
5.1.1	Antécédents familiaux.....	51
5.1.2	Déroulement de la grossesse et naissance.....	51
5.1.3	Variations morphologiques.....	51
5.1.4	Développement psychomoteur.....	51
5.1.5	Développement statural.....	52
5.1.6	Malformations observées.....	52
5.1.7	Examens clinico-biologiques.....	52
5.2	Cytogénétique.....	52
6-	Patient 6.....	54
6.1	Clinique.....	54

6.1.1 Antécédents familiaux.....	54
6.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	54
6.1.3 Variations morphologiques.....	54
6.1.4 Développement psychomoteur.....	54
6.1.5 Développement statural.....	55
6.1.6 Malformations observées.....	55
6.1.7 Examens clinico-biologiques.....	55
6.2 Cytogénétique.....	55
7- Patiente 7.....	56
7.1 Clinique.....	56
7.1.1 Antécédents familiaux.....	56
7.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	57
7.1.3 Variations morphologiques.....	57
7.1.4 Développement psychomoteur.....	57
7.1.5 Développement statural.....	57
7.1.6 Malformations observées.....	57
7.1.7 Examens clinico-biologiques.....	57
7.2 Cytogénétique.....	58
8- Patiente 8.....	59
8.1 Clinique.....	59
8.1.1 Antécédents familiaux.....	59
8.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	59
8.1.3 Variations morphologiques.....	59
8.1.4 Développement psychomoteur.....	59
8.1.5 Développement statural.....	60
8.1.6 Malformations observées.....	60
8.1.7 Examens clinico-biologiques.....	60
8.2 Cytogénétique.....	60
9- Patiente 9.....	61
9.1 Clinique.....	61
9.1.1 Antécédents familiaux.....	61
9.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	61
9.1.3 Variations morphologiques.....	61
9.1.4 Développement psychomoteur.....	62
9.1.5 Développement statural.....	62
9.1.6 Malformations observées.....	62
9.1.7 Examens clinico-biologiques.....	62
9.2 Cytogénétique.....	62
10- Patient 10.....	63
10.1 Clinique.....	63
10.1.1 Antécédents familiaux.....	63
10.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	64
10.1.3 Variations morphologiques.....	64
10.1.4 Développement psychomoteur.....	64
10.1.5 Développement statural.....	64
10.1.6 Malformations observées.....	64
10.1.7 Examens clinico-biologiques.....	64
10.2 Cytogénétique.....	65
11- Patient 11.....	66
11.1 Clinique.....	66

11.1.1 Antécédents familiaux.....	66
11.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	66
11.1.3 Variations morphologiques.....	67
11.1.4 Développement psychomoteur.....	67
11.1.5 Développement statural.....	67
11.1.6 Malformations observées.....	67
11.1.7 Examens clinico-biologiques.....	67
11.2 Cytogénétique.....	67
12- Patiente 12.....	68
12.1 Clinique.....	68
12.1.1 Antécédents familiaux.....	68
12.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance.....	68
12.1.3 Variations morphologiques.....	69
12.1.4 Développement psychomoteur.....	69
12.1.5 Développement statural.....	69
12.1.6 Malformations observées.....	69
12.1.7 Examens clinico-biologiques.....	69
12.2 Caryotype.....	70
<u>Méthodes mises en œuvre.....</u>	<u>72</u>
1- CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE.....	73
1.1 Hybridation <i>In Situ</i> Fluorescente ou FISH.....	73
1.1.1 Principe.....	73
1.1.2 Application de la FISH pour l'identification des points de cassures.....	75
La marche sur le chromosome.....	75
1.1.3 Sondes à façon utilisées dans le cadre de la recherche.....	77
1.2 Analyse chromosomique sur puces à ADN ou ACPA.....	78
1.2.1 Les différents types de puces.....	79
1.2.2 Application de l'ACPA pour cloner un point de cassure.....	80
La technique d'Array-Painting.....	80
2- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	88
2.1 Séquençage type Sanger.....	88
2.1.1 PCR et PCR Longue Distance.....	89
2.1.2 Séquençage.....	92
2.2 Application du séquençage pour cloner un point de cassure.....	93
Next-Generation Sequencing ou NGS.....	93
2.3 qPCR ou PCR quantitative.....	100
2.4 Etude de l'expression des ARN.....	103
<u>Résultats.....</u>	<u>106</u>
1- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS ACPA.....	107
1.1 Patiente 1.....	107
1.1.1 Résultat de l'ACPA.....	107
1.1.2 Rôle de la délétion interstitielle 6q24.3q25.1 dans le phénotype de la Patiente 1.....	108
1.1.3 Conclusion.....	109
1.2 Patient 2.....	110
1.2.1 Résultat de l'ACPA.....	110
1.2.2 Rôle de la délétion interstitielle 14q22.1q22.2 dans le phénotype du Patient 2.....	111
1.2.3 Conclusion.....	113
1.3 Patient 3.....	113

1.3.1	Résultat de l'ACPA	114
1.3.2	Rôle des délétions interstitielles 4p15.1p15.2 et 5p14.3 dans le phénotype du Patient 3	115
1.3.3	Conclusion.....	117
1.4	Patiente 8	117
1.4.1	Résultat de l'ACPA	118
1.4.2	Rôle de la duplication 4p11q12 dans le phénotype de la Patiente 8	119
1.4.3	Conclusion.....	119
1.5	Conclusion.....	119
2- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS VERIFICATION DES DÉSÉQUILIBRES OBSERVÉS À L'ACPA.....		119
2.1	Vérification par FISH uniquement	120
2.1.1	Patiente 1	120
2.1.2	Patient 2.....	123
2.2	Vérification par FISH et Biologie Moléculaire.....	124
2.2.1	Patient 3.....	124
2.2.2	Patiente 8	126
2.3	Conclusion.....	127
3- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS MARCHE SUR LE CHROMOSOME PAR FISH.....		127
3.1	Patient 11	128
3.1.1	Identification des points de cassure par la marche sur le chromosome	128
3.1.2	Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype	132
3.1.3	Conclusion.....	133
3.2	Patiente 12	133
3.2.1	Identification des points de cassure par la marche sur le chromosome	134
3.2.2	Conclusion.....	134
3.3	Conclusion.....	134
4- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS ARRAY-PAINTING.....		134
4.1	Interruption de gène(s)	135
4.1.1	Patient 5.....	135
4.1.2	Patient 6.....	138
4.1.3	Patiente 8	144
4.1.4	Patient 10.....	148
4.1.5	Patiente 12	152
4.2	Pas d'interruption génique aux points de cassure.....	156
4.2.1	Patient 4.....	156
4.2.2	Patiente 7	160
4.2.3	Patiente 8	168
4.2.4	Patiente 9	170
4.2.5	Patiente 12	174
4.3	Conclusion.....	176
5- RÉSULTATS et INTERPRÉTATION DES TECHNIQUES DE SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT		177
5.1	Images recherchées	177
5.2	Patiente 1	180
5.2.1	Identification des points de cassure : présence d'un <i>chromothripsis</i> ?.....	180
5.2.2	Techniques complémentaires : aide à l'interprétation des données.....	183
5.2.3	Conclusion.....	185
5.3	Patient 5.....	187
5.3.1	Identification des points de cassure.....	187

5.3.2 Techniques complémentaires : aide à l'interprétation des données.....	187
5.3.3 Techniques complémentaires : interprétation des résultats.....	189
5.3.4 Conclusion.....	195
5.4 Patient 10.....	196
5.4.1 Identification des points de cassure.....	196
5.4.2 Techniques complémentaires : aide à l'interprétation des données.....	200
5.4.3 Conclusion.....	207
5.5 Patient 11 et Patiente 12.....	209
5.5.1 Patient 11.....	210
5.5.2 Patiente 12.....	228
5.6 Conclusion.....	228
6- RÉSULTATS DES TECHNIQUES D'EXPRESSION MISES EN ŒUVRE POUR CONFIRMER NOS HYPOTHÈSES DIAGNOSTIQUES.....	229
6.1 Patient 5.....	230
6.1.1 Expression du gène <i>KIF1A</i>	230
6.1.2 Expression du gène <i>SLC9A6</i>	231
6.2 Patient 6.....	232
6.3 Patiente 7.....	235
6.4 Conclusion.....	236
7- CONCLUSION.....	236
<u>Discussion.....</u>	<u>240</u>
1- Recherche d'un mécanisme chromosomique commun.....	242
1.1 L'hypothèse d'un mécanisme chromosomique commun est-elle vérifiée ?.....	246
1.2 Cas particulier du Patient 6 : Interruption du gène <i>AUTS2</i> impliqué dans des réarrangements récurrents : mécanisme ?.....	248
1.3 Patients 10 et 11 : <i>chromothripsis</i>	249
1.4 Conclusion.....	250
2- Clonage d'un point de cassure : quelle approche ?.....	252
2.1 Avantages et inconvénients de la marche sur le chromosome par FISH.....	252
2.2 Avantages et inconvénients de l'Array-Painting.....	254
2.3 Avantages et inconvénients du WGS.....	258
2.4 Comparaison des techniques.....	262
<u>Conclusion et perspectives.....</u>	<u>266</u>
<u>Bibliographie.....</u>	<u>270</u>
<u>ANNEXE 1.....</u>	<u>293</u>
<u>ANNEXE 2.....</u>	<u>294</u>
<u>ANNEXE 3.....</u>	<u>296</u>
<u>ANNEXE 4.....</u>	<u>297</u>
<u>ANNEXE 5.....</u>	<u>299</u>
<u>ANNEXE 6.....</u>	<u>301</u>
<u>ANNEXE 7.....</u>	<u>302</u>
<u>ANNEXE 8.....</u>	<u>304</u>

<u>ANNEXE 9</u>	<u>306</u>
<u>ANNEXE 10</u>	<u>307</u>
<u>ARTICLE</u>	<u>311</u>

Abréviations

A	Adénine
AAIDD	American Association on Intellectuel and Developmental Disabilities
ACPA	Analyse Chromosomique par Puce à ADN
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AEC	Arc En Ciel
AP	Array-Painting
APA	American Psychiatric Association
ARN	Acide RiboNucléique
AS	Syndrome d'Angelman
ATB	Antibiotique
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAF	B Allele Frequency
BAM	Binary Alignment Map
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool)
BM	Biologie Moléculaire
C	Cytosine
°C	degré Celsius
CAMSP	Centre d'Aide Médico Psychologique
cDNA	complementary DesoyriboNucleic Acid
cf.	confer
CGH	Comparative Genomic Hybridization
ChAS	Chromosome Analysis Suite - Affymetrix®
chr	chromosome
CH ₃ COONa	Acétate de Sodium
CIM	Classification Internationale des Maladies
CIV	Communication InterVentriculaire
cm	centimètre
cm ²	centimètre carré
CMF	CytoMétrie en Flux
CN	Copy Number
CNV	Copy Number Variation
CO ₂	Dioxyde de Carbone
Cp	Crossing point
CQ	Contrôle Qualité
Ct	Cycle threshold
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DI	Déficiencie Intellectuelle
DSM	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders
ddNTP	didésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates
DNA	DésoxyriboNucléic Acid
dNTP	désoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates
DS	Déviation Standard
dUTP	deoxyUridine TriPhosphate
EBBS	Earle's balanced salts solution

EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Acide éthylène Diamine TétraAcétique
ELAND	Efficient Large-scale Alignment of Nucleotide Databases
ELN	Extrémité Non Localisée
€	euros
FISH	Hybridation Fluorescente In Situ
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FdU	FluorodeoxyUridine
FoSTeS	Fork Stalling and Template Switching
g	gramme
G	Guanine
Glu	acide Glutamique
GTC	GenoTyping Console
GWAS	genome-wide association study
h	heure
H ₂ O	Eau
HD	High Density
hg	human genome
IGV	Integrative Genomics Viewer
IRB	Institut de la Recherche Biothérapie
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays
ISCN	An International System for Human Cytogenetic
J	Jour
kb	Kilobases
KCl	Chlorure de Sodium
kDa	kiloDalton
kg	kilogramme
L	Litre
LB	Luria-Bertani
LCR	Low Copy Repeats
LINE	long interspersed nuclear element
LR	Log Ratio
LTR	Long Terminal Repeat sequence
m	mètre
M	Molaire
Mb	Mégabases
MCF	Marche sur le Chromosome par FISH
MgCl ₂	Chlorure de Magnésium
MgSO ₄ ,7H ₂ O	Sulfate de Magnésium Heptahydraté
µg	microgramme
mg	milligramme
min	minute
µl	microLitre
ml	milliLitre
mm	millimètre
mM	milliMolaire
MMBIR	Microhomology Mediated Break-Induced Replication
W	milliWatt
N	Normalité

NaCl	Chlorure de Sodium
NaHCO ₃	Bicarbonate de Sodium
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de Sodium Dibasique
NGS	Next-Generation Sequencing
NAHR	Recombinaison Homologue Non-Allélique
Ng	nanogramme
NHEJ	Nonhomologous DNA End Joining
nm	nanomètre
OMIM	Online Medelian Inheritance in Man Database
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
§	paragraphe
P	Poids
PAC	Plasmid Artificial Chromosome
pb	paires de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Périmètre Crânien
PCN	PC de naissance
PE2x100	paired-ends reads de 2x100 nucléotides
PEV	Position Effect Variegation
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel Hydrogène
PHA	PhytoHémagglutinine A
PN	P de naissance
%	pourcentage
PSI	Pound per Square Inch
PWS	Syndrome de Prader-Willi
qPCR	PCR quantitative
QI	Quotient Intellectuel
QIP	QI Performance
QIV	QI Verbal
QSP	Quantité Suffisante Pour
RAM	Random Access Memory
RCC	Remaniement Chromosomique Complexe
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
RM	Retard Mental
Rn	nombre de copie
RNA	RiboNucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse transcriptase
s	seconde
SA	Semaine d'Aménorrhée
SINE	small interspersed nuclear element
SNL	Séquences Non Localisées
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
STS	Sequence-Tagged Site)
>	Supérieur à
T	Taille
TA	Température Ambiante
TE	Tris-EDTA
ter	terminal

TN	T de naissance
tr	tour
TR	Texas Red
VABS	Aineland Adaptive Behavior Scale
UV	Ultra Violet
v	volume
VOUS	Variant Of Uncertain clinical Significance
wcp	whole chromosome paint
WGA	Whole Genome Amplification
WGS	Whole Genome Sequencing
YAC	Yeast Artificial Chromosome

Nomenclature

1- CYTOGÉNÉTIQUE

del	délétion
der	dérivé chromosomique
dim	diminution / perte
dn	<i>de novo</i>
dup	duplication
p	bras court du chromosome
or	ou (alternative dans l'interprétation)
parenthèses ()	encadrent les chromosomes et les points de cassure dans les remaniements de structure
point (.)	sépare les bandes et les sous bandes chromosomiques
point virgule (;)	sépare les chromosomes et les points de cassure dans les réarrangements de structure
q	bras long du chromosome
t	translocation réciproque
tel	télomère
ter	terminal
virgule (,)	sépare le nombre de chromosomes des chromosomes ainsi que les anomalies chromosomiques
XX	sexe chromosomique féminin
XY	sexe chromosomique masculin

2- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

c	coding
del	délétion
delins	délétion / insertion
NM_	Assession Number (ADN)
NP_	Assession Number (protéine)
p	proteic

Liste des Figures

<u>Figure 1</u> : Les étiologies de la déficience intellectuelle et leurs fréquences (%) -----	Page 20
<u>Figure 2</u> : Les différents niveaux de résolution en Cytogénétique Classique (exemple du chromosome 1 marqué en bandes G) -----	Page 23
<u>Figure 3</u> : Les différents types de sondes utilisées pour les techniques de FISH-----	Page 25
<u>Figure 4</u> : Les différents types de puces à ADN -----	Page 27
<u>Figure 5</u> : Chronologie récapitulative des technologies développées pour le séquençage de l'ADN -----	Page 29
<u>Figure 6</u> : Principe des translocations réciproques-----	Page 31
<u>Figure 7</u> : Effet de position-----	Page 35
<u>Figure 8</u> : La marche sur le chromosome par FISH -----	Page 38
<u>Figure 9</u> : Arbre décisionnel des techniques mises en œuvre pour le diagnostic chez les différents patients recrutés -----	Page 40
<u>Figure 10</u> : Représentation des translocations t(4;9) et t(7;8) -----	Page 43
<u>Figure 11</u> : Représentation des chromosomes 5 et 14 et des dérivés 5 et 14 de la translocation t(5;14) -----	Page 46
<u>Figure 12</u> : Représentation des chromosomes 4 et 5 et des dérivés 4 et 5 de la translocation t(4;5) -----	Page 48
<u>Figure 13</u> : Représentation des chromosomes 2 et 11 et des dérivés 2 et 11 de la translocation t(2;11) -----	Page 50
<u>Figure 14</u> : Représentation des chromosomes Y et 2 et des dérivés Y et 2 de la translocation t(Y;2) -----	Page 53
<u>Figure 15</u> : Représentation des chromosomes 3 et 7 et des dérivés 3 et 7 de la translocation t(3;7) -----	Page 55
<u>Figure 16</u> : Représentation des chromosomes 3 et 5 et des dérivés 3 et 5 de la translocation t(3;5)-----	Page 58
<u>Figure 17</u> : Représentation des chromosomes 1 et 14 et des dérivés 1 et 14 de la translocation t(1;14) -----	Page 60

<u>Figure 18</u> : Représentation des chromosomes X et 16 et des dérivés X et 16 de la translocation t(X;16)-----	Page 63
<u>Figure 19</u> : Représentation des chromosomes 3, 5 et 15 et des dérivés 3, 5 et 15 de la translocation t(3;15;5)-----	Page 65
<u>Figure 20</u> : Peintures des chromosomes 3 (A et B), 5 (A) et 15 (B) -----	Page 66
<u>Figure 21</u> : Représentation des chromosomes 1 et 10 et des dérivés 1 et 10 de la translocation t(1;10) -----	Page 68
<u>Figure 22</u> : Représentation des chromosomes 4 et 7 et des dérivés 4 et 7 de la translocation t(4;7)-----	Page 70
<u>Figure 23</u> : Principe général de l'hybridation fluorescente in situ -----	Page 74
<u>Figure 24</u> : Principe de la marche sur le chromosome et interprétation des signaux FISH -----	Page 76
<u>Figure 25</u> : -----	Page 78
A- Principe du clonage, de l'amplification, de la fabrication et du marquage des sondes à façon	
B- Après hybridation d'une sonde marquée indirectement, la révélation du signal nécessite l'utilisation d'un anticorps fluorescent	
<u>Figure 26</u> : Principe de l'Array-Painting -----	Page 82
<u>Figure 27</u> : Marquage de la suspension chromosomique avec de l'iodure de propidium -----	Page 85
<u>Figure 28</u> : Exemple de caryogrammes de flux illustrant la séparation des dérivés chromosomiques par CMF -----	Page 87
<u>Figure 29</u> : Les différentes étapes de la PCR -----	Page 90
<u>Figure 30</u> : Stratégie de séquençage d'un amplicon de grande taille, par étape de 400 à 600 pb de façon séquentielle, puis reconstitution de la séquence complète du fragment -----	Page 93
<u>Figure 31</u> : Principe du NGS : Généralités -----	Page 95
<u>Figure 32</u> : Les différentes étapes de la technologie Illumina® -----	Page 96
<u>Figure 33</u> : Représentation graphique avec l'algorithme BWA de 2 remaniements intrachromosomiques sur le chromosome 5 -----	Page 97
<u>Figure 34</u> : Représentation graphique avec l'algorithme ELAND de 2 remaniements intrachromosomiques sur le chromosome 5 -----	Page 98
<u>Figure 35</u> : Représentation graphique avec l'algorithme BWA spécifique d'une translocation réciproque-----	Page 99
<u>Figure 36</u> : Les trois phases d'une courbe de qPCR -----	Page 102

Figure 37 : Représentation point final et temps réel-----Page 102

Figure 38 : Représentation graphique de la gamme étalon et de l'établissement du Ct
-----Page 103

Figure 39 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 6 pour la Patiente 1 -----Page 108

Figure 40 : Représentation graphique de la microdélétion 6q24.3q25.2 de la Patiente 1
-----Page 110

Figure 41 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 14 pour le Patient 2 -----Page 111

Figure 42 : Représentation graphique de la microdélétion 14q22.1q22.2 du Patient 2
-----Page 113

Figure 43 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 4 pour le Patient 3-----Page 114

Figure 44 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 5 pour le Patient 3-----Page 115

Figure 45 : Représentation de la délétion interstitielle 4p15.1 du Patient 3-----Page 116

Figure 46 : Représentation de la délétion interstitielle 5p14.3 du Patient 3-----Page 117

Figure 47 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 4 pour la Patiente 8 -----Page 118

Figure 48 : Classification des RCC -----Page 121

Figure 49 : Principe du chromothripsis-----Page 122

Figure 50 : Interruption du gène AKT3 avec les BAC encadrant RP11-113O11 et RP11-794A13 -----Page 129

Figure 51 : Localisation des sondes BAC utilisées pour la méthode de « marche sur le chromosome » pour le dérivé chromosomique 1-----Page 130

Figure 52 : Localisation des sondes BAC utilisées pour la méthode de « marche sur le chromosome » pour le dérivé chromosomique 10 -----Page 131

Figure 53 : Profil d'hybridation dans le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 2 sur les deux dérivés (Patient 5) -----Page 136

Figure 54 : Représentation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 3 (A) et pour le chromosome 7 (B) à partir des deux dérivés (Patient 6) -----Page 139

Figure 55 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 3 du Patient 6-----Page 140

Figure 56 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 7 du Patient 6-----Page 141

Figure 57 : Représentation de la jonction entre les gènes EPHA6 et AUTS2 après séquençage à partir du dérivé 3 et comparaison par BLAST -----Page 143

Figure 58 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 1 (A) et pour le chromosome 14 (B) à partir des deux dérivés (Patiente 8) -----Page 145

Figure 59 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 1 de la Patiente 8 -----Page 146

Figure 60 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 14 de la Patiente 8 -----Page 147

Figure 61 : Localisation des séquences du chromosome 3p chez le Patient 10-----Page 149

Figure 62 : Localisation des séquences du chromosome 5q chez le Patient 10-----Page 150

Figure 63 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 4 (A) et pour le chromosome 7 (B) à partir du dérivé 4 (Patiente 12) -----Page 153

Figure 64 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 4 de la Patiente 12 -----Page 154

Figure 65 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 7 de la Patiente 12 -----Page 155

Figure 66 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 2 (A) et pour le chromosome 11 (B) à partir des deux dérivés (Patient 4) -----Page 157

Figure 67 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 2 du Patient 4-----Page 158

Figure 68 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 11 du Patient 4 -----Page 158

Figure 69 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 3 (A) et pour le chromosome 5 (B) à partir des deux dérivés (Patiente 7) -----Page 162

Figure 70 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 3 de la Patiente 7 -----Page 163

Figure 71 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 5 de la Patiente 7 -----Page 164

Figure 72 : Régions conservées au niveau des points de cassure entre les points de cassure déterminés par Array-Painting chez la Patiente 7-----Page 166

Figure 73 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 16 (A) et pour le chromosome X (B) à partir des deux dérivés (Patiente 9) -----Page 171

Figure 74 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé X de la Patiente 9-----Page 172

Figure 75 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 16 de la Patiente 9-----Page 172

Figure 76 : Représentation avec l'algorithme ELAND des résultats de WGS dans la zone d'un point de cassure chromosomique -----Page 178

Figure 77 : Représentation l'algorithme BWA des résultats de WGS dans la zone d'un point de cassure chromosomique -----Page 179

Figure 78 : Représentation avec l'algorithme BWA d'une translocation réciproque (flèches oranges) dans la zone d'un point de cassure chromosomique -----Page 179

Figure 79 : Représentation graphique (algorithme BWA) spécifique de la translocation réciproque t(7;8) sur le chromosome 8 (Patiente 1) -----Page 181

Figure 80 : Représentation graphique (algorithme BWA) suggérant la présence de 2 délétions séparées par un segment inversé (Patiente 1)-----Page 182

Figure 81 : Profil d'hybridation des sondes RP11-756P18 en 4q28.3 et RP11-462M05 en 4q28.3 -----Page 183

Figure 82 : profil d'hybridation des sondes RP11-153O07 en 9p24.1 et RP11-367K01 en 9p24.1 confirmant le point de cassure entre ces deux sondes -----Page 184

Figure 83 : Représentation des résultats de chaque technique utilisée pour mettre en évidence le remaniement complexe de la région 6q24.3q25.1 chez la Patiente 1 -----Page 186

Figure 84 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting et localisation de la sonde CTD-2036A16 sur le dérivé 2 du Patient 5 -----Page 188

Figure 85 : Représentation du principe de localisation du point de cassure à l'aide de la technique de qPCR du Patient 5 -----Page 189

Figure 86 : Visualisation du point de cassure sur le chromosome 2 avec le logiciel IGV (Algorithme ELAND)-----Page 190

Figure 87 : Electrophorégramme montrant la délétion d'un codon GAG dans le poly(GAG) de l'exon 27 du Patient 5 -----Page 191

Figure 88 : Représentation de la délétion du codon GAG dans le poly(GAG) dans IGV (Patient 5)-----Page 191

Figure 89 : Données de séquençage haut-débit visualisé avec IGV de la jonction intron 10 - exon11 du gène *SLC9A6*-----Page 192

Figure 90 : Prédiction des conséquences potentielles de la variation sur l'épissage (ALAMUT VISUAL) -----Page 193

Figure 91 : Séquence reconstituée (longueur 267 bases) de part et d'autre du point de cassure sur le chromosome Y-----Page 194

Figure 92 : Proposition d'alignement de la répétition de base de la séquence reconstituée du chromosome Y -----Page 194

Figure 93 : Représentation des résultats de WGS dans la zone d'un point de cassure chromosomique (algorithme ELAND) -----Page 198

Figure 94 : Représentation des résultats de WGS dans la zone des remaniements intrachromosomiques en 5:135746504 (algorithme BWA) -----Page 199

Figure 95 : Hybridation de la sonde RP11-754J20 en 3p12.1-----Page 201

Figure 96 : Hybridation des sondes RP11-25P22 en 5q35.1 (A) et RP11-320M08 en 5q34 (B) avec un témoin subtélomérique 5ptel-----Page 201

Figure 97 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 5q et 3p sur les dérivé 3, 5 et 15 ----- Pages 203-206

Figure 98 : Identification par WGS de l'implication du chromosome 5 dans le remaniement chromosomique du Patient 11 -----Page 211

Figure 99 : Confirmation de l'implication du chromosome 5 dans le remaniement chromosomique du Patient 11 -----Page 212

Figure 100 : Profil d'hybridation des sondes RP11-113O11 en 1q43 et RP11-794A13 en 1q43q44 -----Page 213

Figure 101 : Représentation de la région du point de cassure en 1:241883340 dans le logiciel IGV chez le Patient 11 -----Page 215

Figure 102 : Alignement des séquences SNL (algorithme ELAND) correspondant au deuxième point de cassure chromosomique hypothétique sur le chromosome 1 en position 241883302 -----Page 216

Figure 103 : Séquence reconstituée à partir des SNL au niveau de la région 1:241883340 (longueur de 326pb) chez le Patient 11-----Page 217

Figure 104 : Représentation de la région 10:24704355 dans le logiciel IGV chez le Patient 11 -----Page 218

Figure 105 : Alignement des séquences SNL à partir de l'analyse ELAND correspondant au deuxième point de cassure chromosomique hypothétique sur le chromosome 10 -----Page 219

- Figure 106 : Séquence reconstituée à partir des SNL au niveau de la région 10:24704355 (longueur de 298pb) chez Patient 11-----Page 220
- Figure 107 : Séquence reconstituée au niveau des points de cassure hypothétiques dans la séquence LINE de sous-type L1P1 (sens 5' → 3') chez le Patient 11 -----Page 221
- Figure 108 : Représentation des jonctions entre les séquences LINE L1P1 du chromosome 5 (vert) et les chromosomes 1 (rouge) et 10 (bleu) chez le Patient 11 -----Page 221
- Figure 109 : Représentation de la délétion 1:241809628-241811482 (taille : 1,8kb) dans le logiciel IGV chez le Patient 11 -----Page 223
- Figure 110 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 1q, 5q et 10p sur les dérivé 1, 5 et 10 ----- Pages 224-226
- Figure 111 : Gel d'agarose à 1 % des produits de RT-PCR pour rechercher une expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22*, et *RPL27* et du gène *KIF1A* pour les couples d'amorces 1, 2 et 3 dans une lignée cellulaire immortalisée chez le Patient 5 -----Page 231
- Figure 112 : Profil de migration des produits de RT-PCR-----Page 232
- Figure 113 : Gel d'agarose à 1 % des produits de RT-PCR pour rechercher une expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22*, *RPL27* et *RPS29* ainsi que d'éventuels gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* et *AUTS2-EPHA6* dans une lignée cellulaire immortalisée chez le Patient 6-----Page 234
- Figure 114 : Synthèse des résultats obtenus après ACPA, Array-Painting et WGS ----Page 238
- Figure 115 : Principe du mécanisme NAHR -----Page 243
- Figure 116 : Principe du mécanisme NHEJ-----Page 244
- Figure 117 : Mécanisme FoSTeS - Fork Stalling and Template Switching-----Page 245
- Figure 118 : Mécanisme MMBIR - Microhomology Mediated Break-Induced Replication -----Page 246
- Figure 119 : Représentation schématique des localisations des points de cassure (dans les 7 premiers exons seulement) des translocations impliquant *AUTS2* chez les 6 patients de la littérature ainsi que chez le Patient 6-----Page 249
- Figure 120 : Exemple de caryogramme de flux illustrant la difficulté de séparation des dérivés chromosomiques par CMF chez le Patient 10 -----Page 257
- Figure 121 : Arbre décisionnel présentant la démarche diagnostique étiologique devant un remaniement chromosomique apparemment équilibré et *de novo* chez un patient à phénotype anormal-----Page 269

Liste des tableaux

Tableau I : Récapitulatif des données cliniques et des translocations des patients de l'étude
----- Page 71

Tableau II : Logiciels utilisés pour choisir les amorces----- Page 91

Tableau III : Récapitulatif des patients et des méthodes mises en œuvre -----Page 105

Tableau IV : Résultats des techniques FISH chez le Patient 2-----Page 124

Tableau V : Amorces utilisées pour étudier les points de cassure des différents remaniements chromosomiques de la Patiente 1 par séquençage Sanger -----Page 185

Tableau VI : Présentation de plusieurs motifs répétés intrinsèques identifiés au sein de la séquence reconstituée du chromosome Y et leur nombre de répétitions -----Page 194

Tableau VII : Comparaison de la symptomatologie clinique du Patient 5 avec celles liées à l'atteinte des gènes *KIF1A* et *SLC9A6*-----Page 196

Tableau VIII : Couples d'amorces utilisés pour étudier l'expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22*, *RPL27* et *RPS29* chez les Patients 5, 6 et 7-----Page 230

Tableau IX : Couples d'amorces utilisés pour étudier l'expression de *KIF1A* chez le Patient 5
-----Page 230

Tableau X : Couples d'amorces utilisés pour étudier l'expression de *AUTS2* et rechercher des gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* et *AUTS2-EPHA6* chez le Patient 6-----Page 232

Tableau XI : Récapitulatif des patients, des méthodes mises en œuvre et des résultats de l'étude-----Page 239

Tableau XII : Localisation chromosomique des différents points de cassure impliqués dans les remaniements des patients de notre cohorte -----Page 247

Tableau XIII : Récapitulatif des différents mécanismes de formation des remaniements chromosomiques chez les Patients 1, 6, 7, 10, 11 et 12-----Page 251

Tableau XIV : Récapitulatif du coût de l'Array-Painting-----Page 255

Tableau XV : Comparaison des techniques mises en œuvre -----Page 262

Tableau XVI : Avantages et Inconvénients de chaque technique mise en œuvre lors de la mise en œuvre de ce travail-----Page 263

Tableau XVII : Détails des symptômes cliniques des patients étudiés -----Page 293

Liste des Graphiques

Graphique 1 : Représentation de la diminution de l'expression du gène *AUTS2* chez le Patient 6 ----- Page 233

Graphique 2 : Représentation de la surexpression du gène *MEF2C* chez la Patiente 7 ----- Page 235

Sites Internet

ALAMUT VISUAL	http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/
BLAST	http://grch37.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core
BLASTN	http://www.ensembl.org/Multi/blastview
Cytoscan HD	mscience.com.au/upload/pages/affy-microarray/c100704-rev3-cytoscan_hd_datasheet.pdf
Ensembl	http://feb2014.archive.ensembl.org/index.html
Expression Atlas	http://www.ebi.ac.uk/gxa/
Fastqc	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
Genecards	http://www.genecards.org/
Genome Reference Consortium	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/
Illumina	http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_genomic_sequence.pdf
in-silico	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr
Integrative Genomics Viewer - IGV	http://www.broadinstitute.org/igv/home
MGX, Centre National de Recherche Scientifique - Montpellier	http://www.mgx.cnrs.fr/project/
Primer blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi
Puce Cytoscan HD™, Affymetrix	http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/cytoscan_hd_datasheet.pdf
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org
Séquence humaine de référence : hg19	http://feb2014.archive.ensembl.org/index.html

Introduction

La question de l'origine des êtres vivants intéresse les intellectuels depuis de longues années (Darwin. 1859). Ainsi, de nombreux philosophes et savants se sont interrogés sur ce sujet mais la découverte de la structure de l'Acide DésoxyriboNucléique ou ADN par Watson et Crick en 1953 a marqué un tournant dans l'histoire de la génétique (Watson et Crick. 1953). Cette avancée a permis alors de proposer un modèle pour expliquer la duplication du matériel génétique et donc de « résoudre le problème de l'hérédité ». Différentes étapes sont alors décrites pour expliquer la duplication semi-conservative de la molécule d'ADN ; parmi celles-ci, la découverte de structures moléculaires, supports des caractères héréditaires et appelées « chromosomes », a constitué le point essentiel du développement de la génétique médicale. Cette spécialité recherche les causes génétiques de certaines maladies et en étudie leur hérédité. Parmi les divers domaines d'intérêt, celui du diagnostic expliquant l'origine de la déficience intellectuelle (DI) est primordial.

1- LA DÉFICIENCE INTELLECTUELLE

Le diagnostic de la DI présente un défi majeur dans le domaine de la santé publique. En effet, en plus d'apporter une aide psychologique à la famille qui pourra mettre fin à une quête d'explication et à une incompréhension face aux troubles du patient, le diagnostic permet d'évaluer le risque de récurrence, de transmission, voire de proposer un diagnostic prénatal si possible. Par ailleurs, cette DI peut être isolée mais est souvent associée à d'autres symptômes comme des malformations congénitales (dans 27 à 54 % des cas - Petterson B, et al. 2007), des troubles du spectre autistique (dans 28 % des patients avec une DI - Bryson SE, et al. 2008) ou encore une épilepsie (dans 22 % des DI selon l'équipe de Oeseburg B - Oeseburg B, et al. 2011), pouvant être responsables d'atteintes majeures, et devient alors syndromique.

1.1 La place des déficients intellectuels dans la société au cours de l'histoire

Les écrits nous montrent que la place dans la société des déficients intellectuels a varié au cours de l'histoire passant d'un état de « messie » en recevant « la parole divine » à un état de dénigrement en considérant la DI comme une punition divine. Cependant, même si les enfants atteints de DI ont été vus parfois de façon positive ou avec de la pitié, il revient le plus souvent des considérations négatives ; en effet, la plupart du temps, les déficients intellectuels représentaient un poids voire une menace pour la société, et ce encore à l'heure actuelle (Keren B. 2013).

Dans ce contexte, la place de la compréhension de cette maladie ainsi que le mode d'hérédité sont devenus importants afin d'établir une prise en charge spécifique, un conseil génétique adapté, ainsi que la mise en place d'un éventuel traitement médicamenteux comme par exemple dans les hypothyroïdies et les hyperplasies congénitales des surrénales. Ainsi, la DI est une cause prépondérante de consultations en Génétique Médicale.

1.2 Définitions et classification de la déficience intellectuelle

En fonction des associations médicales et scientifiques prenant en charge les déficients intellectuels, il existe plusieurs définitions de DI et par là même de classifications.

1.2.1 Définition et classification selon l'American Psychiatric Association (APA)

Cette définition est la plus utilisée aux Etats-Unis et dans la littérature. La DI correspond, selon le manuel DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), à une faiblesse généralisée des capacités mentales, ce qui a pour conséquence un impact sur le fonctionnement adaptatif aussi bien dans le domaine conceptuel (comme le langage, la lecture, l'écriture...), que dans le domaine social (l'empathie, le jugement social, les compétences de communication, les relations amicales...) ou encore dans le domaine pratique (l'hygiène, le budget, l'organisation du travail...).

Sans limite d'âge, les divers symptômes doivent apparaître durant la phase de développement. Dans ce contexte, l'APA définit 4 catégories de DI différentes allant d'une certaine autonomie à une dépendance complète : légère, modérée, sévère et profonde.

1.2.2 Définition et classification selon l'American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD)

Selon cette association, la DI est une limitation significative du fonctionnement intellectuel et du comportement adaptatif devant débuter avant l'âge de 18 ans. Le fonctionnement intellectuel est mesuré à l'aide du Quotient Intellectuel (QI) et le fonctionnement adaptatif se réfère aux mêmes domaines que ceux décrits dans la définition de l'APA ci-dessus (cf. § 1.2.1 de l'introduction). Par ailleurs, le diagnostic de DI tient compte non seulement de l'environnement des patients, aussi bien communautaire que culturel, mais aussi de la diversité linguistique.

La classification est donnée par l'équipe de Schalock en 2010 (Schalock RL, et al. 2010) et comprend 4 catégories :

- * la DI nécessitant une aide ponctuelle,
- * la DI nécessitant une aide limitée,
- * la DI nécessitant un support plus étendu,
- * et, la DI nécessitant un support invasif.

1.2.3 Définition et classification selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

L'OMS a défini une Classification Internationale des Maladies (CIM-10) dans laquelle la DI, encore appelée Retard Mental (RM), correspond à un développement arrêté ou incomplet du fonctionnement mental, ce qui a pour conséquence une altération des facultés déterminant le niveau global d'intelligence lors de la période de développement. Cette définition fût très utilisée en Europe et l'est encore en France. Cependant, elle date de 1990 et une nouvelle version plus proche de celles de l'APA et de l'AAIDD est prévue courant de l'année 2015 (CIM-11). Selon Salvador-Carulla et ses collaborateurs le terme de RM prendrait, alors, une autre terminologie (Salvador-Carulla L, et al. 2011).

Actuellement, l'OMS définit 4 catégories en fonction du Quotient Intellectuel (QI) du patient :

- * RM léger (F70) : avec un QI entre 69 et 50,
- * RM moyen (F71) : avec un QI entre 49 et 35,
- * RM grave (F72) : avec un QI entre 34 et 20,
- * et, RM profond (F73) : avec un QI inférieur à 20.

1.3 Prévalence de la déficience intellectuelle

Suite à ces différentes définitions et donc classifications, la mesure de la prévalence de la DI est difficile à réaliser même si, statistiquement, elle représente 2,5 % de la population générale. Cependant, l'étude de l'équipe de Roeleveld, considérée encore à l'heure actuelle comme une référence, concluait en 1997 que la prévalence était proche du chiffre théorique de 2,2 % (Roeleveld N, et al. 1997). Plus récemment, la revue de Leonard H et Wen X indique une fréquence de 1 à 3 % avec une majorité de garçons atteints s'expliquant par des anomalies monogéniques liées au chromosome X (Leonard H, Wen X. 2002).

1.4 Evaluation de la déficience intellectuelle

La DI est évaluée sur deux plans :

- * le fonctionnement intellectuel, basé sur les tests de QI,
- * et, le fonctionnement adaptatif, grâce à certains tests comme l'échelle de Vineland (VABS) ou celle de l'AAIDD.

1.5 Etiologies de la déficience intellectuelle

Trouver l'origine de la DI est essentiel afin de donner un conseil génétique adéquat, et ainsi éventuellement éviter une récurrence en proposant un diagnostic prénatal voire pré-implantatoire. Par ailleurs, il existe, même s'ils sont très rares, des traitements symptomatiques pour certaines étiologies de DI.

Les cas de DI sont nombreux et leur origine hétérogène. De plus, de nouvelles étiologies sont découvertes très régulièrement. Si la trisomie 21 représente la plus grande majorité des causes de DI avec une fréquence de 7 à 11 % (Oeseburg B, et al. 2011), il existe de nombreuses autres étiologies de DI. Chacune d'elles prise isolément est rare (cf. Figure 1) ce qui rend difficile leurs diagnostics. Dans ce contexte, il existe environ 60 % des patients pour lesquels aucun diagnostic étiologique n'a été réalisé et ce pour plusieurs raisons (Keren B. 2013) :

- 1- la cause est trop rare pour être recherchée en routine,
- 2- certaines étiologies (comme les causes toxiques ou infectieuses) reposent sur un faisceau d'arguments cliniques et non sur un diagnostic clinique, biologique ou radiologique,
- 3- ou l'origine reste encore inconnue à ce jour et ne peut donc être recherchée.

A l'heure actuelle, il est convenu de distinguer les causes de DI selon 2 grands groupes : les étiologies acquises et les étiologies génétiques.

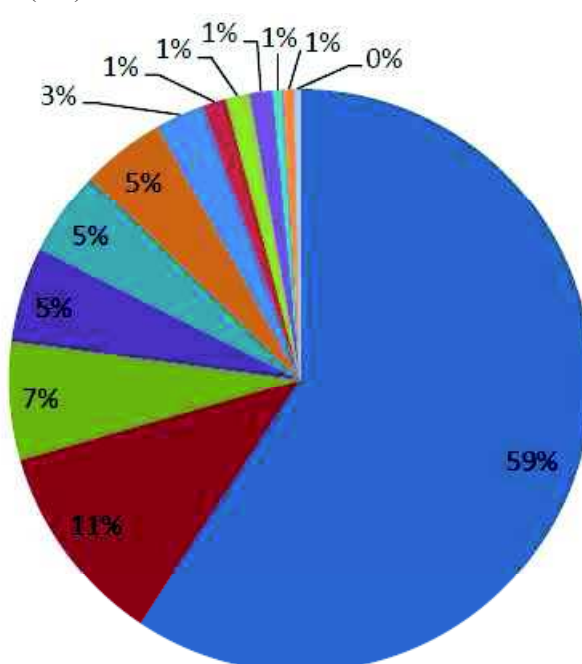
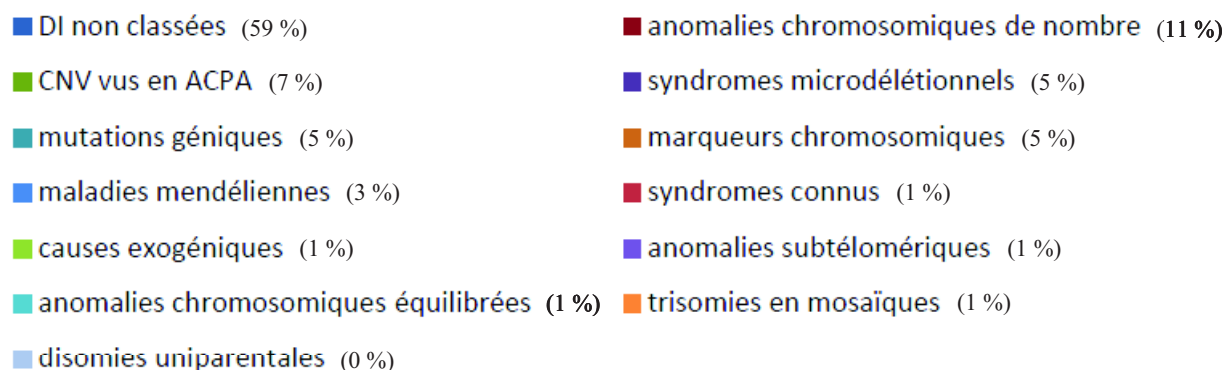


Figure 1 : Les étiologies de la déficience intellectuelle et leurs fréquences (%), (d'après Rauch A, et al. 2006)

1.5.1 Les étiologies acquises

On note une grande variabilité, de 1 à 20 % selon les études dans la fréquence des étiologies acquises (Curry CJ, et al. 1997 ; van Karnebeek CD, et al. 2005 ; Rauch A, et al. 2006). Ceci s'explique par des critères différents de classement dans le groupe des étiologies environnementales en fonction des études et par le fait que certaines étiologies ont une prévalence variant en fonction de l'origine géographique (Keren B. 2013).

Dans le contexte des causes acquises, la DI fait suite à une atteinte cérébrale lors d'un stade critique du développement en période prénatale ou en postnatale. Cette atteinte est alors irréversible et peut être d'origine toxique (comme l'alcoolisme fœtal ou autres drogues...), infectieuse (comme la rubéole, la toxoplasmose...) ou traumatique (comme une hémorragie cérébrale, une ischémie, une lésion...).

1.5.2 Les étiologies génétiques

Le groupe des étiologies génétiques est le plus important avec une fréquence d'au moins 40 % tout en sachant que les études sont anciennes (van Karnebeek CD, et al. 2005 ; Rauch A, et al. 2006) et que de nouvelles causes monogéniques ont été découvertes depuis. Ainsi, l'analyse par puces à ADN (ACPA), technique de diagnostic utilisée en routine devant une DI inexplicée, a permis d'expliquer 5 à 20 % des DI d'origine jusqu'alors inconnue (Stankiewicz P, Beaudet AL. 2007 ; Keren B, et al. 2010 ; Shoukier M, et al. 2013).

Il existe 2 grands sous-groupes d'étiologies génétiques : géniques et chromosomiques. Cependant, il faut noter que certaines anomalies génétiques peuvent être retrouvées dans la population générale et chez les patients avec une DI (mais chez ces derniers avec une fréquence supérieure). Ces facteurs, dits de susceptibilité, favorisent donc la DI mais ne l'expliquent pas complètement (Gregor A, et al. 2011).

- Les étiologies géniques :

Dès les années 1940, Martin JP et Bell J. décrivent des DI familiales avec une transmission mendélienne, notamment récessive liée au chromosome X (Martin JP, Bell J. 1943). Dès lors, des étiologies géniques ont été définies comme correspondant à des mutations ponctuelles de certains gènes. Leur diagnostic se fait donc par des techniques de biologie moléculaire, notamment par la technique de séquençage. Leur mode de transmission est autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X. De nombreux gènes sont identifiés comme responsables de l'atteinte et leurs mécanismes physiologiques sont variables : gène d'une voie métabolique, facteur de transcription ou de régulation, gène de fonctionnement synaptique... (Keren B. 2013). Par ailleurs, le nombre d'étiologies est en perpétuelle augmentation avec le développement des nouvelles technologies comme le séquençage haut débit (NGS ou New Generation Sequencing), (Tarpey PS, et al. 2009 ; Kaufman L, et al. 2010 ; van Bokhoven H. 2011 ; de Ligt J, et al. 2012). Ces gènes ne concernent que très peu de familles voire une seule ; il est donc difficile d'en faire une revue (Vissers LE, et al. 2010 ; Rauch A, et al. 2012).

- Les étiologies chromosomiques :

Les causes chromosomiques dans la DI ont été les premières identifiées dès les années 1950 et 1960. Leur fréquence est de 20 % environ et les techniques de diagnostic sont la cytogénétique classique avec le caryotype et la cytogénétique moléculaire avec l'hybridation *in situ* et l'ACPA (Keren B. 2013).

Les diverses anomalies chromosomiques pouvant expliquer la DI isolée ou syndromique se manifestent principalement par des déséquilibres, soit de chromosomes entiers (anomalie de nombre), soit de région chromosomique (anomalie de structure avec des microdélétions et des microduplications voire des triplications...). Le développement de la cytogénétique (cf. § 2 de l'introduction) a permis d'améliorer les diagnostics de DI chromosomique. Cependant, certains cas de DI sont associés à des remaniements chromosomiques apparemment équilibrés et posent des problèmes d'interprétation physiopathogénique (cf. § 2.3 de l'introduction).

2- ÉVOLUTION DES TECHNIQUES MISES EN ŒUVRE EN CYTOGÉNÉTIQUE ET LEUR APPORT DANS LA DI

2.1 Développements techniques

La découverte des chromosomes a conduit à leur étude et au développement d'une nouvelle discipline : la Cytogénétique. Selon TC Hsu (Hsu TC. 1979), la Cytogénétique est née avec le vingtième siècle et son histoire est subdivisée 4 périodes. Chacune de ces périodes a marqué une évolution dans les techniques permettant de plus en plus de diagnostics d'anomalies cytogénétiques.

La cytogénétique débute dans les années 60 avec la détermination du caryotype humain constitué de 46 chromosomes (Tjio JH, Levan A. 1956). Ont suivi de nombreuses découvertes concernant la structure et la transmission des chromosomes, ainsi que la mise en évidence des principales anomalies chromosomiques s'appuyant sur des techniques cytologiques d'identification des chromosomes avec le développement des bandes Q (Caspersson T, et al. 1971), des bandes C (Pathak S, Arrighi FE. 1973), des bandes G puis des bandes R que l'on doit à Dutrillaux et Lejeune (Dutrillaux B, et al. 1972) et des bandes T (Dutrillaux B. 1973).

Cependant, ces approches ne permettaient pas d'expliquer le phénotype de la plupart des patients. Ainsi, des techniques de plus en plus résolutive ont été développées depuis les années 1980. Dans un premier temps, les cytogénéticiens ont cherché à augmenter la résolution du banding en augmentant le nombre de bandes observées permettant ainsi d'améliorer la définition cytogénétique de chaque chromosome, le but étant alors d'identifier de nouvelles causes et donc d'établir d'éventuelles relations génotype-phénotype à l'aide de résolutions de plus en plus fines (cf. Figure 2), (Yunis JJ, Chandler ME. 1978).

Cependant, le niveau de résolution restant de l'ordre de 2 à 5 Mégabases (Mb), certaines anomalies ne pouvaient pas encore être détectées.

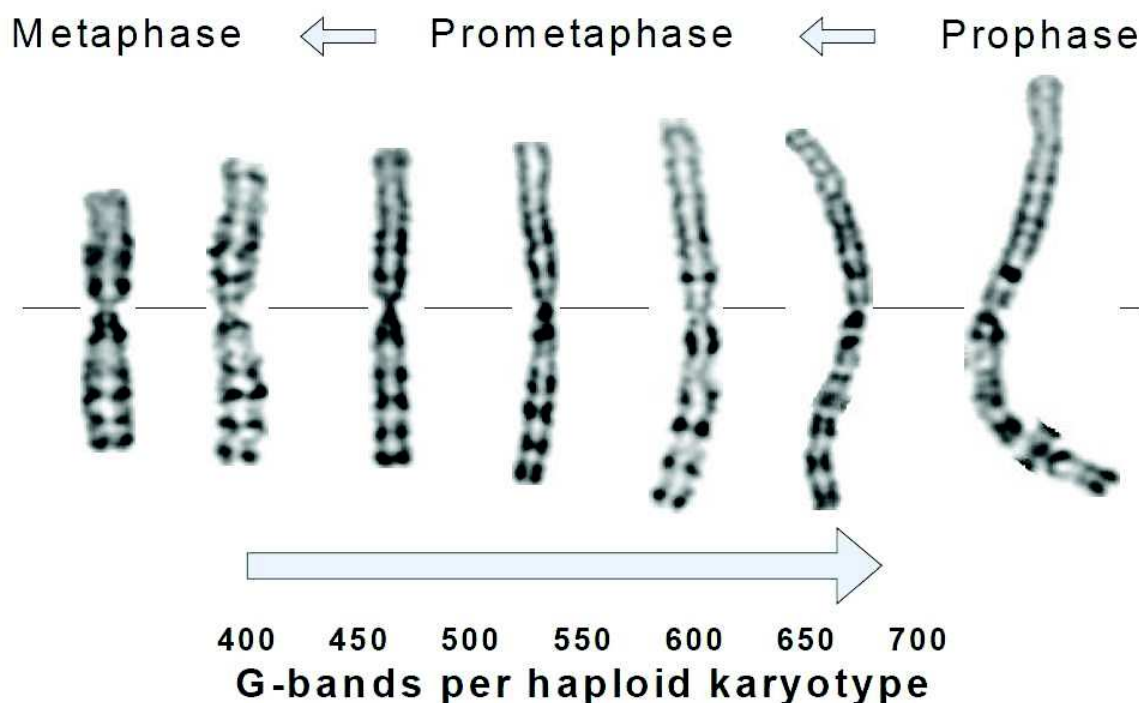


Figure 2 : Les différents niveaux de résolution en Cytogénétique Classique (exemple du chromosome 1 marqué en bandes G), (W. Sethakulvichai, 2012)

Aussi, parallèlement et en complément de la cytogénétique dite « classique » (correspondant aux bandes), s'est développé un nouveau domaine : celui de la cytogénétique moléculaire. Celle-ci regroupe un ensemble de techniques nées de la combinaison de la biologie moléculaire à la cytogénétique classique. Basées sur les travaux de 1969 de Gall et Pardue qui utilisaient des radio-isotopes pour la localisation de séquences uniques (Gall JG, Pardue ML. 1969), de nouvelles techniques de détection non radio-active des chromosomes ont vu le jour dans les années 80. Ainsi, de nombreuses techniques de marquage ont été développées, en

utilisant dans un premier temps des procédés chimiques (Dale RM, Ward DC. 1975 ; Poirier MC et al. 1977 ; Hayatsu H, et al. 1970 ; Brown HS, Shapiro R, 1977), puis par l'incorporation par voie enzymatique (Nick Translation) des nucléotides biotinylés dans des séquences d'ADN ou d'Acide RiboNucléique (ARN), (Langer PR, et al. 1981). Ces sondes, dites « froides » par opposition aux sondes radioactives dites « chaudes », peuvent être révélées en fluorescence, après hybridation, par réaction immunologique (ex : système avidine-biotine) ou directement si elles sont marquées par un nucléotide directement couplé à un fluorochrome. Les sondes utilisées sont des séquences d'ADN spécifiques, uniques ou répétées de petite taille introduites dans un plasmide. La commercialisation de nucléotides marqués a permis l'essor de l'hybridation *in situ* non radioactive, soit l'Hybridation Fluorescente *In Situ* ou FISH, premier outil développé dans le cadre de la cytogénétique moléculaire en routine (Pinkel D, et al. 1986). Alliant les techniques de cytogénétique classique et de biologie moléculaire, la FISH permet une visualisation métaphasique ou interphasique des sondes marquées. De ce fait, elle augmente de façon importante la spécificité et la sensibilité de l'examen cytogénétique.

Différents types de sondes sont utilisés comme les peintures chromosomiques (qui marquent entièrement les chromosomes), les sondes commerciales *locus*-spécifique de syndromes microdélétionnels connus et non visibles sur le caryotype en bandes (ex : syndrome de DiGeorge / VéloCardioFacial Syndrome dû à une microdélétion 22q11.2), les sondes subtélomériques (car de nombreux remaniements impliquant les extrémités des chromosomes sont responsables de phénotypes anormaux - Adeyinka A, et al. 2005) et les sondes fabriquées (Bacterial Artificial Chromosome - BAC, Plasmid Artificial Chromosome - PAC) dans le laboratoire dans le cadre de la recherche (spécifiques et mono-*locus*). Les différents types de sondes sont représentés sur la figure 3 ci-dessous.

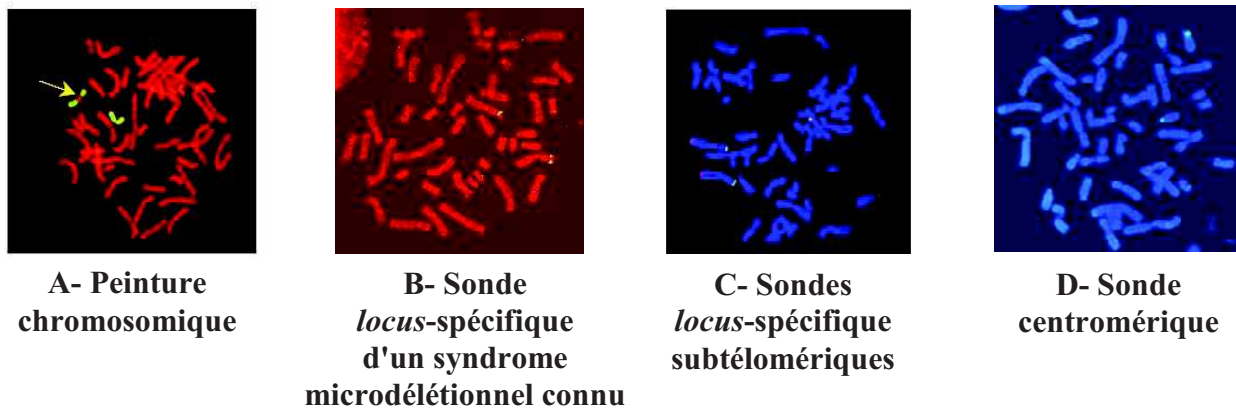


Figure 3 : Les différents types de sondes utilisées pour les techniques de FISH

A- Peinture chromosomique avec un marquage à la biotine, une détection par immunofluorescence directe par FITC* et l'utilisation de l'iodure de propidium comme contre-colorant.

B- Sonde *locus*-spécifique avec un marquage à la biotine, une détection par immunofluorescence indirecte par FITC* et l'utilisation de l'iodure de propidium comme contre-colorant.

C- Sondes *locus*-spécifique subtélomériques avec un marquage direct par FITC*/TR** et l'utilisation du DAPI*** comme contre-colorant.

D- Sonde *locus*-spécifique centromérique avec un marquage direct par FITC* l'utilisation du DAPI*** comme contre-colorant.

* FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

** TR : Texas Red

*** DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole

Compte tenu des nombreux avantages des sondes froides (grande stabilité, haut pouvoir de résolution, rapidité de détection, possibilité de marquages multiples non radiotoxiques...), la FISH et ses variantes sont devenues des méthodes d'exploration du génome largement employées aussi bien dans les laboratoires de recherche qu'en routine. Cependant, leur limite est qu'elles ne permettent pas une étude globale du génome mais une étude ciblée de régions chromosomiques, orientée par la clinique.

De ce fait, des techniques permettant une étude pangénomique ont été développées. Dès 1992, l'Hybridation Génomique Comparative (CGH), technique présentée par l'équipe de Kallioniemi (Kallioniemi A, et al. 1992), a été le premier outil de cytogénétique moléculaire permettant une analyse globale du génome. Dépistant directement à partir de l'ADN marqué du patient des déséquilibres génomiques existant, la CGH s'avère une méthode de choix pour la recherche globale de déséquilibres génomiques. Cette technique a été développée dans un premier temps dans le cadre des tumeurs solides. Mais dès le départ, les auteurs y ont vu un intérêt aussi pour la détection et donc l'identification de déséquilibres génomiques lors de signes échographiques en prénatal ou de syndromes malformatifs en postnatal (Houldsworth J, Chaganti RS. 1994). Ainsi, elle est devenue l'une des techniques les plus accessibles de criblage du génome, permettant la détection, la quantification et la localisation chromosomique des déséquilibres par excès ou par défaut (Sanlaville D, et al. 1999).

L'inconvénient majeur de cette technique est le niveau de résolution qui est similaire à celui du caryotype soit de 5 à 10 Mb. De ce fait, l'amélioration s'est réalisée principalement en changeant les cibles d'hybridation. Dans un premier temps, pour augmenter la résolution sur les chromosomes, il a été proposé de remplacer les chromosomes par des fibres d'ADN étirées comme support d'hybridation (Kraus J, et al. 1997).

Puis, la technologie des puces à ADN a été mise en place. Elle repose sur l'hybridation de molécules fixées sur un support solide avec une sonde marquée préparée à partir de l'ADN génomique ou de l'ARN (cDNA - complementary DesoxyriboNucleic Acid) d'un échantillon biologique. La puce à ADN ou la CGH-array est donc une amélioration technique de la CGH chromosome spécifique *via* des réseaux de marqueurs d'ADN clonés fixés. Les chromosomes ont donc cédé leurs places aux clones d'ADN dont la résolution a augmenté au fur et à mesure des années avec les progrès techniques (clones génomiques type BAC, Yeast Artificial Chromosome (YAC) ou cosmides puis Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) et séquences d'oligonucléotides). De ce fait, la résolution génomique obtenue est déterminée par la densité des sondes et la distance génomique les séparant ou par la longueur des segments d'ADN cloné (Pinkel D, et al. 1998). Il ne s'agit plus de quantifier les déséquilibres au niveau cytogénétique (quelques mégabases), mais au niveau moléculaire. Ainsi, la résolution des puces est passée du niveau BAC/PAC (taille de 1Mb à quelques centaines de kilobases - kb) à celui des oligonucléotidiques qui permettent un niveau de résolution de quelques kilobases à quelques centaines de bases sur la presque totalité du génome avec une densification accrue du nombre de sondes dans les régions codantes du génome (cf. Figure 4), (Barrett MT, et al. 2004). Par ailleurs, des puces contenant des sondes SNP ont été développées afin de rechercher des pertes d'hétérozygotie responsables de disomies et de réaliser des analyses de liaison et des études d'associations (Komura D, et al. 2006). Par ailleurs, en fonction du nombre et de la localisation des fragments d'ADN positionnés sur les lames, une puce peut être pangénomique si les sondes recouvrent l'ensemble du génome ou pansyndromes microdélétionnels si les fragments d'ADN couvrent toutes les régions où des syndromes microdélétionnels ont été décrits (Andrieux J. 2008). Cependant, l'ensemble de ces techniques, aussi résolutive soient elles, ne permettent pas d'expliquer tous les phénotypes observés. En effet, leur approche limite le champ d'investigation à celui de la recherche uniquement de causes chromosomiques en excluant les origines cliniques.

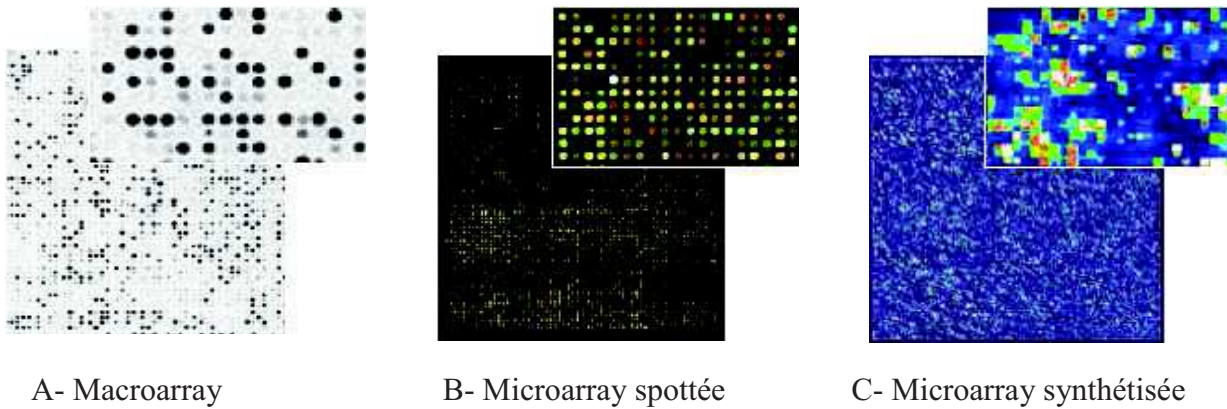


Figure 4 : Les différents types de puces à ADN

A- Macroarray : support : membrane de nylon ; taille des spots : 0,5-1mm ; densité : quelques centaines de spots/cm² (centimètre carré) ; sondes : produits de PCR (Polymerase Chain Reaction) ; cibles : cDNA avec marquage radioactif au ³²P ; principales applications : analyse de l'expression des gènes

B- Microarray spotted : support : lame de verre à revêtement chimique ; taille des spots : ~100µm ; densité : 1000-10000 spots/cm² ; sondes : BAC, PAC, produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers) ; cibles : ADN, cDNA ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5 ; principales applications : expression, ChIP-on-Chip, CGH-array

C- Microarray synthétisée : support : lame de verre à revêtement chimique ; taille des spots : ~20µm ; densité : jusque 250000 spots/cm² ; sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés *in situ* ; cibles : ADN, cDNA ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine ; principales applications : expression, détection de marqueurs moléculaires, CGH-array, pseudoCGH-array

Afin d'augmenter le seuil de résolution des analyses de génétique, diverses techniques ont été développées fondées sur la découverte par Watson et Crick que l'ADN était la molécule porteuse du code génétique. Depuis leurs travaux, de nombreuses équipes scientifiques ont tenté de découvrir les mystères de l'ADN. Leur espoir était le suivant : si le code génétique pouvait être séquencé, les origines de la vie elle-même pourraient être révélées. Dans ce but, les efforts des différentes équipes ont permis de révolutionner le domaine de la biologie, en ce qui concerne la détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné, à savoir le séquençage de l'ADN (Zhang J, et al. 2011). Ainsi, dès la moitié des années 70, deux méthodes pour le séquençage de l'ADN ont été développées : l'une par Walter Gilbert et ses collaborateurs (Etats-Unis) basée sur la dégradation chimique sélective (Maxam AM, Gilbert W. 1977) et l'autre par l'équipe de Frederick Sanger (Royaume-Uni) basée sur une synthèse enzymatique (Sanger F, et al. 1977). La technologie de Sanger a connu de grandes avancées durant les années qui ont suivi (Zhang J, et al. 2011) ; cependant, afin de séquencer des séquences plus longues d'ADN, une nouvelle approche, appelée séquençage aléatoire, a été développée au cours du projet de séquençage du génome humain entier. Dans cette technique, l'ADN génomique est, par enzyme ou par un processus mécanique, coupé en petits fragments qui sont clonés dans un vecteur de séquençage, ces fragments pouvant être alors séquencés individuellement. La séquence complète d'un long fragment d'ADN peut être

éventuellement produite par ces méthodes. L'alignement et le réassemblage de fragments de séquence se font à l'aide de la séquence partielle chevauchante (Zhang J, et al. 2011). Ce type de séquençage, dit aléatoire, a eu un avantage significatif lors du projet de séquençage du génome humain entier qui a, de ce fait, été rendu possible. Ainsi, cette technique est la base du séquençage haut débit ou Next-Generation Sequencing (NGS), (Venter JC, et al. 2003). Depuis ce projet, selon Shendure J et Ji H (Shendure J, Ji H. 2008), trois autres étapes ont permis le développement du NGS :

- 1- la disponibilité de nombreux génomes entiers de l'Homme et de tous les grands organismes modèles, en offrant une référence à laquelle de courtes lectures peuvent être cartographiées,
- 2- le développement d'un grand nombre de méthodes moléculaires : des phénomènes biologiques, comme les variations épigénétiques, l'expression des gènes, les interactions ADN-protéines, la conformation des chromosomes, ont pu alors être expliqués grâce au séquençage à haut débit de l'ADN,
- 3- et, le progrès général de la technologie dans tous les domaines aussi bien dans le domaine de la microscopie que celui de la chimie de surface, des nucléotides, des polymérase, du calcul ou encore du stockage de données qui ont été des stratégies alternatives pour le développement du séquençage haut débit de l'ADN (cf. Figure 5).



LEGENDE :

- * Séquençage par semiconducteur
- * Séquençage par Electrophorèse Capillaire et analyse des fragments
- * NGS
- * Séquençage épigénétique
- * Séquençage des ARN et transcriptome

Figure 5 : Chronologie récapitulative des technologies développées pour le séquençage de l'ADN

Ainsi, le séquençage haut débit trouve des applications aussi bien en cancérologie / hématologie oncologique (qui ont été les premiers champs d'application, Roukos DH. 2010),

que pour le diagnostic prénatal (Papasavva T, et al. 2013) et postnatal, même si l'interprétation peut être difficile (Roukos DH. 2010).

Ces développements technologiques ont eu pour conséquences des avancées considérables tant sur le plan médical que sur le plan scientifique, qui sont très liés l'un à l'autre dans le domaine de la génétique.

2.2 Développements scientifiques

L'analyse cytogénétique et moléculaire des remaniements génétiques observés chez des patients présentant des phénotypes anormaux a suscité de nombreuses questions sur l'étiologie et les mécanismes intervenant dans le développement de ces pathologies.

Aussi ont été développés de nombreux programmes de recherche portant sur la mécanique chromosomique, la ségrégation des chromosomes, ainsi que sur les composants cellulaires de cette ségrégation et le rôle de la topologie nucléaire des territoires chromosomiques. Ainsi, le développement du secteur de la cytogénétique des gamètes (Rudak E, et al. 1978) et des embryons humains (Munné S, et al. 1994) a permis de mieux comprendre les mécanismes de formation et de transmission des anomalies de nombre et de structure des chromosomes ainsi que leur étiologie. De ce fait, des phénomènes comme l'effet interchromosomique (Pellestor F, et al. 2011), la séparation des chromatides sœurs au cours de la méiose (Angell RR. 1991) ou encore les phénomènes de fusion télomérique ou de pertes anaphasiques (Munné S, et al. 1998) ont pu être étudiés directement au niveau des gamètes.

Plus récemment, des approches *in situ* ou *in vivo* en 3 dimensions ont permis de mieux comprendre le rôle majeur de la disposition des chromosomes au sein des noyaux et les interactions qui s'opèrent entre des entités structurales tout au long du cycle cellulaire (Esa A, et al. 2000). La notion de mobilité des territoires chromosomiques est aujourd'hui un paramètre important pris en compte dans l'étude des phénomènes de réplication ou de transcription, ainsi que pour la genèse des remaniements chromosomiques complexes (Dion V, Gasser SM. 2013 ; Bickmore WA, van Steensel B. 2013).

2.3 Développements médicaux

Désormais, les puces à ADN sont devenues les techniques de prédilection lors de l'enquête étiologique chez les patients présentant un phénotype anormal. Malgré tout, le caryotype reste encore prescrit en première intention chez de nombreux patients et permet alors la découverte de remaniements apparemment équilibrés, notamment des translocations. Ces réarrangements chromosomiques sont des remaniements caractérisés par l'échange réciproque de fragments chromosomiques entre des chromosomes non homologues, c'est-à-dire n'appartenant pas à la même paire de chromosomes (cf. Figure 6).

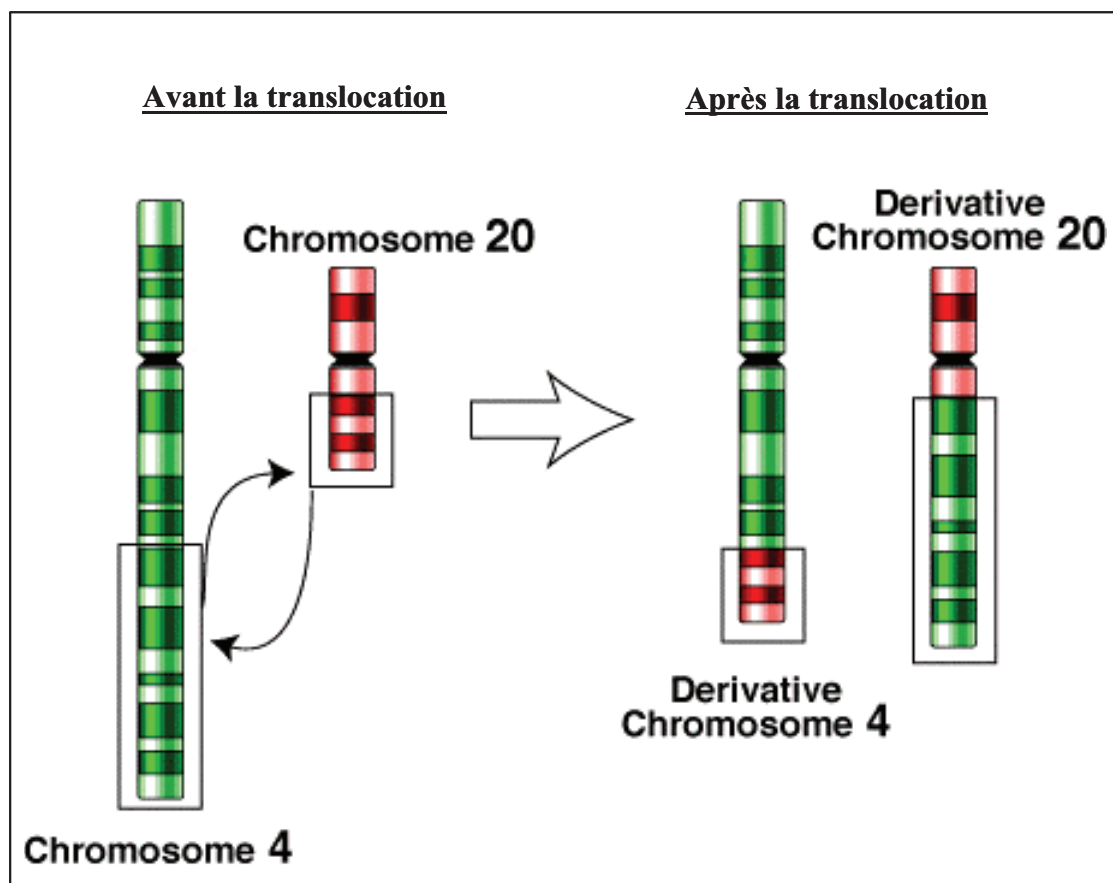


Figure 6 : Principe des translocations réciproques : cassure et échange de segments chromosomiques entre 2 chromosomes non homologues

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/30/Translocation.gif>

Ces observations sont retrouvées aussi bien chez des patients sans phénotype anormal que chez des patients avec une DI isolée ou syndromique. Chez ces derniers, qui représentent 6 % des personnes porteuses d'une translocation *de novo* apparemment équilibrée (Warburton D. 1991), différentes hypothèses pourraient expliquer leur phénotype :

- Micro-remaniement déséquilibré identifié par l'utilisation de techniques plus résolutive,
- Formation d'un gène de fusion,
- Effet de position,
- Modification d'une région soumise à une empreinte parentale,
- Interruption d'un gène au niveau d'un ou des deux points de cassure,
- Mutation génique sans rapport avec la translocation,
- Cause non génétique.

2.3.1 Micro-remaniement déséquilibré identifié par l'utilisation de techniques plus résolutive

Le développement de la FISH et de la CGH a permis de diagnostiquer des déséquilibres cryptiques associés à des réarrangements apparemment équilibrés chez des patients à phénotype anormal. Ainsi l'équipe de Gregori M décrit une délétion chez 40 % des patients ayant une translocation réciproque (de Gregori M, et al. 2007), donnée similaire à celles rapportées par les équipes de Gribble SM (Gribble SM, et al. 2005) et de Ciccone R (Ciccone R, et al. 2005). Par la suite, d'autres équipes rapportent sur des cohortes de patients à phénotype anormal des anomalies localisées dans différentes régions chromosomiques et associées à des remaniements chromosomiques. Ainsi, en 2009, l'équipe de Schluth-Bolard C observe des déséquilibres chez 16 patients parmi 33 avec une DI et/ou des malformations congénitales multiples présentant un remaniement apparemment équilibré ; parmi les 16 patients, 7 ont une délétion en dehors des points de cassure, 8 ont une délétion au niveau d'un point de cassure et un présente deux délétions (l'une au niveau d'un point de cassure et l'autre en dehors des points de cassure), (Schluth-Bolard C, et al. 2009).

2.3.2 Formation d'un gène de fusion

De nombreux cas de translocations responsables de la formation de gènes de fusion ont été décrits dans la littérature. D'une manière générale, les conséquences fonctionnelles de la formation d'un gène de fusion sont une modification de la régulation transcriptionnelle ou l'activation d'une kinase constitutive comme dans l'exemple le plus connu du « chromosome

de Philadelphie », observé principalement dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique. Il s'agit du dérivé 22 d'une translocation réciproque entre un chromosome 9 et un chromosome 22, qui aboutit à la création du gène de fusion *BCR-ABL* (breakpoint cluster region - abelson). Ce sont Peter Nowell (Université de Pennsylvanie) et David Hungerford (Fox Chase Cancer Center's Institute for Cancer Research) qui ont décrit pour la 1^{ère} fois cette fusion en 1960. Janet D Rowlet en identifia les mécanismes en 1973 comme le précise Randolph TR, lors de sa revue sur la leucémie myéloïde chronique (Randolph TR. 2005). Depuis, d'autres gènes de fusion ont été rapportés dans la littérature comme la formation du gène de fusion *FKHR-PAX3* ou *FOXO1A* (forkhead box O1) - *PAX3* (paired box 3) observé dans le rhabdomyosarcome alvéolaire (Hu Q, et al. 2013).

Même si ces gènes de fusion sont principalement décrits dans le cadre de l'oncologie ou de l'onco-hématologie, certains cas sont aussi rapportés en cytogénétique constitutionnelle. Ainsi, l'équipe de di Gregorio E relate la formation d'un gène de fusion *PTK2-THOC2* (protein tyrosine kinase 2 - THO complex 2) chez une petite fille porteuse d'une forme non-progressive de l'ataxie congénitale, des troubles cognitifs et une hypoplasie cérébelleuse associés à une translocation *de novo* t(X;8), (di Gregorio E, et al. 2013).

2.3.3 Effet de position

En 1998, Kleinjan et van Heyningen (Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998) décrivent trois catégories de facteurs régulant l'expression d'un gène : (i) une région promotrice (promoter) ; (ii) un système « enhancer/silencer » ; et (iii) un environnement chromatinien favorable au *locus* du gène. En effet, un environnement chromatinien « permissif » est nécessaire pour une bonne action du couple « enhancer/promoter », l'enhancer activant le promoteur responsable de la lecture du gène. Ainsi, l'expression d'un gène peut être influencée par sa position dans le génome avec des régions hétérochromatiques étroitement enroulées et des régions euchromatiques plus accessibles. En 1998, Kleinjan et van Heyningen rapportent que les réarrangements chromosomiques peuvent conduire à des altérations dans l'environnement chromatinien des gènes et donc être responsables d'un changement dans l'expression de ces gènes par un effet de position (cf. Figure 7), (Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer ces modifications :

- (i) Le point de cassure peut être situé entre le gène et sa région promotrice.
- (ii) Le réarrangement pourrait séparer l'unité de transcription / promoteur d'un élément régulateur situé à distance, ce qui pourrait entraîner une sur-expression ou une sous-

expression dans les tissus impliqués par cette dérégulation. Ainsi, l'équipe de Velagaleti GV décrit en 2005 un effet de position dû à des points de cassure localisés à distance du *locus* de *SOX9* (SRY (sex determining region Y)-box 9), (Velagaleti GV, et al. 2005) ;

(iii) Le réarrangement pourrait juxtaposer au gène un élément régulateur d'un autre gène ce qui impliquerait une expression inappropriée du gène - ce mécanisme est souvent observé dans les processus cancéreux comme dans le lymphome de Burkitt (Joos S, et al. 1992) ;

(iv) Le réarrangement pourrait être responsable d'une compétition dans l'expression de gènes placés l'un à côté de l'autre avec les éléments régulateurs de l'un des deux ;

Et enfin, (v) le réarrangement pourrait être responsable d'une variabilité dans l'expression des gènes (ou position effect variegation - PEV). Le remaniement place le gène dans un environnement hétérochromatinien qui peut induire une diminution ou un arrêt de l'expression du gène déplacé. Le phénomène de PEV a d'abord été décrit chez la drosophile (Schultz J. 1936) puis chez la levure (Karpen GH. 1994) et enfin par l'équipe de Milot dans le système mammifère en 1996 (Milot E, et al. 1996).

Par ailleurs, un autre mécanisme a été décrit en 2003 par l'équipe de Tufarelli C : le réarrangement pourrait jouer sur le système « antisens-mediated cis-acting methylation » qui utilise de l'ARN non codant (Tufarelli C, et al. 2003).

En 2009, un nouveau mécanisme est rapporté par Benko S et ses collaborateurs concernant la régulation de l'expression de *SOX9*. En effet, ils ont étudié 3 familles présentant une séquence isolée de Pierre Robin autosomique dominante ségrégeant avec une translocation *de novo* apparemment équilibrée avec un point de cassure dans une région de 160kb en 17q24. Cette région, localisée à plus de 1Mb du gène *SOX9*, correspondait à un désert génique et contenant plus de 200 éléments non codants hautement conservés. Grâce à des études fonctionnelles, ils ont pu conclure que cette partie du génome jouait un rôle critique dans la régulation de l'expression de *SOX9* (Benko S, et al. 2009).

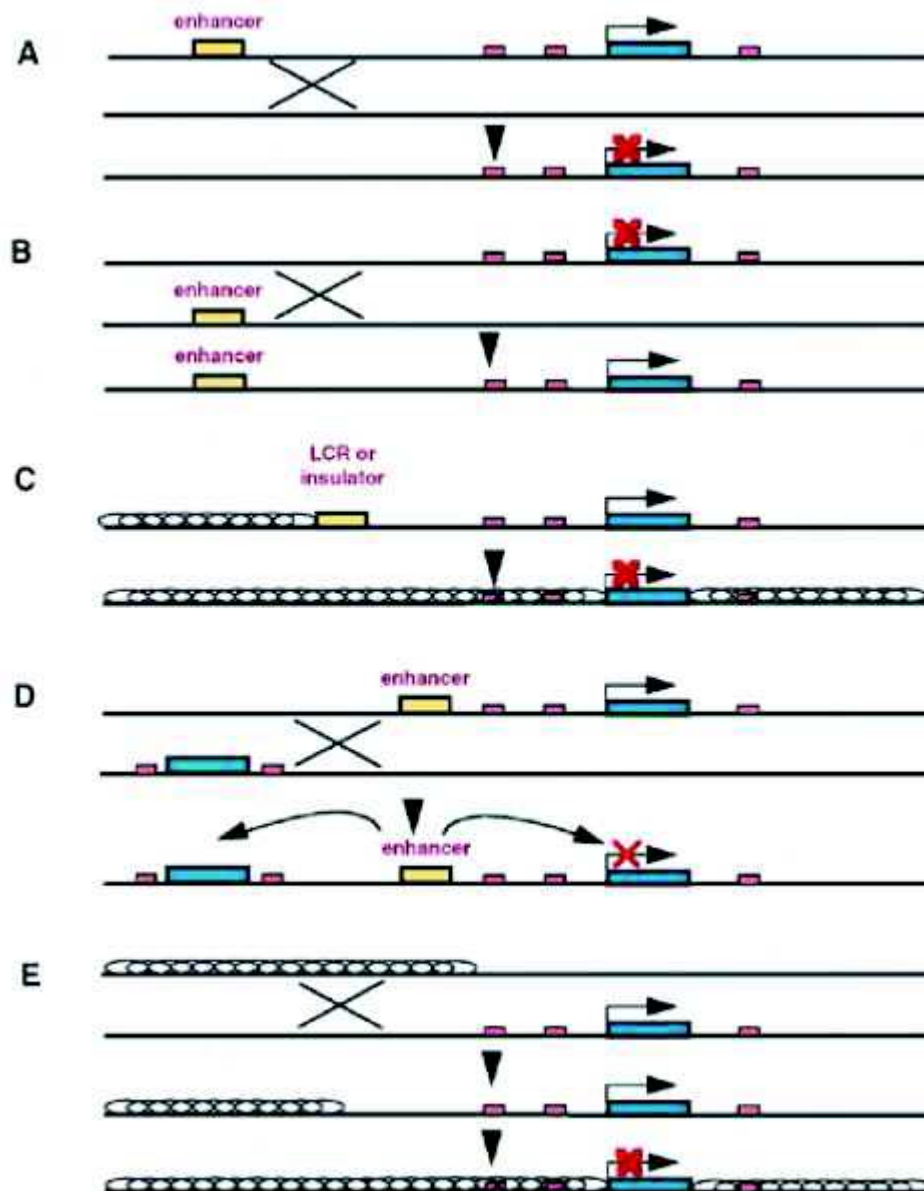


Figure 7 : Effet de position

Les mécanismes possibles pouvant conduire à un effet de position : (Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998)

A- Le réarrangement chromosomique sépare l'unité promoteur / transcription d'un élément régulateur agissant en cis lointain. La suppression d'un élément enhancer entraînera un silencing complet ou partiel de l'allèle affecté. A l'inverse, si un élément de silencing est retiré, l'activation inappropriée de l'allèle peut se produire.

B- La juxtaposition du gène avec un élément enhancer provenant d'un autre gène peut également conduire à l'expression inappropriée du gène.

C- L'élimination d'un isolateur à long terme ou élément régulateur peut conduire à une faible expression du *locus* voire à l'absence d'expression. L'absence d'un LCR (Low Copy Repeats) entraîne l'inactivation par une combinaison des mécanismes (A) et (C).

D- Enhancer concurrence : Un gène au niveau du point de cassure d'une translocation est en concurrence avec un gène responsable de la maladie pour interagir avec l'élément ou les éléments de régulation, ce qui réduit le niveau d'expression du gène responsable de la maladie.

E- PEV : Le PEV peut se produire quand un réarrangement chromosomique entraîne la juxtaposition d'un gène donc une région euchromatique avec une région d'hétérochromatine. L'organisation de la région d'hétérochromatine influence l'organisation de l'ADN dans la région euchromatique juxtaposée, ce qui induit un effet « silence » pour le gène voisin.

2.3.4 Modification d'une région soumise à une empreinte parentale

Parmi l'ensemble des gènes du génome humain, certains sont dits « soumis à empreinte » ; c'est-à-dire, que leur activité est différente pour les deux copies, selon leur origine (maternelle ou paternelle). Ainsi, afin d'avoir un phénotype considéré comme normal, il est nécessaire d'avoir une combinaison biparentale pour certains chromosomes, voire pour certaines régions chromosomiques. Lorsque ces chromosomes (ou ces régions) d'une même paire proviennent d'un seul parent, on parle alors de disomie uniparentale (Engel E. 1980).

L'un des exemples les plus décrits dans la littérature est celui des syndromes de Prader-Willi (PWS) / Angelman (AS) pour lesquels les anomalies responsables sont situées au niveau de la région 15q11q13 des bras longs du chromosome 15. Le PWS a pour origine une perte de l'expression de l'allèle paternel tandis que celle de l'AS est une perte de l'expression de l'allèle maternel quel que soit le mécanisme. En ce qui concerne le PWS, plusieurs causes peuvent l'expliquer dont les plus connues sont une microdélétion de la région 15q11q13 du chromosome paternel dans 70 % des cas (Ledbetter DH, et al. 1981 ; Butler MG. 1990), une disomie uniparentale d'origine maternelle chez 25 % des patients (Mascari MJ, et al. 1992), et aussi des mutations affectant le mécanisme de l'empreinte responsable d'une méthylation maternelle de l'allèle paternel (Saitoh S, et al. 1996). Quelques articles rapportent des enfants avec un phénotype de PWS atypique et porteurs d'une translocation apparemment équilibrée impliquant la région 15q11q13. Ainsi, l'équipe de Conroy JM décrit un patient présentant un phénotype de PWS atypique et une translocation réciproque apparemment équilibrée $t(2;15)(q37.2;q11.2)$ dont le point de cassure est localisé entre le centre d'empreinte et le gène *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein, polypeptide N, considéré comme responsable du PWS s'il n'est pas exprimé) ; ceci a pour conséquence la modification de l'expression du gène *SNRPN* et donc des signes cliniques chez l'enfant (Conroy JM, et al. 1997).

2.3.5 Interruption d'un gène au niveau d'un ou des deux points de cassure

L'une des hypothèses lors de la présence d'un remaniement apparemment équilibré chez un patient porteur de signes cliniques est aussi l'altération d'un gène par son interruption au niveau d'un ou des points de cassure. Depuis de nombreuses années, plusieurs articles sont parus associant ainsi des gènes interrompus à des signes cliniques. Par exemple, l'équipe de Tegay DH décrit en 2009 l'interruption du gène *SATB2* (SATB homeobox 2) chez un patient présentant un syndrome de Toriello-Carey (Tegay DH, et al. 2009) ; l'équipe de Panza E

identifie une interruption du gène *AKAP2* (A kinase anchor protein 2) chez un patient atteint d'un syndrome de Kallmann associé à des malformations osseuses et porteur d'une translocation apparemment équilibrée t(7;9), (Panza E, et al. 2007) ; l'équipe de Kleefstra T présente *EHMT1* (Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 1) comme gène candidat du Syndrome de Kleefstra à la suite d'une translocation apparemment équilibrée t(X;9) chez une femme atteinte (Kleefstra T, et al. 2006).

De plus, l'interruption d'un gène peut révéler une maladie dont le mode de transmission est récessif. Le mécanisme pourrait être :

- (i) Un des 2 allèles serait interrompu par un remaniement chromosomique et l'autre serait muté comme le décrit l'équipe de Ren CM à propos d'un patient autiste porteur d'une translocation interrompant un allèle du gène *ZNF407* (zinc finger protein 407) et d'une mutation de l'autre allèle de ce gène (Ren CM, et al. 2013) ;
- (ii) Les 2 allèles sont interrompus par une translocation réciproque homozygote comme le rapportent Baala L et ses collaborateurs chez 4 patients présentant une microcéphalie associée à une polymicrogyrie et porteurs d'une translocation t(3;10) homozygote interrompant le gène *EOMES* (eomesodermin), (Baala L, et al. 2007).

2.3.6 Mutation génique sans rapport avec la translocation

Dans un premier temps, comme le suggère Schluth-Bolard C en 2009 (Schluth-Bolard C, et al. 2009), on ne peut exclure une association fortuite entre un remaniement chromosomique apparemment équilibré et un phénotype anormal ayant une autre étiologie génétique.

Dans ce contexte d'une éventuelle cause génique au phénotype de l'enfant, une consultation en génétique est indiquée en première intention pour orienter la recherche étiologique et éliminer une cause monogénique évidente. Par ailleurs, l'avènement du NGS pourrait permettre une analyse non seulement des points de cassure des remaniements apparemment équilibrés mais aussi la recherche de mutation, notamment dans les gènes connus de la DI.

2.3.7 Cause non génétique

Enfin, l'explication d'une DI peut ne pas être liée à une étiologie génétique. En effet, la présence d'un remaniement chromosomique apparemment équilibré chez un patient atteint de DI n'exclut pas une cause acquise comme une origine toxique, infectieuse ou traumatique.

2.3.8 Conclusion

Suite à ces mécanismes décrits ci-dessus, de nombreuses études soulignent l'intérêt de la recherche de cassure de gènes lors de remaniements apparemment équilibrés chez des sujets à phénotypes anormaux. Dans un premier temps, la technique d'approche était la « marche sur le chromosome », technique de référence basée sur la FISH itératives à l'aide de sondes non commerciales BAC (Bacterial Artificial Chromosome), (Tsukamoto K, et al. 1992), (cf. Figure 8).

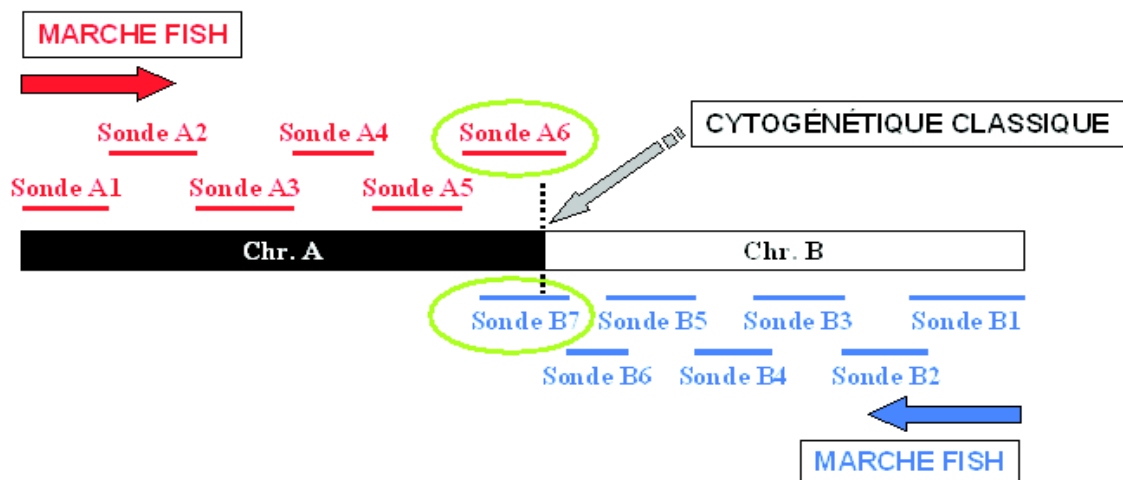


Figure 8 : La marche sur le chromosome par FISH

Mais depuis quelques années, de nouvelles technologies ont été développées notamment pour rechercher des interruptions de gènes au niveau des points de cassure :

- en se basant sur la cytogénétique moléculaire : Array-Painting (Gribble SM, et al. 2009) ;
- en se basant sur la biologie moléculaire : sequencing / NGS (Utami KH, et al. 2014).

Ces différentes approches sont développées dans le chapitre « Méthodes mises en œuvre ».

Objectifs

Le diagnostic de la DI présente un défi majeur dans le domaine de la santé publique, notamment dans un but d'une prise en charge adaptée, d'un conseil génétique mais aussi dans un objectif de médecine personnalisée.

De nombreux cas de DI, syndromique ou non, associés à des remaniements chromosomiques apparemment équilibrés sont rapportés dans la littérature.

Après avoir éliminé un déséquilibre infracytogénétique à l'aide des puces à ADN, le clonage des points de cassure a été l'une des principales préoccupations des cytogénéticiens afin d'identifier les étiologies des différents troubles observés chez ces patients. Plusieurs technologies ont été développées depuis les années 1980. Ainsi, notre principal objectif est de comparer en terme d'apport, de coût et d'interprétation les différentes techniques de FISH, Array-Painting et NGS mises en œuvre au laboratoire afin d'aboutir une stratégie diagnostique (cf. Figure 9 ci-dessous).

Les objectifs secondaires de ce travail sont :

- (i) De rechercher un éventuel mécanisme chromosomique commun à cette cohorte ;
- (ii) De poser un éventuel diagnostic définitif, dans le cadre d'une identification moléculaire du point de cassure, permettant ainsi un conseil génétique pour les patients et leurs familles.

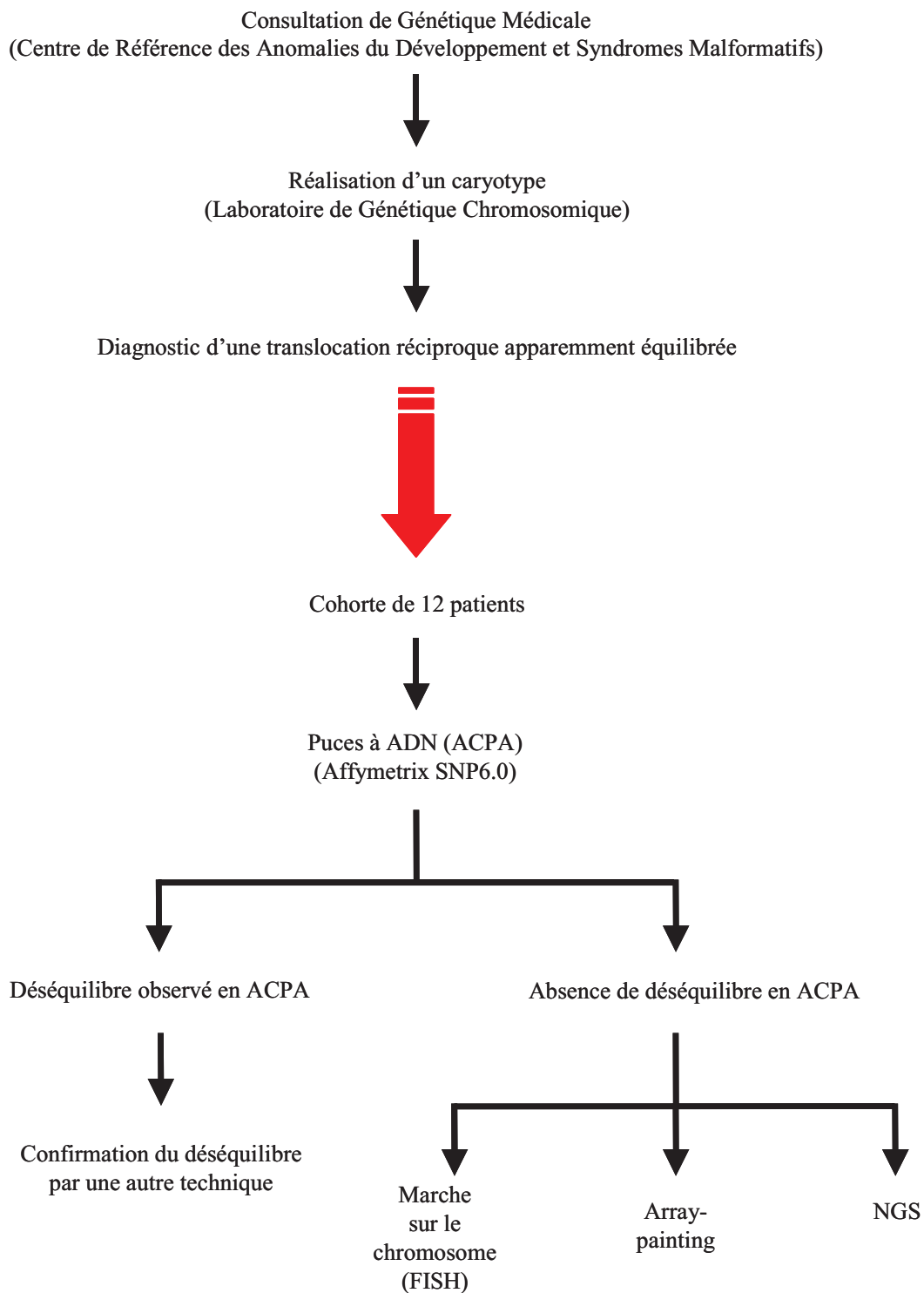


Figure 9 : Arbre décisionnel des techniques mises en œuvre pour le diagnostic chez les différents patients recrutés

Présentation des patients étudiés

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Génétique Chromosomique du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, où nous avons recruté rétrospectivement sur 11 années 12 patients, porteurs d'une translocation *de novo*, apparemment équilibrée. Ces patients sont venus en consultation de Génétique Médicale au Centre de Référence des Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs pour un bilan clinique et étiologique : 11 pour une DI plus ou moins associée à d'autres signes cliniques et 1 pour des multiples malformations. Tous sont porteurs d'une translocation apparemment équilibrée *de novo*. Les formules chromosomiques sont données selon la nomenclature ISCN 2013 (Shaffer L, et al. An International System for Human Cytogenetic 2013).

Le tableau I (page 71) résume la chronologie du travail effectué dans cette thèse et sera implémenté au fur et à mesure de l'avancement des expériences.

Le détail des symptômes cliniques des patients est indiqué dans l'annexe 1 page 293.

1- PATIENTE 1

1.1 Clinique

1.1.1 Antécédents familiaux

Il s'agit de la seule enfant issue de parents non apparentés, sans antécédents cliniques signalés.

1.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

Aucun renseignement concernant la grossesse n'a été retrouvé dans le dossier clinique de cette patiente.

1.1.3 Variations morphologiques

Quelques particularités morphologiques ont été notées comme un hypertélorisme, une macroglossie et des conduits auditifs externes petits.

1.1.4 Développement psychomoteur

La Patiente 1 présentait une DI associés à troubles de la déglutition.

1.1.5 Développement statural

Le retard de croissance diagnostiqué chez cette patiente a nécessité la mise en place d'un traitement par hormone de croissance. Cependant, ce retard de croissance persiste avec une taille (T) à 143,5cm (centimètres), (-3,5DS - Déviation Standard) pour un poids (P) 41,40kg (kilogrammes), (-2DS) à 19 ans et 10 mois.

1.1.6 Malformations observées

- cardiaques :

A la naissance, cette enfant présentait une interruption de l'arche aortique associée à une Communication InterVentriculaire (CIV) infundibulaire opérée en période néonatale. Puis, un tube valvé pour une insuffisance mitrale associée à l'insuffisance tricuspide a été mis en place.

- pulmonaires :

Une intervention chirurgicale de la sténose sous-valvulaire pulmonaire observée dans la 1^{ère} année de vie a été réalisée à l'âge de 1 an et 1 mois.

1.1.7 Examens clinico-biologiques

La numération formule sanguine montrait une sphérocytose héréditaire.

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) cérébrale a montré une lésion hypophysaire diagnostiquée comme un adénome.

La recherche d'un syndrome de l'X fragile est revenue négative.

1.2 Cytogénétique

La cytogénétique classique a permis d'identifier une formule à 46 chromosomes de sexe chromosomique féminin (XX) avec deux translocations réciproques (t) apparemment équilibrées sur l'ensemble des métaphases analysées (cf. Figure 10) :

1/ une première entre le bras long d'un des 2 chromosomes 4 et le bras court d'un des 2 chromosomes 9, avec des points de cassure identifiés en bandes R en 4q27 et 9p23.

2/ une seconde entre le bras long d'un des 2 chromosomes 7 et le bras court d'un des 2 chromosomes 8, avec des points de cassure identifiés en bandes R en 7q31.3 et 8p11.2.

L'étude du caryotype des parents montre que ces remaniements sont *de novo* (dn).

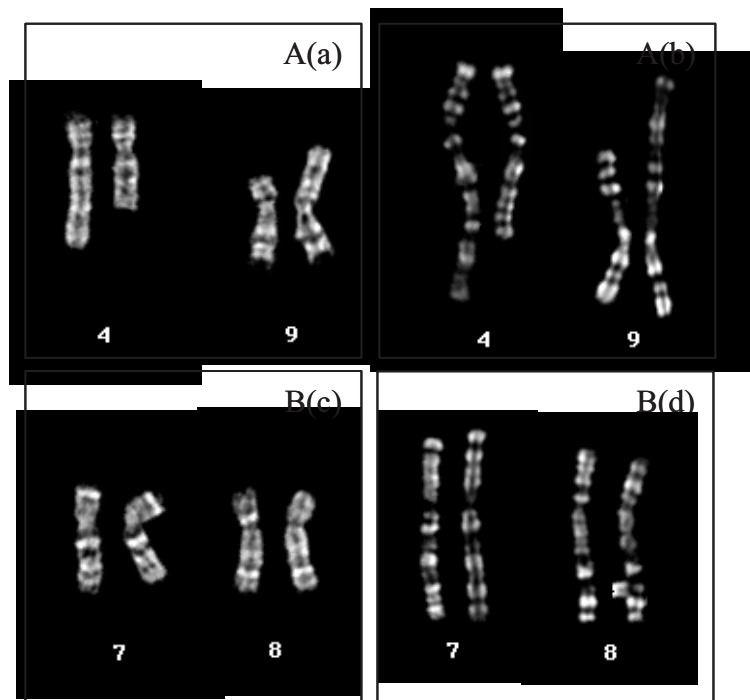


Figure 10 : Représentation des translocations t(4;9) et t(7;8)

A- chromosomes 4 et 9 et dérivés 4 et 9 de la translocation t(4;9) en bandes G (a) et R (b)

B- chromosomes 7 et 8 et dérivés 7 et 8 de la translocation t(7;8) en bandes G (c) et R (d)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques des chromosomes 4 (wcp4 - whole chromosome paint, Poseidon®) et 9 (wcp9, Poseidon®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 4 et 9 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

De même que l'utilisation des peintures spécifiques des chromosomes 7 (wcp7, Poseidon®) et 8 (wcp8, Poseidon®) confirme l'échange entre les chromosomes 7 et 8 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La FISH de la sonde RP11-69O3 spécifique de la région chromosomique 7q36.3 du bras long du chromosome 7 montre un signal sur le chromosome 7 normal et un signal sur le dérivé 8 de la translocation t(7;8). De plus, la FISH avec la sonde RHG65733 (Poseidon®) spécifique de la région subtélomérique du bras court du chromosome 8 montre un signal sur le chromosome 8 normal et un signal sur le dérivé 7 de la translocation t(7;8). L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'un échange réciproque apparemment équilibré de matériel chromosomique entre la région 7q36.3qter et la région subtélomérique du bras court du chromosome 8.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XX,t(4;9)(q27;p23)dn,t(7;8)(q31.3;p11.2)dn
.ish t(4;9)(wcp4+,wcp9+;wcp4+,wcp9+),t(7;8)(wcp7+,wcp8+,RP11-69O3-,RH65733+;
RH65733-,RP11-69O3+,wcp7+,wcp8+).

2- PATIENT 2

2.1 Clinique

2.1.1 Antécédents familiaux

Il s'agit du 2^{ème} enfant d'une fratrie de 2 issu de parents non apparentés. Aucun d'antécédent familial particulier n'a été pas apporté hormis deux fausses couches précoces chez la mère.

2.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

La grossesse s'est déroulée sans évènement notable avec des mouvements fœtaux actifs et un accouchement à 39 SA (Semaine d'Aménorrhée) par voie basse. Les mensurations à la naissance étaient dans les normes avec un P de naissance (PN) à 2990g (grammes), (-1DS),

une T de naissance (TN) à 47cm (-1DS) et un périmètre crânien (PC) de naissance (PCN) à 34cm (-1DS).

2.1.3 Variations morphologiques

Un palais creux et des malpositions dentaires ont été observés.

Par ailleurs, un hippocratisme digital associé à un scrotum en châte ont été retrouvés.

2.1.4 Développement psychomoteur

Une hypotonie a été diagnostiquée à l'âge de 3 mois.

Un retard des acquisitions psychomotrices d'allure syndromique avec des difficultés graphomotrices, de problèmes d'attention et de concentration avec des éléments dyspraxiques et dyskinétiques ont été notés. En effet, à l'âge de 6 ans, son QIP (Quotient Intellectuel Performance) est de 80 et son QIV (QI Verbal) de 71.

Par ailleurs, l'hyperlaxité ligamentaire observée pourrait expliquer le problème de motricité fine ainsi que la mauvaise coordination manuelle.

