

**UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE PHARMACIE**

ANNÉE 2013

N° 031

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 09/10/2013

Par Gaëlle THIERRY

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 6 mai 1987 tient lieu de :

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Les insertions chromosomiques en
pathologie constitutionnelle

Présidente : Mme IMBERT Berthe-Marie, Professeur de Virologie-Nantes

Membres du Jury : M. LE CAIGNEC Cédric, Professeur de Génétique-Nantes

M. BEZIEAU Stéphane, Professeur de Génétique-Nantes

Mme JAILLARD Sylvie, MCU-PH en Histologie-Embryologie-Rennes

Mme LODE Laurence, PH en Hématologie-Nantes

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à **Madame Berthe-Marie Imbert** pour avoir accepté de juger mon travail et présider ce jury de thèse.

Je remercie également **les membres du jury** pour l'honneur qu'ils me font d'avoir consacré un peu de leur temps à la lecture et l'examen du manuscrit ainsi qu'à la soutenance de ma thèse.

J'adresse des remerciements particuliers au **Professeur Cédric Le Caïgnec**, directeur de cette thèse pour la liberté qu'il m'a offerte dans le choix du sujet, pour la rapidité de ses corrections, pour le respect qu'il a témoigné à mon travail de rédaction, pour l'opportunité qu'il m'a donnée, en accord avec le Dr Albert David, de valoriser une partie de ce travail par un article et pour tous les autres travaux qu'il m'a confiés et qui m'ont permis d'acquérir des connaissances et des compétences tout au long de ces trois dernières années.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du **service de Génétique Médicale** du CHU de Nantes : **les techniciens, ingénieurs et secrétaires** des laboratoires de biologie moléculaire et de cytogénétique pour l'accueil qu'ils m'ont réservé au sein de leur équipe, pour la patience dont ils ont fait preuve pour me former et pour leur soutien au quotidien ; **les cadres** pour leur disponibilité, leur patience et leurs conseils qui feront de moi, je l'espère, une bonne biologiste en génétique ; **les cliniciens** pour avoir accepté de me confier des données concernant leurs patients et pour le temps consacré à m'expliquer leur phénotype. Enfin, je remercie le **Professeur Stéphane Bézieau** pour son écoute, ses conseils, sa participation au jury de thèse et l'énergie dépensée ces derniers mois à organiser mon avenir professionnel.

Sur le plan personnel aussi, j'ai été très bien entourée.

Merci à **mes amis**. Vous n'en voyiez pas le bout ? Pourtant, on y est : c'est (presque) la fin de mes études ! Finalement, je ne serai pas la dernière à finir... Bon courage à Damien et Emma ! Merci à vous tous pour votre soutien, vos encouragements et votre compréhension tout au long de ces 11 années d'études.

Ce manuscrit est l'occasion pour moi d'exprimer toute ma reconnaissance à ma famille. Merci à **mes parents** qui m'ont laissé le choix de mon orientation et m'ont soutenue, sur tous les plans, tout au long de mes études. Ils m'ont appris la persévérance, l'ambition, le courage, la rigueur et bien d'autres valeurs qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Merci pour tous vos enseignements, vos encouragements et votre soutien inconditionnel.

J'ai bien évidemment une pensée pour mon « petit » frère, **ian**, qui aura fini ses études avant moi, pour **Allan** qui partage mon goût pour la biologie et pour **Charlyse** qui reprend des études l'année où je les termine... Bon courage.

Je ne veux surtout pas oublier de remercier **ma belle-famille** qui m'a accueillie à bras ouverts il y a maintenant plus de 10 ans. Je suis admirative de la patience et de l'indulgence qu'ils ont eues à mon égard dans les moments de stress ou de fatigue notamment lors de la préparation du concours de l'internat. Je sais depuis longtemps déjà que je peux compter sur eux quel que soit ma demande. Encore un grand merci !

Pour finir, je te dédie ce mémoire de thèse, **Marc**. Tu es celui qui sait le mieux, pour l'avoir vécu au quotidien, ce qu'il représente pour moi. Tu t'es toujours adapté à mon rythme d'étudiante puis d'interne sans t'en plaindre malgré les soirées passées seul pendant mes gardes, les trajets à Lille, Paris ou Brest. Tu as dû supporter mes humeurs dans les moments les plus difficiles. Tu as toujours été là pour me reconforter, me rassurer et prendre soin de moi. Ces quelques mots ne suffiront pas pour te témoigner toute ma reconnaissance et mon amour mais il me reste plusieurs dizaines d'années à passer à tes côtés pour bien faire. Je t'aime.

Table des matières

Table des figures.....	6
Abréviations	8
I. Introduction.....	10
II. Généralités	11
A. Définition.....	11
B. Mécanisme	11
1. Les cassures double-brin	12
a) Physiologiques.....	12
b) Pathologiques.....	13
2. Les mécanismes de réparation impliqués	14
a) Non-Allelic Homologous Recombination	14
b) Non-Homologous End Joining	15
c) Break-Induced Replication	17
C. Caractérisation d'une insertion	18
1. Inter- ou intrachromosomique.....	18
2. Equilibrée ou déséquilibrée.....	18
3. Orientation du fragment	19
4. Insertions réciproques.....	20
D. Conséquences.....	22
1. Pour le porteur de l'insertion	23
a) Insertion équilibrée	23
b) Insertion déséquilibrée.....	24
c) Cas des insertions dans les gonosomes.....	25
2. Pour la descendance	26
a) Insertion interchromosomique	28
b) Insertion intrachromosomique	28
E. Circonstances de découverte	30
1. Historique et épidémiologie.....	30
a) A partir du caryotype.....	30
b) Apport des différentes techniques d'hybridation in situ	30
c) Epidémiologie dans les années 90s.....	31
d) Détection d'insertions de plus en plus petites grâce à la CGH array	32

2.	La FISH : analyse essentielle pour le diagnostic	34
III.	Explorations cytogénétiques et moléculaires	36
A.	Les techniques de cytogénétiques	36
1.	Le caryotype	36
a)	Mise en culture, thymidine et BrdU	36
b)	Blocage des cellules en métaphase	37
c)	Choc hypotonique et fixation	37
d)	Etalement du culot cellulaire sur les lames	37
e)	Solution de Hoescht et SSC 2X.....	37
f)	Dénaturation thermique	38
g)	Coloration et lecture des lames	38
2.	La FISH	38
a)	Préparation du matériel chromosomique du patient	39
b)	Préparation des sondes	40
c)	Hybridation.....	41
d)	Révélation.....	42
B.	Techniques de biologie moléculaire.....	42
1.	Extraction d'ADN	42
a)	A partir de sang, sur l'automate QuickGene610L®	42
b)	A partir de sang, avec le kit Nucleon Bacc2®	43
2.	La CGH array	43
a)	Qualité et concentration de l'ADN	45
b)	Marquage fluorescent de l'ADN.....	45
c)	Purification et quantification des ADN marqués.....	46
d)	Précipitation des ADN marqués	46
e)	Hybridation sur micro-array	46
f)	Lavages des micro-arrays	47
g)	Lecture des lames et analyse des résultats	47
IV.	A propos de trois familles.....	48
A.	La famille vue par le Dr Bénéteau	48
1.	Description de la famille.....	48
2.	Résultats	50
3.	Discussion	54
B.	Famille vue par le Dr Martin-Coignard	56

1.	Description de la famille.....	56
2.	Résultats	58
3.	Discussion	62
C.	Famille vue par le Dr David.....	65
1.	Description de la famille.....	65
2.	Résultats	66
3.	Discussion	69
V.	Discussion	72
	Bibliographie.....	77
	Annexe.....	84

Table des figures

Figure 1 : Schéma illustrant une insertion interchromosomique.	12
Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme NAHR.	15
Figure 3 : Représentation schématique des deux types de mécanismes NHEJ.	16
Figure 4 : A-Mécanisme de Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS). B-Mécanisme de Microhomology-Mediated Break-Induced Replication (MMBIR).	17
Figure 5 : Schéma illustrant deux types d'insertions intrachromosomiques (équilibrée et déséquilibrée).....	19
Figure 6 : Orientation du fragment inséré (Flèche bleue).....	20
Figure 7 : Ségrégation théorique dans le cas d'une insertion réciproque équilibrée interchromosomique.....	21
Figure 8 : Ségrégation théorique dans le cas d'une insertion interchromosomique (A) ou intrachromosomique sans recombinaison (B).	27
Figure 9 : Possibles recombinants après crossing-over en fonction du type d'insertion intrachromosomique.	29
Figure 10 : Déroulement de la FISH.....	39
Figure 11 : Principe de la CGH array.....	44
Figure 12 : Arbre généalogique de la famille vue par le Dr Bénêteau.	48
Figure 13 : Photographies des trois enfants de la famille vue par le Dr Bénêteau.	50
Figure 14 : Profil du chromosome 2 obtenu après analyse de la CGH array 60K Agilent réalisée chez le cas index de la famille vue par le Dr Bénêteau.	51
Figure 15 : Hybridations <i>in situ</i> sur métaphases réalisées chez les membres de la famille vue par le Dr Bénêteau.	52
Figure 16 : Chromosomes 2 et 4 issus du caryotype de l'individu II-1 de la famille vue par le Dr Bénêteau et les idéogrammes correspondants.	53
Figure 17 : Arbre généalogique de la famille vue par le Dr Martin-Coignard.	56
Figure 18 : Photographies de l'individu III-3 de la famille vue par le Dr Martin-Coignard.....	57
Figure 19 : Photographies de l'individu III-1 de la famille vue par le Dr Martin-Coignard.....	58
Figure 20 : Profil du chromosome 13 obtenu après analyse de la CGH array 60K Agilent réalisée chez le cas index de la famille vue par le Dr Martin-Coignard.	59

Figure 21 : Hybridations <i>in situ</i> sur métaphases réalisées chez les membres de la famille vue par le Dr Martin-Coignard avec la sonde spécifique RP11-796G17.	60
Figure 22 : Hybridations <i>in situ</i> sur métaphases réalisées chez les membres de la famille vue par le Dr Martin-Coignard avec les sondes spécifiques RP11-599C08 et RP11-383J16.....	61
Figure 23 : Arbre généalogique de la famille vue par le Dr David.....	65
Figure 24 : Profil du chromosome 8 obtenu après analyse de la CGH array 180K Agilent réalisée chez le cas index de la famille vue par le Dr David.	67
Figure 25 : Hybridations <i>in situ</i> sur métaphases réalisées chez les membres de la famille vue par le Dr David.....	68

Abréviations

ADN : Acide DéoxyriboNucléique.

ARN : Acide RiboNucléique.

BIR : Break-Induced Replication.

BrdU : BromoDésoxyUridine.

CAP : Certificat d'Aptitude Professionnelle.

CGH : Comparative Genomic Hybridization.

CNV : Copy Number Variant, variation du nombre de copies.

DNA-PKcs : DesoxyriboNucleic Acide – Protein Kinase Catalytic Subunit.

dNTP : DésoxyNucléotideTri-Phosphate.

DPI : Diagnostic Pré-Implantatoire.

DS : Déviation Standard.

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization, hybridation *in situ*.

FoSTeS : Fork Stalling and Template Switching, décrochage de la fourche et changement de matrice.

FSH : Follicule Stimulating Hormone.

Hg : Human Genome.

Kb : Kilobase.

LCR : Low Copy Repeat.

LINE : Long Interspred Element.

LTR : Long Terminal Repeat.

Mb : Mégabase.

MMBIR : Microhomology-Mediated Break-Induced Replication.

MMIR : Microhomology / Microsatellite-Induced Replication.

NAHR : Non-Allelic Homologous Recombination.

NHEJ : Non-Homologous End Joining.

Pb : Paires de base.

PC : Périmètre Crânien.

PHA : PhytoHémagglutinine.

PRINS : PRimed *IN Situ* labelling, synthèse *in situ* amorcée.

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction.

Rpm : Rotation Par Minute.

SA : Semaine d'aménorrhée.

SINE : Short Interspred Element.

UTP : UridineTri-Phosphate.

UV : Ultra-Violets.

I. Introduction

Les insertions chromosomiques sont des remaniements complexes rares lors desquels un fragment intercalaire d'un chromosome est inséré ailleurs dans le génome. Ces anomalies n'ont pu être mises en évidence que récemment grâce à l'évolution des techniques de cytogénétique conventionnelles puis moléculaires. Ces avancées technologiques successives ont permis de mieux les détecter mais aussi de mieux les caractériser. De nombreux facteurs endogènes et/ou exogènes peuvent favoriser la formation d'une insertion chromosomique. Les conséquences d'une telle anomalie peuvent être variables. Les porteurs d'insertion équilibrée ne sont identifiés, pour la plupart, que lorsqu'un déséquilibre est identifié chez un de leurs enfants. Le risque de récurrence d'une variation du nombre de copies à chaque nouvelle grossesse est un élément majeur qui souligne l'importance de rechercher une éventuelle insertion par FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) chez les parents d'un enfant porteur d'une délétion ou d'une duplication.