2.1.5 Développement statural

Un léger retard a été observé avec une taille de 104,3cm (-2DS), un poids de 16kg (-2DS) et un PC à 50,8cm (-1DS).

2.1.6 Malformations observées

- ophtalmiques :

Un diagnostic de strabisme sur amblyopie a été posé ainsi qu'une hypermétropie et d'une astigmatie. Le bilan ophtalmologique montre un fond d'œil normal et une rétine considérée comme fonctionnelle. Les seules anomalies observées étaient celles des réponses évoquées par les stimulations structurées.

2.1.7 Examens clinico-biologiques

Devant le souffle cardiaque de cet enfant, une échographie cardiaque a été réalisée et est revenue normale, de même que les radiographies du squelette.

Une IRM cérébrale a été alors réalisée et est revenue normale.

2.2 Cytogénétique

Les techniques de cytogénétique classique en bandes R et G montrent une formule chromosomique à 46 chromosomes correspondant à un sexe masculin (XY) associée à une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long d'un des 2 chromosomes 5 et le bras long d'un des 2 chromosomes 14, sur l'ensemble des métaphases analysées. Les points de cassure identifiés en bandes G sont 5q21 et 14q22 (cf. Figure 11).

L'étude du caryotype des parents montre que ce remaniement est *de novo*.

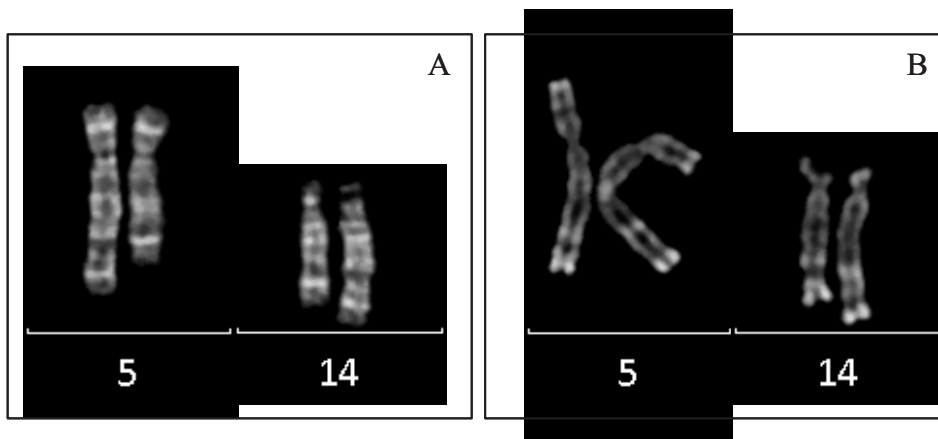


Figure 11 : Représentation des chromosomes 5 et 14 et des dérivés 5 et 14 de la translocation t(5;14) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 5 (wcp5, Poseidon®) et du chromosome 14 (wcp14, Poseidon®) confirme la translocation t(5;14) apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La formule chromosomique est la suivante :

46,XY,t(5;14)(q21;q22)dn.ish t(5;14)(wcp5+,wcp14+;wcp14+,wcp5+).

3- PATIENT 3

3.1 Clinique

3.1.1 Antécédents familiaux

Cet enfant a été vu en consultation de Génétique Médicale lors d'un rendez-vous pris pour sa sœur qui présente une DI. Ses parents sont non apparentés et il n'y pas d'antécédents familiaux particulier même si son père aurait commencé à parler tardivement.

3.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

Né à terme, ses mensurations à la naissance étaient normales avec un PN à 3700g, une TN à 50cm et un PCN non noté.

3.1.3 Variations morphologiques

Aucun élément particulier n'a été noté.

3.1.4 Développement psychomoteur

La marche a été acquise à 16 mois mais ce patient n'alterne toujours pas les marches lors de la descente des escaliers à l'âge de 4 ans.

A 12 ans et 8 mois, une évaluation neuropsychologique, réalisée par le Centre de Référence des Troubles du Langage et des Apprentissages à l'hôpital de Montpellier, a montré des difficultés d'apprentissage avec des résultats moyens en ce qui concernaient l'indice de compréhension verbale à 90, l'indice de raisonnement perceptif à 99, l'indice de mémoire de travail à 67 et l'indice de vitesse de traitement à 76.

Par ailleurs, cet enfant présentait un retard de langage majeur.

3.1.5 Développement statural

A l'âge de 4 ans, sa taille était de 103cm (moyenne), le poids de 15,5kg (+1DS) et le PC de 52,5cm (+1,5DS).

3.1.6 Malformations observées

Aucune malformation n'a été observée.

3.1.7 Examens clinico-biologiques

Aucun examen complémentaire n'a été réalisé.

3.2 Cytogénétique

Le caryotype de cet enfant montre une formule à 46 chromosomes correspondant à un sexe masculin (XY) avec présence sur l'ensemble des métaphases analysées d'une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras court d'un des 2 chromosomes 4 et le bras court d'un des 2 chromosomes 5, qui est *de novo* car elle n'est pas présente chez les parents. Les points de cassure identifiés en bandes G sont 4p15.1 et 5p14.3 (cf. Figure 12).

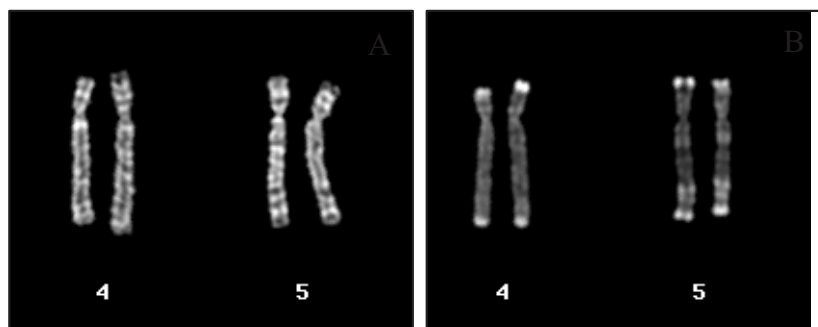


Figure 12 : Représentation des chromosomes 4 et 5 et des dérivés 4 et 5 de la translocation t(4;5) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 4 (wcp4, Poseidon®) et du chromosome 5 (wcp5, Poseidon®) confirme la translocation t(4;5) apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XY,t(4;5)(p15.1;p14.3)dn.ish t(4;5)(wcp5+,wcp4+;wcp4+,wcp5+).

4- Patient 4

4.1 Clinique

4.1.1 Antécédents familiaux

Cet enfant est le deuxième d'une fratrie de 3, sans histoire familiale particulière,.

4.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

Né à terme, ses mensurations à la naissance étaient dans les limites de la normale avec un PN à 3265g, une TN à 50cm et un PCN à 35,5cm. L'indice apgar est mesuré à 10/10.

4.1.3 Variations morphologiques

Aucun élément particulier n'est noté.

4.1.4 Développement psychomoteur

Un retard global du développement psychomoteur, des troubles du comportement à type de colère et une a marche saccadée avec des troubles de l'équilibre, des bras et des jambes raides et des hanches hyperlaxes ont été observés. Des difficultés du langage, une dysphasie, un retard d'acquisition syllabique, sont aussi notés.

Une évaluation en ergothérapie, à 7 ans et 9 mois, a établi des troubles dans le domaine des praxies constructives, de planification du geste, de la motricité fine, de la coordination uni- et bimanuelle, des capacités visuo-motrices et des capacités de mémorisation et de l'attention.

4.1.5 Développement statural

Le développement statur pondéral a été retrouvé dans les limites de la normale avec un PC à 49cm (-1,8DS), une taille de 104,3cm (-2DS) et un poids de 16kg (-2DS).

4.1.6 Malformations observées

Aucune malformation n'a été observée.

4.1.7 Examens clinico-biologiques

Les différents examens réalisés, comme l'IRM cérébrale, la radiographie du squelette, la chromatographie des acides aminés, ont été considérés comme normaux. De plus, la recherche du syndrome de l'X fragile est revenue négative.

4.2 Cytogénétique

Le diagnostic d'une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long d'un des 2 chromosomes 2 et le bras court d'un des 2 chromosomes 11 est fait chez ce patient de sexe chromosomique masculin (XY). Les points de cassure identifiés en bandes G sont 2q32 et 11p14 (cf. Figure 13).

L'étude du caryotype des parents montre que ce remaniement est *de novo*.

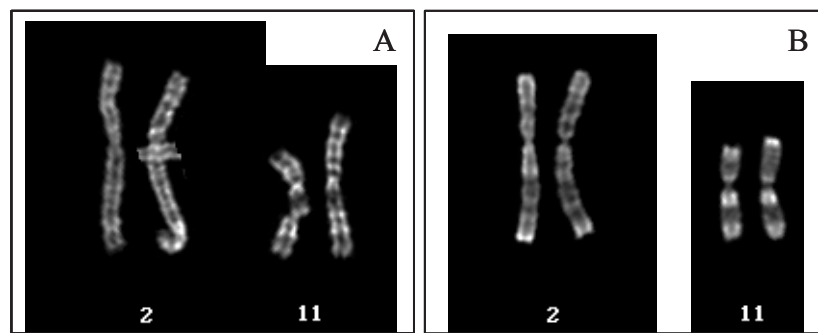


Figure 13 : Représentation des chromosomes 2 et 11 et des dérivés 2 et 11 de la translocation t(2;11) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 2 (wcp2, Aquarius®) et du chromosome 11 (wcp11, Cambio®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 2 et 11 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La formule est donc la suivante :

46,XY,t(2;11)(q32;p14)dn.ish t(2;11)(wcp2+,wcp11+;wcp2+,wcp11+).

5- Patient 5

5.1 Clinique

5.1.1 Antécédents familiaux

Il s'agit d'un enfant, de parents non consanguin, issu d'une fratrie de 6 dont l'arbre généalogique montre un neveu qui présente d'un retard psychomoteur et une hyperactivité sans variations morphologiques notables.

5.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

La grossesse s'est déroulée sans problème avec des mouvements fœtaux actifs, un accouchement à terme et des mensurations de naissance dans la normale (PN à 3720g, TN à 52cm et PCN à 36,5cm).

5.1.3 Variations morphologiques

Ce patient présentait visage allongé avec un élargissement des os propres du nez, un palais creux et une lnette normale.

5.1.4 Développement psychomoteur

A l'âge de 2 mois et demi, une épilepsie apparentée à un syndrome de West a été notée. La marche a été acquise à 3 ans, le langage très tardivement. La DI était associée à des

manifestations anxieuses, des troubles du comportement et une absence de communication verbale.

Par ailleurs, une ataxie cérébelleuse modérée accompagnée de mouvements ataxiques et dystoniques ont été observés.

5.1.5 Développement statural

Un aspect marfanoïde a été noté avec une grande taille à caractère familial évaluée à 176cm, une hypotrophie pondérale. Cette allure a été conservée au cours de son évolution avec une taille de 185cm (+1,8DS), un poids de 49kg (-2DS) et un PC à 54,5cm (-1,5DS) à l'âge de 17 ans et 10 mois.

5.1.6 Malformations observées

- orthopédiques :

Un bassin oblique en haut et à droite avec une attitude scoliotique compensatrice, une cyphoscoliose, une arachnodactylie, des pieds plats valgus et un aspect gracile des os long ont été observés.

5.1.7 Examens clinico-biologiques

L'IRM cérébrale était normale.

La recherche du syndrome de l'X fragile est revenue normale.

5.2 Cytogénétique

Le caryotype montre une formule chromosomique à 46 chromosomes avec présence sur l'ensemble des métaphases analysées d'une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long du chromosome Y et le bras long d'un des 2 chromosomes 2. Les points de cassure identifiés en bandes R sont Yq11.2 et 2q37 (cf. Figure 14).

Ce remaniement n'est pas retrouvé chez son père et est donc *de novo*.

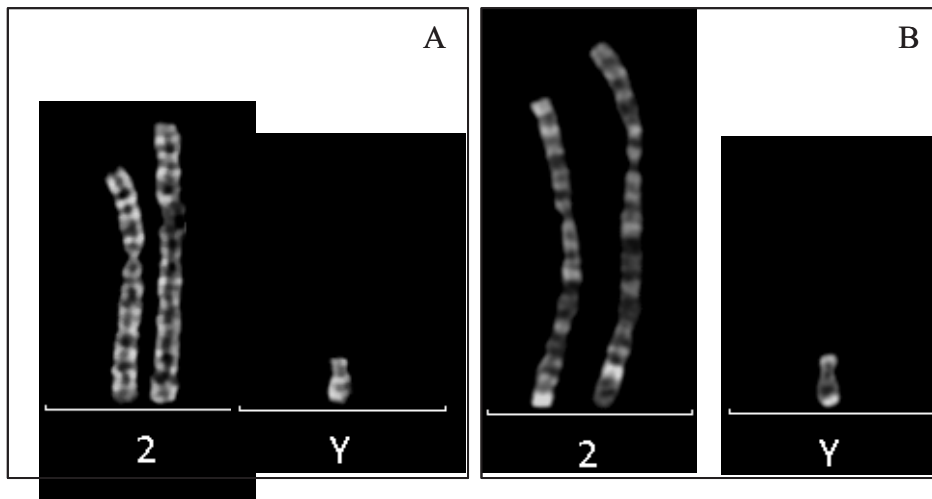


Figure 14 : Représentation des chromosomes Y et 2 et des dérivés Y et 2 de la translocation t(Y;2) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 2 (wcp2, Poseidon®) et du chromosome Y (wcpY, Poseidon®) confirme la translocation t(Y;2) apparemment sans l'implication d'autres chromosomes.

La FISH avec les sondes spécifiques des régions subtélomériques du bras long du chromosome 2 (D2S447, Vysis®) et du bras long du chromosome Y (EST Cdy 16c07, Vysis®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les régions subtélomériques des bras longs des chromosomes 2 et Y.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,X,t(Y;2)(q11.2;q37)dn.ish t(Y;2)

(wcpY+,wcp2-,D2S447+,ESTCdy16c07-;wcp2+,wcpY-,D2S447-,ESTCdy16c07+).

6- Patient 6

6.1 Clinique

6.1.1 Antécédents familiaux

Cet enfant est le second issu de parents cousins germains, qui sont en bonne santé et qui n'ont pas d'histoire clinique.

6.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

L'accouchement, à 40SA, a été suivi d'une bonne adaptation cardio-respiratoire avec des paramètres de naissance dans la moyenne : PN à 3550g, TN à 50cm et PCN à 35cm.

6.1.3 Variations morphologiques

Un ptosis modéré, des fentes palpébrales courtes et en bas, des sourcils très arqués, des lèvres remplies, un strabisme, un philtrum court et une incisive centrale large ont été rapportés.

6.1.4 Développement psychomoteur

Il s'est tenu assis à l'âge de 15 mois et a marché à l'âge de 2 ans.

Des troubles neurodéveloppementaux étaient observés avec un retard de langage et une hyperactivité. Les tests de screening ADOS et ADIR n'ont pas permis de diagnostiquer cet enfant comme autiste mais il présentait un comportement anormal avec des stéréotypies sensitives et motrices : un flapping associé à des sautilllements stéréotypés dans les situations émotionnellement chargées, des utilisations stéréotypées d'objets avec ouverture/fermeture des portes et des interrupteurs, et des jets d'objets par la fenêtre. Ce patient avait tendance à sentir la nourriture et était hypersensible au bruit des robots ménagers et de bricolage.

Le WPPSI-III n'a pas pu être établi à cause de la fatigue et de l'instabilité motrice de l'enfant. Cependant, une DI a été observée avec un retard de développement estimé à 3 ans pour un âge réel de 8 ans et 4 mois. Par ailleurs, le profil socio-adaptatif sur l'échelle de Vineland était de 59 en communication, 63 en autonomie et vie quotidienne, 66 pour les habiletés sociales.

6.1.5 Développement statural

A l'âge de 8 ans et 4 mois, le poids et la taille étaient normaux mais il présentait une microcéphalie postnatale avec un PC à 49cm (-3DS).

6.1.6 Malformations observées

Aucune malformation n'a été notée lors de l'examen clinique.

6.1.7 Examens clinico-biologiques

L'IRM cérébrale et la spectroscopie étaient normales. Les fonctions visuelles et auditives ainsi que la radiographie du squelette ne présentaient pas d'anomalie.

6.2 Cytogénétique

Le caryotype révèle une formule à 46 chromosomes correspondant à un sexe masculin (XY), avec présence sur l'ensemble des métaphases analysées d'une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long d'un des 2 chromosomes 3 et le bras long d'un des 2 chromosomes 7. Les points de cassure identifiés en bandes G sont 3q11.2 et 7q11.22 (cf. Figure 15).

Ce remaniement est *de novo* car il n'a pas été retrouvé chez ses parents.

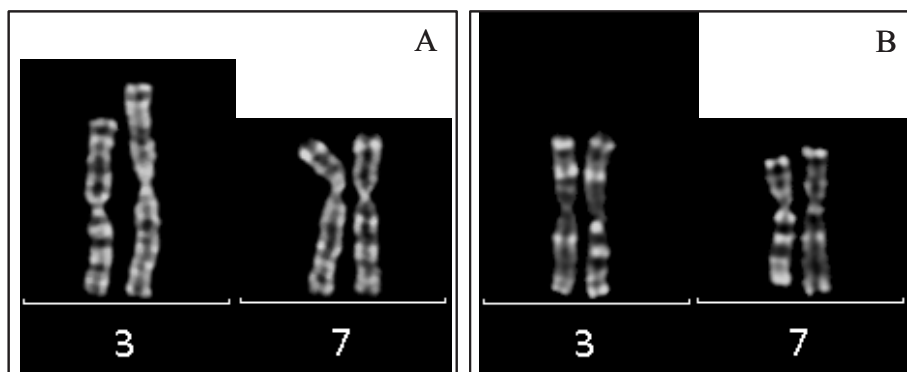


Figure 15 : Représentation des chromosomes 3 et 7 et des dérivés 3 et 7 de la translocation t(3;7) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 3 (wcp3, Poseidon®) et du chromosome 7 (wcp7, Poseidon®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 3 et 7 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes avec les sondes utilisées.

L'hybridation *in situ* des sondes spécifiques des centromères des chromosomes 3 (D3Z1, Poseidon) et 7 (D7Z1, Poseidon®) permet d'objectiver :

* pour D3Z1, un signal sur le chromosome 3 normal et un signal sur le dérivé 3 de la translocation t(3;7),

* et pour D7Z1, un signal sur le chromosome 7 normal et un signal sur le dérivé 7 de la translocation t(3;7).

Ces résultats sont en faveur de points de cassure en aval du centromère sur le bras long pour chacun des chromosomes impliqués dans le remaniement chromosomique.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XY,t(3;7)(p11.2;p11.22)dn

.ish t(3;7)(wcp3+,D3Z1+,D7Z1-,wcp7+;wcp7+,D7Z1+ D3Z1-,wcp3+).

7- Patiente 7

7.1 Clinique

7.1.1 Antécédents familiaux

Cette patiente est issue d'une fratrie de 2 et de parents non apparentés. L'arbre généalogique montre, côté paternel, une nièce, qui serait porteuse d'un retard au moins au niveau du langage associée peut-être à une épilepsie, une demi-sœur qui a un retard léger et un demi-cousin décédé à un an de vie dans un contexte d'un syndrome polymalformatif d'étiologie inconnue. La mère est porteuse d'un variant de *MECP2* (methyl CpG binding protein 2 - Rett syndrome) dont sa fille a hérité.

7.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

Cette enfant est née à terme après une grossesse sans particularité. Ses mensurations à la naissance étaient dans les limites de la normale avec un PN à 3200g, une TN à 49cm et un PCN à 34cm ; l'indice apgar était noté à 10/10.

7.1.3 Variations morphologiques

Quelques variations morphologiques mineures ont été mentionnées avec des sourcils assez étalés avec un tiers externe plus fin et des oreilles décollées avec un hélix assez simple. De plus, la patiente présentait des anomalies des dermatoglyphes et une clinodactylie héritée du père.

7.1.4 Développement psychomoteur

La tenue assise a été acquise à 10 mois et la marche à 22 mois.

Le diagnostic d'une déficience intellectuelle avec des troubles relationnels, selon sa mère, et un retard précoce de développement sans élément d'orientation à l'examen clinique ont été posés à l'âge de 4 ans et 10 mois.

Lors de consultations ultérieures, des troubles du langage étaient présents ainsi qu'une dissociation automatico-volontaire.

7.1.5 Développement statural

Les mensurations observées n'ont pas interpellé les différents intervenants.

7.1.6 Malformations observées

Les comptes rendus de consultation ne rapportaient aucune malformation.

7.1.7 Examens clinico-biologiques

En dehors, de la recherche du syndrome de l'X fragile, qui est revenue négative, aucun autre examen n'a été réalisé.

7.2 Cytogénétique

Les techniques de cytogénétique classique en bandes R et G montrent une formule chromosomique à 46 chromosomes correspondant à un sexe féminin (XX) associée à une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras court d'un des 2 chromosomes 3 et le bras long d'un des 2 chromosomes 5 sur l'ensemble des métaphases analysées. Les points de cassure identifiés en bandes R et G sont 3p26 et 5q13.3 (cf. Figure 16).

Le caryotype des parents ne montre pas de remaniement.



Figure 16 : Représentation des chromosomes 3 et 5 et des dérivés 3 et 5 de la translocation t(3;5) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 3 (wcp3, Poseidon®) et du chromosome 5 (wcp5, Poseidon®) confirme la translocation t(3;5) apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XX,t(3;5)(p26;q13.3)dn.ish t(3;5)(wcp5+,wcp3+;wcp5+,wcp3+).

8- Patiente 8

8.1 Clinique

8.1.1 Antécédents familiaux

Il s'agit d'une enfant, 2^{ème} d'une fratrie de 2. Les parents, en bonne santé, ne sont pas apparentés. La mère est d'origine espagnole et le père présente une hypercholestérolémie probablement familiale. L'arbre généalogique montre un cousin germain du côté maternel avec une DI sévère non étiquetée.

8.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

La grossesse a été marquée par un décollement placentaire et la naissance par une césarienne. La patiente est née eutrophe avec un PN à 3200g, une TN à 52cm et un PCN à 35cm. L'indice apgar était noté à 10/10.

8.1.3 Variations morphologiques

Quelques variations morphologiques mineures ont été constatées : petit épicanthus inversus, philtrum long avec des piliers peu marqués. De plus, cette enfant avait un pli palmaire transverse unique de façon bilatérale, un discret « sandal gap », des pieds plats et des lésions dépigmentées diffuses au niveau de l'abdomen sur le flanc gauche.

8.1.4 Développement psychomoteur

La tenue assise a été acquise à 9 mois, une marche à 1 an et une propreté nocturne à 2 ans. A 11 ans et 1 mois, ont été observés un décalage des acquisitions, une instabilité motrice, des troubles du comportement avec des troubles de l'attention et des difficultés de concentration, une hyperactivité avec une grande agitation, une sensibilité aux bruits et une anxiété importante. Quelques accidents au niveau de la propreté diurne étaient notés, ainsi qu'un sommeil agité.

8.1.5 Développement statural

A 11 ans et 1 mois, les mensurations observées étaient une T à 1,30m (mètre), (-2DS), un P à 28,4kg (-0,5DS) et PC à 52 cm (médiane).

A 14 ans et 4 mois, une prise de poids importante était notée depuis 1 an avec un P à 48kg (médiane), une T à 148cm (-1,8DS), et un PC à 53,5 cm (-1DS).

8.1.6 Malformations observées

Aucune malformation n'a été rapportée lors des différentes consultations.

8.1.7 Examens clinico-biologiques

Aucun examen en dehors du caryotype n'a été réalisé.

8.2 Cytogénétique

La présence, sur l'ensemble des métaphases analysées, de 46 chromosomes correspondant à un sexe féminin (XX) associés à une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long d'un des 2 chromosomes 1 et le bras long d'un des 2 chromosomes 14 est observée en cytogénétique classique. Les points de cassure identifiés en bandes G sont 1q44 et 14q32.2 (cf. Figure 17).

Cette translocation est *de novo* puisqu'elle n'est pas retrouvée sur le caryotype des parents.

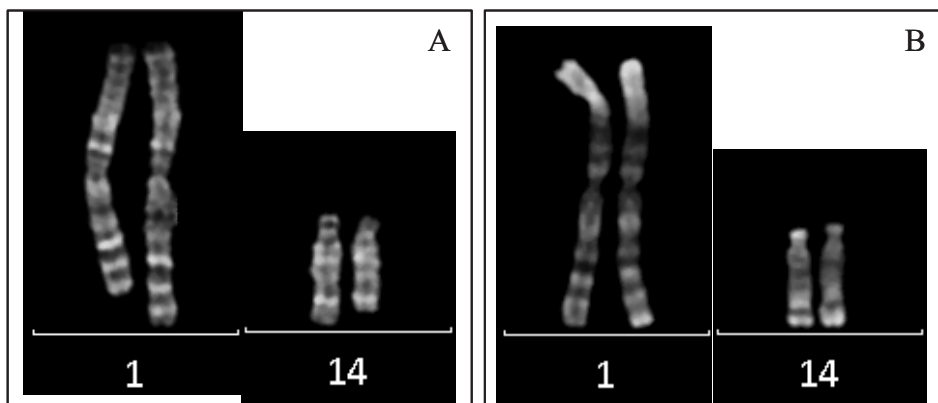


Figure 17 : Représentation des chromosomes 1 et 14 et des dérivés 1 et 14 de la translocation t(1;14) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 1 (wcp1, Poseidon®) et du chromosome 14 (wcp14, Poseidon®) confirme un échange de matériel chromosomique apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes avec les sondes utilisées.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XX,t(1;14)(q44;q32.2)dn.ish t(1;14)(wcp1+,wcp14+;wcp14+,wcp1+).

9- Patiente 9

9.1 Clinique

9.1.1 Antécédents familiaux

Cette enfant est issue d'une fratrie de 4 qui sont tous bien portants, de même que leurs enfants. Ses parents, en bonne santé, ne sont pas apparentés.

9.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

La grossesse a été spontanée et s'est déroulée sans problème, malgré un accident de la voie publique à 6 mois de grossesse. A la naissance, à terme, l'indice apgar était à 10 malgré une circulaire du cordon. Le PN était à 2840g (-1DS) pour une TN à 48cm (-1DS) et un PCN à 33cm (-2DS). Un reflux gastro-œsophagien et une division palatine postérieure ont été notés.

9.1.3 Variations morphologiques

Des lésions cutanées linéaires de topographie fluctuante, préférentiellement au niveau du visage, du décolleté et des seins, sont apparues à l'âge de 31 ans. Quelques années plus tard, les lésions cutanées étaient sévères et prurigineuses linéaires à type d'excoriation des membres et du visage.

9.1.4 Développement psychomoteur

Elle a souri à 3 mois, marché à 15 mois et était propre à 2 ans. Durant l'enfance, la patiente a présenté des difficultés alimentaires. Par ailleurs, un retard de langage avec des onomatopées a été noté à l'âge de 5 ans et 9 mois, ainsi que des difficultés dans l'écriture sous forme de gribouillis. La lecture n'a été acquise que vers 10-12 ans.

Plus tard, un diagnostic de retard du développement associé à des troubles psychotiques du comportement, une DI et des difficultés de coordination a été posé. Par ailleurs, cette adulte décrivait des réveils multiples avec un sommeil agité.

9.1.5 Développement statural

A 35 ans, ses mensurations étaient les suivantes : un P à 58kg (+0,5DS) pour une T à 169,5cm (+1,2DS) et un PC à 56 cm (moyenne).

9.1.6 Malformations observées

La Patiente 9 ne présentait aucune malformation.

9.1.7 Examens clinico-biologiques

Aucun examen en dehors du caryotype n'a été réalisé.

9.2 Cytogénétique

Le caryotype montre de 46 chromosomes avec un chromosome X de structure normale. Par ailleurs, sur l'ensemble des métaphases analysées, est retrouvée une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras court d'un des 2 chromosomes X et le bras long d'un des 2 chromosomes 16. Les points de cassure identifiés en bandes G et R sont Xp21.1 et 16q11.2 (cf. Figure 18). Les parents ne présentent pas de remaniement.

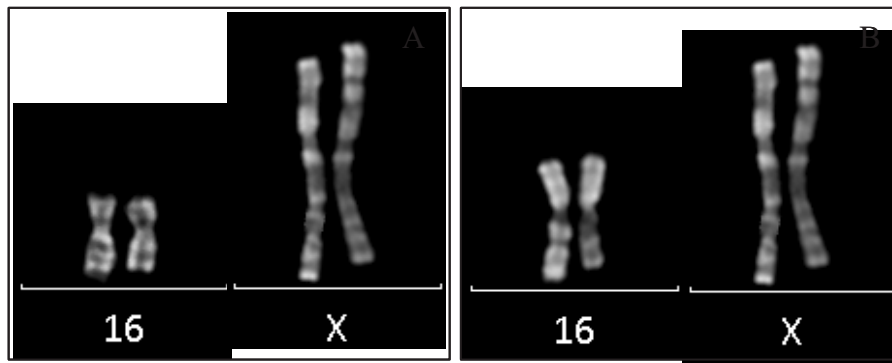


Figure 18 : Représentation des chromosomes X et 16 et des dérivés X et 16 de la translocation t(X;16) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome X (wcpX, Poseidon®) et du chromosome 16 (wcp16, Poseidon®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes X et 16 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes avec les sondes utilisées.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,X,t(X;16)(p21.1;q11.2)dn.ish t(X;16)(wcp16+,wcpX+;wcp16+,wcpX+).

Les translocations de type (X;autosome) sont décrites comme pouvant être associées à des anomalies du phénotype en raison de l'inactivation du chromosome X transloqué (cf. § 4.2.9 du chapitre Résultat). La recherche d'un biais d'inactivation a donc été réalisée et les résultats ont mis en évidence un profil de type aléatoire.

10- Patient 10

10.1 Clinique

10.1.1 Antécédents familiaux

Il s'agit du seul enfant du couple, sans antécédent particulier.

10.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

A la naissance, provoquée à 41SA, le Patient 10 était eutrophe avec un PN à 3650g, une TN à 52 cm et un PCN à 32cm.

10.1.3 Variations morphologiques

Aucune variation morphologique n'a été décrite chez cet enfant.

10.1.4 Développement psychomoteur

La tenue de tête a eu lieu à 4 mois. Cependant, à 10 mois, la station assise n'était toujours pas acquise. Le Patient 10 a marché à 2 ans avec une discrète ataxie.

La DI était précoce avec une prédominance sur le langage. Par ailleurs, l'examen clinique révélait un bavage persistant, une aphasie motrice et des séquelles spastiques dystoniques. De plus, ont été notés avec hypotonie, un retard postural et difficultés à la mastication avec des dyspraxies bucco-faciales.

10.1.5 Développement statural

A l'âge de 10 mois, la croissance staturo-pondérale était normale de même que la courbe de PC.

Un retard staturo-pondéral a été observé à l'âge de 6 ans et 5 mois avec les mensurations suivantes : P à 17,5kg, (-1,5DS), T à 116,6cm (-0,5DS) et PC à 50,5cm (-1,5DS).

10.1.6 Malformations observées

Les comptes rendus médicaux n'ont rapporté aucune malformation.

10.1.7 Examens clinico-biologiques

L'IRM cérébrale est considérée comme normale à l'âge de 10 ans et 9 mois.

10.2 Cytogénétique

L'étude du caryotype a identifié 46 chromosomes avec un sexe chromosomique masculin (XY) et un remaniement chromosomique complexe (RCC) apparemment équilibré de type « *three-way* » impliquant les chromosomes 3, 5 et 15. Une partie du bras court d'un des 2 chromosomes 3 a remplacé une partie du bras long d'un des 2 chromosomes 15, qui est allée sur le bras long d'un des 2 chromosomes 5. La région chromosomique du bras long du chromosome 5 a pris la place de la région chromosomique du bras court du chromosome 3. Les points de cassure identifiés en bandes G et R sont 3p11, 15q2 (hypothétiquement la sous-bande 5) et 5q23 (cf. Figure 19). Les parents ne présentent pas de remaniement.

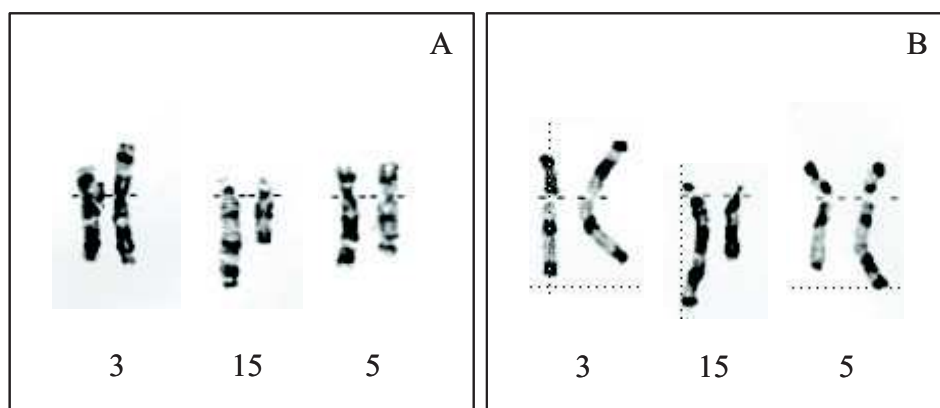


Figure 19 : Représentation des chromosomes 3, 5 et 15 et des dérivés 3, 5 et 15 de la translocation $t(3;15;5)$ en bandes G (A) et R (B)

A la suite de l'anomalie observée sur le caryotype, une technique de Multi-FISH a été mise en œuvre, permettant une analyse de cytogénétique moléculaire globale des chromosomes. Afin de caractériser plus précisément la translocation complexe, nous avons étudié les chromosomes impliqués à l'aide des peintures spécifiques des chromosomes 3, 5 et 15 (wcp3, wcp5 et wcp15 - MetaSystems®). Cette dernière approche confirme l'échange de matériel chromosomique entre les 3 chromosomes identifiés sur le caryotype, apparemment sans intervention d'autres chromosomes (cf. Figure 20). Il en est de même pour les résultats observés en M-FISH.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XY,t(3;15;5)(p11;q2?5;q23)dn

.ish t(3;15;5)(wcp5+,wcp15-,wcp3+;wcp15+,wcp5-,wcp3+;wcp5+,wcp3-,wcp15+).

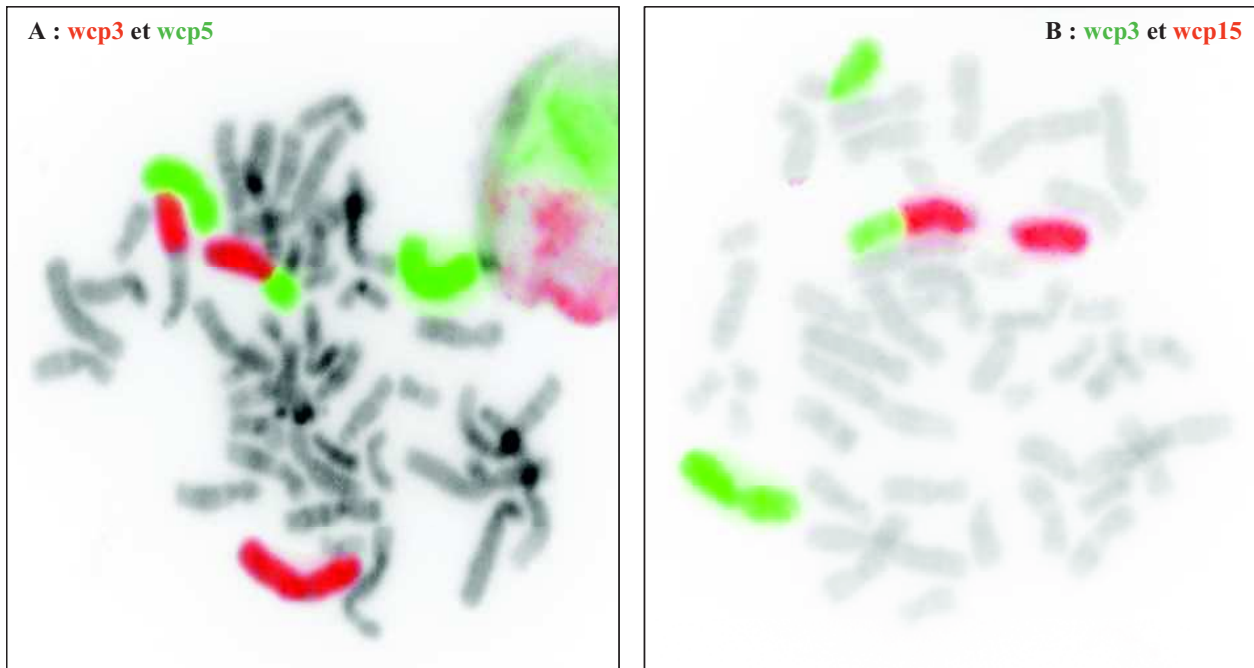


Figure 20 : Peintures des chromosomes 3 (A et B), 5 (A) et 15 (B)

11- Patient 11

11.1 Clinique

Il s'agit d'un enfant décédé dans ses 1^{ers} mois de vie.

11.1.1 Antécédents familiaux

Il s'agit du 2^{ème} enfant de la famille.

11.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

La naissance de ce patient a eu lieu après un déclenchement artificiel par voie basse à 35SA+3J. Le PN est à 2560g (+1DS), la TN à 46,5 cm et le PCN à 33,5 cm (+0,5DS) avec un indice apgar à 7/8/9. L'échographie obstétricale de cette grossesse spontanée a identifié une artère ombilicale unique associée à des malformations cardiaques de type ventricule droit à

double issue, hypoplasie du ventricule droit, pathologie de la valve tricuspide et CIV sous-aortique large. L'IRM cérébrale à 32SA était normale.

11.1.3 Variations morphologiques

Aucune variation morphologique n'a été décrite dans les différents comptes rendus médicaux.

11.1.4 Développement psychomoteur

Aucun recul ne permettait de conclure sur le développement psychomoteur de cet enfant.

11.1.5 Développement statural

A 5 mois de vie, le P était de 3900g, la T de 59cm et le PC de 37cm, ce qui montrait une croissance extrêmement restreinte.

11.1.6 Malformations observées

A 5 mois de vie, une laparotomie exploratrice a conduit à une gastrostomie et une iléostomie. Par la suite, cet enfant a développé une cardiopathie complexe associée à des malformations cérébrales.

11.1.7 Examens clinico-biologiques

Aucun examen complémentaire n'a été réalisé en dehors du caryotype.

11.2 Cytogénétique

Les techniques de cytogénétique classique en bandes R et G montrent une formule chromosomique à 46 chromosomes correspondant à un sexe masculin (XY) associée à une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long d'un des 2 chromosomes 1 et le bras court d'un des 2 chromosomes 10, sur l'ensemble des métaphases analysées. Les points de cassure identifiés en bandes G sont 1q44 et 10p14 (cf. Figure 21).

L'étude du caryotype des parents montre que ce remaniement est *de novo*.

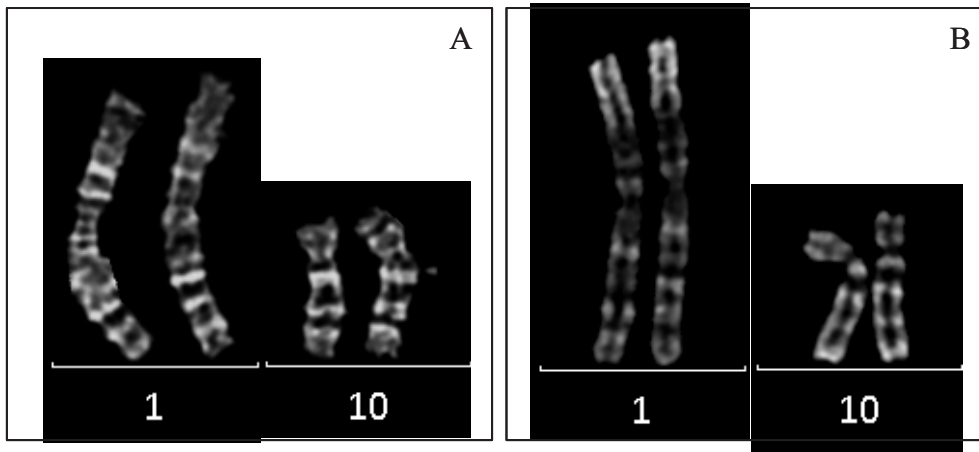


Figure 21 : Représentation des chromosomes 1 et 10 et des dérivés 1 et 10 de la translocation t(1;10) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 1 (wcp1, Poseidon®) et du chromosome 10 (wcp10, Poseidon®) confirme la translocation t(1;10) apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XY,t(1;10)(q44;p14)dn.ish t(1;10)(wcp1+,wcp10+;wcp10+,wcp1+).

12- Patiente 12

12.1 Clinique

12.1.1 Antécédents familiaux

Cette enfant est issue de parents non apparentés.

12.1.2 Déroulement de la grossesse et naissance

Née à terme, la Patiente 12 était eutrophe avec un PN à 3200g, une TN à 50,5cm et un PCN à 34,5cm. La grossesse s'est déroulée sans problème médical.

12.1.3 Variations morphologiques

Des variations morphologiques mineures comme un épicanthus bilatéral avec une obliquité anti-mongoloïde et des fentes palpébrales plus marquées à droite ont été notées. Un cubitus valgus bilatéral, un thorax étroit et des anomalies du calibre et d'orientation des doigts et de certains orteils ont été observés.

12.1.4 Développement psychomoteur

Le retard des acquisitions a été considéré comme léger et a été retrouvé associé à un décalage du langage, un décalage dans les activités scolaires, une lenteur, des dystonies et une incoordination des membres supérieurs avec de fréquents mouvements de type tics ou stéréotypies.

A 8 ans et demi, son QIV a été évalué à 75 et des troubles de la structuration visuo-spatiale ont été identifiés.

12.1.5 Développement statural

Son périmètre crânien était alors à -2DS et sa taille à +1,5DS, à l'âge de 7 ans et 7 mois.

A 9 ans et 3 mois, son développement staturo-pondéral était normal avec une T à +1,5DS, un P à +2DS et un PC à -0,5DS. Deux ans plus tard, les mensurations étaient sur la même courbe.

12.1.6 Malformations observées

Les comptes rendus médicaux ne notaient pas de malformation.

12.1.7 Examens clinico-biologiques

L'IRM ne montrait pas d'anomalie intracrânienne et la radiographie du squelette était normale à l'âge de 7 ans et 10 mois. La recherche du syndrome de l'X fragile n'a pas été réalisée.

12.2 Caryotype

Le caryotype de cette enfant montre une formule à 46 chromosomes correspondant à un sexe féminin (XX) avec présence sur l'ensemble des métaphases analysées d'une translocation réciproque apparemment équilibrée entre le bras long d'un des 2 chromosomes 4 et le bras court d'un des 2 chromosomes 7, qui est *de novo* car elle n'est pas présente chez les parents. Les points de cassure identifiés en bandes G sont 4q26 ou 4q27 et 7p15.3 (cf. Figure 22).

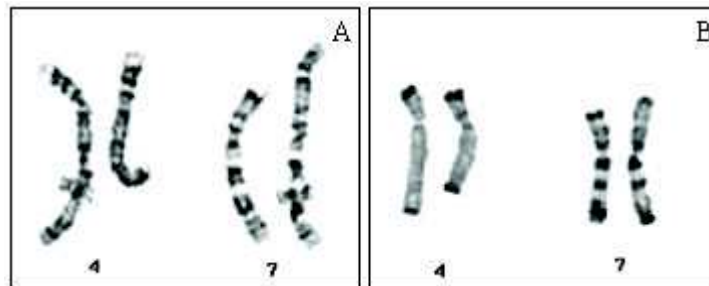


Figure 22 : Représentation des chromosomes 4 et 7 et des dérivés 4 et 7 de la translocation t(4;7) en bandes G (A) et R (B)

L'hybridation *in situ* des peintures spécifiques du chromosome 4 (wcp4, Roche®) et du chromosome 7 (wcp7, Cambio®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 4 et 7 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

La formule chromosomique est donc la suivante :

46,XX,t(4;7)(q26 or q27;p15.3)dn.ish t(4;7)(wcp4+,wcp7+;wcp4+,wcp7+).

Patients	Phénotype					Translocations <i>de novo</i>
	RCIU	DI	Troubles (neuro)musculaires	Retard de croissance staturo-pondérale	Malformations	
1	?	+		+	Insuffisance plumonaire Malformations cardiaques	t(4;9)(q27;p23),t(7;8)(q31.3;p11.2)
2	-	+	Dyspraxie Dyskinésie Hypotonie	+	Souffle cardiaque Strabisme sur amblyopie	t(5;14)(q21;q22)
3	-	+		-		t(4;5)(p15.1;p14.3)
4	-	+	Dyspraxie Hypertonie	-		t(2;11)(q32;p14)
5	-	+	Ataxie Dystonie Epilepsie	-	Cyphoscoliose	t(Y;2)(q11.2;q37)
6	-	+	Epilepsie	-	Troubles ophtalmiques Microcéphalie post-natale	t(3;7)(q11.2;q11.22)
7	-	+		-		t(3;5)(p26;q13.3)
8	-	+		-		t(1;14)(q44;q32.2)
9	-	+		-	Lésions cutanées	t(X;16)(p21.1;q11.2)
10	-	+	Dyspraxie Discrète ataxie Hypotonie globale Troubles pyramidaux	-		t(3;15;5)(p11;q2?5;q23)
11	-	?		+	Malformations cardiaques Malformations cérébrales Microcéphalie	t(1;10)(q44;p14)
12	-	+	Dystonie	-		t(4;7)(q26 or q27;p15.3)

Tableau I : Récapitulatif des données cliniques et des translocations des patients de l'étude (RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin)

Méthodes mises en œuvre

Devant une DI dont l'étiologie semble être d'origine génétique, le caryotype était, jusqu'à peu, la seule technique d'étude globale du génome utilisée en routine. De ce fait, tous les patients de notre cohorte ont eu en première intention la prescription d'un caryotype qui nous a permis d'identifier des translocations réciproques apparemment équilibrées. La prise en charge de chacun des dossiers s'est faite selon le Guide des Bonnes Pratiques de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (2014) avec la mise en œuvre des techniques de cytogénétique moléculaire (les peintures chromosomiques pour l'ensemble des patients, les sondes subtélomériques, notamment pour les Patients 1 et 5, et Multi-FISH, notamment pour le Patient 10). Par ailleurs, nous avons vérifié que les translocations étaient *de novo* en recherchant le remaniement chez les parents.

L'étude de l'équipe de Rauch A rapporte, en 2006, que le caryotype classique permet de réaliser un diagnostic chromosomique pour 10-15 % des patients, avec 11,3 % d'anomalies de nombre (représentées surtout par les trisomies 21) et 3,2 % d'aneusomies, notamment des délétions (Rauch A, et al. 2006). Ces résultats entrent dans les limites de 4 à 28 % définies par Curry CJ et collaborateurs en 1997 avec la synthèse de plusieurs études (Curry CJ, et al. 1997). Cependant, du fait du niveau de résolution de cette technique, seules les anomalies de plus de 5-7Mb sont détectées. C'est pourquoi, de nouvelles techniques ont été développées pour améliorer la résolution et donc identifier des déséquilibres de taille de plus en plus petite. Ces techniques associent la cytogénétique (classique et moléculaire) et la biologie moléculaire. En fonction de l'anomalie recherchée, une ou plusieurs technologies sont choisies afin d'adapter la caractérisation génétique à la situation clinique.

Les patients faisant l'objet de ce travail sont tous porteurs d'une translocation chromosomique *de novo* apparemment équilibrée. Après avoir éliminé un déséquilibre infracytogénétique par ACPA, notre seconde hypothèse est que le remaniement lui-même pourrait éventuellement expliquer le phénotype des patients étudiés. Nous avons donc mis œuvre, dans un second temps, plusieurs techniques complémentaires, comme la marche sur le chromosome par FISH, l'Array-Painting et le NGS type WGS (Whole Genome Sequencing), pour identifier les points

de cassure au plus près. Nous avons utilisé aussi les techniques de PCR et de séquençage classique pour caractériser précisément les points de cassure lors des approches « générales », comme la FISH et l'Array-Painting, ou pour les confirmer dans le cadre du WGS et des techniques d'expression, comme la RT-qPCR (Reverse Transcription associée à de la PCR quantitative).

Le tableau III (page 105) chronologique résume le travail effectué dans cette thèse.

1- CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE

1.1 Hybridation *In Situ* Fluorescente ou FISH

1.1.1 Principe

Les techniques d'hybridation *in situ* sont fondées sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. Une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué) en solution peut s'hybrider spécifiquement avec sa séquence cible complémentaire sur une préparation chromosomique dénaturée grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. Les appariements se font par des liaisons hydrogènes établies selon les critères de Watson et Crick.

Les liaisons non spécifiques créent des « hybrides infidèles » qui sont éliminés avec les molécules de sonde non hybridées par des lavages plus ou moins stringents. Les molécules d'ADN marquées sont observées grâce à un microscope à fluorescence et les images sont capturées, numérisées et interprétées grâce au logiciel Isis® (MetaSystems, Allemagne).

La réalisation relativement facile et rapide de cette technique a permis à la FISH de devenir un outil complémentaire indispensable de la cytogénétique classique. Cette technologie permet d'obtenir un seuil de résolution de quelques dizaines de milliers de paires de bases selon le type de sonde choisi. Cependant, cette technique n'est pas une méthode pangénomique et requiert un examen clinique minutieux car le choix de la sonde est dicté par l'hypothèse diagnostique (par exemple : un syndrome microdélétionnel donné confirmé par une sonde FISH spécifique).

La cytogénétique moléculaire nous a permis, dans un premier temps, de compléter le caryotype de tous nos patients. Par ailleurs, nous avons choisi cette approche pour confirmer un déséquilibre observé en ACPA (Patients 1, 2, 3 et 8) ou pour nous aider dans l'interprétation des résultats des autres techniques mises en œuvre dans l'optique de cloner les points de cassure (Patients 10, 11 et 12). La résolution varie en fonction des cibles choisies et du type de sondes utilisé.

Le principe de la FISH est représenté sur la Figure 23 ci-dessous.

Le protocole utilisé dans notre laboratoire est décrit dans l'annexe 2.

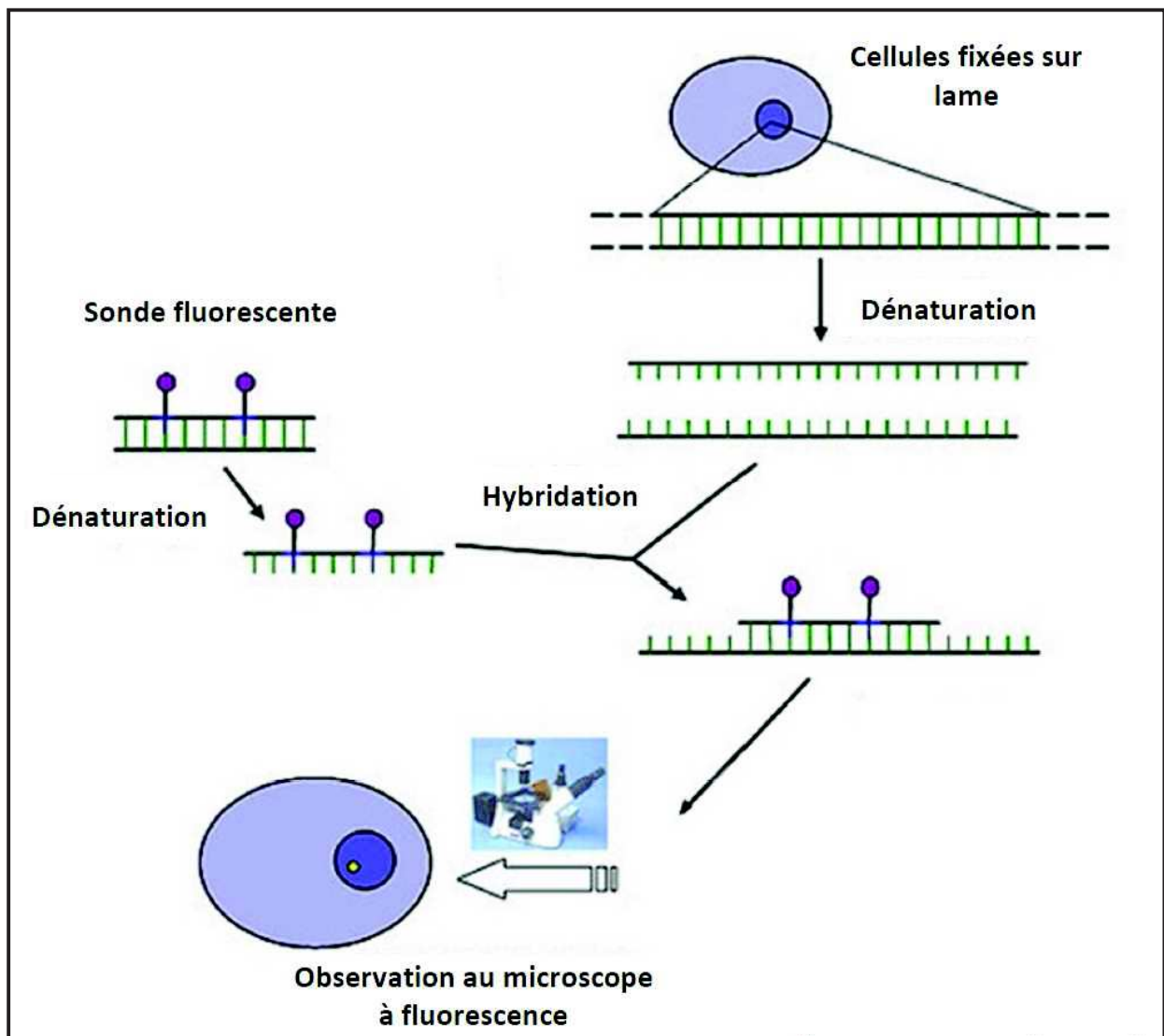


Figure 23 : Principe général de l'hybridation fluorescente *in situ* (d'après Matze 2007)

1.1.2 Application de la FISH pour l'identification des points de cassures

La marche sur le chromosome

Une approche efficace pour identifier les points de cassure d'un remaniement chromosomique est la « marche sur le chromosome », technique de référence basée sur la FISH principalement à l'aide de sondes BAC (Tsukamoto K, et al. 1992).

Cette stratégie nécessite la réalisation d'un caryotype, afin d'identifier au mieux les régions chromosomiques contenant les points de cassure, puis de techniques de FISH itératives. Les sondes sont choisies de part et d'autre des points de cassure théoriques. A chaque hybridation, la position des sondes utilisées est qualifiée sur le dérivé chromosomique et le chromosome normal permettant ainsi de choisir de nouvelles sondes jusqu'à encadrer, voire chevaucher, le point de cassure à déterminer. La Figure 24 ci-dessous représente le principe de cette technique.

Bien que cette approche soit abordable tant sur la faisabilité au laboratoire que sur le plan financier, elle pose plusieurs problèmes :

- * de nombreuses sondes doivent être utilisées avant d'identifier à la sonde près le point de cassure, d'où l'emploi principalement de sondes non commerciales et la nécessité de disposer d'une banque de sondes couvrant tout le génome dans le laboratoire,
- * cette technique peut prendre plusieurs mois (fabrication des sondes, FISH itératives...),
- * et, la quantité de matériel chromosomique du patient doit être suffisante, la méthode se faisant séquentiellement ; dans les cas limites, il est parfois nécessaire de déshybrider des lames pour tester de nouvelles sondes (cf. Annexe 3). L'existence d'une lignée cellulaire immortalisée du patient permet de pallier ce problème.

Nous avons employé cette approche chez 3 patients :

- * Patient 10 : pour nous aider à l'interprétation des résultats du séquençage haut débit,
- * Patients 11 et 12 : pour rechercher les points de cassure à la suite de la difficulté d'interprétation des résultats de WGS et en l'absence de lignées cellulaires pour ces patients. En effet, les chromosomes impliqués dans les translocations chez ces patients étant différents, nous avons pris l'option de mélanger leur ADN afin de les étudier par WGS ensemble, non seulement pour réduire le coût mais aussi pour étudier la faisabilité de cette approche. Nous expliquons ce choix dans le § 2.3 le chapitre Méthodes mises en œuvre.

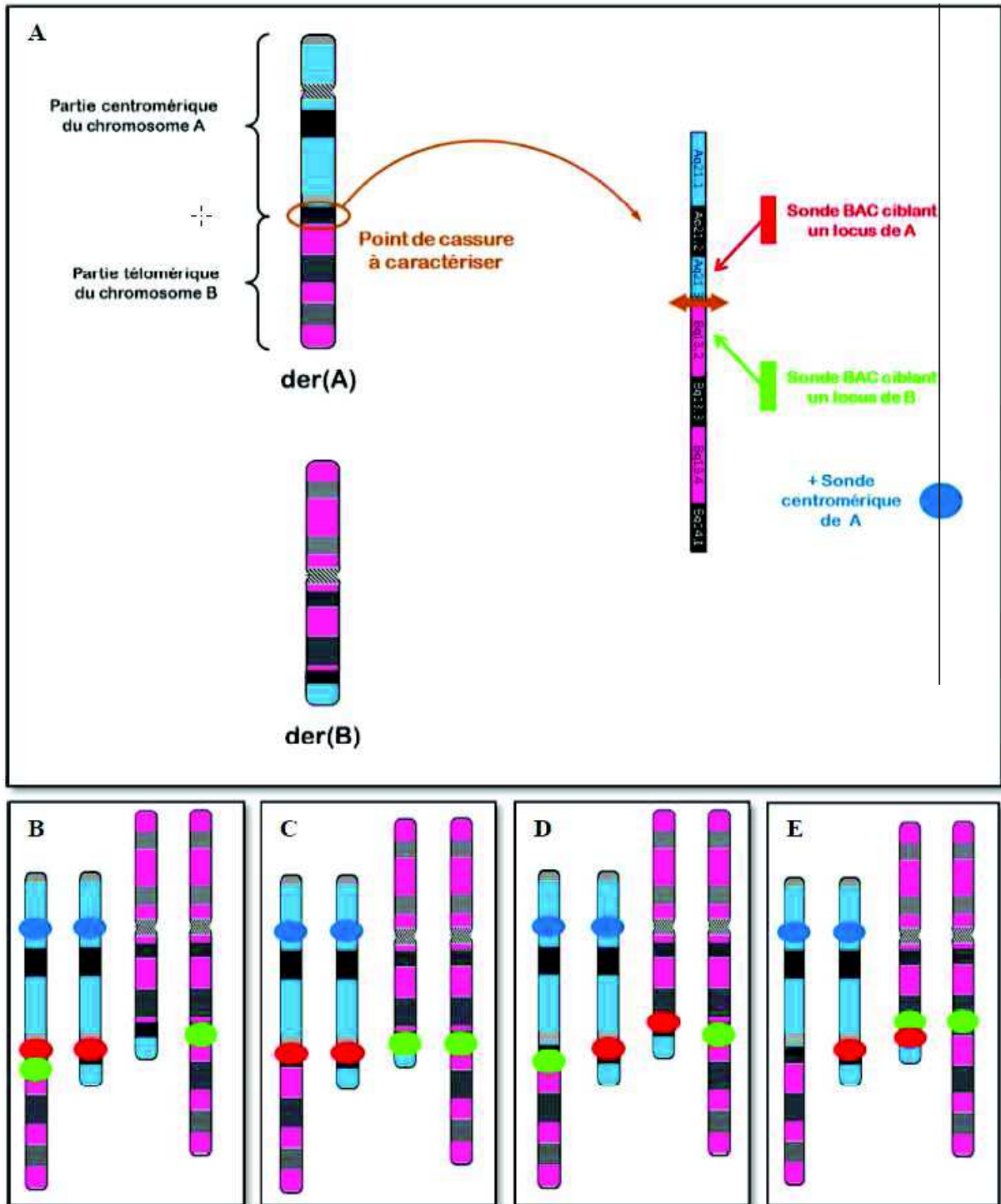


Figure 24 : Principe de la marche sur le chromosome et interprétation des signaux FISH (d'après Gatinois V. 2012) :

- A- Choix des sondes *locus*-spécifiques de type BAC
- B- Sondes « A » et « B » encadrent bien le point de cassure sur der(A)
- C- Sonde « B » trop centromérique (en amont du point de cassure)
- D- Sonde « A » trop télomérique (en aval du point de cassure)
- E- Les 2 sondes « A » et « B » sont mal positionnées pour le dérivé A : « A » trop télomérique, et « B » trop centromérique, mais encadrent le point de cassure sur le dérivé B.

1.1.3 Sondes à façon utilisées dans le cadre de la recherche

Ces sondes sont fabriquées à façon au sein du laboratoire à partir d'une banque de sondes où le fragment d'ADN d'intérêt a été cloné à l'intérieur d'un vecteur comme un chromosome artificiel de phage (PAC), de bactérie (BAC) ou de levure (YAC). Les sondes BAC sont les sondes qui sont les plus utilisées, notamment dans notre laboratoire.

La fabrication des sondes BAC pour la FISH comprend plusieurs étapes :

- 1- Mise en culture des colonies de bactéries,
- 2- Extraction de l'ADN,
- 3- Marquage de la sonde par une technique de Nick-translation, qui correspond à une coupure enzymatique monobrin aléatoire par la DNase I suivie d'une réparation des cassures par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*Escherichia coli* ; celui-ci a conservé une activité 5'-3' polymérase et une activité 3'-5' exonucléase ce qui permet, au moment de la synthèse du brin, l'insertion compétitive de nucléotides marqués :
 - indirectement par la biotine ou la digoxigénine (une étape de révélation par des anticorps anti-biotine ou anti-digoxigénine couplés à un fluorochrome est alors indispensable),
 - ou directement par un fluorochrome.

Le principe de la fabrication des sondes à façon est représenté sur la Figure 25 ci-dessous (d'après Gatinois V. 2012).

Le protocole de fabrication de ces sondes est décrit dans l'annexe 4 et celui correspondant aux particularités techniques de la FISH dans l'annexe 5.

Les sondes ont été choisies à l'aide de la base de données Ensembl (<http://feb2014.archive.ensembl.org/index.html>), (séquence humaine de référence : hg19) qui permet de visualiser notamment l'ensemble des sondes disponibles dans la région d'intérêt, de même que la bande chromosomique, la distance physique sur le chromosome et les gènes.

La liste des BAC utilisés dans ce travail est dans l'Annexe 6.

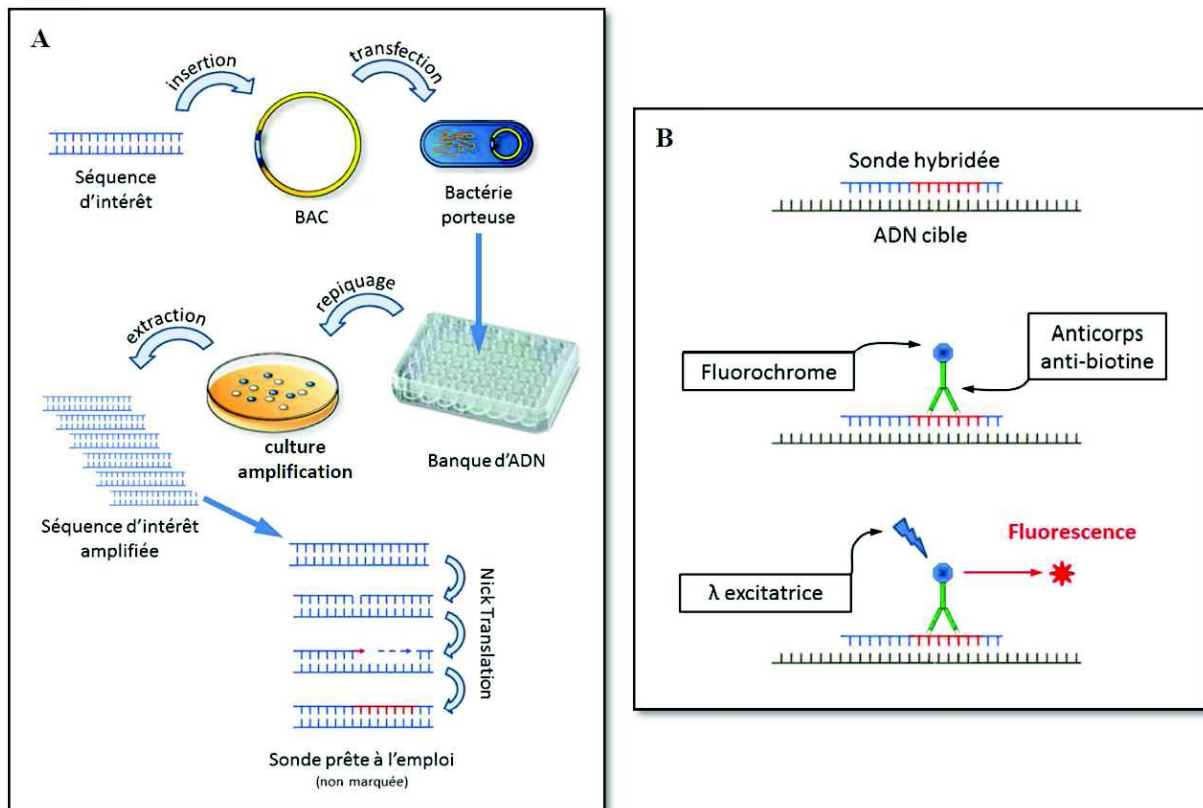


Figure 25 : A- Principe du clonage, de l'amplification, de la fabrication et du marquage des sondes à façon

B- Après hybridation d'une sonde marquée indirectement, la révélation du signal nécessite l'utilisation d'un anticorps fluorescent.

1.2 Analyse chromosomique sur puces à ADN ou ACPA

Pour expliquer le phénotype du patient, la recherche d'un déséquilibre génomique est réalisée en première intention si aucun diagnostic étiologique n'est suspecté cliniquement (Miller DT, et al. 2010). Dans ce contexte, l'ACPA est indiquée afin d'identifier des anomalies chromosomiques déséquilibrées, principalement infracytogénétiques, correspondant à des Variations du Nombre de Copies (CNV), par une étude quantitative du génome entier. Tout CNV observé est interprété par un cytogénéticien, afin d'en définir le caractère pathogène ou non. De façon schématique, 3 catégories de CNV sont décrits dans la littérature (Miller DT, et al. 2010, Kearney HM, et al. 2011), même si parfois les limites entre elles peuvent ne pas être nettes :

* les CNV dits bénins : ce sont de simples polymorphismes ou variants familiaux considérés comme non responsables du phénotype, ou retrouvés fréquemment dans la population générale ;

* les CNV dits pathogènes : ce sont des déséquilibres qui sont considérés comme responsables du phénotype du patient ;

* et les VOUS (Variant Of Uncertain clinical Significance ou variant de signification clinique inconnue) dont la pathogénicité potentielle et l'implication dans le phénotype du patient sont incertaines ou inconnues, avec les connaissances actuelles.

Cette analyse pangénomique permet la détection de déséquilibres infracytogénétiques. La taille des CNV observée dépend de la résolution de la puce utilisée et du paramétrage de segmentation choisi. Les limites de cette approche sont la non-détection des remaniements chromosomiques équilibrés, les faibles mosaïques chromosomiques et les mutations ponctuelles. Le principe général repose sur la technique de CGH et fait appel à l'hybridation de l'ADN du patient marqué sur des sondes oligonucléotiques fixées sur un support de verre en compétition avec un ADN témoin marqué avec un fluorochrome différent (aCGH) ou analysée informatiquement contre une base de données d'individus considérés comme normaux (pseudo-CGH).

1.2.1 Les différents types de puces

Il existe 2 types de sondes oligonucléotidiques :

* Les Copy Number (CN) représentant le nombre de copies. Ce sont des marqueurs monomorphes, qui évaluent uniquement le nombre de copies. Ils sont potentiellement très nombreux et régulièrement espacés le long du génome, permettant une étude du génome en haute résolution.

* Et les Single Nucleotide Polymorphism (SNP) correspondant au polymorphisme d'un seul nucléotide. Dans le cas des puces, ce sont des marqueurs génétiques bi-alléliques permettant de faire un génotypage (distinction entre les individus, étude de la ségrégation intrafamiliale, recherche d'une perte d'hétérozygotie) et de déterminer aussi le nombre de copies. Leur variation porte sur un seul nucléotide de la séquence et non sur la longueur d'une répétition nucléotidique. Leur nombre important (plusieurs millions) et leur répartition irrégulière le long du génome permettent de réaliser une cartographie à haute résolution. La quantité d'informations disponible est ainsi augmentée rendant possible les études d'association ou de liaison d'un phénotype ou d'un caractère, notamment pour les maladies complexes (The International HapMap Consortium, 2005).

Le format des puces est défini en fonction du nombre de sondes cibles qui spécifient la résolution potentielle et qui sont sélectionnées de façon plus ou moins régulièrement espacée tout le long du génome. Ainsi, les puces sont pangénomiques et peuvent être particulièrement enrichies dans certaines régions d'intérêt (gènes, régions ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays), syndromes cytogénétiques connus, ...).

Le principe de cette méthode repose sur la quantification des marqueurs CN et/ou des marqueurs SNP. Cette étude est réalisée à partir d'un échantillon d'ADN (donc sur le génome entier) hybridé sur une puce sur laquelle ont été synthétisés *in situ* à haute densité des oligonucléotides spécifiques. Il s'agit d'une hybridation allèle-spécifique (Matsuzaki H, et al. 2004).

Au CHRU de Montpellier, nous avons accès à 2 plateformes de puces à ADN :

* Agilent (puces CN 60K), localisée dans le Laboratoire de Génétique Chromosomique à l'hôpital Arnaud de Villeneuve (Département de Génétique Médicale : Pr David Geneviève), financée localement par le CHRU,

* et, Affymetrix (puces CN/SNP), localisée à l'Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapie (IMRB) à l'hôpital Saint-Éloi (Plateforme Régionale de Puces ADN très haute densité : Pr Bernard Klein). Dans notre étude, nous avons utilisé cette plateforme avec les formats de lames Affymetrix Human Mapping 500K Array set™, Genome-Wide Human SNP Array 6.0™ et Cytoscan HD™ Array (High Density) permettant une analyse en haute résolution (respectivement 0,5, 1,8 et 2,6 millions de sondes).

L'analyse et l'interprétation ont été réalisées à l'aide du logiciel GTC (GenoTyping Console) pour les puces Human Mapping 500K Array set™ et Genome-Wide Human SNP Array 6.0™ et ChAS (Chromosome Analysis Suite - Affymetrix®) pour la puce Cytoscan HD™, (selon les paramètres d'analyse utilisés et en fonction du phénotype et des connaissances actuelles).

1.2.2 Application de l'ACPA pour cloner un point de cassure

La technique d'Array-Painting

Différentes approches ont été développées pour identifier précisément un point de cassure, afin de suppléer aux inconvénients de la « marche sur le chromosome » par FISH. L'Array-Painting est basée sur l'association de deux techniques : le tri chromosomique suivi d'une ACPA pour chacun des dérivés chromosomiques triés.

Cette stratégie innovante a pour but de créer un déséquilibre chromosomique artificiel en séparant, par CytoMétrie en Flux (CMF), (Fiegler H, et al. 2003) ou par microdissection (Backx L, et al. 2011), de façon plus ou moins pure les dérivés chromosomiques impliqués dans le remaniement. L'ADN extrait de chacune des suspensions chromosomiques déséquilibrées est ensuite étudié sur puce à ADN, afin de caractériser les points de cassure à la résolution la plus élevée possible en fonction de la puce utilisée. Comme il existait une plateforme commune de cytométrie en flux à l'IMRB de Montpellier, nous avons opté pour un tri chromosomique par cette méthode en collaboration avec cet institut.

Le principe de cette technologie est représenté dans la Figure 26 ci-dessous.

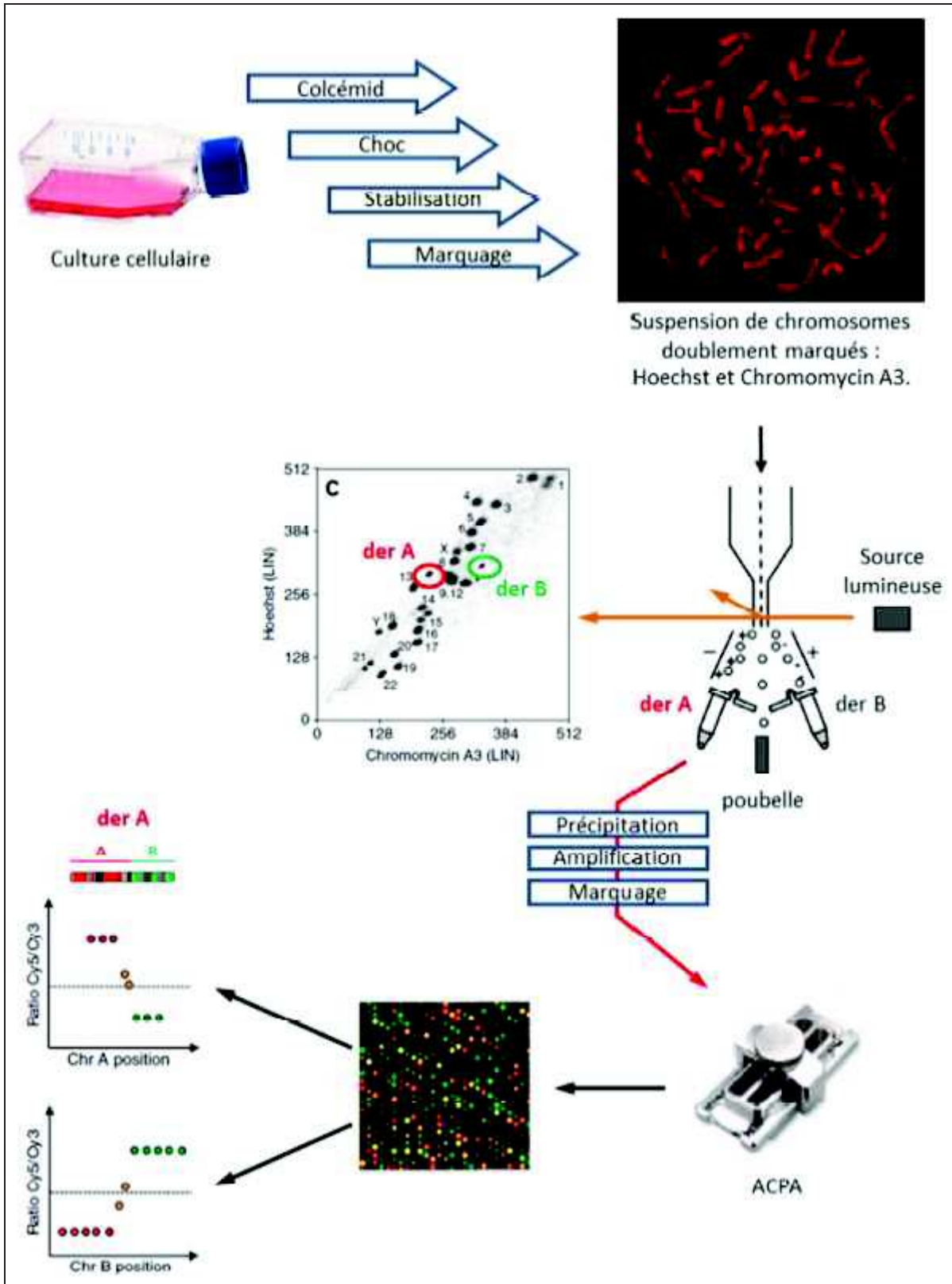


Figure 26 : Principe de l'Array-Painting (selon Gribble SM et al, 2009)

Nous avons suivi le protocole technique décrit dans l'article de Gribble SM et collaborateurs (Gribble SM, et al. 2009), dérivé des travaux de séparation des chromosomes par CMF de Carter NP (Carter NP. 1994) et de l'équipe de Harris P (Harris P, et al. 1985). L'étude se fait à partir des cellules issues d'une lignée lymphocytaire immortalisée par l'EBV (Epstein Barr Virus), qui permet l'obtention d'une importante quantité de matériel ce qui facilite la séparation du ou des chromosomes d'intérêt et ainsi améliore la procédure de tri (Harris P, et al. 1985). Cette étape d'immortalisation a été réalisée dans un laboratoire expert spécialisé : la Banque de génome du Laboratoire de Génétique (Pr Jonveaux, Hôpital de Bradois, CHRU de Nancy). Afin de préparer les suspensions chromosomiques, les lignées lymphoblastoïdes ont été rapatriées dans notre laboratoire pour y être entretenues dans un milieu spécifique dans une étuve à 37°C (degrés Celsius) et une atmosphère de 5 % de CO₂ (dioxyde de Carbone) et contrôlées sous hotte à flux laminaire (cf. Annexe 7). Dès la réception des lignées, il est nécessaire de procéder à un changement du milieu de culture, selon les modalités suivantes :

- * après avoir transféré la totalité du milieu de culture de transport contenant les cellules dans un tube conique de 50ml (millilitre), une centrifugation pendant 5min (minute) à 1200tr/min (tour/min) est réalisée ;
- * le surnageant est alors éliminé par aspiration et le culot est remis précautionneusement en suspension dans 10ml de milieu de culture reconstitué ;
- * cette suspension peut alors être transférée dans un flacon de culture de 25cm² qui est placé à l'étuve à 37°C et 5 % de CO₂.

L'entretien des lignées se fait par un changement de milieu 2 fois par semaine en suivant les étapes ci-dessous :

- * la totalité de la suspension cellulaire est transférée dans un tube conique de 15ml ou de 50ml en fonction du volume initial pour être centrifugée pendant 5min à 1200 tr/min ;
- * le surnageant est alors éliminé par aspiration tandis que le culot est remis doucement en suspension dans un volume de milieu frais équivalent au volume initial, puis transvasé dans un flacon de culture de 25cm² ou de 75cm² en fonction du volume qui est placé à l'étuve à 37°C et 5 % de CO₂.

A partir de ces lignées, la suspension chromosomique est préparée en transférant la culture cellulaire dans un tube conique de 50ml pour être centrifugée pendant 5min à 289g à Température Ambiante (TA). Seul le culot cellulaire est conservé en éliminant précautionneusement le surnageant puis en plaçant le tube à l'envers sur un papier absorbant pour éliminer le maximum de milieu de culture. Le culot est alors resuspendu doucement dans

5ml de solution hypotonique avec une pipette en plastique et incubé durant 15min à TA. Ensuite les cellules sont centrifugées pendant 5min à 289g à TA. Le surnageant est alors éliminé et le tube drainé brièvement sur du papier absorbant. Le culot cellulaire est alors remis doucement en suspension dans 3ml de tampon « ice-cold polyamine isolation » puis incubé pendant 10min dans la glace. La suspension est vortexée vigoureusement pendant 10-20s (seconde). Le but est de séparer les chromosomes les uns des autres. La suspension chromosomique peut être centrifugée durant 2min à 201g à TA et le surnageant est filtré à travers un filtre de 20µm dans un tube conique de 15ml, pour retenir les débris cellulaires. La préparation est alors marquée, toute la nuit à 4°C, avec une double coloration à base de Hoechst (concentration finale à 5µg/ml - microgramme/ml), de Chromomycine A3 (concentration finale 50µg/ml) et de Sulfate de Magnésium Heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, concentration finale 10mM - milliMolaire). Avant de passer la suspension chromosomique dans le cytomètre en flux, du citrate de sodium et du sulfite de sodium à une concentration finale de 10mM et 25mM, respectivement, sont additionnés et mélangés doucement à la solution marquée. La suspension chromosomique est placée dans de la glace et à l'obscurité pendant au moins 1h (heure).

A ce niveau, nous relevons plusieurs points critiques :

- 1- Le gonflement des cellules : le temps d'incubation dans la solution hypotonique doit être aussi long que nécessaire mais il faut éviter l'éclatement des cellules ; pour cela, il est important de surveiller cette étape au microscope à contraste de phase par l'examen d'un aliquot d'un mélange de 5µl (microlitre) de suspension cellulaire avec 5µl de réactif coloré « Turck's stain » déposé sur une lame de microscope non recouverte par une lamelle.
- 2- L'index mitotique : il peut être estimé, lors de la surveillance du gonflement des cellules, en comptant la proportion de cellules gonflées grâce au microscope à contraste de phase.
- 3- La séparation des chromosomes : l'absence de chromosomes en grappes (cf. Figure 27 A) et par contraste la présence de chromosomes plus ou moins isolés (cf. Figure 27 B) sont essentielles pour la poursuite de la technique. Cette étape est donc contrôlée avec un microscope à fluorescence pour observer la suspension cellulaire (5µl) additionnée d'iode de propidium (5µl) sur une lame de microscope recouverte d'une lamelle. Si un grand nombre de grappes de chromosomes est observé (les chromosomes semblent adhérer les uns aux autres dans le même champ), il faut continuer de vortexer pendant 20s supplémentaires. Un nouveau contrôle est alors fait pour vérifier l'aspect isolé et intact des chromosomes. Si le nombre de chromosomes libres seuls n'est pas augmenté, la suspension cellulaire est passée à

travers une aiguille de calibre 22,5 en utilisant une seringue de 5ml pour séparer les chromosomes en suspension.

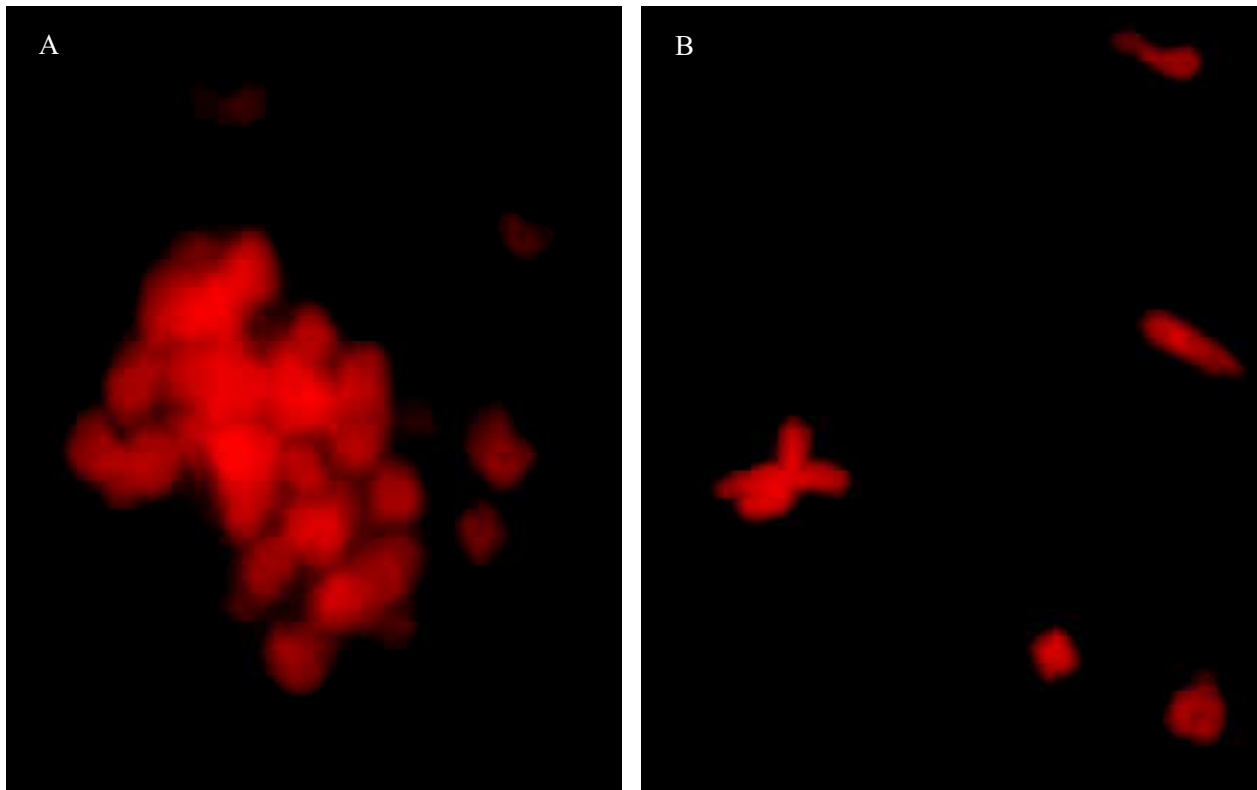


Figure 27 : Marquage de la suspension chromosomique avec de l'iodure de propidium

- A-** Chromosomes en amas
- B-** Chromosomes isolés

Le tri des dérivés chromosomiques (cf. Figure 28) se fait sur un cytomètre en flux en fonction de leur taille, évaluée à l'aide de la table 1 de l'article de Gribble SM et collaborateurs (Gribble SM, et al. 2009). La différence de taille entre les dérivés chromosomiques doit être suffisante pour permettre leur séparation. La plateforme de CMF disponible à l'IRMB (Institute of Regenerative Medicine and Biotherapy) utilise un appareil Atrios® de chez Beckman Coulter®. Les caractéristiques de cet appareil sont les suivantes :

- * le laser UV (Ultra Violet) a une longueur d'onde de 355nm (nanomètre) avec une puissance de 100mW (milliWatt),
- * la buse utilisée est de 100 microns pour une pression de 25 PSI (Pound per Square Inch, unité de pression anglo-saxonne) ou de 70 microns et 60 PSI,
- * et les filtres ont des bandes passantes dont les longueurs d'onde sont de 448/59nm pour le Hoeschst lié, de 620/75nm pour l'Iodure de Propidium et de 692/75nm pour le Hoescht libre.

Pour optimiser la réalisation du tri chromosomique par CMF, il faut réunir plusieurs conditions (Gribble SM, et al. Communication personnelle) :

* la longueur d'onde d'excitation pour la Chromomycine A3 est 457nm avec une détection à l'aide d'un filtre de 490nm,

* et la puissance du laser doit être supérieure à 100mW.

Les chromosomes sont 100 fois plus petits qu'une cellule. Dans ce contexte, la plateforme de CMF de Cambridge utilise un laser UV à une longueur d'onde de 457nm et une puissance de 300mW pour recueillir le signal de ces petites particules. De plus, la température de la pièce contenant l'appareil doit être contrôlée car elle influence la pureté de la solution de sortie (Gribble SM, et al. 2009).

Avant de réaliser une ACPA sur la suspension chromosomique ainsi obtenue, deux étapes préalables sont nécessaires :

1- amplifier le chromosome trié afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour la technique ; pour cela, nous avons suivi le protocole du kit GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA), (Sigma®), qui comprend trois étapes (fragmentation, préparation des banques d'amorces et amplification) dont les deux premières doivent se faire dans la foulée,

2- puis purifier la solution d'ADN amplifié car l'ACPA nécessite un ADN de la meilleure qualité possible ; pour cela, nous avons utilisé les colonnes Amicon® Ultra-0.5 ml Centrifugal Filter Devices.

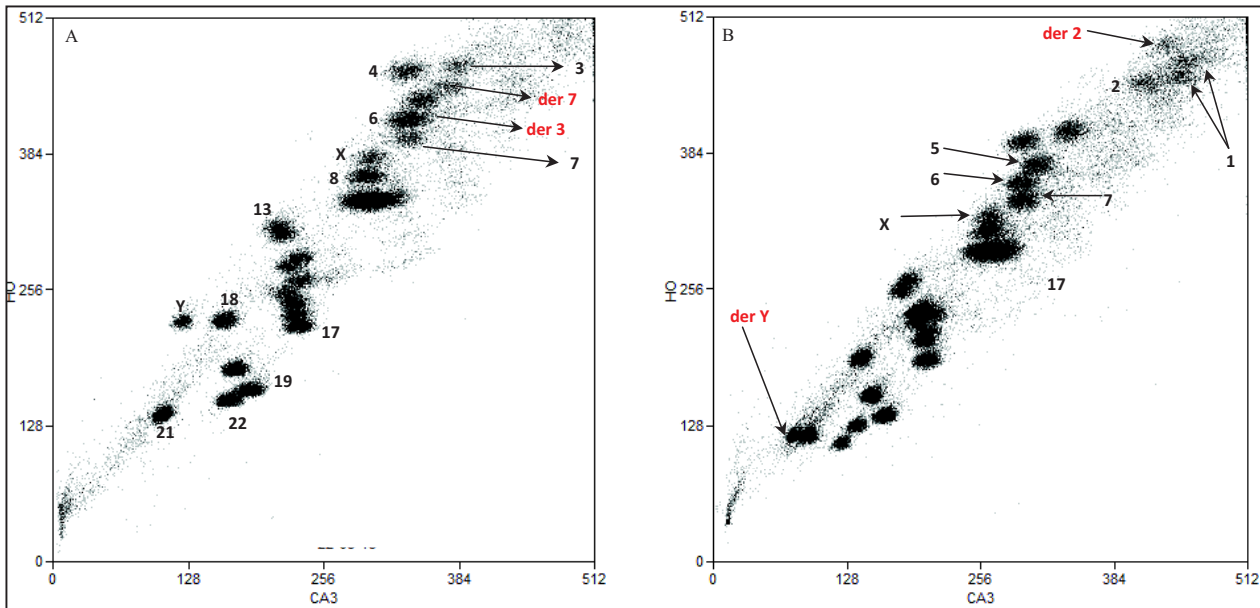


Figure 28 : Exemple de caryogrammes de flux illustrant la séparation des dérivés chromosomiques par CMF :

- A-** séparation des dérivés 3 (165,2 Mb) et 7 (191,80Mb) de la translocation $t(3;7)$ de la Patient 7
- B-** séparation des dérivés Y (~26Mb) et 2 (~276Mb) de la translocation $t(Y;2)$ du Patient 5

La dernière phase de cette technique d'Array-Painting est l'hybridation sur puce à ADN de chacun des dérivés chromosomiques dont la résolution détermine la précision de la localisation du point de cassure. Nous avons choisi la puce Cytoscan HD™ de chez Affymetrix® pour sa haute résolution. En effet, cette puce comporte environ 2,69 millions de marqueurs pour l'analyse du nombre de copies (1953000 CN et 743000 SNP) avec une résolution moyenne globale de 1148pb. Ainsi, les marqueurs composant cette puce sont très proches les uns des autres et la détermination de la zone du point de cassure est alors plus précise (de l'ordre du kb). De plus, cette puce possède une excellente couverture avec une densification des marqueurs au niveau des gènes OMIM (Online Medelian Inheritance in Man Database) et les gènes RefSeq (résolution de 400 à 900pb) pour une analyse cytogénétique la plus complète et pertinente possible. Les caractéristiques de la puce sont décrites via le lien internet ci-dessous :

http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/cytoscan_hd_datasheet.pdf.

Le protocole suivi est celui décrit dans le § 2.2.1 des Méthodes mises en œuvre.

Ainsi, la robustesse de l'Array-Painting est connue en cytogénétique. Cette méthode permet notamment une identification rapide du point de cassure théorique. Cependant, cette approche présente au moins deux contraintes majeures pour son exécution :

- * disposer d'une lignée cellulaire immortalisée et pouvoir l'entretenir localement,
- * et, avoir accès à un cytomètre en flux nécessitant souvent le recours à une unité de recherche. Bien que la plateforme de Montpellier ne réponde pas aux exigences décrites ci-dessus pour réaliser le tri des dérivés chromosomiques, nous avons réalisé initialement plusieurs tests qui ont échoué. C'est pourquoi, nous avons contacté secondairement l'équipe de Gribble SM à Cambridge, qui a accepté de collaborer avec nous.

La recherche des points de cassure des remaniements chromosomiques des Patients 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 12 a été réalisée par la technique d'Array-Painting.

2- TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1 Séquençage type Sanger

Les techniques de cytogénétique, précédemment décrites, mises en œuvre pour caractériser un point de cassure, doivent être complétées par un séquençage afin de le préciser au nucléotide près et non plus à la sonde près comme avec la FISH ou l'ACPA.

Cette approche nécessite :

- 1- une amplification du fragment de jonction supposé contenir le point de cassure par une PCR Longue Distance avec des amorces oligonucléotidiques choisies de part et d'autre du point de cassure hypothétique sur chacun des dérivés chromosomiques (cf. § 2.1.1 du chapitre Méthodes mises en œuvre),

- 2- un séquençage de ce fragment amplifié par la technique classique de Sanger (cf. § 2.1.2 du chapitre Méthodes mises en œuvre),

- 3- et, un alignement des séquences obtenues sur le génome humain de référence par un logiciel d'alignement de séquences de type BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (<http://grch37.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core>).

2.1.1 PCR et PCR Longue Distance

- PCR :

Développée dans les années 1980 (Saiki RK, et al. 1985 ; Green and Sambrook, chapter 7, 2012), la PCR est une technique d'amplification élective d'une séquence d'ADN double brin effectuée *in vitro* par extension de deux amorces, situées de part et d'autre de la région d'intérêt, grâce à une ADN polymérase thermostable. Les amorces sont choisies l'une sur le brin sens et l'autre sur le brin antisens. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation / hybridation / extension qui assure une amplification théoriquement exponentielle de la région désirée.

Les différentes étapes sont schématisées dans la Figure 29 ci-dessous.

L'intérêt de cette méthode est d'amplifier, de façon spécifique en fonction du choix des amorces, n'importe quelle séquence d'ADN. Par ailleurs, la PCR est devenue une technique de base de la biologie moléculaire. Pour nos expériences, nous avons suivi le protocole du kit Master Mix (Promega®).

De nombreuses variantes ont été développées à partir de la technique initiale, notamment la PCR Longue Distance, dont le but est d'amplifier des fragments d'ADN de grande taille (>2kb) avec une fidélité élevée.

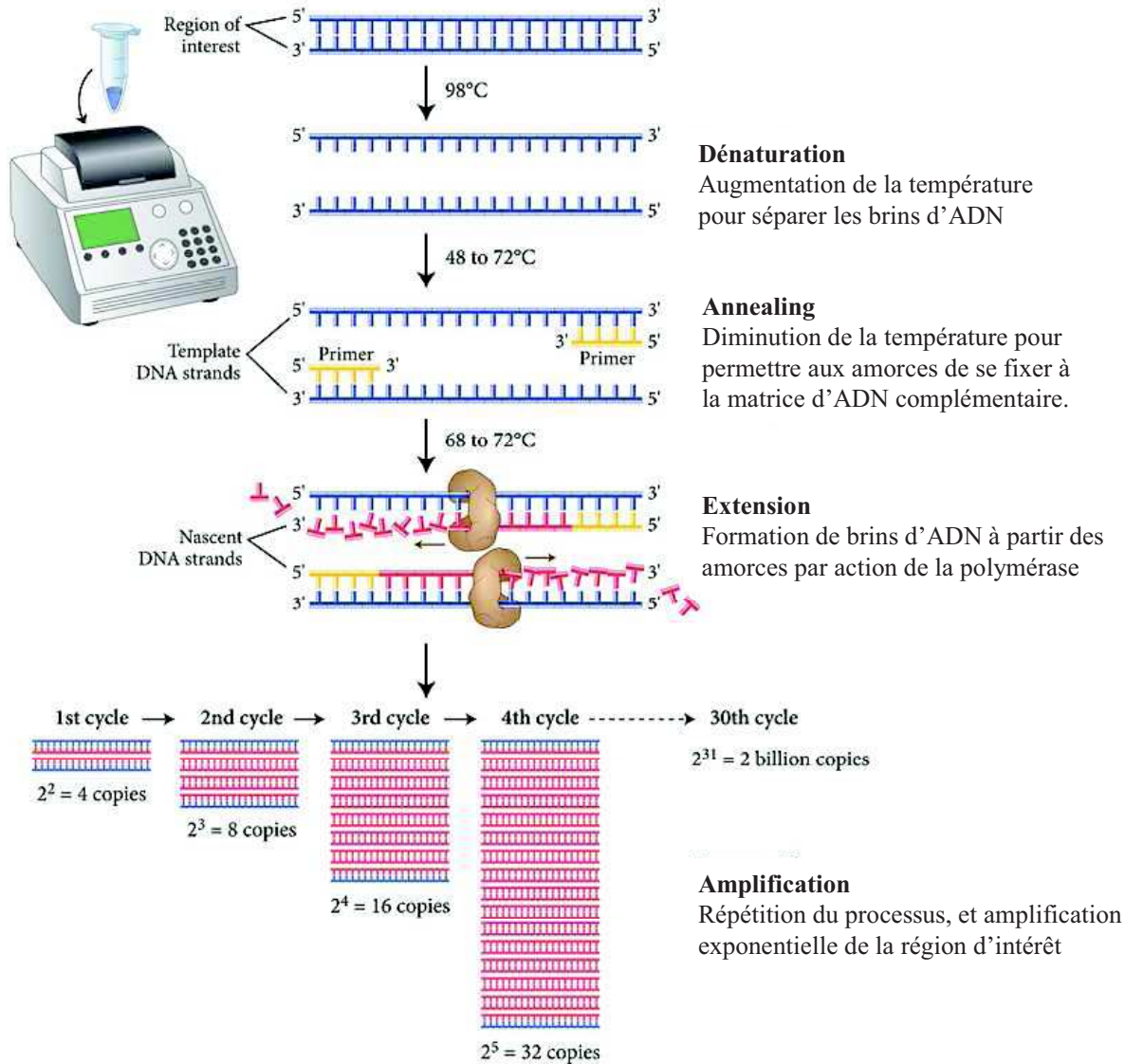


Figure 29 : Les différentes étapes de la PCR

- PCR Longue Distance :

Dans le cadre d'un remaniement chromosomique tel que les translocations, le fragment à amplifier est composé de la jonction/fusion de deux segments provenant de deux chromosomes différents. Ainsi, pour réaliser cette PCR, les amorces sens et anti-sens doivent hybrider sur deux chromosomes différents ; elles sont choisies après l'identification préalable du point de cassure théorique à l'aide de techniques telles que la marche sur le chromosome par FISH (cf. § 1.1.2 des Méthodes mises en œuvre), l'Array-Painting (cf. § 1.2.2 des Méthodes mises en œuvre) ou encore le WGS (cf. § 2.2 des Méthodes mises en œuvre). Dans ce contexte, le fragment à amplifier peut être d'une grande taille nécessitant une approche plus

complexe que la PCR classique : on parle de PCR Longue Distance. Cette technique de PCR utilise pour l'amplification un mélange de deux Taq polymérases :

- * une ADN polymérase classique pouvant être responsable d'erreurs de lecture,
- * et, une ADN polymérase de haute fidélité corrigeant ces erreurs par une activité exonucléase 3'→5' (Barnes WM. 1994).

Nous avons suivi le protocole du kit GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega®) pour réaliser l'amplification des fragments d'ADN de grande taille.

- Choix des amorces :

Les amorces sont choisies selon les critères suivants :

- * des températures d'hybridation si possible identiques pour un même couple (+/- 2°C),
- * une plus grande richesse en nucléotide G ou C sur leur extrémité 3' pour une meilleure robustesse de l'hybridation,
- * une absence de polymorphisme de type SNP qui rendrait l'hybridation moins robuste,
- * et, une localisation si possible dans des régions non répétées de l'ADN (Line, Sine,...).

De ce fait, nous avons utilisé plusieurs logiciels (Tableau II) en ligne pour la mise en œuvre de cette technique.

Logiciel	Adresse	But
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org	identification des séquences répétées
Primer blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi	choix des amorces (PCR classique)
UCSC In-Silico PCR	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr	Test des amorces

Tableau II : Logiciels utilisés pour choisir les amorces

Dans le cadre de la PCR Longue Distance réalisée pour cloner un point de cassure au niveau des dérivés chromosomiques de translocations, les amorces choisies sont localisées sur deux chromosomes différents. Le couple d'amorces ainsi obtenu répond aux mêmes critères de choix décrits ci-dessus et chaque amorce est testée sur le logiciel en ligne BLASTN® (site internet : <http://grch37.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core>) qui indique l'ensemble des *loci* sur lesquels elles s'hybrident de façon plus ou moins spécifique.

La liste des différentes amorces utilisées dans ce travail est répertoriée dans l'Annexe 8.

2.1.2 Séquençage

Le séquençage de Sanger est une méthode de séquençage de l'ADN basée sur l'incorporation sélective de didésoxynucléotides (ddNTP) par une ADN-polymérase lors de la répllication *in vitro* de l'ADN (Sanger F, Coulson AR. 1975 ; Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977). Ces ddNTP prennent la place des désoxynucléotides (dNTP) et agissent comme des « poisons » terminateurs de chaîne : une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle avec les quatre didésoxyribonucléotides différents en présence de leurs compétiteurs dNTP spécifiques.

Le principe de cette méthode est dans un premier temps d'initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire d'une partie du fragment de PCR à séquencer. La synthèse du brin complémentaire se fait à partir de l'extrémité 3' de l'amorce hybridée grâce au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Cette élongation se fait en présence des quatre dNTP et de l'un des quatre ddNTP marqué qui est en compétition avec le dNTP correspondant. L'incorporation d'un ddNTP dans la séquence bloque la synthèse du fragment et est aléatoire. Les fragments ainsi obtenus sont de taille variable et migrent à des distances différentes sur un gel d'acrylamide (Sanger F, et al. 1977).

La détection des fragments ainsi synthétisés se fait en incorporant un traceur au moment de la répllication dans l'ADN à étudier. Initialement ce traceur (un dNTP ou un ddNTP) était radioactif ; aujourd'hui, on utilise des traceurs fluorescents, attachés aux ddNTP et différents pour chaque ddNTP, ce qui permet de les mélanger dans un même tube. De plus, l'élongation se fait actuellement par une ADN polymérase thermostable pour réaliser la technique sur un thermocycleur.

Cette méthode de séquençage de l'ADN de Sanger est devenue le procédé de référence pour le séquençage de l'ADN en général, et pour le génome humain en particulier (Green and Sambrook, chapter 11, 2012).

Pour notre étude, nous avons suivi le protocole du kit Big Dye Terminator v3.1 (Lifetech®). La réaction de séquence a été passée sur le bioanalyseur ABI3130x2/Genetic Analyser (AppliedBiosystem®). La lecture et l'interprétation ont été faites à l'aide du logiciel SeqScape 2.6 (AppliedBiosystem®) ou Chromas Lite® 2.01 dans le cadre d'un remaniement

chromosomique. Cette technique nous a permis de séquencer les 48 exons codants du gène *KIF1A* (kinesin family member 1A) chez le patient 5 et de cloner au nucléotide près les points de cassure des Patients 6 et 7. Le principe du séquençage type Sanger est représenté dans la Figure 30 ci-dessous.

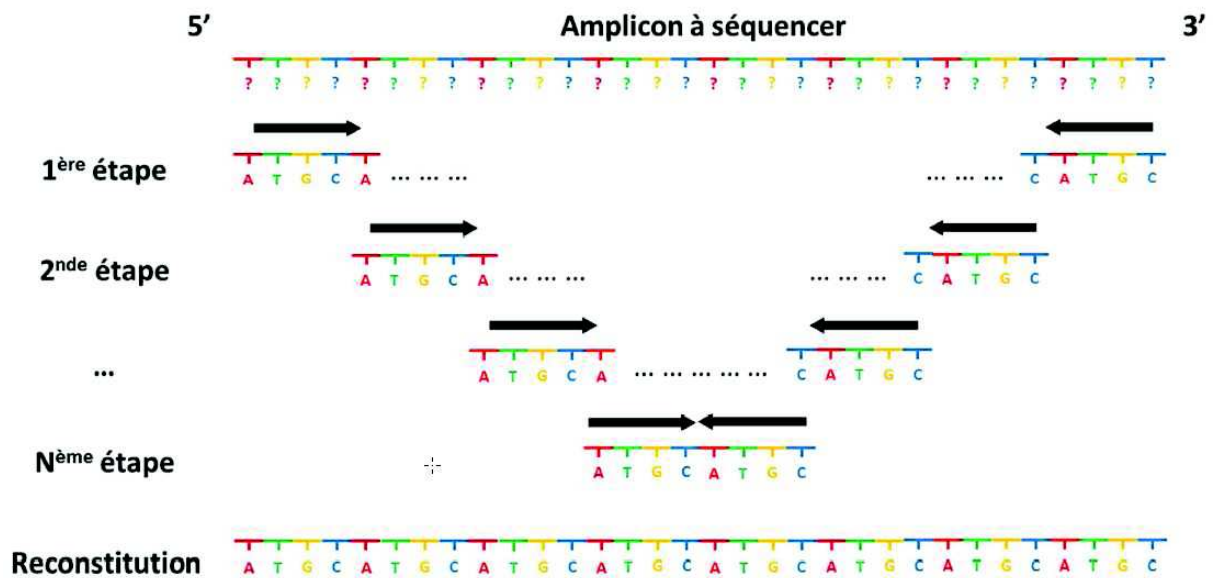


Figure 30 : Stratégie de séquençage d'un amplicon de grande taille, par étape de 400 à 600 pb de façon séquentielle, puis reconstitution de la séquence complète du fragment

2.2 Application du séquençage pour cloner un point de cassure

Next-Generation Sequencing ou NGS

On désigne par séquençage à haut débit, aussi appelé NGS pour Next-Generation Sequencing, un ensemble de méthodes apparues à partir de 2005 produisant des millions de séquences en parallèle en une seule fois.

En fonction de l'approche choisie, les applications sont variables : le séquençage du génome entier, le séquençage de l'exome entier ou le séquençage ciblé de plusieurs gènes, du transcriptome ou des régions régulatrices des gènes.... La recherche des points de cassure d'un remaniement chromosomique fait appel au WGS, c'est-à-dire le séquençage du génome complet d'un patient en une seule fois.

Cette technologie n'est pas encore un examen diagnostique proposé en routine mais elle se développe dans les laboratoires de recherche et certains laboratoires hospitaliers.

Pour la mettre en œuvre, nous avons collaboré avec l'équipe de Laurent Journot (Equipe MGX, Centre National de Recherche Scientifique - Montpellier), (<http://www.mgx.cnrs.fr/project/>). La quantité de matériel demandée est de 10µg d'ADN, dont la concentration et la qualité sont vérifiées à l'aide d'un fluoromètre Qubit® (Life technologies®). Dans un 1^{er} temps, l'ADN est coupé par sonication, les fragments sont liés à un adaptateur grâce à une transposase puis séquencés. L'appareil utilisé est un HiSeq2000 Sequencing System de chez Illumina®, avec la méthode « Sequencing By Synthesis » associée à la « Reverse dye Terminator Chemistry ». Le kit utilisé est Nextera™ de la société Illumina®, dont les avantages sont la rapidité de construction des bibliothèques et une bonne diversité des séquences obtenues.

Quatre approches ont été décrites pour analyser les diverses variations de structure :

- 1- la méthode dite Read-depth qui donne des informations similaires à celles obtenues par ACPA (Yoon S, et al. 2009),
- 2- la méthode dite Read-pair ou paired-end qui est la plus utilisée pour étudier les réarrangements chromosomiques (Korbel JO, et al. 2007),
- 3- la méthode dite Split-read qui a été développée lors du séquençage type Sanger (Mills RE, et al. 2006), qui utilise la longueur de lecture la plus grande mais qui peut détecter des délétions de 1pb à 10kb grâce à l'algorithme de Pindel (Ye K, et al. 2009),
- 4- et enfin, l'association de l'ensemble de ces trois méthodes permettant de détecter en théorie tous les remaniements aussi bien équilibrés que déséquilibrés (Le Scouarnec S, Gribble SM. 2011).

Dans ce travail, les deux extrémités d'un même fragment ont été séquencées sur 100-125 nucléotides ou paired-ends. La qualité des séquences générées a été vérifiée avec le logiciel FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Enfin, l'alignement des séquences sur le génome de référence et la création des fichiers BAM (Binary Alignment Map) ont été réalisés avec l'un ou l'autre des deux algorithmes d'alignement suivants, qui sont complémentaires :

* BWA® (Burrows-Wheeler Alignment) : cet algorithme d'alignement de lecture est basé sur l'utilisation antérieure du logiciel Burrows-Wheeler Transform (BWT), qui permet d'aligner de courtes séquences contre une séquence de référence de grande taille telle celle du génome humain. L'un des principaux avantages du BWA est sa rapidité d'exécution sans perte de précision par rapport aux autres algorithmes développés (Li H, Durbin R. 2009).

* ELAND® (Efficient Large-scale Alignment of Nucleotide Databases) de la suite logicielle CASAVA® (Illumina) : ELAND® permet de faire l'alignement d'une expérience de séquençage par rapport à un génome de référence, d'analyser les variants (et le comptage des lectures pour le séquençage de l'ARN). L'un des principaux avantages de cet algorithme est, notamment, l'identification des insertions, délétions et des réarrangements complexes (http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_genomic_sequence.pdf).

Le principe général du NGS, ainsi que celui d'Illumina®, sont illustrés dans les Figures 31 et 32 ci-dessous. Les différentes étapes, ainsi que la construction de la banque, sont représentées dans la Figure 32 ci-dessous.

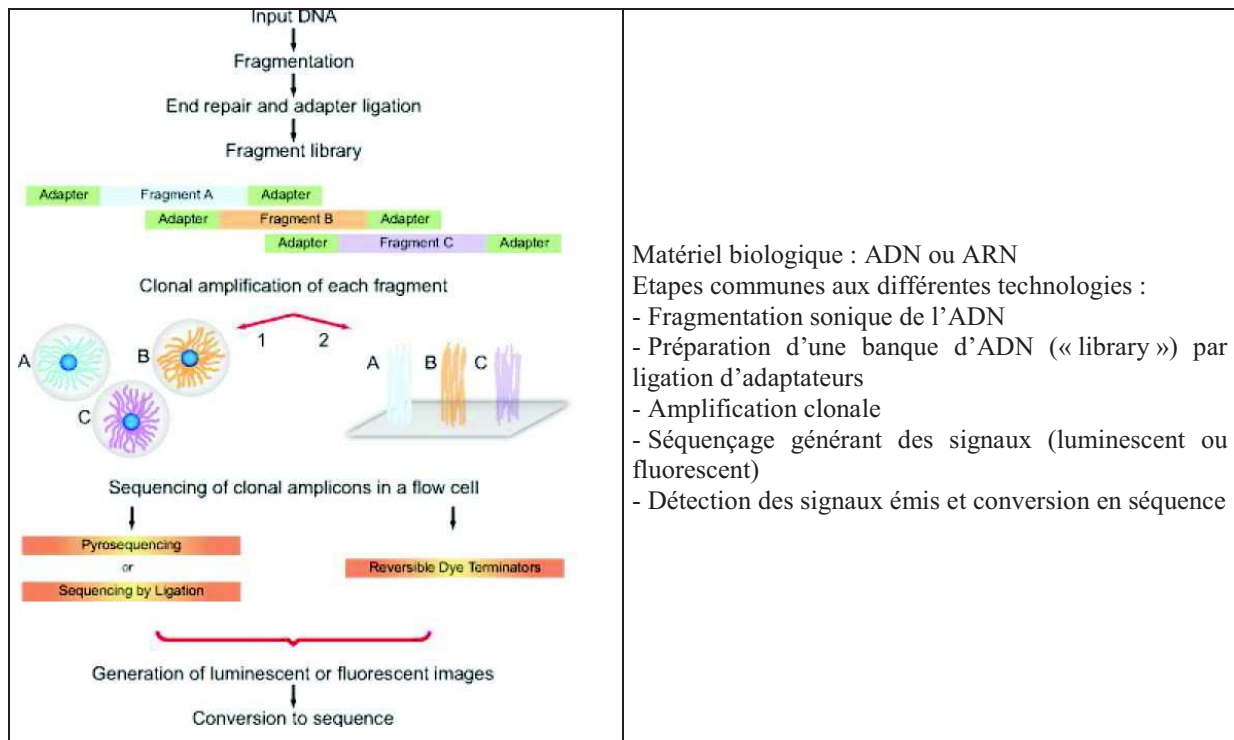


Figure 31 : Principe du NGS : Généralités (selon Voelkerding KV, et al. 2010)

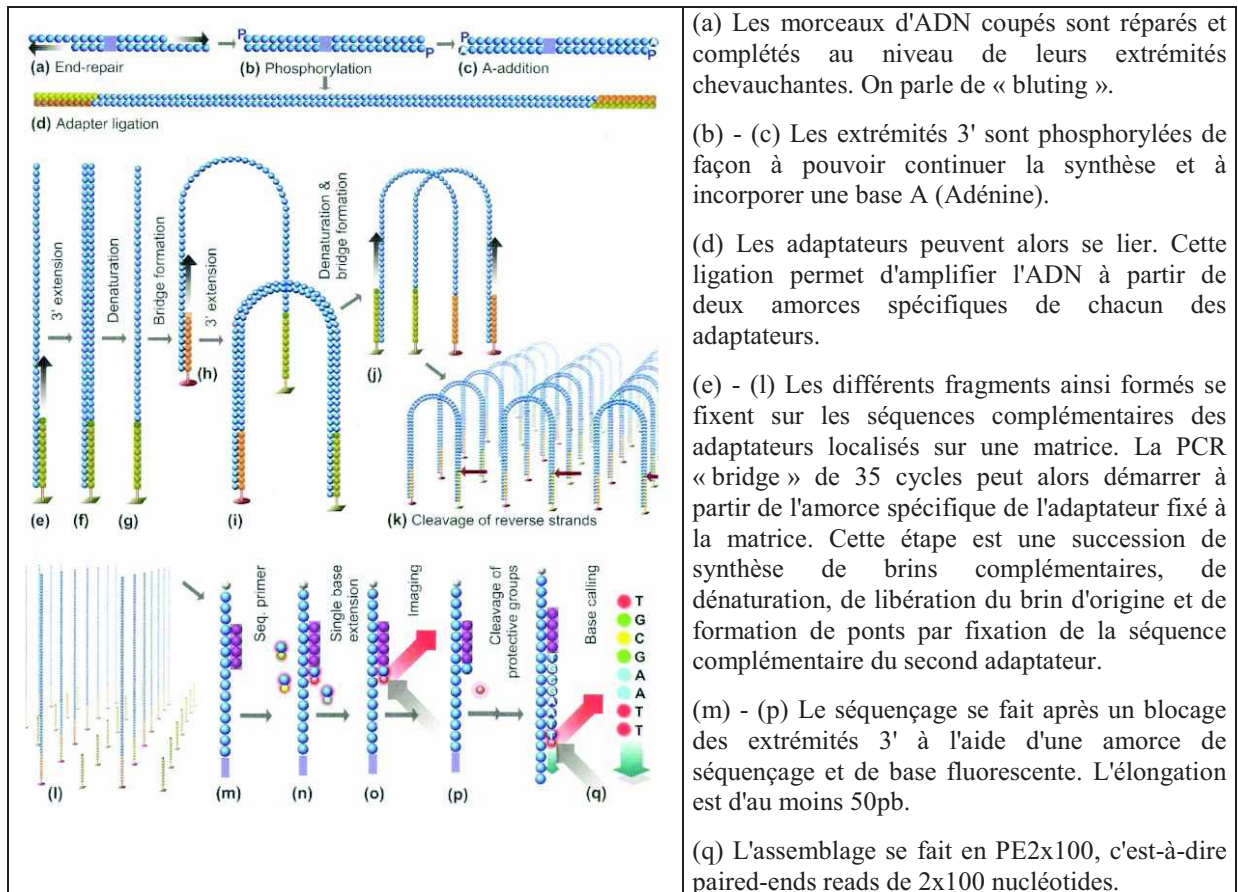


Figure 32 : Les différentes étapes de la technologie Illumina®

Après création des fichiers *.bam (BAM Binary Alignment/Map format = fichier SAM compressé, SAM Sequence Alignment/Map format, format d'alignement générique de séquences) et bam indexés *.bam.bai (Li H, et al. 2009), les données obtenues sont visualisées dans le logiciel « Integrative Genomics Viewer - IGV » (<http://www.broadinstitute.org/igv/home>). Différentes images peuvent être observées en fonction de l'algorithme d'alignement utilisé (BWA ou ELAND). Les figures 33, 34 et 35 ci-dessous représentent plusieurs images recherchées lors de l'analyse des résultats de WGS, comme les séquences que nous avons appelées « arc en ciel » (AEC) ou les séquences dont seule l'une seulement des 2 extrémités est localisée (ENL), qui sont observées avec ELAND.

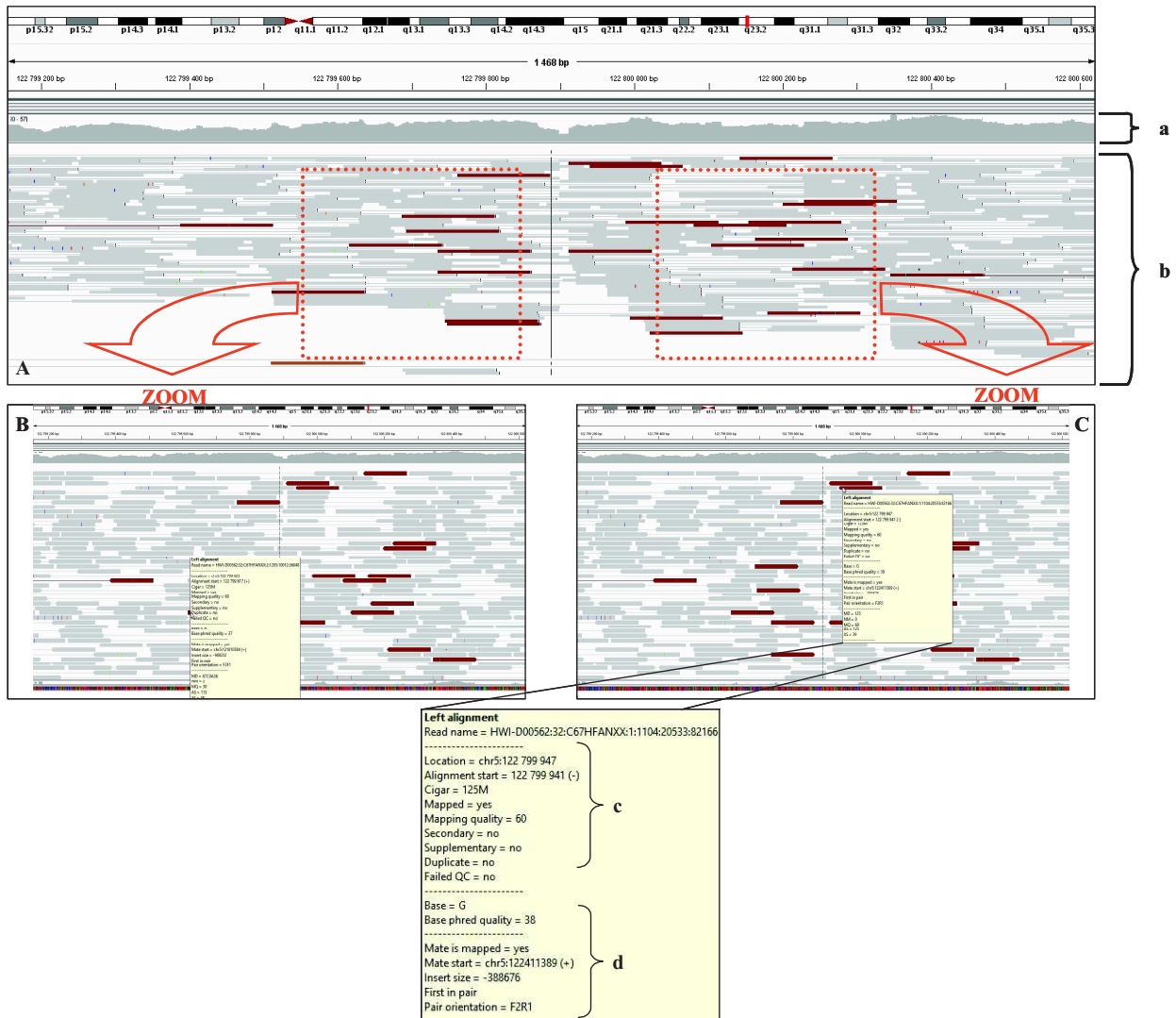


Figure 33 : Représentation graphique avec l'algorithme BWA de 2 remaniements intrachromosomiques sur le chromosome 5 :

- A- image recherchée visuellement significative
- B- zoom sur le remaniement observé à gauche de l'image A
- C- zoom sur le remaniement observé à droite de l'image A
- a- coverage track (couverture et profondeur de lecture)
- b- alignment track (alignement des séquences appariées)
- c- position et paramètres de l'extrémité séquencée du fragment considéré sur l'image C (flèche blanche)
- d- position et paramètres de l'autre extrémité séquencée du fragment considéré sur l'image C (flèche blanche)

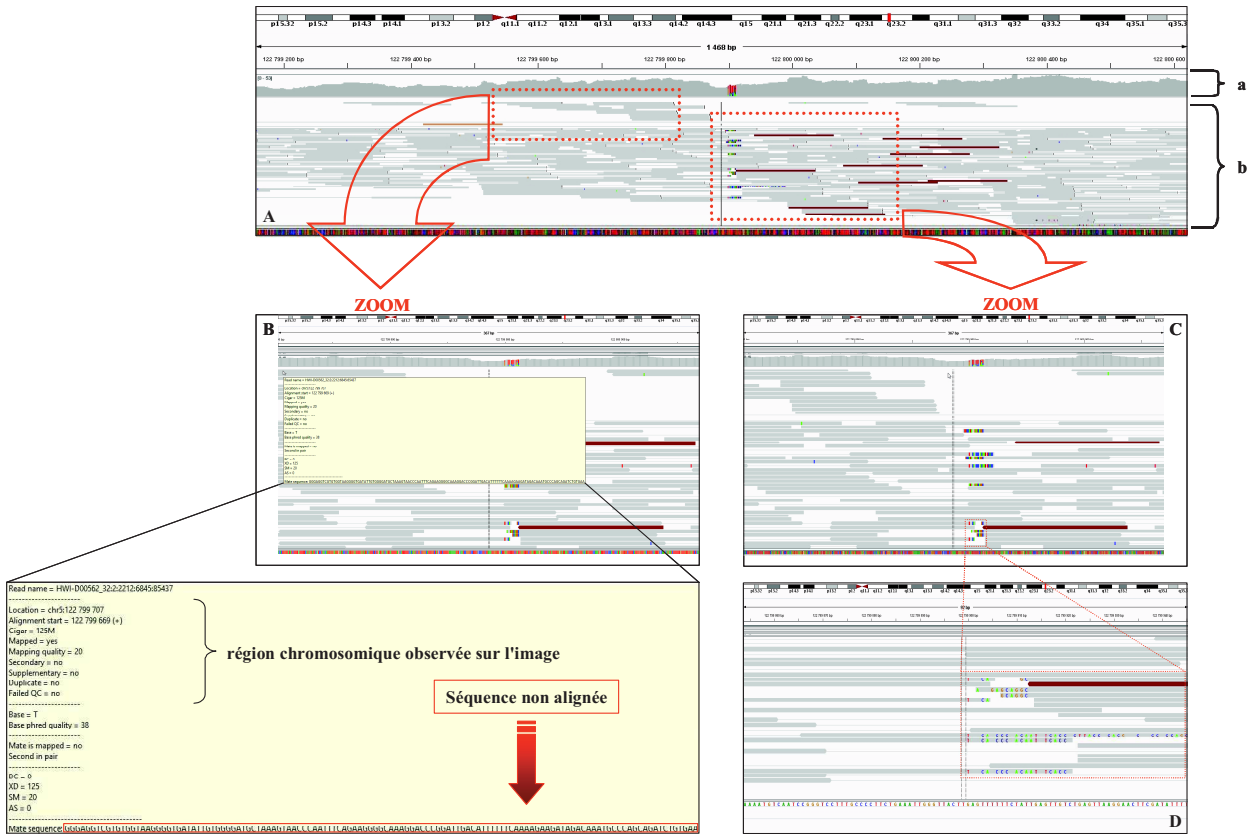


Figure 34 : Représentation graphique avec l'algorithme ELAND de 2 remaniements intrachromosomiques sur le chromosome 5 :

- A- image recherchée visuellement significative
- B- zoom sur les séquences de l'image A dont l'autre extrémité n'est pas localisée (ENL)
- C- zoom sur les séquences « arc en ciel » de l'image A (AEC)
- a- coverage track (couverture et profondeur de lecture)
- b- alignment track (alignement des séquences appariées)
- D- jonction séquence grise et AEC = point de cassure (lignes verticales)

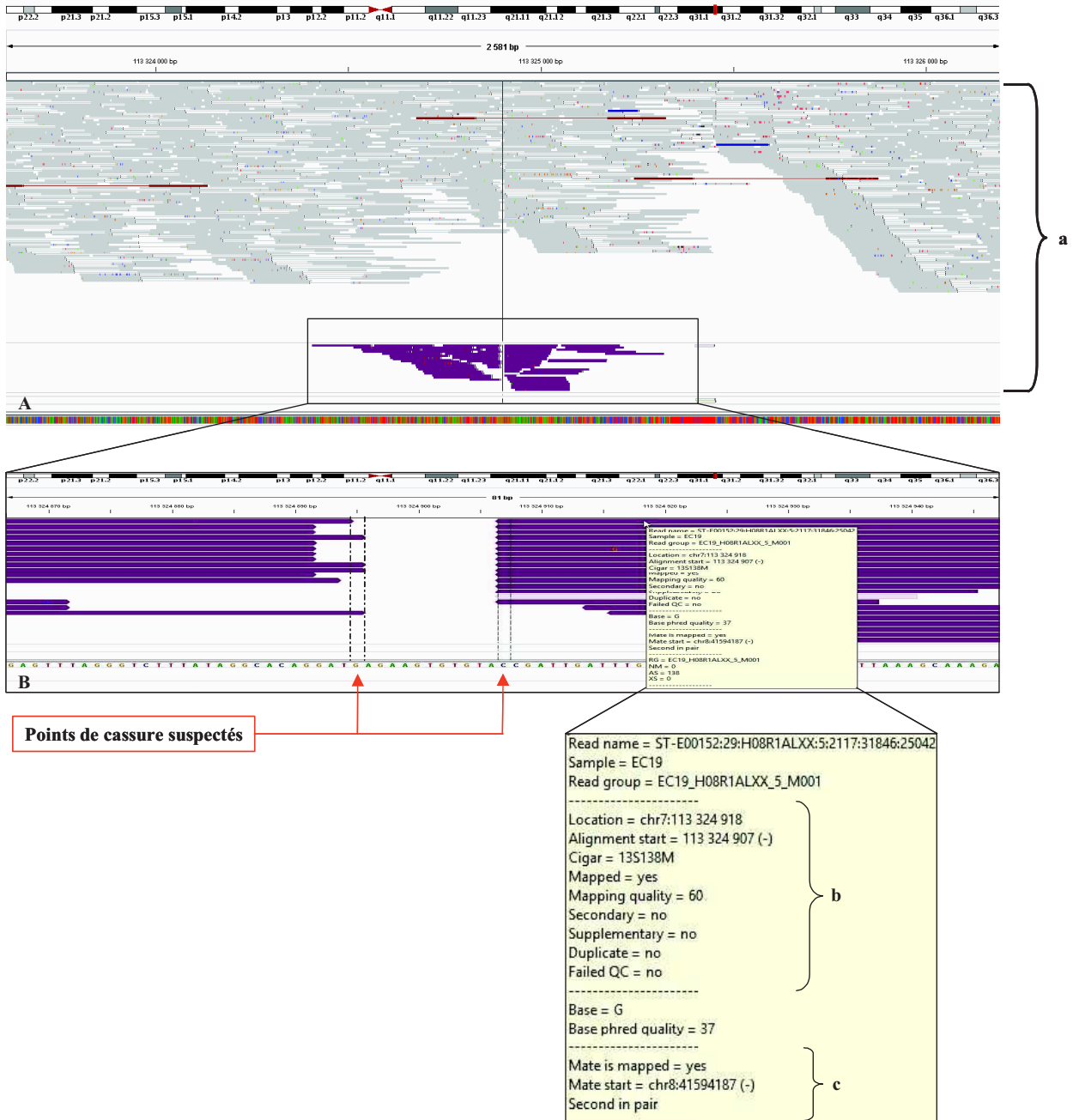


Figure 35 : Représentation graphique avec l'algorithme BWA spécifique d'une translocation réciproque :

- A- image recherchée visuellement significative
- B- zoom sur les séquences d'intérêt
- a- alignment track (alignement des séquences appariées)
- b- position et paramètres de l'extrémité séquencée du fragment considéré sur l'image B (flèche blanche)
- c- position et paramètres de l'autre extrémité séquencée du fragment considéré sur l'image B (flèche blanche)

L'une des limites dans l'interprétation des données est la profondeur de lecture qui correspond au nombre de fois que chaque nucléotide est lu. Ainsi, si nous prenons une profondeur de lecture 10X, nous espérons que la séquence de la région du point de cassure est lue théoriquement 10 fois, soit 5 fois sur le chromosome normal et 5 fois sur le dérivé de la translocation. Après avoir pris conseil auprès de différentes équipes françaises de cytogénétique, nous avons choisi une profondeur de lecture de 10X. Notre choix a été dicté aussi en fonction du coût qui est de 2539€ (euros) incluant les CQ (Contrôle Qualité) des données mais sans l'interprétation.

Dans un premier temps, nous avons étudié les Patients 10, 11 et 12 pour lesquels nous n'avions pas de lignée cellulaire immortalisée pour la technique d'Array-Painting. Les chromosomiques impliqués dans les translocations chez les Patients 11 et 12 étant différents, nous avons pris l'option de mélanger leur ADN afin de les étudier ensemble, non seulement pour réduire le coût de l'expérience mais aussi pour étudier la faisabilité de cette approche. Nous avons espéré obtenir 2 ou 3 séquences pour chaque point de cassure. En effet, en prenant une profondeur de lecture de 10X pour un seul ADN, théoriquement le chromosome normal et le dérivé sont lus 5 fois chacun. Si nous mélangeons deux ADN avec deux translocations différentes $t(A;B)$ et $t(C;D)$, nous supposons que les chromosomes A, B, C et D normaux seront lus 7,5 fois (2,5 fois pour chacun des chromosomes normaux) et les dérivés A, B, C et D seront lus 2,5 fois chacun.

A la suite des résultats obtenus avec les techniques mises en œuvre, nous avons pris l'option de compléter notre étude par la réalisation de WGS chez les Patients 1, 5 et 11. La profondeur de lecture mise en œuvre est de 20X.

2.3 qPCR ou PCR quantitative

La PCR classique est une technique dite en point final, c'est-à-dire que l'ADN est amplifié puis analysé. Elle ne permet pas une approche quantitative car, après un certain nombre de cycles, la réaction entre dans une phase de plateau. En effet, les réactifs deviennent limitatifs avec une perte de l'activité de l'ADN polymérase, une accumulation d'inhibiteurs et une accumulation du produit de PCR qui entre en concurrence avec les amorces.

Cet inconvénient a été résolu en 1992 par le développement de la PCR en temps réel ou PCR quantitative en temps réel ou encore la qPCR par l'équipe de Higuchi (Higuchi R, et al. 1992).

Cette technique permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néoformés à chaque cycle.

Le profil d'une réaction de qPCR est identique à celui d'une PCR classique et se décompose en 3 étapes (cf. Figures 36 et 37) :

- une première étape qui correspond au bruit de fond et qui s'achève lorsque le nombre de produits de PCR est supérieur à la valeur seuil de la technique de détection utilisée,
- puis une étape intermédiaire de phase exponentielle de croissance avec un doublement du nombre de produits de PCR à chaque cycle,
- et, enfin une étape finale de plateau observée lorsque les constituants de la réaction de PCR deviennent limitants en particulier l'enzyme Taq polymérase. Cette enzyme est une ADN polymérase sans activité exonucléasique de correction d'erreur lors de la copie.

Le principe de la qPCR est de mesurer le nombre d'amplicons (qui sont des portions d'ADN définies par un couple d'amorces les encadrant), grâce à la fluorescence émise. Ainsi, la qPCR se base sur la propriété suivante de la PCR : plus il y a de molécules cibles à l'origine, plus le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un nombre déterminé de molécules amplifiées sera réduit. Cette technologie nécessite un thermocycleur particulier dosant la fluorescence en temps réel. On estime qu'il faut environ 10^{10} copies de produits de PCR de taille standard entre 100 et 1000pb pour atteindre le signal seuil qui dépend du nombre de cycles nécessaire, en relation avec la quantité d'ADN initiale. On parle alors de Crossing point (ou Cp) ou de Cycle threshold (ou Ct). Pour chaque échantillon analysé, il y a une relation linéaire, à la base de la quantification, entre la quantité de cibles présentes à l'origine et son Ct (cf. Figure 38).

La qPCR présente un certain nombre d'avantages comme la mesure de la quantité d'acides nucléiques, sa sensibilité et sa capacité à traiter plusieurs échantillons simultanément. Malgré quelques problèmes, notamment de reproductibilité, résolus à l'aide de contrôles externes et internes, cette technologie est utilisée dans de nombreuses applications aussi bien en recherche qu'en diagnostic génétique (Klein D. 2002), comme par exemple la détermination du nombre de copies d'un gène d'intérêt (D'Haene B, et al. 2010).

Pour ce travail, nous avons suivi le protocole du kit qPCR SYBR Green (Roche®) et réalisé la technique sur un thermocycleur LightCycler 480 (Roche®). Les couples d'amorces ont été définis suivant les critères décrits dans le § 2.1.1 du chapitre « Méthodes mises en œuvre », ci-dessus.

Deux patients de cette étude ont bénéficié de cette approche :

- * pour aider à l'identification d'un point de cassure chez le Patient 5,
- * et pour confirmer un déséquilibre observé en puce chez la Patiente 8.

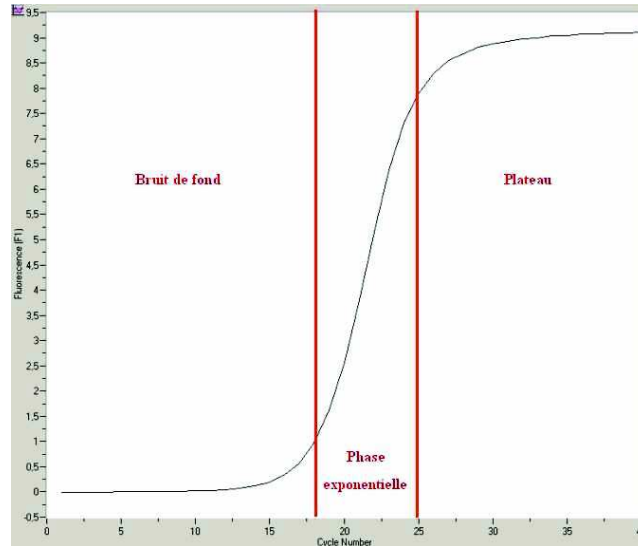


Figure 36 : Les trois phases d'une courbe de qPCR

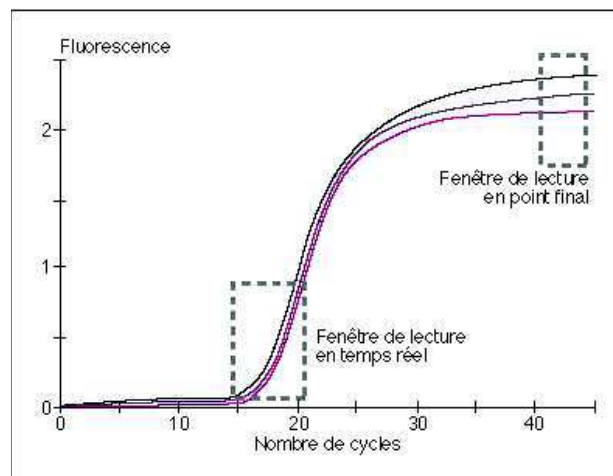


Figure 37 : Représentation point final et temps réel (Collot S et al. 2001) :

Les résultats obtenus pour la même amplification réalisée trois fois sont identiques au début de la phase exponentielle mais peuvent être différents au niveau de la phase de plateau. Par conséquent, l'analyse des données en temps réel est plus exacte que celle en point final.

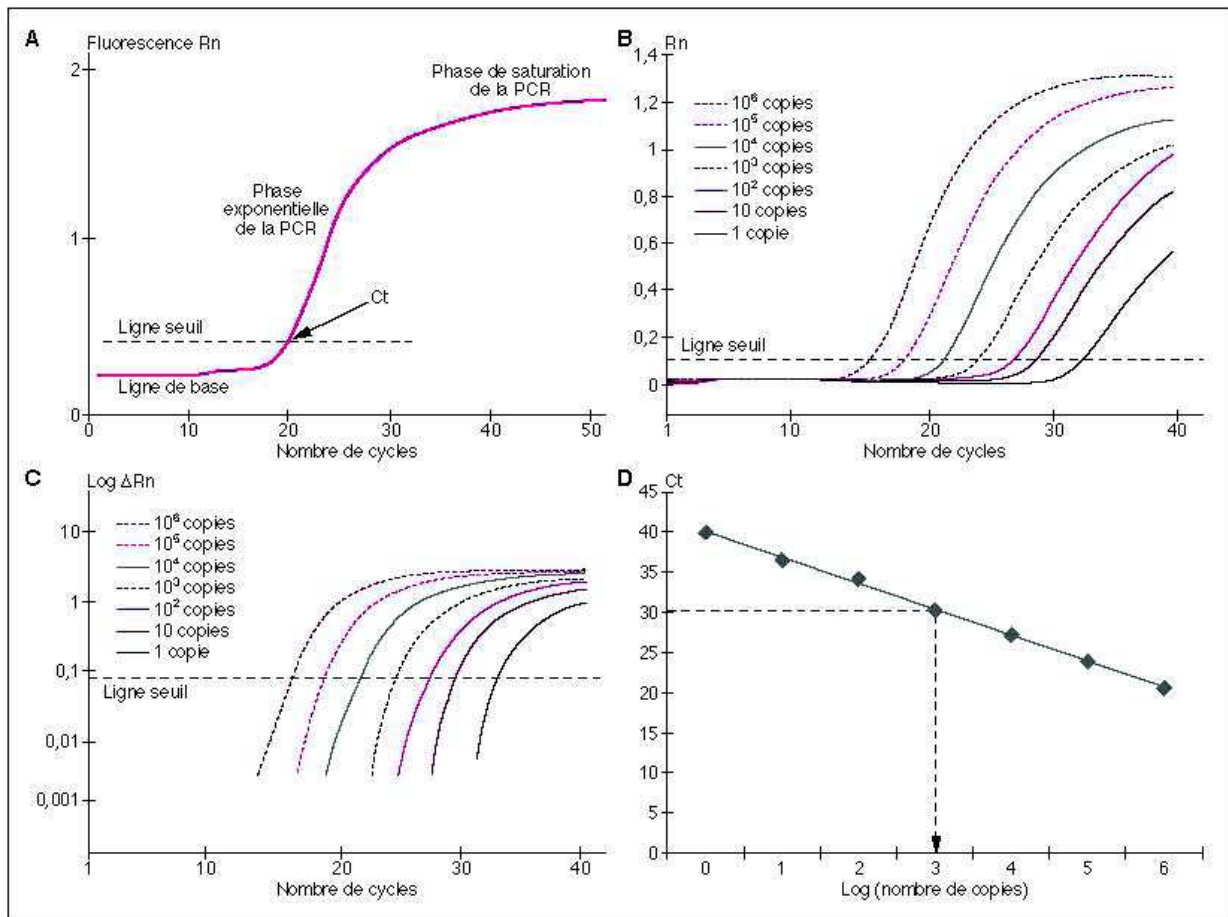


Figure 38 : Représentation graphique de la gamme étalon et de l'établissement du Ct (Collot S et al. 2001) :

A- Courbe sigmoïde d'une amplification. La ligne de base correspond à des variations du signal fluorescent au cours des premiers cycles d'amplification. Une augmentation de la fluorescence au-dessus de cette ligne de base correspond à la détection de produits de PCR accumulés.

B- Courbes d'amplification obtenues avec la gamme standard de concentrations croissantes d'ADN. La ligne de seuil, déterminée arbitrairement, est basée sur la variabilité de la ligne de base. Le paramètre Ct est défini comme le nombre de cycles auxquels la fluorescence passe la ligne de seuil.

C- Mêmes données que B avec le Log du delta Rn (Rn : nombre de copies) *versus* le nombre de cycles.

D- Relation linéaire existant entre le Ct et le nombre de copies de la gamme standard. Pour un échantillon donné, la quantité de cibles est déduite du Ct en se reportant sur la droite D, le calcul étant réalisé par le logiciel du thermocycleur.

2.4 Etude de l'expression des ARN

La méthode standard pour quantifier les ARN est la RT-qPCR (Reverse Transcription qPCR), (VanGuilder HD, et al. 2008). Le but est de mesurer quantitativement l'expression des gènes par la création de cDNA (complementary DeoxyriboNucleic Acid) en utilisant comme matrice l'ARN et comme enzyme la transcriptase inverse. Puis, une qPCR est réalisée selon le principe et le protocole décrits dans le § 2.3 du chapitre « Méthodes mises en œuvre », ci-dessus.

Pour notre étude, nous avons suivi le protocole du kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen®) pour l'extraction des ARN. Le protocole de RT est décrit dans l'Annexe 9. Les réactifs utilisés sont les suivants : M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), Random hexamer primer (Fisher) et dNTP (Fisher).

Les couples d'amorces ont été définis suivant les critères décrits dans le § 2.1.1 du chapitre « Méthodes mises en œuvre », ci-dessus.

L'expression de gènes d'intérêt a été étudiée chez les Patients 5, 6 et 7.

Patients	Phénotype				Translocations <i>de novo</i>	Techniques mises en œuvre				
	RCIU	DI	Troubles (neuro)musculaires	Retard de croissance staturo-pondéral		Malformations	ACPA	MCF	AP	WGS
1	?	+		+	Insuffisance pulmonaire Malformations cardiaques	t(4;9)(q27;p23),t(7;8)(q31.3;p11.2)	✓			✓
2	-	+	Dyspraxie Dyskinésie Hypotonie	+	Souffle cardiaque Strabisme sur amblyopie	t(5;14)(q21;q22)	✓			
3	-	+		-		t(4;5)(p15.1;p14.3)	✓			
4	-	+	Dyspraxie Hypertonie	-		t(2;11)(q32;p14)	✓		✓	
5	-	+	Ataxie Dystonie Epilepsie	-	Cyphoscoliose	t(Y;2)(q11.2;q37)	✓		✓	✓
6	-	+	Epilepsie	-	Troubles ophtalmiques Microcéphalie post-natale	t(3;7)(q11.2;q11.22)	✓		✓	
7	-	+		-		t(3;5)(p26;q13.3)	✓		✓	
8	-	+		-		t(1;14)(q44;q32.2)	✓		✓	
9	-	+		-	Lésions cutanées	t(X;16)(p21.1;q11.2)	✓		✓	
10	-	+	Dyspraxie Discrète ataxie Hypotonie globale Troubles pyramidaux	-		t(3;15;5)(p11;q2?5;q23)	✓	✓	✓	✓
11	-	?		+	Malformations cardiaques Malformations cérébrales Microcéphalie	t(1;10)(q44;p14)	✓	✓		✓
12	-	+	Dystonie	-		t(4;7)(q26 or q27;p15.3)	✓	✓	✓	✓

Tableau III : Récapitulatif des patients et des méthodes mises en œuvre (MCF : marche sur le chromosome par FISH, AP : Array-Painting)

Résultats

Notre cohorte comprend 12 patients porteurs d'une translocation apparemment équilibrée *de novo* et présentant tous un phénotype anormal. Il s'agit d'une étude descriptive et rétrospective sur 11 années.

A la suite de la découverte de la translocation apparemment équilibrée *de novo*, une analyse chromosomique sur puce à ADN a été réalisée et nous avons recherché dans un premier temps un déséquilibre par ACPA et, en fonction du résultat, nous avons tenté de cloner les points de cassure à l'aide des différentes techniques décrites au préalable.

Toutes les positions nucléotidiques notées dans le texte le sont selon la séquence humaine de référence GRCh37 (hg19 - human genome) produite par le Genome Reference Consortium (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/>). Les résultats sont écrits suivant la nomenclature ISCN 2013 (Shaffer L, et al. 2013).

Pour l'ensemble des expériences FISH mises en œuvre dans ce travail, les résultats sont donnés en fonction des sondes utilisées et des limites de la technique. Les sondes notées RP11-* et CTD-* sont des sondes non commerciales utilisées dans le cadre de la recherche provenant de la banque Human 32K clone set (Krzywinski M, et al. 2004). Leurs positions génomiques sont précisées dans l'Annexe 6. Les sondes centromériques non commerciales ont été offertes par le docteur M. Rocchi (Resources for Molecular Cytogenetics, Université de Bari - Italie)

Les résultats observés sont récapitulés dans le tableau XI (page 239).

1- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS ACPA

Dans un premier temps, nous avons recherché un déséquilibre additionnel sur puce à ADN permettant d'expliquer la symptomatologie clinique chez les différents patients de notre cohorte. L'ensemble des échantillons a été analysé sur les puces Affymetrix SNP6.0® excepté pour la Patiente 1 (puce Affymetrix Human Mapping 500K) et pour la Patiente 9 (puce Affymetrix Cytoscan HD®). Suite à l'ACPA, seuls les Patients 1, 2, 3 et 8 ont montré un déséquilibre considéré initialement comme responsable du phénotype.

1.1 Patiente 1

Cette enfant présente une DI associée à un retard de croissance et des malformations cardiaques. Les remaniements observés sur son caryotype sont deux translocations :

- * une translocation impliquant le bras long d'un des 2 chromosomes 4 et le bras court d'un des 2 chromosomes 9 : t(4;9)(q27;p23),
- * et une translocation impliquant le bras long d'un des 2 chromosomes 7 et le bras court d'un des 2 chromosomes 8 : t(7;8)(q31.3;p11.2).

1.1.1 Résultat de l'ACPA

La réalisation d'une puce Affymetrix Human Mapping 500K a mis en évidence une délétion interstitielle d'environ 7,1 Mb dans la région chromosomique 6q24.3q25.2 entre les marqueurs SNP_A-4271559 et SNP_A-1919115 (cf. Figure 39).

La formule cytogénétique est donc la suivante :

arr[hg19] 6q24.3q25.2(146,208,120-153,310,332)x1.

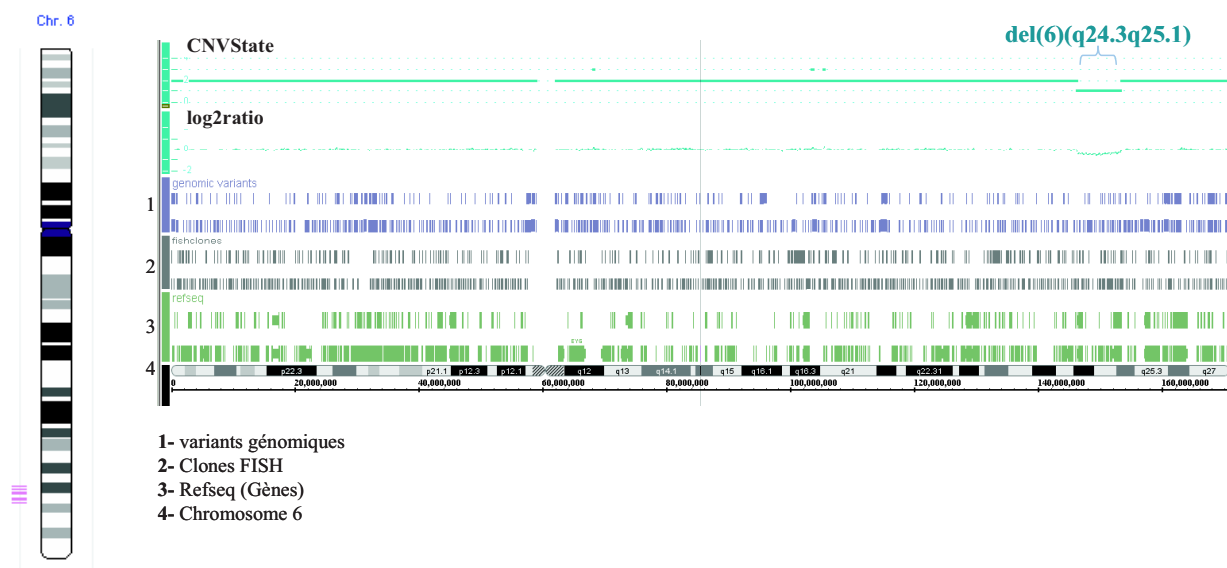


Figure 39 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 6 pour la Patiente 1

1.1.2 Rôle de la délétion interstitielle 6q24.3q25.1 dans le phénotype de la Patiente 1

L'ACPA chez la Patiente 1 a donc mis en évidence une délétion des bandes chromosomiques 6q24.3q25.1 du bras long de l'un des chromosomes 6. Cette observation est cohérente avec celle de l'équipe de Feenstra I, qui indique que la présence d'un déséquilibre additionnel lors d'un RCC peut être retrouvée jusque dans 90 % des cas (Feenstra I, et al. 2011). Le RCC de cette enfant serait donc encore plus complexe et pourrait expliquer son phénotype. En effet, cette microdélétion 6q interstitielle est identifiée comme un syndrome microdélétionnel interstitiel 6q24.2q25.2 depuis 1999 (Sukumar S, et al. 1999).

Entre 1999 et 2008, plusieurs auteurs ont décrits des patients porteurs d'une délétion 6q24.3 dont les signes cliniques varient en fonction de la taille qui s'étend de 2,6Mb (Caselli R, et al. 2007) à 9.2Mb (Nowaczyk MJ, et al. 2008). Dans ce contexte, un nouveau syndrome des gènes contigus de la région 6q24q25 est proposé par l'équipe de Nowaczyk M. Des variations morphologiques mineures y sont associées à un retard de croissance (OMIM - Online Medelian Inheritance in Man Database - #612863). Malgré une grande variabilité dans l'expression clinique dépendante de la variation de la taille de la microdélétion, la plupart des patients présente, comme la Patiente 1, une DI, un retard de croissance, des anomalies cardiaques et des variations morphologiques mineures (Kumar R, et al. 1997 ; Caselli R, et al. 2007 ; Nowaczyk MJ, et al. 2008). Par ailleurs, un retard de croissance intra-utérin est rapporté par ces mêmes auteurs. Cet aspect n'est pas précisé dans le dossier clinique de la Patiente 1 de notre cohorte.

Ainsi, de nombreux autres auteurs ont décrit ce microremaniement et l'équipe de Meloni VA a colligé à partir de 11 articles 17 patients présentant ce syndrome et colligés (Meloni VA, et al. 2014). Une région minimale critique de 300kb a, alors, été identifiée (excluant les patients 1 et 3 de l'article de Nowaczyk MJ et ses collaborateurs de 2008) contenant notamment les gènes *KATNA1* et *LATS1*. Le gène *KATNA1*, (Katanin P60 Subunit A 1), qui est délété chez cette patiente, s'exprime dans le cerveau et les neurones (Karabay A, et al. 2004 ; Toyo-Oka K, et al. 2005). Il pourrait donc représenter un bon gène candidat pour expliquer les problèmes neurologiques. Le gène *LATS1* (large tumor suppressor kinase 1) est décrit comme responsable d'une infertilité et d'un retard de croissance chez les souris « knockout ». Il joue un rôle dans la tumorigénèse et le dysfonctionnement endocrinien (St John MA, et al. 1999). Ce gène pourrait éventuellement expliquer le retard de croissance observé chez les patients délétés comme chez la Patiente 1 (Meloni VA, et al. 2014).

En ce qui concerne les anomalies cardiaques, Meloni VA et ses collaborateurs réduisent la région minimale critique à 93kb qui englobe le gène *TAB2* (en excluant les patients 1 et 3 de l'article de Nowaczyk MJ et ses collaborateurs de 2008 et le cas 3 de l'étude de Nagamani SC et ses collaborateurs en 2009 - Nagamani SC, et al. 2009). *TAB2* (TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2) est probablement le gène candidat responsable des malformations cardiaques congénitales car il joue un rôle à différentes stades du développement du cœur dont la vasculogénèse et la formation des valves (Thienpont B, et al. 2007 ; Thienpont B, et al. 2010).

1.1.3 Conclusion

La perte de fonction (ou l'haplo-insuffisance) de plusieurs gènes contenus dans cette microdélétion, représentée Figure 40, pourrait être responsable de la pathologie de la Patiente 1 au vu de l'ensemble des données de la littérature, malgré une variabilité interindividuelle dans l'expression du phénotype associé. Dans ce contexte, nous avons décidé de vérifier la délétion par FISH (cf. § 2.1.1 du chapitre Résultats).

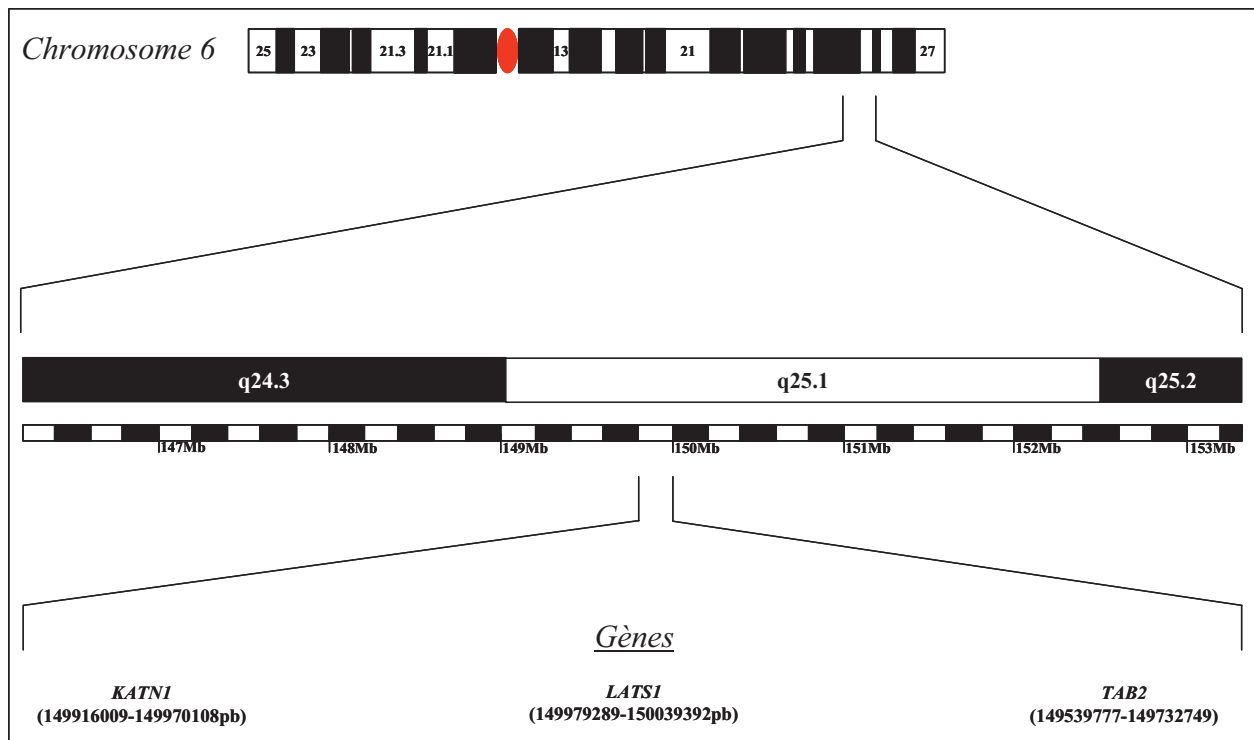


Figure 40 : Représentation graphique de la microdélétion 6q24.3q25.2 de la Patiente 1

1.2 Patient 2

Une DI associée à des troubles ophtalmiques sont les principaux signes cliniques observés chez cet enfant porteur d'une translocation entre le bras long d'un des 2 chromosomes 5 et le bras long d'un des 2 chromosomes 14 : t(5;14)(q21;q22).

1.2.1 Résultat de l'ACPA

La réalisation d'une puce Affymetrix Human SNP array 6.0 a mis en évidence une délétion (perte) interstitielle d'environ 3,58 Mb dans la région chromosomique 14q22.1q22.2 entre les marqueurs SNP_A-8316776 et CN_110516 (cf. Figure 41).

Ainsi, la formule cytogénétique est la suivante :

arr[hg19] 14q22.1q22.2(51,482,560-55,067,440)x1.

Ce remaniement, contenant de nombreux gènes, pourrait être situé au niveau du point de cassure, déterminé en cytogénétique classique sur le dérivé chromosomique du chromosome 14.

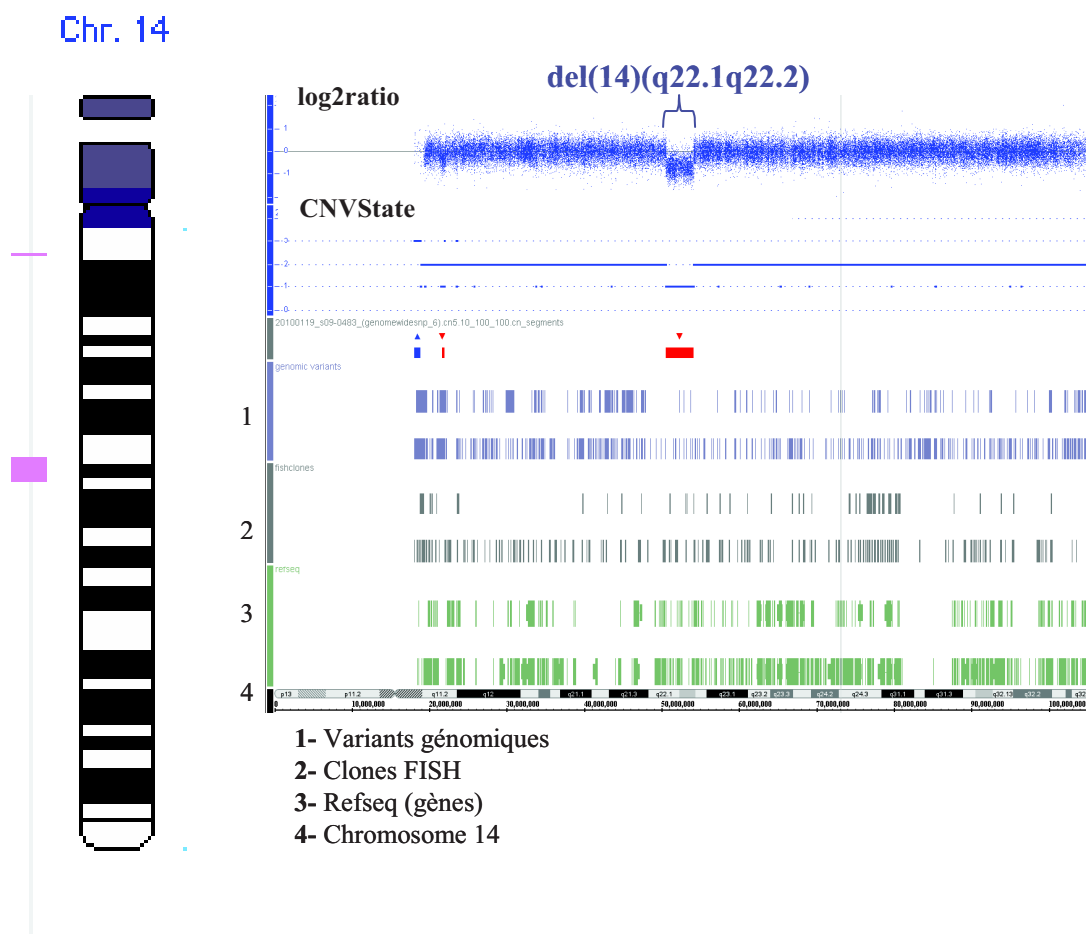


Figure 41 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 14 pour le Patient 2

1.2.2 Rôle de la délétion interstitielle 14q22.1q22.2 dans le phénotype du Patient 2

L'ACPA a permis de mettre en évidence une délétion de la région chromosomique 14q22.1q22.2 du bras long de l'un des chromosomes 14 au niveau du point de cassure de la translocation t(5;14). Ce déséquilibre semble expliquer le phénotype de cet enfant. En effet, celui-ci présente une DI associée à des anomalies ophtalmiques, signes cliniques qui sont retrouvés chez 15 patients porteurs d'une délétion 14q22q23 rapportés dans la revue de la littérature réalisée par l'équipe de Lumaka A (Lumaka A, et al. 2012). L'expression clinique est variable et les anomalies peuvent toucher les yeux, le palais, les membres et le cerveau (Lumaka A, et al. 2012). Les manifestations ophtalmiques peuvent être majeures, comme une microphthalmie ou une anophthalmie, mais sont parfois représentées par une microcornée, une sclérocornée ou un glaucome (Ahmad ME, et al. 2003 ; Hayashi S, et al. 2008 ; Reis LM, et al. 2011). Le Patient 2 de notre cohorte présente des symptômes ophtalmiques correspondant

à un strabisme sur amblyopie. Cet enfant est donc porteur d'une pathologie ophtalmique atypique par rapport aux différentes atteintes décrites dans la littérature.

Le clinicien ne note pas, chez cet enfant, de polydactylie ou de syndactylie qui sont pourtant typiquement décrites dans la littérature (Bennett CP, et al. 1991 ; Ahmad ME, et al. 2003 ; Thienpont B, et al. 2007 ; Hayashi S, et al. 2008). Cependant, ces manifestations cliniques ne sont pas observées chez le patient III-5 de la famille étudiée par l'équipe de Lumaka A en 2012 (Lumaka A, et al. 2012).

Comme chez le Patient 2, des anomalies du palais sont décrites dans les divers articles. Elles sont variables en fonction des patients : palais creux (retrouvé chez le Patient 2) ou fente palatine. Une micrognathie ou une rétrognathie sont aussi rapportées (Reis LM, et al. 2011 ; Lumaka A, et al. 2012).

Aucune malformation du cerveau rapportée dans la littérature (comme l'agénésie du corps calleux ou une hypoplasie pituitaire), (Nolen LD, et al. 2006 ; Lumaka A, et al. 2012) n'est décrite chez le Patient 2. En effet, son IRM cérébrale est considérée comme normale. Cette absence d'anomalie cérébrale est aussi retrouvée chez certains patients de la littérature comme les patients I-1 et II-2 de la famille étudiée par l'équipe de Lumaka A en 2012 (Lumaka A, et al. 2012).

En comparant la clinique du Patient 2 de notre cohorte à celle des cas cliniques de la littérature, nous remarquons que l'expressivité de ce syndrome microdélétionnel est variable aussi bien sur le plan interfamilial qu'intrafamilial (Lumaka A, et al. 2012). Par ailleurs, en 2006, l'équipe de Nolen LD décrit un syndrome des gènes contigus des bandes chromosomiques 14q22q23 dont les signes cliniques sont l'anophtalmie, l'hypoplasie pituitaire et des anomalies des oreilles (Nolen LD, et al. 2006).

Parmi les gènes délétés (cf. Figure 42), nous signalons *BMP4* (bone morphogenetic protein 4) dont les mutations hétérozygotes sont responsables d'une microophtalmie associée à des anomalies cérébrales et des membres (OMIM #607932). Cependant, les adultes d'une même famille qui sont porteurs d'une délétion 14q22.1q22.2 n'ont pas de DI (Lumaka A, et al. 2012). Il serait peut-être intéressant de rechercher un autre gène candidat pour expliquer la DI du Patient 2. Ainsi, *GNG2* (guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2), contenu dans la délétion 14q22.1q22.2 et exprimé dans de nombreux tissus dont le cerveau (MIM #606981 - Modarressi MH, et al. 2000), pourrait être un bon gène candidat. Cependant, aucune donnée dans la littérature n'associe des mutations de ce gène à des patients présentant une DI.

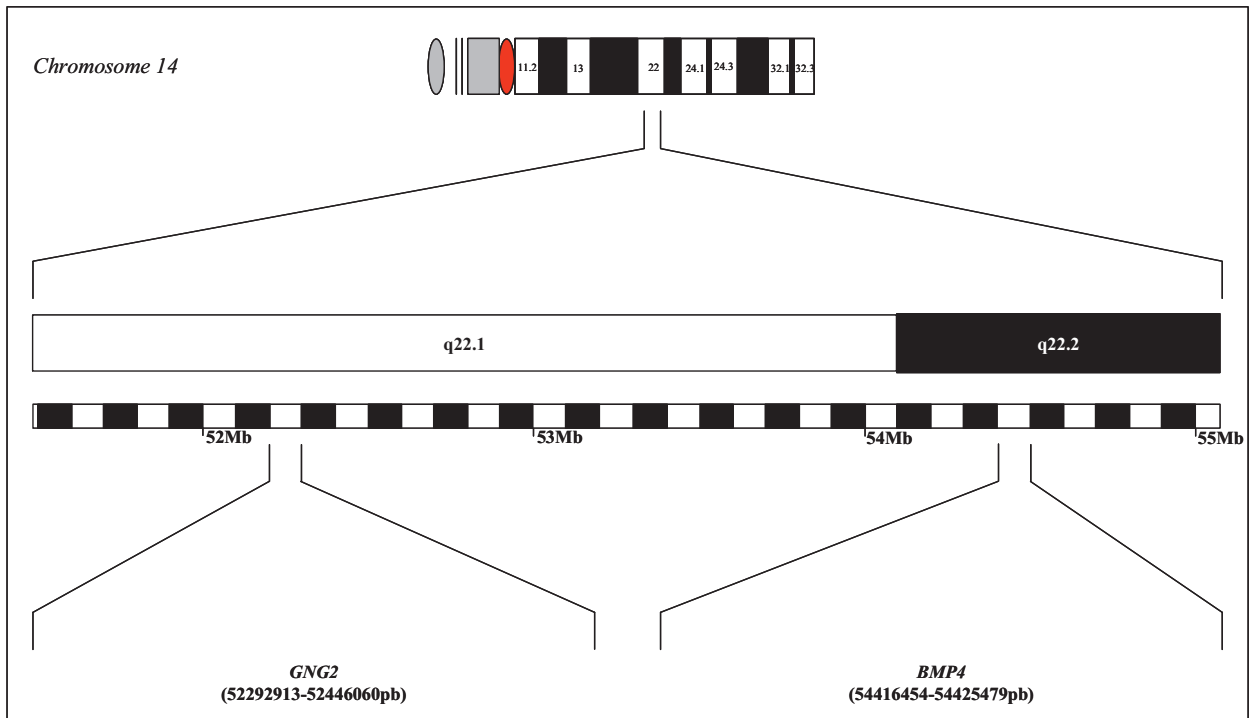


Figure 42 : Représentation graphique de la microdélétion 14q22.1q22.2 du Patient 2

1.2.3 Conclusion

La délétion 14q22.1q22.2 correspond donc à un syndrome microdélétionnel *de novo*, décrit dans la littérature, situé au niveau du point de cassure sur le dérivé 14 de la translocation t(5;14) diagnostiquée chez le Patient 2. D'après la littérature, ce déséquilibre pourrait expliquer le phénotype de cet enfant. Dans ce contexte, nous avons décidé de vérifier la délétion par FISH (cf. § 2.1.2 du chapitre Résultats).

1.3 Patient 3

Cet enfant présente une DI apparemment isolée et est porteur d'une translocation t(4;5)(p15.1;p14.3) entre le bras court d'un des 2 chromosomes 4 et le bras court d'un des 2 chromosomes 5.

1.3.1 Résultat de l'ACPA

La réalisation d'une puce Affymetrix SNP6.0 a permis de mettre en évidence deux microdélétions (cf. Figures 43 et 44) :

1- une délétion (perte) interstitielle d'environ 1,08 Mb dans la région 4p15.1p15.2 entre les marqueurs CN_1073426 et CN_1080076 ;

2- et, une délétion (perte) interstitielle d'environ 1,29 Mb dans la région 5p14.3 entre les marqueurs CN_1143226 et SNP_A-8505130. Cette région contient notamment les gènes *CDH12* (cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)) et *PMCHL1* (pro-melaninconcentrating hormone-like 1).

Ainsi, la formule cytogénétique est la suivante :

arr[hg19] 4p15.1p15.2(28,089,923-29,172,045)x1,5p14.3p14.3(21,550,645-22,840,106)x1.

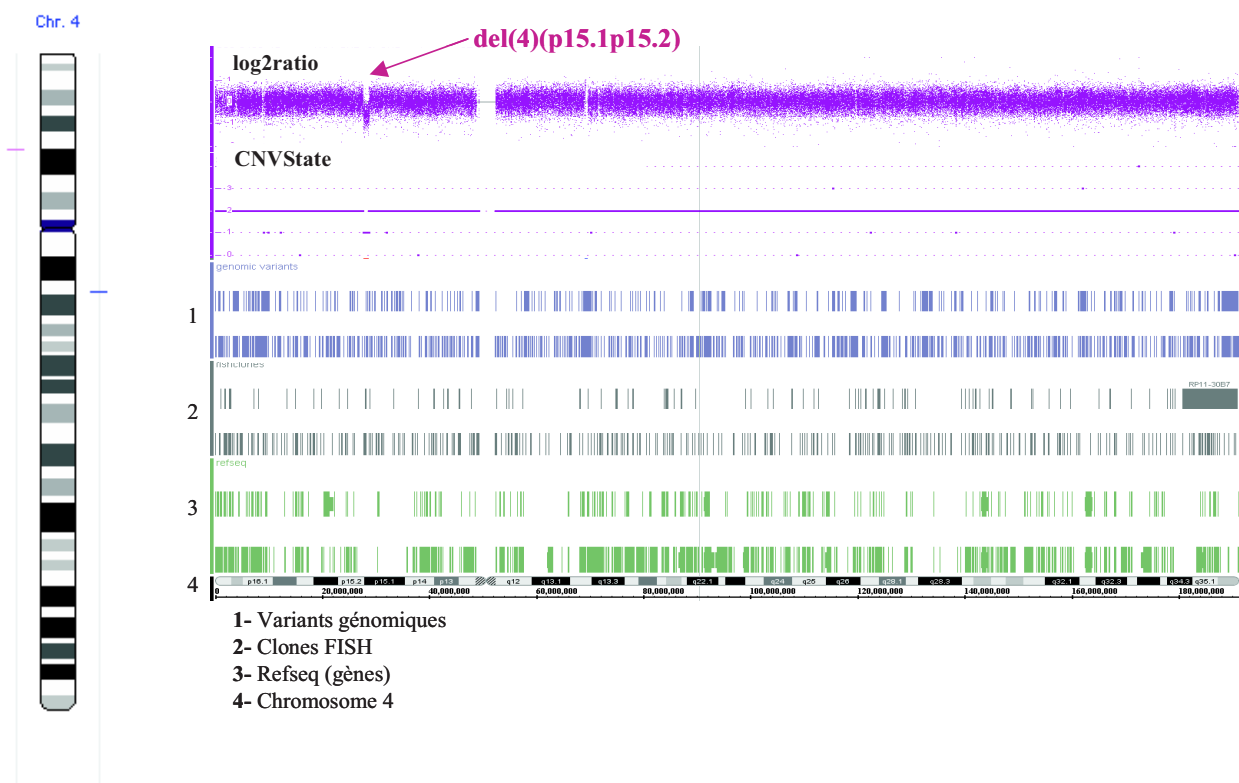


Figure 43 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 4 pour le Patient 3

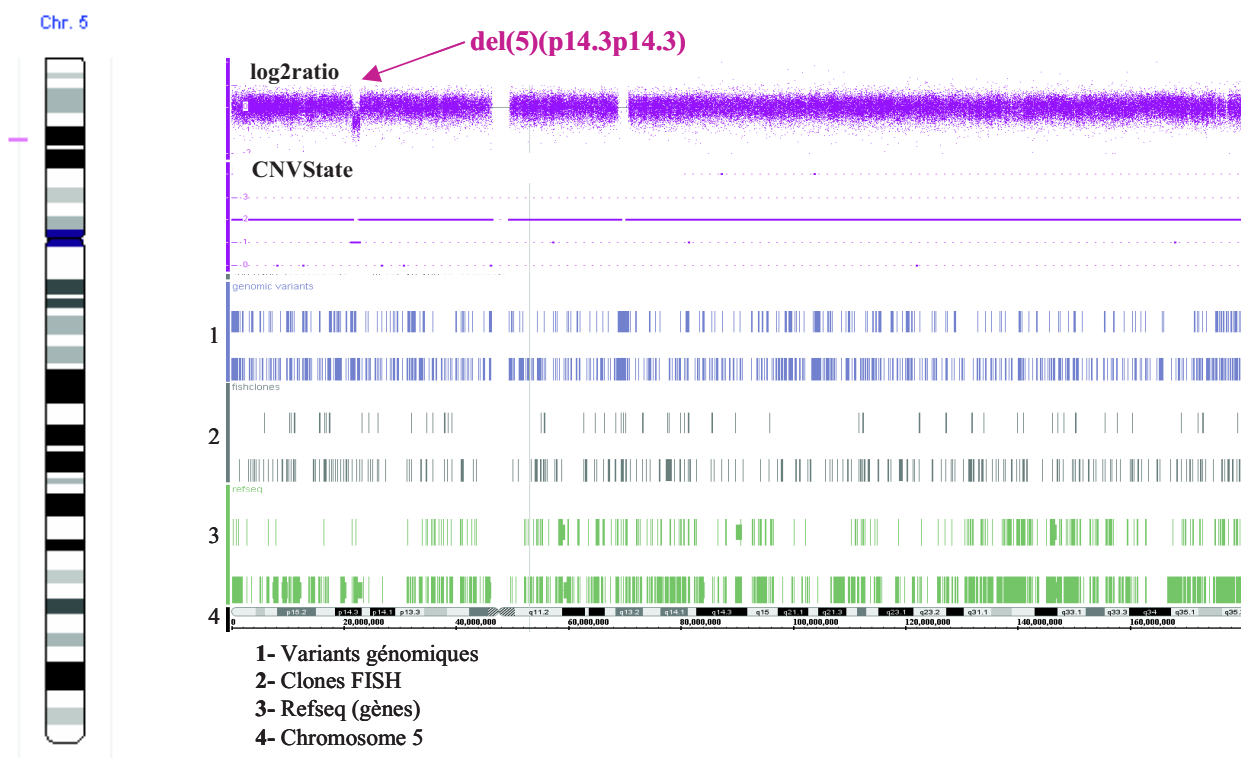


Figure 44 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 5 pour le Patient 3

1.3.2 Rôle des délétions interstitielles 4p15.1p15.2 et 5p14.3 dans le phénotype du Patient 3

Cet enfant présente deux délétions interstitielles au niveau des bras courts des chromosomes 4 et 5. Ces déséquilibres mis en évidence sur puces à ADN sont localisés au niveau des points de cassure de la translocation t(4;5).

La microdélétion en 4p15.1 ne concerne pas la région critique du Syndrome de Wolf Hirschhorn (microdélétion de la région 4p16). Elle emporte 2 gènes (cf. Figure 45) : *MIR4275*, qui est un microRNA, et *MESTP3* (mesoderm specific transcript pseudogene 3) dont les fonctions éventuelles sont à ce jour non décrites dans les bases de données et qui est décrit comme un pseudogène.

Le Syndrome du Cri du Chat, qui correspond à une perte de matériel chromosomique en 5p15.2, est largement décrit dans la littérature. Le Patient 3 de notre cohorte présente une microdélétion interstitielle plus proximale (cf. Figure 46) en 5p14.3 qui emporte les pseudogènes suivants : *GUSBP1* (glucuronidase, beta pseudogene 1), *HSPD1P1* (heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) pseudogene 1), *PMCHL1* (pro-melanin-concentrating hormone-like 1, pseudogene) et *GCNTIP2* (glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 pseudogene 2). Le gène *CDH12* (cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2) est aussi impliqué dans le

microremaniement. Les cadhérines ont un rôle non seulement de médiation/adhésion de cellules à cellules mais aussi dans les voies de signalisation intracellulaire associées notamment aux maladies neuropsychiatriques (Redies C, et al. 2012). Par ailleurs, les cadhérines ont un rôle pivot dans le développement de l'ensemble des circuits neuronaux, ainsi que dans la fonction synaptique mature, et permettent donc de réguler le développement neuronal et le fonctionnement du cerveau mature (Redies C, et al. 2012). De ce fait, en dehors du probable rôle de *CDH12* dans la dépendance à l'alcool décrit par Lydall GJ et ses collaborateurs (Lydall GJ, et al.2011), ce gène interviendrait aussi dans la physiopathologie de la schizophrénie (Singh SM, et al. 2009). Ces différents éléments en font un potentiel gène candidat pour expliquer le phénotype du Patient 3 qui présente un retard global du développement psychomoteur associé à des troubles du comportement.

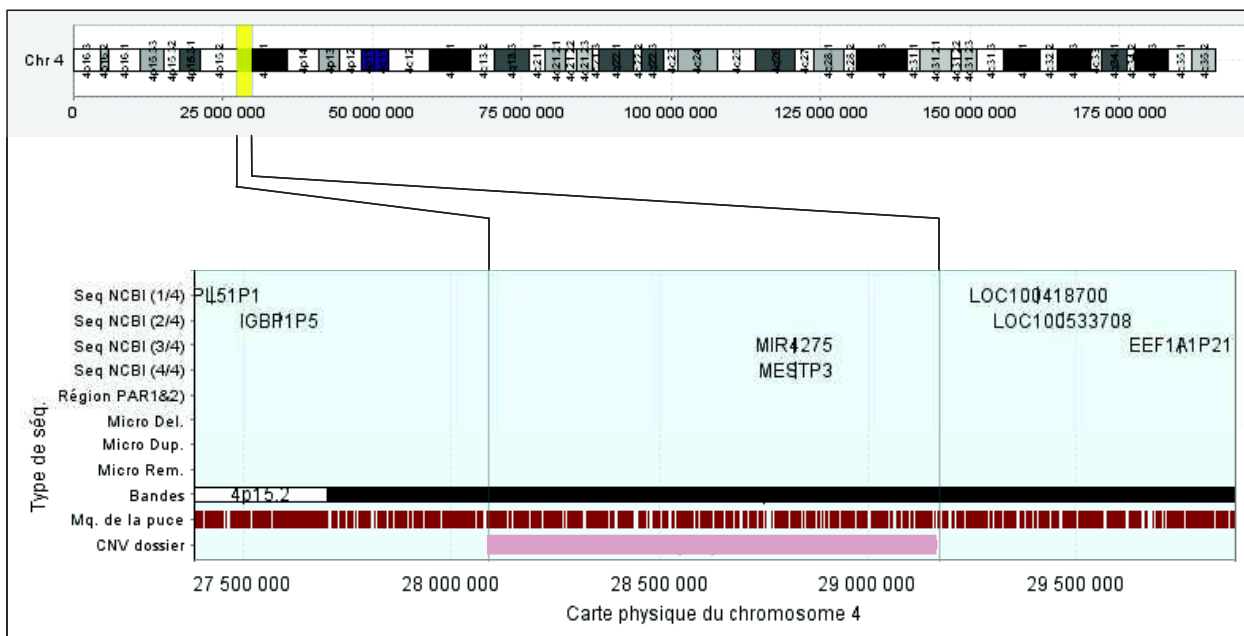


Figure 45 : Représentation de la délétion interstitielle 4p15.1 du Patient 3

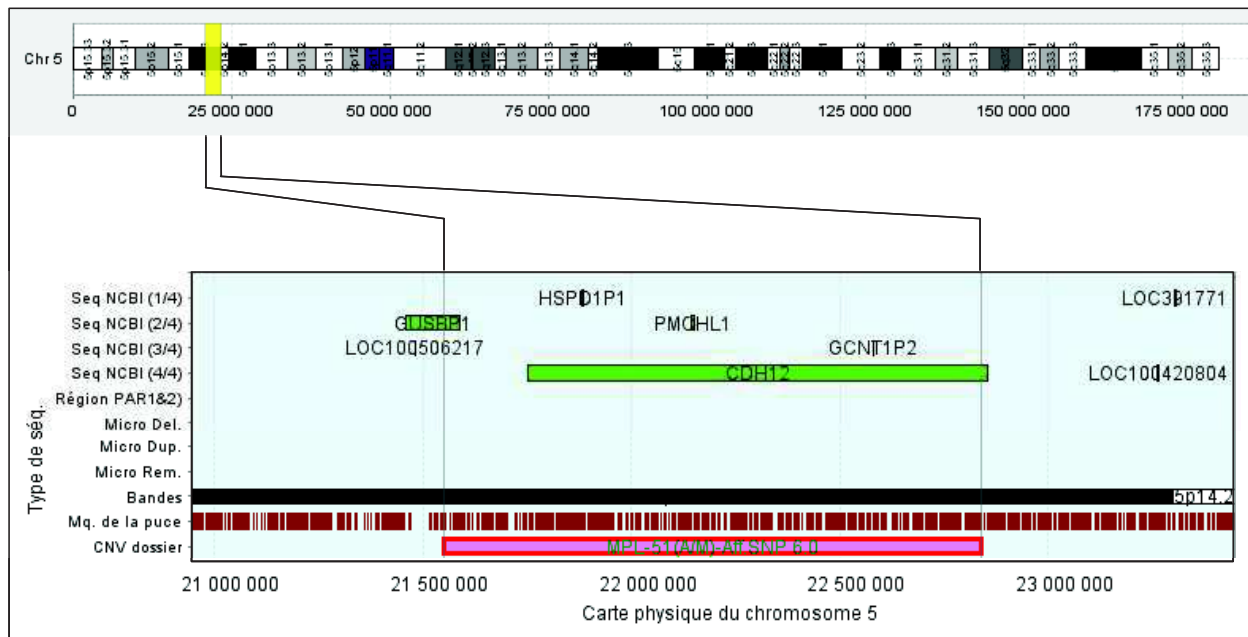


Figure 46 : Représentation de la délétion interstitielle 5p14.3 du Patient 3

1.3.3 Conclusion

Ces délétions sont *de novo* et sont situées au niveau des points de cassure sur les dérivés 4 et 5 de la translocation. Une revue de la littérature laisse suspecter le caractère pathogène de la délétion sur le dérivé 5, qui pourrait donc expliquer le phénotype de l'enfant. Cependant, cette translocation $t(4;5)$, de même que les délétions retrouvées au niveau des points de cassure, ne sont pas observées chez la sœur de cet enfant. Celle-ci présente aussi une DI mais n'est pas porteuse de la délétion 5p14.3 (ni de la translocation). Dans ce contexte, soit la DI de cette fratrie a une étiologie différente pour les 2 patients, soit la DI du Patient 3 n'est pas due aux délétions constatées au niveau des points de cassure.

Dans ce contexte, nous avons réalisé des techniques complémentaires non seulement pour confirmer la présence des deux délétions par FISH mais aussi pour préciser les bornes de ces déséquilibres à l'aide de la Biologie Moléculaire (cf. § 2.2.1 du chapitre Résultats).

1.4 Patient 8

Cette enfant présente principalement une DI. Son caryotype montre une translocation entre le bras long d'un des 2 chromosomes 1 et le bras long d'un des 2 chromosomes 14 : $t(1;14)(q44;q32.2)$

1.4.1 Résultat de l'ACPA

Le résultat de la puce SNP6.0 a mis en évidence une duplication (gain) interstitielle d'environ 4,5 Mb dans la région péri-centromérique 4p11q12 entre les marqueurs CN_1049667 et CN_1058470 (cf. Figure 47).

La formule cytogénétique est la suivante :

arr[hg19] 4p11q12(49,291,343-53,779,534)x3.

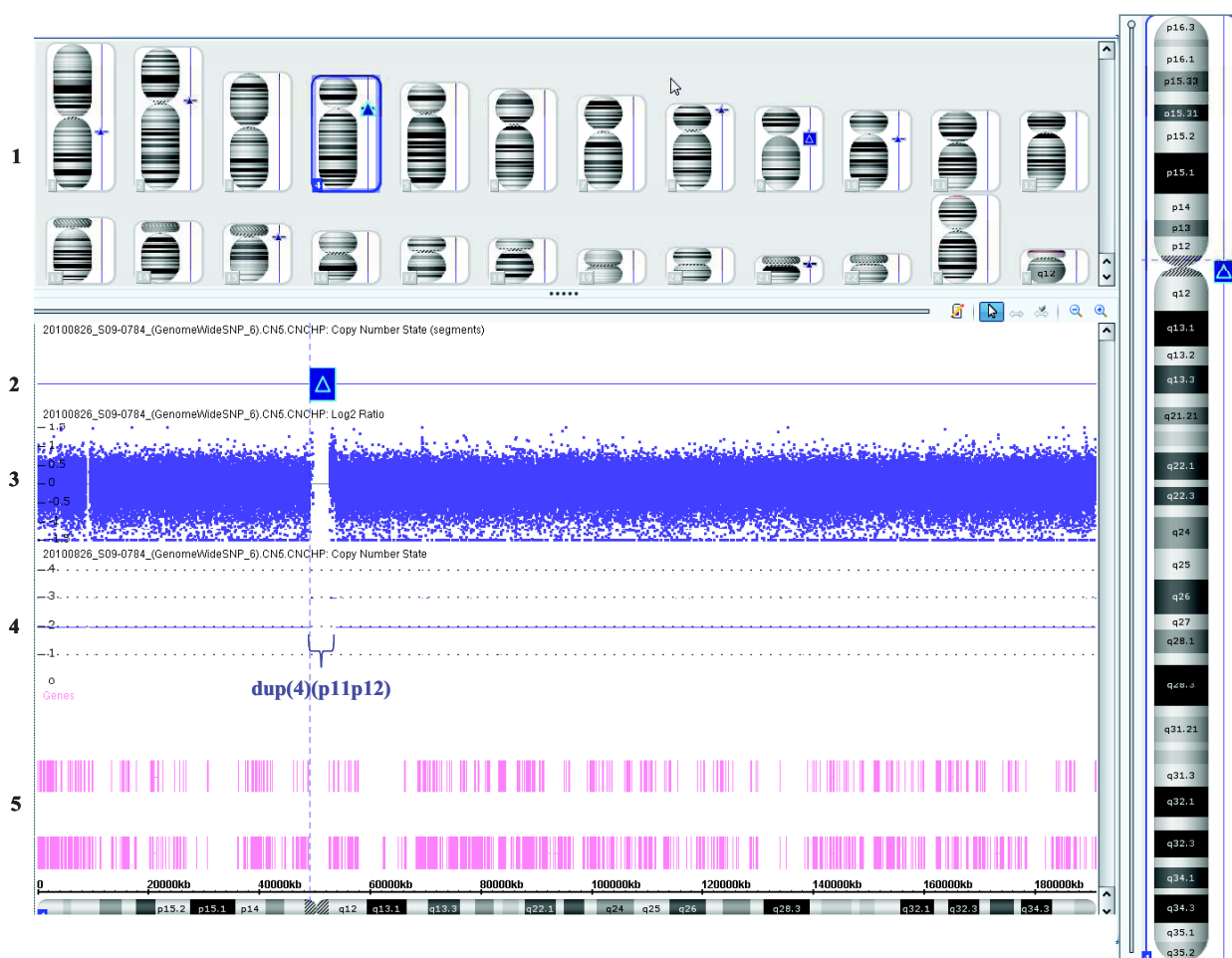


Figure 47 : Profil d'hybridation de l'ACPA du chromosome 4 pour la Patiente 8

- 1- Chromosomes
- 2- CNV Segment
- 3- Log2 Ratio
- 4- CNV
- 5- Gènes

1.4.2 Rôle de la duplication 4p11q12 dans le phénotype de la Patiente 8

L'ACPA a montré un déséquilibre du chromosome 4 qui a été interprété dans un 1^{er} temps comme potentiellement responsable du phénotype. La duplication contient 8 gènes, notamment le gène *USP46* (ubiquitin specific peptidase 46), qui régule une vaste gamme de phénotypes comportementaux. Son implication dans certains troubles mentaux humains pourrait être suspectée au vu des études réalisées chez la souris « knockout » (Imai S, et al. 2013). Cependant, dans le cas présent, l'ARN messager de ce gène serait surexprimé et l'analyse de la littérature ne renseigne pas sur un éventuel effet d'une surexpression de ce transcrit.

1.4.3 Conclusion

Nous avons vérifié, par une autre technique, ce remaniement et l'avons recherché chez les parents pour en déterminer le caractère *de novo* ou transmis, nous permettant ainsi d'appréhender son éventuelle implication dans le phénotype de la Patiente 8 (cf. § 2.2.2 du chapitre Résultats).

1.5 Conclusion

Les puces à ADN ont donc montré 5 déséquilibres chez 4 patients parmi les 12 de notre cohorte. Cependant, il est nécessaire de confirmer ces résultats par des techniques de référence (FISH et qPCR). Par ailleurs, nous devons également les rechercher chez les parents afin notamment de conclure sur leur caractère délétère ou non, particulièrement chez la Patiente 8 (cf. § 2.2.2 du chapitre Résultats).

2- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS VERIFICATION DES DÉSÉQUILIBRES OBSERVÉS À L'ACPA

Devant tout résultat anormal de puces, il est nécessaire de vérifier l'anomalie par une autre technique et de la rechercher chez les parents pour en déterminer le caractère *de novo* ou

transmis. Dans ce contexte, nous avons utilisé des techniques de FISH et de qPCR pour étudier les déséquilibres observés après ACPA chez les Patients 1, 2, 3 et 8.

2.1 Vérification par FISH uniquement

2.1.1 Patiente 1

- Résultat de la recherche de la délétion interstitielle 6q24.3q25.1 par FISH :

Nous avons réalisé une technique de FISH avec la sonde RP11-455K21, spécifique de la région chromosomique 6q25.1. L'hybridation *in situ* de cette sonde montre un seul signal sur l'ensemble des métaphases analysées. Ce résultat est donc en faveur d'une microdélétion dans la région 6q25.1 avec la sonde utilisée et confirme le déséquilibre observé avec la puce Affymetrix Human Mapping 500K. Par ailleurs, les parents ne présentent pas de remaniement de cette région chromosomique avec cette même sonde indiquant le caractère *de novo* de cette délétion.

Au final, la formule chromosomique pour la Patiente 1 est la suivante :

46,XX,t(4;9)(q27;p22)dn,t(7;8)(q31.3;p11.2)dn
 .ish t(4;9)(wcp4+,wcp9+;wcp4+,wcp9+),
 t(7;8)(wcp7+,wcp8+,RP11-69O3-,RH65733+;RH65733-,RP11-69O3+,wcp7+,wcp8+),
 del(6)(q25.1q25.1)(RP11-455K21-)dn.

- Conclusion :

La présence de 2 translocations non héritées et donc de 4 points de cassure suggère un caryotype complexe. Selon la classification de Kausch K et ses collaborateurs de 1998, la coexistence chez un même individu de deux ou trois translocations indépendantes impliquant des chromosomes différents classerait la Patiente 1 comme porteuse d'un remaniement chromosomique complexe (RCC) double ou triple *two-way* (cf. Figure 48), (Kausch K, et al. 1988). Cependant, cette classification exclut certains remaniements tels que la présence additionnelle d'inversions, d'insertions ou de délétions (comme observées chez notre patiente), présence prise en compte dans l'article de Madan K et ses collaborateurs en 1997 (Madan K, et al. 1997). Ce même auteur rapporte 103 nouveaux patients en 2012 ce qui lui fait proposer une nouvelle variante de cette classification structurale. Cette variante distingue quatre types

de RCC en fonction du nombre de points de cassure et du mode de ségrégation (Madan K. 2012).

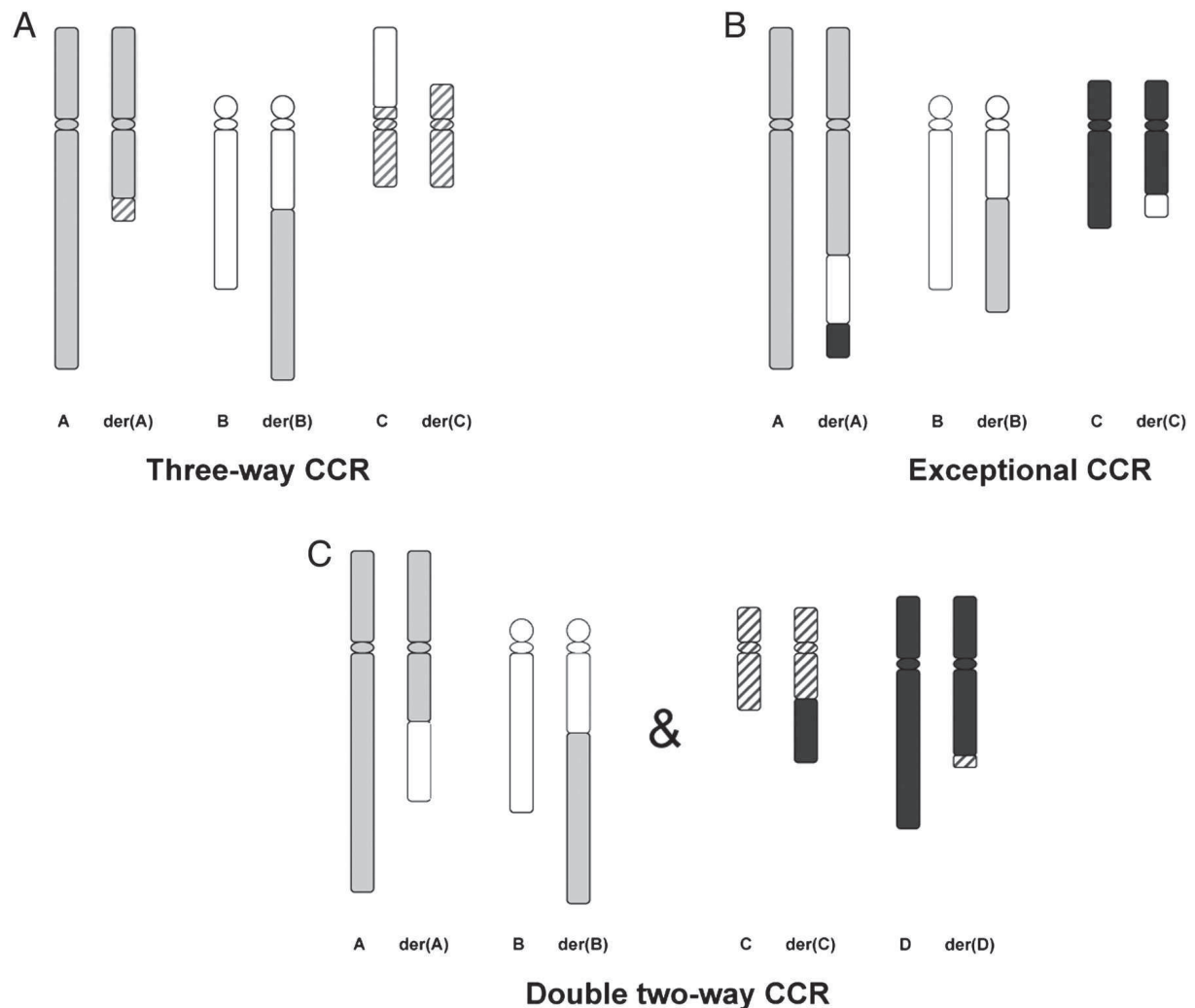


Figure 48 : Classification des RCC selon Pellestor en 2011 :

- (i). *Tree-way* RCC : un point de cassure sur chacun des chromosomes A, B et C donnant naissance à 3 dérivés der(A), der(B) et der(C)
- (ii). RCC exceptionnel : plus de points de cassure que de chromosomes impliqués et aucune limite de complexité à la formation des dérivés
- (iii). *Double two-way* RCC : anomalies concomitantes mais indépendantes

Ainsi, la classification des RCC est difficilement établie ce qui traduit bien la complexité et la grande variabilité de ce type de remaniements. Dans ce contexte, différentes études réalisées sur les RCC ont permis de mieux comprendre leurs étiologies et leurs mécanismes de formation.

Le développement de nouvelles techniques mises en œuvre pour analyser le génome a alors contribué non seulement à l'amélioration des connaissances de ces anomalies mais aussi à la description d'une nouvelle variété de réarrangements complexes et massifs du génome,

appelée *chromothripsis* (Pellestor F. 2014). Ce phénomène, défini comme faisant intervenir au moins 10 points de cassure sur un seul chromosome, a été observé initialement dans les cancers (Stephens PJ, et al. 2011) puis par la suite décrit en génétique constitutionnelle (Kloosterman WP, et al. 2011). La Figure 49 présente le principe du *chromothripsis*. Suite au RCC observé chez la Patiente 1, nous nous sommes interrogés sur la présence d'un remaniement encore plus complexe et donc d'un éventuel *chromothripsis* chez celle-ci. Afin de répondre à cette question, une analyse par WGS a été réalisée chez cette enfant (cf § 5.2 du chapitre Résultats).

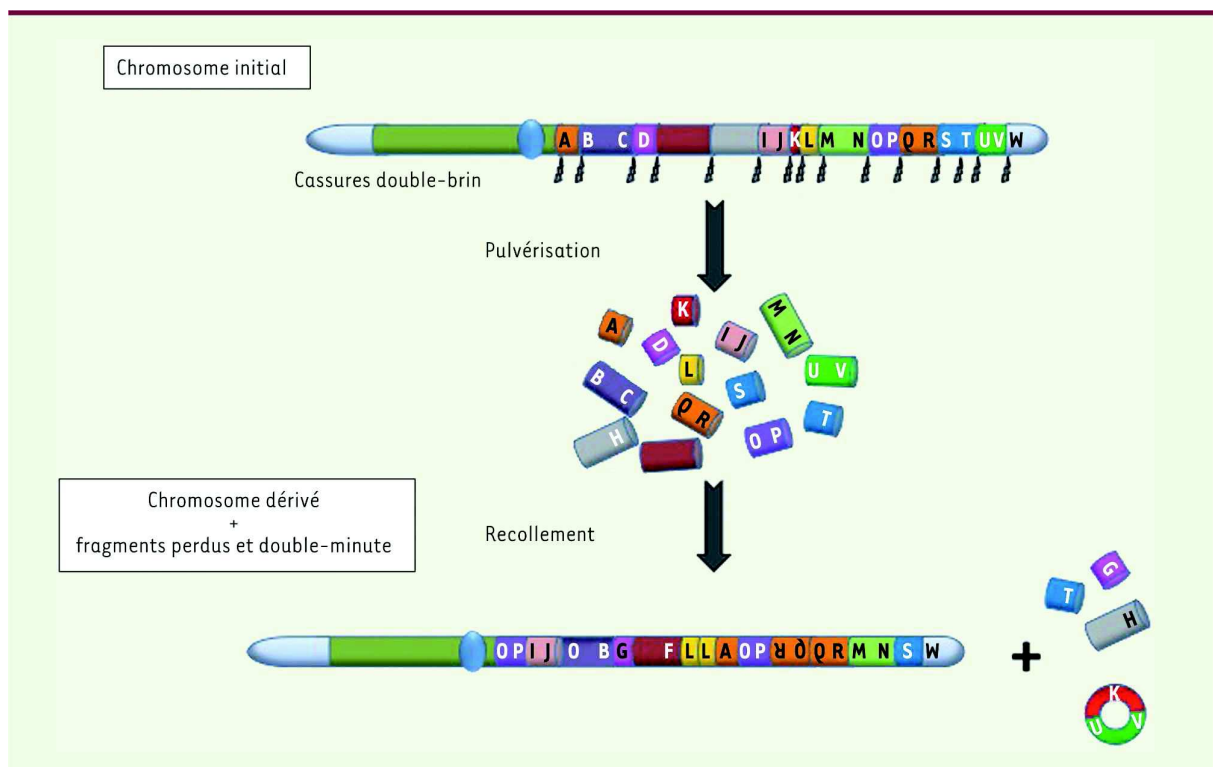


Figure 49 : Principe du *chromothripsis* : Au cours d'un seul évènement catastrophique, de multiples cassures double-brin se produisent dans une région chromosomique, entraînant une pulvérisation en fragments chromosomiques. La plupart sont recollés de manière aléatoire afin de reformer une structure chromosomique chaotique (chromosome dérivé), alors que certains peuvent être perdus ou combinés sous forme de mini-chromosomes circulaires surnuméraires (double-minute), généralement porteurs d'oncogènes (d'après Pellestor F, et al. 2014).

2.1.2 Patient 2

- Résultat de la recherche de la délétion interstitielle 14q22.1q22.2 par FISH :

Nous avons réalisé des techniques de FISH avec différentes sondes localisées sur le bras long du chromosome 14 (cf. Annexe 6) :

- * RP11-416J15, RP11-336C08 et RP11-762L21 : spécifiques de la région 14q22.1,
- * CTD-2297J14, RP11-779N21 et RP11-299D05 : spécifiques de la région 14q22.2,
- * et, RP11-262B02 : spécifique de la région 14q22.2q22.3.

L'ensemble des résultats de FISH montre :

1- La FISH des peintures spécifiques des chromosomes 5 (wcp5, Poseidon®) et 14 (wcp14, Poseidon®) confirme l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 5 et 14 apparemment sans l'intervention d'autres chromosomes.

2- L'hybridation *in situ* de l'ensemble des sondes non commerciales utilisées pour caractériser la délétion observée en ACPA montre un signal sur le bras long du chromosome 14 normal.

Par ailleurs, un signal sur le dérivé 14 de la translocation t(5;14) sur l'ensemble des métaphases analysées est observé pour les sondes RP11-416J15 et RP11-336C08. A noter que le signal sur le dérivé 14 semble de plus faible intensité avec la sonde RP11-336C08. Ces résultats sont en faveur d'un point de cassure en aval de la région chromosomique couverte par la sonde RP11-416J15 et d'un point de cassure chevauché par la sonde RP11-336C08, qui est partiellement délétée.

De plus, aucun signal sur le dérivé 14 avec les sondes RP11-762L21 et CTD-2297J14 n'est observé. Ce résultat est en faveur d'une microdélétion de la région 14q22.1q22.2 de ces sondes, microdélétion localisée au niveau du point de cassure sur le dérivé 14 de la translocation t(5;14).

En outre, la FISH avec la sonde RP11-779N21 montre un signal de plus faible intensité sur le bras long du dérivé 5 de la translocation t(5;14). Ce résultat est en faveur d'une microdélétion partielle de la sonde RP11-779N21 qui chevauche donc le point de cassure du dérivé 14 de la translocation t(5;14).

Enfin le second signal des sondes RP11-299D05 et RP11-262B02 est localisé sur le bras long du dérivé 5 de la translocation t(5;14). Ce résultat permet de confirmer la présence de matériel chromosomique de la région 14q22.2q22.3 sur le bras long du dérivé 5 de la translocation t(5;14).

3- L'ensemble de ces sondes a été testé chez les parents et aucun remaniement des régions chromosomiques n'a été identifié chez eux.

En conclusion, l'ensemble des résultats des techniques de Cytogénétique Classique et Moléculaire mises en œuvre au laboratoire montre la présence d'une translocation réciproque t(5;14) associée à une microdélétion 14q22.2q22.3 au niveau du point de cassure sur le dérivé 14 de la translocation t(5;14), (cf. Tableau IV). Ces résultats confirment ceux observés sur la puce Affymetrix Human SNP array 6.0.

	Présence du signal				Interprétation
	Chromosome 5	Dérivé 5	Chromosome 14	Dérivé 14	
RP11-416J15	-	-	+	+	En amont
RP11-336C08	-	-	+	dim	Point de cassure
RP11-762L21	-	-	+	-	Délétion
CTD-2297J14	-	-	+	-	Délétion
RP11-779N21	-	dim	+	-	Point de cassure
RP11-299D05	-	+	+	-	En aval
RP11-262B02	-	+	+	-	En aval

Tableau IV : Résultats des techniques FISH chez le Patient 2

La formule chromosomique est alors la suivante :

46,XY,t(5;14)(q21;q22)dn

.ish der(14)t(5;14)del(14)(q22.1q22.2)dn(wcp14+,RP11-416J15+,RP11-336C08 dim, RP11-762L21-,CTD-2297J14-,RP11-779N21-,RP11-299D05-,RP11-262B02-,wcp5+), der(5)t(5;14)(wcp5+,RP11-416J15-,RP11-336C08-,RP11-762L21-,CTD-2297J14-, RP11-779N21 dim,RP11-299D05+,RP11-262B02+,wcp14+).

- Conclusion :

A la suite de ces résultats obtenus, nous avons considéré que la délétion 14q22.1q22.2 permettait d'expliquer le phénotype du Patient 2. Dans ce contexte, nous avons arrêté les investigations étiologiques chez cet enfant.

2.2 Vérification par FISH et Biologie Moléculaire

2.2.1 Patient 3

- Résultat de la recherche des délétions interstitielles 4p15.1p15.2 et 5p14.3 par FISH :

La sonde RP11-180C01 spécifique de la région 4p15.1 du bras court du chromosome 4 et la sonde RP11-356O21 spécifique de la région 5p14.3 du bras court du chromosome 5 montrent

chacune un seul signal sur l'ensemble des métaphases analysées. Ces résultats sont en faveur de la présence de deux microdélétions dans les régions 4p15.1 et 5p14.3. A noter que la sonde RP11-356O21 se fixe aussi sur le bras long du chromosome 5 mais cette co-hybridation ne gêne pas la lecture ni l'interprétation.

Ces délétions ont donc été confirmées par FISH, n'ont pas été retrouvées chez les parents et sont donc *de novo*.

En conclusion, l'ensemble des résultats des techniques de Cytogénétique Classique et Moléculaire mises en œuvre au laboratoire montre la présence d'une translocation réciproque t(4;5) associée à deux microdélétions au niveau des points de cassure de chacun des dérivés chromosomiques en 4p15.1 et en 5p14.3. Ces résultats confirment ceux observés sur la puce Affymetrix Human SNP array 6.0.

La formule chromosomique est alors la suivante :

46,XY,t(4;5)(p15.1;p14.3)dn
 .ish der(4)t(4;5)del(4)(p15.1p15.1)dn(wcp5+,RP11-180C01-,wcp4+),
 der(5)t(4;5)del(5)(p14.3p14.3)dn(wcp4+,RP11-356O21-,wcp5+).

- Recherche des points de cassure des délétions interstitielles 4p15.1p15.2 et 5p14.3 confirmées par FISH :

Nous ne pouvons exclure l'interruption d'un gène au niveau des points de cassure de cette translocation t(4;5). Plusieurs tentatives pour préciser les bornes de ces déséquilibres par des techniques de Biologie Moléculaire ont été réalisées mais sans succès. Pour expliquer ces difficultés, nous pouvons émettre l'hypothèse de réarrangements plus complexes au niveau des points de cassure et non identifiables par les puces à ADN et donc ne permettant pas un choix convenable d'amorces pour la PCR longue distance.

- Conclusion :

Ces délétions sont *de novo* et sont situées au niveau des points de cassure sur les dérivés 4 et 5 de la translocation. Une revue de la littérature laisse suspecter le caractère pathogène de la délétion sur le dérivé 5, qui pourrait donc expliquer le phénotype de l'enfant.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu séquencer les points de cassure de ces deux déséquilibres. Notre hypothèse est la présence d'un remaniement complexe au niveau des points de cassure de l'une ou des deux délétions. Un tel remaniement additionnel peut être suspectée au vu des résultats du WGS non seulement de la Patiente 1 (cf. § 5.2 du chapitre Résultats) mais aussi

des autres patients testés dans notre laboratoire par les techniques de séquençage haut débit (Patients 10 et 11). Cela nous amène à nous reposer la question de la place de l'ACPA même devant une « simple » translocation réciproque (cf. chapitre Discussion).

2.2.2 Patiente 8

- Résultat de la recherche de la duplication 4p11q12 par qPCR

Cette analyse a permis de confirmer la présence de la duplication 4q12 englobant le gène *USP46* (chr4:53159395-53192170) chez la Patiente 8. Par conséquent, ce résultat confirme celui observé par puce Affymetrix Human SNP array 6.0. Par ailleurs, l'analyse de l'ADN des parents a permis de montrer que ce remaniement était d'origine maternelle.

- Résultat de la recherche de la duplication 4p11q12 par FISH

L'analyse FISH ne permet pas de confirmer la présence d'une duplication dans la région 4p11q12 (ish 4q12(RP11-98B06, RP11-177B04)x2). Cependant, sur quelques noyaux (mais pas suffisamment pour l'interprétation) 3 signaux semblent visibles dont 2 sont très proches l'un de l'autre. Ce résultat ne confirme pas celui observé par ACPA et pourrait s'expliquer par les limites de la FISH. Ce résultat doit donc s'interpréter avec celui de l'analyse de Biologie Moléculaire. Cette dernière technique confirmant la duplication, celle-ci est localisée dans la région 4q12 du bras long du chromosome 4.

- Conclusion

La vérification par qPCR et FISH a confirmé l'anomalie qui est d'origine maternelle. La disomie uniparentale maternelle du chromosome 4 est rarement décrite dans la littérature. Kotzot D et Utermann G indiquent, dans une revue de la littérature en 2005, que les disomies uniparentales rapportées sont partielles ou complètes (Kotzot D, Utermann G. 2005). La disomie uniparentale maternelle complète du chromosome 4 a une expressivité variable. En effet, Carpenter NJ et ses collaborateurs publient le cas d'une patiente présentant notamment une DI et porteuse d'une disomie uniparentale maternelle du chromosome 4 (Carpenter NJ, et al. 1982). De même, les manifestations de dépression observées chez une autre patiente s'expliqueraient par une disomie uniparentale maternelle du chromosome 4 (Middleton FA, et al. 2006). En ce qui concerne les disomies partielles du chromosome 4, le phénotype varie en fonction des gènes impliqués et l'analyse de la littérature ne renseigne pas sur le rôle d'une disomie uniparentale de la région chromosomique impliquant le gène *USP46*.

Au vu des données de la littérature et du caractère hérité du remaniement, nous avons conclu à une variation probablement bénigne. Nous n'avons donc pas retenue d'anomalie sur la puce et nous avons poursuivi la recherche étiologique pour expliquer le phénotype de la patiente.

2.3 Conclusion

Suite aux résultats observés après ACPA et confirmés par les techniques de FISH et de Biologie Moléculaire, plusieurs interrogations ont été soulevées.

Chez la Patiente 1, la présence d'un RCC associé à une délétion fait évoquer un remaniement plus complexe. Nous avons donc envisagé un *chromothripsis* chez cette enfant, nouvelle variété de remaniement chromosomique de plus en plus décrit avec le développement des nouvelles technologies d'analyse pangénomique. Afin de répondre à cette question, nous avons complété l'étude du RCC de cette patiente par la mise en œuvre d'un séquençage haut débit (cf. § 5.2 du chapitre Résultats).

Nous avons considéré que les délétions observées en puces à ADN chez les Patients 2 et 3 sont responsables du phénotype. Cependant, nous avons voulu caractériser les déséquilibres en 4p15.1p15.1 et en 5p14.3p14.3 chez le Patient 3 en séquençant les points de cassure. Nous n'avons obtenu aucun résultat et nous avons alors évoqué la possibilité d'un remaniement plus complexe au(x) point(s) de cassure. Dans ce contexte, la place de l'ACPA est alors à discuter même devant un remaniement apparemment simple (cf. chapitre Discussion).

Les résultats obtenus suite aux techniques de Cytogénétique Moléculaire (ACPA et FISH) et de Biologie Moléculaire ne permettent pas de réaliser un diagnostic chez la Patiente 8. Dans ce contexte, la recherche de l'étiologie des signes cliniques de cette enfant a donc été poursuivie avec la mise en œuvre de l'Array-Painting.

3- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS MARCHE SUR LE CHROMOSOME PAR FISH

Dans un premier temps, n'ayant pas de lignées cellulaires immortalisées à notre disposition pour réaliser une technique d'Array-Painting, les ADN des Patients 11 et 12 ont été étudiés en WGS. A cause du coût élevé de cette technique et parce que ces patients étaient porteurs de

translocations impliquant des chromosomes différents, nous avons décidé de réaliser le séquençage haut débit à partir d'un mélange d'ADN de ces 2 patients. La profondeur de lecture était de 10X. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de résultat interprétable par cette approche, dont le principe est défini dans le § 2.2 du chapitre Méthodes mises en œuvre. De ce fait, nous avons choisi d'utiliser la méthode classique de marche sur le chromosome par FISH.

3.1 Patient 11

Cet enfant est porteur d'une translocation impliquant les chromosomes 1 et 10 : t(1;10)(q43;p14). Les signes cliniques observés sont une cardiopathie complexe associée à des malformations cérébrales, un retard de croissance et une microcéphalie avec un décès survenu à 6 mois de vie.

3.1.1 Identification des points de cassure par la marche sur le chromosome

Le point de cassure sur le dérivé 1 est situé entre deux BAC localisés sur le bras long du chromosome 1 (annexe 6) : RP11-113O11, localisé en 1q43, qui reste en place et RP11-794A13, localisé en 1q44 (1:243,549,368-243,737,467pb), qui est sur le dérivé 10. Ce résultat permet d'affirmer que le gène *AKT3* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene homolog 3), localisé en 1q44 (1: 243,651,535-244,014,381pb), est interrompu (cf. Figure 50).

Le point de cassure sur le dérivé 10 est situé entre deux BAC localisés sur le bras court du chromosome 10 (annexe 6) : RP11-145L14, localisé en 10p12.2p12.1, qui est sur le dérivé 1 et RP11-165A20, localisé en 10p12.1, qui reste en place. N'ayant plus de matériel cytogénétique pour réaliser de nouvelles FISH pour affiner la localisation du point de cassure sur le dérivé 10, nos investigations n'ont pas pu être poursuivies, malgré plusieurs essais d'hybridations / déshybridations des lames de cytogénétique.

La représentation graphique des différentes sondes testées correspond aux Figures 51 et 52.

Les résultats obtenus ne sont que partiels. Dans ce contexte, une nouvelle étude par WGS a été réalisée (cf. § 5.5.1 du chapitre Résultats).

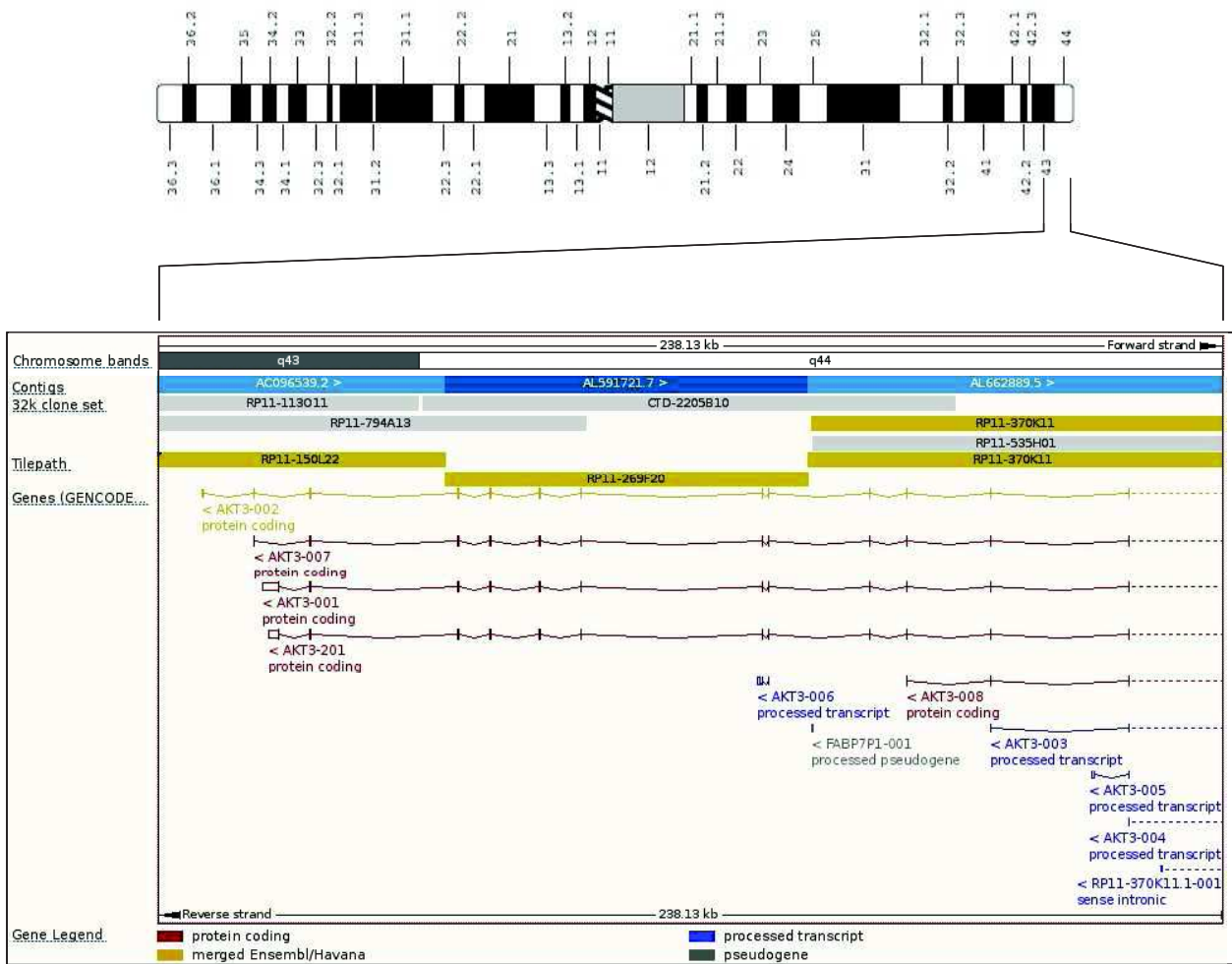


Figure 50 : Interruption du gène *AKT3* avec les BAC encadrant RP11-113011 et RP11-794A13

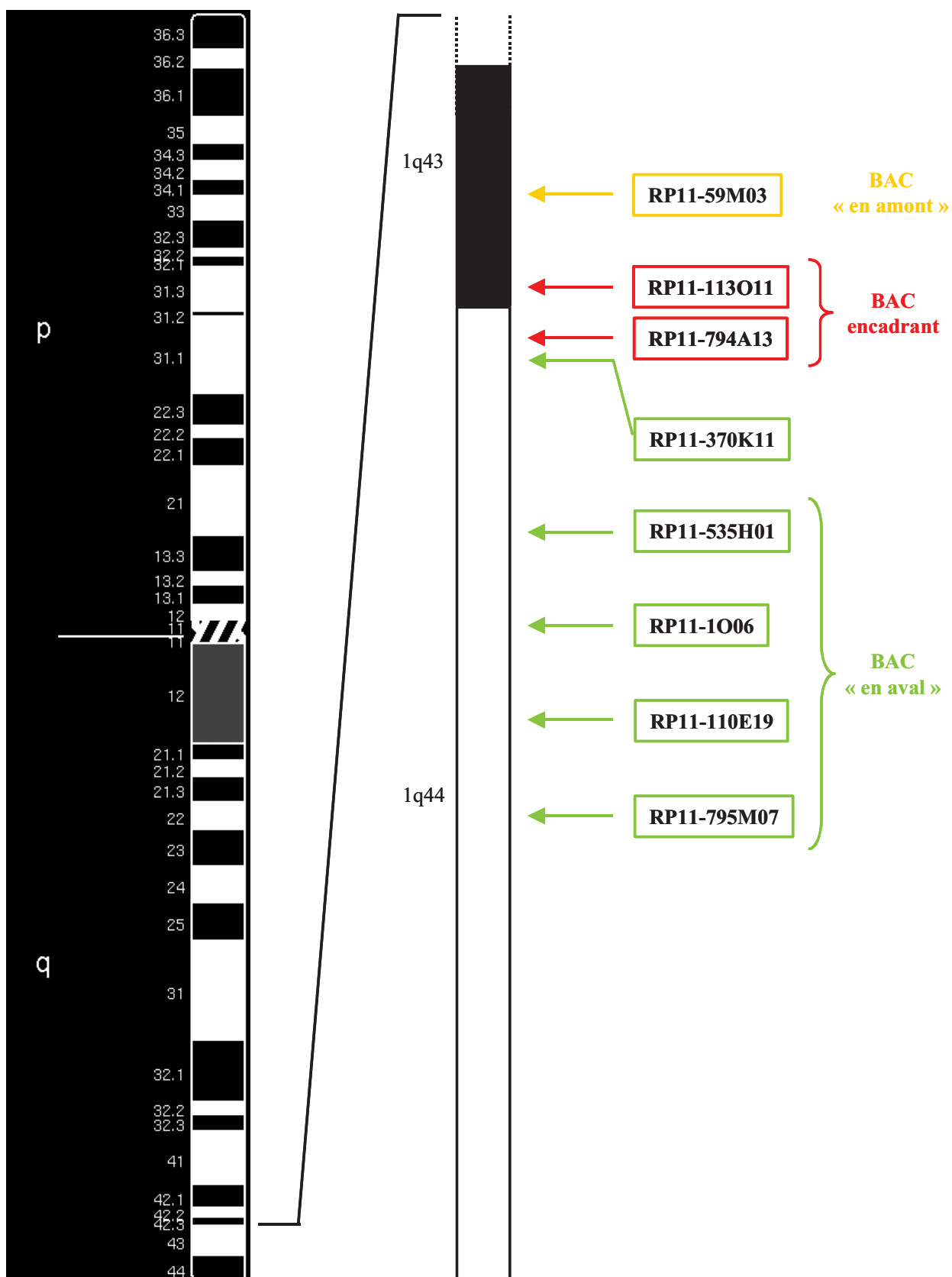


Figure 51 : Localisation des sondes BAC utilisées pour la méthode de « marche sur le chromosome » pour le dérivé chromosomique 1 : caractérisation incomplète du point de cassure en 1q43q44 en 10 étapes

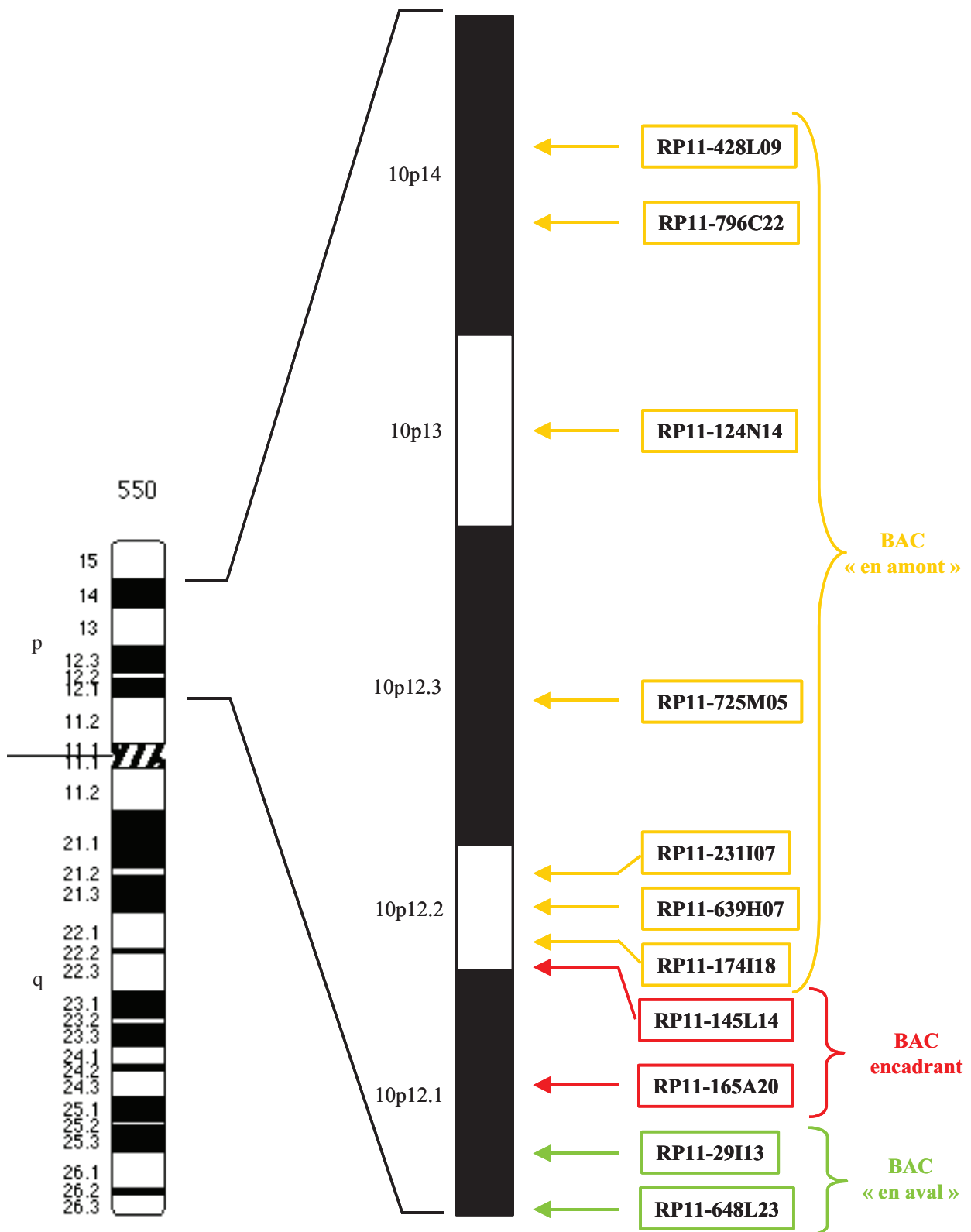


Figure 52 : Localisation des sondes BAC utilisées pour la méthode de « marche sur le chromosome » pour le dérivé chromosomique 10 : caractérisation incomplète du point de cassure en 10p12.1p12.2 en 15 étapes

3.1.2 Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype

Les résultats de la marche sur le chromosome identifient une potentielle interruption du gène *AKT3* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene homolog 3) sur le dérivé 1 de la translocation t(1;10).

La famille des oncogènes *AKT* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene) est composée de 3 membres : *AKT1* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene homolog 1), *AKT2* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene homolog 2) et *AKT3*. En 2013, Cohen MM Jr écrit une revue sur le rôle des gènes de cette famille (Cohen MM Jr. 2013) :

1- *AKT1*, exprimé dans de nombreux tissus, est considéré comme jouant un rôle important dans le développement cardiaque et dans les pathologies comme les adénocarcinomes gastriques (Staal SP. 1987),

2- *AKT2*, exprimé dans les muscles et les adipocytes, est associé aux tumeurs et est impliqué dans la régulation de l'insuline dans la voie du glucose (Kohn AD, et al. 1996).

3- *AKT3* n'est retrouvé que dans le cerveau et les testicules (Hers I, et al. 2011).

La microdélétion de la région 1q43q44 a été décrite à de nombreuses reprises et en 2010, l'équipe de O'Driscoll MC l'associe à des malformations du corps calleux chez 35 individus (O'Driscoll MC, et al. 2010). Par la suite, Orellana C et ses collaborateurs décrivent un patient avec une petite délétion interstitielle en 1q44 dont le phénotype permet de définir une région minimale critique intervenant dans le développement du corps calleux. Les gènes *AKT3* et *ZNF238* sont alors mis en cause (Orellana C, et al. 2009). L'ensemble de ces données, complétées avec celles de l'équipe de Tschoop O qui montre le rôle de *AKT3* dans le développement du cerveau et décrit une hypoplasie du corps calleux chez les souris « knockout » (Tschoop O, et al. 2005), sont en faveur d'une responsabilité des délétions de ce gène dans les anomalies du corps calleux (Nagamani SC, et al. 2012). Cependant, en 2008, van Bon BW et ses collaborateurs décrivent une cohorte de patients permettant d'exclure l'association *AKT3* / anomalies du corps calleux (van Bon BW, et al. 2008). Malgré tout, le bilan est plutôt en faveur d'un rôle de *AKT3* dans le développement du corps calleux. En période postnatale, l'imagerie du cerveau du Patient 11 montre des malformations cérébrales avec un aspect large des cavités ventriculaires et un corps calleux fin. La présence d'une anomalie du corps calleux est en faveur du rôle de l'interruption d'*AKT3* dans les signes cliniques de cet enfant.

Une revue de la littérature rapporte 2 phénotypes distincts en miroir en fonction du type de mutations affectant le gène *AKT3*. En effet, lors de mutations activatrices, plusieurs auteurs parlent d'hémimégalencéphalie (Poduri A, et al. 2012 ; Lee JH, et al. 2012) ou de mégalencéphalie (Rivière JB, et al. 2012). Devant une haplo-insuffisance (délétions ou interruptions) de ce gène, la microcéphalie est le symptôme le plus souvent rapporté dans la cohorte décrite par Ballif BC et ses collaborateurs (Ballif BC, et al. 2012). Cette microcéphalie est postnatale selon l'article de Boland E et al. en 2007 (Boland E, et al. 2007). Cette observation est en faveur du rôle de l'haplo-insuffisance de *AKT3* dans la microcéphalie postnatale observée chez le Patient 11.

3.1.3 Conclusion

AKT3 pourrait donc être responsable des manifestations notées chez le Patient 11 de notre cohorte. Cependant, les malformations cardiaques ne sont pas expliquées par ce gène. Deux hypothèses peuvent être posées :

1- *AKT1* joue un rôle important dans le développement cardiaque et a une structure commune avec *AKT3* (Cohen MM Jr. 2013). Nous pouvons alors suspecter une certaine pathogénicité de *AKT3* dans les malformations cardiaques chez ce patient. Néanmoins, aucun argument en ce sens n'est décrit dans la littérature.

2- Nous pouvons émettre l'hypothèse de l'interruption d'un autre gène au niveau du second point de cassure. La combinaison de l'interruption de 2 gènes différents (un sur chaque dérivé) pourrait expliquer l'ensemble des manifestations cliniques et donc le phénotype complet du Patient 11. Malheureusement, cet enfant est décédé et nous n'avons plus de matériel cytogénétique pour réaliser les FISH nécessaires pour identifier plus précisément le point de cassure sur le dérivé 10 de la translocation t(1;10). Une étude par WGS a donc été réalisée afin d'essayer d'élucider cette question (cf. § 5.5.1 du chapitre Résultats).

3.2 Patiente 12

Cette enfant est porteuse d'une translocation impliquant les chromosomes 4 et 7 : t(4;7)(q31;p22). Les signes cliniques observés sont un retard des acquisitions associé à un décalage du langage, un décalage dans les activités scolaires, une lenteur, des dystonies et une incoordination des membres supérieurs.

3.2.1 Identification des points de cassure par la marche sur le chromosome

La marche sur le chromosome par FISH n'a pas permis d'obtenir de résultat probant suite à la faible quantité de culot cellulaire disponible et malgré plusieurs essais de d'hybridations / déshybridations des lames.

3.2.2 Conclusion

Au vu de l'absence de résultat obtenu avec la technique de marche sur le chromosome, nous avons demandé un nouveau prélèvement au généticien clinicien afin d'établir une lignée cellulaire. La réalisation d'une technique d'Array-Painting a ainsi pu être mise en œuvre (cf. § 4.1.5 et 4.2.5 du chapitre Résultats).

3.3 Conclusion

La mise en œuvre de la marche sur le chromosome n'a pas permis de cloner les points de cassure des translocations réciproques apparemment équilibrées des Patients 11 et 12. Nous avons donc complété ces explorations par un séquençage haut débit chez le Patient 11 et par l'Array-Painting chez la Patiente 12.

4- RÉSULTATS OBTENUS APRÈS ARRAY-PAINTING

Parmi les 12 patients de notre cohorte, 9 ne présentent pas d'anomalie considérée comme responsable de leur phénotype après ACPA. Afin d'expliquer le phénotype des Patients 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 et 12, d'autres approches ont été mises en œuvre pour déterminer le point de cassure et ainsi tenter de relier le remaniement apparemment équilibré aux signes cliniques observés chez ces enfants.

L'une des principales hypothèses physiopathologiques est l'interruption d'un gène pour expliquer le phénotype des patients de notre cohorte. Nous avons donc décidé d'identifier les points de cassure par deux techniques différentes en fonction du matériel biologique à notre disposition. Ainsi, 8 patients (Patients 4 à 10 et Patiente 12) ont été étudiés par la technique

d'Array-Painting. La puce utilisée dans le cadre de l'Array-Painting est la Cytoscan HD® d'Affymetrix.

Les résultats permettent de classer les patients en deux groupes distincts : ceux porteurs d'une translocation interrompant un ou plusieurs gènes et ceux dont le remaniement n'interrompt pas de gène.

4.1 Interruption de gène(s)

4.1.1 Patient 5

Des troubles neuromusculaires associés à un syndrome marfanoïde et à une DI sont décrits chez cet enfant porteur d'une translocation $t(Y;2)(q11.2;q37)$ entre le bras long d'un des 2 chromosomes 2 et le bras long du chromosome Y.

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 53) :

L'interprétation des résultats de l'Array-Painting a permis d'identifier le point de cassure dans la région 2q37.3 sur le bras long du chromosome 2. Celui-ci est localisé entre les marqueurs S-3ABON (241692973pb) et S-4BGHN (241693811pb) et interrompt le gène *KIF1A* (kinesin family member 1A).

Les résultats de l'Array-Painting pour le chromosome Y identifie un point de cassure au niveau de l'hétérochromatine de son bras long en Yq11.23q12.

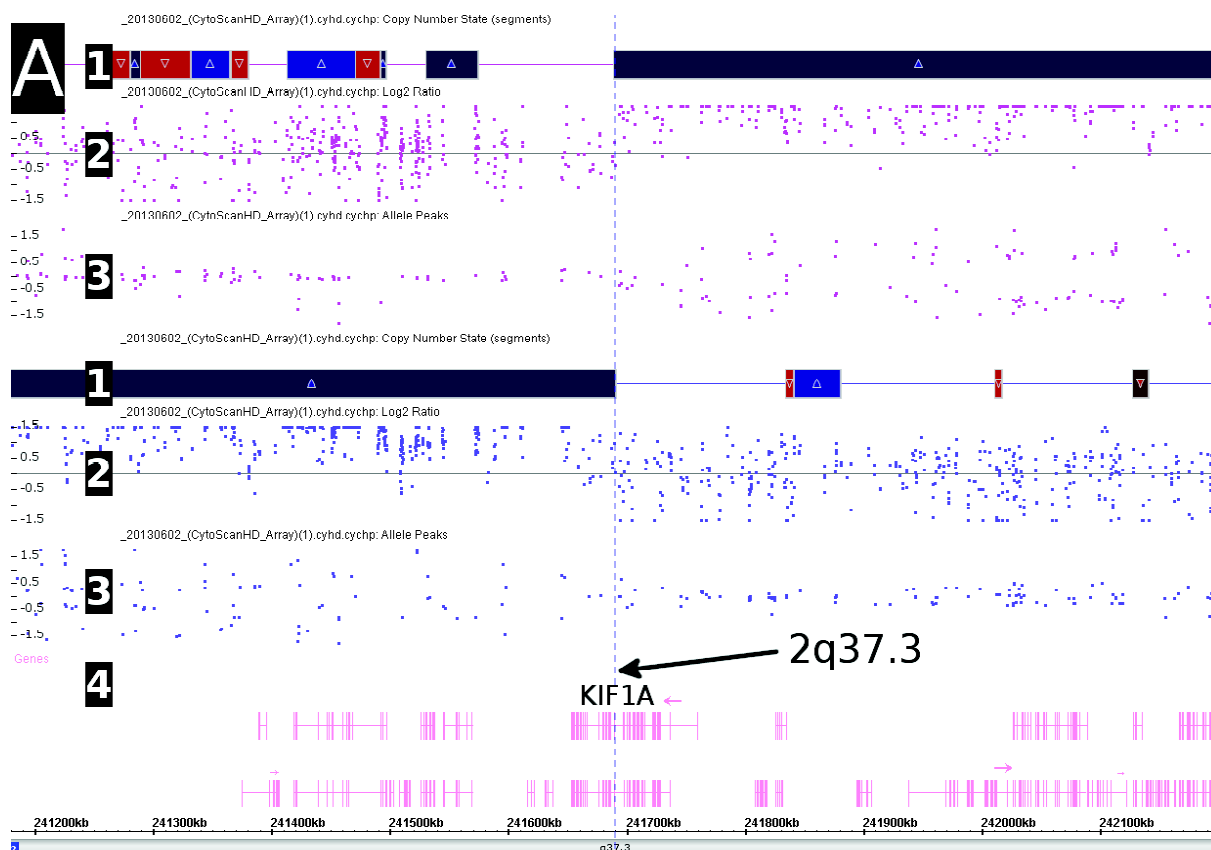


Figure 53 : Profil d'hybridation dans le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 2 sur les deux dérivés (Patient 5)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- Log2ratio
- 3- Différence allélique
- 4- Gènes

- Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype :

L'Array-Painting a permis d'identifier le point de cassure en 2q37.3 avec une interruption du gène *KIF1A* (kinesin family member 1A).

KIF1A est un membre de la superfamille des protéines kinésines qui ont des rôles fondamentaux dans plusieurs processus dans le cerveau tels que le fonctionnement neuronal, le développement des axones, des dendrites et des synapses (Miki H, et al. 2001 ; Mandelkow E, et al. 2002 ; Hirokawa N, et al. 2010). De plus, des souris « knockout » pour *KIF1A* présentent des anomalies de structure du cerveau, une diminution de sa taille et une létalité périnatale importante secondaire à des problèmes neurologiques (Hirokawa N, et al. 2010 ; Yonekawa Y, et al. 1998 ; Midorikawa R, et al. 2006 ; Zhao C, et al. 2001). Ainsi, l'équipe de Willemsen MH rapporte que plusieurs gènes *KIF* ont été impliqués dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives et neurodéveloppementales. Par ailleurs, *KIF1A* est impliqué dans la neuropathie sensitive héréditaire de type IIC (OMIM #614213), la paraplégie

spastique 30 (OMIM #610357) dont le mode d'hérédité est autosomique récessif. Ce gène est également responsable d'une DI non syndromique dont la transmission serait autosomique dominante (Willemsen MH, et al. 2014). Les autres données de la littérature sont en cohérence avec ce dernier article en décrivant un syndrome microdélétionnel 2q27 émettant l'hypothèse de l'implication de *KIF1A* dans une DI non syndromique associée à des troubles du comportement (Galasso C, et al. 2008 ; Leroy C, et al. 2013).

L'article de Hamdan FF et ses collaborateurs rapporte, en 2011, une cohorte de 95 patients atteints d'une DI non syndromique chez lesquels ils ont séquencé 197 gènes codant pour des récepteurs au glutamate. Cette étude a permis d'évoquer la pathogénicité d'une mutation faux sens *de novo* de *KIF1A*, retrouvée chez une enfant âgée de 3 ans et 5 mois, avec une DI sévère sans épilepsie évidente et une atrophie du vermis. Cette mutation affecterait la localisation de *KIF1A* dans les neurites par un changement de structure, hypothèse à confirmer par des études complémentaires (Hamdan FF, et al. 2011). Par ailleurs, Lee JR et ses collaborateurs ont publié, en 2014, une série de 11 patients présentant une DI et une épilepsie associées ou non à une atrophie cérébelleuse, une paraparésie spastique, une atrophie du nerf optique et une neuropathie périphérique. Ils mettent en évidence chez ces patients des mutations faux sens dans le domaine moteur de *KIF1A*, qu'ils considèrent comme responsables des manifestations cliniques (Lee JR, et al. 2015).

- Conclusion :

Le Patient 5 présente une DI majeure associée à une épilepsie apparentée à un syndrome de West et considérée comme syndromique. L'interruption de *KIF1A* pourrait expliquer le phénotype de cet enfant selon les données de la littérature. Cependant, le caractère dominant a été remis en question lors de nos discussions avec l'équipe de Hamdan FF. En effet, son équipe décrit, dans l'Exome Variant Server de l'Université de Washington, 2 individus contrôles hétérozygotes porteurs d'une mutation tronquante dans le gène *KIF1A* et, dans Single Nucleotide Polymorphism database, 2 autres variants tronquants de *KIF1A* affectant son domaine moteur. De plus, Rivière JB et ses collaborateurs indiquent la présence de mutations tronquantes récessives homozygotes chez des enfants issus de parents hétérozygotes et non atteints de neuropathie sensorielle héréditaire de type II (Rivière JB, et al. 2011). Ces observations remettent en question la théorie d'une relation entre l'haplo-insuffisance du gène *KIF1A* et un retard de développement sévère. Dans ce contexte, si nous suspectons un mode de transmission récessif, le mécanisme serait alors le suivant : un des 2

allèles serait interrompu par un remaniement chromosomique et l'autre serait muté. L'association de ces 2 événements est décrite notamment chez un patient autiste porteur d'une translocation interrompant un allèle du gène *ZNF407* (zinc finger protein 407) et d'une mutation de l'autre allèle de ce gène par l'équipe de Ren CM (Ren CM, et al. 2013). Nous avons alors décidé de séquencer l'ensemble des 48 exons codants (de l'exon 2 à l'exon 49) dans le but de trouver une mutation sur l'autre allèle dans l'optique d'une hérédité autosomique récessive (cf. § 5.3.3 du chapitre Résultats).

Ces observations mettent bien en évidence la difficulté d'interprétation des résultats non seulement concernant l'implication éventuelle du gène *KIF1A* dont la pathogénicité en haplo-insuffisance n'est pas formelle, mais aussi en soulevant aussi la question du choix de la technique à mettre en œuvre devant un remaniement chromosomique apparemment équilibré *de novo* chez des patients à phénotype anormal. Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression du gène *KIF1A* (cf. § 6.1.1 du chapitre Résultats). Par ailleurs, devant le résultat de l'Array-Painting, nous avons tenté de préciser le point de cassure sur le dérivé 2 de la translocation t(Y;2) nécessitant la mise en œuvre des techniques de séquençage haut débit développées dans le § 5.3 du chapitre Résultats.

4.1.2 Patient 6

Cet enfant présente une DI et des troubles comportementaux. Une translocation entre le bras long d'un des 2 chromosomes 3 et le bras long d'un des 2 chromosomes 7 a été observée sur son caryotype : t(3;7)(q11;q11).

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 54) :

L'Array-Painting a permis d'identifier les deux points de cassure (cf. Figures 55 et 56) :

* en 3q12.1 sur le bras long du chromosome 3 entre les marqueurs S-3GILWS (96705342pb) et C-SAUV (96705356pb) avec l'interruption du gène *EPHA6* (EPHrin receptor A6) ;

* et, en 7q11.22 sur le bras long du chromosome 7 entre les marqueurs S-3UMOG (70189223pb) et S-3MPWM (96705356pb) avec l'interruption du gène *AUTS2* (autism susceptibility candidate 2).

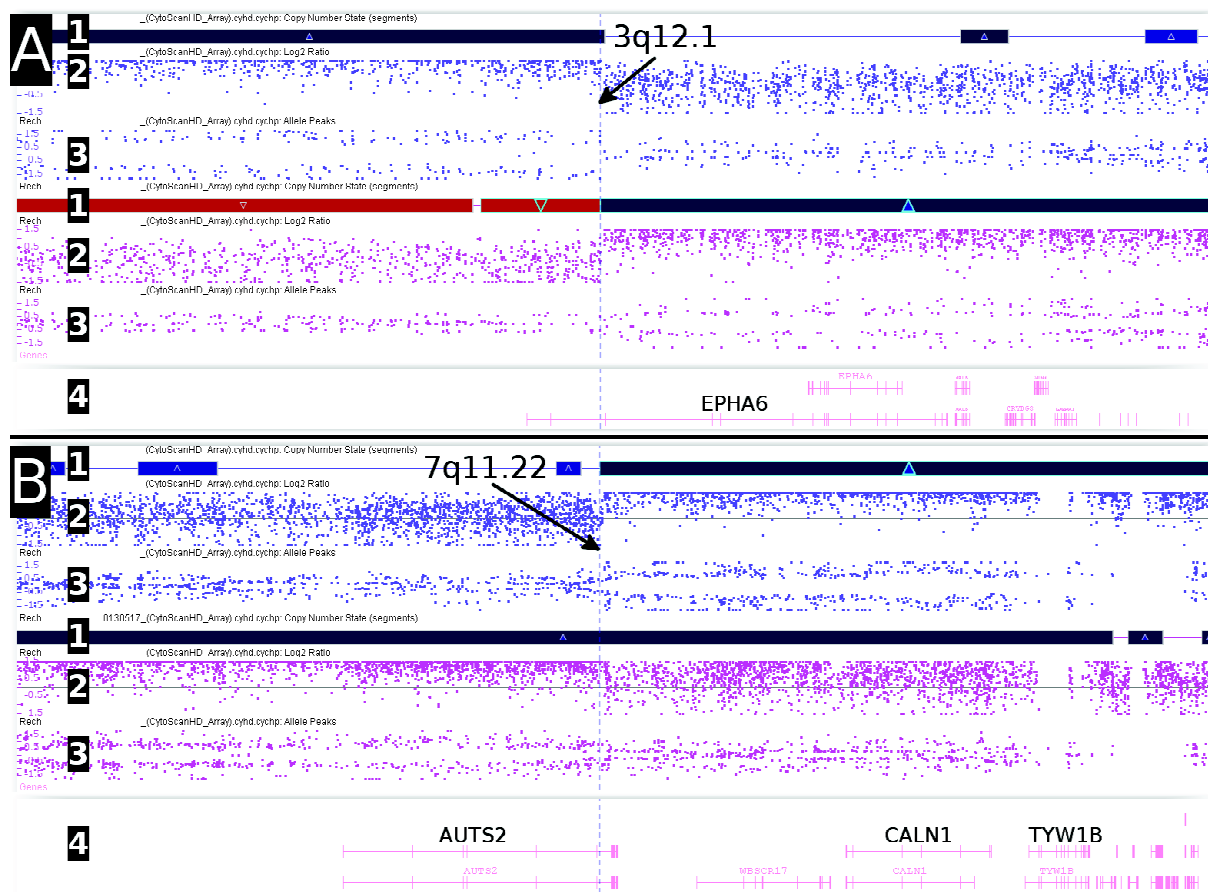


Figure 54 : Représentation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 3 (A) et pour le chromosome 7 (B) à partir des deux dérivés (Patient 6)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- log2ratio
- 3- Différence allélique (Allele Peaks)
- 4- gènes

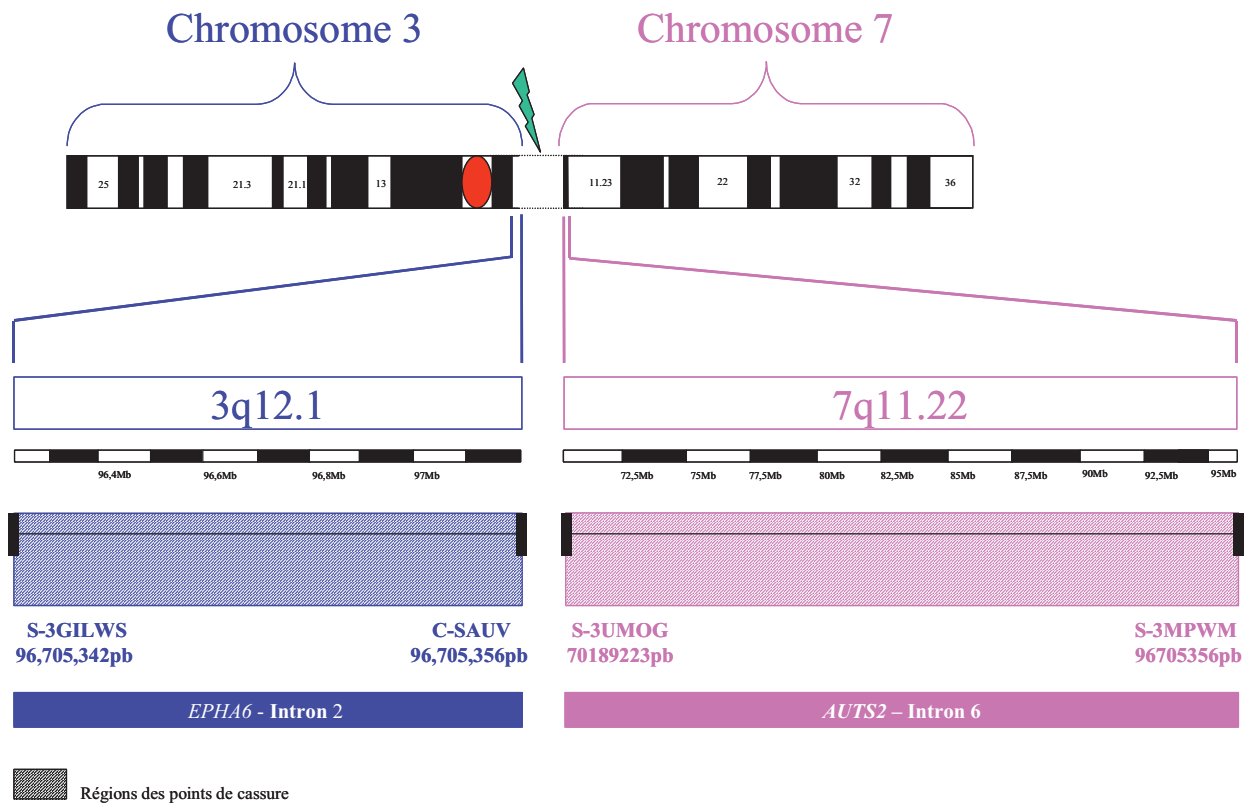


Figure 55 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 3 du Patient 6

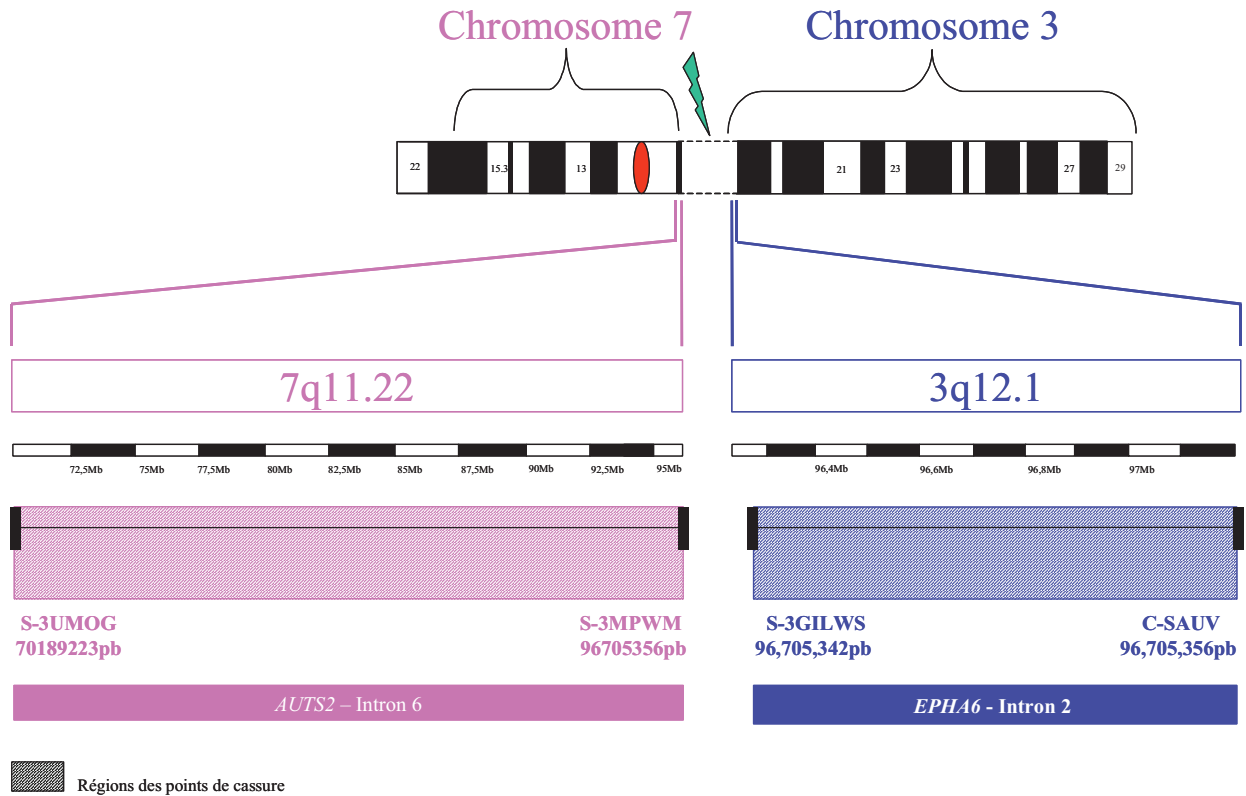


Figure 56 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 7 du Patient 6

- Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype :

Les résultats de l'Array-Painting nous ont permis d'identifier l'interruption de 2 gènes : *EPHA6* (Ephrin Receptor A6) et *AUTS2* (Autism Susceptibility Candidate 2), localisés respectivement dans les régions 3q12.1 et 7q11.22.

Epha6 appartient à la famille des récepteurs *Eph*, une sous-famille des récepteurs tyrosines kinases qui sont activés en réponse à la liaison avec l'éphrine. La voie de signalisation *Eph* / éphrine a été impliquée dans la régulation de processus importants et variables tels que le guidage axonal, la formation des frontières tissulaires, la migration cellulaire et la segmentation (Klein R. 2012). Plusieurs études, sur des modèles de souris « knockout », ont décrit le rôle des récepteurs *Eph* dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Yamaguchi Y, Pasquale EB. 2004 ; Martínez A, Soriano E. 2005). Ainsi, l'équipe de Savelieva a observé des problèmes d'apprentissage et de mémoire chez les souris « knockout » *Epha6*^{-/-}, par rapport aux souris de type sauvage mais sans neuropathologie évidente à l'examen histologique (Savelieva KV, et al. 2008). De plus, *Epha6* a été rapporté comme étant impliqué dans la formation de réseaux de neurones et comme étant sélectivement exprimé dans la plaque corticale de la souris lors de la corticogenèse (Yun ME,

et al. 2003) et dans le cortex cérébral embryonnaire des primates (Donoghue MJ, Rakic P. 1999). Chez l'homme, ce gène est préférentiellement fortement exprimé dans le cerveau, les testicules (Hafner C, et al. 2004), la rétine et les cellules ganglionnaires (Kozulin P, et al. 2009). En outre, des variations du nombre de copies impliquant *EphA6* ont été décrites chez 2 patients non apparentés atteints de la maladie d'Alzheimer familiale suggérant que le dérèglement de l'expression de *EphA6* pourrait être une voie pathogène possible responsable de cette maladie (Hooli BV, et al. 2014). Par ailleurs, de petites délétions au voisinage du locus *EphA6-UNQ6114* ont été observées dans une cohorte d'enfants atteints d'obésité non syndromique (1/1080 et 5/1479 des enfants obèses américains d'origine européenne et d'origine africaine respectivement) suggérant qu'une délétion de ce locus pourrait contribuer également à l'obésité (Glessner JT, et al. 2010). Cependant, le rôle exact de *EphA6* en pathologie humaine n'est pas bien défini et il est donc difficile d'attribuer formellement un rôle de l'haplo-insuffisance de *EphA6* dans les maladies humaines. Dans ce contexte, nous ne pouvons affirmer que la perturbation de ce gène explique le phénotype de notre patient.

AUTS2, second gène interrompu par la translocation t(3;7), est exprimé dans le cerveau (aussi bien dans le néocortex que dans le cortex préfrontal), (Zhang YE, et al. 2011), le muscle squelettique, le foie et, à un niveau moindre, dans le placenta, la langue et les leucocytes (Sultana R, et al. 2002). Ce gène jouerait aussi un rôle dans le développement neurologique (Pennacchio LA et al 2006 ; Bedogni F, et al 2010). De plus, *AUTS2* code pour une protéine nucléaire qui est principalement exprimée dans divers types cellulaires dans le cerveau, notamment dans le néocortex, région impliquée dans les troubles du spectre autistique (Oksenberg N et Ahituv N. 2013).

Différents réarrangements chromosomiques impliquant *AUTS2* ont été rapportés dans la littérature comme étant responsables de DI et / ou de retard de développement ainsi que de traits autistiques et de microcéphalie chez l'homme : des délétions intragéniques (Beunders G, et al. 2013 ; Nagamani SC, et al. 2013 ; Jolley A, et al. 2013 ; Amarillo IE, et al. 2014 ; Beunders G, et al. 2015 ; Liu Y, et al. 2015), des duplications (Elia J, et al. 2010 ; Nagamani SC, et al. 2013), des inversions (Bakkaloglu B, et al. 2008 ; Beunders G, et al. 2013), translocations (voir ci-dessous) ou de mutations ponctuelles (Beunders G, et al. 2014). De plus, certains traits du visage sont rapportés chez les patients ayant une atteinte de *AUTS2*, à savoir des sourcils arqués, un ptosis, un philtrum court et un strabisme. Le Patient 6 présente une DI associée à une microcéphalie et des traits du visage assez similaires aux patients de la littérature sauf pour les fentes palpébrales orientées en bas. Sur la base de ces données, nous

pensons que la perturbation de *AUTS2*, dont l'implication est largement rapportée en pathologie médicale dans la littérature, pourrait expliquer une partie du phénotype de cet enfant.

L'équipe de Sultana R est la 1^{ère} à mentionner, en 2002, l'interruption par une translocation apparemment équilibrée de *AUTS2* chez des jumeaux. Leur hypothèse est que l'interruption de ce gène pourrait expliquer la symptomatologie clinique observée chez ces jumeaux (Sultana R, et al. 2002). Par la suite, cinq patients ont été décrits avec des translocations réciproques apparemment équilibrées qui interrompent *AUTS2* (Kalscheuer VM, et al 2007 ; Huang XL, et al 2010 ; Beunders G et al, 2013). Dans le cadre des perturbations de *AUTS2*, l'hypothèse d'Amarillo IE est que son interruption est responsable d'une modification du cadre de lecture créant un codon stop prématuré (Amarillo IE, et al. 2014). Cependant, plusieurs points de cassure ont été identifiés et peuvent avoir comme conséquence un effet de position ou la formation d'un gène de fusion, comme observé notamment chez quatre patients atteints de leucémie (Kawamata N, et al. 2008 ; Coyaud E, et al. 2010 ; Denk D, et al. 2012.; Denk D, et al. 2014).

- Techniques complémentaires : précision des points de cassure :

L'Array-Painting a révélé l'interruption de deux gènes dont l'un semble expliquer la symptomatologie du Patient 6. Dans ce contexte, nous avons décidé de cloner les points de cassure par le séquençage type Sanger en nous appuyant sur les résultats de l'Array-Painting pour choisir les amorces. Les points de cassure ont été identifiés dans l'intron 2 du gène *EPHA6* (3:96699437) et dans l'intron 6 du gène *AUTS2* (7:70190828), (cf. Figure 57).

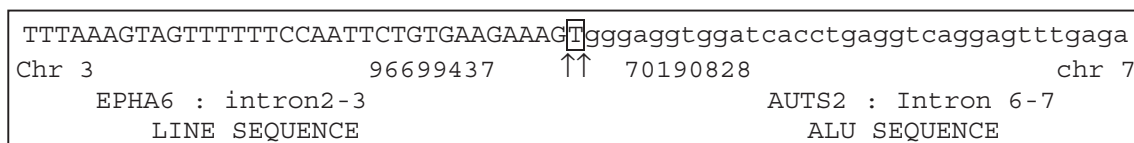


Figure 57 : Représentation de la jonction entre les gènes *EPHA6* et *AUTS2* après séquençage à partir du dérivé 3 et comparaison par BLAST (T est commun à la séquence sur le chromosome (chr) 3 et à celle sur le chromosome 7). La comparaison des séquences avec les logiciels BLAST et RepeatMasker® met en évidence 2 séquences répétées au niveau des points de cassure (LINE sur le dérivé 3 et ALU sur le dérivé 7). Les positions nucléotidiques sont en pb.

- Conclusion :

La translocation observée chez cet enfant interromp les gènes *AUTS2* et *EPHA6*. *AUTS2* serait être associée à des troubles du développement neurologique syndromique ou non et donc pourrait expliquer le phénotype du Patient 6. Mais, nous ne pouvons exclure que les

gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* ou *AUTS2-EPHA6*, potentiellement formés à la suite de ce remaniement, interviennent dans la pathologie de cet enfant, comme l'équipe de di Gregorio E l'a décrit au sujet d'une petite fille dont les symptômes cliniques s'expliquent par la présence du gène de fusion *PTK2-THOC2* (di Gregorio E, et al. 2013). Dans ce contexte, nous avons recherché des gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* ou *AUTS2-EPHA6* ainsi qu'étudier l'expression du gène *AUTS2* (cf. § 6.2 du chapitre Résultats).

4.1.3 Patiente 8

Cette enfant présente principalement une DI. Son caryotype montre une translocation entre le bras long d'un des 2 chromosomes 1 et le bras long d'un des 2 chromosomes 14 : $t(1;14)(q44;q32.2)$. L'analyse par puce à ADN a montré une duplication de la région 4p11q12, dont le caractère pathogène n'est pas avéré. Dans ce contexte, nous avons pris l'option de cloner les points de cassure du remaniement observé chez cette patiente, afin de rechercher une autre étiologie expliquant son phénotype.

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 58) :

Les points de cassure, identifiés après Array-Painting, sont localisés (cf. Figures 59 et 60) :

* en 1q44 du bras long du chromosome 1 entre les marqueurs C-3SKPT (244020515pb) et C-4GJAN (244021351pb),

* et, en 14q32.12 du bras long du chromosome 14 au niveau du marqueur C-6TITIDO (93949596pb).

Il n'y a pas d'interruption de gène sur le dérivé 1 de la translocation $t(1;14)$ mais, en amont du point de cassure, se trouvent les gènes *AKT3* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene homolog 3), *SDCCAG8* (serologically defined colon cancer antigen 8) et *CEP170* (centrosomal protein 170kDa - kiloDalton), et en aval, les gènes *LOC339529*, *ZNF238* (zinc finger and BTB domain containing 18) et *C1ORF100* (chromosome 1 open reading frame 100). En ce qui concerne le dérivé 14, le marqueur interrompu est situé au niveau du gène *KIAA1409* (Unc-79 Homolog - *C. Elegans*).

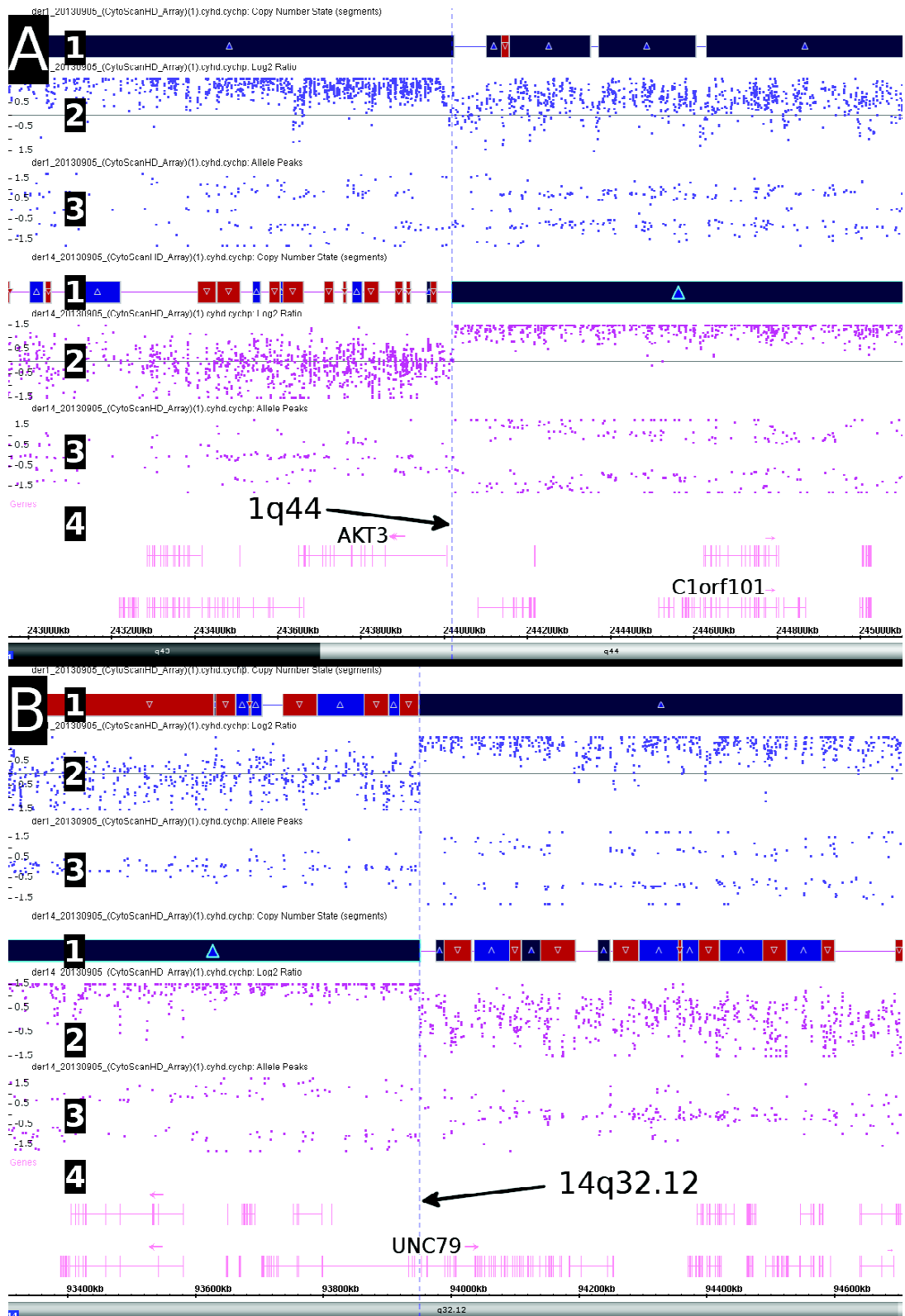


Figure 58 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 1 (A) et pour le chromosome 14 (B) à partir des deux dérivés (Patiente 8)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- log2ratio
- 3- Différence allélique (Allele Peaks)
- 4- gènes

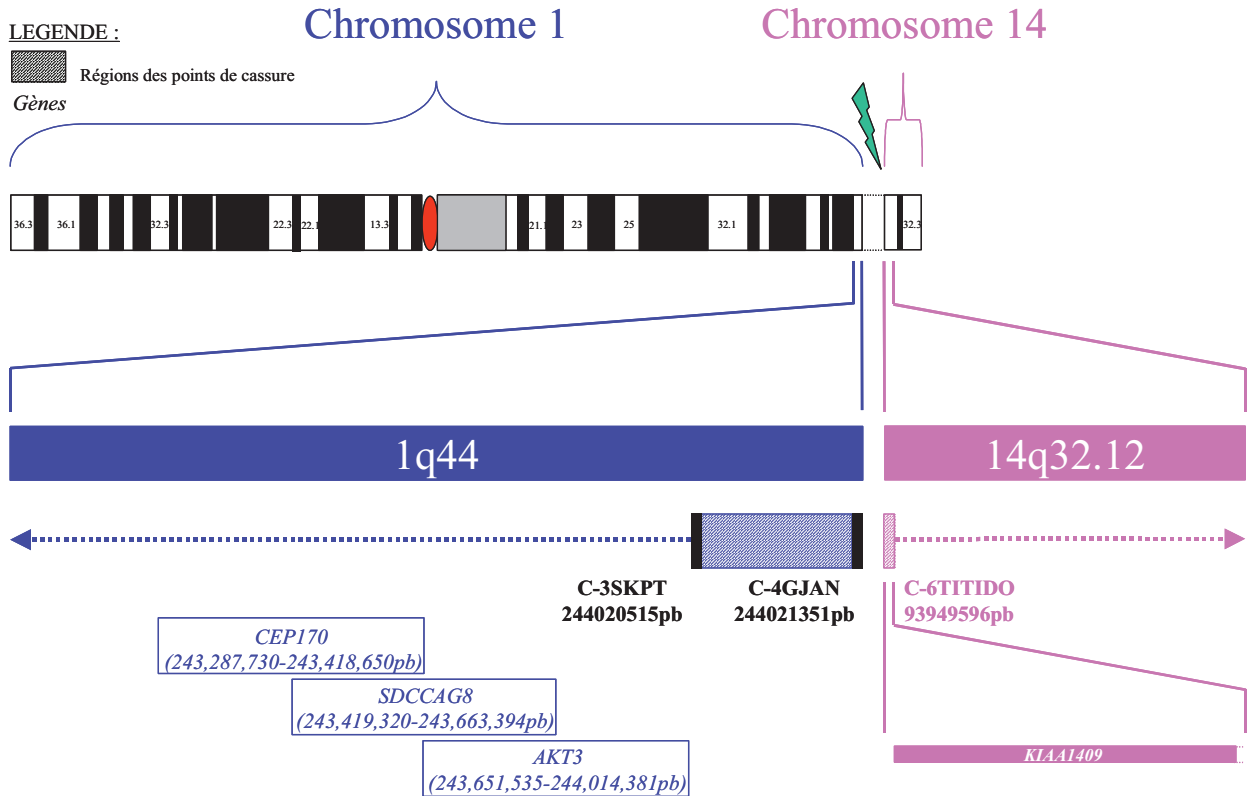


Figure 59 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 1 de la Patiente 8

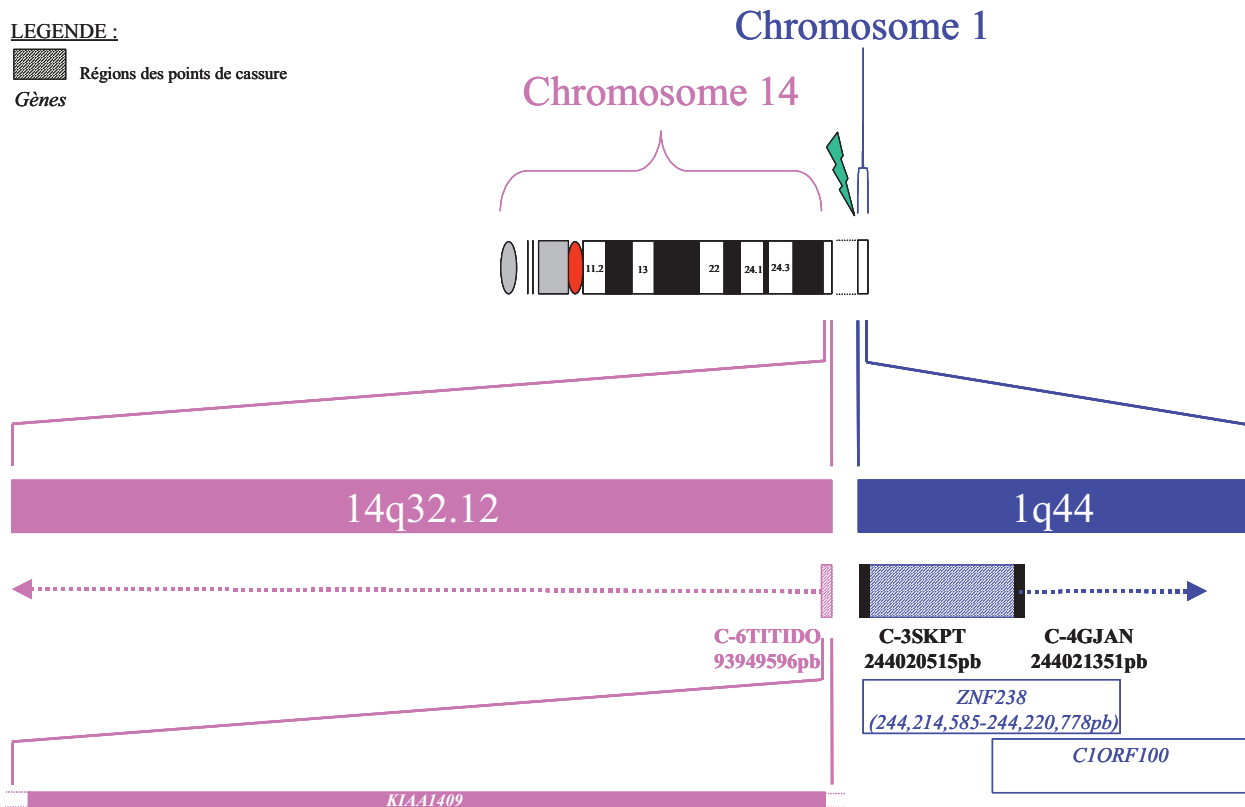


Figure 60 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 14 de la Patient 8

- Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype :

Cette enfant présente une translocation t(1;14). Les résultats de l'Array-Painting ont mis en évidence une interruption du gène *KIAA1409* (Unc-79 Homolog - C. Elegans) localisé en 14q32.12 du bras long du chromosome 14. Après consultation des bases de données de la littérature médicale, aucune information permettant d'expliquer le phénotype de la Patient 8 n'a pu être retrouvée avec les connaissances actuelles. Le rôle de ce gène reste donc encore à définir. Pour savoir si la perte de fonction de ce gène pourrait être responsable du phénotype de cette enfant, différentes approches seraient nécessaires comme des études fonctionnelles ou le séquençage de ce gène chez des patients présentant le même phénotype dans l'espoir de retrouver des mutations délétères.

- Conclusion :

Après consultation des données de la littérature, nous n'avons pas d'explication pour le phénotype de la Patient 8. Dans ce contexte, un autre mécanisme pathologique pourrait être envisagé comme un effet de position (cf. § 4.2.3 du chapitre Résultats).

4.1.4 Patient 10

Cet enfant est porteur d'un remaniement chromosomique complexe avec une translocation à 3 chromosomes : t(3;15;5)(p11;q2?5;q23). Les signes cliniques observés sont une DI et des troubles neuromusculaires.

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figures 61 et 62) :

L'interprétation des résultats de l'Array-Painting a permis d'identifier un remaniement plus complexe que celui initialement diagnostiqué. En effet, trois points de cassure sont observés sur les dérivés chromosomiques 3 et 5.

Sur le chromosome 3, les points de cassure sont localisés :

- * entre les marqueurs S-3GHAX (83609319pb) et S-3OREM (83611406pb),
- * entre les marqueurs C-7DZTO (85508898pb) et C-EPFS (85520902pb),
- * et, entre les marqueurs C-5LLRV (88657298pb) et S-4KHVG (88668147pb).

Sur le chromosome 5, les points de cassure sont localisés :

- * entre les marqueurs S-3LQED (130138005pb) et C-7MJSI (130139269pb),
- * entre les marqueurs C-5YQTP (166168108pb) et C-4EFQZ (166175239pb),
- * et, entre les marqueurs C-3SBUE (167436605pb) et C-4JLPE (167440835pb).

Sur le chromosome 15, le point de cassure est localisé entre les marqueurs S-3VWEN (97627684pb) et S-3QECG (97628975pb).

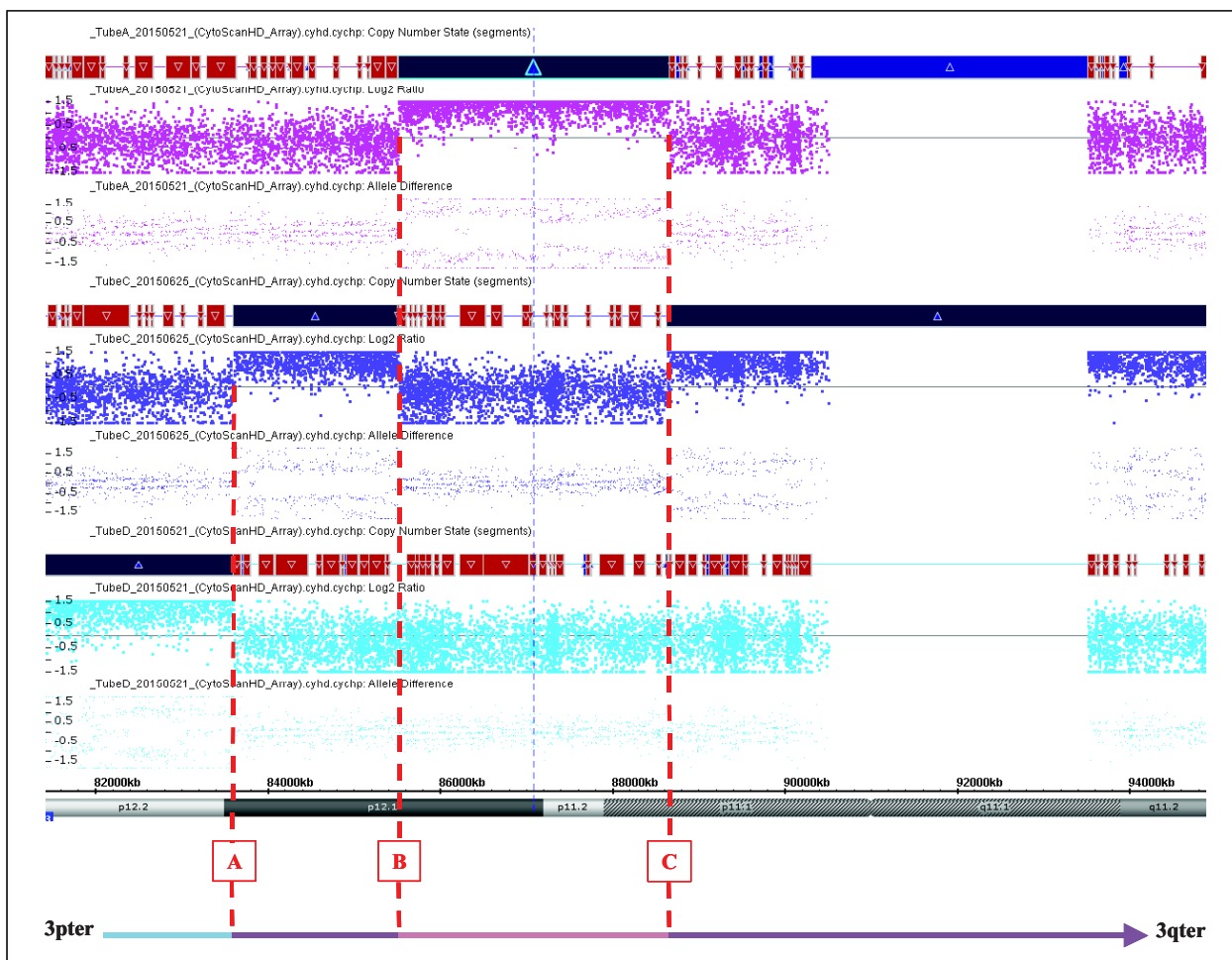


Figure 61 : Localisation des séquences du chromosome 3p chez le Patient 10

A- Point de cassure entre les marqueurs S-3GHAX (83609319pb) et S-3OREM (83611406pb)

B- Point de cassure entre les marqueurs C-7DZTO (85508898pb) et C-EPFS (85520902pb)

C- Point de cassure entre les marqueurs C-5LLRV (88657298pb) et S-4KHVG (88668147pb)

- Séquence localisée sur le dérivé 3
- Séquence localisée sur le dérivé 5
- Séquence localisée sur le dérivé 15
- - - Point de cassure

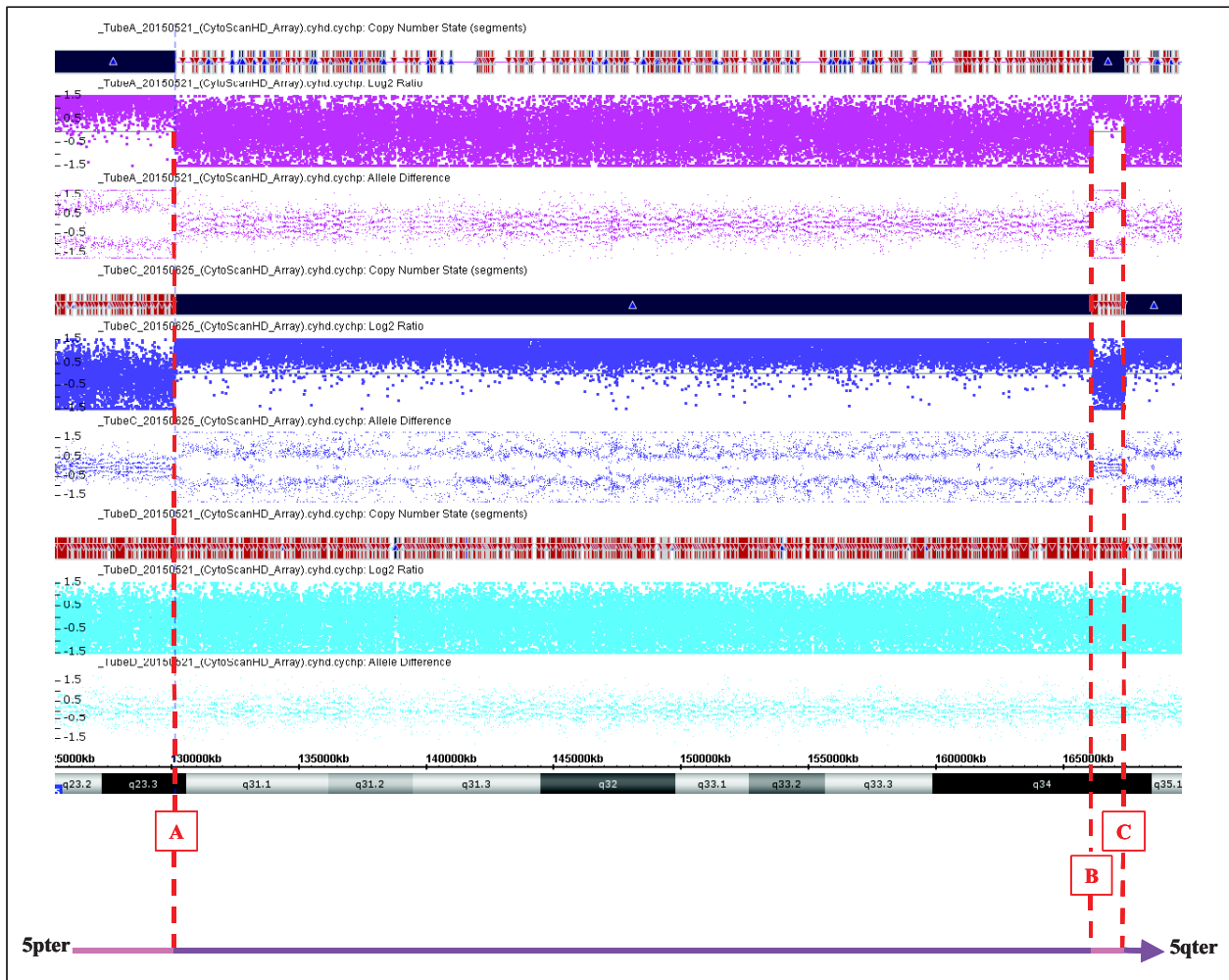


Figure 62 : Localisation des séquences du chromosome 5q chez le Patient 10

- A- Point de cassure entre les marqueurs S-3LQED (130138005pb) et C-7MJSI (130139269pb)
- B- Point de cassure entre les marqueurs C-5YQTP (166168108pb) et C-4EFQZ (166175239pb)
- C- Point de cassure entre les marqueurs C-3SBUE (167436605pb) et C-4JLPE (167440835pb)
- Séquence localisée sur le dérivé 3
- Séquence localisée sur le dérivé 5
- - - Point de cassure

- Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype :

Ces résultats ont permis d'identifier l'interruption de 3 gènes : *CADM2* (Cell Adhesion Molecule 2) et *CCDS54614* en 3p12.1 du bras court du chromosome 3 ainsi que le gène *TENM2* en 5q34 (teneurin transmembrane protein 2) du bras long du chromosome 5.

Les différentes bases de données de la littérature médicale ne donnent aucune information sur le gène *CCDS54614* permettant d'expliquer le phénotype du Patient 10.

CADM2 code pour un membre de la famille des molécules d'adhésion cellulaire synaptique (SynCAM) qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig), (Ibrahim-Verbaas CA, et al. 2015). Différentes études montrent que la molécule d'adhésion neuronale codée par ce

gène est largement exprimée dans le cerveau des souris (Thomas LA, et al. 2008), mais aussi dans le tissu cérébral du rat et de l'homme, notamment au niveau de l'hippocampe (Ibrahim-Verbaas CA, et al. 2015). Par ailleurs, même si aucun variant de *CADM2* n'a été associé à des fonctions cognitives, il semblerait que ce gène soit un bon candidat dans les maladies du spectre de l'autisme (Casey JP, et al. 2012), ainsi que dans les troubles de la personnalité avec un rôle dans certaines maladies neuropsychiatriques et dans les démences (Ibrahim-Verbaas CA, et al. 2015). Selon les données de la littérature, l'interruption de *CADM2* pourrait expliquer le phénotype du Patient 10. Cependant, cette hypothèse est basée principalement sur des études d'association pangénomique ou genome-wide association study (GWAS) et doit donc être confirmée par des études fonctionnelles.

TENM2 appartient à la famille des teneurines composée de 4 membres qui sont tous exprimés dans le cerveau (Oohashi T, et al. 1999). Les teneurines jouent un rôle dans le développement et la croissance des neurites, le guidage axonal, la connectivité neuronale et la synaptogenèse (Tucker RP, et al. 2006 ; Young TR, Leamey CA. 2008). De plus, Latrophilin 1 et son ligand endogène Lasso/teneurin-2 forment un complexe trans-synaptique pour certains récepteurs intervenant dans la signalisation (Silva JP, et al. 2011). L'implication de *TENM2* pourrait être suspectée mais cette hypothèse reste à confirmer par des études fonctionnelles.

- Conclusion : hypothèse d'un *chromothripsis*

Initialement, le Patient 10 présente une translocation à 3 chromosomes $t(3;15;5)$ qui correspond à un RCC. Ce RCC est un *three-way*, selon la classification de Kausch K et ses collaborateurs de 1988. Ces réarrangements sont considérés comme les plus fréquents et les moins complexes. Ils sont caractérisés par 3 points de cassure avec des échanges des segments chromosomiques distaux (Kausch K, et al. 1988). Selon l'équipe de Feenstra I, la présence d'un déséquilibre additionnel lors d'un RCC peut atteindre jusqu'à 90 % (Feenstra I, et al. 2011). Nous nous attendions donc à une éventuelle anomalie additionnelle sur la puce à ADN. A la suite du résultat normal de l'ACPA, nous avons recherché une autre étiologie pour expliquer le phénotype du patient en utilisant la technique d'Array-Painting.

Les résultats de l'Array-Painting du Patient 10 ont montré non seulement l'interruption de 2 gènes dont l'implication peut être évoquée pour expliquer les signes cliniques de cet enfant mais aussi un remaniement apparemment plus complexe que celui identifié par les techniques de Cytogénétique standard et moléculaire.

Dans ce contexte, comme chez la Patiente 1, nous avons envisagé un mécanisme encore plus complexe et ainsi fait l'hypothèse d'un *chromothripsis*, qui pourrait être responsable de l'interruption d'un autre gène dont les mutations décrites dans la littérature induisent un caractère délétère. L'ADN du Patient 10 a donc été étudié par WGS (cf. § 5.4 du chapitre Résultats).

4.1.5 Patiente 12

Cette enfant présente notamment un retard des acquisition et est porteuse d'une translocation impliquant les chromosomes 4 et 7 : $t(4;7)(q31;p22)$. L'interprétation impossible des résultats obtenus par WGS (réalisé sur le mélange de son ADN et de l'ADN du Patient 11) ainsi que l'absence de détermination des points de cassure par FISH nous ont amenés à réaliser la technique d'Array-Painting pour cloner les points de cassure du remaniement observé chez cette patiente.

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 63) :

Les points de cassure, identifiés après Array-Painting, sont localisés (cf. Figures 64 et 65) :

* en 4q32.1 du bras long du chromosome 4 entre les marqueurs C-FKWE (2160337386pb) et S-3NENS (160347953pb),

* et, en 7p22.1 du bras court du chromosome 7 entre les marqueurs C-6HKKO (5362408pb) et C-5CIBM (5367122pb).

Il n'y a pas d'interruption de gène sur le dérivé 4 de la translocation $t(4;7)$ mais, en amont du point de cassure, se trouve le gène *RAPGEF2* (Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 2), et en aval, le gène *FSTL5* (Follistatin-Like 5). En ce qui concerne le dérivé 7, le point de cassure est situé au niveau du gène *TNRC18* (Trinucleotide Repeat Containing 18).

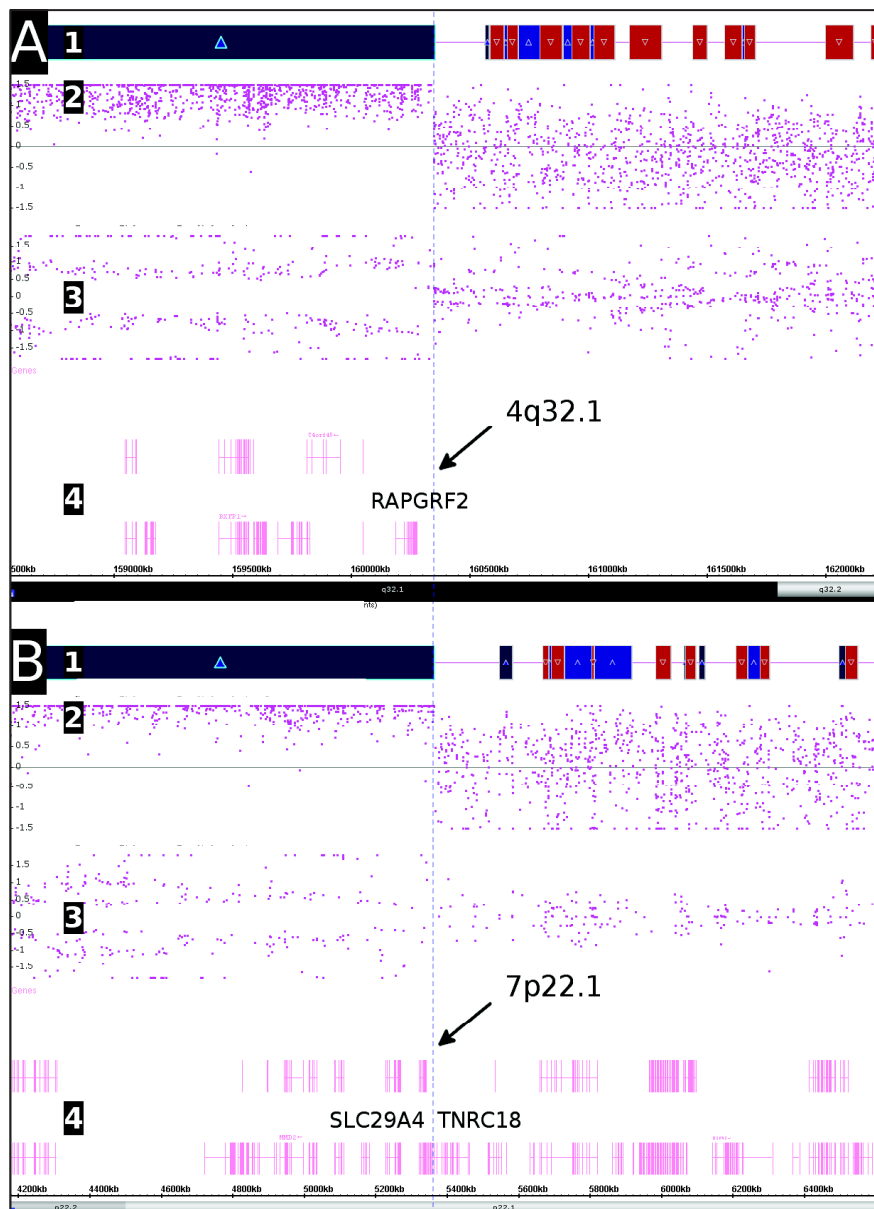


Figure 63 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 4 (A) et pour le chromosome 7 (B) à partir du dérivé 4 (Patiente 12)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- log₂ratio
- 3- Différence allélique (Allele Peaks)

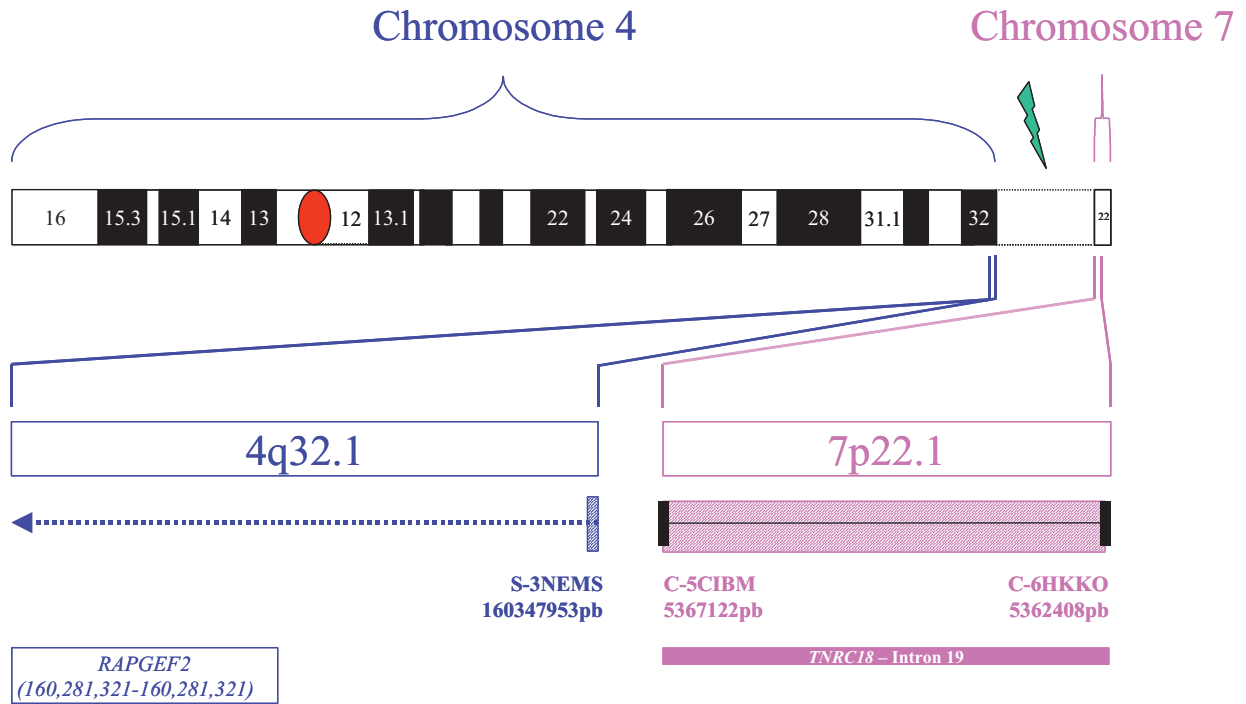
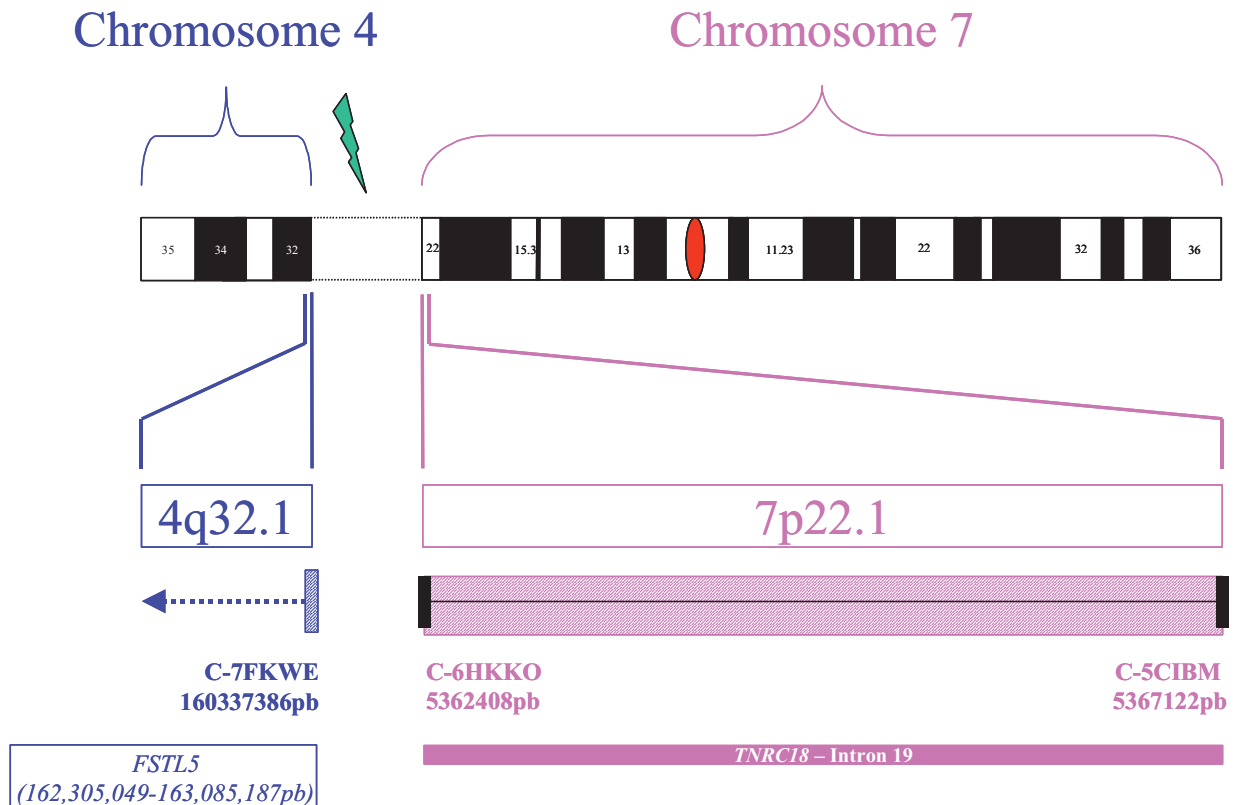


Figure 64 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 4 de la Patiente 12



LEGENDE :


 Régions des points de cassure
Gènes

Figure 65 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 7 de la Patientte 12

- Hypothèse de l'interruption d'un gène pouvant expliquer le phénotype :

L'interruption du gène *TNRC18* (Trinucleotide Repeat Containing 18), localisé en 7p22.1 du bras court du chromosome 7, a été mise en évidence par la technique d'Array-Painting. Les différentes bases de données de la littérature médicale ne rapportent aucune information permettant d'expliquer le phénotype de la Patientte 12, avec les connaissances actuelles. Le rôle de ce gène reste donc encore à définir. Pour savoir si la perte de fonction de ce gène pourrait être responsable du phénotype de cette enfant, différentes approches sont nécessaires comme des études fonctionnelles ou le séquençage de ce gène chez des patients présentant le même phénotype dans l'espoir de retrouver des mutations délétères.

- Conclusion :

Après consultation des données de la littérature, nous n'avons pas d'explication pour le phénotype de enfant. Dans ce contexte, nous suggérons un autre mécanisme pathologique tel qu'un effet de position (cf. § 4.2.2 du chapitre Résultats).

4.2 Pas d'interruption génique aux points de cassure

4.2.1 Patient 4

Ce patient présente une DI associée à des troubles neuromusculaires. Son caryotype montre une translocation entre le bras long d'un des 2 chromosomes 2 et le bras court d'un des 2 chromosomes 11 : t(2;11)(q32;p14).

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 66) :

Les résultats de l'Array-Painting montrent des points de cassure en 2q33.1 sur le bras long du chromosome 2 et en 11p14.3 sur le bras court du chromosome 11 (au niveau du marqueur C-4GEAQ (199803844pb) sur le chromosome 2 et du marqueur C-3BSOE (23207837pb) sur le chromosome 11), (cf. Figures 67 et 68).

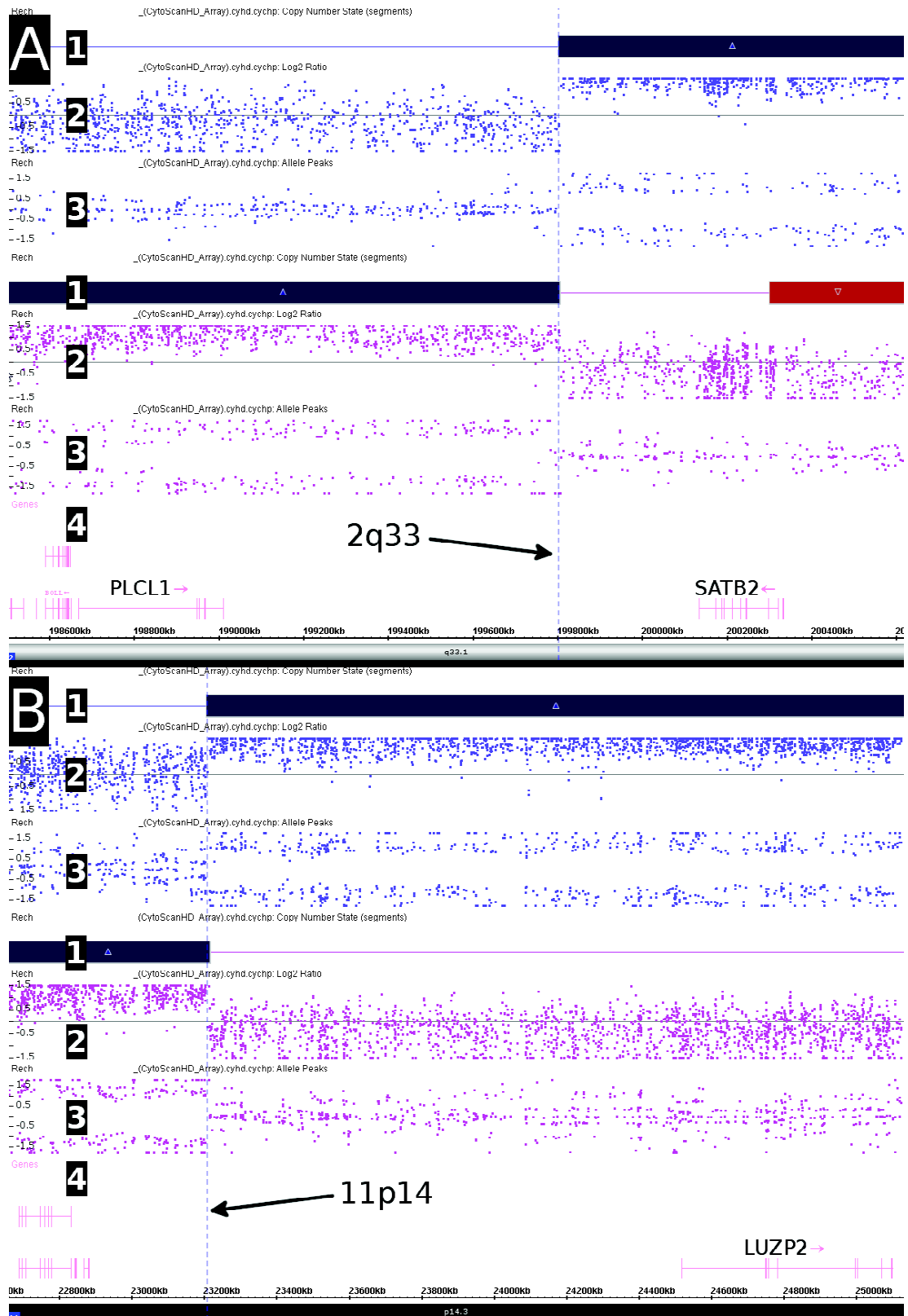


Figure 66 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 2 (A) et pour le chromosome 11 (B) à partir des deux dérivés (Patient 4)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- log2ratio
- 3- différence allélique (Allele Peaks)
- 4- gènes

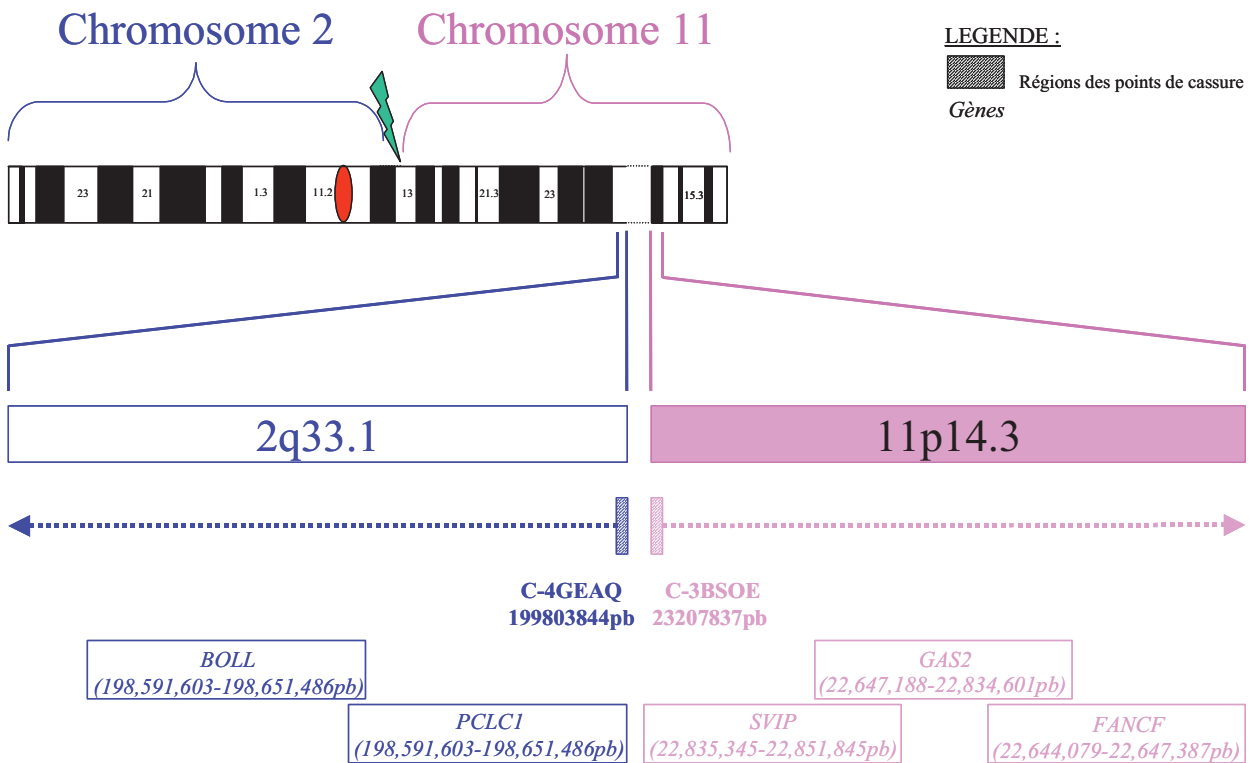


Figure 67 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 2 du Patient 4

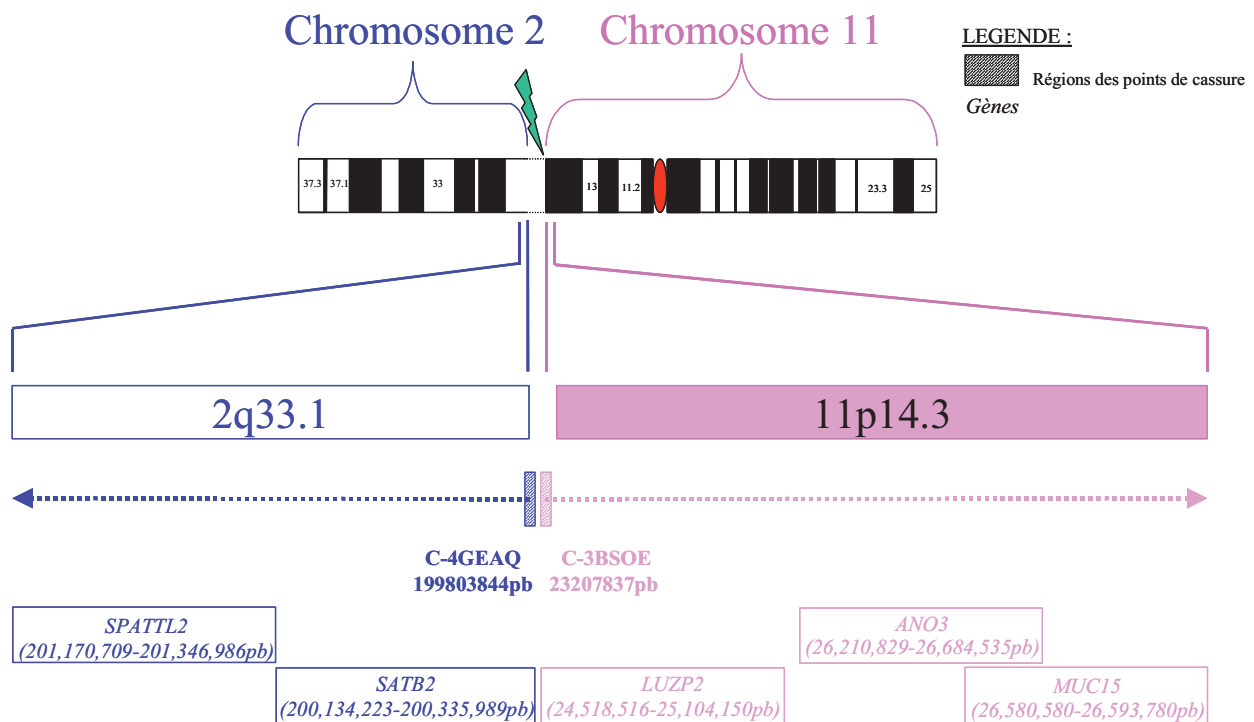


Figure 68 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 11 du Patient 4

Aucun gène n'est interrompu aux points de cassure. A distance, de part et d'autre des points de cassure, se trouvent les gènes suivants :

* sur le dérivé 2 : *PLCLI* (Phospholipase C-Like 1), *BOLL* (Boule-Like RNA-Binding Protein) et *LFTN2* en amont du point de cassure et *SATB2* (SATB homeobox 2), *LOC3487851* et *SPATS2L* (Spermatogenesis Associated, Serine-Rich 2-Like) en aval du point de cassure.

* sur le dérivé 11 : *FANCF* (Fanconi Anemia, Complementation Group F), *GAS2* (Growth Arrest-Specific 2), *SVIP* (small VCP/p97-interacting protein) et *LOC100500938* en amont du point de cassure et *LUZP2* (leucine zipper protein 2), *ANO3* (anoctamin 3) et *MUC15* (mucin 15, cell surface associated) en aval du point de cassure.

- Hypothèse d'un effet de position pour expliquer le phénotype :

L'analyse par Array-Painting n'a pas montré d'interruption de gènes aux points de cassure. Cependant, nous avons regardé si, de part et d'autre des points de cassure, certains gènes pouvaient expliquer la clinique de cet enfant. Les points de cassure sont en 5' des gènes *FANCF* (à environ 560kb du point de cassure), *ANO3* (à environ 3002kb du point de cassure) et *MUC15* (à environ 3372kb du point de cassure) ou en 3' du gène *SATB2* (à environ 330kb du point de cassure).

L'implication de *SATB2* dans la pathogenèse des variations morphologiques faciales et dans le développement du cerveau a été rapportée en 2007 par l'équipe de Leoyklang P, qui décrit le 1^{er} patient avec une mutation stop de *SATB2* qui présente une DI, des variations morphologiques faciales, une ostéoporose et une épilepsie (Leoyklang P, et al. 2007). Par la suite, une délétion de *SATB2* et une interruption sont évoquées chez des patients présentant un syndrome de Toriello-Carey (Rosenfeld JA, et al. 2009 ; Tegay DH, et al. 2009). Cependant, ce syndrome est caractérisé par des variations morphologiques faciales caractéristiques comme un télécanthus, des fentes palpébrales courtes, un petit nez avec des narines antéversées et une séquence de Pierre Robin qui ne sont pas décrites chez le Patient 4. Le gène *SATB2* ne semble donc pas impliqué dans son phénotype.

Des mutations de *FANCF* sont responsables de l'anémie de Fanconi du groupe F (OMIM #603467), (de Winter J P, et al. 2000). Cette maladie se manifeste par une anémie, une thrombopénie et une leucopénie, ainsi que des malformations cardiaques, rénales et des membres. Parmi les signes cliniques du Patient 4, aucune malformation n'est notée, ni d'atteinte hématologique. *FANCF* ne semble donc pas être impliqué.

Le gène *ANO3* code pour un canal chlore activé par des ions calciques et est fortement exprimé au niveau du striatum (Hartzell HC, et al. 2009). De nombreux auteurs incriminent des mutations hétérozygotes de ce gène dans la dystonie de type 24 (DYT24), (OMIM #615034), dont le dernier en date est Stamelou M (Stamelou M, et al. 2014). De plus, des variants polymorphes de ce locus *ANO3/MUC15* sont décrits dans des familles atteintes d'asthme et d'eczéma (Dizier MH, et al. 2012). Dans ce dernier article, les auteurs suggèrent que *MUC15* serait un bon candidat à l'atteinte cutanée mais soulignent la nécessité d'une étude plus poussée pour confirmer leurs résultats et pour mieux comprendre le rôle du locus *ANO3/MUC15* dans ces pathologies. Au vu de la clinique associée à une dérégulation de l'expression de ces gènes, la présence d'un point de cassure responsable d'un effet de position agissant sur *ANO3* et/ou *MUC15* ne semble pas être une hypothèse satisfaisante pour expliquer le phénotype du Patient 4.

- Conclusion :

Ainsi, après analyse des gènes situés de part et d'autre des points de cassure, nous n'avons pas trouvé d'étiologie pour expliquer les signes cliniques du Patient 4. Dans ce contexte, l'hypothèse d'une mutation d'un autre gène reconnu comme responsable de DI ou encore non identifié comme pathogène peut être émise.

4.2.2 Patiente 7

Cette patiente présente une DI et est porteuse d'une translocation entre le bras court d'un des 2 chromosomes 3 et le bras long d'un des 2 chromosomes 5 : t(3;5)(p26;q13.3).

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 69) :

L'interprétation de l'Array-Painting permet d'objectiver des points de cassure dans la région 3p26.3 sur le bras court du chromosome 3 et en 5q14.3 sur le bras long du chromosome 5 (cf. Figures 70 et 71).

Les points de cassure identifiés à l'aide du logiciel ChAS sont localisés entre :

* les marqueurs C-3KMZN (917011pb) et SC-7BSFY (917267pb) sur le chromosome 3.

* les marqueurs S-3DWYA (88348122pb) et C-5HKUC (88348221pb) sur le chromosome 5.

Aucun gène n'est interrompu et à distance, de part et d'autre des points de cassure, se trouvent :

* sur le dérivé 3 : *CHL1* (cell adhesion molecule L1-like) en amont du point de cassure et *CNTN6* (contactin 6), *CNTN4* (contactin 4), *IL5RA* (interleukin 5 receptor, alpha), *TRNT1* (tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1) et *CRBN* (cereblon) en aval du point de cassure.

* sur le dérivé 5 : *MEF2C* (myocyte enhancer factor 2C), *TMMI61B* et *RASAI* (RAS p21 protein activator (GTPase activating protein 1) en amont du point de cassure et *CETN3* (centrin, EF-hand protein, 3), *MBLAC2* (metallo-beta-lactamase domain containing 2), *POLR36*, *LYSMD3* (LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3) et *GPR98* (G protein-coupled receptor 98) en aval du point de cassure.

Ainsi les points de cassure identifiés par cette approche sont

* en 5' des gènes *CNTN6* (à environ 272kb du point de cassure) et *CNTN4* (à environ 1223kb du point de cassure) sur le dérivé 3 et en 5' des gènes *MEF2C* (à environ 148kb du point de cassure) et *GPR98* (à environ 1477kb du point de cassure) sur le dérivé 5.

* et en 3' des gènes *CRBN* (à environ 2274kb du point de cassure) sur le dérivé 3 et *RASAI* (à environ 1660kb du point de cassure) sur le dérivé 5.