Différents contextes de découverte d'insertions chromosomiques seront illustrés dans ce manuscrit à travers l'histoire clinique et génétique de trois familles étudiées à Nantes. La première famille est un exemple d'insertion interchromosomique classique. La seconde famille permet de discuter les cas particuliers des insertions intrachromosomiques. La dernière famille a fait l'objet d'une publication (Thierry *et al.* 2013, en annexe) tant elle montre l'importance de l'étude parentale par FISH devant tout déséquilibre chez un enfant même lorsque, *a priori*, le résultat attendu n'est pas une insertion chromosomique.

II. Généralités

A. Définition

Les insertions font partie des anomalies chromosomiques dites de structure. Ce sont des remaniements rares qui consistent en la délocalisation d'un segment intercalaire d'un chromosome ailleurs dans le génome. La taille du segment chromosomique déplacé est variable. Les autosomes (chromosomes non sexuels) ainsi que les gonosomes (chromosomes sexuels) peuvent être concernés.

L'anomalie est congénitale et présente dans toutes les cellules de l'organisme si elle est d'origine germinale, soit parce que le remaniement se produit lors de la méiose, soit lorsqu'il est hérité d'un parent qui porte la même anomalie dans ses propres cellules et notamment dans une partie de ses gamètes. L'existence de deux populations de cellules germinales, l'une indemne de l'anomalie et l'autre mutée, est appelée mosaïcisme germinale. Lorsque l'anomalie n'est pas présente dans les cellules somatiques du parent porteur d'une mosaïque germinale, il ne développe pas la maladie associée mais risque de la transmettre à chaque grossesse.

Si le remaniement se produit lors d'une mitose, au cours des premières étapes du développement embryonnaire, l'individu portera l'anomalie seulement dans une proportion variable de ses cellules : on parle de mosaïcisme somatique.

B. Mécanisme

Les insertions sont des réarrangements chromosomiques complexes puisqu'elles nécessitent la survenue d'au moins trois points de cassure double-brin, deux sur le chromosome donneur libérant un fragment, et un troisième sur le chromosome receveur (Figure 1). Des erreurs d'appariement des extrémités ainsi formées sont à l'origine de l'anomalie chromosomique. Le fragment libre généré s'insère entre les deux segments engendrés par le troisième point de cassure.

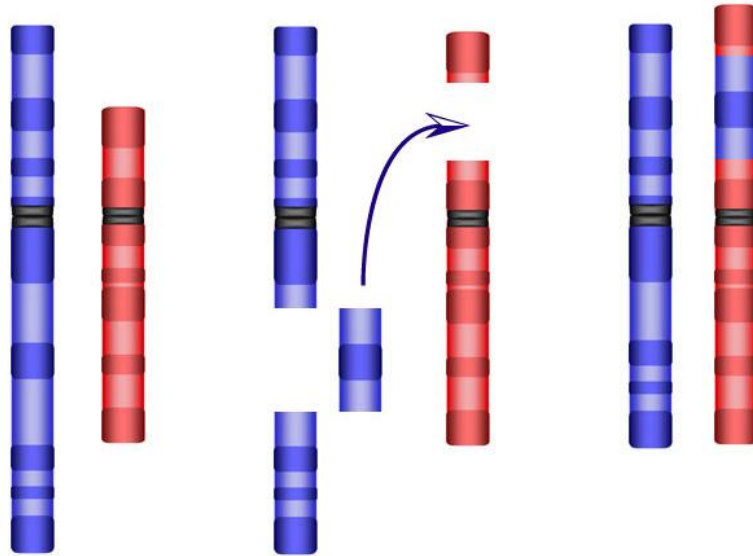


Figure 1 : Schéma illustrant une insertion interchromosomique (chromosome donneur en bleu, chromosome receveur en rouge) (schéma extrait du site : http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/cytogen/2-1_fichiers/schema).

1. Les cassures double-brin

Entre mille et un million de lésions sur l'ADN sont occasionnées chaque jour dans chaque cellule de l'organisme (Lodish *et al.* 2004). Les cassures double-brin sont parmi les plus toxiques et pathogènes pour la cellule (Helleday *et al.* 2007). Une étude sur des fibroblastes en division a permis d'établir qu'une dizaine de cassures double-brin se produit par jour dans chaque cellule (Lieber *et al.* 2010). Ce nombre est variable en fonction de la vitesse de division des lignées cellulaires étudiées.

Ces cassures sont parfois indispensables (physiologiques) à la fonction de certains types cellulaires. Dans les autres cas, elles ne sont pas attendues ; on parlera de cassures pathologiques.

a) *Physiologiques*

Dans le système immunitaire humain, la production des anticorps spécifiques d'un antigène nécessite une recombinaison des gènes V(D)J et la survenue de certaines cassures

double-brin. Le changement de classe des immunoglobulines fait également intervenir ce processus (Lieber *et al.* 2010).

Lors de la prophase I de la méiose, une enzyme crée des cassures double-brin physiologiques pour permettre la formation de recombinaisons par crossing-over entre les chromosomes homologues (Zickler et Kleckner 1999, Lieber *et al.* 2010).

b) Pathologiques

Les radiations ionisantes, les radicaux libres oxygénés, la réplication au niveau d'une cassure simple-brin ou des erreurs faites par des enzymes responsables de la maintenance du génome notamment à des sites fragiles de l'ADN peuvent être à l'origine de cassures double-brin pathologiques (Lieber *et al.* 2010).

Chez les levures, certaines structures secondaires de l'ADN générées par alignement de séquences répétées homologues orientées dans un sens opposé l'une par rapport à l'autre peuvent favoriser les cassures chromosomiques. Des erreurs de réparation de ces cassures peuvent alors être à l'origine de translocations, ou autres insertions ou duplications intrachromosomiques (Van Hulle *et al.* 2007).

Les séquences répétées représentent au moins 50% du génome humain et sont classées en deux grandes catégories : les séquences répétées en tandem (microsatellites, minisatellites et l'ADN satellite des centromères et télomères) et les séquences répétées dispersées (LINE, SINE, LTR, transposons et rétrotransposons) (Lander *et al.* 2001). Cette dispersion des éléments répétés sur l'ensemble du génome, leur fréquence et leur diversité expliquent en partie la complexité et l'individualité des remaniements qui peuvent se produire.

Plusieurs études indiquent que les régions riches en séquences répétées (Low Copy Repeat (LCR), Alu) semblent plus instables. Elles seraient donc plus susceptibles aux cassures double-brin et aux réarrangements (Bauters *et al.* 2008, Lee *et al.* 2006, Woodward *et al.* 2005). L'équipe de Bauters ajoute que les régions présentant un fort pourcentage de GC sont également plus à risque d'être remaniées (Bauters *et al.* 2008).

2. Les mécanismes de réparation impliqués

Deux mécanismes moléculaires principaux sont fréquemment impliqués dans les réarrangements chromosomiques : la recombinaison non allélique homologue ou NAHR (Non-Allelic Homologous Recombination) et la jonction d'extrémités non homologues ou NHEJ (Non-Homologous End Joining) (Neill *et al.* 2011, Gu *et al.* 2008). Plus récemment, d'autres mécanismes alternatifs ont été identifiés. Il s'agit du FoSTeS (Fork Stalling and Template Swithcing) et du BIR et ses dérivés MMBIR et MMIR (Break-Induced Replication, Microhomology-Mediated Break-Induced Replication et Microhomology / Microsatellite-Induced Replication) (Lee *et al.* 2007, Morrow *et al.* 1997, Hastings *et al.* 2009, Payen *et al.* 2008). Ces quatre mécanismes de réparation peuvent survenir aussi bien pendant une mitose que pendant la méiose.

a) *Non-Allelic Homologous Recombination*

Ce mécanisme nécessite la présence, à proximité des points de cassure, de séquences d'une longueur suffisante et dont le taux d'homologie est proche de 100%, comme les LCR (Low Copy Repeat) (Figure 2). La présence de ces LCR explique que ce premier mécanisme soit plus souvent impliqué dans les anomalies récurrentes. Le réarrangement peut avoir lieu entre des LCR homologues portés par des chromosomes différents (réarrangement interchromosomique) ou entre des LCR homologues présents sur deux chromatides sœurs d'un même chromosome (remaniement interchromatidien). Lors de la méiose, dans ces deux cas, des duplications ainsi que des délétions peuvent être générées. Seules des délétions peuvent être obtenues si la recombinaison a lieu entre des LCR d'une même chromatide (remaniement intrachromatidien).

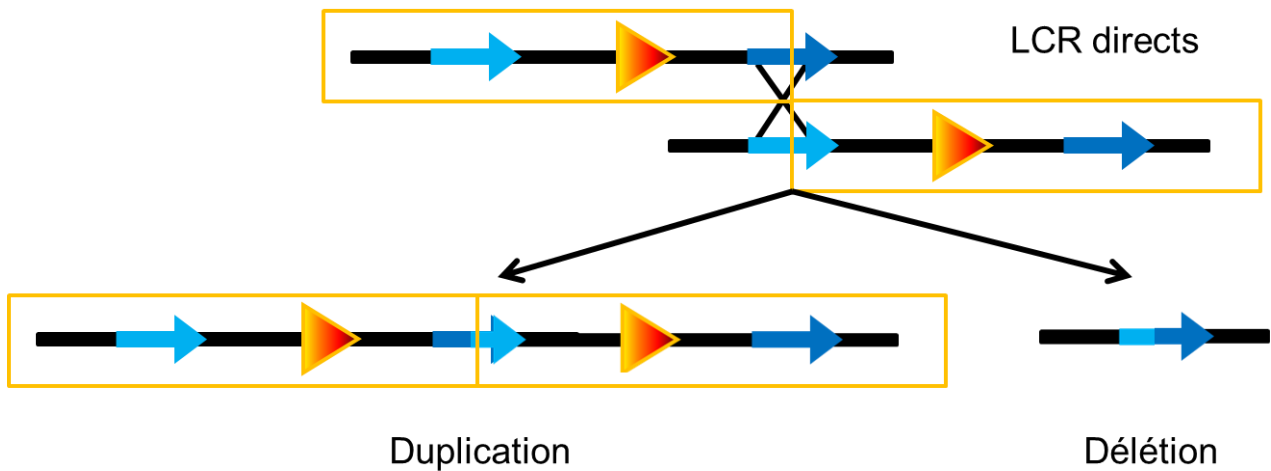


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme NAHR. Les séquences homologues (LCR) sont représentées par les flèches bleues et turquoise. Le triangle orange représente la région d'intérêt. En pathologie, cette séquence d'intérêt comprend le plus souvent un ou plusieurs gène(s). La recombinaison homologue entre deux LCR situés sur le même chromosome donnera d'une part une duplication de la région d'intérêt et d'autre part, une délétion de cette même région.

b) Non-Homologous End Joining

La NHEJ ne nécessite pas d'homologie de séquence entre les deux fragments réunis et peut donc être mise en place dans tous les cas de cassures double-brin. Elle constitue, de ce fait, le mécanisme principal de réparation dans le cas d'anomalies non récurrentes.

On distingue deux types de NHEJ : la NHEJ dépendante des protéines kinases dépendantes de l'ADN ou D-NHEJ qui peut être mise en place à tout moment du cycle cellulaire et la « backup NHEJ » ou B-NHEJ intervenant en cas d'échec de la D-NHEJ (mutations d'un des gènes des facteurs nécessaires à la D-NHEJ ou après traitement inhibant les protéines kinases dépendantes de l'ADN). La B-NHEJ est également le mécanisme de réparation des cassures double-brin physiologiques créées lors de la recombinaison V(D)J et du changement de classe des immunoglobulines (Mladenov *et al.* 2013).

Lors d'une cassure double-brin, les extrémités libres sont reconnues par des complexes protéiques particuliers recrutant les enzymes nécessaires pour la réparation de la cassure.

Dans le cas de la D-NHEJ, l'hétérodimère Ku 70/Ku 80 reconnaît les extrémités libres d'ADN et empêche leur dégradation. Il permet surtout de recruter les sous-unités catalytiques des protéines kinases dépendantes de l'ADN (DNA-PKcs). La dimérisation de ces kinases est à l'origine du rapprochement de deux extrémités libres d'ADN et initie la réparation. Les kinases phosphorylent et recrutent des enzymes ayant des propriétés polymérases afin de préparer les brins d'ADN à la ligation réalisée par un complexe protéique spécifique (Figure 3 A) (Mladenov *et al.* 2013).

Lors de la B-NHEJ, la reconnaissance des extrémités libres d'ADN implique les Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP-1 favorisant la réparation des cassures et PARP-2 s'y opposant). La préparation des extrémités fait intervenir un complexe protéique (MRN pour MRE11/RAD50/NBS1 associé à la C-terminal binding protein 1 interacting protein ou CtIP) qui recrute d'autres ligases que celles finalisant la D-NHEJ (Figure 3 B) (Mladenov *et al.* 2013).

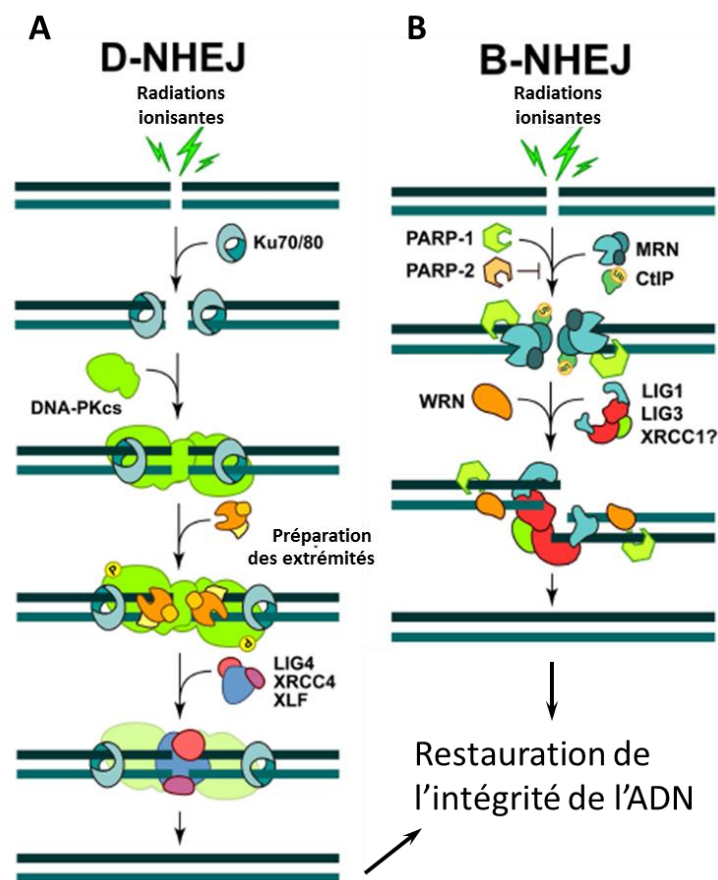


Figure 3 : Représentation schématique des deux types de mécanismes NHEJ. A-D-NHEJ. B-B-NHEJ. Adapté de l'article Mladenov *et al.* 2013.

c) *Break-Induced Replication*

D'autres mécanismes (FoSTeS pour Fork Stalling and Template Switching, Break-Induced Replication, Microhomology-Mediated Break-Induced Replication et Microhomology / Microsatellite-Induced Replication) ont été avancés pour expliquer certains remaniements non récurrents (Ballif *et al.* 2004, Lee *et al.* 2007, Bauters *et al.* 2008, Colnaghi *et al.* 2011). Le point commun de ces mécanismes est l'existence d'homologie de séquence de petite taille, ou microhomologie, au niveau des points de cassure (Reiter *et al.* 1998, Payen *et al.* 2008, Hastings *et al.* 2009). Le MMBIR et le FoSTeS sont des mécanismes très proches. La présence d'une cassure simple brin qui arrête la fourche et qui forme, avec le brin nouvellement synthétisé, une cassure double-brin différencie le MMBIR (Figure 4 B) du FoSTeS (Figure 4 A). Pour l'équipe de Payen, ces mécanismes sont à l'origine de la diversité et de la complexité des petites insertions (Payen *et al.* 2008).

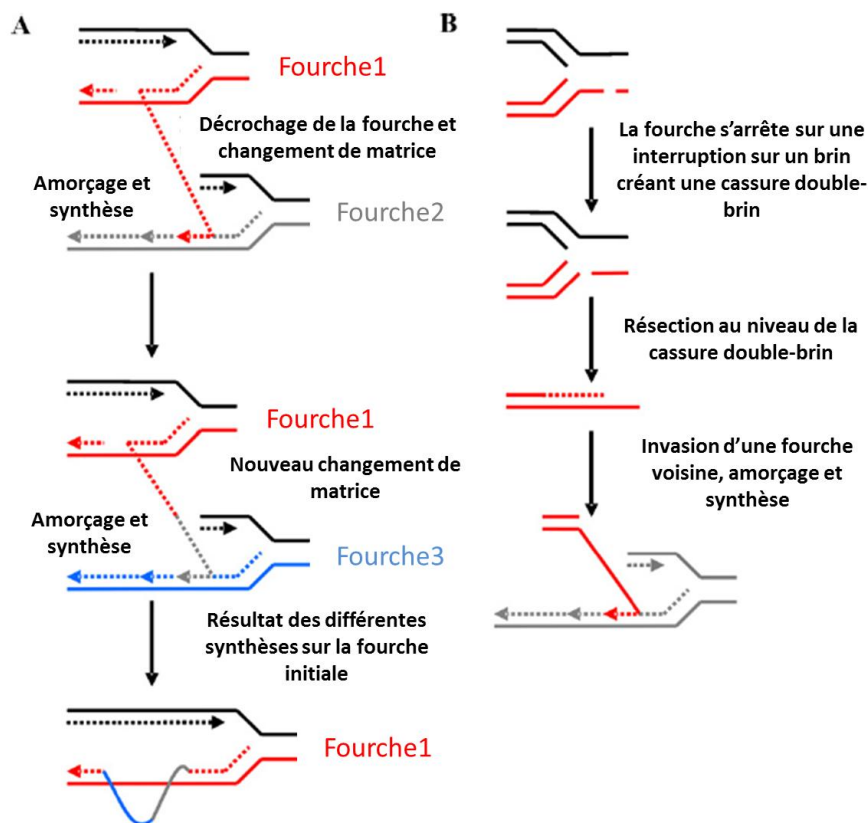


Figure 4 : A-Mécanisme de Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS). B-Mécanisme de Microhomology-Mediated Break-Induced Replication (MMBIR). La différence réside en la présence d'une interruption d'un brin matrice dans le MMBIR conduisant, après l'arrêt de progression de la fourche, à une cassure double-brin et à une résection. Schéma adapté de Colnaghi *et al.* 2011.

C. Caractérisation d'une insertion

Une insertion peut être inter- ou intrachromosomique, équilibrée ou non, directe ou inversée.

1. Inter- ou intrachromosomique

L'insertion est interchromosomique si le troisième point de cassure intervient sur un chromosome d'une autre paire. Le fragment libéré du chromosome donneur sera donc inséré dans un chromosome d'une autre paire (Figure 1).

Elle est intrachromosomique si les chromosomes donneur et receveur sont un seul et même chromosome. Le fragment inséré sera ainsi situé à une place inhabituelle sur son chromosome d'origine (Figure 5).

2. Equilibrée ou déséquilibrée

L'insertion est qualifiée d'équilibrée si, lors du réarrangement, il n'y a pas eu de perte ni de gain de matériel chromosomique. Elle est déséquilibrée s'il existe une perte ou un gain de matériel chromosomique à proximité d'un point de cassure ou si le nombre de copies du fragment inséré n'est pas égal à deux (Figure 5).

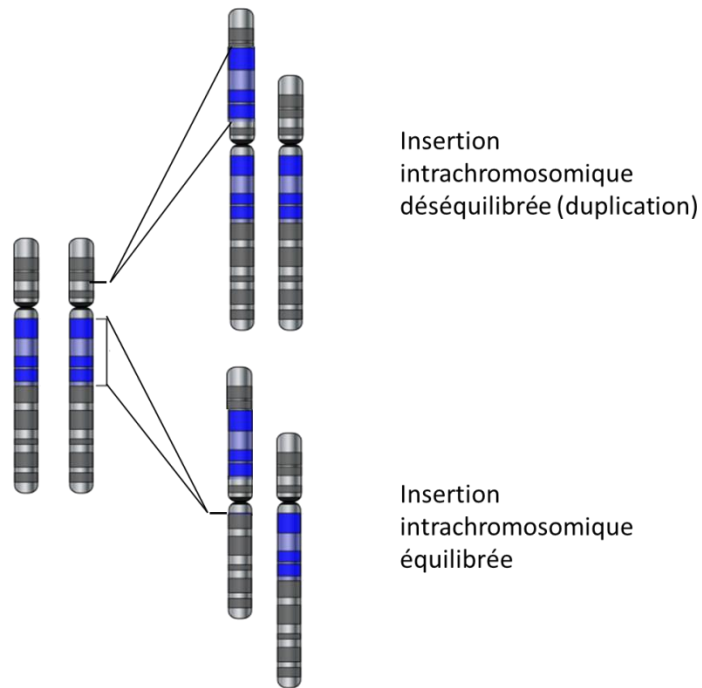


Figure 5 : Schéma illustrant deux types d'insertions intrachromosomiques (équilibrée et déséquilibrée).

Lorsqu'une seule copie du fragment est présente, il s'agit d'une délétion mais lorsqu'il existe trois copies, il s'agit soit d'une duplication, si les deux copies sont juxtaposées, soit d'une insertion, si les copies ne sont pas contiguës. La localisation de la troisième copie grâce à la FISH permet de différencier ces cas.

3. Orientation du fragment

Chaque fragment chromosomique possède une extrémité centromérique et une extrémité télomérique. Cela lui confère une orientation physiologique. Lors d'une insertion directe, le fragment inséré conserve son orientation d'origine (l'extrémité centromérique s'insère du côté du centromère et l'extrémité télomérique du côté du télomère du chromosome receveur). Lors d'une insertion inversée, le fragment s'insère avec une orientation contraire (l'extrémité centromérique s'insère du côté du télomère et l'extrémité télomérique du côté du centromère du chromosome receveur) (Figure 6).

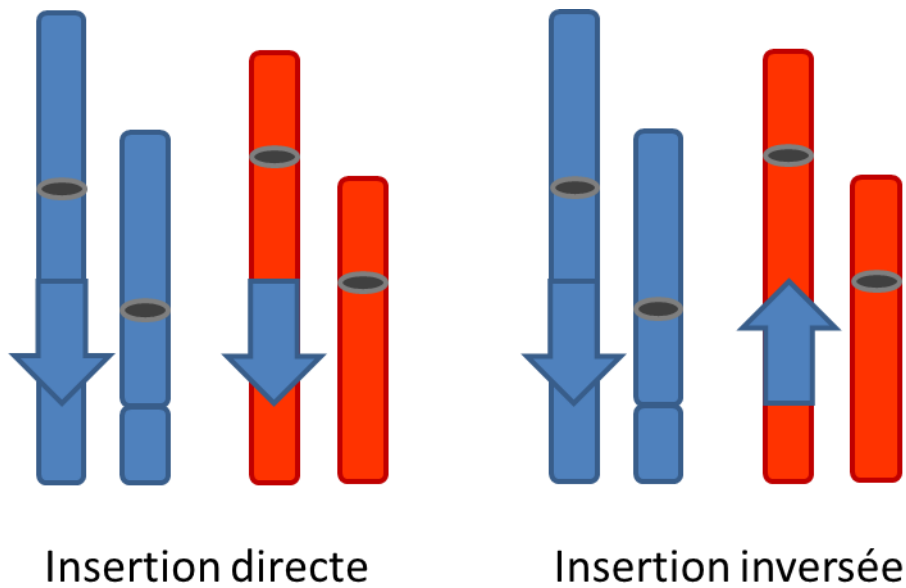


Figure 6 : Orientation du fragment inséré (Flèche bleue). Les centromères des deux paires de chromosomes sont représentés par des ovales gris. L'extrémité télomérique physiologique du fragment inséré (sur le chromosome bleu de gauche) correspond à la pointe de la flèche. L'autre extrémité de la flèche correspond à l'extrémité centromérique physiologique du fragment inséré. A gauche, le fragment inséré dans le chromosome receveur (rouge) garde son orientation physiologique. L'insertion est dite directe. A droite, l'extrémité télomérique du fragment inséré est orientée vers le centromère du chromosome receveur. L'insertion est dite inversée.

4. Insertions réciproques

Une insertion réciproque correspond à un échange de fragments intercalaires entre les deux chromosomes impliqués. Dans ce cas, chaque chromosome est à la fois donneur et receveur (Figure 7).

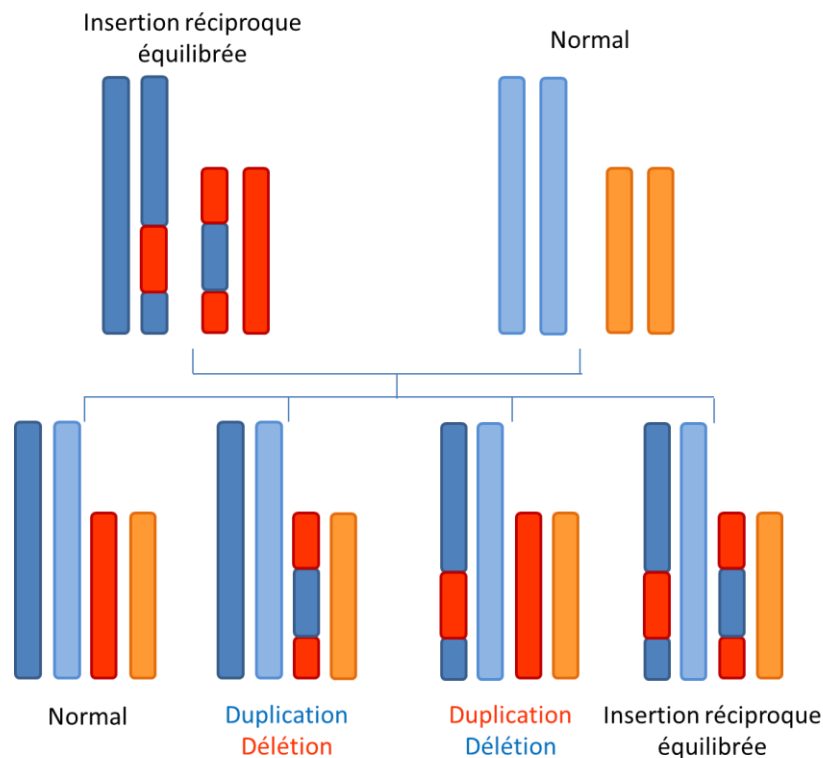


Figure 7 : Ségrégation théorique dans le cas d'une insertion réciproque équilibrée interchromosomique.