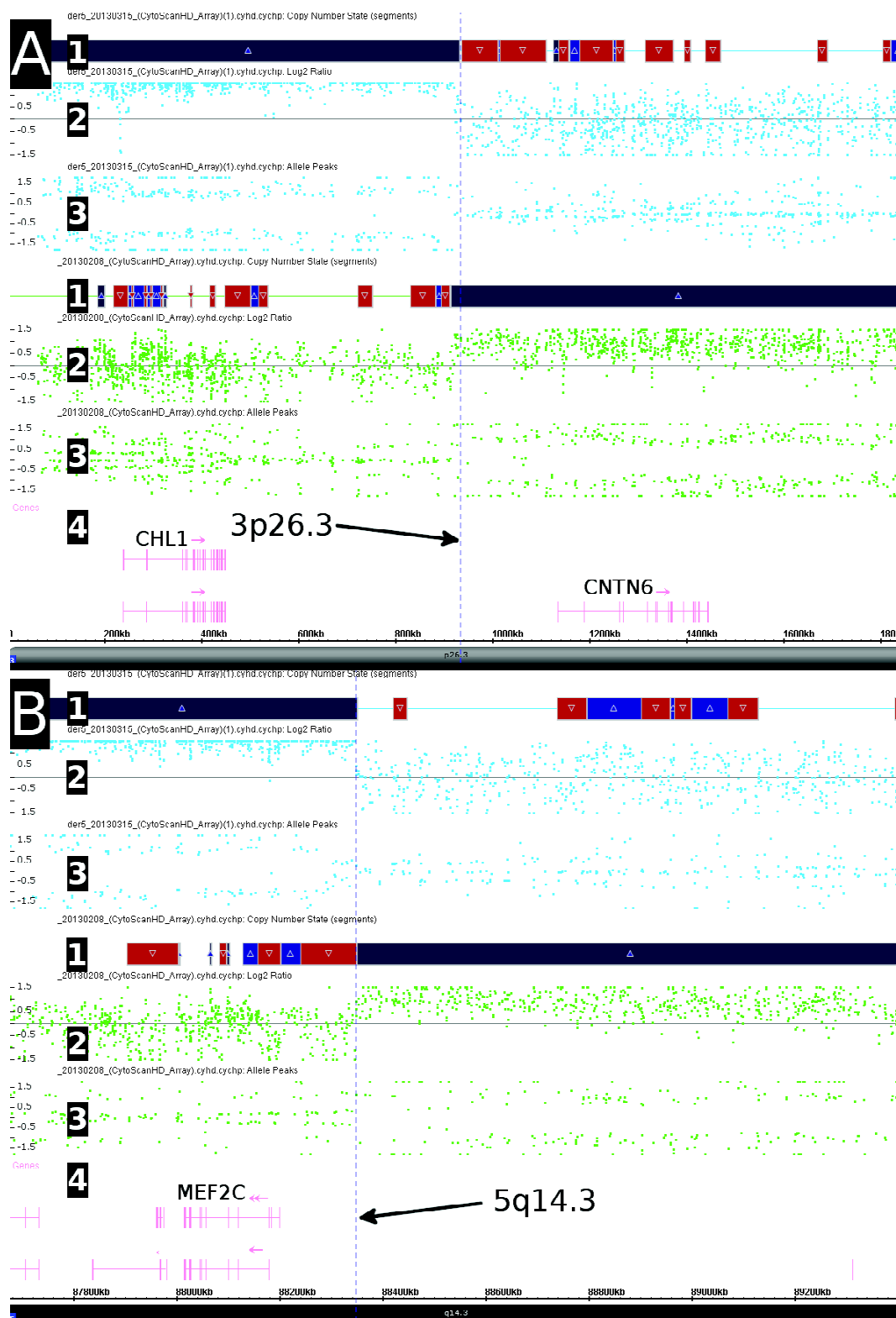


Figure 69 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 3 (A) et pour le chromosome 5 (B) à partir des deux dérivés (Patiente 7)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- log2ratio
- 3- Différence allélique (Allele Peaks)
- 4- gènes

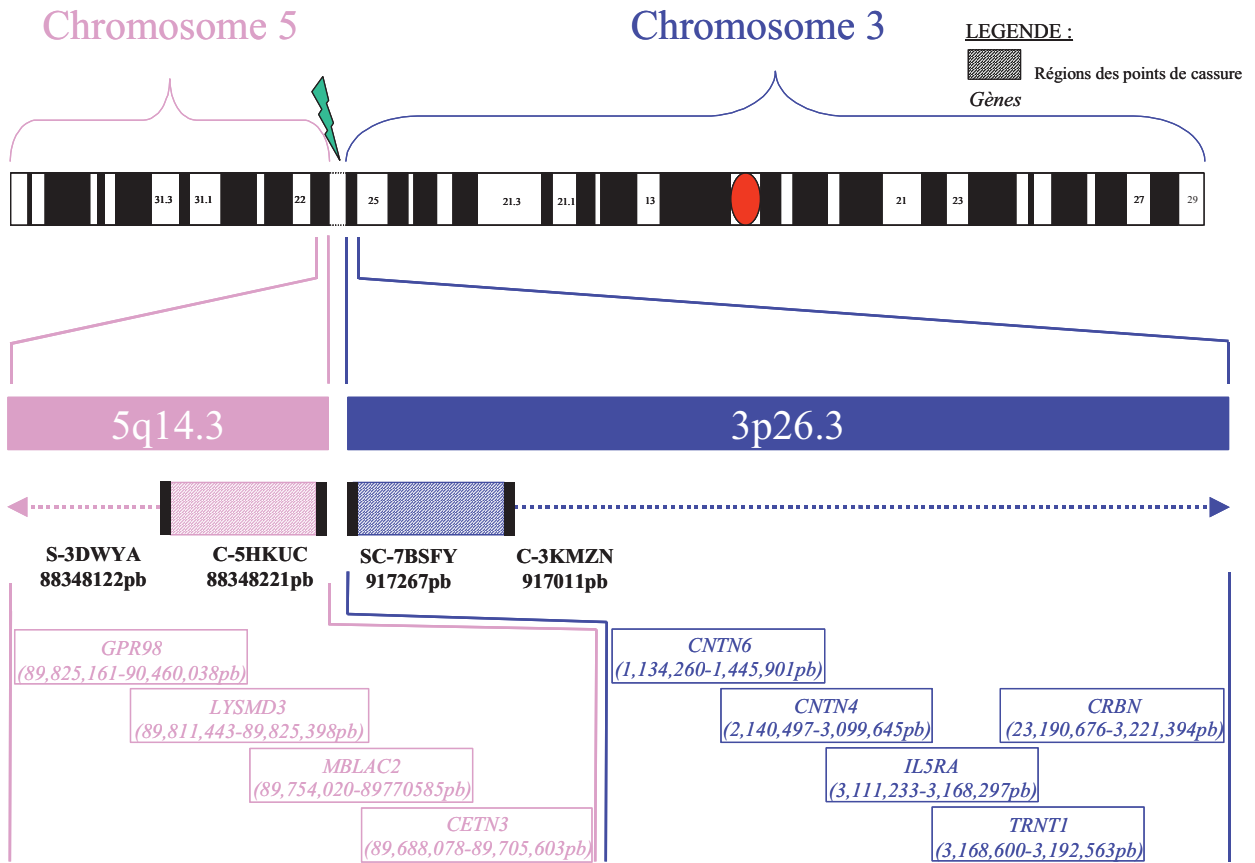


Figure 70 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 3 de la Patient 7

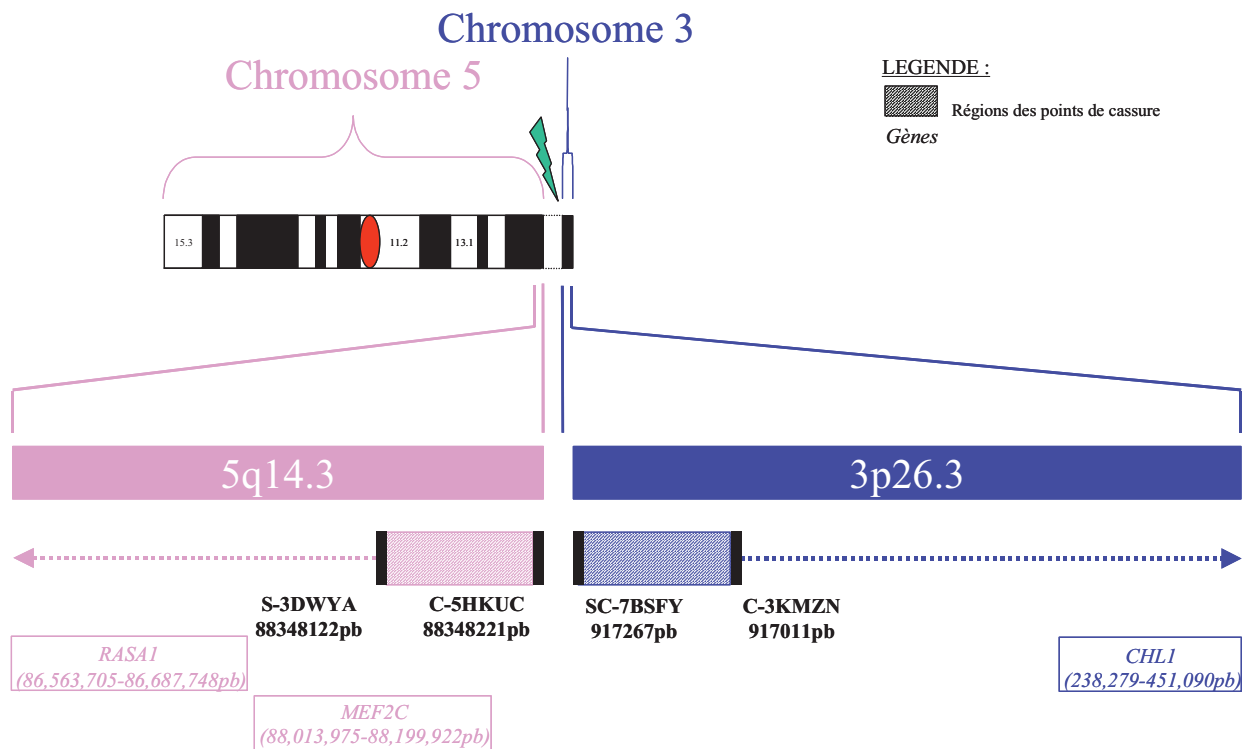


Figure 71 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 5 de la Patiente 7

- Hypothèse d'un effet de position pour expliquer le phénotype :

L'analyse par Array-Painting n'a pas montré d'interruption de gènes. Cependant, nous avons regardé si de part et d'autre des points de cassure ne se trouvaient pas des gènes pouvant expliquer la clinique de cette enfant.

Le point de cassure identifié en 5q14.3 se situe en 5' des gènes *GPR98* et *MEF2C*. Le gène *GPR98* code pour une protéine exprimée dans le système nerveux central selon le site Internet Genecards (<http://www.genecards.org/>).

Le gène *MEF2C*, qui est exprimé notamment dans le système nerveux central (Leifer D, et al. 1994), est connu pour être responsable du Syndrome « Mental Retardation, Autosomal Dominant 20 » (OMIM #613443). En effet, plusieurs auteurs rapportent au total plus de 5 patients porteurs de mutations dans ce gène avec une DI, une épilepsie, une absence de langage, une hypotonie, un contact visuel fugace et des stéréotypies associés parfois à des malformations cérébrales à l'IRM (Le Meur N, et al. 2010 ; Zweier M, et al. 2010 ; Bienvenu T, et al. 2013). De plus, des délétions de *MEF2C* sont retrouvées chez des patients ayant les mêmes signes cliniques dont une DI (Cardoso C, et al. 2009 ; Le Meur N, et al. 2010 ; Novara

F, et al. 2010). Ces observations suggèrent qu'une haplo-insuffisance de ce gène serait responsable du phénotype décrit dans la littérature. Cependant, une certaine variabilité phénotypique, notamment concernant l'épilepsie, est rapportée dans les différents articles. En effet, Paciorkowski AR et ses collaborateurs présentent 16 nouveaux patients avec une haplo-insuffisance de *MEF2C* qu'ils comparent cliniquement avec les 27 déjà publiés. Ainsi, ces auteurs décrivent un phénotype neurologique comprenant une hyperkinésie, une hypotonie, une déficience intellectuelle avec des déficits dans le langage verbal, et des altérations de la motilité gastro-intestinale, de l'humeur, de la tolérance à la douleur, et des interactions sociales. Par ailleurs, si l'épilepsie est une caractéristique majeure, elle n'est pas uniforme et est variable dans sa sévérité et dans l'âge d'apparition. De plus, elle n'est pas présente chez 23 % des 43 patients de la littérature et l'équipe de Paciorkowski AR suggère qu'un effet sur l'épissage alternatif de l'isoforme neuronale *MEF2C* puisse influencer la gravité de l'épilepsie (Paciorkowski AR, et al. 2013). La Patiente 7 de notre cohorte présente une DI associée à un retard de langage, un épisode convulsif fébrile simple et un contact fugace vis à vis de son environnement social selon sa mère. Ces signes pourraient être expliqués par un point de cassure entraînant une dérégulation de l'expression de *MEF2C*. Cette hypothèse est en cohérence avec 3 observations de la littérature qui suggèrent que la région génomique située entre 121,5 et 500kb en amont de l'extrémité 5' du gène *MEF2C* est nécessaire l'expression correcte de *MEF2C*, notamment pour le développement du cerveau (Floris C, et al. 2008 ; Zweier M, et al. 2010 ; Saitsu H, et al. 2011). Sachant que le point de cassure de la translocation de la Patiente 7 est à environ 148kb en amont de l'extrémité 5' du gène *MEF2C*, l'hypothèse d'une dérégulation du gène *MEF2C* du fait de la translocation t(3;5) peut être envisagée. Nous avons donc recherché la présence de régions hautement conservées dans la région non codante entre les points de cassure déterminés par Array-Painting afin d'appuyer notre hypothèse (cf. Figure 72).

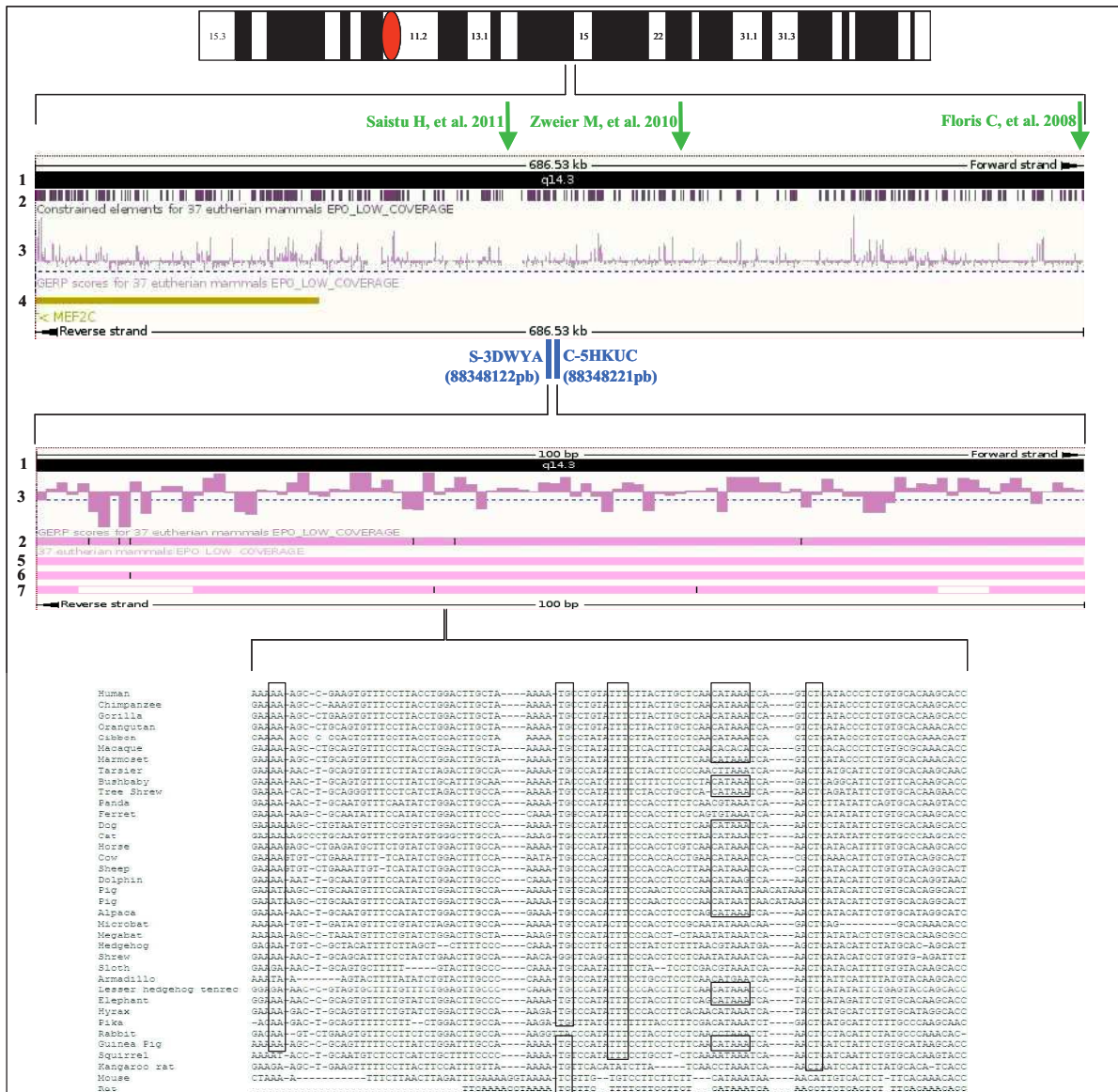


Figure 72 : Régions conservées au niveau des points de cassure entre les points de cassure déterminés par Array-Painting chez la Patiente 7 (entre les marqueurs S-3DWYA et C-5HKUC)

- 1- bande chromosomique
- 2 et 3- Comparaison de la région chromosomique avec 37 mammifères euthériens
- 4- Gène
- 5- Comparaison de la région chromosomique avec le chimpanzé (*Pan troglodytis*)
- 6- Comparaison de la région chromosomique avec le gorille (*Gorilla gorilla gorilla*)
- 7- Comparaison de la région chromosomique avec la souris (*Mus musculus*)

La délétion de l'extrémité télomérique du bras court du chromosome 3 correspond à un syndrome des gènes contigus caractérisé par une DI, un faible PN, un retard de croissance et des variations morphologiques (Verjaal M, De Nef MB.1978). Ce déséquilibre chromosomique est de taille variable mais la région minimale critique est de 1,5Mb incluant le gène *CNTN4* qui participerait à l'expression clinique de ce syndrome microdélétionnel (Pohjola P, et al. 2010). Cette observation rejoint celle de l'équipe de Fernandez TV, en 2008, qui implique aussi *CNTN6* (Fernandez TV, et al. 2008). Les contactines 4 et 6, localisées en

3p26.3 des bras courts du chromosome 3, sont exclusivement exprimées dans le système nerveux (Ogawa J, et al. 1996 ; Shimoda Y, Watanabe K. 2009). Une revue de la littérature sur les contactines, réalisée par Zuko A et ses collaborateurs, rapporte l'implication principalement de *CNTN4* mais aussi de *CNTN6* dans la clinique des individus présentant des DI et des troubles du spectre autistique (Zuko A, et al. 2013). Notre patiente présente une DI et est aussi décrite par sa mère comme une enfant qui a un contact fugace vis-à-vis de son environnement social. Ces symptômes pourraient être expliqués par un point de cassure responsable d'une dérégulation de *CNTN4* et/ou de *CNTN6*.

Le point de cassure identifié par Array-Painting sur le chromosome 5 est en 3' du gène *CRBN*, qui est exprimé dans le cerveau. Son rôle dans le syndrome « Mental Retardation, Autosomal Recessive 2, MRT2 » (OMIM #607417) est suspecté par Higgins JJ et ses collaborateurs en 2000 puis confirmé en 2004. En effet, après avoir rapporté une famille avec une DI non syndromique, une mutation homozygote est identifiée dans le gène *CRBN* qui ségrège avec le phénotype malade (Higgins JJ, et al. 2000 ; Higgins JJ, et al. 2004). Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse d'un point de cassure responsable d'un effet de position dérégulant l'expression de *CRBN*. Cependant, vu le caractère récessif du mode de transmission des pathologies associées, il faudrait séquencer l'autre allèle afin de rechercher une autre mutation. En effet, nous pouvons évoquer la révélation d'une maladie récessive par un double mécanisme comme nous l'avons fait pour le Patient 5 (cf. § 5.3.3 du chapitre Résultats).

- Techniques complémentaires : précision des points de cassure :

Les résultats de l'Array-Painting ne montrent pas d'interruption de gène mais le point de cassure situé sur le dérivé 5 est à environ 148kb en 5' du gène *MEF2C*. Les données de la littérature suggèrent une implication forte de *MEF2C* pour expliquer les signes cliniques de la Patiente 7. Dans ce contexte, comme chez le Patient 6, nous avons décidé de cloner les points de cassure par le séquençage type Sanger en nous appuyant sur les résultats de l'Array-Painting pour choisir les amorces, dont les séquences nucléotidiques sont dans l'Annexe 8. Les points de cassure ont été localisés à 920589pb sur le chromosome 3 et à 88347198pb sur le chromosome 5 avec 3 nucléotides en commun (TGC).

- Conclusion :

Chez cette patiente, aucun gène n'est interrompu. Cependant, certains gènes, dans le voisinage des points de cassure, semblent être intéressants et pourraient expliquer son phénotype comme les contactines, *MEF2C* et éventuellement *CRBN*. L'ensemble des données de la

littérature, ainsi que le phénotype décrit dans les divers articles, nous oriente plus particulièrement vers l'implication de *MEF2C* avec un point de cassure à 147276pb du codon d'initiation ATG de ce gène pour expliquer les signes cliniques de la Patiente 7. De ce fait, nous avons étudié l'expression du gène *MEF2C* chez cette patiente (cf. § 6.3 du chapitre Résultats).

4.2.3 Patiente 8

Les précédents résultats non seulement de l'ACPA mais aussi de l'interruption du gène observée à l'aide l'Array-Painting ne permettent pas d'expliquer le phénotype de cette enfant. Nous évoquons donc plusieurs autres hypothèses ci-dessous pour expliquer sa clinique.

- Hypothèse d'un effet de position :

Le point de cassure est situé en 1q44 du bras long du chromosome 1 entre les marqueurs C-3SKPT (244020515pb) et C-4GJAN (244021351pb), soit en 5' des gènes *AKT3* (*v-akt* murine thymoma viral oncogene homolog 3, à environ 6kb du point de cassure), *CEP170* (centrosomal protein 170kDa – kiloDalton, à environ 602kb du point de cassure), *ZNF238* (zinc finger and BTB domain containing 18, à environ 193kb du point de cassure) et *CIORF100* (chromosome 1 open reading frame 100, à environ 495kb du point de cassure), (cf. Figures 55 et 56 pages 140 et 141).

La pathogénicité du gène *AKT3* est décrite chez le Patient 11 dans le § 3.1.2 du chapitre Résultats. En effet, chez le Patient 11, ce gène est interrompu. Cependant, ces deux enfants ne présentent pas la même clinique (sachant que le Patient 11 est décédé précocement à 6 mois de vie donc avec une histoire clinique courte). Effectivement, la biométrie de la Patiente 8 est dans la moyenne alors que celle du Patient 11 a un décalage de +1DS pour la taille et le poids et de +0,5DS pour le PC. Par ailleurs, ces deux patients ne présentent pas de variations morphologiques faciales communes. De plus, même si le PC est à -1DS à 13 ans, nous ne pouvons parler de microcéphalie qui est l'un des signes majeurs du phénotype lié à une perte de fonction de *AKT3* (Ballif BC, et al. 2012).

CEP170 est exprimé en grande quantité dans le cerveau. Ce gène code pour une protéine, qui est un composant du complexe centrosomal, essentiel dans le maintien de l'organisation et de la fonction des microtubules (Nagamani SC, et al. 2012). Ainsi, ces protéines centrosomales, comme *CEP57* (centrosomal protein 57kDa) par exemple, peuvent jouer un rôle dans certaines pathologies caractérisées par des aneuploïdies (Pinson L, et al. 2014) et ont une

fonction bien connue dans la neurogenèse. Ces gènes CEP seraient donc importants pour l'évolution de la taille du cerveau humain. La littérature rapporte aussi que ces protéines centrosomales sont essentielles pour l'organisation des microtubules et la motilité du centrosome, jouant un rôle important dans la formation axonale (de Anda FC, et al. 2010).

Les mutations hétérozygotes de *ZNF238* ou *ZBTB18* sont responsables du syndrome « Mental Retardation, Autosomal Dominant 22 » (OMIM #612337). En 2014, la 1^{ère} mutation non sens est décrite chez une enfant présentant une petite taille, une microcéphalie, un retard global de développement, un retard de langage et des variations morphologiques (de Munnik SA, et al. 2014). En dehors de la DI, notre patiente ne présente pas de traits communs avec celle de l'équipe de de Munnik SA.

Le dernier gène qui pourrait expliquer éventuellement la clinique de cette enfant est *CIORF100*. Cependant, même si en 2008, van Bon BW et ses collaborateurs décrivent des délétions de la région 1q44 impliquant notamment *CIORF100* chez des patients présentant des anomalies du corps calleux (van Bon BW, et al. 2008), l'exploration IRM chez la Patiente 8 ne révèle pas de malformations cérébrales.

Ainsi après avoir émis l'hypothèse d'un point de cassure modifiant la régulation de l'expression de gènes tels que *AKT3*, *CEP170* et *ZNF238*, qu'une revue de la littérature impliquerait éventuellement dans la DI, il nous apparaît que cette enfant ne présente pas les nombreux signes cliniques associés à des anomalies de ces gènes.

- Hypothèse d'une modification de l'empreinte parentale :

Chez cette enfant, aucun gène (ni interrompu ni dans le voisinage des points de cassure) ne permet d'expliquer son phénotype avec certitude avec les connaissances actuelles. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse d'un autre mécanisme responsable des signes cliniques de la Patiente 8 comme une modification de l'empreinte parentale. En effet, l'équipe de Conroy JM décrit un patient présentant un phénotype de PWS atypique et une translocation réciproque apparemment équilibrée $t(2;15)(q37.2;q11.2)$ dont le point de cassure est localisé entre le centre d'empreinte et le gène *SNRPN*. L'inactivation de ce gène est considérée comme responsable du PWS. Ceci a pour conséquence la modification de l'expression du gène *SNRPN* à l'origine des signes cliniques de l'enfant (Conroy JM, et al. 1997). Sachant que le chromosome 14 est soumis à l'empreinte parentale, l'hypothèse d'un point de cassure modifiant l'empreinte parentale chez la Patiente 8 pourrait être évoquée, mais la région soumise à empreinte est localisée en 14q32.2 (Ioannides Y, et al. 2014) qui est à plus de 7Mb

en aval du point de cassure. Par ailleurs, actuellement, il n'existe pas d'argument dans la littérature permettant de définir la région du point de cassure comme soumise à empreinte.

- Conclusion :

Dans ce contexte, l'ensemble des hypothèses diagnostiques suggérées ne permettent pas d'expliquer le phénotype de la Patiente 8. Dans ce contexte, la possibilité d'une mutation génique ailleurs dans le génome pourrait être évoquée.

4.2.4 Patiente 9

Les signes cliniques de cette adulte sont une DI et des lésions cutanées. La translocation observée implique le bras court d'un des 2 chromosomes X et le bras long d'un des 2 chromosomes 16 : t(X;16)(p21.1;q11.2).

- Détermination des points de cassure par Array-Painting (cf. Figure 73) :

L'interprétation des résultats de l'Array-Painting (cf. Figures 74 et 75) a permis d'identifier le point de cassure sur le bras court du chromosome X. Celui-ci est localisé en Xp21.1 entre les marqueurs C-6KFRX (35172991pb) et C-7ERGP (35179496pb). Aucun gène n'est interrompu mais à environ 200kb en aval du point de cassure se trouve le gène *FAM47B* (family with sequence similarity 47, member B).

En ce qui concerne le chromosome 16, l'Array-Painting donne le point de cassure au niveau de l'hétérochromatine de son bras long en 16q11.2. Cette observation est confirmée par la FISH avec la sonde CEP16 (D16Z3, 16q11.2, Vysis®) correspondant au satellite 2 de la région hétérochromatique du bras long du chromosome 16 et de la sonde non commerciale pZ16A (alpha-satellite) spécifique de la région centromérique du chromosome 16. Le point de cassure est donc dans une région chromosomique considérée comme un désert génique.

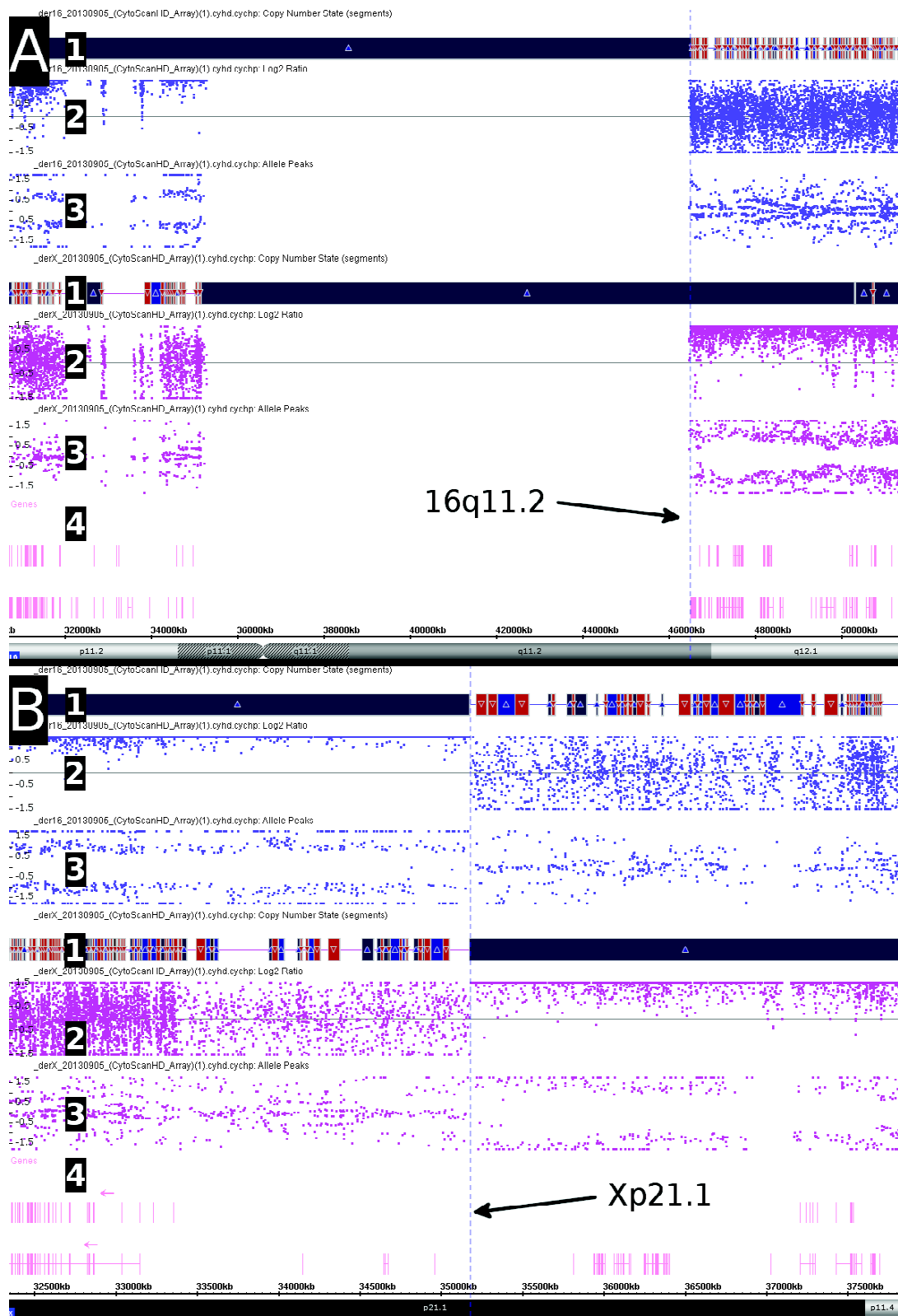


Figure 73 : Profil d'hybridation sur le logiciel ChAS des points de cassure identifiés après Array-Painting pour le chromosome 16 (A) et pour le chromosome X (B) à partir des deux dérivés (Patiente 9)

- 1- Nombre de copies (CNVState)
- 2- log2ratio
- 3- Différence allélique (Allele Peaks)
- 4- gènes

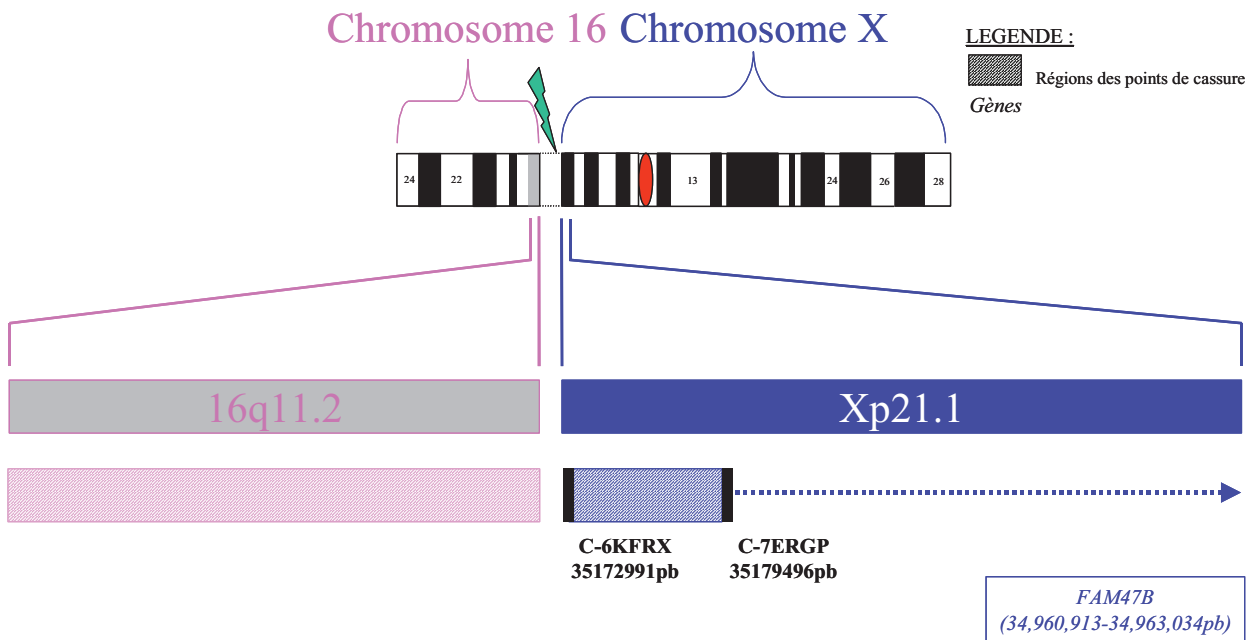


Figure 74 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé X de la Patiente 9

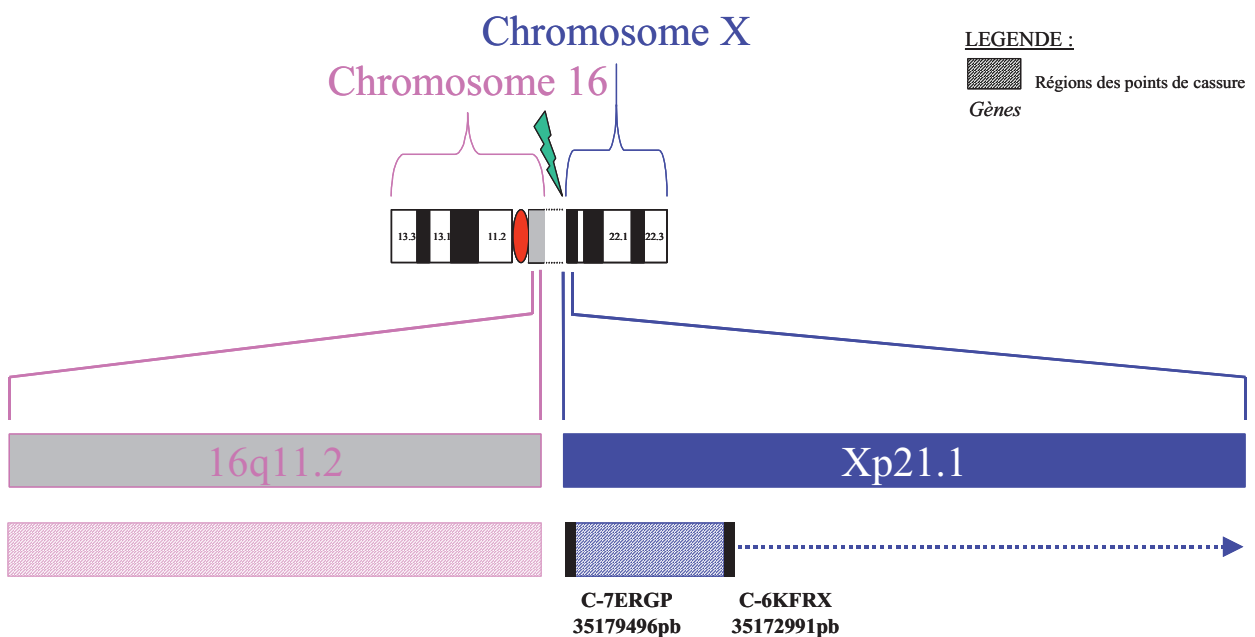


Figure 75 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting sur le dérivé 16 de la Patiente 9

- Hypothèse d'un effet de position pour expliquer le phénotype :

L'interprétation des résultats de l'Array-Painting a permis d'identifier le point de cassure sur le bras court du chromosome X en Xp21.1 à environ 200kb en amont du gène *FAM47B*. Après une revue de la littérature sur ce gène, aucune donnée permettant d'expliquer le phénotype de la Patiente 9 n'est retrouvée avec les connaissances actuelles. Le rôle de ce gène reste donc

encore à définir. Pour connaître son implication éventuelle dans les signes cliniques de cette enfant, différentes approches sont nécessaires comme des études fonctionnelles ou le séquençage de ce gène chez des patients présentant le même phénotype dans l'espoir de trouver des mutations délétères. En ce qui concerne le chromosome 16, le point de cassure est situé au niveau de l'hétérochromatine du bras long en 16q11.2.

- Hypothèse d'un changement de l'environnement chromatinien :

Au vu des résultats obtenus par Array-Painting, le phénotype observé chez cette patiente pourrait être expliqué par un potentiel changement de l'environnement chromatinien d'un certain nombre de gènes, du fait d'un point de cassure dans l'hétérochromatine du chromosome 16 (Milot E, et al. 1996). En effet, dès 1994, Barber suspecte l'existence possible d'un effet de position hétérochromatique (Barber JCK. 1994). De ce fait, une étude de la méthylation pour observer une éventuelle hétérochromatinisation de l'euchromatine du segment transloqué du chromosome X et voisine du point de cassure permettrait de confirmer ou non le rôle de l'hétérochromatine pour expliquer la pathologie de cette enfant.

- Hypothèse d'une absence d'un potentiel biais d'inactivation du chromosome X :

Ce phénomène pourrait être responsable des symptômes cliniques de cette enfant (Mattei MG, et al. 1982). En effet, les translocations X-autosome apparemment équilibrées sont rares et sont observées aussi bien chez les femmes que chez les hommes. En ce qui concerne les femmes porteuses de ce type de remaniement, leur phénotype est très variable. En effet, elles peuvent être aussi bien asymptomatiques qu'avoir des fausses couches à répétition ou présenter des troubles de la fonction gonadique, des syndromes avec une hérédité dominante ou récessive liée au chromosome X, ou encore des anomalies congénitales associées ou non à une DI (Baruffi MR, et al. 2012). Dès 1978, Mattei MG et ses collaborateurs proposent d'étudier l'inactivation du chromosome X devant tout remaniement chromosomique X-autosome (Mattei MG, et al. 1978). En 1982, cette équipe met en évidence un biais d'inactivation du chromosome X lors d'une translocation X-autosome : le chromosome X normal est inactivé préférentiellement. En effet, la répression transcriptionnelle peut se propager dans l'euchromatine autosomique voisine conduisant à une monosomie fonctionnelle (Mattei MG, et al. 1982 ; Waters JJ, et al. 2001). Ainsi, si le dérivé X était inactivé, il y aurait non seulement une monosomie partielle autosomique mais aussi une disomie fonctionnelle de la région transloquée du chromosome X (Schmidt M, Du Sart D. 1992). Cette propagation du processus d'inactivation du chromosome X peut concerner des gènes dans la région

autosomique transloquée jusqu'à 45Mb du point de cassure (Sharp AJ, et al. 2002). Cependant, elle peut être incomplète ou discontinue selon ces mêmes auteurs. Cette observation est rapportée, en 2008, aussi par l'équipe de Giorda R (Giorda R, et al. 2008). Par ailleurs, les équipes de Sharp AJ et Giorda R démontrent que cette extension de l'inactivation du chromosome X serait sous le contrôle non seulement de facteurs dépendant du chromosome X mais aussi de la région autosomique, qui pourrait « résister » au processus d'inactivation du chromosome X, ce qui expliquerait la discontinuité de la propagation (Sharp AJ, et al. 2002 ; Giorda R, et al. 2008). L'étude d'une translocation t(X;5) par Giorda R et ses collaborateurs ne suggère pas de relation entre la présence, à proximité, de séquences répétées type LINE et l'inactivation d'un gène localisé sur le chromosome 5 (Giorda R, et al. 2008). L'étude de l'inactivation du chromosome X de la Patiente 9 de notre cohorte ne montre pas de biais. Ce résultat nous laisse suspecter que l'inactivation concerne aussi bien le chromosome X normal que le chromosome X transloqué. Les signes cliniques observés chez cette enfant pourraient alors être une conséquence de l'inactivation du dérivé X avec une monosomie partielle de la région 16q11.2qter ainsi qu'une disomie fonctionnelle de la région Xp21.1pter en fonction des tissus concernés. De plus, le point de cassure sur le chromosome 16 est situé dans sa constriction secondaire ce qui pourrait être un élément modificateur dans la propagation du processus d'inactivation du chromosome X.

- Conclusion :

Ainsi, l'Array-Painting ne montre pas d'interruption de gène. L'éventuel rôle pathogène du gène *FAM47B* situé en aval du point de cassure Xp21.1 ne peut pas être défini selon les données actuelles de la littérature. Les hypothèses d'un changement de l'environnement chromatinien d'un certain nombre de gènes ou de l'absence d'un biais d'inactivation du chromosome X pourraient alors expliquer la pathologie de la Patiente 9. Cependant, il serait nécessaire de poursuivre les investigations pour le confirmer.

4.2.5 Patiente 12

Les précédents résultats non seulement de l'ACPA mais aussi de l'interruption d'un gène observée à l'aide l'Array-Painting ne permettent pas d'expliquer le phénotype de cette enfant. C'est pourquoi, d'autres hypothèses sont envisagées ci-dessous.

- Hypothèse d'un effet de position pour expliquer le phénotype :

Le point de cassure est en 4q32.1 du bras long du chromosome 4 entre les marqueurs C-FKWE (2160337386pb) et S-3NENS (160347953pb), soit en 3' des gènes *RAPGEF2* (Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 2, à environ 312kb du point de cassure) et *FSTL5* (Follistatin-Like 5, à environ 1957kb du point de cassure), (cf. Figures 64 et 65 pages 154 et 155).

Le gène *FSTL5* code pour une glycoprotéine sécrétoire de la famille des follistatines. Les autres gènes de cette famille *FSTL1* (Follistatin-Like 1) et *FSTL3* (Follistatin-Like 3) sont bien décrits dans la littérature avec un rôle dans le développement neuronal pour *FSTL1* (Amthor H, et al. 1996 ; Patel K, et al. 1996 ; Towers P, et al. 1999) et un rôle dans la régulation de l'homéostasie métabolique et vieillissement testiculaire pour *FSTL3* (Mukherjee A, et al 2007 ; Oldknow KJ, et al. 2013). *FSTL3* serait aussi l'un des gènes responsables de la cardiopathie congénitale (Archer HL, et al. 2005). Au contraire, peu de données sur *FSTL5* sont retrouvées, en dehors d'une indication d'une expression apparemment importante dans le cerveau et la moelle selon la base de données Expression Atlas (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/>). Du fait de la présence d'un domaine conservé et donc d'une homologie de structure entre les différents membres de cette famille de glycoprotéines, l'équipe de Masuda T suggère que *FSTL5* pourrait également jouer un rôle essentiel dans développement ou être un gène responsable d'une maladie congénitale (Masuda T, et al. 2014). Ainsi, leur étude de l'expression de ce gène chez la souris prouve que *FSTL5* est localisé dans le système olfactif, dans la zone de l'hippocampe CA3 ainsi que dans la couche de cellules granulaires du cervelet. Cette observation sous-entend un éventuel rôle de ce gène dans la perception des odeurs (Masuda T, et al. 2014). Aucun problème de cet ordre n'est rapporté dans le phénotype de la Patiente 12. De ce fait, un effet de position agissant sur l'expression de *FSTL5* ne semble pas expliquer les signes de cette enfant.

Le gène *RAPGEF2* code pour une protéine qui est impliquée dans les voies de signalisation de *MAPK* (*MAPK* (Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling pathway) et de *Ras* (*Ras* signaling pathway), (<http://www.genecards.org/>). Par ailleurs, cette protéine est impliquée non seulement dans la migration des cellules épithéliales (Magliozzi R, et al. 2013), mais aussi dans les voies d'activation des cellules neuronales et endocrines (Emery AC, et al. 2013) et dans le contrôle de la migration des cellules neuronales lors du développement du cortex cérébral (Ye T, et al. 2014).

- Conclusion :

L'ensemble de ces données ne permettent donc pas d'expliquer le phénotype de la Patiente 12. Cependant, nous nous sommes appuyés sur les résultats de l'Array-Painting pour interpréter ceux du WGS non seulement pour cloner précisément les points de cassure de la translocation t(4;7) mais aussi pour confirmer l'absence d'interruption de gène(s) (cf. § 5.5.2 du chapitre Résultats).

4.3 Conclusion

Même si l'interruption de *AUTS2* chez le Patient 6 permet d'expliquer le phénotype de cet enfant, les résultats observés après Array-Painting pour les autres soulèvent des interrogations :

1- Pour les Patients 4, 8 et 12, l'absence d'étiologie pour expliquer son phénotype après la mise en œuvre des techniques de puces à ADN et d'Array-Painting, nous évoquons l'hypothèse d'une mutation d'un autre gène reconnu comme responsable de DI ou encore non identifié comme pathogène peut être émise. Dans ce contexte, le choix de cette stratégie diagnostique est remis en question et est développé dans le § 2 du chapitre Discussion.

2- Pour le Patient 5, si l'interruption de *KIF1A* semble expliquer le phénotype de cet enfant, le caractère dominant est discuté. De ce fait, nous avons suspecté un mode de transmission récessif. Nous avons alors séquencé l'ensemble des 48 exons codants (de l'exon 2 à l'exon 49) dans le but de trouver une mutation sur l'autre allèle (cf. 5.3.3 § du chapitre Résultats). Par ailleurs, devant l'intérêt de ce gène pour expliquer le phénotype du Patient 5, nous avons analysé l'expression du gène (cf. § 6.1.1 du chapitre Résultats) ainsi que mis en œuvre des techniques de qPCR, séquençage haut débit, et de FISH (cf. § 5.3 du chapitre Résultats).

3- Pour le Patient 6, deux gènes sont retrouvés interrompus. Nous avons donc recherché des gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* ou *AUTS2-EPHA6* ainsi qu'étudier l'expression du gène *AUTS2* (cf. § 6.2 du chapitre Résultats).

4- Du fait de l'absence d'interruption de gène chez la Patiente 7, nous nous sommes intéressés aux gènes situés de part et d'autre des points de cassure. Devant, l'hypothèse d'une implication forte de *MEF2C* pour expliquer les signes cliniques de cette enfant, nous avons recherché l'expression du gène *MEF2C* chez cette patiente (cf. § 6.3 du chapitre Résultats).

5- Pour la Patiente 9, les résultats obtenus sont en faveur d'un changement de l'environnement chromatinien d'un certain nombre de gènes ou l'absence d'un biais d'inactivation du

chromosome X pour expliquer sa pathologie. Cependant, il serait nécessaire de poursuivre les investigations pour le confirmer.

6- Les réarrangements complexes observés sur les résultats de l'Array-Painting chez le Patient 10, nous ont amené à évoquer l'hypothèse d'un *chromothripsis* que nous avons recherché par WGS (cf. § 5.4 du chapitre Résultats).

7- Les résultats obtenus par WGS lors du mélange des ADN des Patients 11 et 12, nous ont amenés à mettre en œuvre la marche sur le chromosome par FISH chez la Patiente 12. L'absence de résultats nous a conduit à réaliser la technique d'Array-Painting chez cette enfant. Ainsi, afin de préciser les points de cassure de sa translocation t(4;7), nous avons confronté l'interprétation des données de l'Array-Painting à celle du WGS pour choisir les amorces nous permettant de séquencer les ponts de cassure sur les dérivés 4 et 7 de ce remaniement chromosomique (cf. § 5.5.2 du chapitre Résultats).

5- RÉSULTATS et INTERPRÉTATION DES TECHNIQUES DE SÉQUENÇAGE HAUT DÉBIT

Cette approche a été utilisée chez les Patients 1, 5, 10, 11 et 12 soit pour préciser les résultats obtenus par FISH et/ou Array-Painting (Patients 5, 10, 11 et 12), soit dans un but de tester la sensibilité du WGS en mélangeant 2 ADN (Patients 11 et 12), ou encore pour vérifier l'hypothèse d'un *chromothripsis* chez les Patients 1 et 10.

5.1 Images recherchées

Pour rappel, la Figure 76 ci-dessous représente, avec l'algorithme ELAND, les différentes images recherchées dans le logiciel IGV, utilisé pour la visualisation des séquences et l'analyse des résultats. Ces représentations, situées dans la zone des points de cassure suspectés, correspondent à :

1/ des séquences dont l'extrémité paired-end est localisée sur un autre chromosome impliqué dans le remaniement étudié (avec un code couleur différent du gris), signe d'une translocation interchromosomique ou ailleurs sur le même chromosome, signe d'un remaniement intrachromosomique,

2/ des séquences dont le début diverge de la séquence génomique du chromosome considéré (code couleur selon la variation nucléotidique, que nous avons nommées « arc-en-ciel » (AEC),

3/ des séquences SNL (Séquences Non Localisées) dont l'extrémité paired-end n'a pas été localisée sur un chromosome particulier.

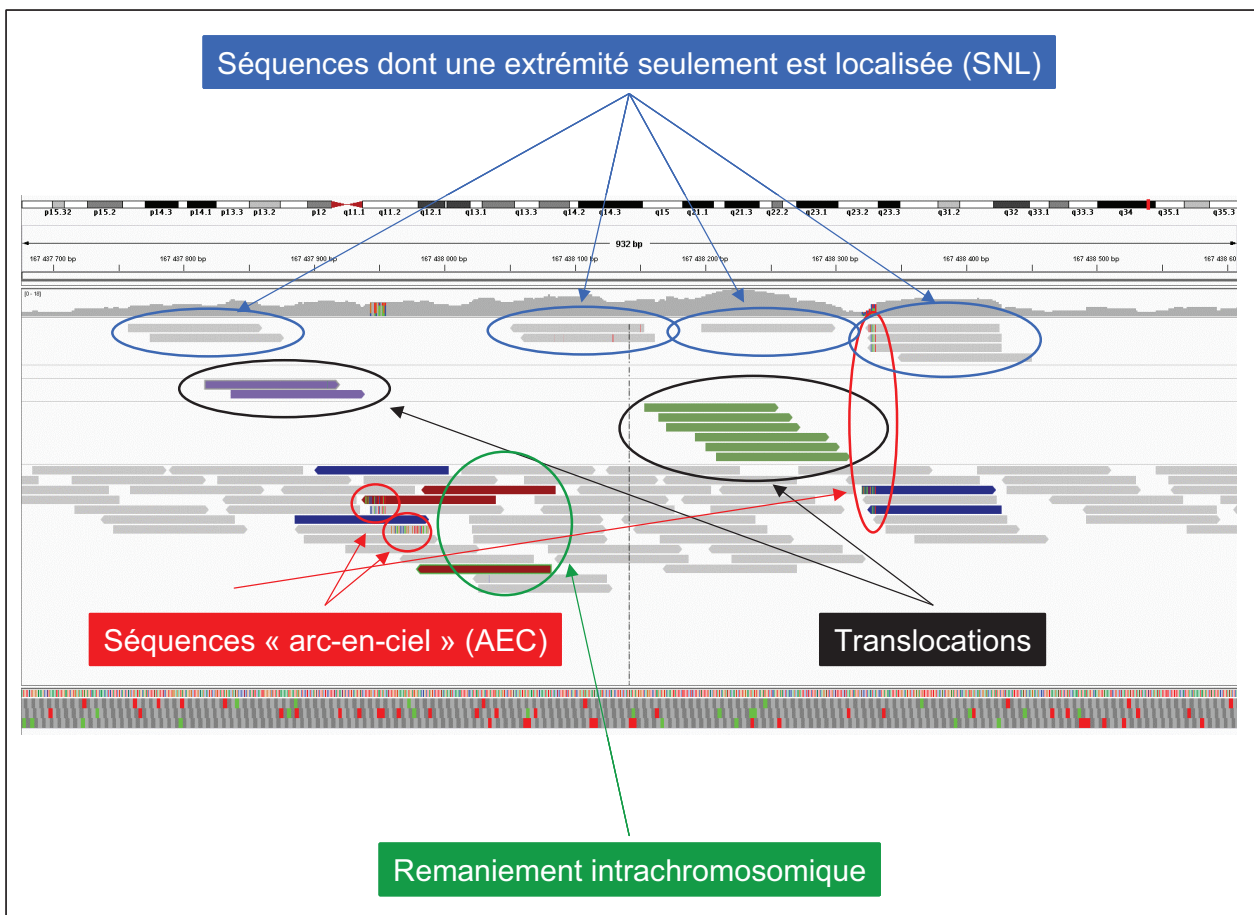


Figure 76 : Représentation avec l'algorithme ELAND des résultats de WGS dans la zone d'un point de cassure chromosomique

Les Figures 77 et 78 ci-dessous représentent, avec l'algorithme BWA, les différentes images recherchées dans le logiciel IGV, utilisé pour la visualisation des séquences et l'analyse des résultats. Ces représentations, situées dans la zone des points de cassure suspectés, correspondent à des séquences dont l'extrémité paired-end est localisée sur un autre chromosome impliqué dans le remaniement étudié (avec un code couleur différent du gris), signe d'une translocation interchromosomique ou ailleurs sur le même chromosome, signe d'un remaniement intrachromosomique.

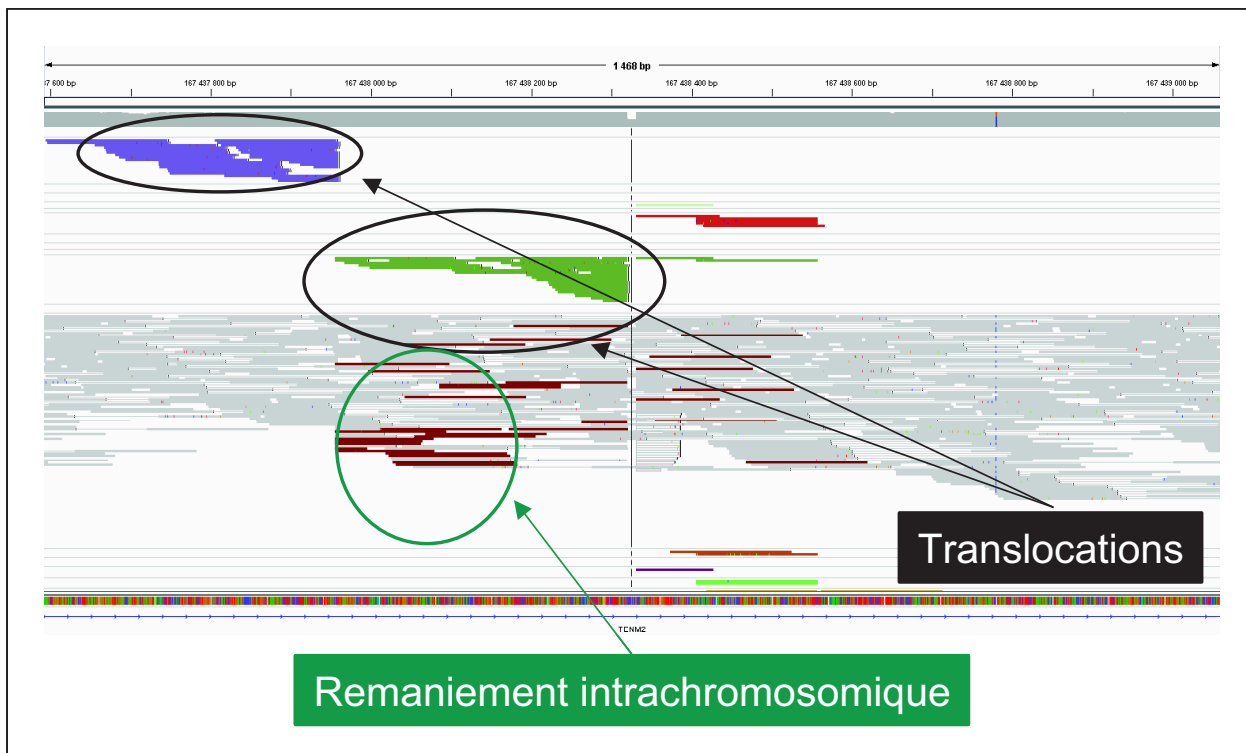


Figure 77 : Représentation l'algorithme BWA des résultats de WGS dans la zone d'un point de cassure chromosomique



Figure 78 : Représentation avec l'algorithme BWA d'une translocation réciproque (flèches oranges) dans la zone d'un point de cassure chromosomique

5.2 Patiente 1

Après les résultats du caryotype et de l'ACPA, nous avons émis l'hypothèse d'un remaniement plus complexe de type *chromothripsis*. Cette nouvelle variété de réarrangements complexes et massifs du génome a été mise en évidence grâce au développement des nouvelles techniques mises en œuvre pour analyser le génome entier tel que le WGS, que nous avons utilisé pour vérifier notre hypothèse et ainsi compléter notre étude.

5.2.1 Identification des points de cassure : présence d'un *chromothripsis* ?

L'analyse des données de WGS confirme la présence non seulement des translocations réciproques t(4;9) et t(7;8) vues en cytogénétique classique mais aussi la délétion 6q24.3q25.1, considérée comme responsable des signes clinique de la Patiente 1.

Cependant, si les points de cassure la translocation t(7;8) est aisément identifiable dans le logiciel IGV (cf. Figure 79), ceux du réarrangement impliquant les chromosomes 4 et 9 ont été difficilement déterminés. En effet, plusieurs régions pouvaient être suspectées lors d'une analyse visuelle. Dans ce contexte, nous avons complété notre interprétation par des techniques de FISH (cf. § 5.2.2 du chapitre Résultats). Cet exemple suggère la nécessité de compléter les analyses de WGS par de la FISH dans certains cas. Cet aspect est développé dans le § 2.3 du chapitre Discussion.

Par ailleurs, l'analyse des résultats du WGS semble révéler un remaniement plus complexe au niveau de la microdélétion observée en 6q24.3q25.1 à l'aide des puces à ADN (cf. Figure 80), avec la présence en amont d'une 2^{ème} délétion et d'un segment inversé entre les 2 délétions. Nous avons donc vérifié ce réarrangement par un séquençage classique des points de cassure déterminés par WGS (cf. § 5.2.2 du chapitre Résultats). Ainsi, même si nous avons mis en évidence un RCC plus complexe que celui initialement diagnostiqué, il ne s'agit pas d'un réel *chromothripsis*.

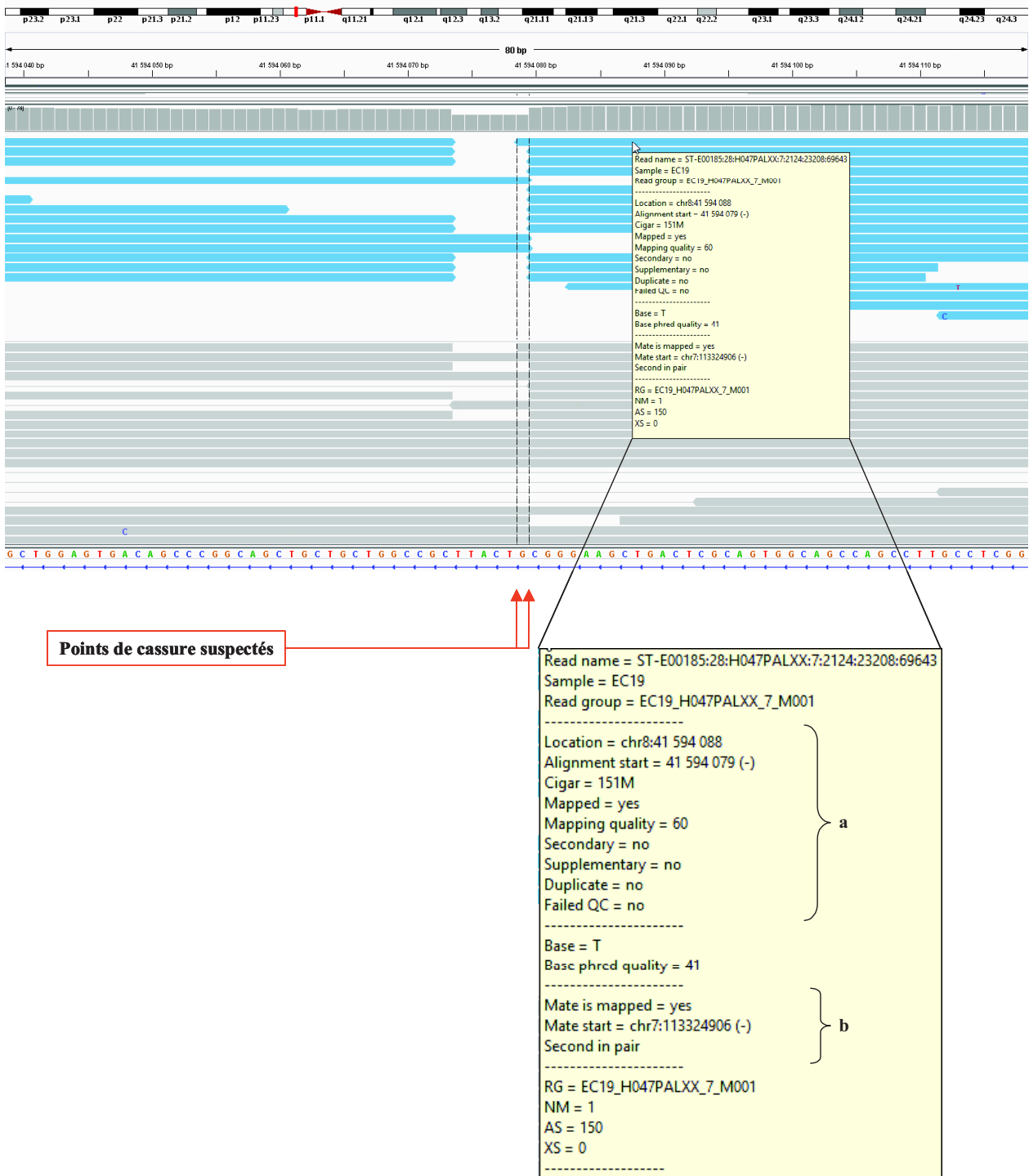


Figure 79 : Représentation graphique (algorithme BWA) spécifique de la translocation réciproque t(7;8) sur le chromosome 8 (Patiente 1) :

a- position et paramètres de l'extrémité séquencée du dérivé 8

b- position et paramètres de l'autre extrémité séquencée située sur le dérivé 7

Le point de cassure sur le chromosome 8 a au moins un nucléotide chevauchant.

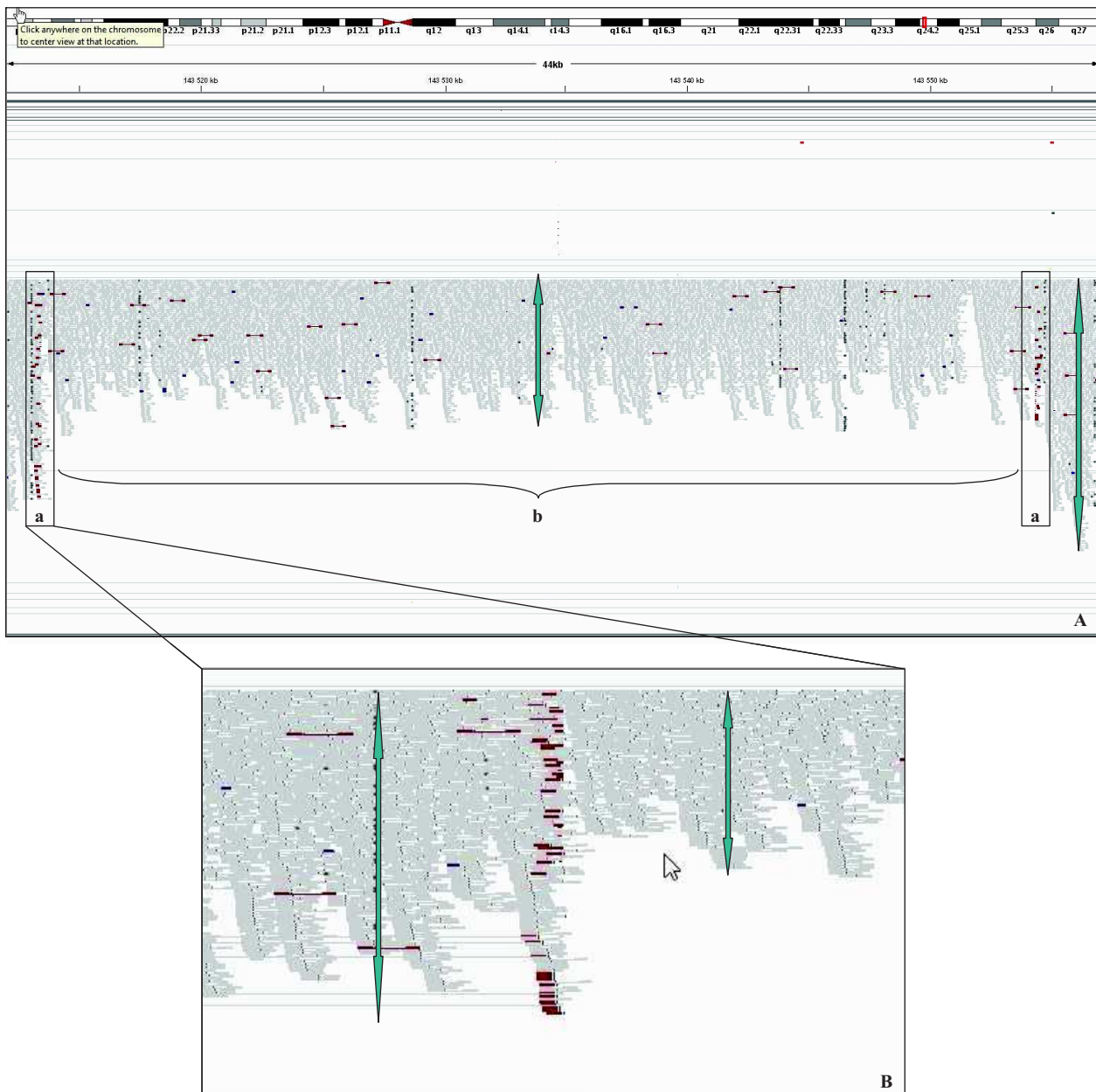


Figure 80 : Représentation graphique (algorithme BWA) suggérant la présence de 2 délétions séparées par un segment inversé (Patiente 1)

A- image recherchée visuellement significative

B- zoom sur la séquence d'intérêt signe d'un remaniement intrachromosomique

a- images caractéristiques d'un remaniement intrachromosomique

b- image caractéristique d'une délétion par rapport aux régions voisines (diminution locale de la profondeur de lecture caractérisée par les flèches)

5.2.2 Techniques complémentaires : aide à l'interprétation des données

- Techniques de FISH :

Les résultats du WGS ne permettent pas de cibler en première analyse les régions des points de cassure de la translocation t(4;9). Nous avons donc réalisé plusieurs techniques FISH à l'aide de différentes sondes non commerciales dont la localisation est précisée dans l'annexe 6. Ainsi, la sonde RP11-462M05, spécifique de la région 4q28.3 du bras long du chromosome 4, a montré une hybridation croisée avec de nombreuses autres régions chromosomique (cf. Figure 81). Par ailleurs, l'hybridation des sondes RP11-153O57 et RP11-367K01, localisées en 9p24.1 du bras court du chromosome 9, a permis de cibler la région chromosomique dans laquelle se situe le point de cassure du dérivé 9 de la t(4;9), (cf. Figure 82). Grâce à ces résultats, nous avons pu choisir des amorces afin de confirmer, amplifier et séquencer précisément les points de cassure de la t(4;9).

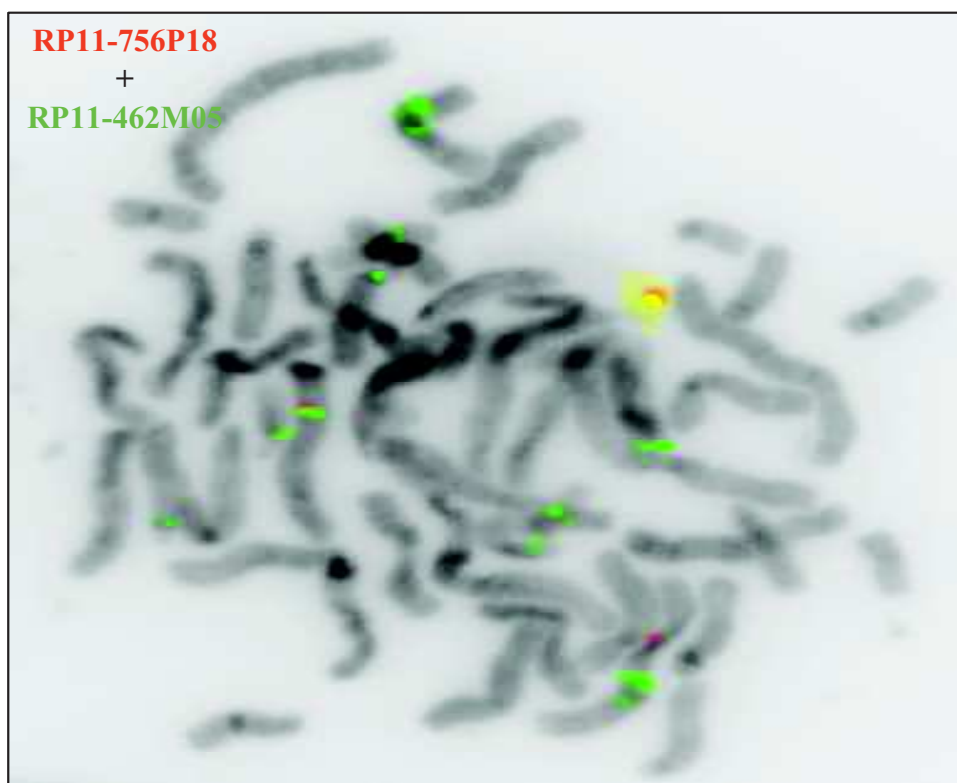


Figure 81 : Profil d'hybridation des sondes RP11-756P18 en 4q28.3 et RP11-462M05 en 4q28.3 (de nombreux signaux verts correspondant à la sonde RP11-462M05 confirment la co-hybridation de ce cette entre plusieurs régions chromosomiques)

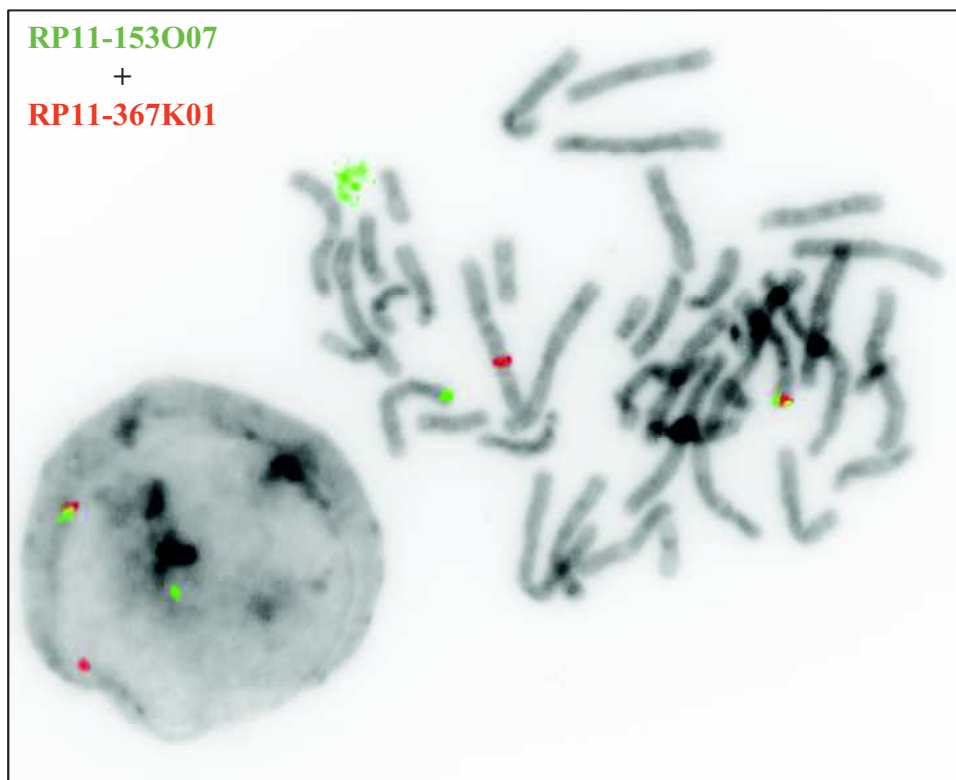


Figure 82 : profil d'hybridation des sondes RP11-153O07 en 9p24.1 et RP11-367K01 en 9p24.1 confirmant le point de cassure entre ces deux sondes

- Résultat du séquençage classique :

Les amorces utilisées sont dans le Tableau V ci-dessous et leurs séquences nucléotidiques sont répertoriées dans l'Annexe 8.

Couples	Nom de l'amorce
Couple 1	P1-4-S
	P1-9-S
Couple 2	P1-4-AS
	P1-9-AS
Couple 3	P1-7-S
	P1-8-AS
Couple 4	P1-7-AS
	P1-8-S
Couple 5	P1-del6-14351-S
	P1-del6-146-S
Couple 6	P1-del6-14351-S
	P1-del6-14355-AS
Couple 7	P1-del6-14351-S
	P1-del6-153-AS
Couple 8	P1-del6-14355-AS
	P1-del6-153-AS
Couple 9	P1-del6-14355-AS
	P1-del6-153-AS
Couple 10	P1-del6-146-S
	P1-del6-153-AS

Tableau V : Amorces utilisées pour étudier les points de cassure des différents remaniements chromosomiques de la Patiente 1 par séquençage Sanger

Les techniques de séquençage de type Sanger localisent les points de cassure :

1- pour la translocation t(4;9) en 4:132875604 et 9:6903915 sur le dérivé 4 et en 4:132875601 et 9:6903911 sur le dérivé 9 ; ces différences s'expliquent par le fait que les dérivés 4 et 9 présentent des séquences communes de type AAAA (ou TTTT) pour la séquence venant du chromosome 4 et de type CAAA (ou TTTTG) pour la séquence venant du chromosome 9 ; par ailleurs, il y a 3 nucléotides en commun entre les séquences du chromosome 4 et du chromosome 9 sur le dérivé 9 au niveau du point de cassure ;

2- et, pour la translocation t(7;8) en 7:113324895 et 8:41594073 sur les deux dérivés.

Par ailleurs, elles confirment le remaniement complexe observé en WGS dans la région de la délétion 6q24.3q25.1 détectée par les puces à ADN avec des points de cassure en 6:143513504pb, 6:143554368pb, 6:146209280pb et 6:153283386pb, ce qui se traduit par deux délétions des régions 6:143513504-143554368 et 6:146209280-153283386 (identifiée par ACPA) et ainsi que l'inversion de la région 6:146209280pb-143554368.

5.2.3 Conclusion

L'ensemble des résultats des techniques mises en œuvre est en faveur de la présence d'un syndrome microdélétionnel *de novo* situé en dehors des points de cassure des translocations.

Une revue de la littérature laisse suspecter le caractère pathogène de ce déséquilibre en 6q24.3q25.1, qui pourrait donc expliquer le phénotype de la Patiente 1. De plus, les résultats du WGS nous ont montré l'absence d'interruption de gène aux points de cassure.

L'analyse du WGS montre un remaniement plus complexe, sans pour autant parler d'un *chromothripsis* vu le nombre de points de cassure, que la microdélétion observée en 6q24.3q25.1 à l'aide des puces à ADN. La Figure 83 permet de voir l'apport de chaque technique concernant le réarrangement de la région 6q24.3q25.1. Cet évènement nous amène à nous poser la question de la place de l'ACPA devant un caryotype complexe chez un enfant à phénotype anormal.

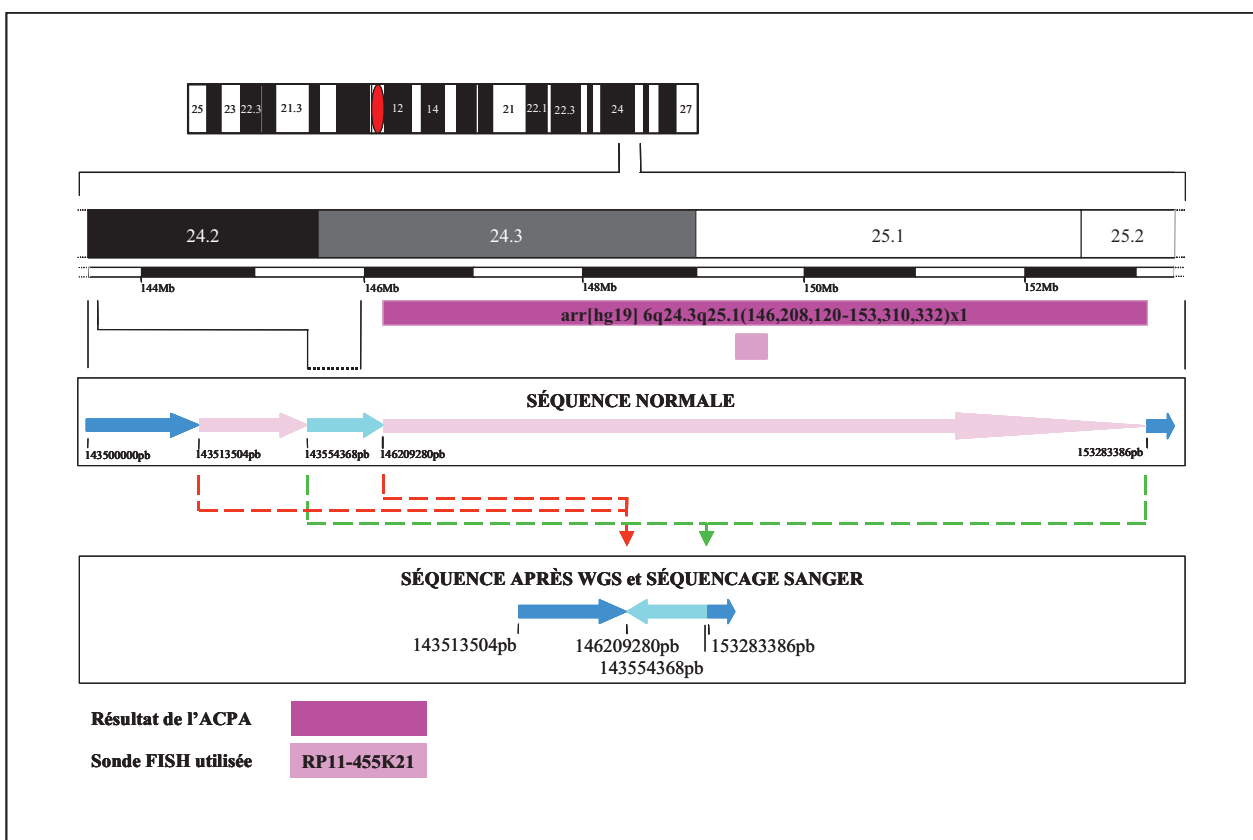


Figure 83 : Représentation des résultats de chaque technique utilisée pour mettre en évidence le remaniement complexe de la région 6q24.3q25.1 chez la Patiente 1

5.3 Patient 5

5.3.1 Identification des points de cassure

Nous avons décidé cependant de caractériser plus précisément les points de cassure sur les deux dérivés chromosomiques. Pour cela, nous avons choisi de mettre en œuvre la technique de WGS (en short paired-end). Nous avons interprété les résultats à l'aide des données de l'Array-Painting (marqueurs encadrant le point de cassure sur le chromosome 2) et du profil d'appariement sur la séquence de référence avec le logiciel ELAND (séquences AEC et SNL). Plusieurs images ont attiré notre attention. Dans ce contexte, nous avons réalisé des techniques complémentaires de FISH et de Biologie moléculaire afin d'interpréter les résultats obtenus par WGS.

5.3.2 Techniques complémentaires : aide à l'interprétation des données

- Technique de FISH :

Dans un premier temps, nous avons vérifié les résultats de l'Array-Painting, non seulement pour confirmer les points de cassure dans l'hétérochromatine du bras long du chromosome Y mais aussi dans le gène *KIF1A*.

La triple sonde SHOX (SHort stature HomeoboX gene, Aquarius®) s'hybride au niveau du *locus* du gène SHOX localisé en Xp22.33 et en Yp11.32, au niveau du centromère du chromosome X (DXZ1) et au niveau de la région d'hétérochromatine sur le bras long du chromosome Y (DYZ1, Yq12). L'analyse complémentaire en cytogénétique moléculaire avec cette sonde montre la présence d'hétérochromatine du chromosome Y (DYZ1) sur les dérivés 2 et Y de la translocation t(Y;2), ce qui signifie que le point de cassure sur le chromosome Y est localisé au sein de la région DYZ1.

Par ailleurs, afin de vérifier une interruption du gène *KIF1A*, nous avons hybridé la sonde non commerciale CTD-2036A16, spécifique du *locus* du gène *KIF1A*. Le résultat de la FISH confirme l'interruption de *KIF1A*. La région du point de cassure sur le dérivé 2 de la translocation t(Y;2) est schématisée sur la Figure 84.

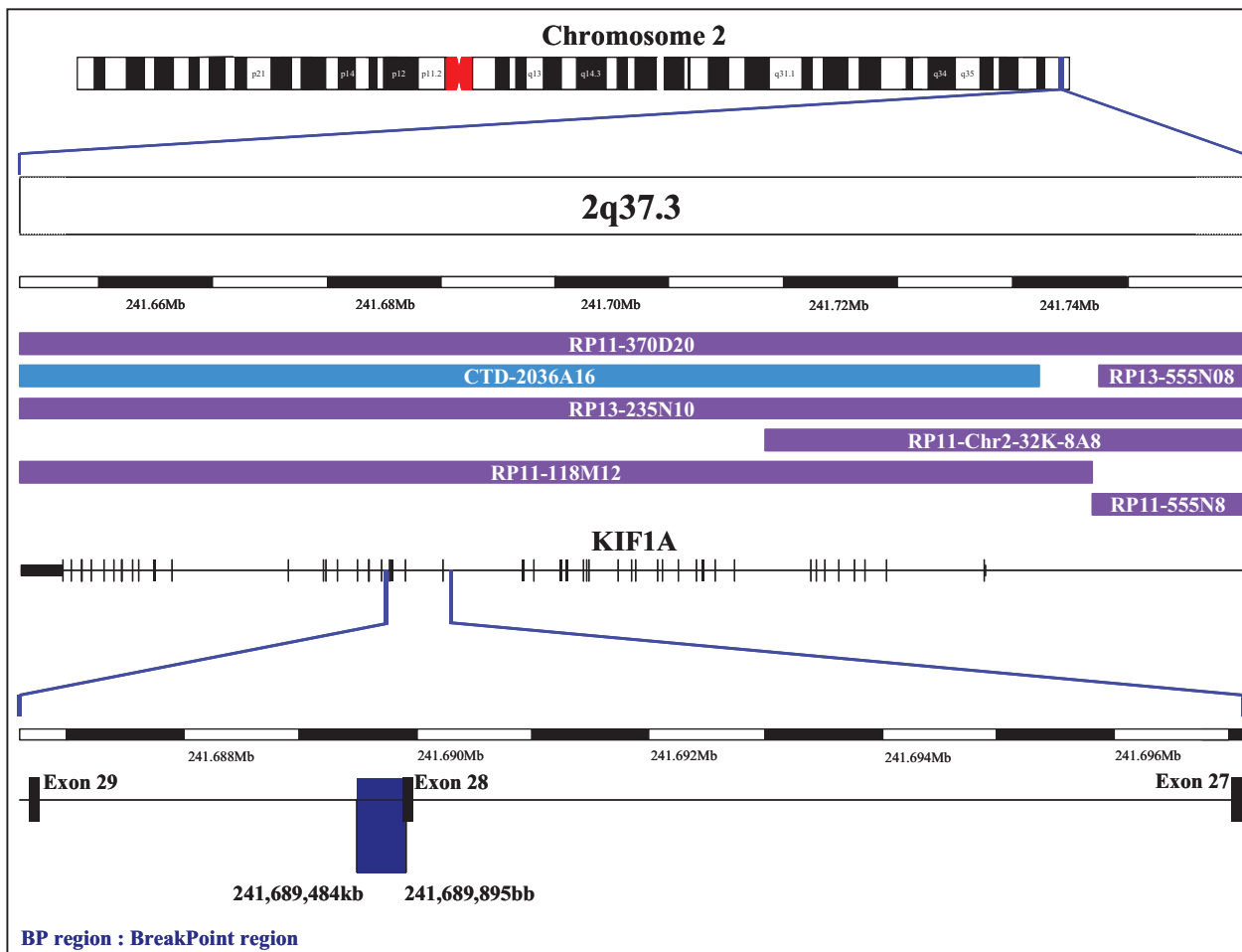


Figure 84 : Représentation graphique du point de cassure identifié après Array-Painting et localisation de la sonde CTD-2036A16 sur le dérivé 2 du Patient 5

- Technique de qPCR :

La région hétérochromatique du chromosome Y est constituée de séquences répétées notamment de satellite 3. Il est difficile de trouver une amorce spécifique dans de telles séquences et donc de cloner le point de cassure au niveau du gène *KIF1A* par la technique de PCR longue distance. La mise en œuvre de la qPCR de part et d'autre du point de cassure hypothétique a permis d'identifier l'interruption du gène *KIF1A* dans l'intron 27. La Figure 85 montre le principe de cette approche.



Figure 85 : Représentation du principe de localisation du point de cassure à l'aide de la technique de qPCR du Patient 5

- couple d'amorces 1
- couple d'amorces 2
- couple d'amorces 3
- couple d'amorces 4
- couple d'amorces 5

L'analyse des qPCR réalisées à l'aide des couples d'amorces 1, 2, 4, 5 révèle l'absence de délétion/duplication. L'analyse de la qPCR réalisée à l'aide du couple d'amorces 3 correspond à une quantité d'ADN initiale équivalente à une seule copie. Ces résultats montrent que le point de cassure est dans la séquence soulignée de la figure.

5.3.3 Techniques complémentaires : interprétation des résultats

Nous avons analysé l'ensemble du profil d'appariement des séquences au niveau du gène *KIF1A* et nous avons identifié la position la plus probable du point de cassure sur le chromosome 2, à l'aide des résultats de la qPCR (cf. Figure 86).

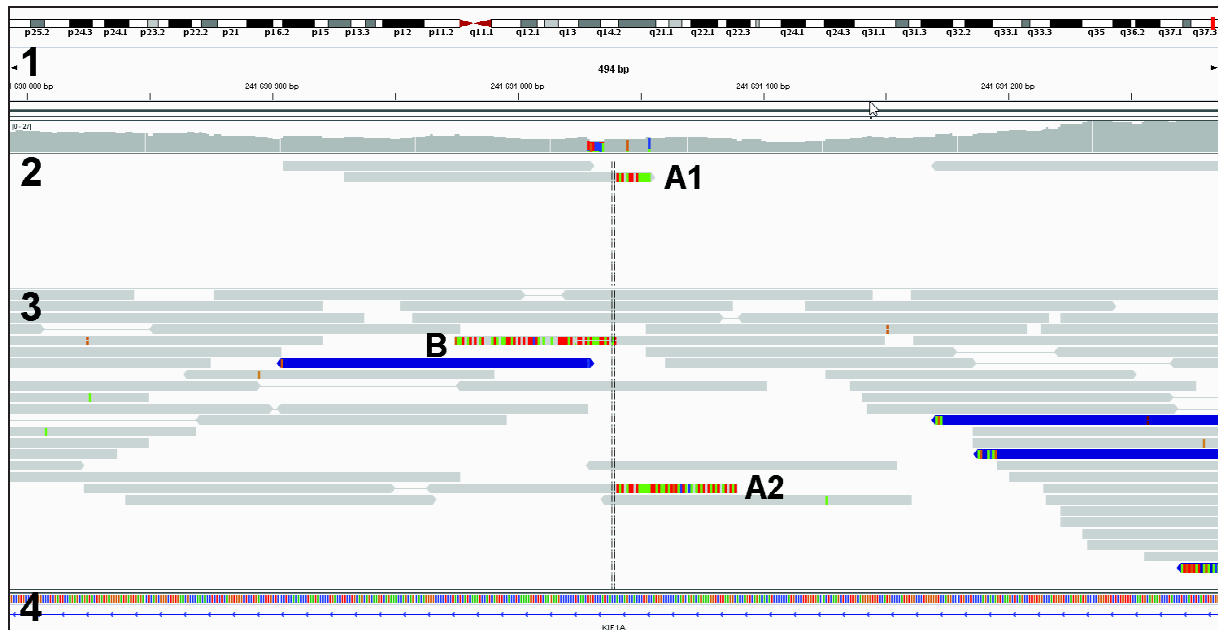


Figure 86 : Visualisation du point de cassure sur le chromosome 2 avec le logiciel IGV (Algorithme ELAND) :

- 1- position sur le chromosome 2 et fenêtre de visualisation
- 2- séquences SNL (3)
- 3- séquences paired-end reliées
- 4- séquences nucléotidiques de référence (hg19) et position dans le gène *KIF1A* (intron)
- A1 et A2**- séquence AEC sur les fragments du dérivé 2 et correspondant à la séquence transloquée du chromosome Y en aval du point de cassure
- B**- séquence AEC sur un fragment du chromosome 2 transloqué sur le dérivé Y et correspondant à la séquence du dérivé Y en amont du point de cassure
- Ligne verticale** : position du point de cassure

- Interprétation des résultats concernant le point de cassure sur le chromosome 2 :

L'analyse des séquences AEC et SNL visuellement dans IGV et après comparaison dans BLAST nous a permis de localiser le point de cassure en 2q27.3 entre les nucléotides 241691040 et 241691041 dans l'intron 27 du gène *KIF1A* (séquence de référence NM_001244008), très proche en amont des marqueurs S-3ABON et S-4BGHN, marqueurs entre lesquels le point de cassure en 2q37.3 a été déterminé par Array-Painting.

L'interruption du gène *KIF1A* est donc confirmée quelle que soit la méthode mise en œuvre. La question sur son éventuelle pathogénicité reste ouverte, de même que celle sur son mode de transmission. Dans ce contexte, nous avons poursuivi les investigations non seulement en séquençant le 2nd allèle du gène *KIF1A* mais aussi en recherchant une autre étiologie au phénotype du Patient 5 :

1- L'analyse des séquences à partir des référentiels NM_001244008.1 et NP_001230937.1 a permis de montrer une délétion d'un codon GAG dans un motif polyGAG au niveau de l'exon 27 d'origine maternelle : c.2751_2753del, p.(Glu917del), (cf. Figure 87). Cette délétion,

détectée aussi par WGS (cf. Figure 88), ne correspond pas à une mutation tronquante. Cependant, l'association de cette mutation d'origine maternelle, qui pourrait intervenir dans la structure de la protéine, et de l'interruption de *KIF1A* sur le chromosome d'origine paternelle expliquerait peut-être le phénotype du Patient 5 de notre cohorte.

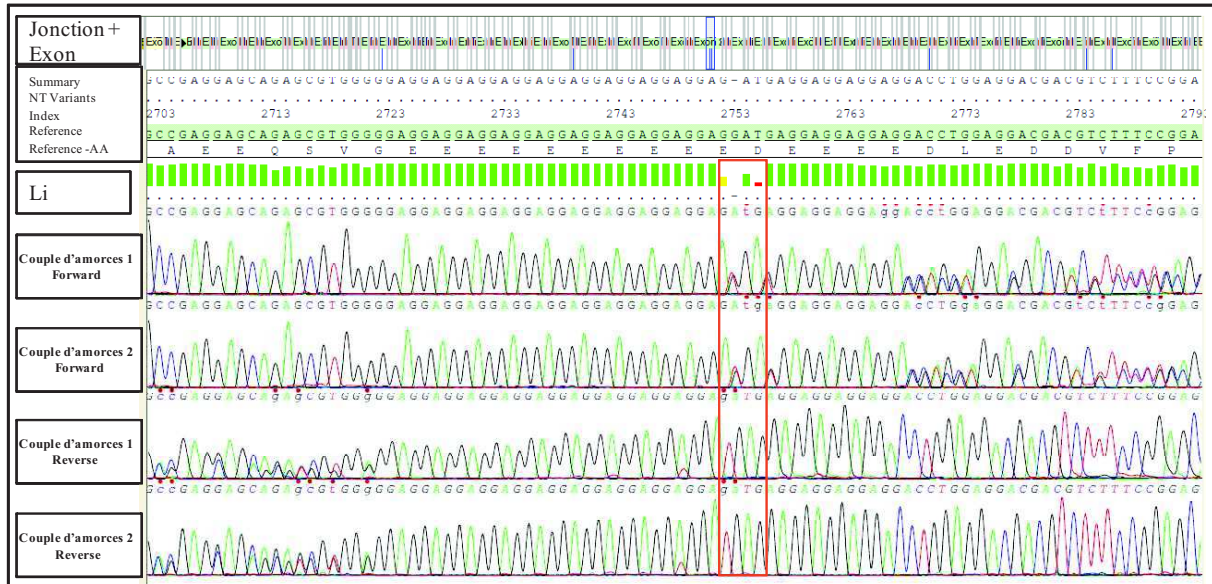


Figure 87 : Electrophorégramme montrant la délétion d'un codon GAG dans le poly(GAG) de l'exon 27 du Patient 5

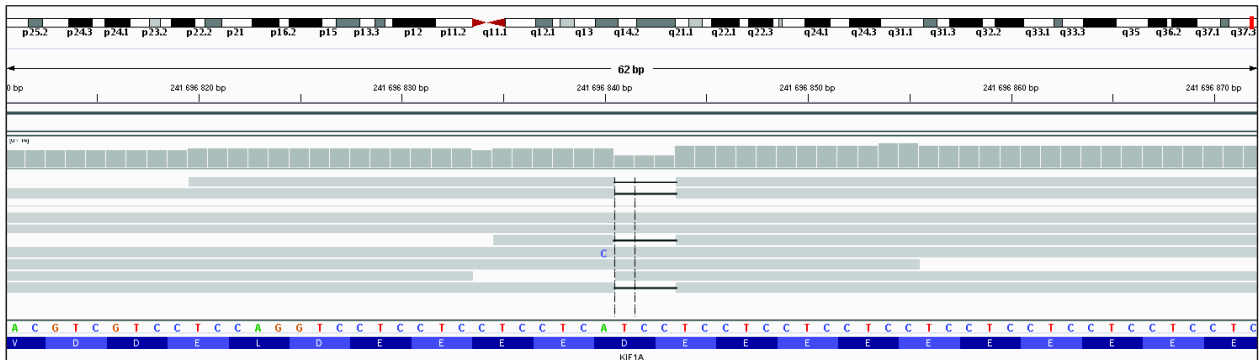


Figure 88 : Représentation de la délétion du codon GAG dans le poly(GAG) dans IGV (Patient 5)

2- Néanmoins, cette interruption de *KIF1A* n'expliquerait pas entièrement le phénotype et un autre mécanisme pourrait en être à l'origine, comme une mutation dans un autre gène localisé ailleurs dans le génome. En effet, le rôle de *KIF1A* n'étant pas clairement défini, la question de rechercher une autre étiologie a été soulevée. Comme le soulignent Schluth-Bolard C et ses collaborateurs, on ne peut pas exclure une association fortuite entre un remaniement chromosomique apparemment équilibré et un phénotype anormal ayant une autre étiologie génétique (Schluth-Bolard C, et al. 2009).

Au vu des données de la littérature, des résultats obtenus et de la clinique du Patient 5, nous ne sommes pas certains de l'implication du gène *KIF1A* pour expliquer l'ensemble du phénotype du Patient 5. Ainsi, comme complément d'étude, nous fait réalisé une étude par séquençage ciblé sur 220 gènes impliqués dans la DI (Dr Amélie Piton - Laboratoire « Mécanismes génétiques des maladies neurodéveloppementales » - Illkirch). Cette analyse a permis d'identifier une délétion/insertion polynucléotidique dans le gène *SLC9A6* (solute carrier family 9, subfamily A, member 6), localisé en Xq26.3 du bras long du chromosome X : NM_001042537.1:c.1351-4T>G (p.?) ; c.1357A>G (p.Ile453Val), (cf. Figure 89). Cette délétion/insertion hétérozygote pourrait affecter un site accepteur d'épissage du gène *SLC9A6*.

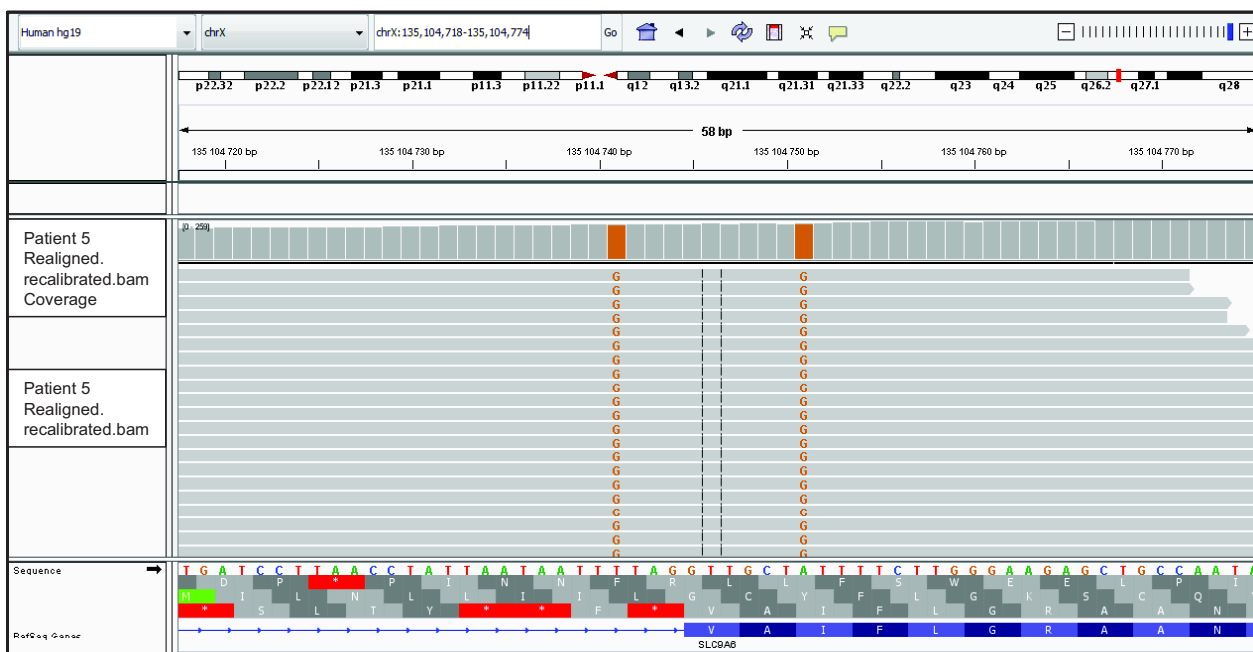


Figure 89 : Données de séquençage haut-débit visualisé avec IGV de la jonction intron 10 - exon11 du gène *SLC9A6*

L'implication de *SLC9A6* est décrite dans le syndrome de Christianson caractérisé par une microcéphalie, un retard sévère de développement global, un comportement autistique, une

épilepsie à début précoce et une ataxie (Zanni G, et al. 2014), ainsi qu'un habitus marfanoïde. L'ensemble de ces symptômes cliniques sont décrits chez le Patient 5. Ce résultat pourrait alors être l'une des 1^{ères} observations de la littérature identifiant directement une mutation dans un gène localisé dans une région différente et sans rapport avec la translocation chromosomique. Dans ce contexte, une prédiction des conséquences potentielles de la variation sur l'épissage à l'aide du site ALAMUT VISUAL (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/>) a été réalisée. Le site d'épissage ne semble pas être modifié par cette délétion/insertion (78,7 % versus 78,8 % sans cette variation), (cf. Figure 90).

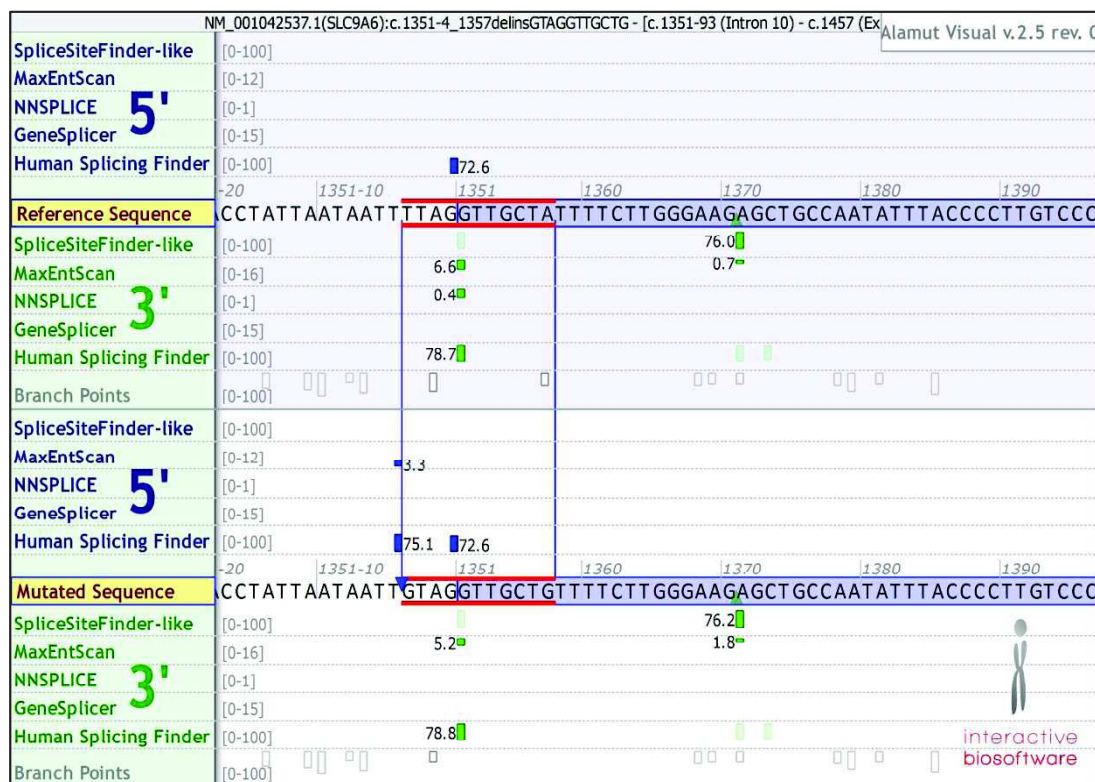


Figure 90 : Prédiction des conséquences potentielles de la variation sur l'épissage (ALAMUT VISUAL)

- Interprétation des résultats concernant le point de cassure sur le chromosome Y :

Grâce aux séquences AEC et SNL, nous avons fait une reconstitution hypothétique de la séquence située de part et d'autre du point de cassure sur le chromosome Y (cf. Figure 91).


```
TTATACATATAACTAGATAAACCTGTAATTCTACATATTTTCATTTATAATATGTAGAATTATATAATCATATAT
AATTATTTATATTCTATAAAAAATTTTATCATTATATAAAATTATAAT*TATAATTATAAAAAATCATAATATGTAC
TACAAATATATATATTATATATCATATATGCTATAGTACCTTTGTTATATATCATAATACATATAAATGTGTATT
ATGTTATCTATAATTATATAATTTTCATATATAAGTTGTATAA
```

Figure 91 : Séquence reconstituée (longueur 267 bases) de part et d'autre du point de cassure sur le chromosome Y (astérisque rouge : point de cassure).

La recherche d'homologie de cette séquence reconstituée du chromosome Y par analyse BLAST et RepeatMasker® est négative. Cette séquence est donc inconnue et n'a jamais été décrite dans les bases de données. De ce fait, nous ne pouvons pas savoir si un remaniement particulier est survenu dans cette séquence au niveau du point de cassure. Sa longueur est de 267 bases, elle est riche en nucléotides A et T (87,27 %) et elle semblerait être une séquence répétée en tandem dégénérée de type minisatellite (avec une unité de répétition de 30-40 nucléotides), (cf. Figure 92 et Tableau VI).

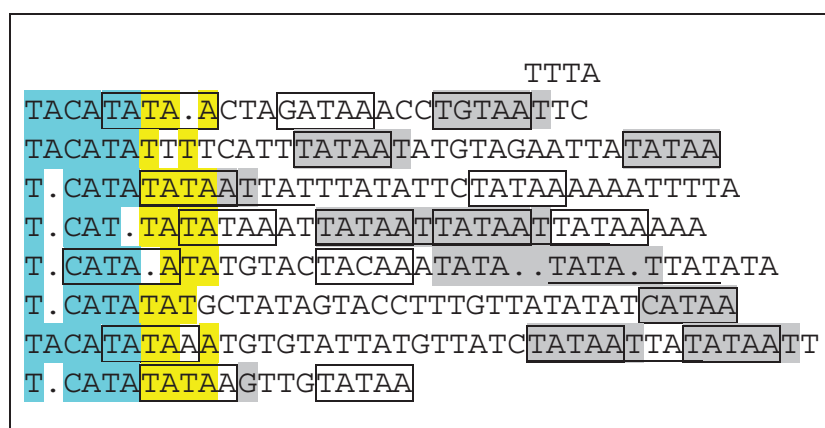


Figure 92 : Proposition d'alignement de la répétition de base de la séquence reconstituée du chromosome Y (couleurs, encadrés et soulignés : motifs répétés intrinsèques, cf. Tableau VI)

Motif	Nombre de répétitions
TACATATATA / variants	8
TATAATTAT / variants	5
TATAAT / variants	12
TATAA / variants	19

Tableau VI : Présentation de plusieurs motifs répétés intrinsèques identifiés au sein de la séquence reconstituée du chromosome Y et leur nombre de répétitions

La région d'hétérochromatine Yq12 est décrite classiquement comme contenant des séquences répétées d'ADN de type satellite 3. Dans le détail, elle comprend au moins 3 domaines faits de différents types de séquences satellites :

- * le domaine DYZ18 constitué de séquences satellites 3 situé à l'interface euchromatine / hétérochromatine,
- * le domaine DYZ1 constitué aussi de séquences satellites 3 et représentant la majeure partie de la région Yq12,
- * et, le domaine DYZ2 constitué de séquences riches en nucléotides A et T et plus ou moins dispersé au sein du domaine Yq12 (Cooke HJ, et al. 1982 ; Arnemann J, et al. 1985 ; Nakahori Y, et al. 1986 ; Skaletsky H, et al. 2003).