Cette configuration est exceptionnelle. Très peu de cas ont été rapportés. En 2000, lorsque Van Hemel et Eussen rapportent un cas d'insertion réciproque entre les bras longs d'un chromosome 11 et d'un chromosome 13 ($ins(11;13)(q14q122)(q21.32q31.2)$), seules deux autres observations similaires avaient été décrites (Van Hemel et Eussen, 2000).

La première publication rapportant un cas d'insertion réciproque est parue en 1994. L'anomalie chromosomique a été mise en évidence sur le caryotype d'une femme ayant fait cinq fausses-couches précoces. L'insertion réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 7 et 14 a été confirmée par FISH et l'analyse parentale a montré qu'elle était héritée de sa mère. Cette dernière a perdu deux garçons en période néonatale (Wang *et al.* 1994). Les fausses-couches à répétitions chez la fille, ainsi que le décès des deux nouveau-nés de sa mère, sont probablement dus à des déséquilibres chromosomiques non viables causés par une malségrégation des chromosomes maternels pendant la méiose. En effet, le risque de déséquilibre chez la descendance, lorsqu'il n'y a pas de crossing-over, est de 50% et associe une monosomie partielle d'une des régions échangées et une trisomie partielle de l'autre région (Figure 7). En cas de crossing-over pendant la méiose, la formation de

chromosomes recombinants acentriques ou dicentriques augmente encore le risque de fausse-couche spontanée.

Dans le cas précédent, l'insertion réciproque à l'état équilibrée n'a pas causé de phénotype ou pathologie particulière chez les deux femmes, en dehors des difficultés de procréation. Cependant, même à l'état équilibré, une insertion réciproque peut être pathogène. En 1999, une équipe publie un cas de syndrome de DiGeorge causé par une insertion réciproque entre une région du bras long du chromosome 8 et une région du bras court du chromosome 10 (Van Esch *et al.* 1999). En effet, la formation d'une insertion réciproque équilibrée nécessite quatre points de cassure, contre trois pour une insertion simple, et augmente d'autant le risque de rupture d'un gène et la genèse d'une pathologie. Le patient décrit par Van Esch *et al.* présentait des exostoses multiples en plus du DiGeorge en rapport avec un remaniement complexe au point de cassure en 8q24.1 au sein du gène *EXT1* (Van Esch *et al.* 1999).

Dans le cas des insertions réciproques, le nombre de gènes délocalisés, et potentiellement dérégulés, est aussi plus grand que lors d'une insertion simple.

En 2011, la mise en évidence par CGH array d'une monosomie partielle associée à une trisomie partielle de deux régions distinctes dans le génome de deux patients, ont conduit à la découverte d'insertions réciproques équilibrées chez les pères. La première est interchromosomique (chromosomes 2 et 9) et la seconde est intrachromosomique (chromosome 9). Les déséquilibres observés chez les enfants sont dus à une malségrégation dans le cas de l'insertion interchromosomique et à une recombinaison méiotique entre les régions homologues sur le chromosome 9 normal et le chromosome 9 remanié dans le cas de l'insertion réciproque intrachromosomique (Neill *et al.* 2011).

D. Conséquences

Plusieurs facteurs interviennent pour définir les conséquences phénotypiques d'une insertion : (1) le contenu en gènes du segment inséré, (2) un éventuel effet de position (en raison de la délocalisation du segment inséré) responsable d'une dérégulation de

l'expression de gènes contenus dans le segment inséré et/ou situés à proximité des points de cassure des chromosomes donneur et receveur et (3) un éventuel déséquilibre aux points de cassure (Baptista *et al.* 2005, Baptista *et al.* 2008).

1. Pour le porteur de l'insertion

a) Insertion équilibrée

Majoritairement asymptomatiques, les insertions chromosomiques équilibrées sont le plus souvent mises en évidence lors de l'étude parentale par FISH suite à la détection d'un déséquilibre chez le cas index.

Cependant, dans de rares cas, l'interruption d'un gène à un des points de cassure peut conduire à une protéine correspondante anormale ou anormalement exprimée par les cellules induisant une symptomatologie particulière. Le syndrome de Rett, par exemple, est une maladie génétique neurologique liée à au chromosome X se manifestant chez les filles par un retard psychomoteur important associé, de manière caractéristique, à la perte de l'utilisation volontaire des mains. Ce syndrome est habituellement dû à des mutations ponctuelles du gène *MECP2* situé en Xq28. En 2011, une équipe a décrit le cas d'une jeune fille atteinte cliniquement d'un syndrome de Rett pour lequel l'anomalie causale n'était pas une mutation ponctuelle dans *MECP2* mais l'insertion d'une région du chromosome 19 (19p13.3) au sein de ce gène (Neill *et al.* 2011).

La dérégulation de l'expression d'un gène compris dans le fragment délocalisé peut aussi être à l'origine d'un désordre. L'expression de chaque gène est régie par différents éléments régulateurs (activateurs ou répresseurs) situés à plus ou moins grande distance dudit gène. Lorsque celui-ci est délocalisé sur une autre portion du génome, les éléments de régulation habituels peuvent ne plus être en mesure d'influencer son expression et ainsi provoquer une pathologie. Ce phénomène est également valable pour les gènes proches des points de cassure au site de l'insertion par éloignement de leurs régulateurs physiologiques ou par l'intervention d'éléments régulateurs contenus dans le fragment inséré. Le

rapprochement des deux parties du chromosome donneur entourant le fragment libéré peut également perturber l'expression des gènes situés sur l'un et l'autre des segments.

Lors de la jonction entre les extrémités générées par les points de cassure, un gène rompu sur un des fragments peut être juxtaposé à un gène rompu sur l'autre fragment et aboutir à la formation d'un gène de fusion. Ce phénomène est très souvent à l'origine d'hémopathies malignes où un gène du cycle cellulaire fusionne avec un oncogène et provoque une prolifération accélérée du clone porteur de cette anomalie. La cause chromosomique est plus souvent une translocation réciproque mais quelques cas d'insertions conduisant à des hémopathies malignes ont été rapportés. Par exemple dans les leucémies aiguës promyélocyaires, la translocation t(15;17) est une anomalie fréquemment rencontrée. Elle est à l'origine d'un gène de fusion entre le gène *PML* situé en 15q22 et le gène *RAR α* en 17q12. Des insertions cryptiques d'un des deux gènes dans le locus du second ont été publiées comme étant responsables de leucémies aiguës promyélocyaires sans véritable translocation t(15;17) (Wang *et al.* 2009).

b) Insertion déséquilibrée

Les insertions déséquilibrées correspondent à des duplications dans lesquelles le fragment surnuméraire n'est pas juxtaposé à sa localisation habituelle, comme dans les duplications en tandem ou en miroir, mais intégré au sein d'une autre région chromosomique.

Comme dans le cas des insertions équilibrées, la rupture d'un ou plusieurs gène(s), la dérégulation de l'expression d'un gène par délocalisation ou la formation d'un gène de fusion peuvent contribuer à l'établissement du phénotype pathologique.

Les patients porteurs d'une insertion déséquilibrée peuvent être parfaitement asymptomatiques si le fragment dupliqué ne contient pas de gène ou si les gènes contenus dans la région ne sont pas sensibles au dosage génique, c'est-à-dire si la variation du nombre de copies dudit gène n'entraîne pas de perturbation de sa fonction.

Certains gènes cependant, peuvent être responsables d'une symptomatologie dès lors qu'ils sont présents en un nombre de copies différent de deux. Ce sont les gènes sensibles au dosage génique. Par exemple, la délétion d'une copie du gène *SHOX* est fréquemment impliquée dans le syndrome de Léri-Weill. Ce syndrome se manifeste par un retard statural plus ou moins associé à une déformation du poignet appelée déformation de Madelung. Des anomalies du gène *SHOX* peuvent aussi être responsables de certains cas de retard statural idiopathique (Belin *et al.* 1998, Shears *et al.* 1998). La délétion homozygote du gène *SHOX* conduit à un phénotype plus sévère nommé dysplasie mésomélique de Langer (Robertson *et al.* 2000). A l'inverse, des cas de duplications du gène *SHOX* ont été identifiés chez des patients présentant une grande taille (Ogata *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2009). En pratique, lorsque le segment inséré contient plusieurs dizaines de gènes, il est probable que plusieurs d'entre eux soient sensibles au dosage génique et donc associés à un phénotype anormal.

c) Cas des insertions dans les gonosomes

Les insertions chromosomiques peuvent également intéresser les gonosomes. Du fait de l'inactivation de l'X chez les femmes, l'insertion d'un fragment chromosomique dans un chromosome X peut engendrer un phénotype plus modéré chez une femme que chez un homme. Le risque réside donc dans la transmission de l'X portant l'insertion à un garçon et le développement d'une pathologie invalidante. Une équipe chinoise a rapporté le cas d'une famille dont quatre garçons étaient atteints d'une hypertrichose généralisée congénitale due à l'insertion d'un fragment intragénique (*COL23A1*) de 126kb de la région 5q35.3 au sein du locus Xq27.1. Dans cette famille, les femmes porteuses de l'insertion présentaient un phénotype plus modéré. L'hypothèse émise est l'inactivation aléatoire du X porteur de l'insertion chez les femmes de la famille (Zhu *et al.* 2011).

En 2011, une équipe a rapporté trois cas identiques d'insertions déséquilibrées d'un fragment de 437kb de la région 18q11.32 dans le chromosome Y, en Yp11.2 (Neill *et al.* 2011). Les patients présentaient soit une dysmorphie faciale associée à plusieurs malformations congénitales, soit un colobome de l'iris, soit un retard staturo-pondéral. Dans

les trois cas, la transmission de l'anomalie s'est faite de père en fils et aucun père n'avait de signe clinique notable.

À l'inverse, des fragments de gonosome peuvent aussi s'insérer dans les autosomes. Au moins cinq cas d'insertion de fragments du chromosome X dans différents autosomes (Chromosome 1, 9 ou 21) ont été rapportées (Neill *et al.* 2011).

Les auteurs ont également observé dans leur série une insertion du bras court du chromosome Y dans le bras court du chromosome X chez un garçon atteint d'un retard du développement et des acquisitions (Neill *et al.* 2011).

2. Pour la descendance

La plupart des insertions sont découvertes suite à l'identification d'un déséquilibre chez le cas index. En effet, le risque principal pour la descendance d'un porteur d'une insertion est d'avoir une monosomie ou une trisomie partielle du fragment inséré. Le risque théorique, pour une insertion interchromosomique, se répartit de la façon suivante : 25% des descendants auront une délétion du fragment inséré, 25% auront une duplication du fragment inséré, 25% auront une insertion équilibrée comme le parent porteur et 25% auront un génotype normal (Figure 8 A).

En 1988, la première insertion interchromosomique découverte suite à des fausses-couches à répétition a été rapportée par une équipe américaine (Abuelo *et al.* 1988). Depuis, il a été plusieurs fois constaté que la répartition théorique des anomalies n'est pas celle observée en pratique. En effet, de nombreux déséquilibres ne sont pas viables et conduisent à des fausses-couches spontanées. Cela réduit donc la proportion d'enfants vivants avec une duplication ou une délétion issue d'une insertion. Cette proportion est variable en fonction de la taille du fragment inséré, de la région concernée et du type d'insertion (Xanthopoulou *et al.* 2010). Dans la littérature, le risque de déséquilibre observé varie entre 15% (Madan et Menko 1992) et 50% (Friedrich *et al.* 2000). Dans l'étude de Madan et Menko, portant essentiellement sur les insertions intrachromosomiques, les duplications sont quatre fois plus fréquentes que les délétions et le taux de fausses-couches spontanées est semblable à celle de la population générale (12%).

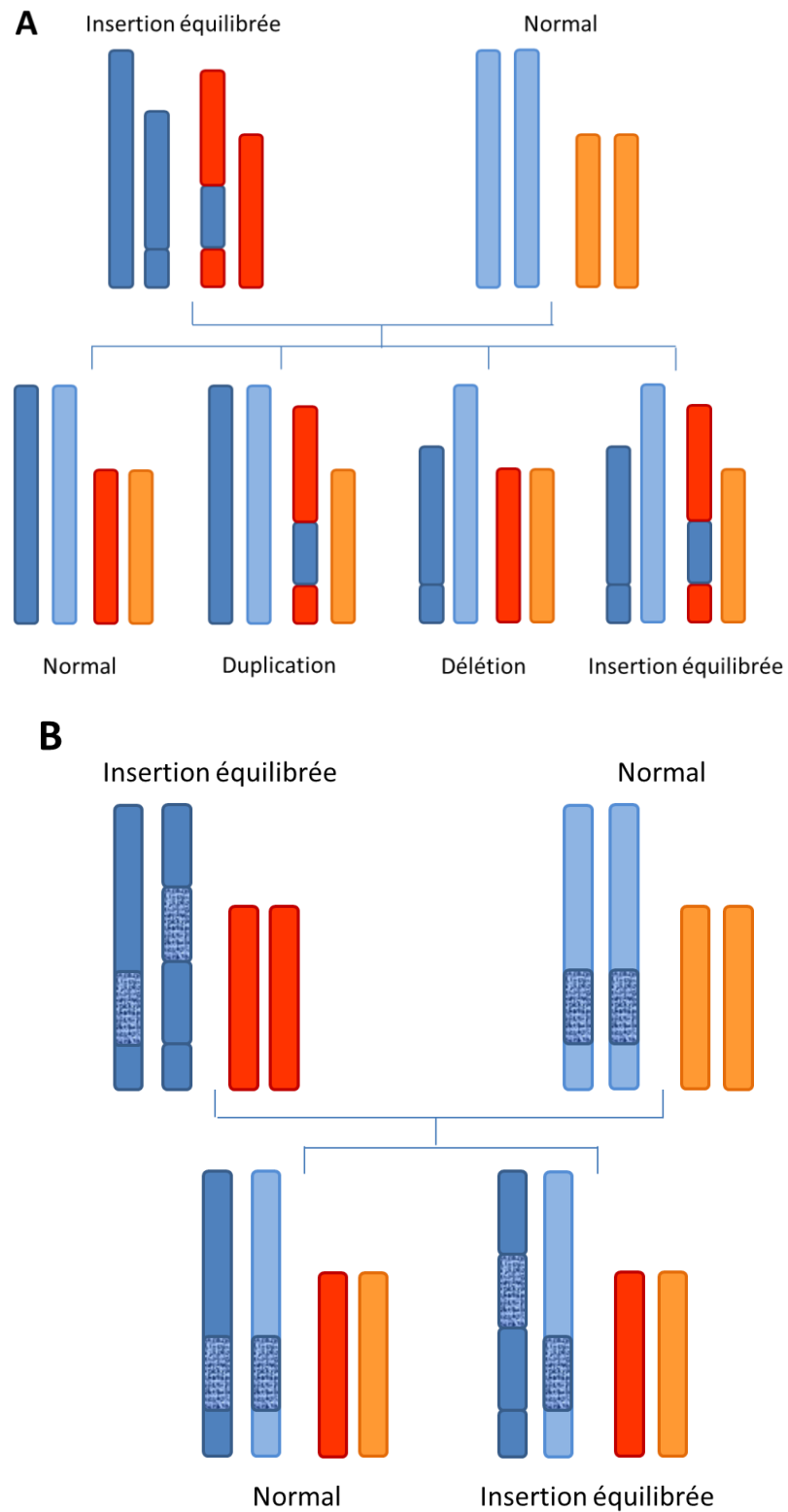


Figure 8 : Ségrégation théorique dans le cas d'une insertion interchromosomique (A) ou intrachromosomique sans recombinaison (B).

a) Insertion interchromosomique

Dans le cas des insertions interchromosomiques, le déséquilibre est, le plus souvent, la conséquence de la ségrégation des chromosomes normaux et remaniés de chacune des paires impliquées dans l'insertion (Van Hemel et Eussen. 2000) (Figure 8 A).

b) Insertion intrachromosomique

En ce qui concerne les insertions intrachromosomiques, il existe une possibilité de crossing-over. En l'absence de recombinaison par crossing-over, il existe un risque de transmettre l'insertion équilibrée de 50% à chaque grossesse (Figure 8 B). La probabilité de survenue d'un crossing-over est plus ou moins importante en fonction de la distance entre la localisation habituelle du fragment et celle de l'insertion, de la taille du fragment, de son orientation par rapport à celle d'origine. L'insertion intrachromosomique peut se faire au sein du même bras chromosomique ou dans l'autre bras du chromosome. Si le fragment s'insère dans l'autre bras de manière inversée (Figure 9 B) ou s'il s'insère dans le même bras de manière directe (Figure 9 C), le risque de déséquilibre concerne le segment de chromosome situé entre les deux localisations. À l'inverse, s'il s'insère dans le même bras de manière inversée (Figure 9 D) ou dans l'autre bras de manière directe (Figure 9 A), le déséquilibre impliquera les segments terminaux de part et d'autre (Madan et Menko, 1992).

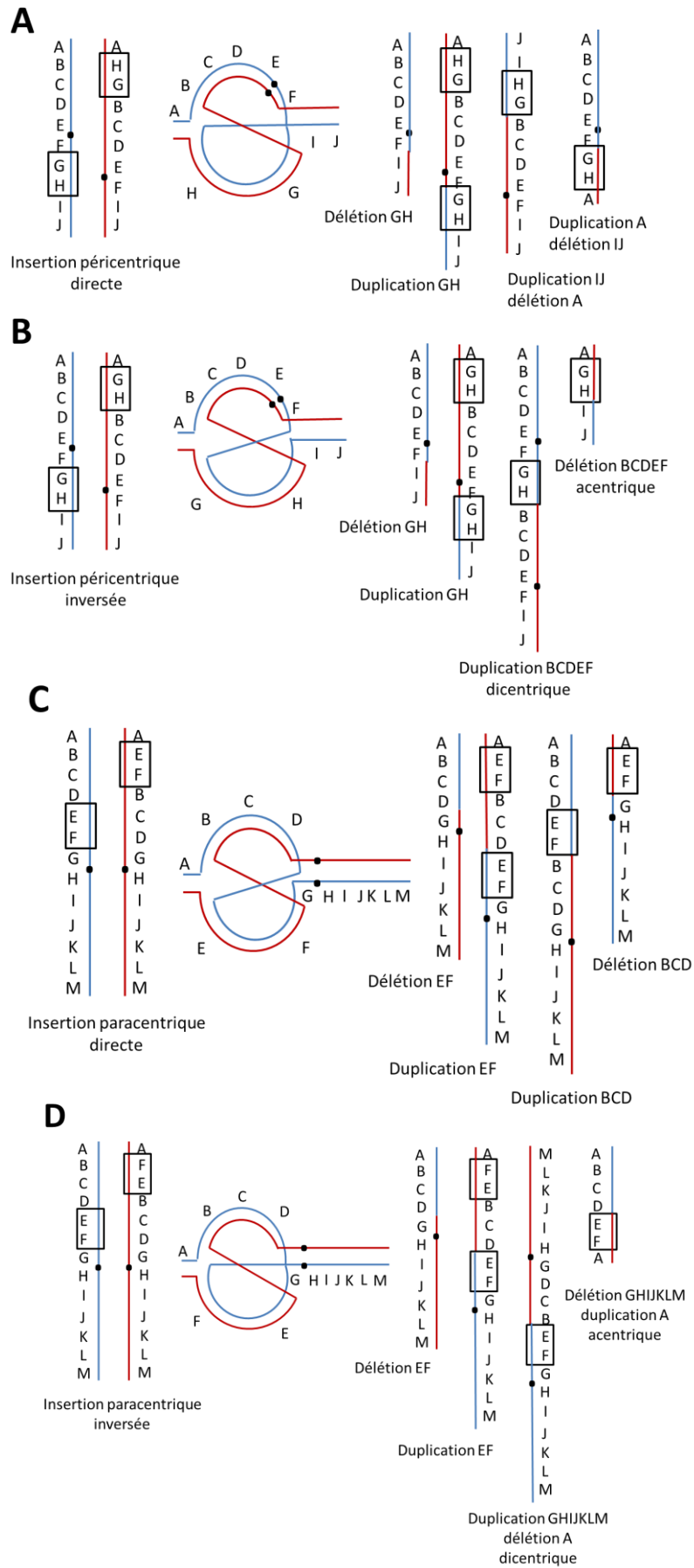


Figure 9 : Possibles recombinants après crossing-over en fonction du type d'insertion intrachromosomique. Schéma inspiré de Madan et Menko 1992.

E. Circonstances de découverte

1. Historique et épidémiologie

La notion d'insertion est relativement récente et a évolué au gré des avancées techniques en cytogénétique conventionnelle puis en cytogénétique moléculaire.

a) A partir du caryotype

Les premières insertions ont été décrites dans les années 70 grâce à l'étude du caryotype standard puis du caryotype haute résolution. Seuls les réarrangements d'une taille supérieure à 5 Mb pouvaient alors être mis en évidence.

b) Apport des différentes techniques d'hybridation in situ

L'identification d'insertions de plus petite taille a été grandement facilitée par l'avènement de la technique d'hybridation *in situ* à la fin des années 80, tout d'abord grâce à la peinture chromosomique (Whole Chromosome Painting). Cette technique de fluorescence permet de marquer d'une même couleur tout le matériel chromosomique appartenant à une paire de chromosomes donnée. L'utilisation de deux fluorochromes différents permet de visualiser simultanément deux paires de chromosomes. L'insertion se caractérise alors par un chromosome bicolore, une bande de la couleur du chromosome donneur intégrée entre deux extrémités de la couleur du chromosome receveur. Les insertions intrachromosomiques ne peuvent pas être identifiées par cette technique.

Les sondes subtélomériques, la technique PRINS (PRimed *IN Situ* labelling ou Synthèse *in situ* amorcée) et la Fiber FISH ont parfois aidé à détecter des insertions chromosomiques non décelables par le caryotype ou à préciser la nature de remaniements complexes.

A la fin des années 90, il est devenu possible de visualiser tous les chromosomes simultanément en employant 24 sondes de couleurs différentes. Ce sont les techniques de

FISH multicolor comme la M-FISH, le Spectral Karyotyping (SKY) ou la COBRA FISH. La visualisation des insertions intrachromosomiques n'est, là encore, pas possible.

Liehr *et al.* ont introduit, en 2002, une technique de banding par fluorescence appelée MulticolorBanding encore utilisée récemment. Elle permet de distinguer différentes régions d'un même chromosome par des sondes fluorescentes de différentes couleurs. Cela a permis d'abaisser la résolution à quelques mégabases (Pellestor *et al.* 2011).

c) *Epidémiologie dans les années 90s*

En 2000, Van Hemel et Eussen rapportent cinq cas d'insertions et publient une revue des 81 articles précédemment écrits sur le sujet. Contrairement à la prévalence de 1/5000 avancée par deux équipes en 1974 et 1981, leur laboratoire a identifié 5 insertions parmi environ 40000 caryotypes, soit une prévalence proche de 1/10000 identique à celle estimée par Fryns *et al.* en 1984.

La revue de la littérature a permis d'évaluer à quatre-vingt pour cent la proportion des insertions identifiées dans le cadre de l'exploration d'anomalies congénitales chez le cas index. Les autres indications comprenaient des fausses-couches répétées, des bilans d'infertilité ou d'investigations dans un contexte d'antécédent familial d'anomalie congénitale.

Environ quatorze pour cent des insertions sont apparues *de novo* tandis que la majorité des insertions sont héritées, le plus souvent transmises par la mère (59,5% contre 26,6% pour les insertions d'origine paternelle) (Van Hemel et Eussen. 2000). Certains porteurs de l'insertion à l'état équilibré présentent des anomalies congénitales et dans la plupart des cas, l'insertion est apparue *de novo* chez ces individus. À l'inverse, les insertions équilibrées retrouvées chez des individus ne présentant pas d'anomalie congénitale sont principalement familiales. Ces deux observations ont amené à penser que l'identification d'une insertion chromosomique *de novo* en diagnostic prénatal est plus à risque de conduire à des anomalies congénitales que si elle avait été héritée.

L'étude de familles sur plusieurs générations leur a permis d'estimer un risque d'avoir un enfant porteur d'un déséquilibre chromosomique atteignant 32% pour un homme porteur d'une insertion équilibrée et 36% si c'est une femme qui porte l'insertion équilibrée (Van Hemel et Eussen 2000).

d) Détection d'insertions de plus en plus petites grâce à la CGH array

L'étude de l'ensemble du génome avec une résolution pouvant atteindre 1kb grâce à la CGH array a permis de mettre en évidence des déséquilibres de plus en plus petits dont l'exploration a révélé l'existence d'insertions qui n'auraient pas été détectées par les techniques précédentes chez certains membres de la famille. Leur fréquence a alors pu être réévaluée. En 2010, une équipe de Houston a rapporté 40 insertions parmi 18000 patients non apparentés analysés par CGH array, soit une fréquence d'environ 1/500 (Kang *et al.* 2010). Ce chiffre correspond à l'incidence des insertions au sein d'une population d'individus atteints de retard mental et/ou malformations congénitales.