Elle pourrait contenir aussi des séquences bêta-satellites (Warburton PE, et al. 2008).

Notre séquence reconstituée pourrait correspondre au domaine DYZ2 (Cooke HJ, et al. 1982). Peu de données de séquences concernant ce domaine sont disponibles, cependant il serait riche en nucléotides A et T, comme notre séquence (Frommer M, et al. 1984).

5.3.4 Conclusion

Ce Patient 5 met bien en évidence la difficulté d'interprétation des résultats impliquant des gènes dont la pathogénicité n'est pas formelle. Cela soulève aussi la question du choix de la technique à mettre en œuvre devant un remaniement chromosomique apparemment équilibré *de novo* chez des patients à phénotype anormal. Cet aspect est développé dans le § 2 du chapitre Discussion. Le tableau VII présente la clinique observée en fonction de l'implication des gènes *KIF1A* et *SLC9A6* en comparaison avec celle de cet enfant. Par ailleurs, nous pouvons aussi suspecter que le phénotype de cet enfant pourrait être la conséquence de l'association des anomalies des gènes *KIF1A* et *SLC9A6*. Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression de ces gènes chez le Patient 5 (cf. § 6.1 du chapitre Résultats).

De plus, les résultats obtenus par WGS nous montrent les difficultés d'interprétation du séquençage haut débit, même devant un réarrangement apparemment simple, notamment quand il s'agit d'un remaniement impliquant des séquences répétées comme la région hétérochromatique du chromosome Y. Le § 2 du chapitre Discussion expose la nécessité de combiner plusieurs techniques pour une bonne interprétation des résultats, particulièrement dans le cadre du WGS.

Signes cliniques	Patient 5	<i>KIF1A</i>	<i>SLC9A6</i>
DI	+	+	+
Aspect marfanoïde	+	-	+
Epilepsie	précoce (Syndrome de West)	+	Précoce
Troubles du comportement	+		Traits autistiques
Ataxie	+	+	+
Paraplégie		+	
Neuropathie périphérique		+	
IRM cérébrale	Normale	Atrophie vermienne	Microcéphalie

Tableau VII : Comparaison de la symptomatologie clinique du Patient 5 avec celles liées à l'atteinte des gènes *KIF1A* et *SLC9A6*

5.4 Patient 10

Cet enfant est porteur d'un remaniement chromosomique complexe avec une translocation à 3 chromosomes : $t(3;15;5)(p11;q2?5;q23)$. Les signes cliniques observés sont une DI et des troubles neuromusculaires.

5.4.1 Identification des points de cassure

A l'aide du logiciel IGV, nous avons recherché dans les régions des points de cassure les images décrites précédemment. Ainsi, si nous prenons l'exemple de la région chromosomique comprenant le point de cassure situé sur le chromosome 5 (cf. Figure 93), nous remarquons que dans une même zone, il y a plusieurs réarrangements. Pour mieux visualiser ces remaniements, nous les avons signalisés sous forme de carrés de différentes couleurs sur cette figure. Nous déduisons que le RCC observé initialement avec les techniques de Cytogénétique Classique et Moléculaire est en fait beaucoup plus complexe.

Prenons les 3 exemples d'interprétation schématisés sous forme d'un carré sur la Figure 93.

1- Analyse de la séquence au niveau de la région située entre les positions 167437750pb et 167437850pb du chromosome 5 schématisée par le carré rouge :

Nous sommes dans la situation d'une séquence localisée sur le chromosome 5 dans le sens 5'→3' (couleur grise) dont la séquence paired-end (dans le sens 3'→5') n'est pas localisée, même si nous pouvons suspecter sa localisation. En effet, des séquences schématisées par des flèches violettes dirigées dans le même sens sont présentes en dessous. Cette couleur violette

renvoie sur le chromosome 15 sur lequel l'extrémité paired-end des séquences « violettes » est donc localisée. Si nous recherchons une homologie de cette séquence paired-end non localisée (inverse complémentaire) à l'aide du logiciel BLAST, nous obtenons deux appariements avec directement la localisation du point de cassure : l'un sur le chromosome 5 et l'autre sur le chromosome 15. Les points de cassure sur ces deux chromosomes sont donc en 5q34 (167437959pb) et 15q26.2 (97627156pb).

2- Analyse de la séquence au niveau de la région située entre positions 167438200pb et 167438300pb du chromosome 5 schématisée par le carré orange :

Nous sommes dans les mêmes circonstances que ci-dessus mais la séquence paired-end semble être localisée sur le chromosome 3, si nous regardons les séquences vertes en dessous. La recherche de la séquence homologue de la séquence inverse complémentaire de la séquence paired-end non localisée à l'aide du logiciel BLAST donne directement la localisation des points de cassure sur les 2 chromosomes en 3p12.1 (84876529pb) et 5q34 (167438320pb).

3- Analyse de la séquence au niveau de la région située entre les positions 167438320pb et 167438420pb du chromosome 5 schématisée par le carré bleu :

L'extrémité sur le chromosome 5 est associée à une séquence type « arc-en-ciel », qui est lue au total 4 fois, correspondant à 3 des 4 séquences dont l'extrémité paired-end n'est pas localisée et à une séquence de la trame. En effet, l'alignement de l'extrémité paired-end non localisée de ces 4 séquences SNL contre la séquence de référence du génome humain montre de multiples occurrences, ce qui traduit la présence d'une séquence répétée. Cependant, une identité de séquence de 100 % avec le chromosome 5, qui signale un remaniement intrachromosomique à la position 5:135746504, est bien visualisée avec l'algorithme BWA (cf. Figure 94). Une analyse par le logiciel RepeatMasker® donne une homologie avec une séquence type L1 (position : 5265-5424pb d'une séquence L1P).

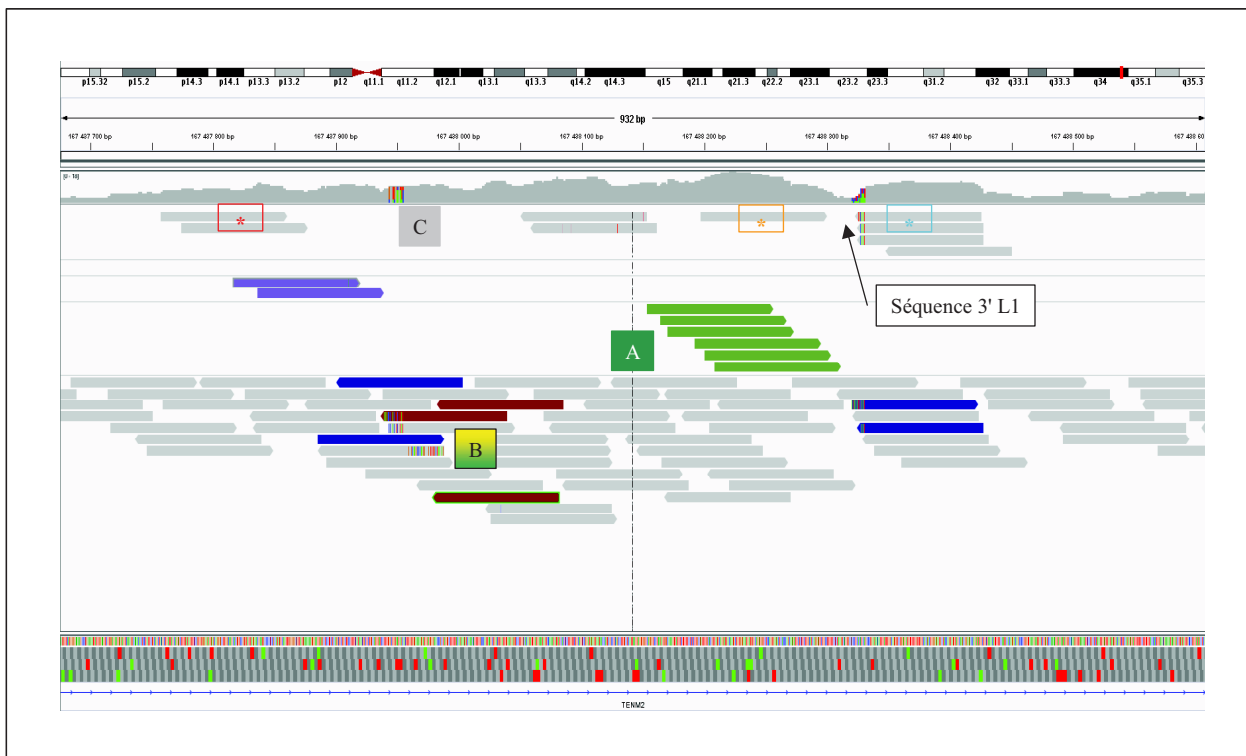


Figure 93 : Représentation des résultats de WGS dans la zone d'un point de cassure chromosomique (algorithme ELAND) :

- A-** séquences localisées sur le chromosome 5 dans la région hypothétique du point de cassure dont l'extrémité paired-end est sur le chromosome 3 (couleur verte).
- B-** séquences type « arc-en-ciel ».
- C-** séquences localisées sur le chromosome 5 dont l'extrémité paired-end n'est pas localisée

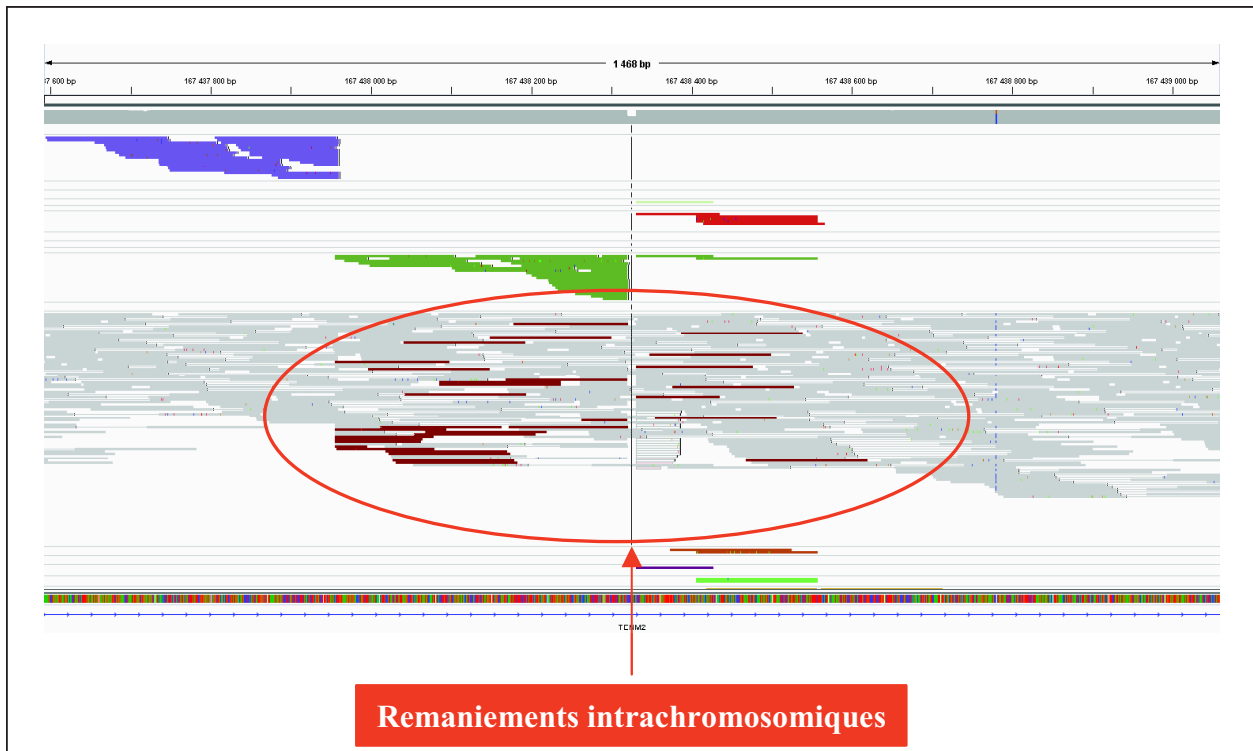


Figure 94 : Représentation des résultats de WGS dans la zone des remaniements intrachromosomiques en 5:135746504 (algorithme BWA)

En analysant les différentes régions chromosomiques contenant les points de cassure, nous avons pu confirmer plusieurs réarrangements qui complexifient la translocation à 3 chromosomes diagnostiquée initialement.

Ainsi, nous retrouvons et confirmons les résultats obtenus après le caryotype et l'Array-Painting :

- trois points de cassure en 3p12.1 à 83608969pb, à 85518652pb et en 3p11.1 à 88667960pb,
- trois points de cassure en 5q23.3 à 130138598pb et en 5q34 à 166171696pb et à 167438320pb,
- et, un point de cassure en 15q26.2 à 97627156pb.

De plus, nous avons suspecté :

- des points de cassure supplémentaires sur le chromosome 3 en 84876529pb et sur le chromosome 5 en 167438320pb associés à un remaniement entre les chromosomes 3 et 5 à la base 83608966 du chromosome 3 et à la base 168709090 du chromosome 5,
- et, des réarrangements intrachromosomiques sur le dérivé 3 et sur la région transloquée du chromosome 5 sur le chromosome 3 et sur le dérivé 5 entre les positions 167437956-168874538pb et 168709118-168874552pb.

5.4.2 Techniques complémentaires : aide à l'interprétation des données

- Technique de FISH :

Afin de comprendre l'organisation et la redistribution des diverses régions chromosomiques impliquées dans ce RCC, nous avons réalisé plusieurs FISH à l'aide de différentes sondes non commerciales dont la localisation est précisée dans l'annexe 6.

Ainsi, les sondes RP11-754J20 et RP11-72B20, spécifiques de la région 3p12.1 du bras court du chromosome 3, montrent un signal sur le chromosome 3 normal et un signal sur le dérivé 3 (cf. Figure 95). De plus, les sondes RP11-320M08 et RP11-25P22, respectivement spécifiques des régions 5q34 et 5q35.1 du bras long du chromosome 5, s'hybrident sur le chromosome 5 normal et sur le dérivé 3 (cf. Figure 96). Dans ces résultats, l'important est de noter que la sonde RP11-320M08, qui est terminale sur le chromosome 5 normal, est proche du centromère du dérivé 3 contrairement à ce qui était attendu. Ce nouvel exemple confirme la nécessité de compléter les analyses de WGS par des techniques de FISH notamment dans les remaniements complexes. Cet aspect est développé dans le § 2.3 du chapitre Discussion.

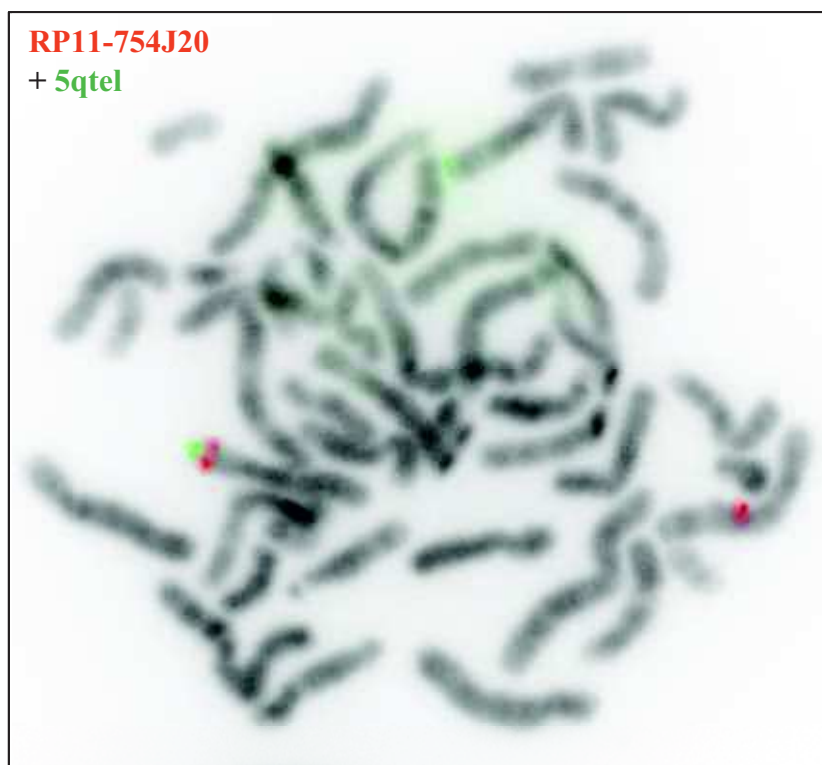


Figure 95 : Hybridation de la sonde RP11-754J20 en 3p12.1

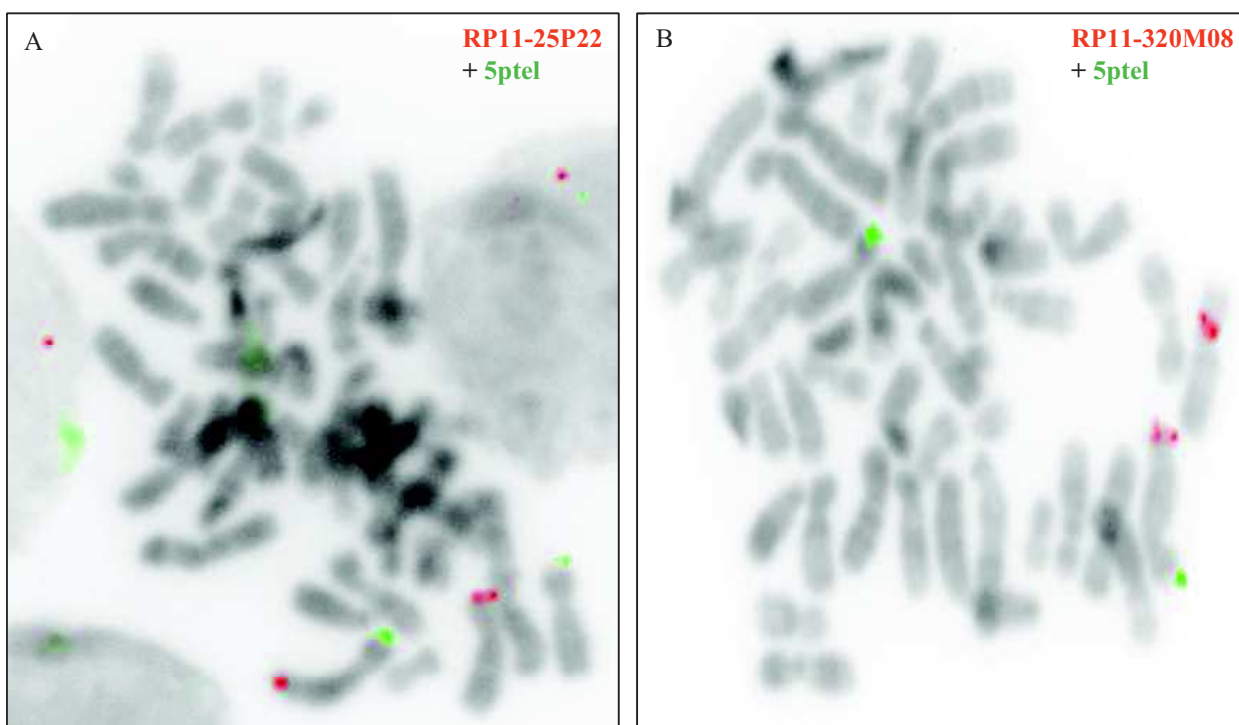


Figure 96 : Hybridation des sondes RP11-25P22 en 5q35.1 (A) et RP11-320M08 en 5q34 (B) avec un témoin subtélomérique 5ptel

Ces résultats de WGS et de FISH nous ont donc permis de mettre en évidence un remaniement plus complexe des séquences sur les dérivés 3 et 5. Nous proposons l'organisation hypothétique suivante des séquences dans la Figure 97.

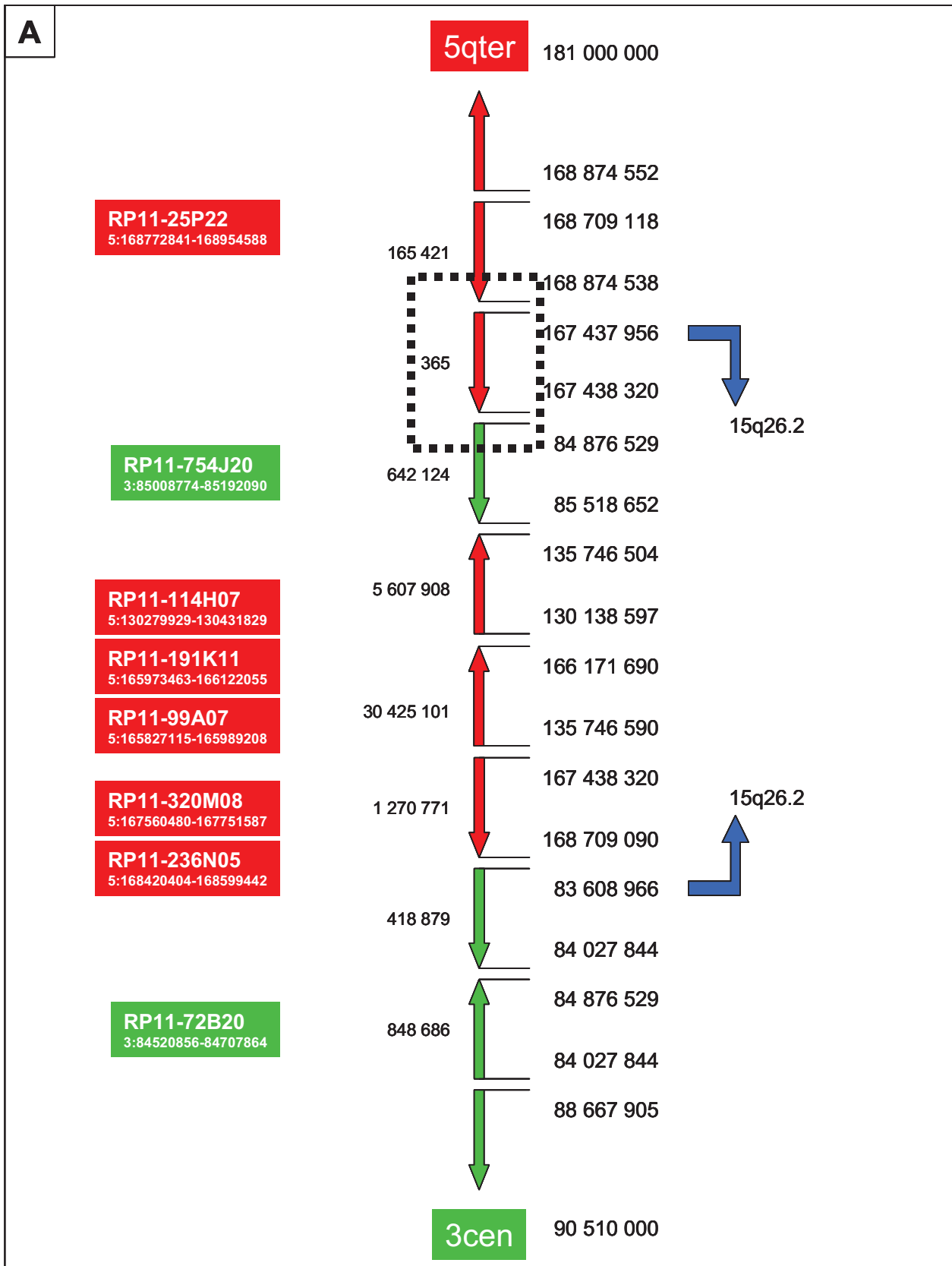


Figure 97 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 5q et 3p sur les dérivé 3, 5 et 15

A- Dérivé 3 (à gauche : taille des segments remaniés et à droite : position nucléotidique des points de cassure chromosomiques)

— Séquences du chromosome 3 — Séquences du chromosome 5
 — Séquences du chromosome 15

■ Sondes testées

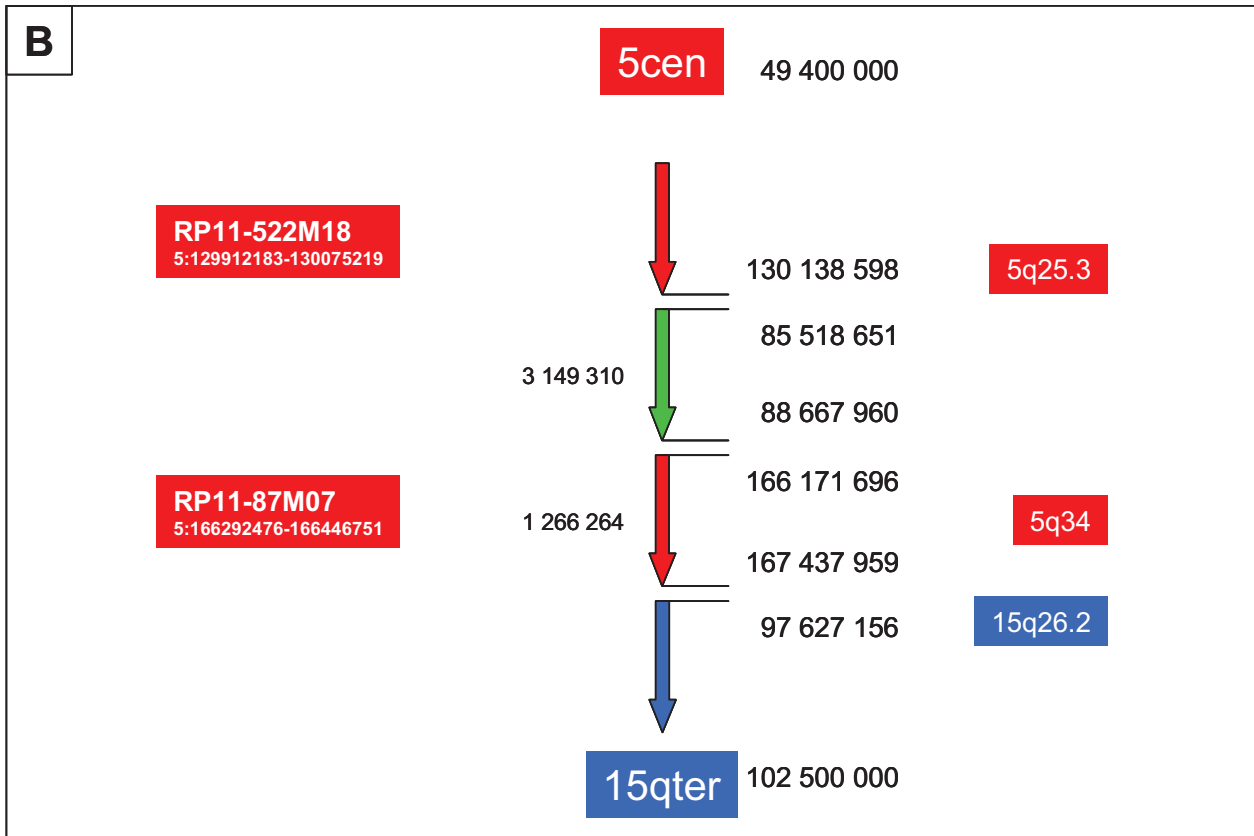


Figure 97 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 5q et 3p sur les dérivé 3, 5 et 15

B- Dérivé 5(à gauche : taille des segments remaniés et à droite : position nucléotidique des points de cassure chromosomiques)

- Séquences du chromosome 3
- Séquences du chromosome 5
- Séquences du chromosome 15

Sondes testées

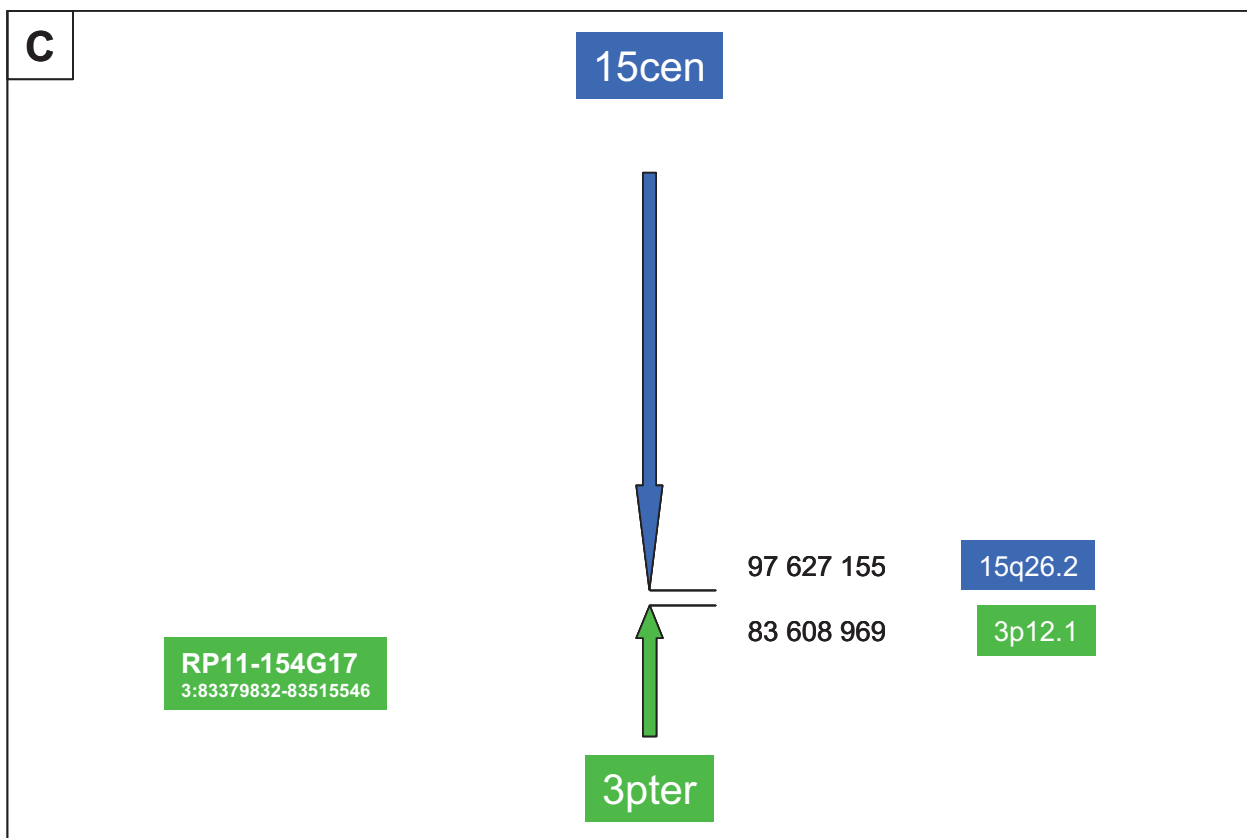


Figure 97 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 5q et 3p sur les dérivé 3, 5 et 15 C- Dérivé 15(à gauche : taille des segments remaniés et à droite : position nucléotidique des points de cassure chromosomiques)

- Séquences du chromosome 3
- Séquences du chromosome 5
- Séquences du chromosome 15

Sondes testées

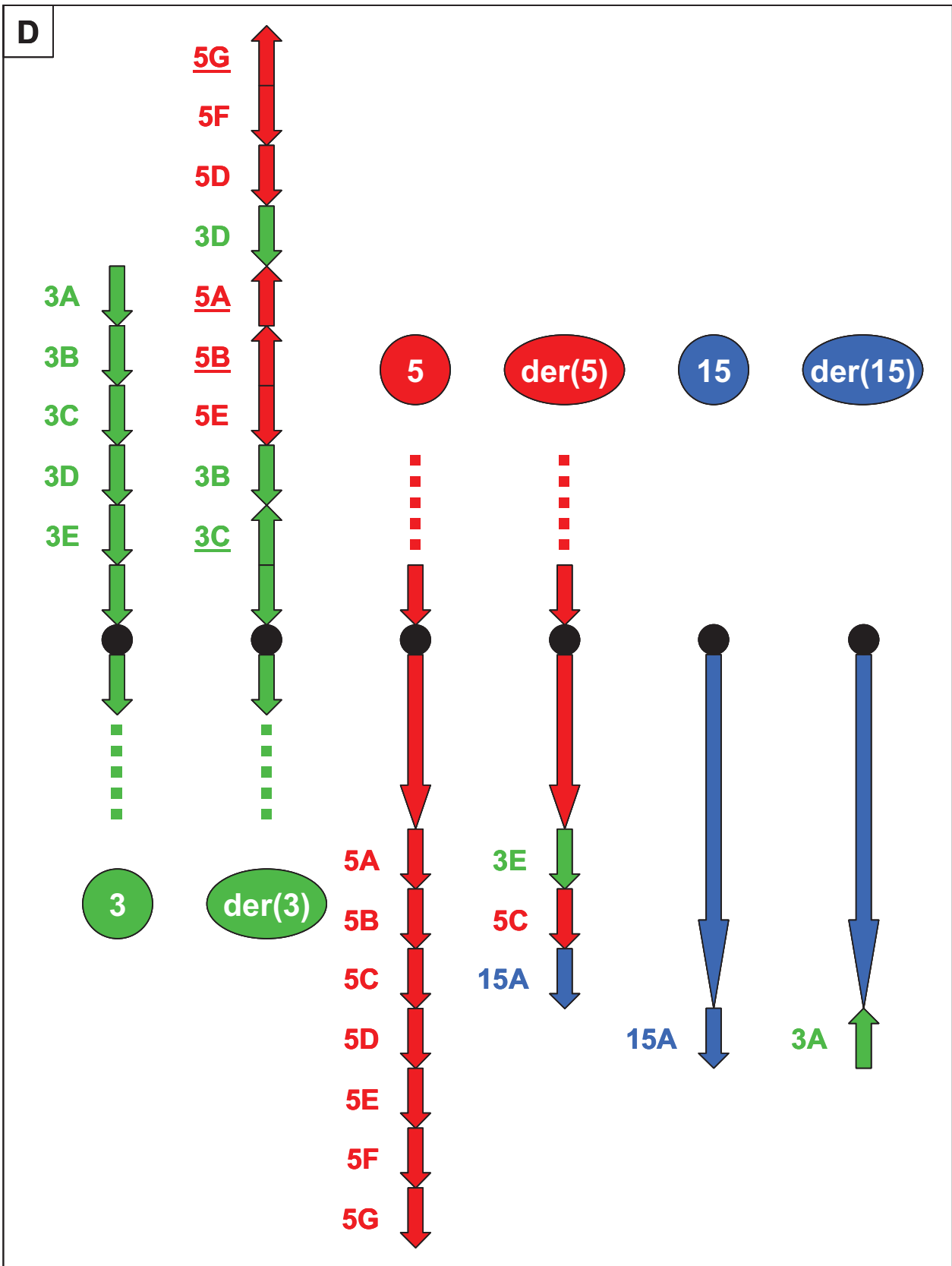



Figure 97 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 5q et 3p sur les dérivé 3, 5 et 15 **D**- Récapitulatif

- Séquences du chromosome 3
- Séquences du chromosome 5
- Séquences du chromosome 15
- Sondes testées

- Résultat du séquençage classique :

Nous avons voulu confirmer quelques hypothèses par des techniques de séquençage classique Sanger. Ainsi, l'organisation de la séquence encadrée  dans la figure 97A est bien réelle. A noter, nous avons utilisé des sondes FISH complémentaires pour confirmer que ce remaniement intrachromosomique était présent sur le dérivé 3. Par ailleurs, le point de cassure sur le dérivé 15 est confirmé et unique. Aucun réarrangement complexe ne semble donc y être associé.

5.4.3 Conclusion

Les résultats de WGS précisent les points de cassure observés avec Array-Painting et montrent une organisation encore plus complexe des régions chromosomiques 3p11.1, 3p12.1, 3p12.2p12.1, 5q23.2, 5q34 et 5q34q35.1.

En effet, les données du séquençage haut débit complétées avec celles de la FISH suggèrent une alternance entre les régions 3p et 5q dans le bras court du dérivé 3 et sur le bras long du dérivé 5. Ces observations sont en faveur d'un *chromothripsis* chez le Patient 10. Selon l'équipe de Feenstra I, la complexification des RCC est retrouvée jusque dans 90 % des cas (Feenstra I, et al. 2011). Ainsi, chez le Patient 10, cette complexification se manifesterait alors sous forme d'un *chromothripsis*. La compréhension de l'organisation des régions chromosomiques impliquées dans ce mécanisme a nécessité une approche complémentaire par FISH. Cet aspect est développé dans le § 2 de la Discussion.

L'environnement chromatinien doit être favorable pour avoir une « bonne expression du gène » (Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998). La présence d'un éventuel *Chromothripsis* serait potentiellement responsable d'une réorganisation de l'architecture des régions chromosomiques impliquées et pourrait avoir des impacts, qui sont encore méconnus, non seulement dans les pathologies acquises (cancers) mais aussi dans les pathologies constitutionnelles (Pellestor F, et al. 2014). Chez le Patient 10, notre hypothèse de réorganisation des régions chromosomiques impliquées dans les dérivés 3 et 5 montre plusieurs inversions et insertions laissant suspecter un changement de l'environnement chromatinien des gènes dans ou à proximité de ces régions ou à proximité (cf. Figure 97). Un effet de position pourrait alors entraîner éventuellement une dérégulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes pouvant être responsables du phénotype du Patient 10, comme l'équipe de Gonzalez JR l'a décrit dans une inversion d'environ 450kb dans la région chromosomique 16p11.2, qui était pourtant considérée comme sans signification pathologique reconnue.

Cependant, nous ne pouvons exclure l'éventuel rôle, dans le phénotype du Patient 10, d'un gène interrompu suite aux divers remaniements observés. Pour rappel, les résultats de l'Array-Painting montrent l'interruption des gènes *CCDS54614* (dont le caractère délétère n'est pas encore identifié à l'heure actuelle) et *TENM2* (dont l'implication pourrait être suspectée). De nouvelles données, obtenues par WGS, complètent la liste des gènes avec l'interruption de *LINC00971* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 971) localisé en 3p12.1 et de *SLIT3* (Slit Homolog 3 - Drosophila) localisé en 5q34q35.1.

Après consultation des bases de données de la littérature médicale, aucune information sur le gène *LINC00971* permettant d'expliquer le phénotype du Patient 10 n'a pu être retrouvée avec les connaissances actuelles. Son rôle reste donc encore à définir. Pour savoir si la perte de fonction de ce gène pourrait être responsable de la clinique de cet enfant, des approches comme des études fonctionnelles sont nécessaires. Le séquençage de ce gène chez des patients présentant le même phénotype dans le but de retrouver des mutations délétères pourrait être aussi envisagé.

Les gènes *SLIT* codent pour un groupe de molécules agissant dans le guidage des axones (Unni DK, et al. 2012). Parmi les membres de ce groupe, *SLIT2* a été le plus étudié, notamment chez des souris « knockout », qui ont des anomalies dans le développement des axones thalamocorticaux, optiques et olfactifs (Bagri A, et al. 2002 ; Nguyen-Ba-Charvet KT, et al. 2002 ; Plump AS, et al. 2002). Ces souris présentent également une dysgénésie du corps calleux (Bagri A, et al. 2002). Cette observation a été confirmée par l'étude d'Unni DK et ses collaborateurs qui décrivent même une absence totale de corps calleux chez certaines souris *Slit2*^{-/-}. Cette équipe rapporte par ailleurs que les souris *Slit3*^{-/-} ont des anomalies de la ligne médiane mais avec une faible pénétrance (Unni DK, et al. 2012). Ces données confirment donc que *SLIT2* joue un rôle majeur dans le développement du corps calleux et que *SLIT3* pourrait contribuer à ce processus. Cependant, l'interruption de ce gène ne semblerait pas être impliquée dans les symptômes cliniques du Patient 10. En effet, son IRM est considérée comme normale. Ceci pourrait s'expliquer par un mode d'hérédité récessif de la pathologie de ce gène. Cette hypothèse est en cohérence avec la description d'animaux hétérozygote *Slit3*^{+/-} présentant un corps calleux normal dans l'étude d'Unni DK et ses collaborateurs (Unni DK, et al.2012).

Ainsi, le remaniement chromosomique identifié chez le Patient 10 associe plusieurs mécanismes et leur action conjuguée pourrait probablement être responsable du phénotype de cet enfant :

1- Le RCC diagnostiqué sur la caryotype implique les chromosomes 3, 5 et 15 : L'hypothèse d'une modification de l'empreinte parentale pour le chromosome 15 peut être évoquée. En effet, plusieurs mécanismes étiologiques ont été décrits qui sont responsables des Syndromes PWS / AS, la conséquence pathogénique étant au final l'équivalent d'une disomie uniparentale (Mascari MJ, et al. 1992). Cependant, le point de cassure identifié est en 15q26.2, qui est très en aval du centre d'empreinte (15q11q13) de ces syndromes et dans une zone non connue d'empreinte parentale.

2- Le *chromothripsis* : La réorganisation de l'architecture des régions chromosomiques impliquées pourrait rendre l'environnement chromatinien défavorable à l'expression de certains gènes et donc provoquer des effets de position.

3- L'interruption de gènes suite aux multiples remaniements : *TENM2* semble être le candidat le plus intéressant.

5.5 Patient 11 et Patiente 12

A cause de notre difficulté d'accès à ces techniques localement, du coût élevé du séquençage haut débit et parce que ces patients étaient porteurs de translocations impliquant des chromosomes différents, nous avons décidé de réaliser un WGS à partir d'un mélange d'ADN de ces 2 patients. La profondeur de lecture était de 10X. Nous n'avons pas pu obtenir de résultats interprétables par cette approche. Dans cette configuration, la cause principale de cet échec est une profondeur de lecture insuffisante et l'augmenter aurait fait accroître le coût de l'expérience, allant dans le sens contraire du but initial.

A la suite de cet échec, nous avons choisi de compléter les résultats de la méthode classique de marche sur le chromosome par FISH par une analyse avec un nouveau WGS avec une profondeur de lecture de 20X pour le Patient 11.

Par ailleurs, nous nous sommes, malgré tout, appuyés sur les données de cette analyse chez la Patiente 12, afin de préciser les points de cassures suspectés après la technique d'Array-Painting et ainsi de faciliter le choix des amorces pour les séquencer.

5.5.1 Patient 11

Le clonage des points de cassure par un nouveau WGS a permis de montrer dans un premier temps que la translocation était plus complexe avec l'implication d'un 3^{ème} chromosome, le chromosome 5. L'analyse des données du WGS a permis de conclure que ce RCC pourrait être finalement un *chromothripsis*.

Initialement, nous nous sommes aidés des résultats de la FISH (cf. § 3.1 du chapitre Résultats) pour rechercher précisément les points de cassure sur les chromosomes 1 et 10 normalement situés dans les régions 1q43 (1:243504111-243820051pb) et 10p12.2p12.1 (10: 24453608-25369091pb). Quel que soit l'algorithme utilisé, nous avons bien identifié le point de cassure sur le chromosome 10 en 10:247043355pb mais le « renvoi » nous dirigeait en 5q23.2 et non sur le chromosome 1 (cf. Figure 98). Dans ce contexte, nous avons hybridé la peinture du chromosome 5 qui a confirmé son implication, prouvant ainsi le RCC (cf. Figure 99). Cependant, aucun point de cassure n'a été observé dans la région 1q43 en 1:243504111-243820051pb.

Ces résultats nous ont amenés à :

- 1- Réinterpréter les résultats de l'hybridation *in situ* des sondes RP11-113O11 et RP11-794A13 ; nous avons alors observé que la sonde RP11-113O11 était plus proximale qu'attendu (cf. Figure 100), ce qui augmente l'intervalle dans lequel est localisé le point de cassure et donc ne permet plus de conclure à une interruption du gène *AKT3* ; l'hypothèse principale qui pourrait expliquer cette inexactitude dans la localisation serait une erreur de technique (soit en récupérant la sonde dans le puit de la banque, soit en déposant la sonde dans le puit par le fournisseur).
- 2- Et, parcourir visuellement dans IGV les chromosomes 1, 5 et 10 afin de rechercher les points de cassure de ce RCC.

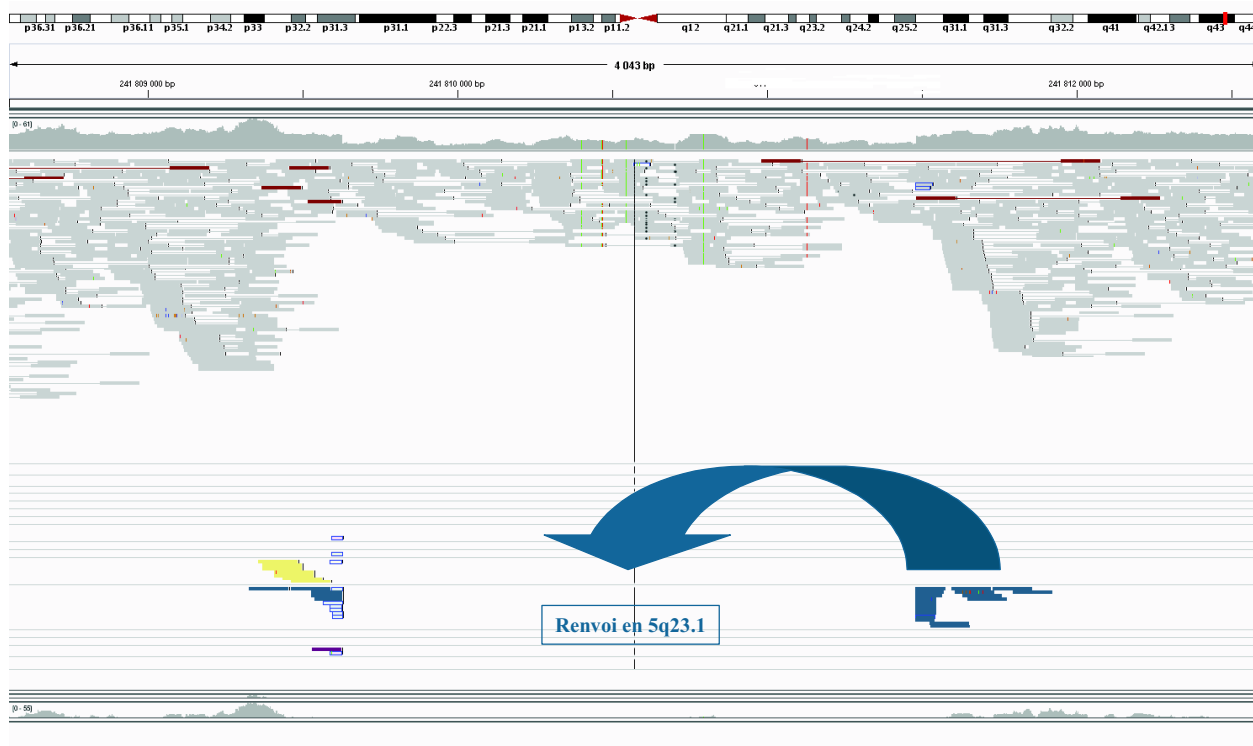


Figure 98 : Identification par WGS de l'implication du chromosome 5 dans le remaniement chromosomique du Patient 11

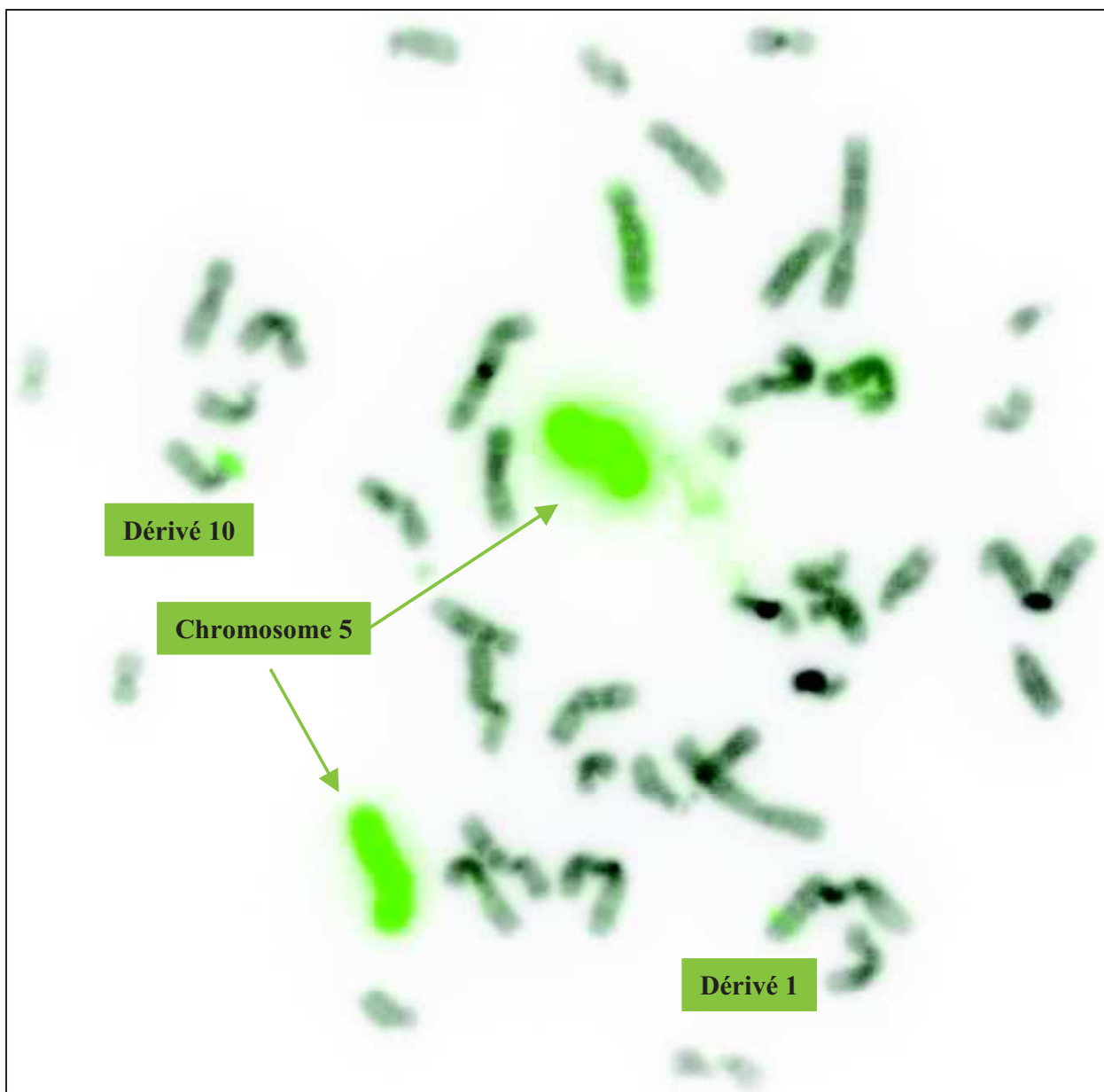


Figure 99 : Confirmation de l'implication du chromosome 5 dans le remaniement chromosomique du Patient 11 (peinture du chromosome 5 en vert (Metasystems) marquant les deux chromosomes 5 et les dérivés 1 et 10)

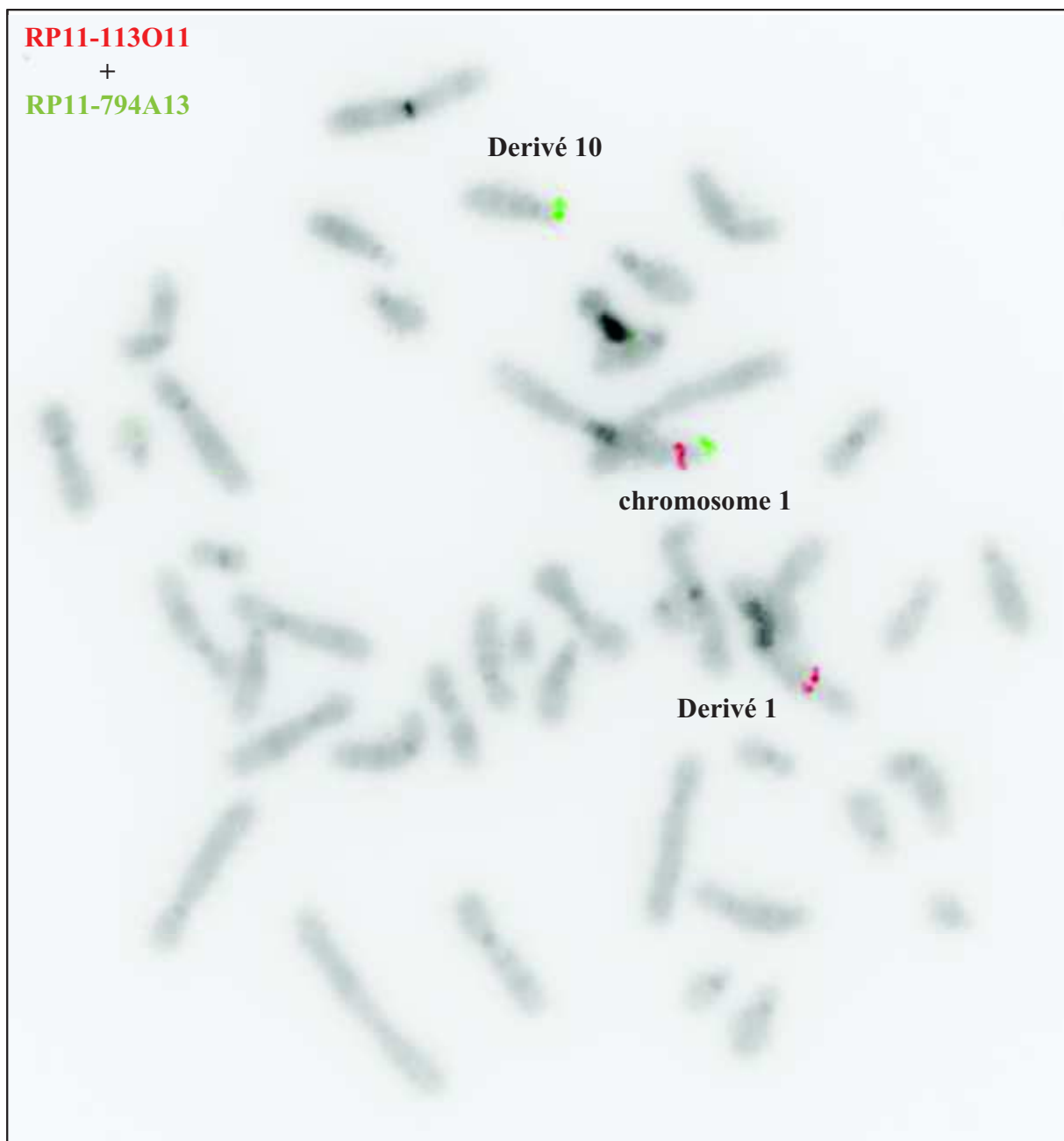


Figure 100 : Profil d'hybridation des sondes RP11-113O11 en 1q43 et RP11-794A13 en 1q43q44 (la sonde RP11-113O11 est plus proche du centromère du chromosome 1 qu'attendu)

L'analyse du WGS a montré que le remaniement était encore beaucoup plus complexe qu'attendu et nous avons diagnostiqué un *chromothripsis*. Si nous avons réussi relativement facilement à établir la nouvelle organisation des régions chromosomiques impliquées dans les dérivés 1 et 5, des difficultés sont apparues pour reconstituer la structure chromosomique chaotique correspondant au dérivé 10.

1- Dans un premier temps, nous avons identifié « une seule liaison » entre le chromosome 10 et le chromosome 5, qui correspond à la jonction 10:24704355 et 5:121810547 localisée sur le dérivé 1. Nous n'avons donc pas de point de cassure impliquant le chromosome 10 et localisé sur le dérivé 10.

2- Par la suite, nous avons identifié « une seule liaison » entre le chromosome 1 et le chromosome 5, qui correspond à la jonction 1:241883303 et 5:111271523 localisée sur le dérivé 1. Nous n'avons donc pas de point de cassure impliquant la région du point de cassure en 1:241883303 du chromosome 1 et localisé sur le dérivé 10. De même, nous avons bien identifié un réarrangement intrachromosomique impliquant la région 5:111271523 du chromosome 5 mais que nous n'arrivions pas à intégrer dans la réorganisation des régions chromosomiques sur aucun dérivé. Cependant, ce réarrangement semblerait, suite à la reconstitution des dérivés 1 et 5, être sur le dérivé 10.

Dans ce contexte, nous avons analysé dans IGV la région 1:241883340 proche du point de cassure identifié sur le chromosome 1, ainsi que la région 10: 24704355 sur le chromosome 10.

- Analyse des régions 1:241883340 du chromosome 1 et 10:24704355 du chromosome 10 :
Nous sommes partis de l'hypothèse qu'il n'y avait qu'un seul pont de cassure sur le chromosome 10.

Au niveau de la région 1:241883340, nous avons alors examiné l'ensemble des séquences AEC orphelines et des séquences SNL dirigées vers la gauche (cf. Figure 101). Si au départ nous avons compté 9 SNL, nous en avons analysées 7. En effet, deux présentent une séquence différente. La reconstitution et l'alignement des 7 séquences SNL donnent une séquence de 326 pb (cf. Figures 102 et 103).



Figure 101 : Représentation de la région du point de cassure en 1:241883340 dans le logiciel IGV chez le Patient 11



Figure 102 : Alignement des séquences SNL (algorithme ELAND) correspondant au deuxième point de cassure chromosomique hypothétique sur le chromosome 1 en position 241883302 (en haut : séquence complète résultant de l'alignement des 7 séquences SNL)

```
GAGTAATGGTTCTCCAGCACAGAGTTTGAGATCTCAGAATGGACAGACAGCCTCCTCAAGT
GGTCACTGATTCCCGAGTAGCCTAACTAGGAGACACCACCCAGTAGGGCCAGACTGATACC
TCACAGGGCCGGGTACCCCTCTGAGACGAAGCTTTCAAAGGAACGATCAGGCAGCAACATTT
GCTGTTTCAGCAGTACTCACTGTTCTGCAGCCTCCGCTGCTGATA_CCATGTGTCCATTCTCA
AGGTTTCAGCTCCCACTTATAAGTGAGAACATACAGTGTTTGGTTTTCTGTTCCCTGTGTTAGT
TTGCTGAGGATAACGGC
```

Figure 103 : Séquence reconstituée à partir des SNL au niveau de la région 1:241883340 (longueur de 326pb) chez le Patient 11 (AEC / _ point de cassure / CC chevauchement)

Cette séquence correspond, avant le point de cassure, c'est-à-dire du nucléotide 1 au 232^{ème}, à une séquence répétée identifiée comme étant une séquence LINE de sous-type L1P1, qui n'est pas normalement retrouvée dans cette région du chromosome 1. En effet, la séquence normalement présente de part et d'autre de la position 1:241883302 est de type LINE de sous-type L1PA10.

La comparaison BLAT de cette séquence reconstituée ne donnant aucune identité à 100 % avec la séquence humaine de référence, nous avons donc émis l'hypothèse que cette séquence LINE pourrait provenir d'une région non séquencée probablement du chromosome 5.

Au niveau de la région 10:24704355, nous avons alors examiné l'ensemble des séquences AEC orphelines et des séquences SNL dirigées vers la gauche (cf. Figure 104). Si au départ nous avons compté 15 SNL, dont deux présentent une séquence type « arc-en-ciel », nous en avons éliminé 5 (deux SNL ont un AEC différent, deux ont une séquence ne correspondant pas à celle des autres SNL et une est avec une séquence mal lue). La reconstitution et l'alignement des 10 séquences SNL restantes donnent une séquence de 298pb (cf. Figures 105 et 106).

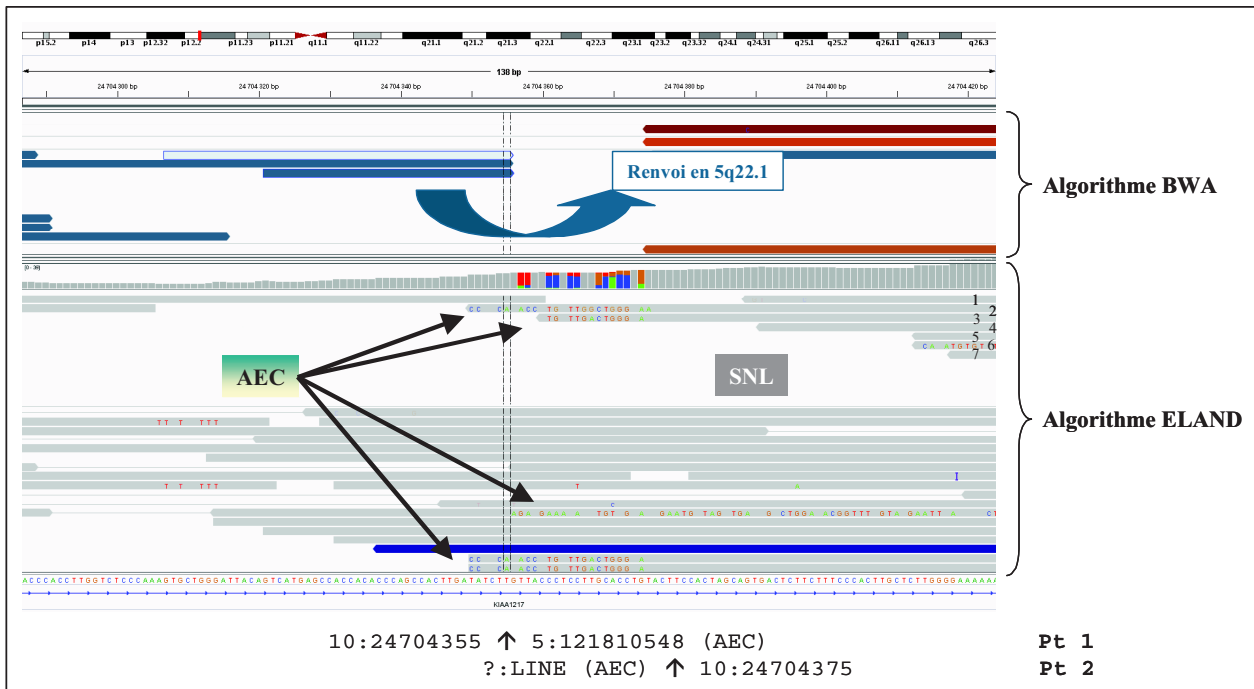


Figure 104 : Représentation de la région 10:24704355 dans le logiciel IGV chez le Patient 11

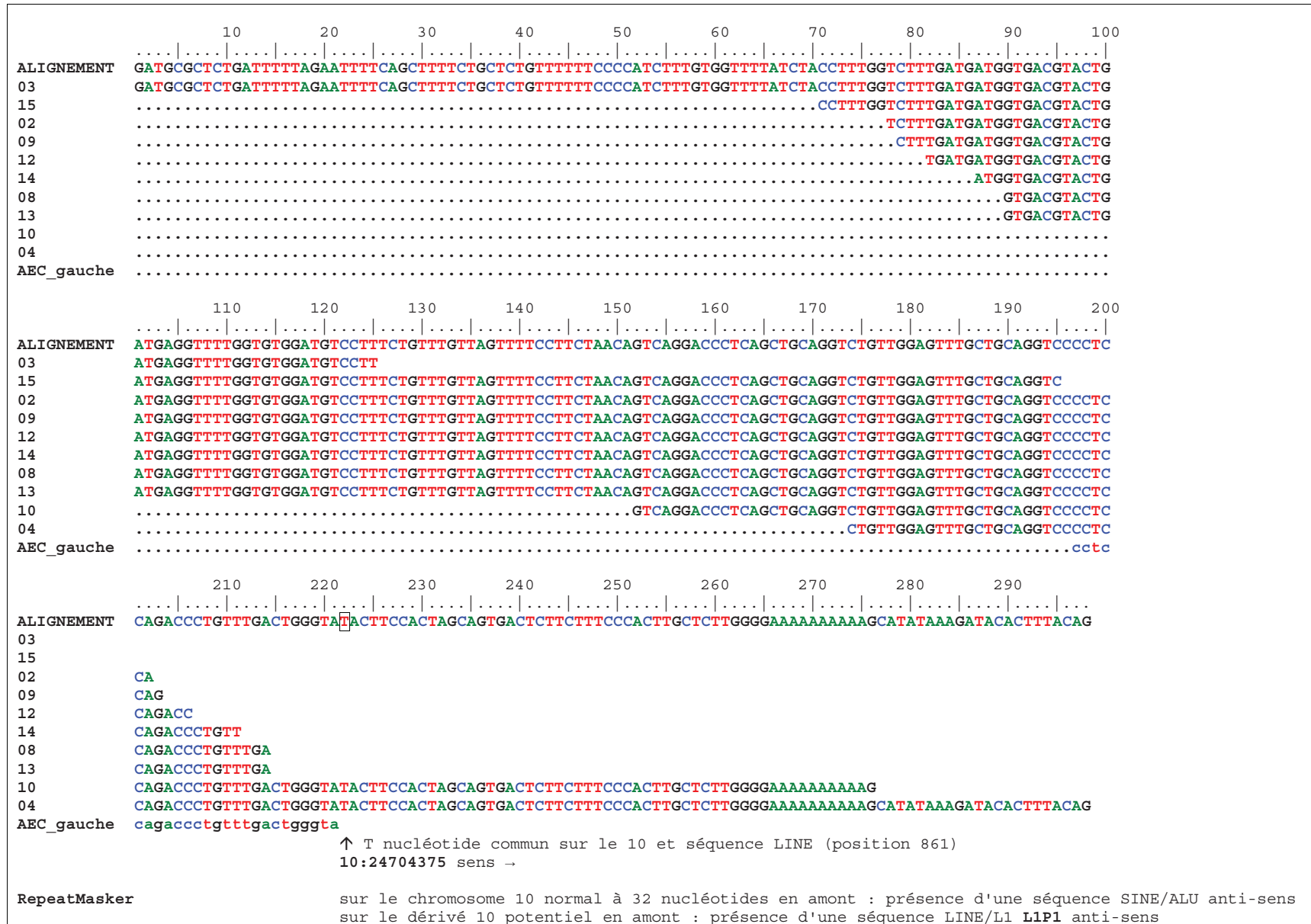


Figure 105 : Alignement des séquences SNL à partir de l'analyse ELAND correspondant au deuxième point de cassure chromosomique hypothétique sur le chromosome 10 (en haut : séquence complète résultant de l'alignement des 10 séquences SNL)

```
GATGCGCTCTGATTTTTAGAAATTTTCAGCTTTTCTGCTCTGTTTTTTTCCCCATCTTTGTGGT
TTTATCTACCTTTGGTCTTTGATGATGGTGACGTACTGATGAGGTTTTGGTGTGGATGTCCT
TTCTGTTTTGTTAGTTTTTCTTCTAACAGTCAGGACCCTCAGCTGCAGGTCTGTTGGAGTTTG
CTGCAGGTCCCCTCCAGACCCTGTTTACTGGGTAT_ACTTCCACTAGCAGTGACTCTTCTT
TCCCCTTGCTCTTGGGGAAAAAAAAAAGCATATAAAGATACACTTTACAG
```

Figure 106 : Séquence reconstituée à partir des SNL au niveau de la région 10:24704355 (longueur de 298pb) chez Patient 11 (_ point de cassure)

Cette séquence correspond, avant le point de cassure, c'est-à-dire du nucléotide 1 au 222^{ème}, à une séquence répétée identifiée comme étant une séquence LINE de sous-type L1P1 qui n'est pas normalement retrouvée dans cette région du chromosome 10. En effet, la séquence normalement présente en amont à environ 32 nucléotides de la position 10:24704375 est de type SINE/ALU.

La comparaison BLAT de cette séquence reconstituée ne donnant aucune identité à 100 % avec la séquence humaine de référence, nous avons donc émis l'hypothèse que cette séquence LINE pourrait provenir d'une région non séquencée probablement du chromosome 5.

En conclusion, nous avons identifié sur les chromosomes 1 et 10 deux points de cassure hypothétiques pouvant correspondre à l'autre versant de ceux déjà identifiés dans cette région. De plus, nous avons reconstitué une séquence L1P1 au niveau du point de cassure hypothétique. Cette séquence reconstituée commune de 449pb est représentée sur la Figure 107. Nous avons ainsi observé une séquence dupliquée ATACC de part et d'autre du point de cassure dans la séquence LINE de sous-type L1P1. Lors d'une recherche d'homologie avec 100 % d'identité avec BLAT, nous n'avons pas identifié de région chromosomique spécifique. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'une région non séquencée du chromosome 5. en fonction de l'organisation des différents dérivés, nous émettons l'hypothèse que le point de cassure non identifié dans la région chromosomique du chromosome 5 impliqué dans le dérivé 10 serait localisé entre les nucléotides 111271522 et 119112457.

```

GAGTAATGGTTCTCCCAGCACAGAGTTTGAGATCTCAGAATGGACAGACAGCCTCCTCAAGT
GGGTCAGTATTCCCAGTAGCCTAACTAGGAGACACCACCCAGTAGGGCCAGACTGATACC
TCACAGGGCCGGGTACCCCTCTGAGACGAAGCTTTCAAAGGAACGATCAGGCAGCAACATTT
GCTGTTTCTGAGTACTACTGTTCTGCAGCCTCCGCTGCTGATACCAGTCAAACAGGGTCT
GGAGGGGACCTGCAGCAAACCTCCAACAGACCTGCAGCTGAGGGTCCCTGACTGTTAGAAGGAA
AACTAACAAACAGAAAGGACATCCACACCAAACCTCATCAGTACGTCACCATCATCAAAGA
CCAAAGGTAGATAAAACCACAAAGATGGGGAAAAAACAGAGCAGAAAAGCTGAAAATTCTAA
AAATCAGAGCGCATC

```

Figure 107 : Séquence reconstituée au niveau des points de cassure hypothétiques dans la séquence LINE de sous-type L1P1 (sens 5' → 3') chez le Patient 11 (ATACC séquence dupliquée située de part et d'autre du point de cassure)

L'hypothèse que nous avons faite afin de pouvoir reconstituer l'ensemble des dérivés est décrite sur la Figure 108. Nous avons suggéré qu'un point de cassure, localisé dans une séquence LINE L1P1, sur le chromosome 5 est relié au chromosome 1 en 1:241883302 et au chromosome 10 en 10:24704375.

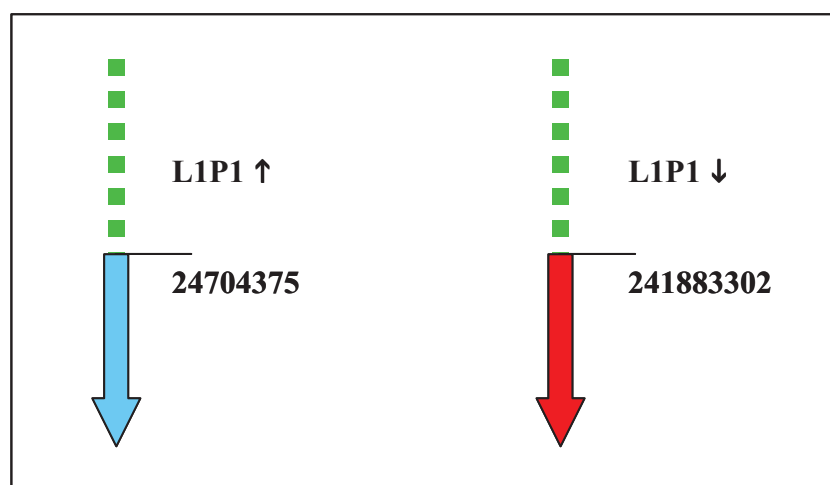


Figure 108 : Représentation des jonctions entre les séquences LINE L1P1 du chromosome 5 (vert) et les chromosomes 1 (rouge) et 10 (bleu) chez le Patient 11. (la flèche noire indique le sens 5' → 3' de la séquence L1P1, la flèche colorée indique le sens de la séquence par rapport à la séquence génomique de référence)

- Conclusion :

Après l'analyse du WGS, nous avons aussi suspecté une délétion du chromosome 1 entre le nucléotide 241809628 et 241811482 (cf. Figure 109). Nous avons ré-analysé l'ACPA de cet enfant pour rechercher ce déséquilibre qui n'est pas observé de façon franche (seuls 2 marqueurs sont en délétion mais la région est peu couverte d'autant plus qu'il n'y a pas de gène). Malgré tout, nous nous sommes appuyés sur cette perte de matériel chromosomique pour compléter nos hypothèses de réorganisation des régions chromosomiques pour chacun

des dérivés qui sont représentés dans la Figure 110. Cependant, aucune hypothèse n'a pu être démontrée par FISH du fait d'un manque de matériel cytogénétique, l'enfant étant décédé dans ses 1^{ers} mois de vie. L'étude de ce patient confirme les difficultés d'interprétation des résultats de WGS et la nécessité de les compléter par d'autres techniques (cf. § 2.3 du chapitre Discussion).

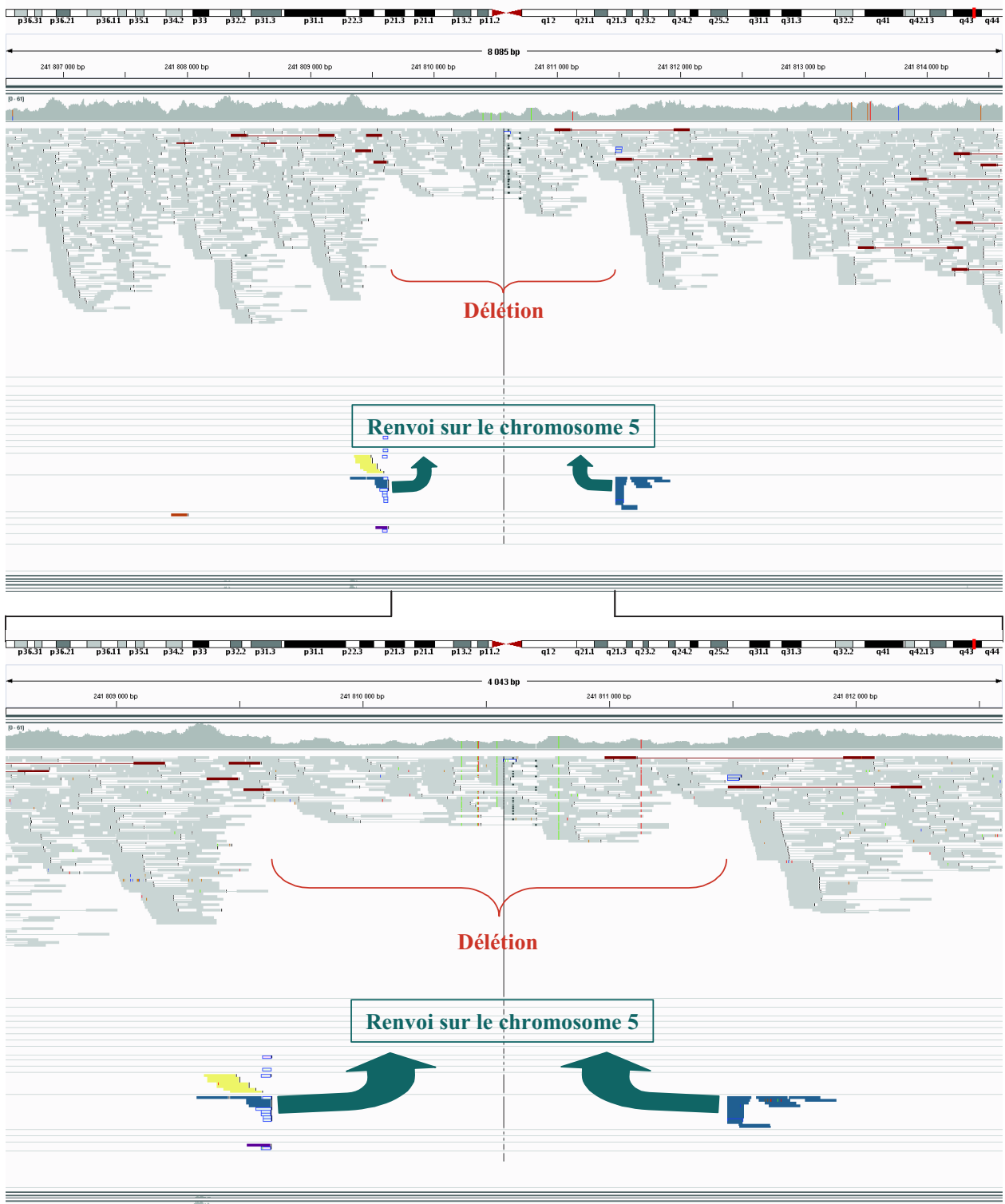


Figure 109 : Représentation de la délétion 1:241809628-241811482 (taille : 1,8kb) dans le logiciel IGV chez le Patient 11

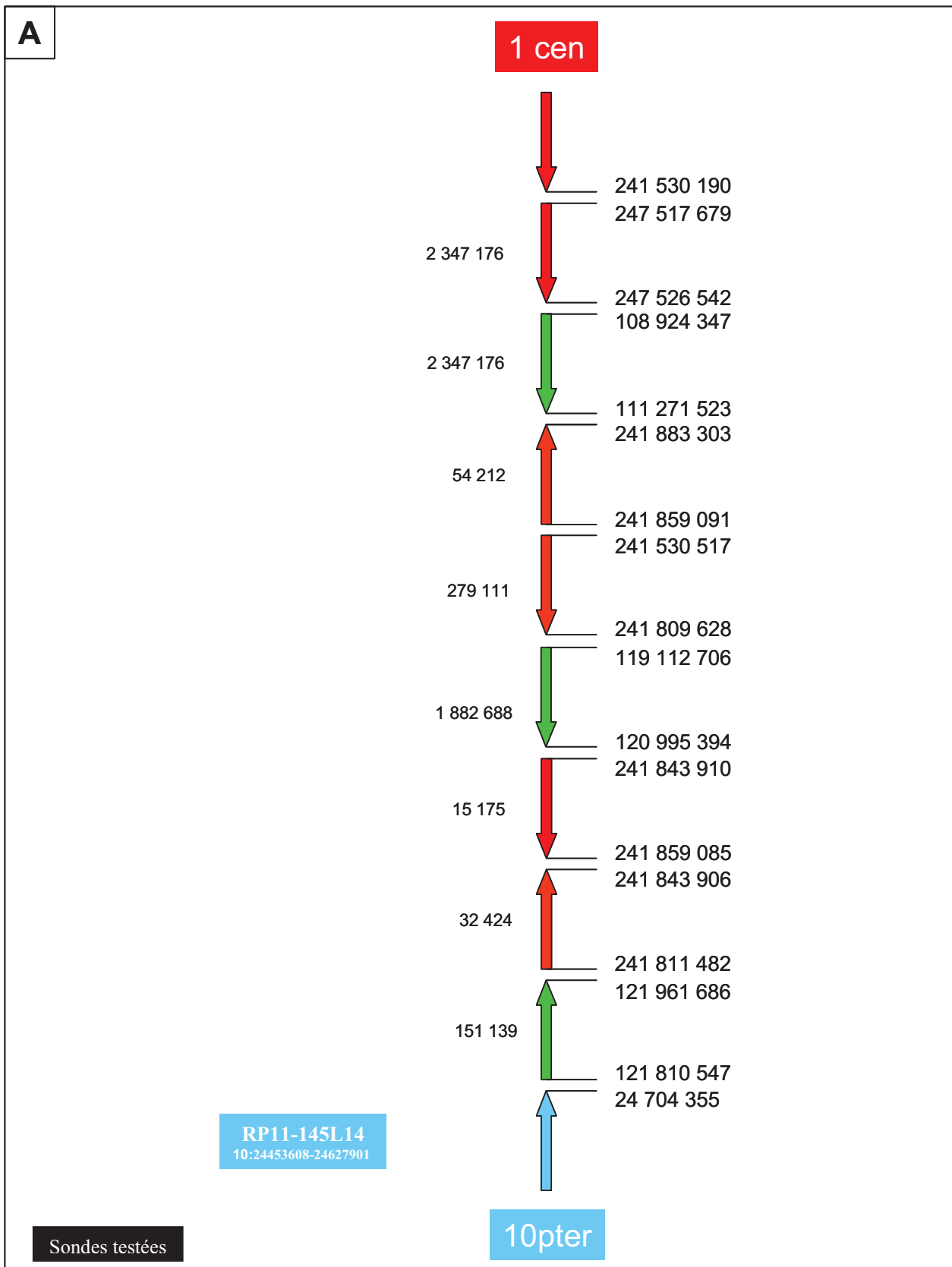


Figure 110 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 1q, 5q et 10p sur les dérivé 1, 5 et 10 **A** Dérivé 1 (A gauche : taille des segments remaniés / A droite : position nucléotidique des points de cassure chromosomiques)

Séquences : █ chromosome 1 █ chromosome 5 █ chromosome 10

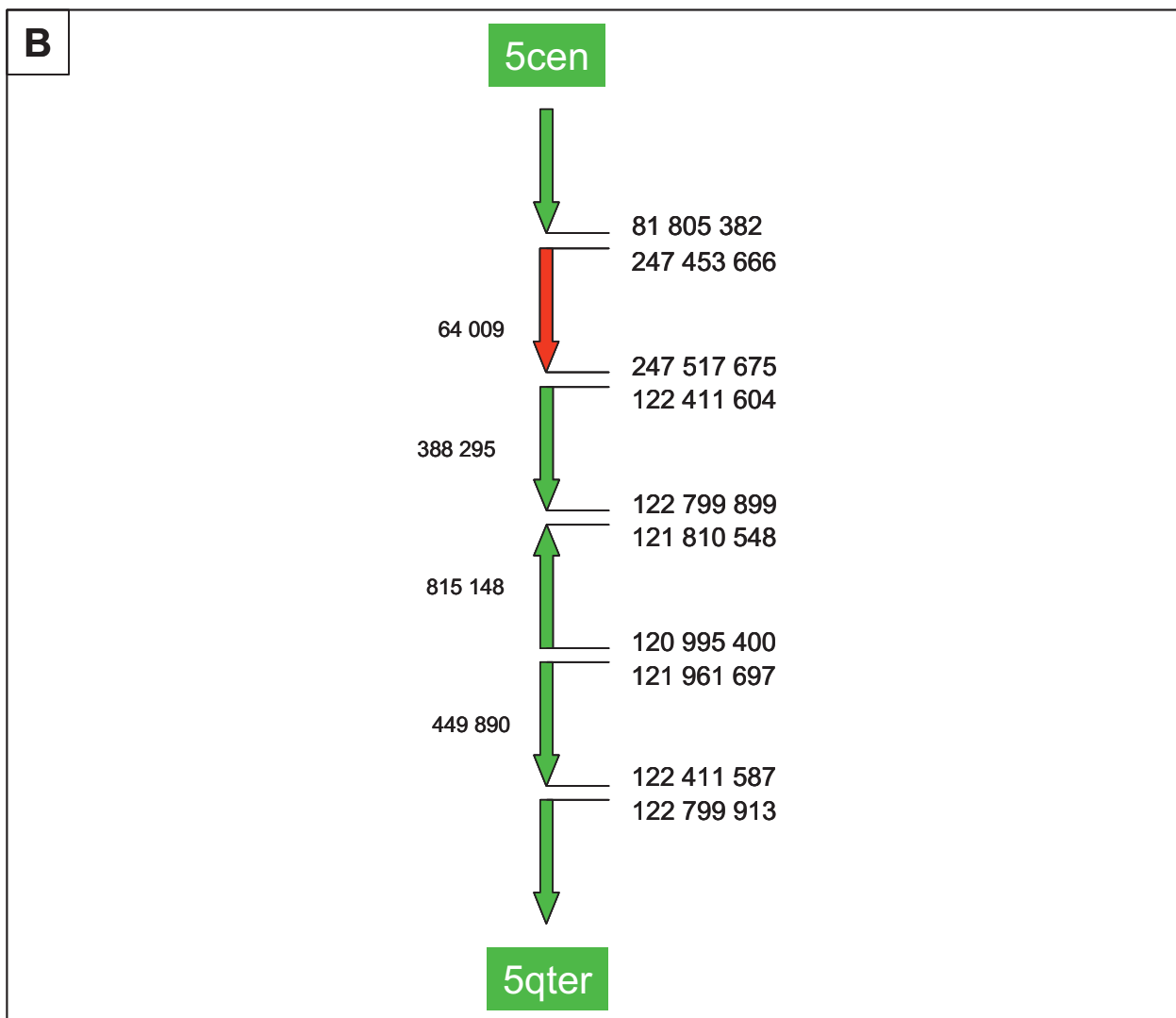


Figure 110 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 1q, 5q et 10p sur les dérivé 1, 5 et 10

B- Dérivé 5

A gauche : taille des segments remaniés

A droite : position nucléotidique des points de cassure chromosomiques

— Séquences du chromosome 1

— Séquences du chromosome 5

— Séquences du chromosome 10

Sondes testées

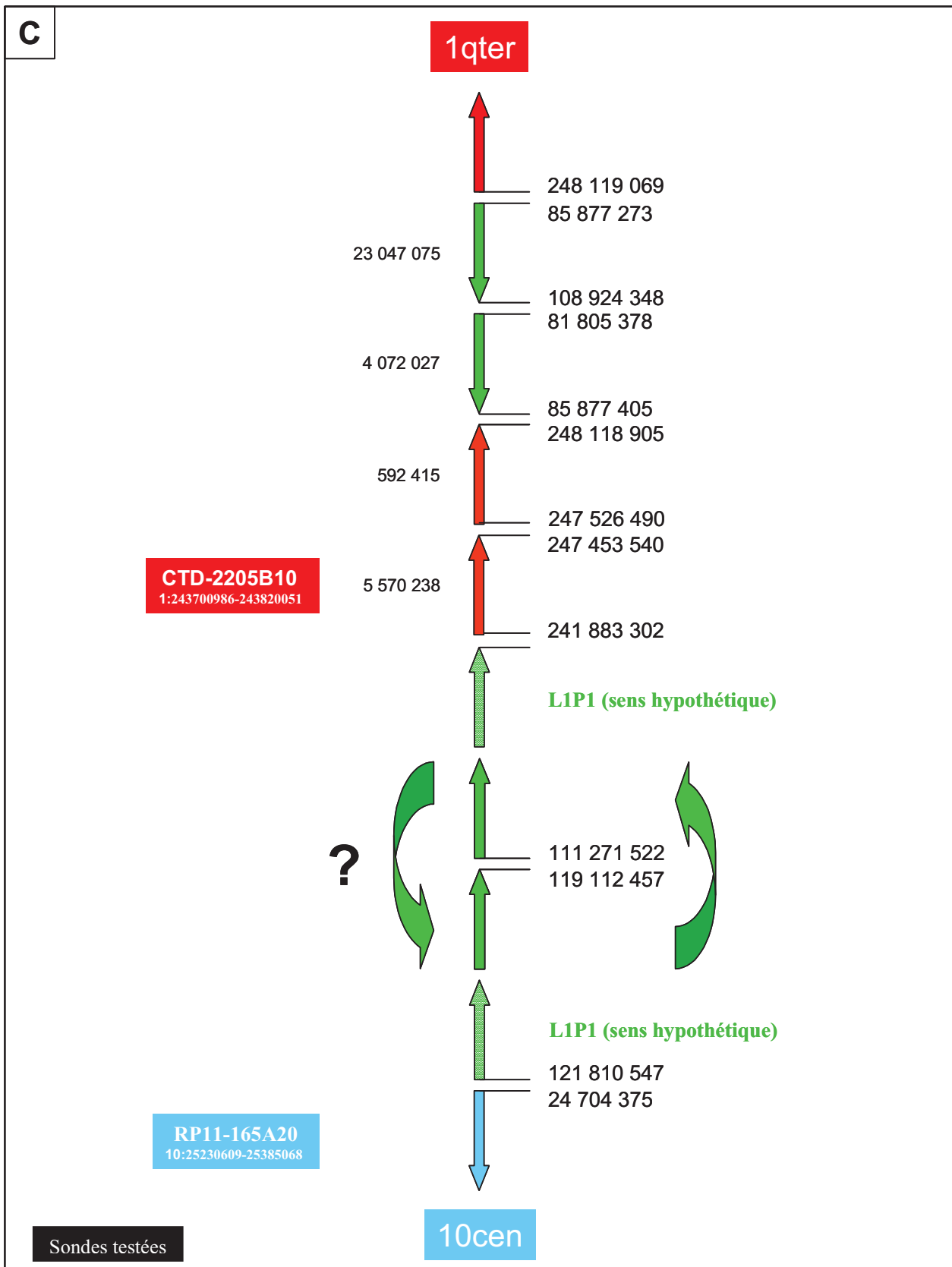


Figure 110 : Hypothèse de l'organisation des régions chromosomiques 1q, 5q et 10p sur les dérivé 1, 5 et 10 **C** Dérivé 10 (A gauche : taille des segments remaniés / A droite : position nucléotidique des points de cassure chromosomiques)

Séquences : — chromosome 1 — chromosome 5 — chromosome 10

Ainsi, les données du séquençage haut débit suggèrent une alternance entre les régions 1q et 5q dans le bras long du dérivé 1, sur le bras long du dérivé 5 et sur le bras court du dérivé 10, avec de nombreux points de cassure localisés dans les régions 1q43, 5q14.2, 5q14.3, 5q22.1, 5q23.1, 5q23.2 et 10p12.1. Ces observations sont en faveur d'un *chromothripsis* chez le Patient 11. Comme nous l'avons précisé chez le Patient 10, la complexification des RCC (identifié grâce au WGS chez le Patient 11) est retrouvée jusque dans 90 % des cas (Feenstra I, et al. 2011) et se manifesterait aussi sous forme d'un *chromothripsis* chez le Patient 11. Les conséquences de cette réorganisation complexe des régions chromosomiques sont développées ci-dessous.

Cependant, nous ne pouvons exclure l'éventuel rôle, pour expliquer la clinique du Patient 11, d'un gène interrompu suite aux divers remaniements observés. Plusieurs gènes ont ainsi identifiés : (i) en 1q43, *WDR64* (WD Repeat Domain 64), *OPN3* (Opsin 3), et *OR2L13* (Olfactory Receptor, Family 2, Subfamily L, Member 13), (ii) sur le chromosome 5 *KTR18P42* et *NREP* (Neuronal Regeneration Related Protein), et (iii) en 10p12.1, *CTC-210G5*, *CCDS411496*, *CCDS31165*, *CCDS60502*, *CCDS60501* et *KIAA1217*.

Après consultation des bases de données, aucune information sur les gènes *WDR64*, *KTR18P42*, *NREP*, *CTC-210G5*, *CCDS411496*, *CCDS31165*, *CCDS60502*, *CCDS60501* et *KIAA1217* permettant d'expliquer le phénotype du Patient 11 n'a pu être retrouvée avec les connaissances actuelles. Leur rôle reste donc encore à définir. Pour savoir si la perte de fonction de ces gènes pourrait être responsable de la clinique de cet enfant, des approches comme des études fonctionnelles sont nécessaires. Le séquençage de ces gènes chez des patients présentant le même phénotype dans le but retrouver des mutations délétères pourrait être aussi envisagé.

Le gène *OR2L13* a peu été étudié et seule l'équipe de Garcia-Esparcia P rapporte son implication chez des malades atteints de la maladie de Parkinson (Garcia-Esparcia P, et al. 2013), ce qui est éloigné du phénotype décrit chez le Patient 11.

OPN3 appelé aussi encephalopsin ou panopsin (Halford S, et al. 2001) appartient à la sous-famille des encephalopsin/tmt-opsin de la famille des opsines. Cette famille de gènes est connue pour servir de médiateur de la phototransduction dans le système visuel ainsi que dans le non-visuel (Terakita A. 2005). Le gène *OPN3* est fortement exprimé dans le cerveau, les testicules et la rétine (Halford S, et al. 2001 ; Blackshaw S et SH Snyder. 1999) de même que dans les cellules épidermiques (Haltaufderhyde K, et al. 2015). Son rôle n'est pas clairement

défini même si ce gène semble être impliqué dans le rythme circadien ou la régulation de la production de mélatonine pinéale (Kasper G, et al 2002 ; White JH, et al. 2008). Ainsi, l'interruption de ce gène ne semblerait pas être impliquée dans le phénotype décrit chez le Patient 11, sachant que celui-ci est décédé dans les 1ers mois de vie et que nous n'avons pas de recul quant à son évolution clinique.

Nous suggérons donc plusieurs hypothèses pour expliquer la symptomatologie du Patient 11 par rapport à son remaniement chromosomique :

1- Le RCC diagnostiqué suite aux résultats obtenus par WGS met en évidence de multiples remaniements pouvant être responsables de l'interruption d'un ou plusieurs gènes expliquant le phénotype. Cependant, une revue de la littérature sur l'ensemble des gènes localisés au niveau des différents points de cassure ne semble pas suggérer l'implication de ces gènes.

2- Le *chromothripsis* : La réorganisation de l'architecture des régions chromosomiques impliquées pourrait rendre l'environnement chromatinien défavorable à l'expression de certains gènes par un effet de position. Cette hypothèse paraît être la plus probable au vu des résultats obtenus.

5.5.2 Patiente 12

La confrontation des divers résultats obtenus à partir des différentes techniques mises en œuvre chez cette enfant nous a permis de choisir les amorces, dont les séquences nucléotidiques sont indiquées dans l'Annexe 8, afin de préciser les points de cassure de la translocation t(4;7).

Le séquençage type Sanger identifie les points de cassure en 160342580bp sur le chromosome 4 et en 5366361bp sur le chromosome 7 avec un nucléotide en commun (G ou C) et une délétion de 7 nucléotides CGGTAGG entre deux C sur le chromosome 7. Aucun gène n'est retrouvé interrompu. De ce fait, l'existence d'une mutation génique ailleurs dans le génome pourrait être évoquée.

5.6 Conclusion

Les résultats du WGS nous ont permis de mettre en évidence un *chromothripsis* à la fois chez le Patient 10, chez lequel l'Array-Painting suggérait un remaniement plus complexe que le RCC initialement identifié, et chez le Patient 11, chez lequel un réarrangement simple de type

translocation réciproque avait été observé à l'origine de ce travail. Par ailleurs, cette technologie permet d'infirmier ce type de réorganisation des régions chromosomiques chez la Patiente 1, même si le WGS a montré que la délétion préalablement détectée sur puces à ADN était plus complexe. La place de l'ACPA devant un remaniement apparemment équilibré associé à des signes cliniques est donc évoquée dans le chapitre Discussion.

La mise en œuvre du séquençage haut débit chez ces différents patients a montré la complexité dans l'interprétation des données obtenues, ce qui nous amène à discuter de la nécessité de combiner plusieurs techniques et analyses pour une bonne interprétation des résultats (§ 2 du chapitre Discussion).

6- RÉSULTATS DES TECHNIQUES D'EXPRESSION MISES EN ŒUVRE POUR CONFIRMER NOS HYPOTHÈSES DIAGNOSTIQUES

Au fur et à mesure de l'avancée de ce travail, plusieurs hypothèses diagnostiques ont été posées :

- 1- L'implication des gènes *KIF1A* et *SLC9A6* dans le phénotype du Patient 5 n'est pas prouvée. Dans ce contexte, nous avons recherché une variation de l'expression de ces gènes.
- 2- L'hypothèse d'un gène de fusion *EPHA6-AUTS2* et/ou *AUTS2-EPHA6* a été évoquée chez le Patient 6. De ce fait, nous avons non seulement recherché la présence de ces gènes de fusion mais aussi vérifié que l'interruption de *AUTS2* induisait une diminution de l'expression de ce gène.
- 3- Les résultats de l'Array-Painting chez la Patiente 7 montrent un point de cassure à environ 148kb en 5' de *MEF2C* sur le chromosome 5. Au vu des données de la littérature sur ce gène, nous suggérons qu'un effet de position induisant une dérégulation de *MEF2C* serait responsable du phénotype de cette enfant.

Les amorces utilisées pour l'étude de l'expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22* (Ribosomal Protein L22), *RPL27* (Ribosomal Protein L29) et *RPS29* (Ribosomal Protein S29), utilisées chez les Patients 5, 6 et 7, sont dans le Tableau VIII. Leurs séquences nucléotidiques sont répertoriées dans l'Annexe 8.

Gènes de référence	Couples	Nom de l'amorce
Beta-2-Microglobuline	Couple 1	B2-microglo-F
		B2-microglo-R
RPL22	Couple 1	RPL22-expr-F
		RPL22-expr-R
RPL27	Couple 1	RPL27-expr-F
		RPL27-expr-R
RPS29	Couple 1	RPS29-expr-F
		RPS29-expr-R

Tableau VIII : Couples d'amorces utilisés pour étudier l'expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22*, *RPL27* et *RPS29* chez les Patients 5, 6 et 7

6.1 Patient 5

L'étude de l'expression des gènes *KIF1A* et *SLC9A6* a été réalisée dans une lignée cellulaire immortalisée pour *KIF1A*, et suite à un prélèvement sanguin pour *SLC9A6*, après avoir vérifié la faisabilité de ces analyses dans les sources cellulaires disponibles pour chacun des gènes.

6.1.1 Expression du gène *KIF1A*

Malgré le test de plusieurs couples d'amorces (cf. Tableau IX et Annexe 8), aucune amplification du gène *KIF1A* n'a été visualisée après la RT-PCR (cf. Figure 111), et ce bien que ce gène semblait être exprimé dans les lignées cellulaires immortalisées.

Couples	Nom de l'amorce
Couple 1	P5-qPCR1-S
	P5-qPCR1-AS
Couple 2	P5-qPCR2-S
	P5-qPCR2-AS
Couple 3	P5-qPCR3-S
	P5-qPCR3-AS
Couple 4	P5-qPCR4-S
	P5-qPCR4-AS
Couple 5	P5-qPCR5-S
	P5-qPCR5-AS

Tableau IX : Couples d'amorces utilisés pour étudier l'expression de *KIF1A* chez le Patient 5

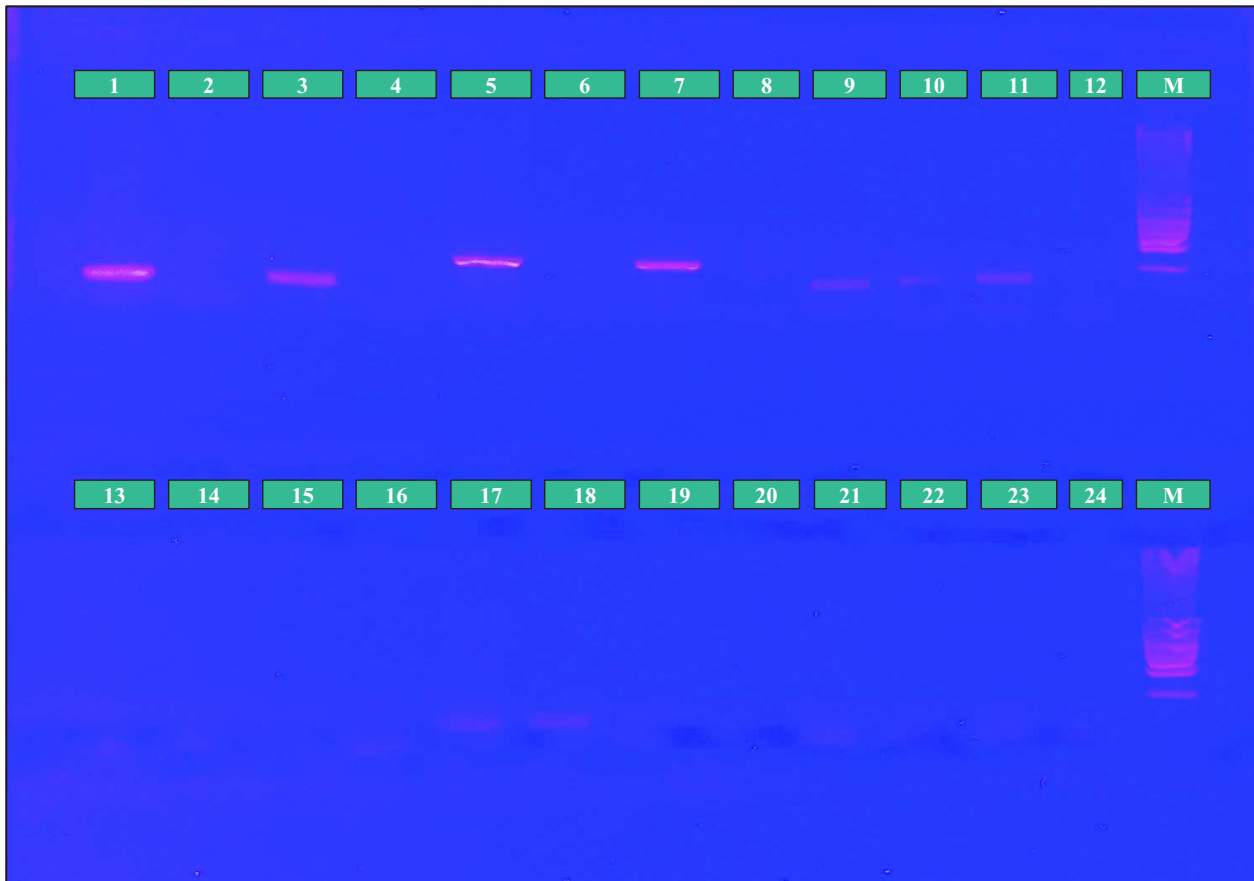


Figure 111 : Gel d'agarose à 1 % des produits de RT-PCR pour rechercher une expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22*, et *RPL27* et du gène *KIF1A* pour les couples d'amorces 1, 2 et 3 dans une lignée cellulaire immortalisée chez le Patient 5

M : Marqueur de taille

1 à 4 : *Beta-2-Microglobulin* (**2 et 4** : témoin négatif / **1** : cDNA non dilué / **3** : cDNA dilué au 1/5^{ème})

5 à 8 : *RPL22* (**6 et 8** : témoin négatif / **5** : cDNA non dilué / **7** : cDNA dilué au 1/5^{ème})

9 à 12 : *RPL27* (**10 et 12** : témoin négatif / **9** : cDNA non dilué / **11** : cDNA dilué au 1/5^{ème})

13 à 24: *KIF1A*

* **14, 16, 18, 20, 22 et 24** : témoin négatif

* **13, 14, 15 et 16** : Couple d'amorces 1 (**13** : cDNA non dilué / **15** : cDNA dilué au 1/5^{ème})

* **17, 18, 19 et 20**, : Couple d'amorces 2 (**17** : cDNA non dilué / **19** : cDNA dilué au 1/5^{ème})

* **21, 22, 23 et 24** : Couple d'amorces 3 (**21** : cDNA non dilué / **24** : cDNA dilué au 1/5^{ème})

6.1.2 Expression du gène *SLC9A6*

L'étude, réalisée par l'équipe du Dr Amélie Piton, de la conséquence de la délétion/insertion sur l'expression du gène *SLC9A6* ne montre pas de modification dans le profil de migration des produits obtenus après RT-PCR (cf. Figure 112).

Ce résultat n'est pas en faveur du rôle de la variation observée (cf. § du chapitre Résultat) dans le gène *SLC9A6* pour expliquer le phénotype du Patient 5.