Parmi ces 40 insertions, 28 (70%) sont des trisomies partielles pures appelées insertions simples. Deux insertions intrachromosomiques (7%) sont héritées d'un parent. Dans six cas sur 26 insertions interchromosomiques (23%), le fragment s'insère dans le bras court d'un chromosome acrocentrique (le chromosome 15 ou le chromosome 22), six autres étaient suffisamment grandes pour être détectées au caryotype.

Cette revue de la littérature a également permis de montrer qu'il existe des insertions récurrentes. Ils rapportent la présence d'une insertion d'un fragment de la région 6p25.3 au sein de la bande 3p13 chez quatre patients non apparentés.

Huit insertions dites complexes, c'est-à-dire qui nécessitent plus de trois points de cassure, ont été répertoriées dans cette étude (2 intrachromosomiques et 6 interchromosomiques) (20%).

Dans dix pour cent des cas (4 cas), des délétions chez le cas index ont permis de découvrir, grâce à la FISH, une insertion présente à l'état équilibré chez un des parents pouvant conduire à des récurrences lors de prochaines grossesses (Kang *et al.* 2010).

Une autre équipe a détecté, parmi plus de 40.000 CGH array réalisées entre mars 2004 et février 2010, 71 insertions déséquilibrées (chez 50 patients) parmi 4909 patients porteurs de déséquilibres (Neill *et al.* 2011). D'après leur expérience, environ 3% des gains chromosomiques découverts par CGH array s'avèrent être des insertions après analyse par FISH. L'incidence des insertions dans la population de patients analysés en CGH array est de 1/800 (Neill *et al.* 2011). Ce chiffre est comparable à celui rapporté par Kang *et al.* en 2010.

Pour estimer l'incidence des insertions dans la population générale, les auteurs ont comparé le nombre d'insertions identifiées parmi les 40.000 CGH array réalisées avec celui de la microduplication 7q11.23. Ce déséquilibre a été choisi puisque, comme les insertions, il est difficile à évoquer cliniquement. Treize patients porteurs d'une microduplication 7q11.23 et 50 patients avec insertions déséquilibrées ont été identifiés. Dans leur cohorte, les insertions ont donc une incidence 3,85 fois plus élevée que celle de la microduplication 7q11.23. Dans la population générale, l'incidence de la microduplication 7q11.23 a été estimée entre 1/13000 et 1/20000 (Van der Aa *et al.* 2009). L'incidence des insertions dans la population générale pourrait donc être comprise entre 1/3380 et 1/5200.

Dans leur cohorte, 81% des insertions identifiées chez les cas index sont héritées et dans 65% des cas, l'anomalie retrouvée chez le parent est identique à celle de l'enfant, c'est-à-dire présente à l'état déséquilibré. Si le parent ne partage pas le phénotype du cas index, il peut s'agir d'une variation du nombre de copies (CNV) bénigne, ou d'un phénomène de démasquage d'allèle récessif dans le cas d'une délétion chez le propositus. En effet, il peut exister une mutation sur un allèle chez l'enfant qui ne serait pathogène qu'à l'état homozygote. Cependant, si le deuxième allèle est délété, la mutation se retrouve à l'état hémizygotique et peut entraîner la pathologie. Le développement de la pathologie chez le cas index et non chez son parent peut aussi être influencé par la présence d'autres anomalies ailleurs sur le génome, qu'elles soient chromosomiques et/ou moléculaires, ou par d'autres facteurs d'ordre non génétique. Enfin, de nombreux désordres génomiques récurrents ne

s'expriment pas de la même manière chez les différents porteurs ; on parle d'anomalies à expressivité variable (Sharp. 2009).

2. La FISH : analyse essentielle pour le diagnostic

Il faut garder à l'esprit que l'incidence des insertions reste sous-estimée dans les publications puisque, dans un certain nombre de cas, il n'est pas possible d'étudier les deux parents après identification d'un déséquilibre chez le cas index.

L'amélioration de la résolution avec l'avènement de la CGH array a permis la détection de déséquilibres de plus en plus petits. Cependant, cette technique, utilisée seule, ne permet pas de localiser les gains de matériel qu'elle détecte. C'est uniquement associée à la FISH qu'elle a pu améliorer l'identification des insertions correspondantes.

Cependant, la taille de l'anomalie à explorer est devenue une limite à l'utilisation de la FISH. En effet, du fait de la taille des sondes habituellement utilisées (Bacterial Artificial Chromosomes ou BAC), il n'est pas possible d'employer la FISH pour confirmer les anomalies de taille inférieure à 100 kb qui sont facilement détectée par CGH array. Dans de nombreux laboratoires, après identification de tels déséquilibres, la confirmation chez le cas index et l'étude parentale est faite par PCR quantitative (qPCR). Cette technique permet de connaître le nombre de copies d'une région d'intérêt par amplification à l'aide d'amorces spécifiques. Cependant, elle ne permet pas de visualiser la localisation des copies de cette région. Dans le cas d'une insertion équilibrée, l'individu possède bien deux copies donc la qPCR donnera un résultat normal alors qu'une des deux copies n'est pas localisée à sa position habituelle.

Les fosmidés sont des vecteurs d'ADN basés sur un plasmide d'*Escherichia coli* responsable de la synthèse des pili, organe impliqué dans la conjugaison des bactéries (équivalent de la reproduction). Les séquences spécifiques portées par ces vecteurs ont une taille limitée, inférieure à celle des sondes FISH (BAC ou Cosmidés). Leur utilisation pourrait pallier aux limites de taille des sondes BAC ou cosmids en FISH et permettre une analyse qualitative et quantitative à la fois, et remplacer avantageusement la qPCR. Cependant, ils sont peu utilisés car les banques de fosmidés comprennent des centaines de milliers de sondes et sont beaucoup plus coûteuses que la qPCR.

En conclusion, malgré ces limites, toutes les études s'accordent sur l'importance de réaliser l'étude parentale (et des autres membres de la famille) par FISH lorsqu'un déséquilibre est décelé chez un cas index. Le conseil génétique fourni à la famille est totalement différent dans le cas d'une insertion équilibrée à l'origine du déséquilibre ou dans le cas d'un déséquilibre *de novo*. Dans le premier cas, il existe un risque de récurrence important lors d'éventuelles grossesses ultérieures. Dans le second cas, le risque de récurrence est inférieur à 1%.

III. Explorations cytogénétiques et moléculaires

L'identification de l'anomalie chromosomique responsable du phénotype du patient, sa caractérisation ainsi que l'étude parentale pour déterminer son caractère héréditaire ou *de novo* nécessite de recourir à diverses techniques cytogénétiques (caryotype et FISH) et moléculaires (CGH array). Toutes les analyses génétiques ont été réalisées après accord écrit des patients ou de leur tuteur légal.

A. Les techniques de cytogénétiques

1. Le caryotype

Le caryotype est une analyse cytogénétique conventionnelle qui permet de visualiser l'ensemble du génome. Tous les chromosomes sont individualisés et classés par ordre de taille et en fonction de la position du centromère. Le génome humain est constitué de 22 paires de chromosomes non sexuels, les autosomes, et de deux chromosomes sexuels. La formule chromosomique normale d'une femme s'écrit 46,XX et celle d'un homme : 46,XY. Il permet la détection de réarrangements chromosomiques de tailles supérieures à 5-10 mégabases (Mb). En deçà, l'anomalie est difficilement décelable par cette technique.

Les caryotypes haute résolution ont été réalisés à partir des lymphocytes du sang périphérique prélevé sur tube hépariné.

a) Mise en culture, thymidine et BrdU

Un millilitre de sang est mis en culture à 37°C pendant 72 heures dans du milieu RPMI. Après 56 heures d'incubation, neuf gouttes de thymidine à 6 mg/mL sont ajoutées au milieu de culture. À la fin des 72 heures d'incubation, le culot cellulaire est lavé avec du milieu de culture puis resuspendu dans du milieu RPMI. La phytohémagglutinine (PHA), introduite à cette étape dans le milieu, est un mitogène qui stimule la prolifération des

lymphocytes. De la bromodéoxyuridine (BrdU) à 1 mg/mL, un analogue de la thymidine, est également ajoutée au milieu pour permettre la synchronisation du cycle des différentes cellules. La suspension cellulaire est remise à incuber pendant 5h30 à 37°C.

b) *Blocage des cellules en métaphase*

Un contact de 30 minutes avec 100 µL de colchicine à (20 mg/L) entraîne le blocage des cellules en métaphase.

c) *Choc hypotonique et fixation*

Pour provoquer un choc hypotonique et la dispersion des chromosomes, le culot est repris dans 12 mL d'une solution de sérum de veau fœtal décomplémenté à 56°C dilué au 1/6 dans de l'eau. Après une incubation de 20 minutes à 37°C, 10 mL d'un mélange froid méthanol/acide acétique dans un rapport 3 volumes / 1 volume est ajouté sur le culot cellulaire pour la fixation des métaphases et cela pendant 30 minutes à +4°C. Après avoir éliminé le surnageant, une deuxième étape de fixation d'une heure est réalisée avec, à nouveau, 10 mL de fixateur.

d) *Étalement du culot cellulaire sur les lames*

Après centrifugation, un millilitre de fixateur est laissé pour remettre le culot en suspension. Quelques gouttes de cette suspension sont ensuite étalées sur des lames propres humides et inclinées.

e) *Solution de Hoescht et SSC 2X*

Après séchage, les lames sont plongées dans une solution de Hoescht (intercalant de l'ADN sensible aux UV, émettant dans le bleu) pendant 20 minutes à l'obscurité puis rincées.

Quelques gouttes de tampon SSC 2X sont ajoutées sur les lames avant d'y apposer une lamelle. L'ensemble est placé 1h45 dans une boîte à UV puis les lamelles sont ôtées sous un filet d'eau.

f) Dénaturation thermique

Les lames sont rincées dans un bac d'eau distillée avant de subir une dénaturation thermique dans une solution de Earle à pH 6,5 pendant 1 heure à 87°C. Elles sont ensuite rincées à l'eau froide pour arrêter la dénaturation.

g) Coloration et lecture des lames

Après séchage, les lames sont colorées par du Giemsa dilué à 5% pendant 3 minutes à température ambiante, rincées à l'eau puis séchées. La détection des métaphases est réalisée par un automate (GSL).

2. La FISH

L'hybridation *in situ* en fluorescence est une technique de cytogénétique moléculaire qui permet de localiser une région chromosomique particulière à l'aide d'une sonde dont la séquence est spécifiquement complémentaire à celle-ci. La sonde est marquée par un fluorochrome émettant généralement dans le vert (spectrum Green) ou dans l'orange (spectrum Orange). Cette analyse est dite ciblée puisqu'elle ne permet de tester simultanément qu'un nombre limité de régions chromosomiques. Cette technique est donc utilisée pour rechercher des anomalies pour lesquelles il existe un signe d'appel clinique et/ou comportemental évocateur orientant vers une région chromosomique précise pouvant être reconnue par une sonde spécifique.

Étant donnée la taille des sondes habituellement utilisées (BAC), la FISH ne peut pas être utilisée pour détecter des anomalies de taille inférieure à 100 kb. Si les sondes utilisées sont des fosmidés, des anomalies plus petites peuvent être explorées par FISH.

La technique d'hybridation *in situ* se déroule en quatre étapes : la préparation du matériel chromosomique du patient, la préparation des sondes, l'hybridation et la révélation (Figure 10).