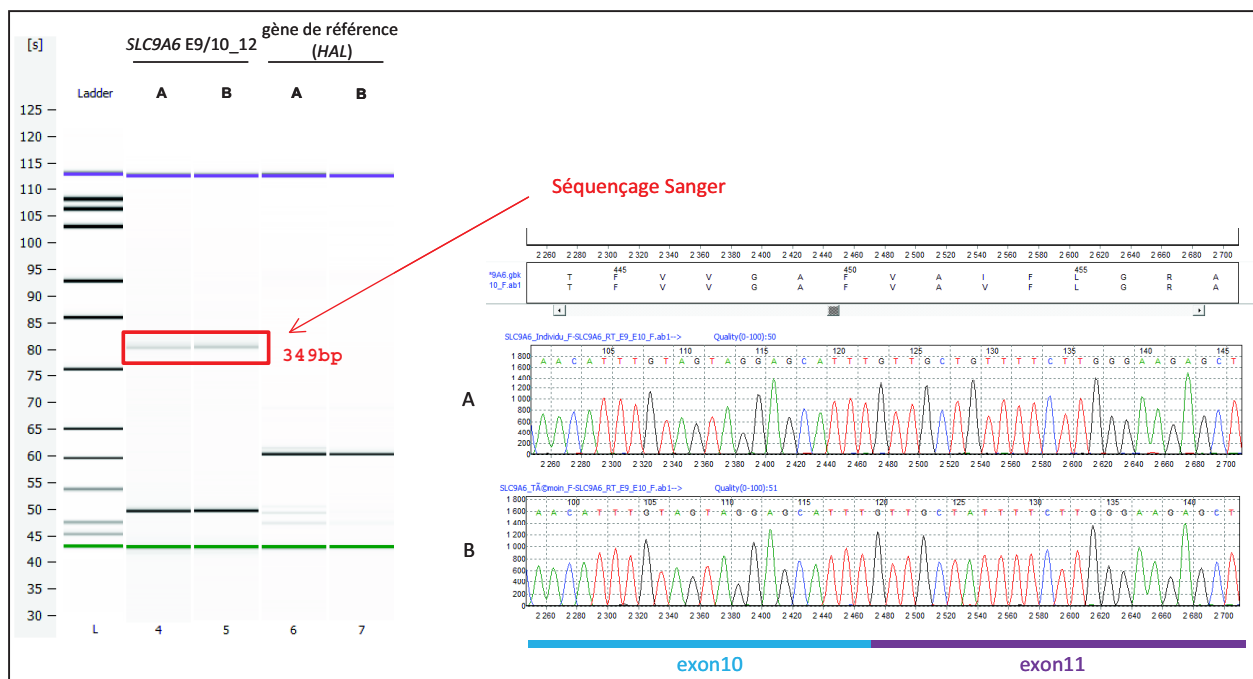


Figure 112 : Profil de migration des produits de RT-PCR

A : Patient 5
 B : Contrôle
 HAL : Histidine Ammonia-Lyase

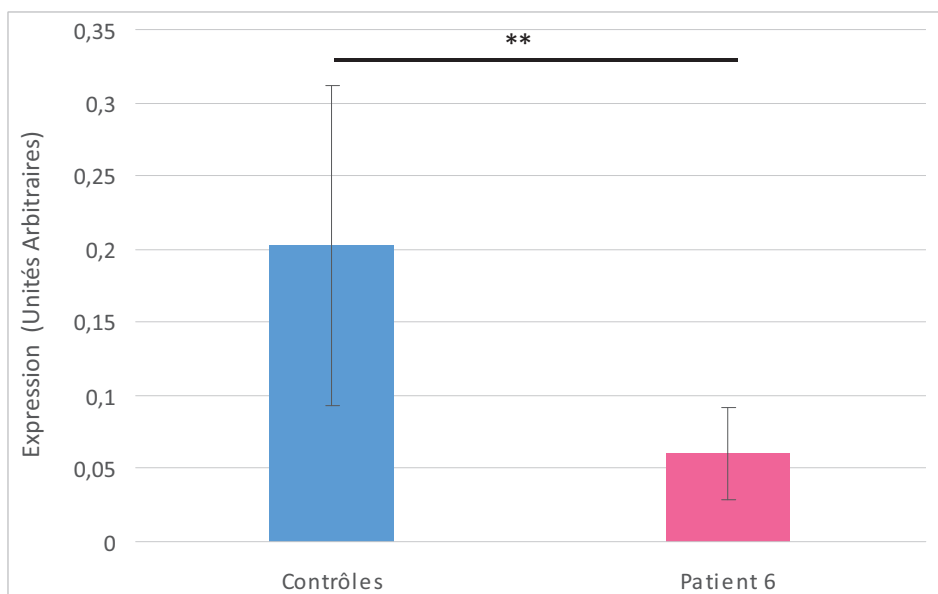
6.2 Patient 6

Après avoir vérifié que les gènes *AUTS2* et *EPHA6* étaient bien exprimés dans les lignées cellulaires immortalisées, des techniques de RT-PCR et RT-qPCR ont été mises en œuvre. Les amorces utilisées, non seulement pour l'étude de l'expression du gène *AUTS2* mais aussi pour la recherche des gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* et *AUTS2-EPHA6*, sont dans le Tableau X et leurs séquences nucléotidiques sont répertoriées dans l'Annexe 8.

La RT-qPCR montre une diminution de l'expression du gène *AUTS2* (cf. Graphique 1). La recherche d'éventuels gènes de fusion s'est révélée négative (cf. Figure 113).

Couples	Nom de l'amorce
Couple 2	EPHA6-ex1-S
	AUTS2-ex7-AS
Couple 3	AUTS2-ex4-S
	EPHA6-ex3-AS

Tableau X : Couples d'amorces utilisés pour étudier l'expression de *AUTS2* et rechercher des gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* et *AUTS2-EPHA6* chez le Patient 6



Graphique 1 : Représentation de la diminution de l'expression du gène *AUTS2* chez le Patient 6 (n (échantillons) = 3 - 9, ** : $p < 0,01$, Welch Two Sample t-test)

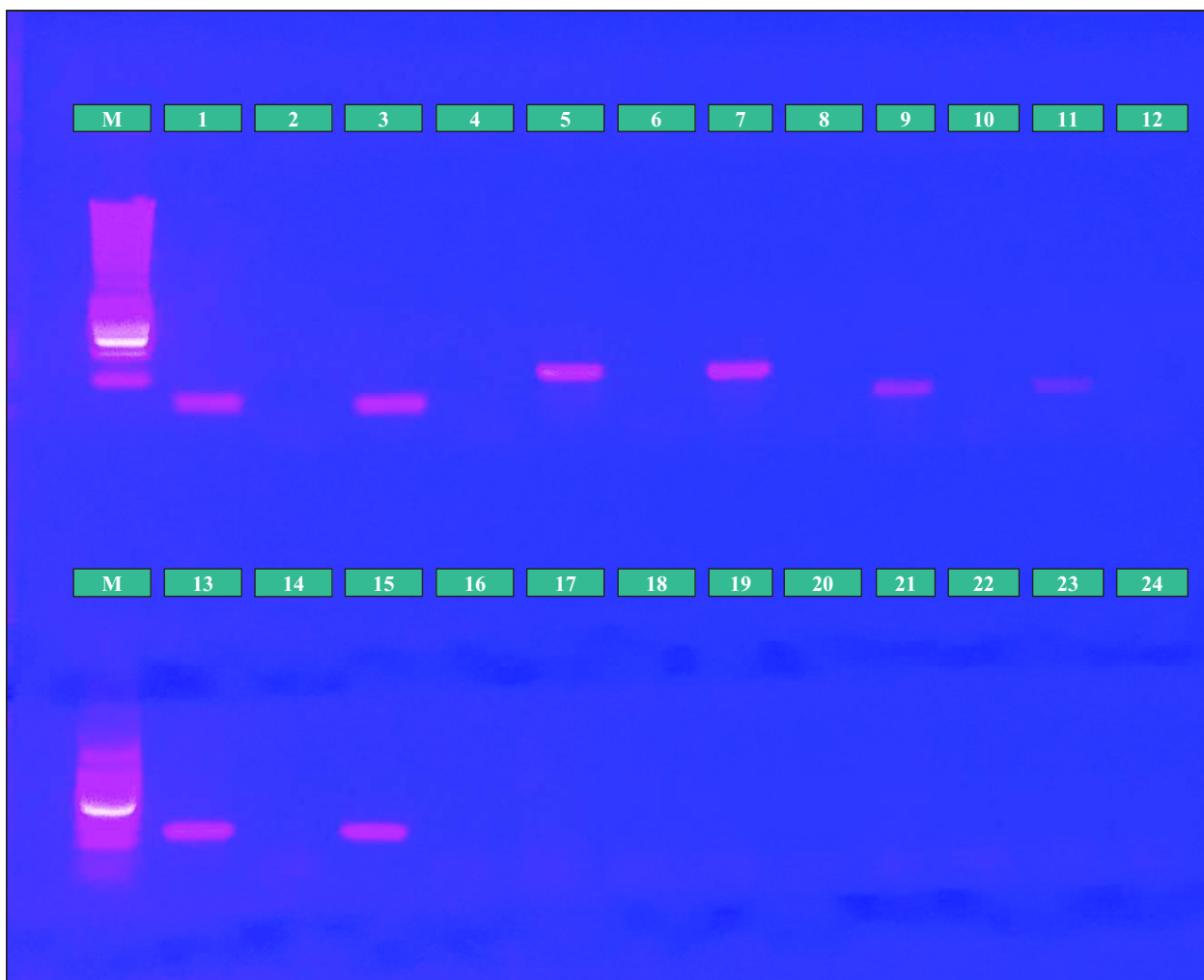


Figure 113 : Gel d'agarose à 1% des produits de RT-PCR pour rechercher une expression des gènes de référence *Beta-2-Microglobulin*, *RPL22*, *RPL27* et *RPS29* ainsi que d'éventuels gènes de fusion *EPHA6-AUTS2* et *AUTS2-EPHA6* dans une lignée cellulaire immortalisée chez le Patient 6

M : Marqueur de taille

1 à 4 : *Beta-2-Microglobulin* (**2 et 4** : témoin négatif / **1** : cDNA non dilué / **3** : cDNA dilué au $1/5^{\text{ème}}$)

5 à 8 : *RPL22* (**6 et 8** : témoin négatif / **5** : cDNA non dilué / **7** : cDNA dilué au $1/5^{\text{ème}}$)

9 à 12 : *RPL27* (**10 et 12** : témoin négatif / **9** : cDNA non dilué / **11** : cDNA dilué au $1/5^{\text{ème}}$)

13 à 16 : *RPS29* (**14 et 16** : témoin négatif / **13** : cDNA non dilué / **15** : cDNA dilué au $1/5^{\text{ème}}$)

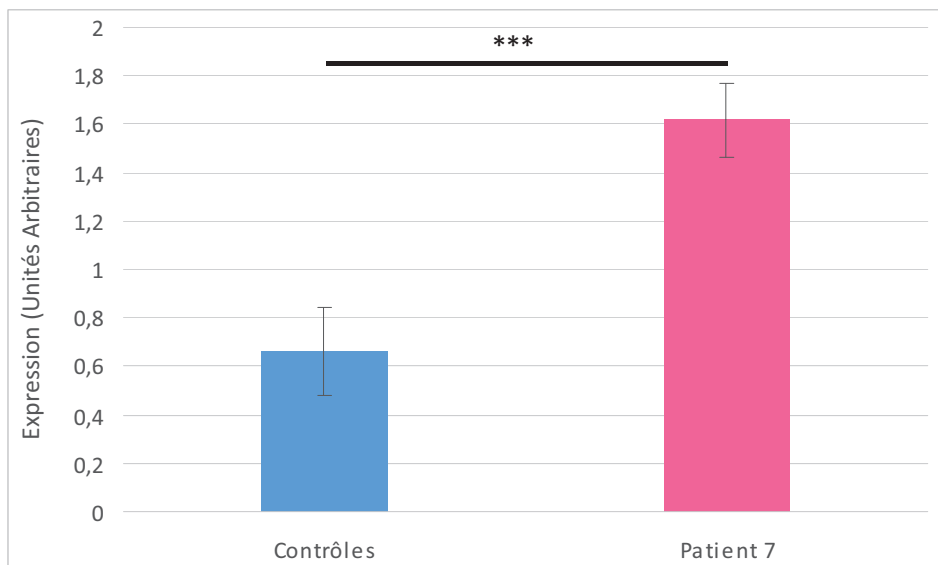
17 à 20 : *EPHA6-AUTS2* (**18 et 20** : témoin négatif / **17** : cDNA non dilué / **19** : cDNA dilué au $1/5^{\text{ème}}$)

21 à 24 : *AUTS2-EPHA6* (**22 et 24** : témoin négatif / **21** : cDNA non dilué / **23** : cDNA dilué au $1/5^{\text{ème}}$)

Nous pouvons donc conclure que l'interruption du gène *AUTS2* suite à la translocation t(3;7) du Patient 6 semble être responsable de son phénotype.

6.3 Patiente 7

La technique de RT-qPCR a été réalisée avec du couple d'amorces Mef2c-F et Mef2c-R, dont les séquences nucléotidiques sont répertoriées dans l'Annexe 8. L'étude de l'expression de *MEF2C* a été réalisée sur une lignée cellulaire immortalisée, après avoir vérifié l'expression de ce gène dans cette source de matériel. Ce gène est surexprimé chez la Patiente 7 par rapport aux témoins utilisés (cf. Graphique 2).



Graphique 2 : Représentation de la surexpression du gène *MEF2C* chez la Patiente 7 (n (échantillons) = 3 - 9, *** : $p < 0.01$, Welch Two Sample t-test)

Comme nous l'avons vu précédemment, 3 observations de la littérature suggèrent que la région génomique située entre 121,5 et 500kb (soit une région de 378,5kb) en amont de l'extrémité 5' du gène *MEF2C* est nécessaire à l'expression correcte de celui-ci. Les résultats de RT-qPCR nous ont permis de réduire légèrement la région dans laquelle l'élément régulateur serait localisé à 353,7kb (soit entre 147,3 et 500kb du codon d'initiation). Cet élément serait un répresseur. Si la pathogénicité de *MEF2C* en haplo-insuffisance n'est plus à prouver, l'inverse est peu décrit dans la littérature. En effet, seuls 3 patients ont été rapportés (Le Meur N, et al. 2010 ; Novara F, et al. 2013). Le signe clinique majeur décrit est une DI, observée chez la Patiente 7, qui est associée à une microcéphalie postnatale, qui n'est pas observée chez cette enfant.

A la suite de ces résultats, nous pouvons conclure que le point de cassure en 5' du gène *MEF2C* suite à la translocation t(3;5) de la Patiente 7 semble être responsable de ses signes cliniques. De plus, cette étude nous a permis de mettre en évidence un élément de régulation négatif de *MEF2C* localisé dans la région entre 147,3 et 500kb du codon d'initiation.

6.4 Conclusion

L'approche par qPCR pour confirmer nos hypothèses diagnostiques a permis de montrer la diminution de l'expression du gène *AUTS2* chez le Patient 6, comme nous l'avions supposé, ainsi que de réduire la région dans laquelle se situe un élément régulateur du gène *MEF2C* chez la Patiente 7. Par ailleurs, nous avons pu déterminer que cet élément régulateur avait un rôle de répresseur puisqu'une disruption entre celui-ci et *MEF2C* provoque la surexpression de ce gène chez cette enfant.

Cependant, cette technique n'a pas pu nous aider dans l'orientation du diagnostic chez le Patient 5. En effet, aucune amplification n'a été mise en évidence avec les différents couples d'amorces testés. La probabilité d'une expression insuffisante du gène *KIF1A* dans les lignées cellulaires immortalisées pourrait expliquer cette absence de résultat.

7- CONCLUSION

Au total, nous avons étudié 12 patients parmi lesquels seuls 3 d'entre eux (Patients 1, 2 et 3) présentent un déséquilibre à l'ACPA considéré comme responsable du phénotype (avec les connaissances actuelles).

Parmi les 9 patients restants, l'interruption d'un ou deux gènes est suspectée ou identifiée chez seulement 3 patients (Patients 5, 6 et 10). Chez les Patients 4, 7, 8, 9, 11 et 12, les résultats obtenus laissent suspecter une autre étiologie :

- un effet de position ou la présence d'un élément régulateur à distance (Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998), comme nous l'avons démontré chez les Patientes 7 et 9 ;
- une modification d'une région soumise à empreinte (Conroy JM, et al. 1997), que nous avons éliminée chez l'ensemble des patients de notre cohorte ;

- une mutation dans un autre gène (Schluth-Bolard C, et al. 2009), que nous suspectons pour les Patients 4, 8 et 12 ;

- ou enfin, une cause non génétique, c'est-à-dire environnementale ou accidentelle.

Par ailleurs, il semblerait que la combinaison de plusieurs mécanismes puisse expliquer le phénotype des Patients 10 et 11, du fait de leur *chromothripsis*.

Une synthèse des résultats obtenus est schématisée sur la Figure 114 et le tableau XI ci-dessous.

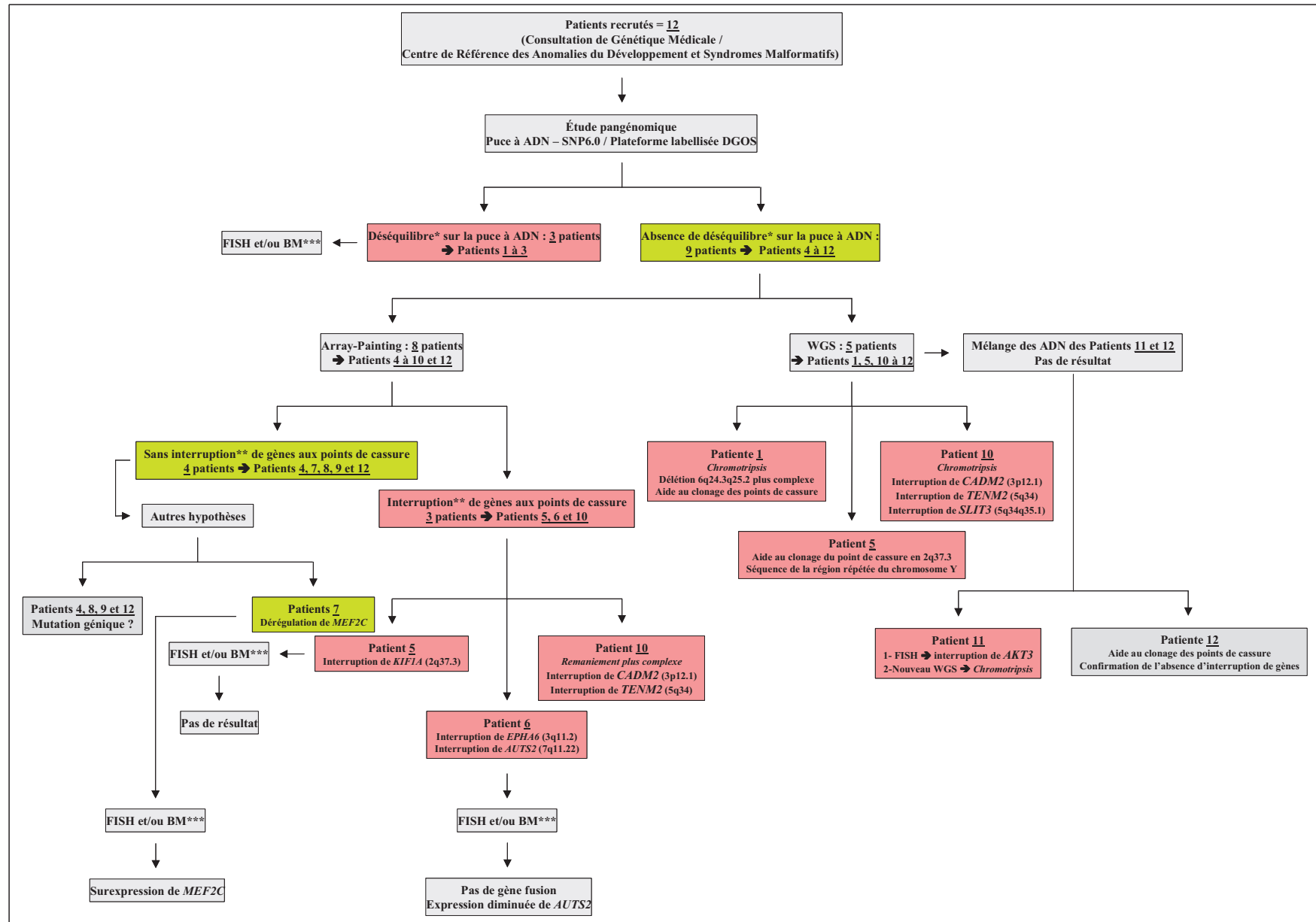


Figure 114 : Synthèse des résultats obtenus après ACPA, Array-Painting et WGS (* Déséquilibre considéré comme responsable du phénotype, ** Interruption d'un gène potentiellement responsable du phénotype, *** BM : Biologie Moléculaire

Anomalie identifiée (rouge)
Absence d'anomalie identifiée (vert)

Patients	Phénotype					Translocations <i>de novo</i>	Techniques mises en œuvre				Résultats
	RCIU	DI	Troubles (neuro)musculaires	Retard de croissance staturo-pondéral	Malformations		ACPA	MCF	AP	WGS	
1	?	+		+	Insuffisance pulmonaire Malformations cardiaques	t(4;9)(q27;p23),t(7;8)(q31.3;p11.2)	✓			✓	del(6)(q25.1q25.1)
2	-	+	Dyspraxie Dyskinésie Hypotonie	+	Souffle cardiaque Strabisme sur amblyopie	t(5;14)(q21;q22)	✓				del(14)(q22.1q22.2)
3	-	+		-		t(4;5)(p15.1;p14.3)	✓				del(4)(p15.1p15.1),del(5)(p14.3p14.3)
4	-	+	Dyspraxie Hypertonie	-		t(2;11)(q32;p14)	✓		✓		Pas d'interruption de gène
5	-	+	Ataxie Dystonie Epilepsie	-	Cyphoscoliose	t(Y;2)(q11.2;q37)	✓		✓	✓	Interruption de <i>KIF1A</i> *
6	-	+	Epilepsie	-	Troubles ophtalmiques Microcéphalie post-natale	t(3;7)(q11.2;q11.22)	✓		✓		Interruption de <i>EPHA6</i> et <i>AUTS2</i> *
7	-	+		-		t(3;5)(p26;q13.3)	✓		✓		Pas d'interruption de gène**
8	-	+		-		t(1;14)(q44;q32.2)	✓		✓		Interruption de <i>KIAA140</i>
9	-	+		-	Lésions cutanées	t(X;16)(p21.1;q11.2)	✓		✓		Pas d'interruption de gène
10	-	+	Dyspraxie Discrète ataxie Hypotonie globale Troubles pyramidaux	-		t(3;15;5)(p11;q2?5;q23)	✓	✓	✓	✓	Interruption de <i>CCDS54614</i> , <i>LINC00971</i> , <i>SLIT3</i> , <i>TENM2</i> * et <i>CADM2</i> * Chromothrypsis
11	-	?		+	Malformations cardiaques Malformations cérébrales Microcéphalie	t(1;10)(q44;p14)	✓	✓		✓	Interruption de <i>WDR64</i> , <i>KTR18P42</i> , <i>NREP</i> , <i>CTC-210G5</i> , <i>CCDS411496</i> , <i>CCDS31165</i> , <i>CCDS60502</i> , <i>CCDS60501</i> , <i>OR2L13</i> , <i>OPN3</i> et <i>KIAA1217</i> Chromothrypsis
12	-	+	Dystonie	-		t(4;7)(q26 or q27;p15.3)	✓	✓	✓	✓	Interruption de <i>TNRC18</i>

Tableau XI : Récapitulatif des patients, des méthodes mises en œuvre et des résultats de l'étude (* gène expliquant potentiellement le phénotype, ** point de cassure en amont du gène *MEF2C* avec dérégulation de son expression)

Discussion

Au total, nous avons étudié 12 patients parmi lesquels, seuls 3 d'entre eux (Patients 1, 2 et 3) présentent un déséquilibre à l'ACPA qui a été considéré comme responsable du phénotype (avec les connaissances actuelles), soit une proportion de 25 %. Ce pourcentage est un peu inférieur à ceux retrouvés dans la littérature qui varient de 28,6 % à 50 % pour des cohortes de 14 à 59 individus porteurs d'un remaniement apparemment équilibré *de novo* (Gribble SM, et al. 2005 ; de Gregori M, et al. 2007 ; Baptista J, et al. 2008 ; Schluth-Bolard C, et al. 2009). Ce chiffre peut augmenter jusqu'à 90 % lors de RCC (Feenstra I, et al. 2011).

Ces anomalies sont des délétions, dont la taille s'étend d'environ 1,08Mb pour le Patient 3 à 7,1Mb pour la Patiente 1, au niveau du (des) point(s) de cassure ou ailleurs dans le génome. Ainsi, l'ACPA de la Patiente 1 identifie une délétion qui est localisée sur un autre chromosome en dehors des points de cassure des translocations *de novo* dont elle est porteuse. Les pertes chromosomiques sont situées au niveau d'un point de cassure pour le Patient 2 ou des deux points de cassure pour le Patient 3. La présence d'un déséquilibre en dehors du remaniement chromosomique peut être retrouvée pour 25 à 60 % des patients selon les mêmes études. Cette observation place notre cohorte dans la moyenne des autres observations avec une délétion située dans une région chromosomique non impliquée dans le remaniement chromosomique pour 1 cas sur 3.

Parmi les 9 patients restants, la disruption d'un ou deux gènes est considérée comme causale (cf. chapitre Résultat) chez seulement 3 patients (Patients 5, 6 et 10). Initialement, la marche sur le chromosome par FISH était la méthode de référence pour la recherche d'un point de cassure. Dans ce cadre, la proportion de gènes interrompus trouvés était de 45 à 52 % (Fantes J, et al. 1995 ; Baptista C, et al. 2008). Grâce au développement des nouvelles technologies comme le séquençage haut débit, ce pourcentage augmente jusqu'à 83 % (Talkowski ME, et al. 2012). Dans notre cohorte, la disruption de gènes, pouvant éventuellement expliquer le phénotype des patients, n'a pas pu être identifiée à l'aide de la marche sur le chromosome (même si nous avons suspecté une interruption d'*AKT3* chez le Patient 11). Les autres techniques mises en œuvre ont permis de mettre en évidence une disruption de gènes chez les Patients 5, 6, 10 et 11 : par Array-Painting (Patients 5, 6 et 10) ou par WGS (Patients 10 et 11). Ces résultats confirment que le diagnostic d'une interruption d'un ou plusieurs gènes peut

être plus facilement réalisé avec les nouvelles technologies comme l'Array-Painting et le WGS. Cependant, la question du temps nécessaire non seulement pour l'identification du point de cassure mais aussi pour la confirmation par le séquençage classique (Sanger) peut être évoquée en fonction du choix de la technique.

Selon Vermeesch J, les séquences LINE sont des éléments essentiels dans la formation des translocations apparemment équilibrées (communication orale L16, 10th European Cytogenetics Conference 2015 - Strasbourg). Cependant, plusieurs mécanismes chromosomiques, impliquant différents types de séquences sont décrits dans la littérature (Gu W, et al. 2008). Dans ce contexte, nous avons séquencé les points de cassure des remaniements observés chez 4 patients (Patients 5, 6, 7 et 12) parmi les 12 patients de notre cohorte, dans le but de rechercher un éventuel mécanisme chromosomique commun chez ces patients.

Parmi les différents remaniements mis en évidence dans cette étude, un *chromothripsis* a été d'abord observé chez le Patient 10, suggérant un mécanisme chromosomique particulier. Cette variété de réarrangements complexes et massifs du génome a été suspectée chez cet enfant au vu des résultats obtenus avec l'Array-Painting, technique soulevant des questions quant aux remaniements chromosomiques de ce patient mais ne permettant de conclusion définitive. La mise en œuvre, dans un second temps, du WGS chez le Patient 10 a confirmé le *chromothripsis*. De plus, l'analyse par WGS du remaniement chromosomique du Patient 11 a confirmé les apports de cette technique en mettant en évidence non seulement un RCC mais aussi le *chromothripsis*. Cependant, il faut noter que, chez le Patient 11, le gène *AKT3*, apparemment interrompu lors de l'analyse par la marche sur le chromosome, n'est pas impliqué dans les divers remaniements identifiés par WGS. Par ailleurs, un éventuel *chromothripsis* a été envisagé chez la Patiente 1 vu l'ensemble des remaniements observé chez cette enfant (2 translocations et 1 délétion). Ainsi, le WGS a montré un réarrangement plus complexe de la région 6q24.2q25.2 que la délétion détectée par ACPA, mais sans pouvoir parler de *chromothripsis*.

Devant une translocation réciproque apparemment équilibrée chez un patient à phénotype anormal, l'ensemble de ces observations nous amène à nous poser plusieurs questions non seulement sur la place des puces à ADN mais aussi sur le choix de la technique à mettre en œuvre pour cloner les points de cassure et avoir un diagnostic complet.

Finalement, ce travail a permis de poser un diagnostic chez 7 patients par la constatation :

- d'un déséquilibre sur puce à ADN (Patients 1-3),
- d'une disruption de gènes (Patient 6),
- d'un effet de position (Patiente 7)
- ou enfin d'un remaniement chromosomique complexe de type *chromothripsis* (Patients 10 et 11).

Cependant, deux autres questions sont importantes :

- (i) existe-il un mécanisme chromosomique commun responsable des translocations de ces différents patients identifiable grâce aux différentes approches utilisées ?
- (ii) quelle(s) technique(s) faut-il mettre en œuvre devant un remaniement apparemment équilibré chez un individu à phénotype anormal, ce qui correspond à la question prépondérante de ce travail ?

1- Recherche d'un mécanisme chromosomique commun

Le bilan de cette étude rapporte différents mécanismes physiopathologiques responsables des phénotypes anormaux des patients de cette cohorte, ce qui en fait un groupe hétérogène. En effet, le diagnostic clinique repose soit sur un déséquilibre sur puce à ADN (Patients 1-3), soit sur une interruption de gènes (prouvée pour le Patient 6 ou suspectée pour le Patient 5), soit sur une modification de l'expression d'un gène (Patiente 7) ou encore sur la présence d'un *chromothripsis* (Patients 10 et 11). Cependant, l'observation d'un mécanisme commun de formation des translocations des patients de notre cohorte pourrait en faire un groupe homogène.

Plusieurs mécanismes chromosomiques sont proposés pour expliquer la formation des remaniements chromosomiques, notamment des translocations réciproques apparemment équilibrées. Trois principales catégories sont décrites :

1- La « Recombinaison Homologue Non-Allélique » (NAHR ou Non Allelic Homologous Recombination), (cf. Figure 115) : Elle correspond au principal mécanisme décrit dans les réarrangements chromosomiques récurrents et survient dans les régions répétées, comme les « Low Copy Repeats » (LCR) ou duplications segmentaires qui représentent 5-10 % du

génomique (Bailey JA, et al. 2001). Selon la position relative des LCR à l'origine de la NAHR, différents cas de figures peuvent se présenter : une délétion et/ou une duplication, une inversion entre 2 LCR et une translocation. Il faut noter que des séquences type LINE (Long Interspersed Nuclear Element) peuvent participer également à ce type de mécanisme chromosomique (Startek M, et al. 2015).

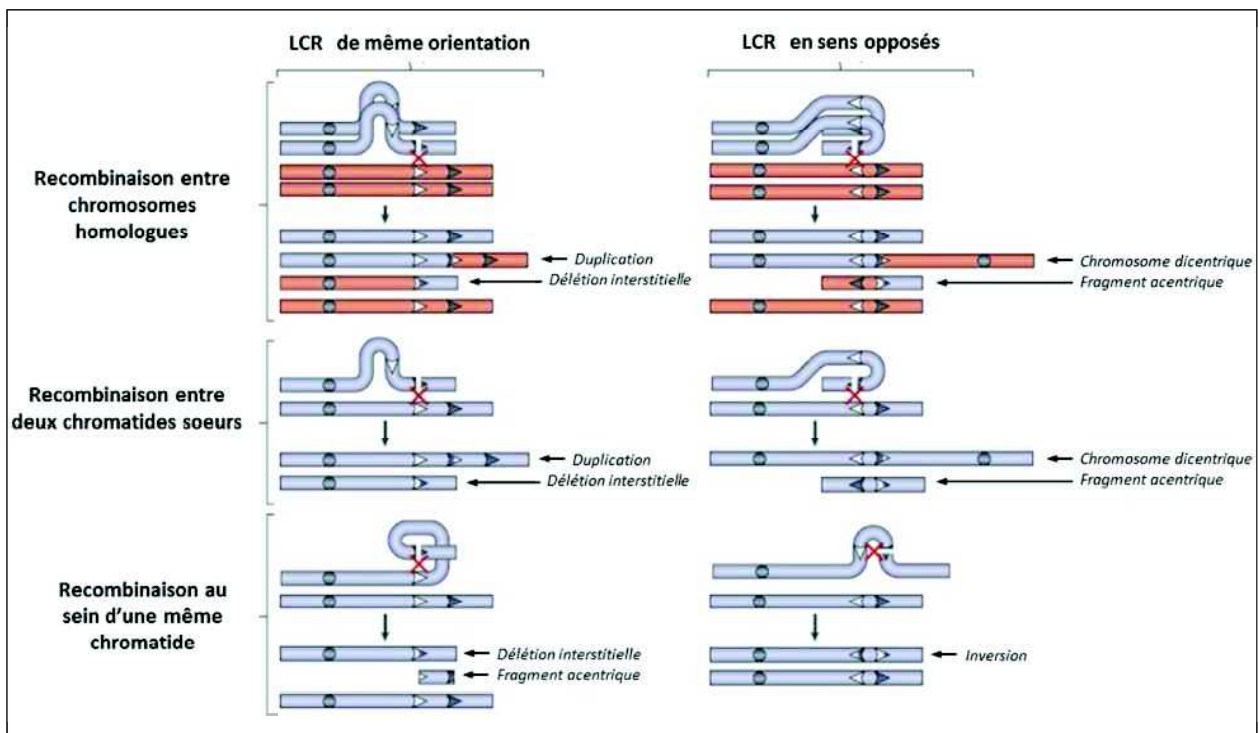


Figure 115 : Principe du mécanisme NAHR (selon Sasaki M, et al. 2010)

2- La « Jonction d'Extrémités Non Homologues » (NHEJ ou Nonhomologous DNA End Joining), (cf. Figure 116) : Elle représente l'un des 2 principaux mécanismes de réparation de l'ADN lors de lésions provoquant des cassures double-brin (Roth DB, et al. 1985). Ce processus est décrit dans les réarrangements chromosomiques non récurrents, notamment en cancérologie (Lieber MR, et al. 2008). En fonction de la localisation des points de cassure, les remaniements créés peuvent être soit des translocations réciproques, soit des délétions interstitielles, accompagnées d'un fragment acentrique en anneau instable, ou encore des fragments dicentriques associés à des fragments sans centromère qui sont instables. La NHEJ est caractérisée par deux particularités (i) ce mécanisme ne nécessite pas la présence de LCR ou de tout autre séquence répétée (Gu W, et al. 2008) et (ii) les points de cassure montrent notamment une modification de la séquence nucléotidique (Lieber MR. 2008). Ce phénomène a pour conséquence la présence d'une séquence « cicatrice » aléatoire au niveau des points de

cassure, qui représente la signature des réarrangements chromosomiques par NHEJ. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont réalisé le séquençage des jonctions chromosomiques de divers réarrangements. Les séquences identifiées étaient courtes et d'origine inconnue ou ne montraient pas de micro-homologie. Cependant, deux publications révélaient la présence de séquences répétées telles que LTR (Long Terminal Repeat sequence), LINE, Alu, MIR et Mer2 chez 16 patients parmi les 38 (42 %) au niveau des points de cassure de leur remaniement (Nobile C, et al. 2002 ; Toffolatti L, et al. 2002). De plus, des séquences de type TTTAAA, connues pour incurver d'ADN et ainsi induire l'apparition de boucle d'ADN par auto-hybridation, sont décrites à proximité des points de cassure (Nobile C, et al. 2002 ; Toffolatti L, et al. 2002). Ces observations suggèrent un rôle des éléments répétés dans les processus de NHEJ.

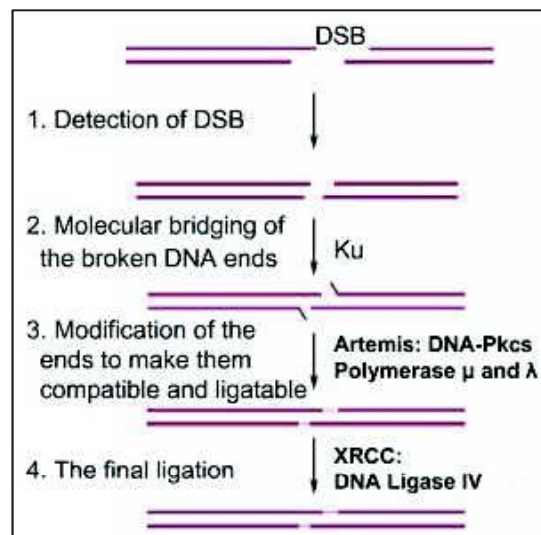


Figure 116 : Principe du mécanisme NHEJ (selon Gu W, 2008, adapté de Lieber MR, 2003)

3- Le Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) ou la Microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR) suite à un « stress réplicatif » : Ce phénomène de « stress réplicatif » se produit au moment de la réplication de l'ADN : les fourches de réplication sont déstabilisées, ce qui conduit à la disparition du réplisome et à la formation de cassures double-brin. Deux modèles basés sur des erreurs de réplication de l'ADN sont proposés, notamment devant certains remaniements ne pouvant être expliqués par les deux mécanismes décrits précédemment :

(i) Le processus FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching), (cf. Figure 117) : Ce mécanisme est la combinaison d'un arrêt de la fourche de réplication avec un changement de brin modèle. L'origine du « stress réplicatif » est exogène ou suite à une conformation

particulière de l'ADN, comme une structure en épingle à cheveu. Des arrêts prolongés de la synthèse peuvent déstabiliser le réplisome et induire une cassure double brin au niveau du brin néosynthétisé. Pour remédier à cette désorganisation, ce brin peut se réengager dans une nouvelle fourche de réplication. Cette action nécessite alors des homologies de séquences de petite taille (4-15pb). La synthèse du brin d'origine est poursuivie à l'aide de la polymérase de la nouvelle fourche de réplication en utilisant comme modèle le brin envahi. Différents types de remaniements chromosomiques comme des duplications, des délétions, des inversions ou des translocations peuvent en être la conséquence.

(ii) Les remaniements par MMBIR (Microhomology-mediated break-induced replication), (cf. Figure 118) : Ce mécanisme se produit après une mise en échec du réplisome responsable d'une cassure double-brin d'une seule extrémité au niveau d'une fourche de réplication par action erronée d'une endonucléase ou par une lésion du brin modèle. La cassure double-brin de l'ADN survient au niveau d'une seule extrémité. En présence d'un environnement nucléaire « permissif », une extrémité 3' simple brin peut se former et ainsi s'apparier à un ADN simple brin présentant des séquences de micro-homologie (2-4pb). Si cet évènement a lieu dans une nouvelle fourche de réplication, une élévation du brin à réparer se produit à partir de l'un des brins envahis.

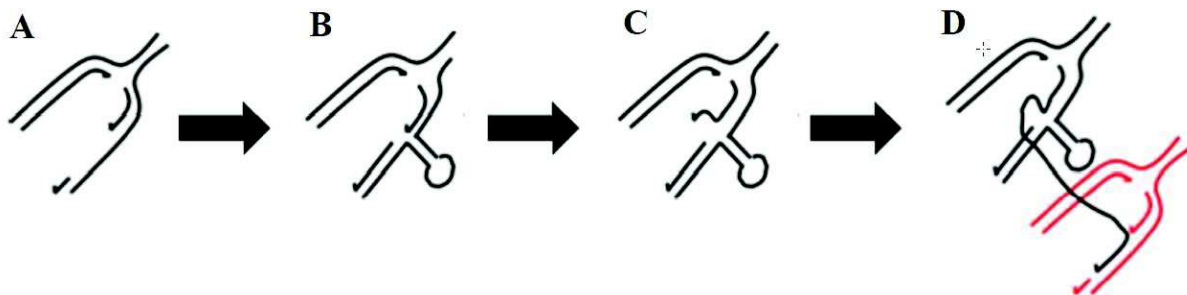


Figure 117 : Mécanisme FoSTeS - Fork Stalling and Template Switching (d'après Hastings et al. 2009) :

- A-** Fourche de réplication avec brin tardif et fragments d'Okazaki
- B-** Stress répliatif
- C-** Libération en 3' d'un fragment d'ADN simple-brin
- D-** Envahissement d'une autre fourche de réplication par micro-homologie.

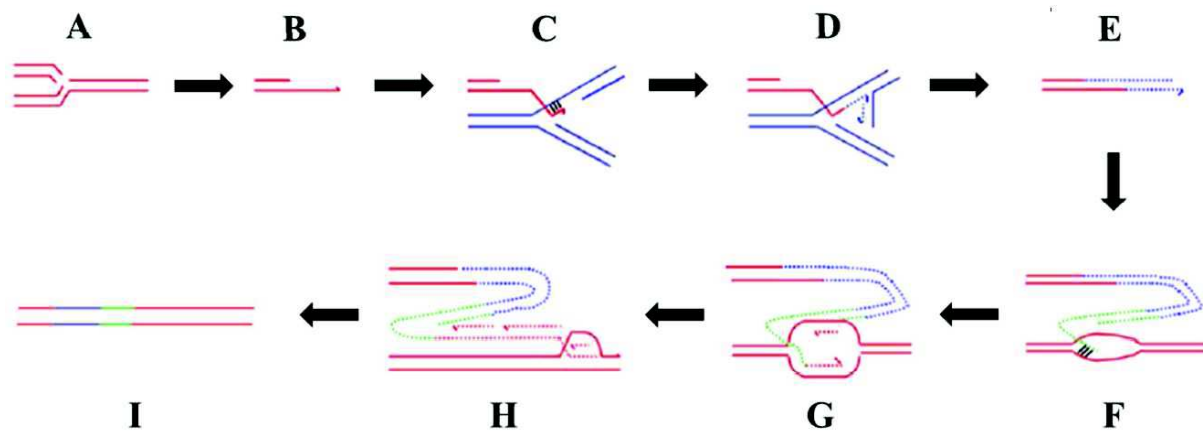


Figure 118 : Mécanisme MMBIR - Microhomology Mediated Break-Induced Replication (d'après Hastings et al. 2009) :

- A-** Stress réplicatif : cassure du brin modèle précoce
- B-** Formation d'une cassure double-brin à une seule extrémité, avec côté 3' libre et simple brin
- C-** Envahissement d'une autre fourche de réplication par micro-homologie
- D-** Fourche secondaire et réplication de faible processivité
- E-** Dissociation de la fourche secondaire : une nouvelle extrémité 3' est libre
- F-** Plusieurs cycles de ces tentatives de réparation s'opèrent...
- G-** ... jusqu'à obtention d'une fourche de haute processivité
- H-** L'élongation se poursuit jusqu'à la fin du chromosome
- I-** Au final, le brin réparé présente un réarrangement complexe.

1.1 L'hypothèse d'un mécanisme chromosomique commun est-elle vérifiée ?

Certains chromosomes impliqués dans les translocations de notre série sont retrouvés chez plusieurs patients de notre cohorte (cf. Tableau XII). Cependant, les points de cassure identifiés sont différents, ce qui permet d'exclure un caractère récurrent des remaniements étudiés dans ce travail, excepté la région 3p11 chez les Patients 6 et 10. Une étude plus approfondie des translocations de ces enfants a confirmé que les points de cassure étaient bien différents (cf. chapitre Résultats). Par ailleurs, la revue de la littérature ne révèle pas de remaniements récurrents dans les régions chromosomiques impliquées dans les différentes translocations de cette série, à l'exception du Patient 6 (cf. § 1.2 du chapitre Discussion).

Chromosomes	Patients	Points de cassure
1	8	1q44
	11	1q43
2	4	2q32
	5	2q37
3	6	3p11
	7	3p26
	10	3p11
4	1	4q27
	3	4p15.1
	12	4q31
5	2	5q21
	3	5p14.3
	7	5q13.3
	10	5q23
7	6	7p11
	12	7p22
14	2	14q22
	8	14q32.2

Tableau XII : Localisation chromosomique des différents points de cassure impliqués dans les remaniements des patients de notre cohorte

Le clonage des points de cassure des translocations des Patientes 1 et 7 a montré que ceux-ci ne se situaient pas dans des séquences répétées mais pouvaient être « à proximité » de celles-ci (entre 13 et 699 nucléotides). Cependant, l'analyse des résultats du séquençage des points de cassure des translocations t(4;9) de la Patiente 1 et t(3;5) de la Patiente 7 montre la présence de « cicatrice » avec des séquences nucléotidiques communes sur chacun des dérivés impliqués (cf. § 5.2.2 pour la Patiente 1 et § 4.2.2 pour la Patiente 7 du chapitre Résultats). Ces données pourraient suggérer la mise en jeu d'un mécanisme chromosomique de type NHEJ. En ce qui concerne, la translocation t(7;8) de la Patiente 1, le clonage des points de cassure n'a pas permis d'évoquer un mécanisme plus qu'un autre. Cette conclusion est la même pour le Patient 5 dont le point de cassure sur le chromosome Y est dans une région répétée mais pas celui sur le dérivé 2 de la translocation t(Y;2), (cf. § 5.3.2 du chapitre Résultats).

Les points de cassure identifiés dans la translocation t(4;7) de la Patiente 12 sont localisés dans une séquence type LTR sur le chromosome 4 et dans une séquence type Alu/SINE sur le chromosome 7, ce qui pourrait évoquer principalement un mécanisme de type NAHR, qui sont aussi décrits dans des réarrangements non récurrents (Lee JA, et al. 2007).

L'ensemble de ces résultats ne sont pas en faveur d'un mécanisme chromosomique commun pour la formation des translocations des patients de cette série.

1.2 Cas particulier du Patient 6 : Interruption du gène *AUTS2* impliqué dans des réarrangements récurrents : mécanisme ?

Le gène *AUTS2* est décrit dans de nombreux remaniements chromosomiques, aussi bien en constitutionnel avec 5 translocations (Sultana R, et al. 2002 ; Kalscheuer VM, et al. 2007 ; Huang XL, et al. 2010 ; Beunders G, et al. 2013) et 3 inversions (Bakkaloglu B, et al. 2008 ; Talkowski ME, et al. 2012 ; Beunders G, et al. 2013), qu'en cancérologie, notamment dans les leucémies (Denk D, et al. 2014).

Le principal mécanisme retrouvé dans les réarrangements chromosomiques récurrents est la NAHR qui est décrite ci-dessus et qui survient principalement au niveau des LCR. Cependant, lors du séquençage des points de cassure de la translocation t(3;7) du Patient 6, nous avons observé, à proximité, des séquences type Alu et LINE (cf. Figure 57, dans le § 4.1.2 du chapitre Résultat, page 143). Ces séquences répétées hautement homologues peuvent être parfois impliquées dans ce type de recombinaison. Ces NAHR exceptionnelles sont alors observées dans les réarrangements non-récurrents (Gu W, et al. 2008).

AUTS2 est un point chaud ou « hot spot » pour la formation de clusters de CNV induits par l'hydroxyurée (inhibiteur d'une ribonucléotide réductase) ou l'aphidicoline (inhibiteur d'une ADN polymérase) suggérant que la région est soumise à un « stress répliatif » (Amarillo IE, et al. 2014). Ainsi, l'autre mécanisme responsable des multiples implications de ce gène dans les translocations réciproques pourrait être l'un des 2 modèles basés sur ces erreurs de répliation de l'ADN secondaires à un « stress répliatif » : le processus FoSTeS ou un remaniement par MMBIR. Par ailleurs, le point de cassure chez le Patient 6 est situé en 7q11.22 dans l'intron 6 qui est l'un des principaux « hot spots » pour la formation de CNV induits par l'aphidicoline et l'hydroxyurée (Arlt MF, et al. 2011).

Ainsi, les 3 mécanismes (NAHR, FoSTeS ou MMBIR) peuvent être responsable des réarrangements impliquant le gène *AUTS2*. En effet, même si ces translocations pourraient être considérées comme récurrentes sur le plan chromosomique, les points de cassure

observés par des techniques plus résolutive telles que l'hybridation *in situ*, l'Array-Painting ou le séquençage haut débit ont montré que l'exon ou le nucléotide impliqué était différent d'un patient à un autre (cf. Figure 119), (Sultana R, et al. 2002 ; Kalscheuer VM, et al. 2007 ; Huang XL, et al. 2010 ; Beunders G, et al. 2013). Ces données mettent en évidence l'intérêt des techniques résolutive dans une tentative de définir plus précisément les mécanismes responsables de réarrangements chromosomiques. A noter que ces localisations multiples des points de cassure dans le gène *AUTS2* expliquent, selon Huang XL et ses collaborateurs, la variabilité de la gravité des phénotypes des cas rapportés dans la littérature (Huang XL, et al. 2010).

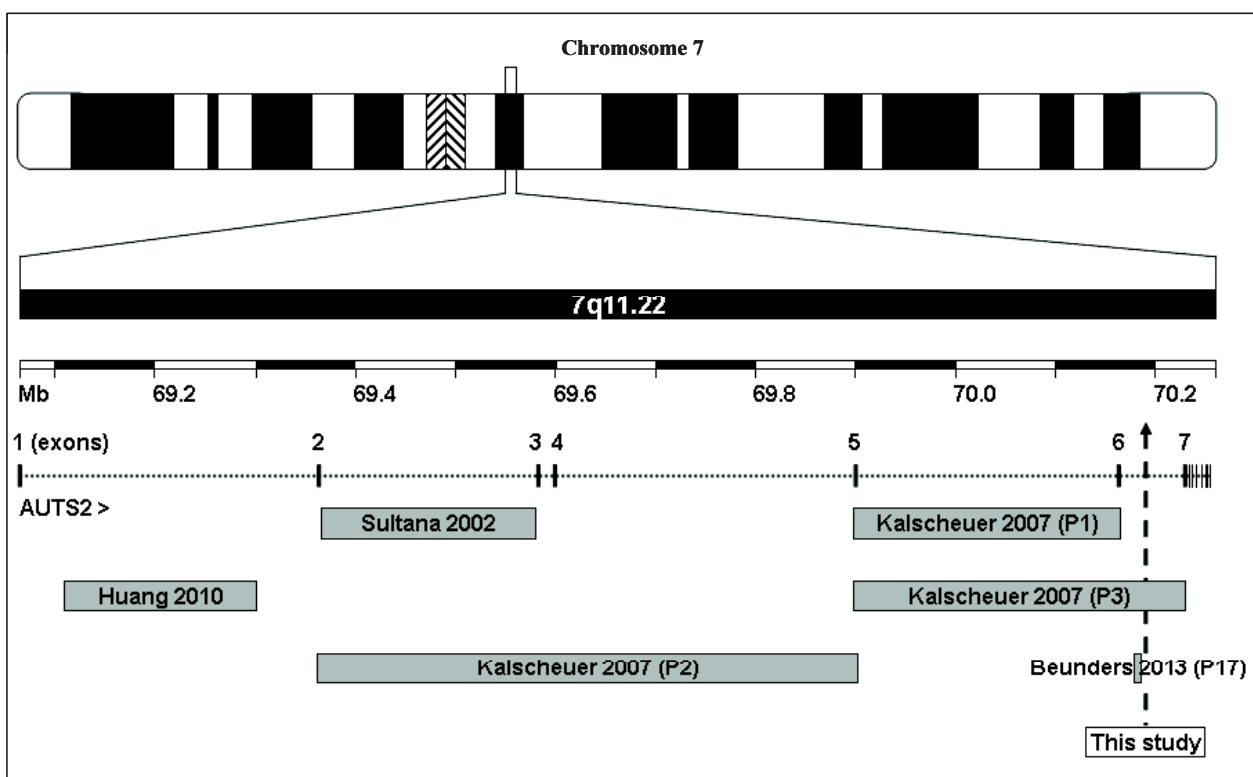


Figure 119 : Représentation schématique des localisations des points de cassure (dans les 7 premiers exons seulement) des translocations impliquant *AUTS2* chez les 6 patients de la littérature ainsi que chez le Patient 6 (Schneider A, et al. 2015)

1.3 Patients 10 et 11 : *chromothripsis*

La mise en œuvre du WGS chez les Patients 10 et 11 a permis de mettre en évidence un *chromothripsis*. Dans un premier temps, ce mécanisme a été décrit dans les cancers. L'étude des points de cassure et des jonctions impliqués a mis en évidence des régions de micro-homologie, voire des petites insertions ou délétions (Stephens PJ, et al. 2011 ; Rausch T, et al.

2012) suggérant que le principal mécanisme de réassemblage serait le NHEJ. Ce processus de réparation serait également identifié dans le cadre des *chromothripsis* constitutionnels (Kloosterman WP, et al. 2011 ; Kloosterman WP, et al. 2012). Cependant, d'autres mécanismes sont évoqués suite à la présence au niveau des points de cassure d'inversions, de duplications, de triplications, ou encore d'insertions de petites séquences homologues d'autres segments du même ou d'un autre chromosome. Ainsi, la formation d'un *chromothripsis* pourrait aussi survenir suite à un « stress réplicatif » avec la mise en jeu des mécanismes FoSTes ou MMBIR (Liu P, et al. 2011 ; Chiang C, et al. 2012). L'implication de ces processus de désengagement et d'envahissement dans la genèse des remaniements chromosomiques complexes s'expliquerait par le fait de leur répétition possible et serait facilitée ou non par de petites homologies de séquence entre les deux brins (Lee JA, et al. 2007). Il est important de noter que ces mécanismes (NHEJ ou stress réplicatif) ont été identifiés dans les *chromothripsis* tumoraux et constitutionnels et ne sont donc pas exclusifs. De plus, dans les régions télomériques, les réarrangements peuvent résulter non seulement d'un mécanisme de type NHEJ (Palm W, de Lange T. 2008) mais aussi de mécanismes de réparation lors d'un « stress réplicatif » (Yatsenko SA, et al. 2012). Le clonage des points de cassure des *chromothripsis* a permis de mettre en évidence la présence de séquences répétées (Kloosterman WP, et al. 2011 ; Liu P, et al. 2011).

Les résultats du WGS ont permis de mettre en évidence un *chromothripsis* chez les Patients 10 et 11 (cf. chapitre Résultats). La reconstitution des différents dérivés permet de montrer la présence non seulement de séquences répétées de type LINE mais aussi la perte de petites séquences nucléotidiques au niveau de certains points de cassure confirmant un réarrangement complexe et massif du génome. Ces observations sont en faveur de la mise en jeu des différents mécanismes de formation des remaniements chromosomiques que nous avons évoqués.

1.4 Conclusion

Ces résultats soulignent la diversité des mécanismes cellulaires mis en œuvre par la réparation des cassures des fibres d'ADN. Aucun des mécanismes évoqués ne semble être privilégié par la cellule, qui va adopter sa réaction en fonction du contexte cellulaire, de la localisation génomique de la cassure et de son positionnement dans le cycle cellulaire.

Toutefois, une constante à noter est la présence fréquente d'éléments répétés qui semblent interférer préférentiellement avec les mécanismes de réparation de l'ADN.

Nous n'avons donc pas identifié de mécanisme unique commun pour expliquer la survenue des différents réarrangements étudiés. Cependant, nous soupçonnons un mécanisme de type NHEJ pour les Patientes 1 et 7 et de type *chromothripsis* pour les Patients 10 et 11 (cf. Tableau XIII). En effet, ces 2 patients présentent un *chromothripsis* diagnostiqué à l'aide du séquençage haut débit. Ainsi, si nous prenons le cas du Patient 10, la réalisation de son caryotype a permis de mettre en évidence un RCC qui s'est avéré être plus complexe au vu des résultats de l'Array-Painting ; cependant, le diagnostic final de *chromothripsis* n'a pu être posé qu'à l'aide du WGS. Dans ce contexte, le choix de la technique (ou des techniques) à mettre en œuvre est essentiel pour réaliser un diagnostic complet, identifier le mécanisme chromosomique de formation du remaniement, rechercher la physiopathologie du phénotype du patient et ainsi donner un conseil génétique adéquat.

Mécanismes Chromosomiques	Patients
NAHR	6 12
NHEJ	1 pour la t(4;9) 7
Stress répliatif (FoSteS ou MMBIR)	6
<i>Chromothripsis</i>	10 11

Tableau XIII : Récapitulatif des différents mécanismes de formation des remaniements chromosomiques chez les Patients 1, 6, 7, 10, 11 et 12

2- Clonage d'un point de cassure : quelle approche ?

2.1 Avantages et inconvénients de la marche sur le chromosome par FISH

Cette approche est efficace et représentait auparavant la technique de référence basée sur des techniques de FISH itératives et séquentielles principalement à l'aide de sondes BAC/PAC (Tsukamoto K, et al. 1992).

Cette stratégie repose sur la réalisation d'un caryotype dont la résolution doit être la plus élevée possible, afin d'identifier au mieux les régions des points de cassure. Les sondes peuvent alors être choisies de part et d'autre, au plus proche, des points de cassure théoriques. De ce fait, nous ne voyons que ce que nous recherchons. Ainsi, nous prenons l'exemple du Patient 10 porteur d'un remaniement complexe à 3 chromosomes $t(3;15;5)$, la FISH nous aurait potentiellement permis d'identifier les points de cassure au niveau de chacun des dérivés mais nous n'aurions pas observé le réarrangement plus complexe du dérivé 3 mis en évidence avec la technique de WGS. L'étude par FISH des points de cassure chez le Patient 11 confirme cette hypothèse. En effet, l'approche par WGS a montré un *chromothripsis* que nous n'avions pas suspecté.

Cette approche est techniquement applicable à l'ensemble des laboratoires de cytogénétique mais exige une grande disponibilité en temps, aussi bien pour la fabrication des sondes que pour la réalisation des hybridations itératives. Par ailleurs, pour s'approcher au plus près des points de cassure, il est nécessaire de disposer d'une banque de sondes couvrant tout le génome ou d'un budget permettant de les commander auprès des fournisseurs. Acheter cette banque demande un investissement financier important de l'ordre de 30000€ (à laquelle s'ajoute la fabrication de chacune des sondes pour préciser le point de cassure et la réalisation de la technique FISH qui l'accompagne, qui sont évaluées à 450€ par technique avec une ou deux sondes testées).

Le choix de la « marche sur le chromosome » se fait si le laboratoire possède un culot cytogénétique cellulaire, en espérant qu'il y ait suffisamment de métaphases pour une bonne interprétation. Parfois il devient indispensable de déshybrider pour réhybrider les lames pour tester de nouvelles sondes, ce qui les dégrade au fil des expériences rendant difficile, voire

impossible la lecture à la longue. Occasionnellement, avec de la chance, seulement quelques sondes sont suffisantes pour identifier le point de cassure. Ce cas très exceptionnel réduit effectivement le délai d'obtention des résultats ainsi que le coût. Cependant, il ne faut pas imaginer que cet événement se reproduira pour chacun des dérivés étudiés. Ainsi, un point de cassure identifié ne signifie pas que le travail est terminé. En effet, celui-ci peut ne pas être responsable d'une disruption d'un gène ou alors peut être localisé au niveau d'un gène sans fonction connue ou sans association clairement établie avec une pathologie particulière selon les connaissances au moment de l'étude. Par ailleurs, l'autre point de cassure peut aussi être impliqué de façon partielle ou totale dans la pathologie. Cette situation correspond à celle initialement décrite chez le Patient 11 de notre cohorte (avant la 2nde étude par WGS) : le point de cassure sur le dérivé 1 de la translocation t(1;10) coupe le gène *AKT3* mais cela n'explique pas toute la clinique de l'enfant et nous n'avons pas pu identifier le point de cassure sur le dérivé 10 (par manque de matériel cytogénétique pour continuer nos investigations par FISH). De plus, ce point de cassure n'a pas été retrouvé lors de l'analyse du WGS réalisée chez cet enfant. Après ré-interprétation des résultats de FISH identifiant un point de cassure dans cette région, nous avons observé que la sonde RP11-113O11 était bien localisée sur le bras court du chromosome 1 mais qu'elle était plus proche du centromère qu'attendu (cf. Figure 100 page 213). Cette observation soulève la question de la « fiabilité » de la localisation des sondes. En effet, la position exacte de la sonde sur le chromosome ne peut être affirmée sans séquençage de ses extrémités ou sans étude du contenu STS (Sequence-Tagged Site) par PCR. Cependant, cette étape augmente d'autant plus le temps nécessaire pour cloner un point de cassure ainsi que le coût.

Quoiqu'il en soit, la résolution obtenue (quelques dizaines de kb) correspond à la sonde qui chevauche le point de cassure. Pour le préciser à la base près, une PCR longue distance avec des tests de plusieurs couples d'amorces choisies en fonction des sondes chevauchant le point de cassure et un séquençage classique de type Sanger du produit de PCR sont néanmoins obligatoires.

Cette technique peut représenter la seule approche possible en fonction du matériel disponible, des moyens financiers et de l'accès aux nouvelles technologies. Cependant, à l'heure actuelle, la plupart des laboratoires possèdent des aliquotes d'ADN de patients, servant à l'ACPA, prescrite de plus en plus en 1^{ère} intention. Ces échantillons peuvent alors être utilisés pour le WGS, dont les apports et les difficultés d'utilisation sont développés dans le §

2.3 du chapitre Discussion. Par ailleurs, il n'est pas rare que le généticien clinicien, surtout si le pronostic vital du patient est en jeu, propose la réalisation d'une lignée cellulaire immortalisée permettant d'obtenir du matériel génétique « à volonté ».

2.2 Avantages et inconvénients de l'Array-Painting

L'existence d'une lignée cellulaire immortalisée pour un patient peut se révéler d'une grande importance pour réaliser l'ensemble des examens biologiques dans un but de diagnostic. En effet, elle représente théoriquement une source inépuisable de matériel disponible notamment pour l'obtention de culots cellulaires cytogénétiques mais aussi d'ADN, sans avoir à prélever itérativement le patient ou si ce dernier est décédé. De plus, elle est indispensable pour réaliser la technique d'Array-Painting.

L'Array-Painting a été développée en 2003 par l'équipe de Fiegler (Fiegler H, et al. 2003), afin de déterminer la composition des chromosomes anormaux, ainsi que les points de cassure, en combinant la CMF à une ACPA (Gribble SM, et al. 2004). Le principal avantage de l'Array-Painting est une résolution bien meilleure (quelques kb) que celle de la marche sur le chromosome, dont la résolution est déjà supérieure (50-200kb) à celle de la Cytogénétique Classique (5-10Mb). Ainsi, en fonction du choix de la puce à ADN utilisée pour analyser l'ADN du dérivé chromosomique trié par cytométrie en flux, le point de cassure sera plus ou moins précis (Gribble SM, et al. 2007). Nous avons utilisé la puce Cytoscan HD™ (Affymetrix®) qui permet une analyse à très haute résolution (environ 2,7 millions de marqueurs avec un espacement moyen des marqueurs de 1148pb, cf. page 87).

Un avantage supplémentaire de l'Array-Painting par rapport à la FISH est le gain de temps, une fois la lignée cellulaire disponible. L'établissement de la lignée prend au minimum un mois et nécessite un prélèvement sanguin sur tube hépariné de bonne qualité (sans hémolyse, ni d'aspect laqué) et qui doit être mis en culture dans les 48H. A partir de cette lignée immortalisée, la préparation de la suspension chromosomique est réalisée en 3H puis est suivie d'un marquage avec les colorants Hoescht et Chromomycine pendant une nuit complète. La séparation des dérivés chromosomiques par CMF peut alors être réalisée en 3H et une étape d'amplification d'ADN avec le kit WGA (Sigma®) précède la technique de puce à ADN qui s'étale sur 4 jours avec la puce Cytoscan HD™ (Affymetrix®), (Gribble SM, et al.

2009). Les étapes limitantes sont donc la production de la lignée cellulaire qu'il est parfois nécessaire de sous-traiter dans un laboratoire spécialisé, ainsi que son entretien (changement de milieu de culture tous les 3 jours).

Cette approche présente d'autres difficultés :

1- Le coût (cf Tableau XIV) : Le coût de cette technique comprend, après l'envoi d'un tube hépariné (71€ par tube envoyé), non seulement la réalisation de la lignée cellulaire (évaluée à 670€ par patient), mais aussi son envoi dans le laboratoire où la préparation de la suspension chromosomique pour l'Array-Painting sera mise en œuvre (148,50€ par échantillon). A cela, il faut ajouter le kit de marquage pour le tri chromosomique pour la CMF de 50€ par patient, le tri en lui-même de 51,99€ par heure (en considérant que 2 jours sont nécessaires pour obtenir les dérivés triés), le kit d'amplification WGA (Sigma®) à 130,8€ pour 10 réactions et l'ACPA post-tri chiffrée à 500€ par dérivé chromosomique. Le montant total est alors d'environ 2700€ par patient.

Technique	Coût
Envoi du tube	71€
Lignée immortalisée	670€
Suspension chromosomique	148,50€
Kit de marquage	50€
Tri chromosomique	51,99€ / heure
Amplification de l'ADN	130,8€ pour 10 échantillons
ACPA	1000€
Montant total estimé	2700€

Tableau XIV : Récapitulatif du coût de l'Array-Painting

2- L'appareillage : Le projet initial était de collaborer avec l'équipe de la plateforme de CMF disponible sur Montpellier, avec laquelle nous n'avons pas pu obtenir de résultats satisfaisants. Cet échec est dû au matériel utilisé : un Atrios® de chez Beckman Coulter®, qui ne répond finalement pas aux exigences conseillées pour trier les chromosomes, comme un filtre de 490nm et une puissance de laser supérieure à 100mW (cf. § 1.2.2 du chapitre Méthodes mises en œuvre). Par la suite, nous avons réalisé une collaboration fructueuse avec l'équipe de Gribble SM à Cambridge.

3- La difficulté du tri chromosomique : Le tri des dérivés chromosomiques se fait en fonction de leur taille, évaluée à l'aide de la table 1 de l'article de Gribble SM et collaborateurs (Gribble SM, et al. 2009). La différence de taille entre les dérivés chromosomiques doit être suffisante pour permettre leur séparation ou créer un déséquilibre artificiel. Cette étape s'est avérée difficile chez le Patient 10 selon l'équipe de Gribble SM, qui n'a pu séparer correctement les dérivés 3, 5 et 15 de la translocation $t(3;15;15)$ mais les différentes suspensions chromosomiques obtenues ont quand même permis la poursuite de l'Array-Painting (cf. Figure 120). Les résultats de l'Array-Painting de la Patiente 12 confirme aussi cette difficulté ; en effet, seul le dérivé 4 de la translocation $t(4;7)$ de cette enfant a pu être étudié (cf. Figure 63, page 153).

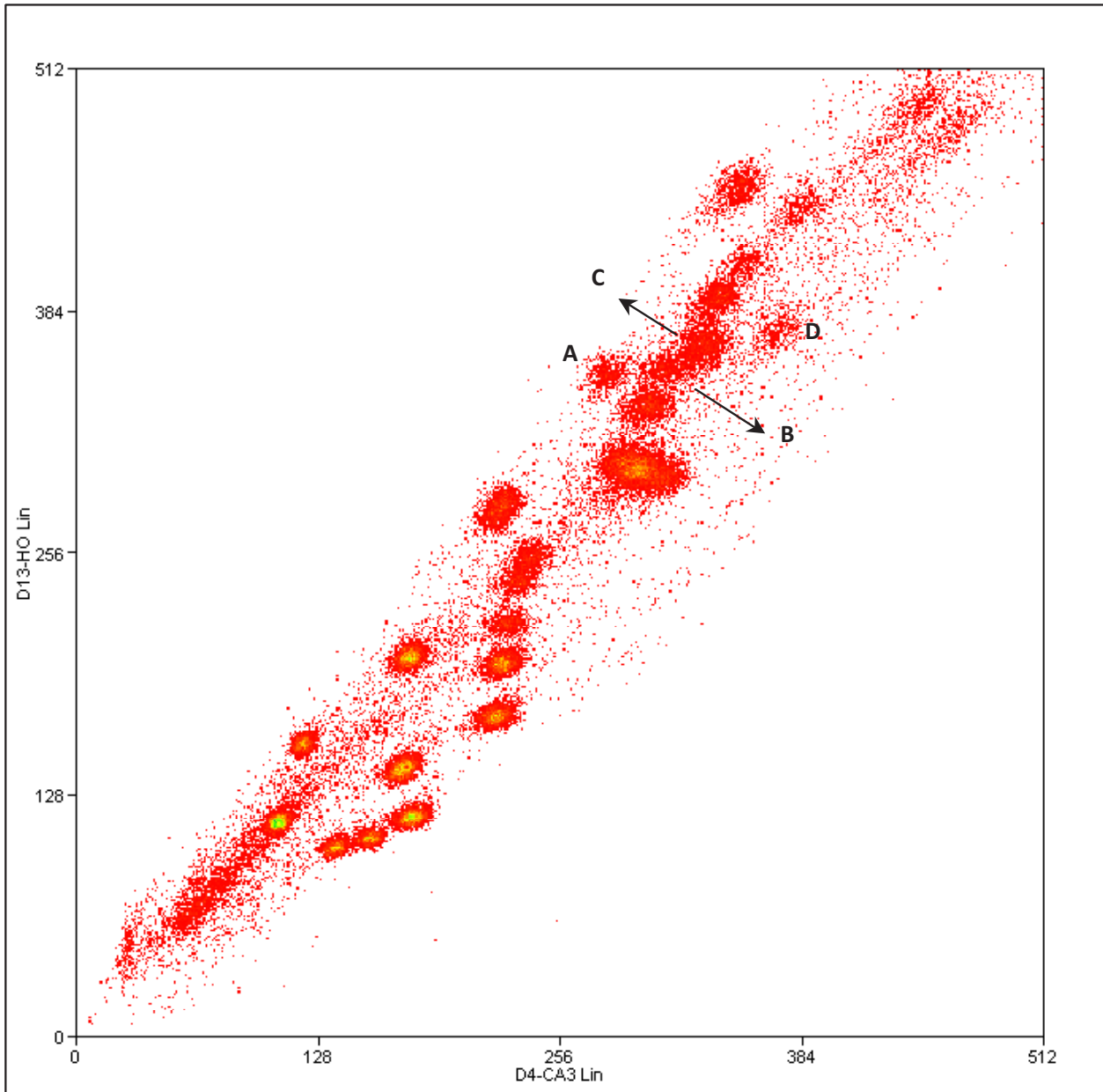


Figure 120 : Exemple de caryogramme de flux illustrant la difficulté de séparation des dérivés chromosomiques par CMF chez le Patient 10

A : t(5,15)

B : chromosomes X et 7

C : t(3q;5q distal) et chromosome 7

D : t(3p;15)

4- Un manque de précision : L'utilisation de l'Array-Painting nous permet d'identifier des points de cassure avec la résolution correspondant à celle de la puce Cytoscan HD™ soit une résolution moyenne de 880pb dans les régions intragéniques et 1737pb dans les régions intergéniques (globalement 1148pb). Il est donc essentiel de réaliser une PCR suivie d'un séquençage classique type Sanger pour préciser le point de cassure à la base près. Dans ce

contexte, le choix des amorces, dont les pré-requis sont décrits dans le § 2.1.1 du chapitre Méthodes mises en œuvre, devient une étape essentielle et peut être plus ou moins difficile. En effet, il dépend de la localisation du point de cassure donc de la distance entre les marqueurs de la puce le flanquant.

5- La nécessité de deux ACPA supplémentaires : Après le tri des dérivés chromosomiques et l'amplification de leur ADN, la qualité de l'ADN ne répond pas aux exigences de l'ACPA. Malgré tout, la technique et l'interprétation sont réalisées et nous étudions seulement les points de cassure sur les chromosomes impliqués dans les remaniements sans analyser les autres chromosomes. De ce fait, bien que nous utilisons deux puces dans l'Array-Painting (une pour chaque dérivé), nous ne pouvons nous dispenser d'une ACPA préalable pour vérifier l'absence d'anomalie du nombre de copies génomiques (Fiegler H, et al. 2003).

6- La limite devant la complexité de certains remaniements : Le principe de cette approche est de créer au final un déséquilibre pour identifier le point de cassure. Malgré tout, à l'exemple du Patient 10 porteur d'un remaniement complexe à 3 chromosomes $t(3;15;5)$, l'Array-Painting a permis de cloner non seulement les points de cassure au niveau de chacun des dérivés mais aussi d'observer un remaniement plus complexe. Cependant, nous n'avons pas observé le réarrangement de type de *chromothripsis* du dérivé 3 ni du dérivé 5. Ainsi, même si les résultats de l'Array-Painting nous donnent plus de renseignements que la FISH, le diagnostic peut rester incomplet.

2.3 Avantages et inconvénients du WGS

Depuis le développement du NGS en 2005, le séquençage complet du génome humain peut être réalisé en quelques jours (Le Scouarnec S, Gribble SM. 2011). Cette technologie permet le séquençage de millions de molécules d'ADN différentes, parallèlement et simultanément à partir d'une bibliothèque (ou « library » ou librairie) de fragments contenant l'ensemble du génome ou des régions ciblées. Les séquences sont alors alignées sur la séquence humaine de référence pour identifier les variations nucléotidiques. Ainsi, tous les remaniements (équilibrés ou non), quels que soient leur type ou leur taille, peuvent être détectés. Cette approche permet donc d'identifier avec une résolution maximale les points de cassure et de

caractériser les réarrangements complexes en une seule expérience (Le Scouarnec S, Gribble SM. 2011).

L'une des premières études de translocation par WGS a été réalisée en 2008 par l'équipe de Chen (Chen W, et al. 2008) à l'aide de la méthode dite Read-depth permettant une résolution de 1kb dans l'identification du point de cassure. Celui-ci a alors été précisé à la base près par une PCR et un séquençage classique. Actuellement, l'analyse se fait principalement par la méthode « paired-end », qui correspond à la lecture des deux extrémités de fragments d'ADN de petite taille provenant de la bibliothèque. Dans une analyse à visée cytogénétique, toutes les discordances de localisation observées entre les extrémités d'un fragment suggèrent très probablement un réarrangement chromosomique (Le Scouarnec S, Gribble SM. 2011).

La plateforme de Montpellier (Montpellier MGX) avec laquelle nous collaborons permet d'utiliser cette approche. Les séquences obtenues ont une longueur de 100-125pb, lus dans le sens 5'→3' des deux côtés d'un fragment mais l'une étant sens et l'autre antisens par rapport à la séquence de référence. Cette taille de fragment est importante pour l'interprétation des résultats. En effet, les données issues des bibliothèques constituées de courts fragments sont, idéalement, complétées par celles fournies par une « library » de longs fragments (« mate-pair » sequencing), ce qui permet une couverture physique supérieure aux points de cassure facilitant ainsi la détection de variations de la structure chromosomique (Shendure J, et al. 2005 ; Bentley DR, et al. 2008). De plus, l'association de séquençage avec différentes tailles de fragments peut aider à comprendre des remaniements plus complexes (Bentley DR et al. 2008). Malgré tout, les équipes de Chen W et Slade I notent qu'il est préférable d'utiliser des bibliothèques de longs fragments « paired-end » (d'environ 3kb) pour augmenter la couverture physique et maximiser les chances d'identifier un point de cassure (Chen W, et al. 2008 ; Slade I, et al. 2010). Ces différentes études soulèvent la question de savoir quelle taille de fragments est idéale pour une bonne interprétation des résultats de WGS. Quoiqu'il en soit notre expérience prouve que du WGS avec du « paired-end » et une séquence minimale des extrémités de 100 nucléotides est suffisante pour analyser les remaniements chromosomiques complexes mêmes s'ils ne sont pas attendus (Patient 11).

L'alignement des séquences sur le génome humain de référence et la création des fichiers BAM ont été réalisés avec l'un ou l'autre des deux algorithmes d'alignement BWA et ELAND. Ces deux analyses donnent des informations identiques ou complémentaires selon les régions observées, ce qui permet d'optimiser la lecture. Ainsi, si certains remaniements

intrachromosomiques ne sont visibles que sur BWA, certaines données, essentielles à l'interprétation, ne sont accessibles que sur ELAND (séquences non localisées et les séquences type « arc en ciel »). Cet exemple confirme bien leur complémentarité nécessaire à l'interprétation de résultats particulièrement complexes comme les *chromothripsis* observés chez les Patients 10 et 11 ou le clonage du point de cassure du dérivé 2 de la translocation t(Y;2) chez le Patient 5.

Le but final est d'identifier directement le point de cassure sans avoir à passer par une étape de PCR/séquençage type Sanger, qui est obligatoire lors des approches par FISH ou Array-Painting. Pour cela, la couverture de la séquence doit être élevée pour retrouver les variations de structure au niveau de la zone de séquence lues (Le Scouarnec S, Gribble SM. 2011). En effet, la profondeur de lecture, qui correspond au nombre de fois que chaque nucléotide est lu, peut être de 10X (fois), 20X, 30X voire plus (en fonction du type d'études). La facilité d'interprétation et donc le temps d'analyse des résultats dépendent de ce paramètre. Cependant, le coût augmente proportionnellement, à savoir 4908€ pour 20X et même 7277€ pour une profondeur de 30X (recommandation minimale pour la recherche de mutation) quand nous avons débuté notre étude.

Nous avons étudié 5 patients, tous analysés avec une profondeur de lecture soit de 10X pour les Patients 1, 10 et le mélange des ADN des Patients 11 et 12, soit de 20X pour les Patients 5 et 11.

Même pour une lecture sur 10X, le WGS est encore une technique coûteuse, notamment au début de notre étude. Dans ce contexte, nous avons réalisé un WGS commun pour 2 cas (Patients 11 et 12), en testant un mélange leur ADN parce qu'ils avaient des translocations impliquant des chromosomes différents. Le résultat n'a pas permis d'identifier des anomalies de séquence dans les régions chromosomiques supposées contenir les points de cassure théoriques identifiés sur caryotype (cf. § 5.5 du chapitre Résultats). La profondeur de lecture n'était probablement pas suffisante mais nous ne savons pas si nous aurions eu un résultat si la séquence avait été lue 20 ou 30 fois. Cependant, grâce à l'analyse du résultat du mélange, l'interprétation de l'Array-Painting chez la Patiente 12 a été plus aisée et nous avons pu choisir les amorces pour cloner précisément les points de cassure de la translocation t(4;7).

Cette technique a été aussi mise en œuvre chez le Patient 10, porteur d'une translocation à 3 chromosomes. Les résultats montrent un nombre de points de cassure plus important que celui attendu. Nous pouvons déjà conclure que cette approche permet de diagnostiquer des réarrangements plus complexes que ceux observés initialement, contrairement aux autres

méthodes mises en œuvre dans ce travail. En effet, si nous pouvons émettre l'hypothèse que les résultats de la FISH peuvent suggérer un remaniement plus complexe en fonction du choix des sondes, la mise en évidence d'un *chromothripsis* est exclue, notamment à cause de la taille et de la réorganisation complexe des régions pouvant être impliquées. Cette constatation est confirmée par l'étude de la translocation t(1;10) du Patient 11 dont les résultats de la FISH n'ont pas fait ressortir l'implication du chromosome 5 ni les nombreux points de cassure identifiés sur les chromosomes 1 et 5 par WGS (cf. § 5.5.1 du chapitre Résultats). La technique d'Array-Painting, quant à elle, permet d'identifier un remaniement plus complexe que celui attendu initialement, laissant suggérer un *chromothripsis* mais sans aller jusqu'à prouver son existence, comme nous l'avons observé chez le Patient 10 (cf § 4.1.4 du chapitre Résultats). L'utilisation de l'Array-Painting aurait pu mettre en évidence l'implication du chromosome 5 dans le remaniement du Patient 11. Cependant, un bon isolement des chromosomes notamment des dérivés 1 et 10 mais aussi du chromosome 5 est nécessaire et cette séparation peut s'avérer difficile comme nous l'avons vu précédemment (cf. § 2.2 du chapitre Discussion).

Ainsi, le principal avantage du séquençage haut débit est la mise en évidence de remaniements plus ou moins complexes non identifiables par d'autres approches. Le WGS de la Patiente 1 représente un exemple en permettant de détecter une délétion interstitielle de la région 6q24.3q25.1 plus complexe, tout en excluant un *chromothripsis*. Dans ce contexte, nous pouvons donc nous poser la question de la place de l'ACPA dans l'étude des réarrangements chromosomiques apparemment équilibrés chez les patients à phénotype anormal. En effet, même si la délétion 6q24.3q25.1 détectée initialement permet d'expliquer le phénotype de l'enfant, l'identification d'un remaniement plus complexe peut être essentielle dans le conseil génétique. Il faut noter que cette observation peut expliquer la difficulté que nous avons eue pour identifier précisément les points de cassure des délétions du Patient 3.

L'inconvénient majeur de cette technique, en dehors de la nécessité de disposer d'un ordinateur avec une RAM (Random Access Memory ou mémoire vive) de taille importante (> 8 giga-octet), est l'interprétation des données qui est beaucoup plus difficile surtout pour les remaniements complexes type *chromothripsis* qu'avec les autres technologies utilisées. En effet, notre expérience nous a montré qu'une bonne analyse des résultats de WGS nécessitait des études complémentaires par FISH. Ainsi, même si chez la Patiente 1, l'identification des points de cassure de la translocation t(7;8) a été aisée, celle des points de cassure de la t(4;9) a nécessité la réalisation de l'hybridation de plusieurs sondes (cf § 5.2.2 du chapitre Résultats).

Cependant, ce point est particulièrement mis en exergue lors de l'étude des *chromothripsis* des Patients 10 et 11. Dans ce contexte, nous avons, chez le Patient 10, utilisé plusieurs approches complémentaires : (i) la FISH pour étudier la réorganisation des régions chromosomiques impliquées sur les dérivés 3 et 5, (ii) et la PCR suivie d'un séquençage type Sanger pour confirmer certains points de cassure sur les dérivés 3 et 15 de la translocation complexe. Cet enfant représente bien les écueils que nous avons rencontrés à l'heure actuelle dans l'interprétation des données de WGS et la nécessité de mettre en œuvre des techniques complémentaires. Il faut noter que nous avons tenté la même approche de FISH chez le Patient 11 mais nous n'avions pas assez de matériel pour confirmer nos hypothèses, cet enfant étant décédé lors des 1^{ers} mois de vie.

Notre expérience suggère, malgré tout, qu'une profondeur de lecture plus élevée aurait probablement pu résoudre certains de ces problèmes. Quoiqu'il en soit, notre travail démontre la nécessité du développement de la bioinformatique pour extraire automatiquement les données et montrer les regroupements d'anomalies sans cibler précisément une région chromosomique particulière, comme ce qui se fait actuellement avec les logiciels d'analyse des données de l'ACPA ou le logiciel surecall de la société Agilent.

2.4 Comparaison des techniques

Les 3 techniques présentent toutes des avantages et des inconvénients et sont comparées dans les tableaux XV et XVI ci-dessous.

	Temps		Mise en œuvre	Coût	Analyse complémentaire par PCR
	technique	interprétation			
FISH	> 6 mois	Facile	Facile	Dépend du nombre de sondes utilisées	Essentielle pour préciser
Array-Painting	~ 1 mois	Facile	Limitée par l'appareillage	Modéré	Essentielle pour préciser
WGS	4-6 mois (sous-traitance)	<u>Difficile</u> : limitée par les connaissances bioinformatiques	Limitée par la disponibilité de la plateforme	Modéré (10X) à élevé ($\geq 20X$)	Peut être inutile

Tableau XV : Comparaison des techniques mises en œuvre

	FISH	Array-Painting	WGS
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> * Facilité de la mise en œuvre * Interprétation aisée * Technique bien maîtrisée * 450€ pour 2 sondes 	<ul style="list-style-type: none"> * Interprétation aisée * Technique connue 	<ul style="list-style-type: none"> * Quantité de renseignements disponibles
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> * Quantité de renseignements disponibles * Disponibilité d'une banque pangénomique avec des zones non couvertes 	<ul style="list-style-type: none"> * Difficulté dans la mise en œuvre * Quantité de renseignements disponibles * Environ 2500€ pour un patient 	<ul style="list-style-type: none"> * Difficulté dans la mise en œuvre * Interprétation complexe * Technique en développement * Coût élevé (2539€ pour 10X)

Tableau XVI : Avantages et Inconvénients de chaque technique mise en œuvre lors de la mise en œuvre de ce travail

A l'issue de notre travail, le WGS semble être l'approche la plus prometteuse non seulement sur le plan de la disponibilité du matériel (10µg d'ADN voire moins) que sur le temps passé à réaliser les techniques. Cependant, quelques problèmes se posent encore : la disponibilité de l'appareillage, le coût et l'interprétation.

1- L'appareillage : La FISH se dédouane de ce problème d'appareil. Cependant, le NGS représente l'avenir : en effet, il apporte une quantité d'informations en permettant de réaliser d'autres études que les variations de structure des chromosomes comme la recherche de mutations ponctuelles et l'analyse du nombre de copies. Actuellement, peu de laboratoires ont une plateforme pour réaliser la technique de NGS notamment à cause du coût du matériel. De ce fait, il y a un goulot d'étranglement au niveau des prestataires de service devant l'afflux des demandes, étant donné l'intérêt. Dans ce contexte, un investissement dans l'achat d'un appareil semble souhaitable au CHRU non seulement pour désengorger les équipes détenant déjà un appareil mais aussi pour développer des projets communs entre différentes équipes (mutualisation).

2- Le coût : La FISH et l'Array-Painting ont des coûts quasi-équivalents si nous tenons compte du nombre de sondes à fabriquer et du temps nécessaire pour les techniques de FISH ou de la réalisation d'une lignée cellulaire et la mise en œuvre de 2 ACPA pour l'Array-Painting. Avec le développement et les progrès techniques du WGS, les prix diminuent et ce problème de coût devient de moins en moins limitant.

3- L'interprétation des résultats : Les résultats des techniques de FISH et d'Array-Painting sont d'interprétation aisée, ce qui n'est pas le cas avec le WGS. En effet, nos connaissances bioinformatiques ne permettent pas, actuellement, une interprétation rapide et sûre des

résultats obtenus après WGS. Ainsi, nous avons exploité visuellement l'ensemble des résultats de chacun des patients étudiés par séquençage haut débit grâce au logiciel IGV. Cependant, nous avons rencontré de nombreuses difficultés au moment de l'analyse par ce logiciel, notamment des Patients 10 et 11 (porteurs d'un *chromothripsis*) mais aussi lors de la recherche des points de cassure de la translocation t(4;9) de la Patiente 1. Nous avons donc réalisé des techniques complémentaires de FISH, non seulement pour mieux comprendre la réorganisation des régions chromosomiques impliquées dans les *chromothripsis*, mais aussi pour confirmer les remaniements observés, principalement chez la Patiente 1. L'association de ces 2 approches nous a permis d'interpréter un certain nombre de remaniements observé en WGS. Nous pensons donc que l'approche complémentaire par FISH est, à l'heure actuelle, encore utile particulièrement, lors d'un séquençage haut débit avec une profondeur de lecture de 10X. Cette association FISH/WGS est en accord avec la nécessité d'une approche au plus près des points de cassure par des techniques complémentaires comme l'a précisé Schluth-Bolard C dans son intervention orale aux Assises de Génétique Humaine et Médicale (2-4 février 2012 - Marseille). L'Array-Painting pourrait remplacer la FISH en se combinant au WGS. En effet, le séquençage uniquement des dérivés de remaniements chromosomiques permettraient, en théorie, d'augmenter la profondeur de lecture pour le même prix. Néanmoins, cette approche comprend aussi le coût supplémentaire de l'Array-Painting. Cependant, il est important de noter que l'étude du Patient 10 par Array-Painting et WGS confirme le fait que nous ne pouvons exclure l'utilisation de la FISH pour comprendre la réorganisation des régions chromosomiques impliquées dans le *chromothripsis* de cet enfant, si nous utilisons « séparément et non ensemble » ces techniques. Par ailleurs, suite aux résultats du Patient 10, 2 questions se posent : (i) sommes-nous sûrs d'avoir identifié l'ensemble des remaniements chromosomiques chez cet enfant ? et (ii) une profondeur de lecture supérieure à 10X, plus coûteuse, aurait-elle facilité l'analyse et donc permis de répondre à toutes nos interrogations ?

L'ensemble de ces observations montre tout l'intérêt du WGS à l'heure actuelle. Cependant, cette technique nécessite encore une approche cytogénétique notamment moléculaire pour étudier l'organisation des régions chromosomiques vu les compétences bioinformatiques actuelles et ainsi comprendre les remaniements, surtout complexes. Par ailleurs, l'ensemble des résultats de ce travail est représentatif :

1- des avantages mais aussi des limites du WGS,

2- de l'importance de la disponibilité du matériel pour les interprétations des données de cette technologie en développement et qui tend à prendre une place prépondérante dans notre travail de cytogénéticien,

3- et, de l'intégration des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire dans la pratique de routine au niveau des laboratoires de cytogénétique.

Conclusion et perspectives

De notre travail, il ressort que la technologie qui semble être la plus adaptée à l'identification des points de cassure de remaniements chromosomiques est le WGS. Ce constat est partagé avec d'autres équipes. En effet, de nombreux auteurs rapportent des patients porteurs de remaniements chromosomiques étudiés par séquençage haut débit (Chen W, et al. 2010 ; Slade I, et al. 2010 ; Sobreira NL, et al. 2011 ; Talkowski ME, et al. 2011 ; Schluth-Bolard C et al. 2013 ; Suzuki T, et al. 2014 ; Utami KH, et al. 2014). Cette technologie représente donc la technique d'avenir. Dans ce contexte, de nombreux laboratoires font l'acquisition de l'appareillage nécessaire, le plus souvent de façon mutualisée comme au CHRU de Montpellier. Une autre alternative serait le développement de plateformes régionales avec une analyse des données au niveau local, en suivant l'exemple de la mise en place des plateformes de puces à ADN regroupant plusieurs centres hospitaliers, même si, actuellement, une vision plutôt nationale serait en cours d'élaboration. Par ailleurs, le coût des analyses diminue régulièrement et de façon significative. Nous pouvons donc envisager dans un proche avenir un accès plus facile à cette technologie et avec des profondeurs de lecture plus importantes. Les recherches en cours tendent à faire de cette technique une méthode d'analyse diagnostique universelle et unique pour rechercher des mutations ponctuelles, identifier des variations du nombre de copies (CNV) et déterminer les points de cassure de tous les types de réarrangements chromosomiques en une seule étape sans orientation clinique ciblée.

Les exemples des Patients 10 et 11 montrent que cette technique d'investigation du génome humain permet d'identifier des remaniements chromosomiques plus complexes que supposés initialement. En ce qui concerne la Patient 1, cette enfant est porteuse d'un RCC composé de 2 translocations et d'une délétion interstitielle 6q24.2q25.2, cette dernière étant responsable *a priori* de son phénotype. Ce déséquilibre additionnel peut atteindre jusque 90 % lors d'un RCC selon l'équipe de Feenstra I (Feenstra I, et al. 2011). Cependant, en se basant sur les dernières données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse d'un remaniement encore plus complexe, type *chromothripsis*, qui serait alors responsable de la microdélétion. Une approche par WGS nous a permis d'exclure ce type de remaniement tout en mettant en évidence une délétion 6q24.2q25.2 plus complexe que celle initialement diagnostiquée par ACPA. L'approche par WGS chez ces différents patients semble donc être la technique de

choix, particulièrement devant un RCC, non seulement pour diagnostiquer les *chromothripsis* mais aussi pour les exclure. Ce point est essentiel notamment pour réaliser un conseil génétique adéquat. En effet, l'équipe de Bertelsen B rapporte le cas d'un *chromothripsis* qui ségrège sur 3 générations sans apparition de remaniement supplémentaire mais avec la présence de plusieurs fausses-couches spontanées (Bertelsen B, et al. 2015). Cependant, même si la plupart des cas sont transmis de manière stable, des modes de transmission déséquilibrés ont déjà été décrits dans la littérature (Gu H, et al. 2013). Par ailleurs, les données des Patients 1, 10 et 11 soulèvent quelques interrogations : (i) les explorations réalisées notamment chez les patients porteurs de RCC avant la mise en place des techniques de séquençage haut débit sont-elles complètes et (ii) pourquoi n'avons nous pu préciser des points de cassure chez le Patient 3 (en effet, en s'appuyant sur les résultats du WGS de la Patiente 1, nous pouvons effectivement émettre l'hypothèse que les délétions observées par ACPA soient plus complexes) ? Quoiqu'il en soit, les analyses se feront à l'aide de la bioinformatique de plus en plus indispensable à notre discipline pour faciliter l'interprétation de la quantité de données produites par le NGS.

Cependant, nous trouvons 4 inconvénients au WGS :

- 1- Il ne permet pas, actuellement, la visualisation morphologique « topographique » des résultats. En effet, devant un remaniement chromosomique complexe ou non, il est important de connaître l'organisation des régions chromosomiques impliquées de façon à essayer de comprendre le mécanisme chromosomique. Dans ce contexte, à l'heure actuelle, le WGS ne peut supplanter la cytogénétique classique et moléculaire qui est une aide précieuse au conseil génétique, particulièrement devant des remaniements complexes type *chromothripsis* (cf. Patients 10 et 11) ou devant des points de cassure difficiles à déterminer (cf. Patiente 1).
- 2- Certaines régions sont mal séquencées comme nous avons pu l'observer chez le Patient 11 (cf. § 5.5.1 du chapitre Résultats), ce qui peut compliquer encore plus l'interprétation des résultats. D'autres régions ne sont pas séquencées dans le génome humain de référence, notamment les régions de séquences répétées (centromères, Yq12...).
- 3- La nécessité d'un ordinateur puissant afin de visualiser correctement les résultats et ainsi observer l'ensemble des régions chromosomiques.
- 4- Ce travail montre bien qu'en dehors des microdélétions observées en ACPA et déjà décrites dans la littérature, les autres hypothèses diagnostiques suspectées doivent être confirmées par la mise en œuvre de techniques complémentaires. Cette observation concerne l'ensemble des approches utilisées pour identifier les points de cassure. Ainsi, même si le

WGS permettait de se dispenser d'une technique de confirmation des résultats, elle ne permet pas d'affirmer sans aucun doute que le ou les gènes impliqués soient responsables du phénotype d'un patient. En effet, quel que soit le diagnostic étiologique supposé, des études complémentaires, comme l'analyse de l'expression des gènes ou des analyses fonctionnelles, qui pourraient expliquer les signes cliniques, sont nécessaires. Cette technique pourrait être complétée par des études à l'aide de construction comportant un gène rapporteur (LacZ par exemple) et le gène d'intérêt dans un vecteur d'expression *in vitro* et *in vivo* ou la construction de modèles animaux.

Ce type de travail serait intéressant notamment chez la Patiente 7, pour laquelle nous avons identifié un point de cassure en 5' du gène *MEF2C* dans une région potentiellement régulatrice de ce gène (Saitou H, et al. 2011). Ainsi, chez cette enfant, nous avons :

- (i) cloné précisément le point de cassure sur le dérivé 5 afin de le localiser par rapport aux zones conservées dans la région ;
- (ii) et, poursuivi l'analyse en confirmant le rôle de cette région dans le contrôle de l'expression de *MEF2C* par des études d'expression par RT-PCR.

En conclusion de ce travail, nous proposons sur la Figure 121 un arbre décisionnel devant un remaniement chromosomique *de novo* apparemment équilibré, sachant que le séquençage haut débit va modifier profondément la discipline de génétique chromosomique telle que nous la pratiquons actuellement. Cependant, un développement de la bioinformatique est nécessaire pour simplifier et aider l'analyse et l'interprétation des résultats. A l'heure actuelle, une approche morphologique des potentiels réarrangements chromosomiques observés par WGS est encore essentielle pour comprendre l'organisation des remaniements chromosomiques dans l'espace. Nous supposons que le développement de cette technologie pourrait permettre, au vu des dernières publications de la littérature médicale et des récentes communications orales dans les congrès internationaux, une étude diagnostique globale et intégrée avec recherche de CNV, de remaniements chromosomiques (équilibrés ou non) et de mutations.

Remaniement chromosomique apparemment équilibré *de novo* chez des patients avec phénotype anormal

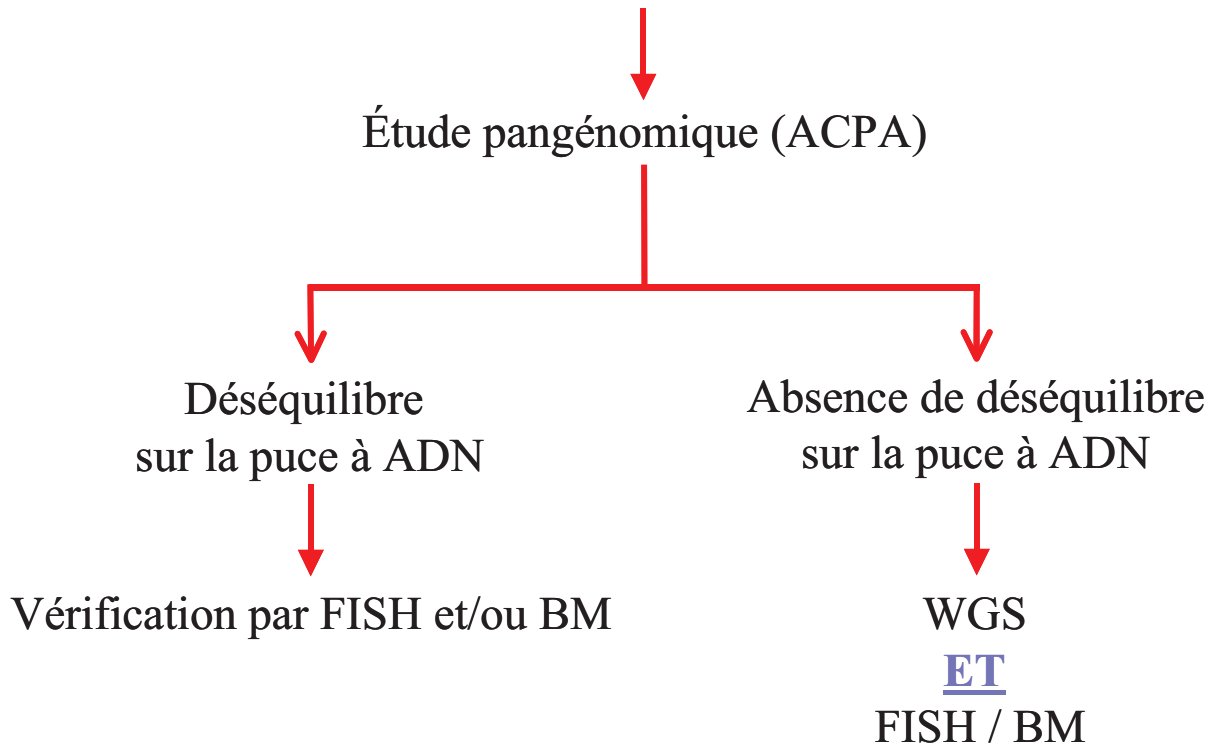


Figure 121 : Arbre décisionnel présentant la démarche diagnostique étiologique devant un remaniement chromosomique apparemment équilibré et *de novo* chez un patient à phénotype anormal.

Bibliographie

Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, *et al.* Subtelomere deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet A.* 2005 May 15;135(1):28-35.

Ahmad ME, Dada R, Dada T, *et al.* 14q(22) deletion in a familial case of anophthalmia with polydactyly. *Am J Med Genet A.* 2003 Jul 1;120A(1):117-22.

Amarillo IE, Li WL, Li X, *et al.* De novo single exon deletion of AUTS2 in a patient with speech and language disorder: a review of disrupted AUTS2 and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet A.* 2014 Apr;164A(4):958-65.

Amthor H, Connolly D, Patel K, *et al.* The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. *Dev Biol.* 1996 Sep 15;178(2):343-62.

Andrieux J. Puces à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques. *Pathologie Biologie.* 2008;56:368-374.

Angell RR. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet.* 1991 Feb;86(4):383-7.

Archer HL, Gupta S, Enoch S, *et al.* Distinct phenotype associated with a cryptic subtelomeric deletion of 19p13.3-pter. *Am J Med Genet A.* 2005 Jul 1;136(1):38-44.

Arlt MF, Ozdemir AC, Birkeland SR, *et al.* Hydroxyurea induces de novo copy number variants in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Oct 18;108(42):17360-5.

Arnemann J, Cooke HJ, Jakubiczka S, *et al.* Human Y-chromosome derived cloned DNA sequences. Human Gene Mapping 8: Eighth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 1985;40:671.

Association des Cytogénéticiens de Langue Française. *Guide des Bonnes Pratiques en Cytogénétique.* Version 3. 2014.

Baala L, Briault S, Etchevers HC, *et al.* Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nat Genet.* 2007 Apr;39(4):454-6.

Backx L, Seuntjens E, Devriendt K, *et al.* A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. *Cytogenet Genome Res.* 2011;132(3):135-43.

Bagri A, Marin O, Plump AS, *et al.* Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron.* 2002;33:233-248.

- Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, *et al.* Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res.* 2001 Jun;11(6):1005-17.
- Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, *et al.* Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet.* 2008 Jan;82(1):165-73.
- Ballif BC, Rosenfeld JA, Traylor R, *et al.* High-resolution array CGH defines critical regions and candidate genes for microcephaly, abnormalities of the corpus callosum, and seizure phenotypes in patients with microdeletions of 1q43q44. *Hum Genet.* 2012 Jan;131(1):145-56.
- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, *et al.* Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82:927-936.
- Barber JCK: Euchromatic heteromorphism or duplication without phenotypic effect? *Prenat Diagn.* 1994;14:323–324.
- Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Mar 15;91(6):2216-20.
- Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A, *et al.* Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Dec 21;101(51):17765-70.
- Baruffi MR, de Souza DH, Bicudo da Silva RA, *et al.* Autism spectrum disorder in a girl with a de novo x;19 balanced translocation. *Case Rep Genet.* 2012;2012:578018.
- Bedogni F, Hodge RD, Nelson BR, *et al.* Autism susceptibility candidate 2 (Aut2) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. *Gene Expr Patterns.* 2010 Jan;10(1):9-15.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, *et al.* Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat Genet.* 2009 Mar;41(3):359-64.
- Bennett CP, Betts DR, Seller MJ. Deletion 14q (q22q23) associated with anophthalmia, absent pituitary, and other abnormalities. *J Med Genet.* 1991 Apr;28(4):280-1.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, *et al.* Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):53-9.
- Bertelsen B, Nazaryan-Petersen L, Sun W, *et al.* A germline chromothripsis event stably segregating in 11 individuals through three generations. *Genet Med.* 2015 Aug 27.
- Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, *et al.* Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet.* 2013 Feb 7;92(2):210-20.

- Beunders G, de Munnik SA, Van der Aa N, *et al.* Two male adults with pathogenic AUTS2 variants, including a two-base pair deletion, further delineate the AUTS2 syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2015 Jun;23(6):803-7.
- Bickmore WA, van Steensel B. Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell.* 2013 Mar 14;152(6):1270-84. Review.
- Bienvenu T, Diebold B, Chelly J, *et al.* Refining the phenotype associated with MEF2C point mutations. *Neurogenetics.* 2013;14:71-75.
- Blackshaw S, SH Snyder. Encephalopsin: A novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain. *J. Neurosci.* 1999;19(10):3681–3690.
- Boland E, Clayton-Smith J, Woo VG, *et al.* Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet.* 2007 Aug;81(2):292-303.
- Brown HS, Shapiro R. Preparation and enzymatic hydrolysis of dinucleoside monophosphates and DNA modified with aromatic residues. *Biochim Biophys Acta.* 1977 Mar 18;475(2):241-53.
- Bryson SE, Bradley EA, Thompson A, *et al.* Prevalence of autism among adolescents with intellectual disabilities. *Can J Psychiatry.* 2008;53:449-59.
- Butler MG. Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet.* 1990 Mar;35(3):319-32.
- Cardoso C, Boys A, Parrini E, *et al.* Periventricular heterotopia, mental retardation, and epilepsy associated with 5q14.3-q15 deletion. *Neurology.* 2009;72:784-792.
- Carpenter NJ, Say B, Barber ND. A homozygote for pericentric inversion of chromosome 4. *J Med Genet.* 1982 Dec;19(6):469-71.
- Carter NP. Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry.* 1994 Mar 15;18(1):2-10.
- Caselli R, Mencarelli MA, Papa FT, *et al.* A 2.6 Mb deletion of 6q24.3-25.1 in a patient with growth failure, cardiac septal defect, thin upperlip and asymmetric dysmorphic ears. *Eur J Med Genet.* 2007 Jul-Aug;50(4):315-21.
- Casey JP, Magalhaes T, Conroy JM, *et al.* A novel approach of homozygous haplotype sharing identifies candidate genes in autism spectrum disorder. *Hum Genet.* 2012 Apr;131(4):565-79.
- Caspersson T, Castleman KR, Lomakka G, *et al.* Automatic karyotyping of quinacrine mustard stained human chromosomes. *Exp Cell Res.* 1971;Jul-67(1):233-5.
- Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, *et al.* Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. *Genome Res.* 2008 Jul;18(7):1143-9.

- Chen W, Ullmann R, Langnick C, *et al.* Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(5):539-43.
- Chiang C, Jacobsen JC, Ernst C, *et al.* Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet.* 2012;44:390-8.
- Ciccone R, Giorda R, Gregato G, *et al.* Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists? *Hum Genet.* 2005 Oct;117(6):571-82.
- Cohen MM Jr. The AKT genes and their roles in various disorders. *Am J Med Genet A.* 2013 Dec;161A(12):2931-7.
- Collot S, Alain S, Denis F, *et al.* Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Libbey Eurotext.* 2001 Nov-Dec;5(6).
- Conroy JM, Grebe TA, Becker LA, *et al.* Balanced translocation 46,XY,t(2;15)(q37.2;q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet.* 1997 Aug;61(2):388-94.
- Cooke HJ, Schmidtke J, Gosden JR. Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma.* 1982;87(5):491-502.
- Coyaud E, Struski S, Dastugue N, *et al.* 2010. PAX5-AUTS2 fusion resulting from t(7;9)(q11.2;p13.2) can now be classified as recurrent in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2010;34(12):e323-5.
- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, *et al.* Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet.* 1997;72:468-77.
- de Anda FC, Meletis K, Ge X, *et al.* Centrosome motility is essential for initial axon formation in the neocortex. *J Neurosci.* 2010 Aug 4;30(31):10391-406.
- de Gregori M, Ciccone R, Magini P, *et al.* Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 2007 Dec;44(12):750-62.
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med.* 2012;367:1921-9.
- de Munnik SA, García-Miñaur S, Hoischen A, *et al.* A de novo non-sense mutation in ZBTB18 in a patient with features of the 1q43q44 microdeletion syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014 Jun;22(6):844-6.
- de Winter JP, Rooimans MA, van der Weel L, *et al.* The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. (Letter) *Nature Genet.* 2000;24:15-16.
- D'haene B, Vandesompele J, Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods.* 2010 Apr;50(4):262-70.

Dale RM, Ward DC. Mercurated polynucleotides: new probes for hybridization and selective polymer fractionation. *Biochemistry*. 1975 Jun 3;14(11):2458-69.

Darwin. L'origine des espèces. 1859.