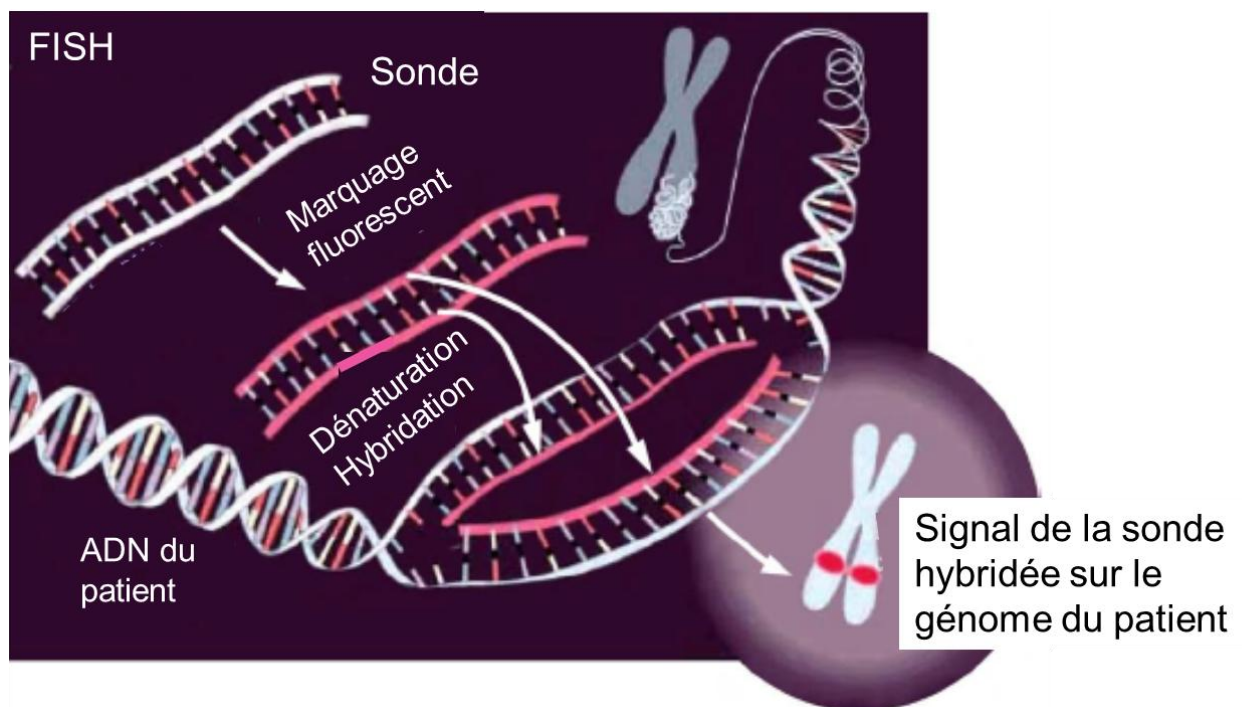


Figure 10 : Déroulement de la FISH. Représentation schématique adaptée de Smeets *et al.* 2004.

a) Préparation du matériel chromosomique du patient

Le matériel chromosomique est obtenu à partir des leucocytes du sang circulant prélevé sur un tube hépariné. L'analyse est réalisée à partir d'une lame sur laquelle est étalé le culot cellulaire traité comme pour la réalisation d'un caryotype (arrêt à l'étape du paragraphe III. A. 1. d)). La lame est immergée 30 minutes dans un bain de 2X SSC préalablement chauffé à 37°C. Elle est ensuite déshydratée dans des bains successifs d'alcools à 70, 80 puis 100% à température ambiante (2 minutes dans chaque solution).

Après séchage à l'air libre, la lame est immergée pendant 2 minutes dans un bain de formamide placé au bain-marie à 72°C. Une nouvelle déshydratation par immersion dans les mêmes solutions d'alcools est réalisée mais cette fois avec des solutions conservées à -20°C. Si les sondes ne sont pas prêtes à l'issue des 2 minutes dans le bain d'alcool absolu à -20°C, la lame doit être laissée dans ce dernier bain.

b) Préparation des sondes

Lorsqu'une délétion ou une duplication est mise en évidence par CGH array, des sondes de FISH sont choisies pour confirmer l'anomalie par une autre technique. Une duplication est confirmée par FISH, si elle a une taille supérieure à 1 Mb. Une délétion est confirmée par FISH si elle atteint une taille minimale proche de 300 kb. Les positions chromosomiques de l'anomalie sont rentrées sur le site internet Ensembl (génome humain) et les sondes de FISH sont choisies, si possible, dans une région riche en gènes, ne contenant pas d'élément répété ni de variation de nombre de copie connue.

Les sondes choisies sont extraites d'une banque composée de 32.000 sondes contiguës couvrant l'ensemble du génome. Après décongélation, 1,2 µL de sonde et 9 µL de tampon SB sont dénaturés pendant 3 minutes à 95°C puis immédiatement refroidis sur glace pendant 3 minutes avant centrifugation. Un mélange réactionnel composé de 9 µL de tampon de réaction (RB) et 1 µL d'enzyme d'amplification est ajouté à l'échantillon dénaturé. Après homogénéisation par aspirations-refoulements, le tube est incubé pendant 2 heures à 30°C. L'enzyme est ensuite désactivée en amenant le milieu réactionnel à 65°C pendant 10 minutes. Les tubes sont conservés sur de la glace.

La purification de la sonde amplifiée s'effectue sur des colonnes Amicon 30K. L'échantillon est dilué dans 500 µL de TE 20 : 1 puis transféré sur la colonne. Une étape de centrifugation de 15 minutes à 10000 rpm permet de piéger la sonde amplifiée sur la colonne et d'éliminer le surnageant et les impuretés. La colonne est ensuite retournée et placée sur un tube collecteur propre et identifié. Une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 3000 rpm permet de recueillir un volume inférieur à 50 µL de sonde amplifiée et purifiée.

Les sondes sont dosées au nanodrop. La concentration doit être supérieure à 70 ng/ μ L pour pouvoir valider l'étape d'amplification des sondes.

Pour réaliser le marquage des sondes, 1 μ g de sondes amplifiées est dilué dans 17,5 μ L d'eau MilliQ. On ajoute ensuite 32,5 μ L d'un mélange réactionnel composé de 20 μ L de dNTP/Tampon de Nick translation, 2,5 μ L de dUTP-fluorochrome (0,2 mM) et 10 μ L d'enzyme de Nick translation. Après homogénéisation, le tube est centrifugé et mis à incuber une nuit à 15°C. La réaction est stoppée par dénaturation de l'enzyme 10 minutes à 72°C puis conservée sur glace à l'obscurité.

Les sondes marquées sont purifiées à nouveau sur des colonnes Amicon 30K. Les 50 μ L de sondes marquées sont dilués dans 450 μ L de TE 20 : 1 puis transférés sur la colonne. L'étape de centrifugation à 10000 rpm dure 15 minutes puis la colonne est retournée et placée sur un tube collecteur propre et identifié. Une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 3000 rpm permet de recueillir un volume inférieur à 50 μ L de sondes amplifiées, marquées et purifiées.

Les sondes marquées sont précipitées pendant au minimum 30 minutes à -20°C après avoir ajouté 7 μ L d'acétate de sodium, 17 μ L d'ADN cot-1 et 170 μ L d'éthanol 100%. Le culot est repris par 300 μ L d'éthanol à 70% après 30 minutes de centrifugation à 13000 rpm et à 4°C. Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm à 4°C est réalisée. Le culot est séché puis repris dans 25 μ L de tampon d'hydratation (FISH Hydratation Buffer). La sonde est stockée à -20°C avant son utilisation.

Un mélange composé de 3 μ L de sonde contrôle et de 3 μ L de sonde spécifique de la région d'intérêt est mis à dénaturer pendant 10 minutes à 72°C. Ensuite, le mélange est placé 15 minutes à 37°C.

c) *Hybridation*

La lame portant le matériel chromosomique du patient est mise à sécher sur une plaque chauffante à 40°C. Le mélange des sondes est alors déposé sur la lame puis recouvert d'une lamelle scellée par de la colle. L'hybridation se fait pendant au minimum 4 heures

dans une chambre humide introduite dans une étuve à 37°C. Le plus souvent, cette étape d'hybridation est faite sur la nuit. La lamelle et la colle sont ôtées et la lame est plongée dans une solution de 2SSC/NP40 pendant 2 minutes à 72°C. Un autre rinçage d'une minute est réalisé dans du 1SSC à température ambiante. Le séchage de la lame a lieu à l'abri de la lumière. L'ensemble du matériel chromosomique est contre-coloré en bleu par 8 µL de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Une nouvelle lamelle est déposée sur la lame avant la lecture au microscope.

d) Révélation

Lorsque la visualisation est faite sur des noyaux interphasiques, où la chromatine est non condensée, l'information n'est que quantitative (nombre de copies de la région étudiée). L'étude des métaphases permet à la fois une analyse quantitative et qualitative car elle permet de vérifier la localisation du fragment d'intérêt (habituelle ou non). Les insertions ne peuvent donc être mises en évidence que sur les métaphases.

B. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN

a) À partir de sang, sur l'automate QuickGene610L®

L'ADN est extrait à partir de 2 mL de sang périphérique recueilli sur EDTA auxquels on ajoute, dans un falcon de 15 mL, 300 µL de protéase EDB et 2,5 mL de solution LDB. Le mélange est homogénéisé par retournements et vortexé puis incubé 5 minutes à 56°C. On vortexe à nouveau après l'incubation avant d'ajouter 2,5 mL d'éthanol absolu pour précipiter l'ADN. La solution est homogénéisée par retournements puis vortexée avant d'être déposée sur les colonnes sous lesquelles des réservoirs-poubelles sont placées. Le dispositif est introduit dans l'automate qui réalise l'élution des solutions d'ADN dans un tube eppendorf identifié.

b) À partir de sang, avec le kit Nucleon Bacc2®

L'ADN est extrait à partir de 3 à 5 mL de sang périphérique recueilli sur EDTA auxquels on ajoute 12 mL de solution A pour lyser les cellules. Pour homogénéiser le mélange et optimiser la lyse, l'échantillon est placé sur l'agitateur à bascule pendant 4 minutes à température ambiante. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 2 mL de solution B. Cinq cents microlitres de solution de perchlorate de sodium sont ajoutés au milieu. Le chloroforme (2mL) ajouté ensuite sous la hotte permettra de créer deux phases pour séparer les résidus organiques dans la phase chloroformée des résidus hydrophiles comme l'ADN. Le mélange est vigoureusement agité avant d'y ajouter 300 µL de résine et de centrifuger. La phase supérieure est transférée dans un nouveau tube dans lequel on ajoute 4 mL d'éthanol absolu froid (à -20°C) pour précipiter l'ADN. Le flocon d'ADN est ensuite isolé et resuspendu dans un volume de TE 20 : 1 adapté pour obtenir une concentration d'ADN proche de 100 ng/µL.

2. La CGH array

L'hybridation génomique comparative (CGH) a été mise au point pour cribler simultanément des variations du nombre de copies dispersées sur l'ensemble du génome en l'absence de signe clinique évocateur d'une région chromosomique particulière. D'abord réalisée sur métaphases, elle a ensuite été développée sur micro-réseaux : c'est ce que l'on appelle la CGH array ou puce à ADN (Figure 11). Des sondes spécifiques dispersées sur tout le génome sont déposées (spottées) ou synthétisées *in situ* sur une lame de verre sur laquelle on co-hybride la même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin, marqué chacun par un fluorochrome différent. Un logiciel détermine le rapport de fluorescence pour chaque sonde, le gain ou la perte de matériel chromosomique se traduisant par une déviation de l'intensité de fluorescence de l'ADN du patient par rapport à celle du témoin pour la région concernée. Cette approche permet d'analyser simultanément la globalité du génome à un niveau de résolution qui dépend du nombre de sondes utilisées. La résolution de cet examen est bien supérieure à celle des techniques de cytogénétique classique. Les remaniements

chromosomiques de très petite taille – délétions et duplications – peuvent ainsi être détectés.

Cette méthode de puces à ADN est actuellement un examen essentiel dans le bilan étiologique des patients présentant un retard mental et/ou un syndrome polymalformatif puisqu'elle permet une analyse pangénomique exploratoire.

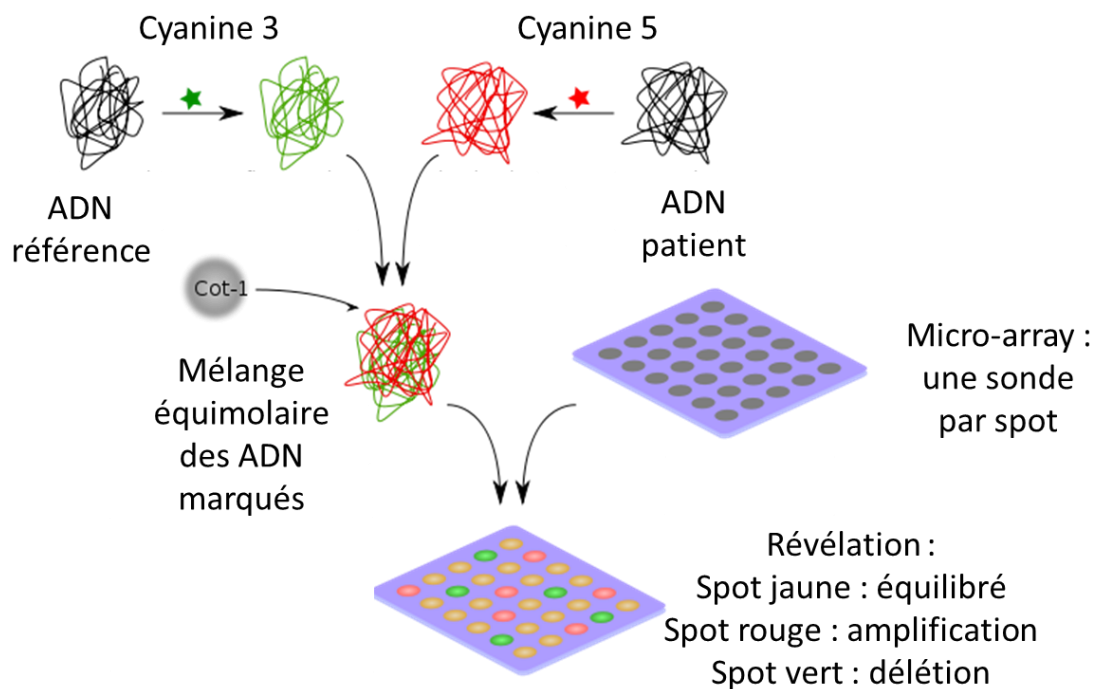


Figure 11 : Principe de la CGH array. L'ADN du patient, marqué par la cyanine 5-dUTP (émettant dans le rouge), est co-hybridé sur une lame portant des sondes (ici des Bacterial Artificial Chromosomes) avec un ADN de référence marqué par la cyanine 3-dUTP (émettant dans le vert). La majorité des sondes émet une fluorescence globale jaune indiquant un signal identique chez le patient et la référence (pas de déséquilibre). Les sondes émettant une fluorescence globale dans le rouge mettent en évidence un gain (amplification) spécifique de matériel chez le patient dans la région correspondant à la sonde par rapport à la référence. A la différence des sondes émettant dans le vert qui indiquent une perte (délétion) de matériel chez le patient par rapport à la référence. (Schéma extrait du site : .wikipedia.org/wiki/Puce_d'hybridation_génomique_comparative)