Denk D, Nebral K, Bradtke J, *et al.* PAX5-AUTS2: a recurrent fusion gene in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2012 Aug;36(8):e178-81.

Denk D, Bradtke J, König M, *et al.* PAX5 fusion genes in t(7;9)(q11.2;p13) leukemia: a case report and review of the literature. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):13.

di Gregorio E, Bianchi FT, Schiavi A, *et al.* A de novo X;8 translocation creates a PTK2-THOC2 gene fusion with THOC2 expression knockdown in a patient with psychomotor retardation and congenital cerebellar hypoplasia. *J Med Genet*. 2013 Aug;50(8):543-51.

Dion V, Gasser SM. Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell*. 2013 Mar 14;152(6):1355-64.

Dizier MH, Margaritte-Jeannin P, Madore AM, *et al.* The ANO3/MUC15 locus is associated with eczema in families ascertained through asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jun;129(6):1547-53.

Donoghue MJ, Rakic P. Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex. *J Neurosci*. 1999 15;19(14):5967-79.

Dutrillaux B, Finaz C, de Grouchy J, *et al.* Comparison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence, and proteolytic digestion. *Cytogenetics*. 1972;11(2):113-6.

Dutrillaux B. New system of chromosome banding: the T bands (author's transl). *Chromosoma*. 1973 Apr 27;41(4):395-402.

Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC *et al.* Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes *Mol psychiatry*. 2010;15(6):637-46.

Emery AC, Eiden MV, Mustafa T, *et al.* Rapgef2 connects GPCR-mediated cAMP signals to ERK activation in neuronal and endocrine cells. *Sci Signal*. 2013 Jun 25;6(281):ra51.

Engel E. A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet*. 1980;6(2):137-43.

Esa A, Edelmann P, Kreth G, *et al.* Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *J Microsc*. 2000 Aug;199(Pt 2):96-105.

Fantes J, Redeker B, Breen M, *et al.* Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Hum Mol Genet*. 1995;4:415-22.

- Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, *et al.* Balanced into array: genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2011 Nov;19(11):1152-60.
- Fernandez TV, García-González IJ, Mason CE, *et al.* Molecular characterization of a patient with 3p deletion syndrome and a review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2008 Nov 1;146A(21):2746-52.
- Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, *et al.* Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet.* 2003 Sep;40(9):664-70.
- Floris C, Rassu S, Boccone L, *et al.* Two patients with balanced translocations and autistic disorder: CSMD3 as a candidate gene for autism found in their common 8q23 breakpoint area. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:696–704.
- Frommer M, Prosser J, Vincent PC. Human satellite I sequences include a male specific 2.47 kb tandemly repeated unit containing one Alu family member per repeat. *Nucleic Acids Res.* 1984 Mar 26;12(6):2887-900.
- Galasso C, Lo-Castro A, Lalli C, *et al.* Deletion 2q37: an identifiable clinical syndrome with mental retardation and autism. *J Child Neurol.* 2008 Jul;23(7):802-6.
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1969 Jun;63(2):378-83.
- Garcia-Esparcia P, Schlüter A, Carmona M, *et al.* Functional genomics reveals dysregulation of cortical olfactory receptors in Parkinson disease: novel putative chemoreceptors in the human brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Jun;72(6):524-39.
- Gatinois V. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, 2012. Les réarrangements chromosomiques complexes : du chromosome à la molécule. Développement de deux approches méthodologiques pour la caractérisation des points de cassure.
- Giorda R, Bonaglia MC, Milani G, *et al.* Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in a girl with microcephaly, mild dysmorphic features and t(X;5)(q22.1;q31.1). *Eur J Hum Genet.* 2008 Aug;16(8):897-905.
- Glessner JT, Bradfield JP, Wang K, *et al.* A genome-wide study reveals copy number variants exclusive to childhood obesity cases. *Am J Hum Genet.* 2010 Nov 12;87(5):661-6.
- Green and Sambrook. *Molecular Cloning*, Fourth Edition, Part I, Chapter 7. 2012.
- Green and Sambrook. *Molecular Cloning*, Fourth Edition, Part I, Chapter 11. 2012.
- Gregor A, Albrecht B, Bader I, *et al.* Expanding the clinical spectrum associated with defects in CNTNAP2 and NRXN1. *BMC Med Genet.* 2011;12:106.
- Gribble SM, Fiegler H, Burford DC, *et al.* Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies. *Chromosome Res.* 2004;12(1):35-43.

- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, *et al.* The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet.* 2005 Jan;42(1):8-16.
- Gribble SM, Kalaitzopoulos D, Burford DC, *et al.* Ultra-high resolution array painting facilitates breakpoint sequencing. *J Med Genet.* 2007 Jan;44(1):51-8.
- Gribble SM, Ng BL, Prigmore E, *et al.* Array painting: a protocol for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1722-36.
- Gu H, Jiang JH, Li JY, *et al.* A familial Cri-du-Chat/5p deletion syndrome resulted from rare maternal complex chromosomal rearrangements (CCRs) and/or possible chromosome 5p chromothripsis. *PLoS One.* 2013 Oct 15;8(10):e76985.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 2008;1(1):4.
- Hafner C, Schmitz G, Meyer S, *et al.* Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem.* 2004;50(3):490-9.
- Halford S, Freedman MS, Bellingham J, *et al.* Characterization of a novel human opsin gene with wide tissue expression and identification of embedded and flanking genes on chromosome 1q43. *Genomics.* 2001;72:203–208.
- Haltaufderhyde K, Ozdeslik RN, Wicks NL, *et al.* Opsin expression in human epidermal skin. *Photochem Photobiol.* 2015 Jan-Feb;91(1):117-23.
- Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, *et al.* Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet.* 2011 Mar 11;88(3):306-16.
- Harris P, Boyd E, Ferguson-Smith MA. Optimising human chromosome separation for the production of chromosome-specific DNA libraries by flow sorting. *Hum Genet.* 1985;70(1):59-65.
- Hartzell HC, Yu K, Xiao Q, *et al.* Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Physiol.* 2009;587:2127-39.
- Hayashi S, Okamoto N, Makita Y, *et al.* Heterozygous deletion at 14q22.1-q22.3 including the BMP4 gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. *Am J Med Genet A.* 2008 Nov 15;146A(22):2905-10.
- Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, *et al.* Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry.* 1970 Jul 7;9(14):2858-65.
- Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal.* 2011 Oct;23(10):1515-27.
- Higgins JJ, Rosen DR, Loveless JM, *et al.* A gene for nonsyndromic mental retardation maps to chromosome 3p25-pter. *Neurology.* 2000;55:335-340.

- Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, *et al.* A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology*. 2004;63:1927-1931.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992 Apr;10(4):413-7.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*. 2010;68:610–38.
- Hooli BV, Kovacs-Vajna ZM, Mullin K, *et al.* Rare autosomal copy number variations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2014 Jun;19(6):676-81.
- Houldsworth J, Chaganti RS. Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol*. 1994 Dec;145(6):1253-60.
- Hsu TC. Human and mammalian cytogenetics. An historical perspective. *New York: Springer Verlag*. 1979.
- Hu Q, Yuan Y, Wang C. Structural and functional studies of FKHR-PAX3, a reciprocal fusion gene of the t(2;13) chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e68065.
- Huang XL, Zou YS, Maher TA, *et al.* A de novo balanced translocation breakpoint truncating the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with autism. *Am J Med Genet A*. 2010 Aug;152A(8):2112-4.
- Ibrahim-Verbaas CA, Bressler J, Debette S, *et al.* GWAS for executive function and processing speed suggests involvement of the CADM2 gene. *Mol Psychiatry*. 2015 Apr 14;doi: 10.1038/mp.2015.37.
- Imai S, Kano M, Nonoyama K, *et al.* Behavioral characteristics of ubiquitin-specific peptidase 46-deficient mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e58566.
- Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ *et al.* Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet*. 2014 Aug;51(8):495-501.
- Jolley A, Corbett M, McGregor L, *et al.* De novo intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with developmental delay: a case report and literature review. *Am J Med Genet A*. 2013 Jun;161A(6):1508-12.
- Joos S, Falk MH, Lichter P, *et al.* Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Hum Mol Genet*. 1992 Nov;1(8):625-32.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

- Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, *et al.* Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Hum Genet.* 2007 May;121(3-4):501-9.
- Karabay A, Yu W, Solowska JM, *et al.* Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J Neurosci.* 2004 Jun 23;24(25):5778-88.
- Karpen GH. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Apr;4(2):281-91.
- Kasper G, Taudien S, Staub E, *et al.* Different structural organization of the encephalopsin gene in man and mouse. *Gene.* 2002;295:27-32.
- Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord.* 2010;2:182-209.
- Kausch K, Haaf T, Köhler J, *et al.* Complex chromosomal rearrangement in a woman with multiple miscarriages. *Am J Med Genet.* 1988 Oct;31(2):415-20. Review.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, *et al.* Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(33):11921-6.
- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, *et al.* American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011 Jul;13(7):680-5.
- Keren B, Schluth-Bolard C, Egea G, *et al.* New technologies for the human genome exploration. *Arch Pediatr.* 2010;17:1605-8.
- Keren B. Thèse de Doctorat de Génétique. 2013. La déficience Intellectuelle. Du diagnostic en puces à ADN à l'identification de gènes candidats. Sous la direction de Brice Alexis – Paris : Université de Paris Descartes. Thèse de docteur en Sciences : Médecine : Paris : 2013. Disponible sur :
https://www.google.fr/url?sa=t&source=web&rct=j&ei=BXY0U8_xEsfEsgben4GgDw&url=http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/91/83/06/PDF/va_keren_boris.pdf&cd=2&ved=0CDQQFjAB&usg=AFQjCNEe7rNsJkT0Wj0SP_BJdB_eAQmeaA&sig2=uZoLRUPCKLcA6XQhQbXPlg.
- Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, *et al.* Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006 Aug;79(2):370-7.
- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med.* 2002 Jun;8(6):257-60. Review.
- Klein R. Eph/ephrin signalling during development. *Development.* 2012 Nov;139(22):4105-9.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet.* 1998;7(10):1611-8. Review.

- Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, *et al.* Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. *Hum Mol Genet.* 2011 May 15;20(10):1916-24.
- Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen M, *et al.* Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. *Cell Rep.* 2012;1:648-55.
- Komura D, Shen F, Ishikawa S, *et al.* Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 2006 Dec;16(12):1575-84.
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, *et al.* Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31372-8.
- Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, *et al.* Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science.* 2007 Oct 19;318(5849):420-6.
- Kotzot D, Utermann G. Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet A.* 2005 Jul 30;136(3):287-305.
- Kozulin P, Natoli R, O'Brien KM, *et al.* Differential expression of anti-angiogenic factors and guidance genes in the developing macula. *Mol Vis.* 2009;15:45-59.
- Kraus J, Weber RG, Cremer M, *et al.* High-resolution comparative hybridization to combed DNA fibers. *Hum Genet.* 1997 Mar;99(3):374-80.
- Krzywinski M, Bosdet I, Smailus D, *et al.* A set of BAC clones spanning the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 9;32(12):3651-60.
- Kumar R, Riordan D, Dawson AJ, *et al.* Proximal interstitial 6q deletion: a recognizable syndrome. *Am J Med Genet.* 1997 Aug 22;71(3):353-6.
- Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981 Nov;78(11):6633-7.
- Le Meur N, Holder-Espinasse M, Jaillard S, *et al.* MEF2C haploinsufficiency caused by either microdeletion of the 5q14.3 region or mutation is responsible for severe mental retardation with stereotypic movements, epilepsy and/or cerebral malformations. *J Med Genet.* 2010;47:22-29.
- Le Scouarnec S, Gribble SM. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity (Edinb).* 2012 Jan;108(1):75-85.
- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, *et al.* Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med.* 1981 Feb 5;304(6):325-9.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell.* 2007;131:1235-47.

- Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, *et al.* De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet.* 2012 Jun 24;44(8):941-5.
- Lee JR, Srour M, Kim D, *et al.* De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. *Hum Mutat.* 2015 Jan;36(1):69-78.
- Leifer D, Golden J, Kowall NW. Myocyte-specific enhancer binding factor 2C expression in human brain development. *Neuroscience.* 1994;63(4):1067-1079.
- Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8:117-34.
- Leoyklang P, Suphapeetiporn K, Siriwan P, *et al.* Heterozygous nonsense mutation SATB2 associated with cleft palate, osteoporosis, and cognitive defects. *Hum Mutat.* 2007 Jul;28(7):732-8.
- Leroy C, Landais E, Briault S, *et al.* The 2q37-deletion syndrome: an update of the clinical spectrum including overweight, brachydactyly and behavioural features in 14 new patients. *Eur J Hum Genet.* 2013 Jun;21(6):602-12.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754-60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 Aug 15;25(16):2078-9.
- Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 2008 Jan 4;283(1):1-5.
- Lieber MR, Lu H, Gu J, *et al.* Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res.* 2008 Jan;18(1):125-33.
- Liu P, Erez A, Sreenath Nagamani SC, *et al.* Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell.* 2011;146:889-903.
- Liu Y, Zhao D, Dong R, *et al.* De novo exon 1 deletion of AUTS2 gene in a patient with autism spectrum disorder and developmental delay: A case report and a brief literature review. *Am J Med Genet A.* 2015;67(6):1381-5.
- Lumaka A, Van Hole C, Casteels I, *et al.* Variability in expression of a familial 2.79 Mb microdeletion in chromosome 14q22.1-22.2. *Am J Med Genet A.* 2012 Jun;158A(6):1381-7.
- Lydall GJ, Bass NJ, McQuillin A, *et al.* Confirmation of prior evidence of genetic susceptibility to alcoholism in a genome-wide association study of comorbid alcoholism and bipolar disorder. *Psychiatr Genet.* 2011;21:294-306.

- Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet.* 1997 Jun;99(6):806-15. Review.
- Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet A.* 2012 Apr;158A(4):947-63. Review.
- Magliozzi R, Low TY, Weijts BG, *et al.* Control of epithelial cell migration and invasion by the IKK β - and CK1 α -mediated degradation of RAPGEF2. *Dev Cell.* 2013 Dec 9;27(5):574-85.
- Mandelkow E, Mandelkow EM. Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* 2002;12:585–91.
- Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry.* 1943;6:154-7.
- Martínez A, Soriano E. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;49(2):211-26.
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, *et al.* The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med.* 1992 Jun 11;326(24):1599-607.
- Masuda T, Sakuma C, Nagaoka A, *et al.* Follistatin-like 5 is expressed in restricted areas of the adult mouse brain: Implications for its function in the olfactory system. *Congenit Anom (Kyoto).* 2014 Feb;54(1):63-6.
- Matsuzaki H, Dong S, Loi H, *et al.* Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods.* 2004 Nov;1(2):109-11.
- Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, *et al.* A dynamic study in two new cases of X chromosome translocations. *Hum Genet.* 1978; 41:251-257.
- Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, *et al.* X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum Genet.* 1982; 61:295-309.
- Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977 Feb;74(2):560-4.
- Meloni VA, Guilherme RS, Oliveira MM, *et al.* Cytogenomic delineation and clinical follow-up of two siblings with an 8.5Mb 6q24.2-q25.2 deletion inherited from a paternal insertion. *Am J Med Genet A.* 2014 Sep;164(9):2378-84.
- Middleton FA, Trauzzi MG, Shrimpton AE, *et al.* Complete maternal uniparental isodisomy of chromosome 4 in a subject with major depressive disorder detected by high density SNP genotyping arrays. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Jan 5;141B(1):28-32.

- Midorikawa R, Takei Y, Hirokawa N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell*. 2006;125:371–83.
- Miki H, Setou M, Kaneshiro K, *et al*. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:7004–11.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, *et al*. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010 May 14;86(5):749-64.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, *et al*. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res*. 2006 Sep;16(9):1182-90.
- Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, *et al*. Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*. 1996 Oct 4;87(1):105-14.
- Modarressi MH, Taylor KE, Wolfe J. Cloning, characterization, and mapping of the gene encoding the human G protein gamma 2 subunit. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 7;272(2):610-5.
- Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, *et al*. FSTL3 deletion reveals roles for TGF-beta family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Jan 23;104(4):1348-53.
- Munné S, Weier HU, Grifo J, *et al*. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod*. 1994 Sep;51(3):373-9.
- Munné S, Marquez C, Magli C, *et al*. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:863–870.
- Nagamani SC, Erez A, Eng C, *et al*. Interstitial deletion of 6q25.2-q25.3: a novel microdeletion syndrome associated with microcephaly, developmental delay, dysmorphic features and hearing loss. *Eur J Hum Genet*. 2009 May;17(5):573-81.
- Nagamani SC, Erez A, Bay C, *et al*. Delineation of a deletion region critical for corpus callosal abnormalities in chromosome 1q43-q44. *Eur J Hum Genet*. 2012 Feb;20(2):176-9.
- Nagamani SC, Erez A, Ben-Zeev B, *et al*. Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*. 2013 Mar;21(3):343-6.
- Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, *et al*. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res*. 1986 Oct 10;14(19):7569-80.
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, *et al*. Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci*. 2002;22:5473-5480.

- Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, *et al.* Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet.* 2002;110:418-421.
- Nolen LD, Amor D, Haywood A, *et al.* Deletion at 14q22-23 indicates a contiguous gene syndrome comprising anophthalmia, pituitary hypoplasia, and ear anomalies. *Am J Med Genet A.* 2006 Aug 15;140(16):1711-8.
- Novara F, Beri S, Giorda R, *et al.* Refining the phenotype associated with MEF2C haploinsufficiency. *Clin. Genet.* 2010;78:471-477.
- Novara F, Rizzo A, Bedini G, *et al.* MEF2C deletions and mutations versus duplications: a clinical comparison. *Eur J Med Genet.* 2013 May;56(5):260-5.
- Nowaczyk MJ, Carter MT, Xu J, *et al.* Paternal deletion 6q24.3: a new congenital anomaly syndrome associated with intrauterine growth failure, early developmental delay and characteristic facial appearance. *Am J Med Genet A.* 2008 Feb 1;146(3):354-60.
- O'Driscoll MC, Black GC, Clayton-Smith J, *et al.* Identification of genomic loci contributing to agenesis of the corpus callosum. *Am J Med Genet A.* 2010 Sep;152A(9):2145-59.
- Oeseburg B, Dijkstra GJ, Groothoff JW, *et al.* Prevalence of chronic health conditions in children with intellectual disability: a systematic literature review. *Intellect Dev Disabil.* 2011;49:59-85.
- Ogawa J, Kaneko H, Masuda T, *et al.* Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain. *Neurosci Lett.* 1996 Nov 8;218(3):173-6.
- Oksenberg N, Ahituv N. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends Genet.* 2013 Oct;29(10):600-8.
- Oldknow KJ, Seebacher J, Goswami T, *et al.* Follistatin-like 3 (FSTL3) mediated silencing of transforming growth factor β (TGF β) signaling is essential for testicular aging and regulating testis size. *Endocrinology.* 2013 Mar;154(3):1310-20.
- Oohashi T, Zhou XH, Feng K, *et al.* Mouse ten-m/Odz is a new family of dimeric type II transmembrane proteins expressed in many tissues. *J Cell Biol.* 1999;145:563-577.
- Orellana C, Roselló M, Monfort S, *et al.* Corpus callosum abnormalities and the controversy about the candidate genes located in 1q44. *Cytogenet Genome Res.* 2009;127(1):5-8.
- Paciorkowski AR, Traylor RN, Rosenfeld JA, *et al.* MEF2C Haploinsufficiency features consistent hyperkinesia, variable epilepsy, and has a role in dorsal and ventral neuronal developmental pathways. *Neurogenetics.* 2013 May;14(2):99-111.
- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008;42:301-34.

- Panza E, Gimelli G, Passalacqua M, *et al.* The breakpoint identified in a balanced de novo translocation t(7;9)(p14.1;q31.3) disrupts the A-kinase (PRKA) anchor protein 2 gene (AKAP2) on chromosome 9 in a patient with Kallmann syndrome and bone anomalies. *Int J Mol Med.* 2007 Mar;19(3):429-35.
- Papasavva T, van Ijcken WF, Kockx CE, *et al.* Next generation sequencing of SNPs for non-invasive prenatal diagnosis: challenges and feasibility as illustrated by an application to β -thalassaemia. *Eur J Hum Genet.* 2013 Dec;21(12):1403-10.
- Patel K, Connolly DJ, Amthor H, *et al.* Cloning and early dorsal axial expression of Flik, a chick follistatin-related gene: evidence for involvement in dorsalization/neural induction. *Dev Biol.* 1996 Sep 15;178(2):327-42.
- Pathak S, Arrighi FE. Loss of DNA following C-banding procedures. *Cytogenet Cell Genet.* 1973;12(6):414-22.
- Pellestor F, Puechberty J, Weise A, *et al.* Meiotic segregation of complex reciprocal translocations: direct analysis of the spermatozoa of a t(5;13;14) carrier. *Fertil Steril.* 2011 Jun;95(7):2433.e17-22.
- Pellestor F. Chromothripsis: how does such a catastrophic event impact human reproduction? *Hum Reprod.* 2014 Mar;29(3):388-93.
- Pellestor F, Gatinois V, Puechberty J, *et al.* Chromothripsis, an unexpected novel form of complexity for chromosomal rearrangements. *Med Sci (Paris).* 2014 Mar;30(3):266-73.
- Pennacchio LA, Ahituv N, Moses AM, *et al.* In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature.* 2006 Nov 23;444(7118):499-502.
- Petterson B, Bourke J, Leonard H, *et al.* Co-occurrence of birth defects and intellectual disability. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007;21:65-75.
- Pinkel D, Gray JW, Trask B, *et al.* Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:151-7.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11
- Pinson L, Mannini L, Willems M, *et al.* CEP57 mutation in a girl with mosaic variegated aneuploidy syndrome. *Am J Med Genet A.* 2014 Jan;164A(1):177-81.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, *et al.* Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron.* 2002;33:219-232.
- Poduri A, Evrony GD, Cai X, *et al.* Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron.* 2012 Apr 12;74(1):41-8.
- Pohjola P, de Leeuw N, Penttinen M, *et al.* Terminal 3p deletions in two families--correlation between molecular karyotype and phenotype. *Am J Med Genet A.* 2010 Feb;152A(2):441-6.

- Poirier MC, Yuspa SH, Weinstein IB, *et al.* Detection of carcinogen-DNA adducts by radiomunoassay. *Nature*. 1977 Nov 10;270(5633):186-8.
- Randolph TR. Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. *Clin Lab Sci*. 2005 Winter;18(1):38-48.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, *et al.* Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2006;140:2063-74.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, *et al.* Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet*. 2012;380:1674-82.
- Rausch T, Jones DTW, Zapatka M, *et al.* Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell*. 2012;148:59-71
- Redies C, Hertel N, Hübner CA. Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res*. 2012 Aug 27;1470:130-44.
- Reis LM, Tyler RC, Schilter KF, *et al.* BMP4 loss-of-function mutations in developmental eye disorders including SHORT syndrome. *Hum Genet*. 2011 Oct;130(4):495-504.
- Ren CM, Liang Y, Wei F, *et al.* Balanced translocation t(3;18)(p13;q22.3) and points mutation in the ZNF407 gene detected in patients with both moderate non-syndromic intellectual disability and autism. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1832(3):431-8.
- Rivière JB, Ramalingam S, Lavastre V, *et al.* KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Am J Hum Genet*. 2011 Aug 12;89(2):219-30.
- Rivière JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, *et al.* De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet*. 2012 Jun 24;44(8):934-40.
- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreëls F. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol*. 1997;39:125-32.
- Rosenfeld JA, Ballif BC, Lucas A, *et al.* Small deletions of SATB2 cause some of the clinical features of the 2q33.1 microdeletion syndrome. *PLoS One*. 2009 Aug 10;4(8):e6568.
- Roth DB, Porter TN, Wilson JH. Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1985 Oct;5(10):2599-607.
- Roukos DH. Next-generation, genome sequencing-based biomarkers: concerns and challenges for medical practice. *Biomark Med*. 2010 Aug;4(4):583-6.
- Roukos DH. Next-generation sequencing and epigenome technologies: potential medical applications. *Expert Rev Med Devices*. 2010 Nov;7(6):723-6.

Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*. 1978 Aug 31;274(5674):911-3.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al*. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, *et al*. Minimal definition of the imprinting center and fixation of chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Jul 23;93(15):7811-5.

Saitsu H, Igarashi N, Kato M, *et al*. De novo 5q14.3 translocation 121.5-kb upstream of MEF2C in a patient with severe intellectual disability and early-onset epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A*. 2011 Nov;155A(11):2879-84.

Salvador-Carulla L, Reed GM, Vaez-Azizi LM, *et al*. Intellectual developmental disorders: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability" in ICD-11. *World Psychiatry*. 2011;10:175-80.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441-8.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, *et al*. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977 Feb 24;265(5596):687-95.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Sanlaville D, Baumann C, Lapierre JM, *et al*. De novo inverted duplication 9p21pter involving telomeric repeated sequences. *Am J Med Genet*. 1999 Mar 12;83(2):125-31.

Savelieva KV, Rajan I, Baker KB, *et al*. Learning and memory impairment in Eph receptor A6 knockout mice. *Neurosci Lett*. 2008 20;438(2):205-9.

Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, *et al*. Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports (11th edition). Annapolis Junction (USA): *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities*. 2010.

Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, *et al*. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet*. 2009 Sep-Oct;52(5):291-6.

Schluth-Bolard C, Lesca G, Till M, *et al*. Apport du séquençage haut débit dans le clonage des points de cassure chez quatre patients porteurs de remaniements chromosomiques apparemment équilibrés à phénotype anormal, communication orale L9. 6^{ème} Assises de Génétique Humaine et Médicale 2012:2-4 Fév 2012 (Marseille - France).

Schluth-Bolard C, Labalme A, Cordier MP, *et al*. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. *J Med Genet*. 2013;50(3):144-50.

- Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet.* 1992;42:161-169.
- Schneider A, Puechberty J, Ng BL, *et al.* Identification of disrupted AUTS2 and EPHA6 genes by array painting in a patient carrying a de novo balanced translocation t(3;7) with intellectual disability and neurodevelopment disorder. *Am J Med Genet A.* 2015 Sep 3;doi: 10.1002/ajmg.a.37350.
- Schultz J. Variegation in Drosophila and the Inert Chromosome Regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1936 Jan;22(1):27-33.
- Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. An International System for Human Cytogenetic. *Karger:* Basel, Switzerland, 2013.
- Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, *et al.* Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet.* 2002 Dec 1;11(25):3145-56.
- Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, *et al.* Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science.* 2005 Sep 9;309(5741):1728-32.
- Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008 Oct;26(10):1135-45.
- Shimoda Y, Watanabe K. Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh Migr.* 2009 Jan-Mar;3(1):64-70. Review.
- Shoukier M, Klein N, Auber B, *et al.* Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet.* 2013;83:53-65.
- Silva JP, Lelianova VG, Ermolyuk YS, *et al.* Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Jul 19;108(29):12113-8.
- Singh SM, Castellani C, O'Reilly R. Autism meets schizophrenia via cadherin pathway. *Schizophr. Res.* 2009;116:293-294.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003 Jun 19;423(6942):825-37.
- Slade I, Stephens P, Douglas J, *et al.* Constitutional translocation breakpoint mapping by genome-wide paired-end sequencing identifies HACE1 as a putative Wilms tumour susceptibility gene. *J Med Genet.* 2010 May;47(5):342-7.
- Sobreira NL, Gnanakkan V, Walsh M, *et al.* 2011. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Genome Res.* 2011;21(10):1720-7.
- St John MA, Tao W, Fei X, *et al.* Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):182-6.

- Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Jul;84(14):5034-7.
- Stamelou M, Charlesworth G, Cordivari C, *et al*. The phenotypic spectrum of DYT24 due to ANO3 mutations. *Mov Disord*. 2014 Jun;29(7):928-34.
- Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17:182-92.
- Startek M, Szafranski P, Gambin T, *et al*. Genome-wide analyses of LINE-LINE-mediated nonallelic homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2015 Feb 27;43(4):2188-98.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, *et al*. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011 Jan 7;144(1):27-40.
- Sukumar S, Wang S, Hoang K, *et al*. Subtle overlapping deletions in the terminal region of chromosome 6q24.2-q26: three cases studied using FISH. *Am J Med Genet*. 1999 Nov 5;87(1):17-22.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, *et al*. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics*. 2002 Aug;80(2):129-34.
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, *et al*. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole-genome sequencing. *J Hum Genet*. 2014;59(12):649-54.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, *et al*. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. *Am J Hum Genet*. 2011;88(4):469-81.
- Talkowski ME, Rosenfeld JA, Blumenthal I, *et al*. Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell*. 2012 Apr 27;149(3):525-37.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, *et al*. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet*. 2009;41:535-43.
- Tegay DH, Chan KK, Leung L, *et al*. Toriello-Carey syndrome in a patient with a de novo balanced translocation [46,XY,t(2;14)(q33;q22)] interrupting SATB2. *Clin Genet*. 2009 Mar;75(3):259-64.
- Terakita A. The opsins. *Genome Biol*. 2005;6:213.
- The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005. 437:1299-1320.

- Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, *et al.* Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J.* 2007 Nov;28(22):2778-84.
- Thienpont B, Zhang L, Postma AV, *et al.* Haploinsufficiency of TAB2 causes congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet.* 2010 Jun 11;86(6):839-49.
- Thomas LA, Akins MR, Biederer T. Expression and adhesion profiles of SynCAM molecules indicate distinct neuronal functions. *J Comp Neurol.* 2008 Sep 1;510(1):47-67.
- Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas.* 1956;42:1-6.
- Toffolatti L, Cardazzo B, Nobile C, *et al.* Investigating the mechanism of chromosomal deletion: characterization of 39 deletion breakpoints in introns 47 and 48 of the human dystrophin gene. *Genomics.* 2002;80:523-530.
- Towers P, Patel K, Withington S, *et al.* Flik, a chick follistatin-related gene, functions in gastrular dorsalisation/neural induction and in subsequent maintenance of midline Sonic hedgehog signalling. *Dev Biol.* 1999 Oct 15;214(2):298-317.
- Toyo-Oka K, Sasaki S, Yano Y, *et al.* Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov 1;14(21):3113-28.
- Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, *et al.* Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development.* 2005 Jul;132(13):2943-54.
- Tsukamoto K, Tohma T, Ohta T, *et al.* Cloning and characterization of the inversion breakpoint at chromosome 2q35 in a patient with Waardenburg syndrome type I. *Hum Mol Genet.* 1992 Aug;1(5):315-7.
- Tucker RP, Kenzelmann D, Trzebiatowska A, *et al.* Teneurins: transmembrane proteins with fundamental roles in development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(2):292-7.
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):157-65.
- Unni DK, Piper M, Moldrich RX, *et al.* Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum. *Dev Biol.* 2012 May 1;365(1):36-49.
- Utami KH, Hillmer AM, Aksoy I, *et al.* Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. *PLoS One.* 2014 Mar 6;9(3):e90852.
- van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet.* 2011;45:81-104.

- van Bon BW, Koolen DA, Borgatti R, *et al.* Clinical and molecular characteristics of 1qter microdeletion syndrome: delineating a critical region for corpus callosum agenesis/hypogenesis. *J Med Genet.* 2008 Jun;45(6):346-54.
- van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, *et al.* Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study. *Am J Ment Retard.* 2005;110:253-67.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008 Apr;44(5):619-26.
- Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, *et al.* Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2005 Apr;76(4):652-62.
- Venter JC, Levy S, Stockwell T, *et al.* Massive parallelism, randomness and genomic advances. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:219-27.
- Verjaal M, De Nef MB. A patient with a partial deletion of the short arm of chromosome 3. *Am J Dis Child.* 1978 Jan;132(1):43-5.
- Vermeesch J. Retrotransposable elements, unbalanced translocations and chimerism, communication orale L16. 10th European Cytogenetics Conference 2015:4-7 July 2015 (Strasbourg - France). *Chromosome Res.* 2015 Jun;23 Suppl 1:S17.
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, *et al.* A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet.* 2010;42:1109-12.
- Voelkerding KV, Dames S, Durtschi JD. Next generation sequencing for clinical diagnostics-principles and application to targeted resequencing for hypertrophic cardiomyopathy: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2010 Sep;12(5):539-51.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991 Nov;49(5):995-1013.
- Warburton PE, Hasson D, Guillem F, *et al.* Analysis of the largest tandemly repeated DNA families in the human genome. *BMC Genomics.* 2008 Nov 7;9:533.
- Waters JJ, Campbell PL, Crocker AJ, *et al.* Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: a retrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. *Hum Genet.* 2001 Apr;108(4):318-27.
- Watson et Crick. A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid. *Nature.* 1953;number 4356 - April 25.
- White JH, Chiano M, Wigglesworth M, *et al.* Identification of a novel asthma susceptibility gene on chromosome 1qter and its functional evaluation. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1890-1903.

- Willemsen MH, Ba W, Wissink-Lindhout WM, *et al.* Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *J Med Genet.* 2014 Jul;51(7):487-94.
- Yamaguchi Y, Pasquale EB. Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14(3):288-96.
- Yatsenko SA, Hixson P, Roney EK, *et al.* Human subtelomeric copy number gains suggest a DNA replication mechanism for formation: beyond breakage-fusion-bridge for telomere stabilization. *Hum Genet.* 2012;131:1895-910.
- Ye K, Schulz MH, Long Q, *et al.* Pindel: pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics.* 2009 Nov 1;25(21):2865-71.
- Ye T, Ip JP, Fu AK, *et al.* Cdk5-mediated phosphorylation of RapGEF2 controls neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Commun.* 2014 Sep 5;5:4826.
- Yonekawa Y, Harada A, Okada Y, *et al.* Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J Cell Biol.* 1998;141:431-41.
- Yoon S, Xuan Z, Makarov V, *et al.* Sensitive and accurate detection of copy number variants using read depth of coverage. *Genome Res.* 2009 Sep;19(9):1586-92.
- Young TR, Leamey CA. Teneurins: important regulators of neural circuitry. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 May;41(5):990-3.
- Yun ME, Johnson RR, Antic A, *et al.* EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J Comp Neurol.* 2003;10:456(3):203-16.
- Yunis JJ, Chandler ME. High-resolution chromosome analysis in clinical medicine. *Prog Clin Pathol.* 1978;7:267-88.
- Zanni G, Barresi S, Cohen R, *et al.* A novel mutation in the endosomal Na⁺/H⁺ exchanger NHE6 (SLC9A6) causes Christianson syndrome with electrical status epilepticus during slow-wave sleep (ESES). *Epilepsy Res.* 2014 May;108(4):811-5.
- Zhang J, Chiodini R, Badr A, *et al.* The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics.* 2011 Mar 20;38(3):95-109. Review.
- Zhang YE, Landback P, Vibranovski MD, *et al.* Accelerate recruitment of new brain development genes into the human genome. *PLoS Biol.* 2011 Oct;9(10):e1001179.
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell.* 2001;105:587-97.
- Zuko A, Kleijer KT, Oguro-Ando A, *et al.* Contactins in the neurobiology of autism. *Eur J Pharmacol.* 2013 Nov 5;719(1-3):63-74.

Zweier M, Gregor A, Zweier C, *et al.* Mutations in MEF2C from the 5q14.3q15 microdeletion syndrome region are a frequent cause of severe mental retardation and diminish MECP2 and CDKL5 expression. *Hum Mutat.* 2010;31:722-733.

ANNEXE 1

Patients	Phénotype														Variations morphologiques	
	Consanguinité	Naissance	Mensurations de naissance	DI	Epilepsie	Retard de langage	Troubles du comportement	Problèmes d'attention, de concentration	Troubles du sommeil	Evolution	Troubles (neuro)musculaires	Troubles digestifs / de l'alimentation / de la déglutition /	Retard de croissance staturo-pondéral	Retard pubertaire		Signes généraux
1				+	-	-	-	-	-			+	+	+	Insuffisance pulmonaire Malformations cardiaques	Conduits auditifs externes petits Hypertélorisme Macroglossie Palais creux
2	non	39SA	PN : 2990g TN : 47cm PCN : 34cm	+	-	-	-	+	-	Marche à 17 mois Difficultés graphomotrices	Dyspraxie Dyskinésie Hypotonie	-	+	-	Souffle cardiaque Strabisme sur amblyopie	
3			PN : 3700g TN : 50cm	+	-	+	-	+	-	Marche à 16 mois Difficultés		-	-	-		
4		à terme		+	-	+	+	+	-	Marche à > 22 mois Assis à 10 mois Difficultés	Dyspraxie Hypertonie	-	-	-		
5			PN : 3720g TN : 52cm PCN : 36,5cm	+	+	+	+	-	+		Ataxie Dystonie	-	+	-	Cyphoscoliose	Os propres du nez élargis Palais creux
6	oui	40SA	PN : 3550g TN : 50cm PCN : 35cm	+	-	+	+	-	< 3 ans	Marche à > 2 ans assis à 15 mois	Ataxie Troubles Pyramidaux	-	-	-	Troubles ophtalmiques Microcéphalie post-natale	Bosses frontales bien présentes oreilles mal ourlées Hypotélorisme Ptosis Fentes palpébrales en bas Sourcils archés Racine du nez plate Philtrum court Hypoplasie maxillaire Lèvres charnues Lèvre supérieure éversée
7		à terme	PN : 3200g TN : 49cm PCN : 34cm	+	-	+	+	-	-	Marche à 22 mois Assis à 10 mois		-	-	-		Oreilles décollées Hélix simple Sourcils assez étalés
8	non	césarienne	PN : 3200g TN : 52cm PCN : 35cm	+	-	-	+	+	+	Marche à 12 mois Assis à 9 mois		-	-	-		Epicanthus inversus Philtrum long
9			PN : 2840g TN : 48cm PCN : 33cm	+	-	+	+	-	-			+	-	-	Lésions cutanées	Fente palatine
10			PN : 3650g TN : 52cm PCN : 32cm	+	-	-	-	-	-	Marche à 24 mois Assis à > 10 mois	Dyspraxie Discrète ataxie Hypotonie globale Troubles Pyramidaux	+	-	-		
11		35SA	PN : 2560g TN : 46,5cm PCN : 33,5cm	+	-	-	-	-	-			-	+	-	Malformations cardiaques Malformations cérébrales Microcéphalie	
12				+	-	+	-	+	-		Dystonie	-	-	-		Epicanthus bilatéral Fentes antimongoloïdes

Tableau XVII : Détails des symptômes cliniques des patients étudiés

ANNEXE 2

Hybridation Fluorescente *in situ*, ou technique FISH :

Protocole technique sur lame non dénaturée. Sondes directement marquées

1- PRÉPARER LES SOLUTIONS SUIVANTES - J1

Solution de 2X SSC à pH 7 au bain-marie à +37°C.
Solution de Post-Fixation à température ambiante.
Solution PBS 1x à température ambiante : préparer 2 bacs.
Solution de pepsine au bain-marie à +37°C.
Ethanol à 70 % (v/v) à température ambiante.
Ethanol à 85 % (v/v) à température ambiante.
Ethanol à 100 % (v/v) à température ambiante.
Attendre l'équilibre des températures.

2- PRÉTRAITEMENT DES LAMES - J1

Placer les lames dans le bac de SSC 2x au bain-marie pendant 10min.
Les traiter 15 min dans la solution de Post-Fixation.
Rincer les lames 5 min dans le premier bac de PBS 1X.
Traiter les lames 13 min dans le bac de pepsine au bain-marie à +37°C.
Les rincer 5 min dans le second bac de PBS 1X.
Laisser sécher les lames à l'air libre.

3- CODÉNATURATION ET HYBRIDATION - J

Tremper les lames 1min dans l'éthanol à 70 %.
Puis 1min dans l'éthanol à 85 %.
Puis 1min dans l'éthanol à 100 %.
Les faire sécher sur l'Hybrite® à +45°C pendant 2 à 4min.
Déposer la sonde sur la zone cible de la lame.
Immédiatement, placer sur ce dépôt une lamelle de verre de 22x22mm.
Sceller cette lamelle avec du *rubber cement*.
Placer à l'Hybrite® 3min à +70°C pour dénaturation (temps et température variables selon recommandation du fournisseur).

Hybrider à +37°C dans une chambre humide *over-night*.

4- RINÇAGE ET CONTRE-COLORATION - J2

Eliminer délicatement la lamelle et le *ruber cement*.

Rincer les lames 2min dans la solution de 0,4X SSC / 0,3 % NP40 à +73°C.

Puis 1min dans la solution de 2X SSC / 0,1 % NP40 à température ambiante.

Laisser sécher les lames à l'abri de la lumière.

Déposer 10µl de solution de DAPI sur la zone hybridée et recouvrir d'une lamelle de verre de 24x60mm.

ANNEXE 3

Protocole technique de déshybridation de lame de FISH

Plonger la lame 5 à 10min dans un bain de PBD à température ambiante.

Eliminer la lamelle de l'hybridation précédente.

Eliminer l'excès de DAPI par un bain de 10min de PBS à 37°C.

Plonger rapidement la lame dans un bain d'eau stérile.

Plonger rapidement la lame dans un bain d'éthanol à 70 %.

Faire 2 bains de 15min dans des bacs à température ambiante contenant une solution de 4X SSC / 0,05 % Tween 20.

Tremper la lame 10 sec dans un bain de PBS 1X.

Puis 10sec dans un bain d'eau.

Laisser sécher complètement la lame.

Tremper la lame dans des bains d'éthanol de concentration croissante : 70 %, 90 % et 100 % pendant 1min chacun.

Codénaturer et hybrider la nouvelle sonde aussitôt.

ANNEXE 4

Protocole technique de la fabrication des sondes BACs à façon

1- MISE EN CULTURE DES BACTÉRIES PORTEUSES DU BAC :

sous hotte

Préparer une boîte de Pétri avec du milieu LB additionné de 100µl de la solution 1 d'antibiotique chloramphénicol.

A partir de la banque à ADN, à l'aide d'une pipette Pasteur, prélever dans le puis correspondant la colonie bactérienne à isoler.

Déposer cette colonie sur la boîte de Pétri et laisser incuber *over-night* à 37°C.

2- PASSAGE SUR BOUILLON DE CULTURE : sous hotte

Repérer et prélever une colonie isolée.

La réensemencer dans un tube contenant 3ml de milieu LB liquide additionné de 3ml de la solution 2 d'antibiotique chloramphénicol.

Incuber sous agitation permanente à 37°C pendant 16 heures.

3- REPIQUAGE DU BOUILLON DE CULTURE : sous hotte

Vérifier que le bouillon de pré-culture soit bien trouble.

En prélever 1ml et le réensemencer dans un flacon contenant 50ml du milieu LB liquide additionné de 50µl de chloramphénicol.

Incuber sous agitation permanente à 37°C pendant 16H.

4- EXTRACTION DES BAC : selon le protocole du Kit Qiagen plasmid Midi kit

(100) :

Vérifier que le bouillon de culture soit bien trouble.

Centrifuger 30min à 4500tr/min. Eliminer le surnageant.
 Remettre en suspension les bactéries dans 10ml de tampon P1 (avec RNase).
 Ajouter 10ml de tampon P2 (lyse des bactéries), homogénéiser par retournements et incubé 5min à température ambiante.
 Ajouter 10ml de tampon P3 à froid (précipitation des débris cellulaires), homogénéiser par retournements et incubé 20min sur glace.
 Centrifuger 30min à 13000tr/min.
 Réhydrater les colonnes d'extraction par 10ml de tampon QBT.
 Transférer le surnageant dans ces colonnes réhydratées et laisser filtrer par gravité.
 Laver la colonne par 2 passages de tampon QC.
 Eluer l'ADN de la colonne par 3 passages de tampon QF préchauffé à 65°C.
 Précipiter l'ADN par ajout de 5ml d'isopropanol à température ambiante.
 Centrifuger 30min à 10000 tr/min à 15°C et éliminer le surnageant.
 Ajouter 500µl d'une solution de NaCl, puis 500µl d'isopropanol.
 Visualiser le précipité d'ADN.
 Centrifuger 30min à 10000tr/min à 4°C, éliminer le surnageant et laisser sécher à l'air libre.
 Ajouter 800µl d'éthanol froid à 70 % et homogénéiser.
 Centrifuger 30min à 10000tr/min à 4°C, éliminer le surnageant et laisser sécher à l'air libre.
 Ajouter 40µl de tampon TE 1X à pH 8,0.
 Vérifier la qualité des BACs extraits sur gel d'agarose 1 %.

5 - NICK-TRANSLATION

Préparer un mix des dNTP additionné de dUTP marqué à la biotine ou à la digoxigénine.
 Ajouter 5 à 10µl de solution de BACs extrait et 3µl d'enzyme de Nick translation.
 Laisser agir l'enzyme de 15 à 60min selon la température ambiante.
 Stopper la réaction en plongeant le tube dans la glace.
 Vérifier la qualité des sondes obtenues sur gel d'agarose à 1 % : observation d'une "trainée" entre 200 et 500 pb.
 Dénaturer les sondes, stockées à -20°C, 10min au bain-marie à 65°C.
 A 20 µl de sonde, ajouter 5µl de sperme de saumon et 2,5µl de CH₃COONa 3M à pH 5,2.
 Agiter par vortex et centrifuger.
 Ajouter 80µl d'éthanol pur à -20°C pour précipiter l'ADN et incubé 30min à -80°C.
 Centrifuger 20min à 13300tr/min, éliminer le surnageant et laisser sécher à l'air libre.
 Ajouter 10µl de Cot 1 et 50µL de tampon d'hybridation 60 % de formamide.

ANNEXE 5

Protocole technique de FISH des sondes BACs

1- Préparation des lames - Prétraitement des échantillons

Cf. Annexe 2 - chapitre 2 - Prétraitement des lames - J1

A noter quelques spécificités techniques :

- Supprimer l'étape de post-fixation au formaldéhyde.
- Digestion enzymatique à la pepsine à 37°C pendant seulement 10min.

2- Co-dénaturation des lames et des sondes. Hybridation

Cf. Annexe 2 - chapitre 3 - Co-dénaturation et hybridation - J1

3- Lavages post-hybridation

Cf. Annexe 2 - chapitre 4 - Préparer les solutions pour rinçages - J2

A noter quelques spécificités techniques :

- Eliminer délicatement la lamelle et le *ruber cement*.
- Rincer les lames 2min dans la solution de 0,4X SSC / 0,3 % NP40 à +73°C.
- Puis 1min dans la solution de 2X SSC / 0,1 % NP40 à température ambiante.
- Laver dans une solution de PBD pendant 5min à température ambiante et sous agitation lente.
- Laisser sécher complètement les lames.

4- Révélation et contre-coloration : A noter quelques spécificités techniques

Préparer la solution suivante pour autant de lame à techniquer :

- 150µl de PBS.
- 1µl d'anticorps anti-biotine.
- 1µl d'anticorps anti-digoxigénine.

Déposer 150µl par lame, recouvrir de Parafilm[®] et incuber 30min à 37°C en chambre humide. Eliminer le Parafilm[®] et tremper les lames dans 3 bains de 2X SSC / 0,1 % NP40 à température ambiante, 5min chacun et sous agitation lente.

Plonger rapidement les lames dans un bac contenant de l'eau stérile.

Procéder à la contre-coloration par un bain de DAPI pendant 2min à température ambiante.

Plonger rapidement les lames dans un nouveau bac d'eau stérile.

Plonger rapidement les lames dans un bain d'éthanol 70 %.

Laisser sécher les lames à l'abri de la lumière.

Sur chaque lame : déposer une goutte de VectaShield[®] et recouvrir d'une lamelle 26x32mm.

Laisser reposer 15min à +4°C et à l'abri de la lumière avant lecture au microscope à fluorescence.

ANNEXE 6

Liste des BAC utilisés dans ce travail

BAC	bande chromosomique	début (pb)	fin (pb)
RP11-59M03	1q43	240188606	240349820
RP11-113O11	1q43	243504111	243699803
RP11-794A13	1q43	243549368	243737467
RP11-370K11	1q44	243787133	243912168
RP11-535H01	1q44	243788233	243976347
RP11-10O6	1q44	243932265	244089707
RP11-110E19	1q44	244092473	244261950
RP11-795M07	1q44	245452140	245643890
RP11-72B20	3p12.1	84520856	84707864
RP11-754J20	3p12.1	85008774	85192090
RP11-180C01	4p15.1	28367719	28550535
RP11-98B06	4q11q12	52681898	52856481
RP11-177B04	4q12	53480760	53656825
RP11-756P18	4q28.3	132994228	133150156
RP11-462M05	4q28.3	132645678	132794267
RP11-356O21	5p14.3	22131367	22297611
RP11-320M08	5q34	167560480	167751587
RP11-25P22	5q35.1	168772841	168954588
RP11-455K21	6q25.1	149654525	149846533
RP11-69O3	7q36.3	155500886	155653624
RP11-153O07	9p24.1	6641741	6804229
RP11-367K01	9p24.1	6988164	7150161
RP11-428L09	10p14	8866587	9044297
RP11-796C22	10p14	11971850	12165075
RP11-124N14	10p13	17128684	17306570
RP11-725M05	10p12.31	21616742	21797310
RP11-231I07	10p12.2	22659937	22808043
RP11-639H07	10p12.2	23735326	23912370
RP11-174I18	10p12.2	24101867	24235239
RP11-145L14	10p12.2p12.1	24453608	24627901
RP11-165A20	10p12.1	25231601	25369091
RP11-29I13	10p12.1	25590398	25754506
RP11-648L23	10p12.1	26163563	26311994
RP11-416J15	14q22.1	51230464	51413342
RP11-336C08	14q22.1	51388716	51585280
RP11-762L21	14q22.1	51514916	51685478
CTD-2297J14	14q22.2	54885051	55035454
RP11-779N21	14q22.2	54948512	55107823
RP11-299D05	14q22.2	55040581	55239866
RP11-262B02	14q22.2	55210607	55354689

ANNEXE 7

Procédure de réception et d'entretien des lignées lymphoblastiques

Ce travail est à réaliser sous hotte à flux laminaire

1- RECONSTITUER UN MILIEU DE CULTURE SPÉCIFIQUE POUR LIGNÉE

Stabilité de 1 mois.

2- À LA RÉCEPTION DES LIGNÉES

Procéder tout de suite à un changement du milieu de culture :

- Transférer la totalité du liquide de transport contenant les cellules dans un tube conique de 50ml.
- Centrifuger 5min à 1200tr/min.
- Eliminer le surnageant par aspiration.
- Avec précaution, remettre le culot en suspension dans 10ml de milieu reconstitué.
- Transférer cette suspension dans un flacon de culture de 25cm² et le placer à l'étuve à 37°C et 5 % de CO₂.

3- ENTRETIEN DES LIGNÉES

Procéder au changement de milieu 2 fois par semaine :

* Attention : Si le surnageant vire au jaune, augmenter la fréquence des changements de milieu.

* Procédure :

- Transférer la totalité de la suspension cellulaire dans un tube conique de 15ml ou de 50ml en fonction du volume initial.
- Centrifuger 5min à 1200 tour/min.
- Eliminer le surnageant par aspiration.

Avec précaution, remettre le culot en suspension dans un volume de milieu frais équivalent au volume initial.

- Transférer cette suspension dans un flacon de culture de 25cm² ou de 75cm² en fonction du volume et le placer à l'étuve à 37°C et 5 % de CO₂.

A noter : Si le virage au jaune s'observe en moins de 24 heures, les cellules ont atteint la confluence, il faut alors subdiviser la culture en procédant à un changement de milieu mais en doublant le volume de remise en suspension.

Quelques précautions :

- si on veut conserver les flacons à plat, il n'est pas conseillé de mettre plus de :

20ml de liquide dans un flacon de 25cm².

30ml de liquide dans un flacon de 75cm².

Si nécessaire, et afin de ne pas dépasser ces volumes, transférer le liquide dans 2 flacons de culture.

- En cas de suspicion de contamination bactérienne ou fongique d'un flacon de culture ou du flacon de milieu reconstitué :

Rechercher cette contamination par ensemencement une goutte du milieu de culture suspecté sur des boîtes de Pétri avec gélose "chocolat", mise dans une étuve à 37°C.

Les boîtes sont observées tous les matins pendant 3 jours.

→ Si aucune pousse n'est observée au 3^{ème} jour, la suspicion est écartée, l'entretien des cultures reprend comme précédemment.

→ Si une pousse est observée, discuter du sort des cellules avec le biologiste.

ANNEXE 8

Liste des amorces utilisées dans ce travail

Patients	Couples	Nom de l'amorce	séquences nucléotidiques
Patiente 1	Couple 1	P1-4-S	5'-CCCGGCCAATATATCTTTACTTC-3'
		P1-9-S	5'-GCATTGGAAAGGAAATCACTATGG-3'
	Couple 2	P1-4-AS	5'-GGGTAACAGAGTAAGACTACG-3'
		P1-9-AS	5'-AACCCAGAAATGTTTTACTTGCTG-3'
	Couple 3	P1-7-S	5'-TAATAAACTTGCTGTTGATGTGGG-3'
		P1-8-AS	5'-CCTCCGGATTGAAATCGTGAC-3'
	Couple 4	P1-7-AS	5'-GGGCTAGGATCTTTCAAAGAC-3'
		P1-8-S	5'-AGCACACAGCATTCTGCAAG-3'
	Couple 5	P1-del6-14351-S	5'-AGTCTGAGGATGTTCAAGACATC-3'
		P1-del6-146-S	5'-CAAATCAGTACAAACCGACTTCAC-3'
	Couple 6	P1-del6-14351-S	5'-AGTCTGAGGATGTTCAAGACATC-3'
		P1-del6-14355-AS	5'-CCAAGGTCATATAATCTCAGGAC-3'
	Couple 7	P1-del6-14351-S	5'-AGTCTGAGGATGTTCAAGACATC-3'
		P1-del6-153-AS	5'-TTTACATTCCCACCAACAATGTAC-3'
	Couple 8	P1-del6-14355-AS	5'-CCAAGGTCATATAATCTCAGGAC-3'
		P1-del6-153-AS	5'-TTTACATTCCCACCAACAATGTAC-3'
	Couple 9	P1-del6-14355-AS	5'-CCAAGGTCATATAATCTCAGGAC-3'
		P1-del6-153-AS	5'-TTTACATTCCCACCAACAATGTAC-3'
	Couple 10	P1-del6-146-S	5'-CAAATCAGTACAAACCGACTTCAC-3'
		P1-del6-153-AS	5'-TTTACATTCCCACCAACAATGTAC-3'
Patient 5	Couple 1	P5-qPCR1-S	5'-AGACAGAAACTCGGCAGGTG-3'
		P5-qPCR1-AS	5'-GGAAGCAGGGTATCCTTCCG-3'
	Couple 2	P5-qPCR2-S	5'-AGTACCTACGGTCGCCAGAT-3'
		P5-qPCR2-AS	5'-TGGTGGTGATGGGACAGTTG-3'
	Couple 3	P5-qPCR3-S	5'-GCAGCAAGTCAGAAACCAGC-3'
		P5-qPCR3-AS	5'-CGTTGGTGAGGTCTCAGCTT-3'
	Couple 4	P5-qPCR4-S	5'-ACTGTCAGGACCTTCCCCTT-3'
		P5-qPCR4-AS	5'-TGTCTCTCGTACTAGGGC-3'
	Couple 5	P5-qPCR5-S	5'-CACCCACCCAGGTTATGTCC-3'
		P5-qPCR5-AS	5'-CTGGGATTTTTGCAGTGGGC-3'
Patient 6	Couple 1	P6-3-S-C	5'-TTCTTGTTTTAGGGAATCAGATCC-3'
		P6-7-AS-E	5'-AGGTCTGAAATTTACTGCCAGCC-3'
	Couple 2	EPHA6-ex1-S	5'-TTCTTGCCTCTGCTGACAGC-3'
		AUTS2-ex7-AS	5'-TCTTTAAGCACCCACAGGCTC-3'
	Couple 3	AUTS2-ex4-S	5'-TCCTTCCAGCTTGGGAACAG-3'
		EPHA6-ex3-AS	5'-TCTTTGCAAGTCCCCAAGAC-3'
Patiente 7	Couple 1	P7-3-S	5'-TCCCAAAGGCTGATATATTGGATC-3'
		P7-5-S	5'-TGTACATTTGAGATTACACTTGGC-3'
	Couple 2	Mef2C-F	5'-CGAGATGCCAGTCTCCATCC-3'
		Mef2C-R	5'-AGCAGACCTGGTGAGTTTCG-3'

Patients	Couples	Nom de l'amorce	séquences nucléotidiques
Patiente 8	Couple 1	USP46-E2-F	5'-GACCAGGGAAGATGCTTGTC-3'
		USP46-E2-R	5'-TTTTCCAGAGCAGAGGCATT-3'
	Couple 2	USP46-E8-F	5'-GGTCCTAATCGTGGGCATTA-3'
		USP46-E8-R	5'-TGGGGATTAGCAGAATTTGG-3'
Patient 10	Couple 1	P10-15/3-3S	5'-CTCCCAGTCTTTCTACATTAGTC-3'
		P10-15/3-AS	5'-CCCATGAAAAGTGACTAACGAAAC-3'
	Couple 2	P10-5/15-S	5'-TGGAAGTCGTGGAGAATGAG-3'
		P10-5/15-AS	5'-AAGCCACCTGCATATCTTCG-3'
	Couple 3	P10-L1-5-S	5'-CATCAGAGAAATGCAATGCC-3'
		P10-L1-5-AS	5'-GTTTACGCTGCATAGAGCTG-3'
	Couple 4	P10-5-3 S point C	5'-TTGTTTCTCCATGTGCTTTTCAGC-3'
		P10-3-5 AS point C	5'-GTCAAAGCATCCAGAAATGTACG-3'
	Couple 5	P10-del5-S	5'-GCAGCTTTCTTGTGATATTTTCTCC-3'
		P10-del5-AS	5'-CCTTAGTCAGAGTACTGTGAATC-3'
	Couple 6	P10-rem 5 S	5'-AGGCGATTTCCATCAGGACAG-3'
		P10-rem 5 AS	5'-GTTATGCCAGCTCAGCAGATTG-3'
Patiente 12	Couple 1	P12-4-AS	5'-GACAGGGTCTTGCTGTGTCC-3'
		P12-7-AS	5'-TATTTTTGAGACGGAGTTTTGCTC-3'
	Couple 2	P12-4-S	5'-TAAAAGCAGGCCACCCAAGC-3'
		P12-7-S	5'-CTACACTTTCTAAAAGGGACACG-3'

Gènes de référence	Couples	Nom de l'amorce	séquences nucléotidiques
Beta-2-Microglobuline	Couple 1	B2-microglo-F	5'-CTTTGTCACAGCCCAAGATAG-3'
		B2-microglo-R	5'-ATCCAAATGCGGCATCTTC-3'
RPL22	Couple 1	RPL22-expr-F	5'-TCGCTCACCTCCCTTTCTAA-3'
		RPL22-expr-R	5'-TCACGGTGATCTTGCTCTTG-3'
RPL27	Couple 1	RPL27-expr-F	5'-ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA-3'
		RPL27-expr-R	5'-TCTGAAGACATCCTTATTGACC-3'
RPS29	Couple 1	RPS29-expr-F	5'-AAAATTCGGCCAGGGTTCTC-3'
		RPS29-expr-R	5'-GTGCCAAGGAAGACAGCTCAG-3'

ANNEXE 9

Protocole de RT

Etape 1	quantité d'ARN	QSP 1000ng
	quantité d'eau	QSP 11,5µl
Etape 2	RH (0,005µg/µl)	1µl
	dNTP (0,5mM)	1µl
Etape 3	5 min à 65°C	
	glace	
Etape 4	Mix Tp 5X (1X)	4µl
	DTT (0,01mM)	2µl
	RT M-MLV	0,5µl
Etape 5	10 min à 25°C	
	60 min à 37°C	
	15 min à 70°C	
	old à 4°C	

ANNEXE 10

Préparations des solutions utilisées

Colchicine 1mg/ml (solution mère)

- 100mg de colchicine
- 100ml de NaCl

Colchicine 2µg/ml (solution fille)

- 1ml de la solution mère de colchicine
- 500ml de NaCl

Ethanol 70 %

- 700ml d'éthanol absolu
- 300ml d'H₂O

Ethanol 85 %

- 850ml d'éthanol absolu
- 150ml d'H₂O

Ethanol 90 %

- 900ml d'éthanol absolu
- 100ml d'H₂O

KCl 0,05M

- 2g de KCl
- 500ml d'eau de volvic

Milieu de culture pour les lignées cellulaires

- 500 ml de milieu RPMI
- 5 ml de L-glutamine 100x (si le milieu RPMI n'en contient pas déjà)
- 100 ml de sérum de veau fœtal décomplémenté 30 min à 56°C
- 5 ml d'antibiotique : pénicilline 10000UI et streptomycine 10000µg
- 2 ml d'antifongique : amphotéricine B à 250µg/ml

PBS 1X

- 2 pastilles de PBS
- 1000ml d'H₂O

Pepsine

- 0,5g de pepsine
- 5ml d'H₂O

Réactifs pour la technique d'Array-Painting**- Polyamine buffer**

Tris	15mM
KCl	80mM
Dithiothréitol	3mM
EDTA	2mM
EGTA	0,5mM
Triton X-100	25 % (v/v)

Conservation +4°C, 1 mois

- Solution hypotonique

KCl	75mM
MgSO ₄	10mM
Spermine	0,2mM
Spermidine	0,5mM

Préparation extemporanée

- Turck's stain

Violet de Gentiane	0,01 % (v/v)
Acide acétique	1 % (v/v)

Conservation +4°C, 1 an

- Iodure de Propodium 1mg/ml**- Préparation du Dye fluo****Chromomycine A3**

10mg dans 1mL d'éthanol
conservation à -20°C, 1 an

Hoescht 33258

solution mère 10mg/ml
concentration finale 5µg/ml
conservation à +4°C, 1 an

Solution de citrate de sodium

solution mère 1M
concentration finale 10mM
conservation -20°C, 1 an

Solution de Sulfite de sodium

solution mère 500mM
concentration finale 25mM
conservation -20°C, 1 an

MgSO₄,7H₂O

solution mère 1M
concentration finale 10mM

Réactif de Carnoy

- 1/4 acide acétique glacial
- 3/4 méthanol

Solution 1 d'antibiotique chloramphénicol

- 90µl de milieu LB liquide
- 10µl d'antibiotique chloramphénicol

Solution 2 d'antibiotique chloramphénicol

- 3 ml de LB liquide
- 3µl d'antibiotique chloramphénicol

Solution mère de contre-coloration au DAPI (1mg/ml)

- 1mg de poudre de DAPI
- 1ml d'H₂O

Solution fille pour le bain de contre-coloration au DAPI

- 3µl d'une solution mère de DAPI à 1mg/ml
- 80ml d'eau stérile

Solution d'Earle Orange

- 10 ml de solution mère EBSS 10X
- Eau stérile QSP 100ml
- Ajuster le pH à 5,35 avec une solution de NaHCO₃
- Laisser stabiliser sous agitation magnétique pendant 15 min

Solution de Giemsa pour bandes G

- 3ml de solution mère de Giemsa
- 3ml de méthanol
- 8ml de Na₂HPO₄ 0,2M
- 4ml d'acide citrique
- Eau stérile QSP 100ml

Solution de Giemsa pour bandes R

- 7,5ml de solution mère
- 250ml d'eau

Solution de pepsine

- 0,8ml d'HCl 1N
- 72,9ml d'eau MilliQ
- 100µl de pepsine 10 % (P/V)

Solution de Post-Fixation

- 4ml de formaldéhyde
- 156ml de PBS 1X
- 0,72g de MgCl₂

TE 1X

- 10ml de TE 10X
- 90ml d'H₂O

Trypsine 1g/l

- 1g de trypsine
- diluer 2 pastilles de PBS dans un peu d'eau stérile
- transvaser l'ensemble dans une fiole de 1l
- eau stérile QSP 1l

CH₃COONa 3M à pH 5,2

- 24,6g de CH₃COONa
- 100ml d'H₂O
- ajuster le pH

0,4X SSC / 0,3 % NP40

- 16ml de SSC 20x
- 784ml d'eau stérile
- 2,4ml de NP40

2X SSC / 0,1 % NP40

- 80ml de SSC 20x
- 720ml d'eau stérile
- 0,8ml de NP40

4X SSC / 0,05 % Tween 20

- 20ml de SSC 20x
- 80ml d'eau stérile
- 50µl de Tween 20

ARTICLE

Identification of Disrupted *AUTS2* and *EPHA6* genes by Array Painting in a Patient carrying a de novo Balanced Translocation t(3;7) with Intellectual Disability and Neurodevelopment Disorder.

Identification of Disrupted *AUTS2* and *EPHA6* Genes by Array Painting in a Patient Carrying a De Novo Balanced Translocation $t(3;7)$ With Intellectual Disability and Neurodevelopment Disorder

Anouck Schneider,^{1*} Jacques Puechberty,² Bee Ling Ng,³ Christine Coubes,² Vincent Gatinois,¹ Magali Tournaire,¹ Manon Girard,¹ Bruno Dumont,¹ Pauline Bouret,¹ Julia Magnetto,⁴ Amaria Baghdadli,⁴ Franck Pellestor,¹ and David Geneviève^{1,2}

¹Laboratoire de Génétique Chromosomique, Plateforme de puces à ADN, CHRU de Montpellier, France

²Département de Génétique Médicale, CHRU de Montpellier, France

³Cytometry Core Facility, The Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, United Kingdom

⁴CRA, Département de Psychiatrie de l'Enfant et de l'Adolescent, Centre de Ressources Autisme, CHRU de Montpellier, France

Manuscript Received: 13 April 2015; Manuscript Accepted: 12 August 2015

Intellectual disability (ID) is a frequent feature but is highly clinically and genetically heterogeneous. The establishment of the precise diagnosis in patients with ID is challenging due to this heterogeneity but crucial for genetic counseling and appropriate care for the patients. Among the etiologies of patients with ID, apparently balanced de novo rearrangements represent 0.6%. Several mechanisms explain the ID in patients with apparently balanced de novo rearrangement. Among them, disruption of a disease gene at the breakpoint, is frequently evoked. In this context, technologies recently developed are used to characterize precisely such chromosomal rearrangements. Here, we report the case of a boy with ID, facial features and autistic behavior who is carrying a de novo balanced reciprocal translocation $t(3;7)(q11.2;q11.22)dn$. Using microarray analysis, array painting (AP) technology combined with molecular study, we have identified the interruption of the autism susceptibility candidate 2 gene (*AUTS2*) and EPH receptor A6 gene (*EPHA6*). We consider that the disruption of *AUTS2* explains the phenotype of the patient; the exact role of *EPHA6* in human pathology is not well defined. Based on the observation of recurrent germinal and somatic translocations involving *AUTS2* and the molecular environment content, we put forward the hypothesis that the likely chromosomal mechanism responsible for the translocation could be due either to replicative stress or to recombination-based mechanisms. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: *AUTS2*; balanced translocation; array painting; intellectual disability

INTRODUCTION

Intellectual disability (ID) is a common disorder that affects up to 3% of the population [Haddad et al., 2009]. ID displays heterogeneous

How to Cite this Article:

Schneider A, Puechberty J, Ng BL, Coubes C, Gatinois V, Tournaire M, Girard M, Dumont B, Bouret P, Magnetto J, Baghdadli A, Pellestor F, Geneviève D. 2015. Identification of disrupted *AUTS2* and *EPHA6* genes by array painting in a patient carrying a de novo balanced translocation $t(3;7)$ with intellectual disability and neurodevelopment disorder. *Am J Med Genet Part A* 9999A:1–7.

origins, including acquired or genetic etiologies [Rauch et al., 2006]. The precise diagnosis of ID is an essential challenge that allows to define the mode of inheritance in an attempt to evaluate the risk of recurrence, and possibly to propose a prenatal diagnosis. About 3–15% of patients with ID present numerical or structural chromosomal abnormalities. Most of them are unbalanced rearrangement [Schluth-Bolard et al., 2009]. However, 0.6% of patients with ID present an apparently balanced chromosomal rearrangement [Rauch et al., 2006], for instance de novo reciprocal translocations.

Grant sponsor: Regional University Hospital of Montpellier.

*Correspondence to:

Anouck Schneider, Laboratoire de Génétique Chromosomique, CHU de Montpellier 371, avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail: a-schneider@chu-montpellier.fr

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2015

DOI 10.1002/ajmg.a.37350

Different mechanisms can be evoked to explain the link of these balanced rearrangements to ID: subtle rearrangement at the breakpoints [Kumar et al., 1998; Schluth-Bolard et al., 2009], formation of a fusion gene with a novel function [Di Gregorio et al., 2013], perturbation of the expression of the genes by positional effect [Kleinjan and van Heyningen, 1998], perturbation of parental imprinting [Dupont et al., 2002], or disruption of one or two genes at the breakpoints leading to a loss of function of these genes [Kleefstra et al., 2006].

To date, two methods have been adapted to identify the structural rearrangements and to define the breakpoints position of de novo reciprocal translocations: fluorescence in situ hybridization (FISH) walking [Tapia-Páez et al., 2000] and next generation sequencing (NGS) [Chen et al., 2010; Slade et al., 2010; Sobreira et al., 2011; Talkowski et al., 2011; Schluth-Bolard et al., 2013; Suzuki et al., 2014; Utami et al., 2014]. Another efficient approach called “Array Painting” (AP) has been developed by Fiegler et al. [2003], which combines flow sorting and DNA microarrays to precisely identify the breakpoint locations [Gribble et al., 2004].

Based on this original procedure, we report the molecular characterization of a de novo balanced reciprocal translocation t(3;7)(q11.2;q11.22)dn that reveals the interruption of autism susceptibility candidate 2 (*AUTS2*) in a male with ID, facial, and autistic features.

CLINICAL REPORT

The proband is the second child born to healthy first cousin parents.

The boy was born at 38 weeks of gestation by normal delivery after a normal full-term gestation. Birth parameters were at mean (birth weight: 3.505 kg; birth length: 50 cm; and occipital frontal circumference [OFC]: 35 cm). He was breastfed for 4 months. He sat at 15 months and walked at 2 years of age. He presented a speech delay diagnosed since 3 years of age.

At the age of 8 years and 4 months, growth measurements were normal for weight and size. He presented a postnatal microcephaly (OFC: 49 cm, -3 SD).

He also suffered from neurodevelopmental disorder, hyperactivity, and sleep disturbance. He still presented a speech delay, as well as autistic features such as abnormal behaviors, namely sensory, and motor stereotypes which manifest themselves through flapping in emotionally charged situations, compulsive opening–closing doors, and interrupters. In addition, he threw all objects through the windows, smelling his food prior to ingestion and was hypersensitive to noise. Based on these features, he was investigated for autism but was not assessed to be autistic, using the ADOS and ADIR screening tests.

Psychometric evaluation using WPPSI-III cannot be fully established because of patients’ tiredness and motor instability. However, the patient presented an ID with a delayed development estimated at 3 years of age for a chronological age at 8 years and 4 months. Using Vineland adaptive behavior scales (mean at 100), we observed abnormal diminished scores with an adaptive social profile at 59 in communication, 63 in daily life and autonomy, as well as 66 in social skills.

Facial features observed in the patient are similar than observed in previously reported patients with *AUTS2* molecular anomalies, namely, mild ptosis, short and downslanted palpebral fissure, highly arched eyebrows, full lips, strabismus, short philtrum, and large central incisors (Fig. 1). Brain MRI with spectroscopy, audition, and visual functions as well as skeletal X-rays were normal. Urine and blood metabolic screening was also normal.

Parents of the patient gave their informed consent before participating in this study, and this study was approved by the institutional review board of Montpellier hospital.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetics

Cytogenetic analysis was performed according to standard techniques, using GTG-banded and RHG-banded chromosomes from



FIG. 1. Front and lateral view of the patient at 8 years and 4 months. Note mild ptosis, short and downslanted palpebral fissure, highly arched eyebrows, full lips, strabismus, short philtrum and large central incisors.

cultured lymphocytes. Karyotypes of the patient and his parents were analysed using Ikaros[®] software (MetaSystems, Altlußheim, Germany). Specific chromosomal painting probes (Poseidon, Amsterdam, The Netherlands) were used for additional FISH techniques.

Microarray Analysis

The extraction of DNA was performed from blood lymphocytes of the patient using QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). High-resolution microarray analysis was realized with GeneChip[®] Human Mapping 6.0 SNP Array kit (Affymetrix, High Wycombe, UK). GTC 4.2 software (GenoTyping Console, Affymetrix) was used to data extraction. The analysis of data was carried out using an homemade database (Cytogalaxie, CHRU Montpellier, France).

Array Painting

We applied the protocol previously described by Gribble et al. [2009]. Briefly, chromosomes were prepared from the patient lymphocytes after treatment with colcemid and polyamine isolation buffer. The derivative chromosomes were sorted using a flow sorter (MoFlo[®], Beckman Coulter, High Wycombe, UK) to obtain an amount equivalent to 10 ng of DNA for each derivative chromosome. After DNA's amplification by GenomePlex[®] Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), we used the high resolution GeneChip[®] Human Mapping Cytoscan HD Array (Affymetrix). Extraction and interpretation of data were performed with the ChAS 2.1 software (Chromosome Analysis Suite, Affymetrix). A transition between a high and a low log₂ ratio is used to identify the chromosome breakpoint.

Molecular Analysis

The precise mapping of breakpoints pinpointed by AP was performed using long range polymerase chain reaction (PCR; Promega standard kit with GoTaq[®] long PCR Master kit, Promega, Charbonnières, France). The subsequent sequence analysis was realized on Hitachi 3130x/Genetic Analyser (Applied Biosystem, Life Technologies, Saint-Aubin, France). The sequences spanning the junctions are aligned, on hg 19 reference (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/>), using BLAST [Kent, 2002].

RNA Extraction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA extraction and RT-PCR for the detection of eventual *EPHA6-AUTS2* and/or *AUTS2-EPHA6* transcripts were performed according to standard procedures using primers *EPHA6-ex1-S* (5'-TTCTTGCTCTGCTGACAGC-3'), *EPHA6-ex3-AS* (5'-TCTTTGCAAGTCCCCAAGAC-3'), *AUTS2-ex4-S* (5'-TCCTTCCAGC-TTGGGAACAG-3'), and *AUTS2-ex7-AS* (5'-TCTTTAAGCACCA CAGGCTC-3') located in exons 1 and 3 of *EPHA6* and exons 4 and 7 of *AUTS2*, respectively. Amplification was realized with M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Paisley, UK) and the results were visualized on an agarose gel.

RESULTS

The chromosome analysis of the patient and his parents shows a de novo apparently balanced reciprocal translocation 46,XY,t(3;7)(q11.2;q11.22)dn. FISH analysis with chromosome painting probes for chromosomes 3 and 7 confirms the only implication of chromosomes 3 and 7 in this rearrangement.

The microarray analysis from the patient's blood sample was normal, excluding the presence of small chromosomal structural changes at the breakpoints or small chromosomal structural involving other chromosomes. These data confirm that the translocation is balanced. AP assays allowed us a fine mapping of the breakpoints within intervals ranging from 89 to 9133 pb. Thus, we evaluate the breakpoint on chromosome 3 to lie between base pairs 96696524 and 96705657, and the breakpoint on chromosome 7 to lie between base pairs 70189223 and 70189312 (Fig. 2). The analysis of these regions revealed the interruption of two genes namely Ephrin (EPH) receptor A6 (*EPHA6*) and *AUTS2* located on the chromosomes 3 and 7, respectively.

A precise mapping analysis of the breakpoints using long range PCR strategy confirmed that the breakpoint on chromosome 3 is located at 96699437 bp in the intron 2 of *EPHA6* and that the breakpoint on chromosome 7 is localized at 70190828 bp in the intron 6 of *AUTS2* (Fig. 2).

RNA studies looking for hypothetical *EPHA6-AUTS2* and/or *AUTS2-EPHA6* gene fusion revealed the absence of fusion transcript.

DISCUSSION

In this study, we report the cloning of the breakpoints of a balanced reciprocal translocation t(3;7)(q11.2;q11.22)dn in a patient with ID using the AP strategy. Different methods are available in the mapping of the breakpoints from a balanced reciprocal translocation. These include an early technique known as "Chromosome Walking" which involved FISH mapping as well as the more recent techniques such as "Whole Genome Sequencing" (WGS) and AP. AP was first described by Fiegler et al. [2003] and has been shown to be effective in the identification of atypical chromosomal breakpoints [Gribble et al., 2009] as well as chromosomal rearrangements with complexity [Fauth et al., 2006].

AP allows rapid detection of rearranged chromosomes and their breakpoints when compared to the labor intensive "chromosome walking" method [Gribble et al., 2004]. Moreover, AP delivers a significantly higher resolution which provides a more refine information about the breakpoints of a balanced reciprocal translocation directly based on the clone size and spacing on the array. However, a limiting factor to AP application is that the procedure involves the use of high end flow sorter and other specific equipment whereby not many labs are equipped with [Gribble et al., 2009].

Using AP strategy, we have successfully cloned the two breakpoints of the t(3;7)(q11.2;q11.22)dn and observed the disruption of two genes namely *EPHA6* on the derivative 3 and *AUTS2* on the derivative 7.

EPHA6 belongs to the family of the Eph receptors, a subfamily of receptor tyrosine kinases which are activated in response to binding

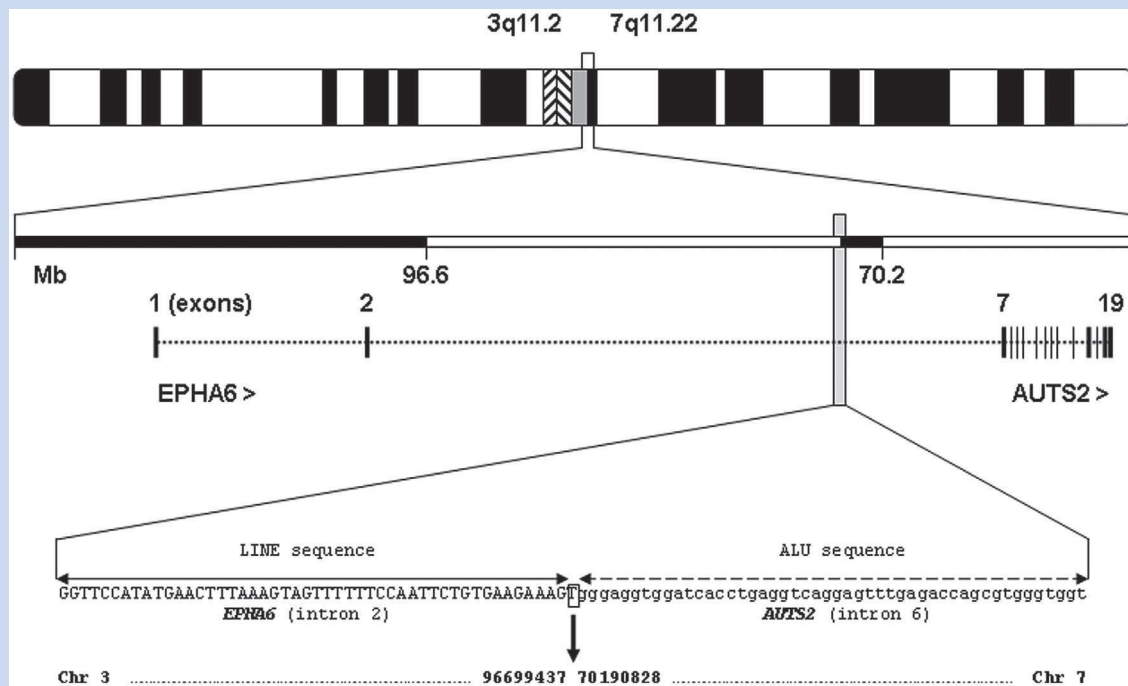


FIG. 2. Schematic representation of the derivative 3 with focus and details on the precise breakpoint junction between intron 2 of *EPHA6* gene and intron 6 of *AUTS2* gene. On top: derivative 3 ideogram; middle: scale in Megabases (Mb) in fusion region 3q11.2 and 7q11.2 and schematic structure of a putative fusion gene *EPHA6/AUTS2* (vertical lines for exons and dotted line for introns); at the bottom: sequence junction between intron 2 of *EPHA6* and intron 6 of *AUTS2* (horizontal arrows: repeated sequences LINE on the intron 2 of *EPHA6* and Alu on the intron 6 of *AUTS2*; black square: shared nucleotide between the two breakpoints; vertical arrow: breakpoint; nucleotide position on hg19 reference sequence in bp).

ephrin. Eph/ephrin signaling has been involved in the regulation of large and variable processes such as axon guidance, formation of tissue boundaries, cell migration, and segmentation [Klein, 2012]. Several studies, using knockout mice, have described the roles of Eph receptors on learning and memory processes [Yamaguchi and Pasquale, 2004; Martínez and Soriano, 2005]. The exact role of *EPHA6* in human pathology is not well defined. In human, *EPHA6* is preferentially highly expressed in brain, testis [Hafner et al., 2004], developing retina, and ganglion cells [Kozulin et al., 2009]. In addition *EPHA6* has been demonstrated to be involved in forming neural networks and is selectively expressed during mouse corticogenesis within the cortical plate [Yun et al., 2003] as well as in the embryonic primate cerebral cortex [Donoghue and Rakic, 1999]. Savelieva et al. [2008] have observed learning and memory defects in knockout mice *EphA6*^{-/-}, compared to wild-type mice but without evident neuropathology during a histological examination. In addition, copy number variations overlapping *EPHA6* have been observed in two unrelated patients with familial Alzheimer's disease suggesting that *EPHA6* dysregulation could be a possible pathogenic pathway leading to Alzheimer's disease [Hooli et al., 2014]. Furthermore, small deletions involving the rs9843398 at vicinity of the *EPHA6-UNQ6114* locus have been observed in a series of children with nonsyndromic obesity (1/1080 and 5/1479 European Americans and African American obese children, respectively) suggesting that deletion at this locus could also

contribute to obesity [Glessner et al., 2010]. Taken together, these data make it difficult to formally attribute an effect of the haploinsufficiency of *EPHA6* in human disease.

AUTS2 is the other gene interrupted at the second breakpoint and is involved in autosomal dominant intellectual disability (MIM: 615834). This gene is highly expressed in developing limbs, ears, and neural tube, as well as in embryonic fetal and adult brain. *AUTS2* encodes for a nuclear protein that is primarily expressed in various cellular types in the brain such as the cells of the neocortex [Oksenberg and Ahituv, 2013].

Either chromosomal rearrangements of *AUTS2* such as intra-genic deletions [Beunders et al., 2013, 2014; Nagamani et al., 2013; Jolley et al., 2013; Amarillo et al., 2014; Liu et al., 2015], duplications [Elia et al., 2010; Nagamani et al., 2013], inversion [Bakkaloglu et al., 2008; Beunders et al., 2013], translocations (see below), or point mutations [Beunders et al., 2014] have been reported to be responsible for ID and/or development delay as well as autistic features and microcephaly in human. In addition, some facial features are reported in patients from the literature with molecular anomalies in *AUTS2*, namely high arched eyebrow, ptosis, strabismus, and short philtrum. The patient from this report presents ID, microcephaly and quite similar facial features to the patients from the literature except for downslanted palpebral fissure. Based on this data, we speculate that *AUTS2* disruption could explain a part of the phenotype of the patient reported here.

Interestingly, recurrent germinal as well as somatic translocations involving *AUTS2* have been reported in the literature. In 2002, Sultana et al. reported for the first time a pair of autistic twins carrying a de novo translocation interrupting *AUTS2*. They proposed that the disruption of *AUTS2* was responsible for the phenotype in the twins [Sultana et al., 2002]. Thenceforth, five additional patients with balanced reciprocal translocations leading to the disruption of *AUTS2* were described in the literature [Kalscheuer et al., 2007; Huang et al., 2010; Beunders et al., 2013]. In addition, recurrent translocations involving *AUTS2* leading to a fusion gene with *PAX5* have been described in four patients with leukemia [Kawamata et al., 2008; Coyaud et al., 2010; Denk et al., 2012, 2014].

The main chromosomal mechanism to explain cytogenetic recurrent rearrangements is the nonallelic homologous recombination (NAHR) between two low-copy repeats (LCRs), [Gu et al., 2008]. Rarely, highly homologous repetitive sequences, such as Alu or LINE, which are observed near the breakpoints in this patient (Fig. 2), can mediate this type of recombination. However, these rare NAHRs are usually observed in nonrecurrent rearrangements [Gu et al., 2008]. The other mechanism responsible for recurrent *AUTS2* translocations could be replication stress [Amarillo et al., 2014]. Indeed, *AUTS2* is localized in a region of hotspots of de novo CNV induced by hydroxyurea and aphidicolin [Amarillo et al., 2014]. This suggests that the recurrence of *AUTS2* translocations could be due to microhomology mediated

break-induced replication (MMBIR) or fork stalling and template switching (FoSTeS) [Hastings et al., 2009; Zhang et al., 2009]. Consequently, either NAHR or MMBIR as well as FoSTeS mechanisms can be evoked to be responsible for *AUTS2* rearrangements. Indeed, even if these translocations could be considered recurrent at the chromosomal level, the specific breakpoints observed by more resolutive techniques (i.e., BAC-FISH experiments, AP or direct sequencing of the breakpoint) revealed that different exons or nucleotides are involved (Fig. 3) [Sultana et al., 2002; Kalscheuer et al., 2007; Huang et al., 2010; Beunders et al., 2013]. These data highlight the interest of resolutive techniques in an attempt to define more precisely the mechanisms responsible for chromosomal rearrangements.

In conclusion, we have found that the AP technique to be an effective and time efficient approach alternative to WGS in the characterization of the breakpoints of a de novo balanced reciprocal translocation t(3;7)(q11.2;q11.22). We hypothesize that *AUTS2* is the likely candidate gene responsible for ID and autistic features observed in the patient. However, we cannot totally rule out the involvement of the disruption of *EPHA6* in the phenotype observed in the patient, which highlights the difficulties in interpreting genetic results. In addition, this report emphasizes the interest of AP as a routine technical procedure in clinical diagnosis as well as in cytogenetics research, an effective technique required for our understanding on the mechanisms involving chromosomal aberrations.

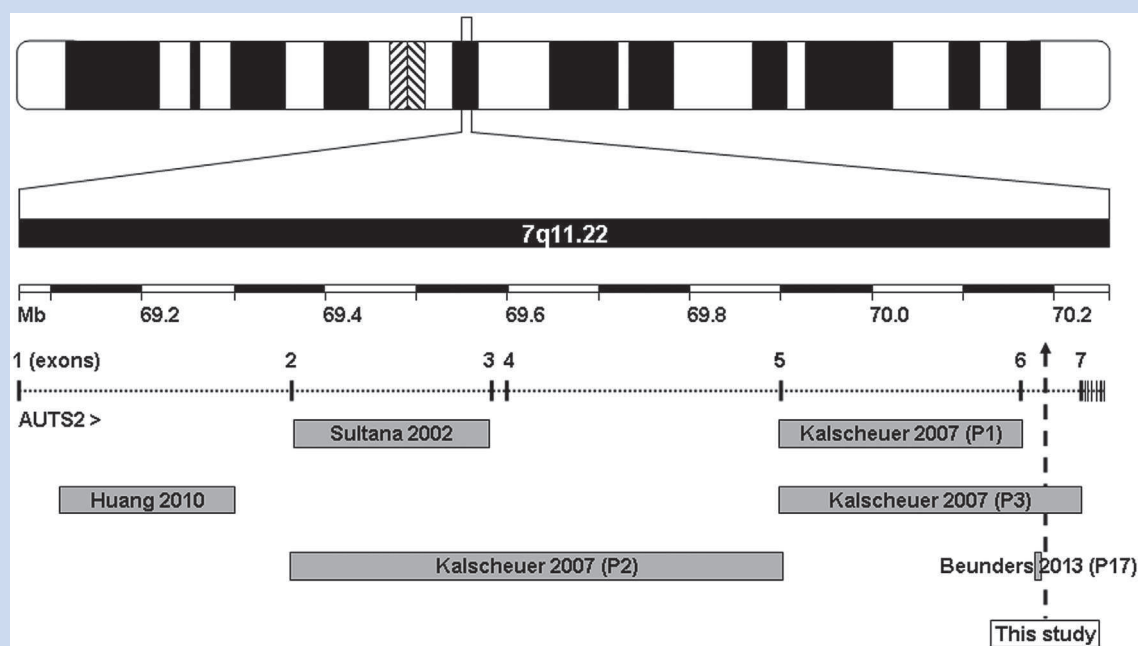


FIG. 3. Schematic representation of the localizations of translocation breakpoints involving *AUTS2* in the six patients reported in the literature as well as the patient reported here. On top: chromosome 7 ideogram; middle: chromosomal band, scale in Megabases [Mb] and schematic structure of *AUTS2* [vertical lines for exons and dotted line for introns]; at the bottom: localization interval of breakpoints of different translocations described in the literature and in this study]. Horizontal grey represented the approximate breakpoints from the literature. Note that all breakpoints encompass the first seven exons.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the patient and his family for their participation in this study. We thank Mrs. D Mechin and Mrs. A Faure for Sanger sequencing. This work was funded by grants “Projet Hospitalier de Recherche Clinique” n°7890 and “Appel d’Offre Interne” n°8688 from Regional University Hospital of Montpellier. We thank the Microarray Core Facility of the Institute of Research on Biotherapy, CHRU-INSERM-UM1 Montpellier, <http://irb.chu-montpellier.fr>.

REFERENCES

- Amarillo IE, Li WL, Li X, Vilain E, Kantarci S. 2014. *De novo* single exon deletion of AUTS2 in a patient with speech and language disorder: A review of disrupted AUTS2 and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet Part A* 164A:958–965.
- Bakkaloglu B, O’Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW. 2008. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 82:165–173.
- Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, Pardo LM, Rosenfeld JA, Talkowski ME, Simonic I, Lionel AC, Vergult S, Pyatt RE, van de Kamp J, Nieuwint A, Weiss MM, Rizzu P, Verwer LE, van Spaendonk RM, Shen Y, Wu BL, Yu T, Yu Y, Chiang C, Gusella JF, Lindgren AM, Morton CC, van Binsbergen E, Bulk S, van Rossem E, Vanakker O, Armstrong R, Park SM, Greenhalgh L, Maye U, Neill NJ, Abbott KM, Sell S, Ladda R, Farber DM, Bader PI, Cushing T, Drautz JM, Konczal L, Nash P, de Los Reyes E, Carter MT, Hopkins E, Marshall CR, Osborne LR, Gripp KW, Thrush DL, Hashimoto S, Gastier-Foster JM, Astbury C, Ylstra B, Meijers-Heijboer H, Posthuma D, Menten B, Mortier G, Scherer SW, Eichler EE, Girirajan S, Katsanis N, Groffen AJ, Sistermans EA. 2013. Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet* 2:210–220.
- Beunders G, de Munnik SA, Van der Aa N, Ceulemans B, Voorhoeve E, Groffen AJ, Nillesen WM, Meijers-Heijboer EJ, Kooy RF, Yntema HG, Sistermans EA. 2014. Two male adults with pathogenic AUTS2 variants, including a two-base pair deletion, further delineate the AUTS2 syndrome. *Eur J Hum Genet* 10:803–807.
- Chen W, Ullmann R, Langnick C, Menzel C, Wotschovsky Z, Hu H, Döring A, Hu Y, Kang H, Tzschach A, Hoeltzenbein M, Neitzel H, Markus S, Wiedersberg E, Kistner G, van Ravenswaaij-Arts CM, Kleefstra T, Kalscheuer VM, Ropers HH. 2010. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet* 18:539–543.
- Coyaud E, Struski S, Dastugue N, Brousset P, Broccardo C, Bradtke J. 2010. PAX5-AUTS2 fusion resulting from t(7;9)(q11.2;p13.2) can now be classified as recurrent in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 34:e323–e325.
- Denk D, Nebral K, Bradtke J, Pass G, Mörcke A, Attarbaschi A, Strehl S. 2012. PAX5-AUTS2: A recurrent fusion gene in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia review. *Leuk Res* 36:e178–e181.
- Denk D, Bradtke J, König M, Strehl S. 2014. PAX5 fusion genes in t(7;9)(q11.2;p13) leukemia: A case report and review of the literature. *Mol Cytogenet* 7:13.
- Di Gregorio E, Bianchi FT, Schiavi A, Chiotto AM, Rolando M, Verdun di Cantogno L, Grosso E, Cavalieri S, Calcia A, Lacerenza D, Zuffardi O, Retta SF, Stevanin G, Marelli C, Durr A, Forlani S, Chelly J, Montarolo F, Tempia F, Beggs HE, Reed R, Squadrone S, Abete MC, Brussino A, Ventura N, Di Cunto F, Brusco A. 2013. A *de novo* X;8 translocation creates a PTK2-THOC2 gene fusion with THOC2 expression knock-down in a patient with psychomotor retardation and congenital cerebellar hypoplasia. *J Med Genet* 50:543–551.
- Donoghue MJ, Rakic P. 1999. Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex. *J Neurosci* 19:5967–5979.
- Dupont JM, Cuisset L, Cartigny M, Le Tessier D, Vasseur C, Rabineau D, Jeanpierre M. 2002. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. *Am J Med Genet* 111:405–408.
- Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E, Glessner JT, D’arcy M, deBerardinis R, Frackelton E, Kim C, Lantieri F, Muganga BM, Wang L, Takeda T, Rappaport EF, Grant SF, Berrettini W, Devoto M, Shaikh TH, Hakonarson H, White PS. 2010. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol Psychiatry* 15:637–646.
- Fauth C, Gribble SM, Porter KM, Codina-Pascual M, Ng BL, Kraus J, Uhrig S, Leifheit J, Haaf T, Fiegler H, Carter NP, Speicher MR. 2006. Microarray analyses decipher exceptional complex familial chromosomal rearrangement. *Hum Genet* 119:145–153.
- Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, Carr P, Prigmore E, Porter KM, Clegg S, Crolla JA, Dennis NR, Jacobs P, Carter NP. 2003. Array painting: A method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40:664–670.
- Glessner JT, Bradfield JP, Wang K, Takahashi N, Zhang H, Sleiman PM, Mentch FD, Kim CE, Hou C, Thomas KA, Garris ML, Deliard S, Frackelton EC, Otieno FG, Zhao J, Chiavacci RM, Li M, Buxbaum JD, Berkowitz RI, Hakonarson H, Grant SF. 2010. A genome-wide study reveals copy number variants exclusive to childhood obesity cases. *Am J Hum Genet* 87:661–666.
- Gribble SM, Fiegler H, Burford DC, Prigmore E, Yang F, Carr P, Ng BL, Sun T, Kamberov ES, Makarov VL, Langmore JP, Carter NP. 2004. Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies. *Chromosome Res* 12:35–43.
- Gribble SM, Ng BL, Prigmore E, Fitzgerald T, Carter NP. 2009. Array painting: A protocol for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *Nat Protoc* 4:1722–1736.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1:4.
- Haddad MR, Mignon-Ravix C, Cacciagli P, Mégarbané A, Villard L. 2009. Characterization of a *de novo* balanced translocation in a patient with moderate mental retardation and dysmorphic features. *Eur J Med Genet* 52:211–217.
- Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T. 2004. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* 50:490–499.
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10:551–564.
- Hooli BV, Kovacs-Vajna ZM, Mullin K, Blumenthal MA, Mattheisen M, Zhang C, Lange C, Mohapatra G, Bertram L, Tanzi RE. 2014. Rare autosomal copy number variations in early-onset familial Alzheimer’s disease. *Mol Psychiatry* 19:676–681.
- Huang XL, Zou YS, Maher TA, Newton S, Milunsky JM. 2010. A *de novo* balanced translocation breakpoint truncating the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with autism. *Am J Med Genet Part A* 152A:2112–2114.
- Jolley A, Corbett M, McGregor L, Waters W, Brown S, Nicholl J, Yu S. 2013. *De novo* intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with developmental delay: A case report and literature review. *Am J Med Genet Part A* 161A:1508–1512.

- Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F, Arkestijn G, Ropers HH, Ullmann R. 2007. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Hum Genet* 121:501–509.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. 2008. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11921–11926.
- Kent WJ. 2002. BLAT—The BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12:656–664.
- Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, Oudakker AR, Nillesen WM, Magee A, Geneviève D, Cormier-Daire V, van Esch H, Fryns JP, Hamel BC, Siermans EA, de Vries BB, van Bokhoven H. 2006. Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 79:370–377.
- Klein R. 2012. Eph/ephrin signalling during development. *Development* 139:4105–4109.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V. 1998. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 7:1611–1618.
- Kozulin P, Natoli R, O'Brien KM, Madigan MC, Provis JM. 2009. Differential expression of anti-angiogenic factors and guidance genes in the developing macula. *Mol Vis* 15:45–59.
- Kumar A, Becker LA, Depinet TW, Haren JM, Kurtz CL, Robin NH, Cassidy SB, Wolff DJ, Schwartz S. 1998. Molecular characterization and delineation of subtle deletions in de novo “balanced” chromosomal rearrangements. *Hum Genet* 103:173–178.
- Liu Y, Zhao D, Dong R, Yang X, Zhang Y, Tammimies K, Uddin M, Scherer SW, Gai Z. 2015. De novo exon 1 deletion of AUTS2 gene in a patient with autism spectrum disorder and developmental delay: A case report and a brief literature review. *Am J Med Genet* 67:1381–1385.
- Martínez A, Soriano E. 2005. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: Emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 49:211–226.
- Nagamani SC, Erez A, Ben-Zeev B, Frydman M, Winter S, Zeller R, El-Khechen D, Escobar L, Stankiewicz P, Patel A, Cheung SW. 2013. Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* 21:343–346.
- Oksenberg N, Ahituv N. 2013. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends Genet* 29:600–608.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschenhoff F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet* 140:2063–2074.
- Savelieva KV, Rajan I, Baker KB, Vogel P, Jarman W, Allen M, Lanthorn TH. 2008. Learning and memory impairment in Eph receptor A6 knockout mice. *Neurosci Lett* 438:205–209.
- Slade I, Stephens P, Douglas J, Barker K, Stebbings L, Abbaszadeh F, Pritchard-Jones K, FACT Collaboration, Cole R, Pizer B, Stiller C, Vujanic G, Scott RH, Stratton MR, Rahman N. 2010. Constitutional translocation breakpoint mapping by genome-wide paired-end sequencing identifies HACE1 as a putative Wilms tumour susceptibility gene. *J Med Genet* 47:342–347.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, Dubourg C, Henry C, Lucas J, Odent S, Pasquier L, Copin H, Latour P, Cordier MP, Nadeau G, Till M, Edery P, Andrieux J. 2009. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet* 52:291–296.
- Schluth-Bolard C, Labalme A, Cordier MP, Till M, Nadeau G, Tevissen H, Lesca G, Boutry-Kryza N, Rossignol S, Rocas D, Dubruc E, Edery P, Sanlaville D. 2013. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. *J Med Genet* 50:144–150.
- Sobreira NL, Gnanakkan V, Walsh M, Marosy B, Wohler E, Thomas G, Hoover-Fong JE, Hamosh A, Wheelan SJ, Valle D. 2011. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Genome Res* 21:1720–1727.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D, Haider ST, Trask BJ, Green ED, Raskind WH, Disteche CM, Wijsman E, Dawson G, Storm DR, Schellenberg GD, Villacres EC. 2002. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* 80:129–134.
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto N. 2014. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole-genome sequencing. *J Hum Genet* 59:649–654.
- Tapia-Páez I, O'Brien KP, Kost-Alimova M, Sahlén S, Kedra D, Bruder CE, Andersson B, Roe BA, Hu P, Imreh S, Blennow E, Dumanski JP. 2000. Fine mapping of the constitutional translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum Genet* 106:506–516.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, Kirby A, Liu S, Muddukrishna B, Ohsumi TK, Shen Y, Borowsky M, Daly MJ, Morton CC, Gusella JF. 2011. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. *Am J Hum Genet* 88:469–481.
- Utami KH, Hillmer AM, Aksoy I, Chew EG, Teo AS, Zhang Z, Lee CW, Chen PJ, Seng CC, Ariyaratne PN, Rouam SL, Soo LS, Yousoof S, Prokudin I, Peters G, Collins F, Wilson M, Kakakios A, Haddad G, Menuet A, Perche O, Tay SK, Sung KW, Ruan X, Ruan Y, Liu ET, Briault S, Jamieson RV, Davila S, Cacheux V. 2014. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. *PLoS ONE* 9:e90852.
- Yamaguchi Y, Pasquale EB. 2004. Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 14:288–296.
- Yun ME, Johnson RR, Antic A, Donoghue MJ. 2003. EphA family gene expression in the developing mouse neocortex: Regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *J Comp Neurol* 456:203–216.
- Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR. 2009. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 25:298–307.

Résumé

La déficience intellectuelle (DI) est définie par un $QI < 70$. La DI, répartie en formes non syndromiques et en formes syndromiques, est observée dans 3 % de la population. Des anomalies chromosomiques sont identifiées dans 15 % des DI syndromiques. Les translocations chromosomiques réciproques (TR) apparemment équilibrées sont observées chez 1 individu sur 1000 et seul 6 % des patients avec une TR *de novo* apparemment équilibrée ont une DI. Plusieurs mécanismes chromosomiques peuvent expliquer la DI syndromique associée à une TR : (i) un microremaniement déséquilibré identifié par l'utilisation de techniques plus résolutive, (ii) la formation d'un gène de fusion, (iii) un effet de position, (iv) la modification d'une région soumise à une empreinte parentale, (v) une interruption d'un gène au niveau d'un ou des deux points de cassure, (vi) une mutation génique sans rapport avec la TR, (vii) ou encore une cause acquise ou multifactorielle.

Nous rapportons l'étude de 12 patients avec DI et porteurs d'une TR *de novo* apparemment équilibrée. L'analyse systématique par puces à ADN de ces individus a été réalisée avec une résolution de 25 kb. Un déséquilibre infracytogénétique au niveau des points de cassure ou ailleurs dans le génome a été observé chez 3/12 patients. Chez les 9 patients sans anomalies sur puces à ADN, nous avons étudié les points de cassure des remaniements *de novo* apparemment équilibrés. En dehors de la technique de marche sur le chromosome par FISH, deux autres approches ont été mises en oeuvre : (i) l'Array-Painting qui correspond à l'hybridation sur puces à ADN de chacun des dérivés chromosomiques préalablement séparés par Cytométrie en Flux, (ii) et le séquençage haut débit (WGS - Whole Genome Sequencing). Grâce à l'Array-Painting, nous avons identifié (i) chez 2 patients, des interruptions de gènes pouvant expliquer leur phénotype, à savoir les gènes : *KIF1A*, *AUTS2* et *EPHA6* ; (ii) et chez 1 patiente, un point de cassure entraînant une dérégulation de la transcription du gène *MEF2C*. L'étude par WGS a permis (i) chez 1 patiente, de diagnostiquer un déséquilibre plus complexe que celui observé par puce à ADN ; (ii) chez 2 patients, de mettre en évidence un *chromothripsis*, qui pourrait avoir un impact dans les pathologies constitutionnelles par interruption de gènes et/ou par effet de position ; (iii) et chez 2 autres patients, de caractériser précisément les points de cassure.

Ainsi, grâce aux résultats obtenus par ces différentes techniques, plusieurs mécanismes physiopathologiques responsables de DI sont mis en évidence permettant un conseil génétique adéquat. Cependant, aucun mécanisme chromosomique commun ne peut être identifié hormis le *chromothripsis* observé chez patients. Finalement, ce travail nous permet principalement de comparer les techniques mises en oeuvre qui se sont avérées complémentaires. En conclusion, nous proposons une démarche diagnostique pour explorer un remaniement chromosomique apparemment équilibré chez des patients à phénotype anormal.

Abstract

Intellectual disability (ID) is defined by an $IQ < 70$. ID, observed in 3% of the population, and displays heterogeneous origins, including acquired etiology (toxicologic, pathologic, traumatic) or genetic disorders with non-syndromic and syndromic forms. Numerical or structural chromosomal abnormalities are observed in 15% of patients with ID. Reciprocal balanced chromosomal translocations (RT) are observed in one individual in 1000. However, only 6% of patients carrying a *de novo* apparently balanced RT present ID. The relation between these balanced rearrangements and ID could be explained by different mechanisms namely (i) subtle rearrangement, (ii) gene fusion, (iii) position effect, (iv) disturbance of parental imprinting, (v) gene disruption at the breakpoints, (vi) mutation in gene unrelated to the translocation, (vii) or acquired or multifactorial cause.

We report a chromosomal study of 12 patients with DI and carrying a *de novo* apparently balanced reciprocal translocation. A systematic analysis by microarrays was performed in all individuals (using a resolution of 25 kb). For three patients, a microdeletion was observed at the breakpoints or elsewhere in the genome. For the 9 remaining cases, we hypothesize that the phenotype is due to a disruption of gene(s) located at the breakpoint(s). In this context, we studied the breakpoints of the apparently balanced *de novo* rearrangements in these patients. Outside FISH walking, two approaches have been implemented namely Array-Painting, which combines flow chromosome sorting in an attempt to isolate derivative chromosomes from each other and DNA microarrays as well as Whole Genome Sequencing (WGS).

Using Array-Painting, we identified (i) in 2 patients, a gene disruptions: in the *KIF1A*, *AUTS2* and *EphA6* genes; (ii) and in 1 patient, a breakpoint resulting in deregulation of transcription of the gene *MEF2C*. The WGS technology has permitted (i) in 1 patient, to diagnose more complex imbalance than that observed by microarray; (ii) in 2 patients, to show a *chromothripsis*, (iii) and 2 other patients, to characterize precisely breakpoints. In conclusion, taking together, these results highlight different physiopathological mechanisms responsible for DI allowing adequate genetic counseling. However, no common chromosomal mechanism can be identified except for *chromothripsis* observed in 2 patients. In addition, this work allows us especially to compare the used techniques which seem to be complementary. Finally, we propose a pipeline to elucidate the etiology of the abnormal phenotype in patients carrying an apparently balanced rearrangement.