Nous avons effectué les analyses sur des puces à oligonucléotides 8X60K ou 4X180K commercialisées par Agilent conformément à leurs recommandations. Les différentes étapes de cette technique sont détaillées ci-dessous.

a) *Qualité et concentration de l'ADN*

Après extraction, l'ADN est resuspendu au moins une heure sous agitation à température ambiante. Si nécessaire, l'état de dégradation de l'ADN est contrôlé en déposant 200 ng d'ADN génomique sur un gel d'agarose à 0.8% dans une cuve d'électrophorèse soumise à un voltage de 100 V pendant environ 30 minutes. La concentration est dosée trois fois au nanodrop. Si l'écart-type est supérieur à 10%, l'extrait d'ADN est laissé sous agitation plus longtemps avant d'être dosé à nouveau. La concentration minimale pour réaliser l'analyse est de 55 ng/μL. Si l'échantillon a une concentration moindre, une étape de concentration sur colonne Amicon 50K est réalisée avant de le doser une nouvelle fois. Lors des dosages, la qualité de l'échantillon est appréciée par le rapport de densité optique 260/280 nm qui doit être compris entre 1,8 et 2 (en dessous, l'échantillon peut contenir des traces de protéines, de phénol ou d'autres contaminants absorbant à des longueurs d'ondes proches de 280 nm) et le rapport 260/230 nm qui doit être supérieur à 2 (en dessous, l'échantillon peut contenir des traces de contaminants absorbant à des longueurs d'ondes proches de 230 nm).

b) *Marquage fluorescent de l'ADN*

Pour les puces 180K, un microgramme d'ADN est dilué dans 26 μL d'eau MilliQ et 5 μL de random primers sont ajoutés. Pour les puces 60K, 700 ng d'ADN sont dilués dans 13 μL d'eau milliQ et 2,5 μL de random primers sont ajoutés. L'ensemble est dénaturé à 95°C pendant 10 minutes puis refroidi immédiatement sur glace. Deux mélanges de marquage composés, pour une réaction, de 5 μL de tampon, 2,5 μL du mélange des quatre déoxynucléotides tri-phosphate concentrés 10 fois, 1,5 μL de cyanine 3-(pour la référence) ou cyanine 5-déoxyuridine tri-phosphate (pour les patients) à 1 mM et 0,5 μL d'Exo-Klenow fragment sont préparés sur glace et à l'abri de la lumière puis ajoutés à la solution d'ADN et de primers. Tous les volumes sont doublés dans le cas des puces 4X180K. Les tubes sont mis à incuber à l'obscurité à 37°C pendant 2 heures puis 10 minutes à 72°C. Ils sont immédiatement refroidis sur glace et peuvent éventuellement être conservés 24 heures à -20°C à l'obscurité.

c) Purification et quantification des ADN marqués

Les ADN marqués sont dilués dans 475 μL de TE 10 :1 (450 μL pour les 180K) puis déposés sur une colonne Amicon 30K. Après centrifugation et élimination de l'éluat, l'échantillon est recueilli dans un nouveau tube par centrifugation de la colonne renversée. Les concentrations en ADN et en ADN marqué sont mesurées au nanodrop.

d) Précipitation des ADN marqués

Cent picomoles d'ADN du patient marqué en cyanine 5 sont mélangés à 100 pmol d'ADN de la référence du même sexe que le patient et extrait par la même méthode (phénol-chloroforme ou extraction sur l'automate) marqué en cyanine 3. Le volume est complété à 50 μL (39 μL pour les 180K) avec de l'eau milliQ.

L'étape suivante n'est effectuée que lors de l'utilisation des puces 8X60K.

Cinq microlitres d'acétate de sodium à 3 M et à pH 5,6 et 150 μL d'éthanol absolu conservé à -20°C sont ajoutés au mélange. La précipitation se déroule à -20°C pendant au moins une heure mais peut aussi avoir lieu sur la nuit. Un culot d'ADN est isolé après centrifugation et élimination du surnageant. Un lavage est ensuite réalisé avec 200 μL d'éthanol à 70% froid. Le culot d'ADN marqué est séché à l'obscurité dans un bloc chauffant à 37°C puis resuspendu dans 16 μL d'eau milliQ.

e) Hybridation sur micro-array

Vingt-neuf microlitres (71 μL pour une 180K) d'un mélange composé, pour une réaction, de 2 μL d'ADN cot-1 à 1 mg/mL (5 μL pour une 180K), 4,5 μL d'agent de blocage concentré dix fois (Agilent) (11 μL pour une 180K) et 22,5 μL de tampon Hi-RPM concentré deux fois (55 μL pour une 180K) sont ajoutés à l'ADN marqué purifié. L'étape suivante consiste en une dénaturation des échantillons à 95°C pendant 3 minutes puis 30 minutes à 37°C . L'hybridation est réalisée immédiatement après en déposant 40 μL du mélange d'ADN

marqué et du mélange d'hybridation dans un compartiment individuel pour chaque réaction d'un support appelé gasketslide (100 µL pour une 180K). La face active du micro-array est ensuite mise en contact avec l'échantillon puis l'ensemble est fermé hermétiquement en vérifiant l'absence de bulles d'air qui pourraient gêner l'hybridation. La chambre d'hybridation est placée 24 heures dans un four préchauffé à 65°C et sous agitation.

f) Lavages des micro-arrays

Un premier lavage dans un tampon permet de dissocier la lame de la gasketslide puis, dans un bac séparé, les lames sont plongées dans le même tampon pendant 5 minutes à température ambiante, sous agitation douce et à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite transférées dans un troisième bac contenant un second tampon préalablement chauffé à 37°C pendant une minute sous agitation, toujours à l'abri de la lumière. Enfin, les lames sont immergées pendant une minute dans de l'acétonitrile sous hotte et sous agitation à température ambiante. Les lames sont stockées à l'abri de la lumière avant la lecture.

g) Lecture des lames et analyse des résultats

Les lames sont lues par un scanner Agilent et les résultats sont exportés vers le logiciel FE 10.7 sur lequel on peut contrôler la qualité des images et repérer la présence éventuelle de tâches, rayures ou bulles pouvant gêner l'analyse des résultats. Celle-ci se fait grâce au logiciel Genomic Workbench.

IV. À propos de trois familles

Dans la majorité des cas, une insertion est mise en évidence chez le parent d'un patient présentant une délétion ou une duplication détectée par CGH array. Bien que ces anomalies chromosomiques soient rares, plusieurs cas d'insertions chromosomiques ont été identifiés au laboratoire de cytogénétique du CHU de Nantes. Trois exemples seront exposés ici. La première famille représente un cas classique d'insertion interchromosomique. La seconde permet d'illustrer les insertions intrachromosomiques. Enfin, la dernière famille nous rappelle l'importance des explorations par FISH chez les parents même lorsque l'histoire clinique suggère un tout autre mode de transmission.

A. La famille vue par le Dr Bénéteau

1. Description de la famille

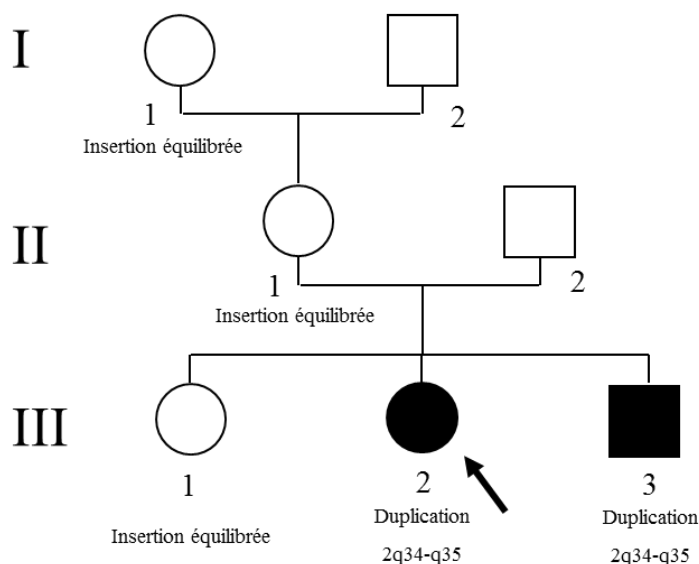


Figure 12 : Arbre généalogique de la famille. Le cas index est indiqué par la flèche noire. Les individus en noir présentent des difficultés d'apprentissage en relation avec une duplication de la région 2q34-q35. Le cas index souffre également d'une dermatite atopique très sévère. Les individus I-1, II-1 et III-1 sont porteurs d'une insertion équilibrée du fragment 2q34-q35 dans le bras long du chromosome 4.

Le cas index (III-2, Figure 12) a été adressé à la consultation de génétique pour des difficultés d'apprentissage associées à une dermatite atopique très sévère. C'est le deuxième enfant d'un couple non apparenté. Elle présente une dysmorphie faciale (des traits épais, un nez long, un philtrum marqué, une lèvre supérieure mince avec une encoche de l'arc de Cupidon profonde et une lèvre inférieure épaisse, une micrognathie) et un palais profond et ogival, un cou large, un écart inter-mamelonnaire excessif, un genu valgum et un genu recurvatum bilatéral (Figure 13). A 15 ans et 10 mois, elle mesure 157,8 cm (-1 Déviation Standard (DS)), pèse 62,9 kg avec une morphologie de type androïde et son périmètre crânien (PC) est de 55 cm (0 DS). Sur le plan développemental, la marche a été acquise à 2 ans. La pathologie cutanée a nécessité la prise de corticoïdes par voie orale ainsi que des immunosuppresseurs associés à des corticoïdes locaux et des émoullients. Une petite taille familiale est notée du côté du père qui mesure entre 155 et 160 cm comme ses cinq frères et son père. Un cousin présenterait également des difficultés d'apprentissage.

Son frère, III-3 (Figure 12), présente un retard des acquisitions et des difficultés d'apprentissage. Aucun événement notable n'est survenu pendant la grossesse, mis à part un diabète gestationnel. La naissance a eu lieu sans particularité à 40 SA et le poids était d'environ 3 kg. La marche a été acquise à 24 mois. Il a un retard de langage puisqu'il a été acquis vers 4-5 ans dans un contexte de perte d'audition faisant suite à des otites séreuses à répétition ayant nécessité paracentèses, opération des végétations et pose de diabolos. Il est scolarisé dans une école spécialisée. Sur le plan clinique, à 12 ans et 8 mois, il mesure 163,7 cm (+1,5 DS), pèse 60,9 kg ce qui est adapté à sa taille, et son PC est à 54 cm (-0,5 DS). Sa puberté est au stade 2-3 de Tanner. Il a fait de l'eczéma pendant l'enfance mais il s'est résolu spontanément. Contrairement à sa sœur, il n'a pas de genu valgum ni de genu recurvatum et l'examen clinique ne retrouve pas non plus de pectum carinatum (Figure 13). La dysmorphie n'est pas marquée mais il est noté des traits du visage épais et des lèvres épaisses. Les incisives et les hélix sont larges. A 13 ans et 4 mois, il mesure 167 cm (+1,5 DS), pèse 70 kg et le PC est de 55,5 cm (+0,5 DS). Il est fait notion d'une discrète scoliose pour laquelle il a été adressé à un orthopédiste.

La sœur aînée, III-1 (Figure 12), mesure 153 cm à 20 ans et suit un CAP petite enfance. En dehors d'un pectus excavatum très modéré, elle est en parfaite santé (Figure 13).

Les parents (II-1 et II-2, Figure 12) n'ont pas de phénotype particulier. La mère a présenté un eczéma jusqu'à l'adolescence qui s'est résolu spontanément.



Figure 13 : Photographies du visage de face et de profil des trois enfants de la famille (III-1 en haut ; III-2 au milieu et III-3 en bas). Photographies du corps entier de l'individu III-2 à gauche et de l'individu III-3 à droite.

2. Résultats

La CGH array réalisée chez le cas index a révélé une duplication de la région 2q34-q35 d'environ 11,5 Mb et comprenant plus de 120 gènes (arr 2q34q35(209,072,197-220,561,675)(Hg19)x3)(Figure 14).

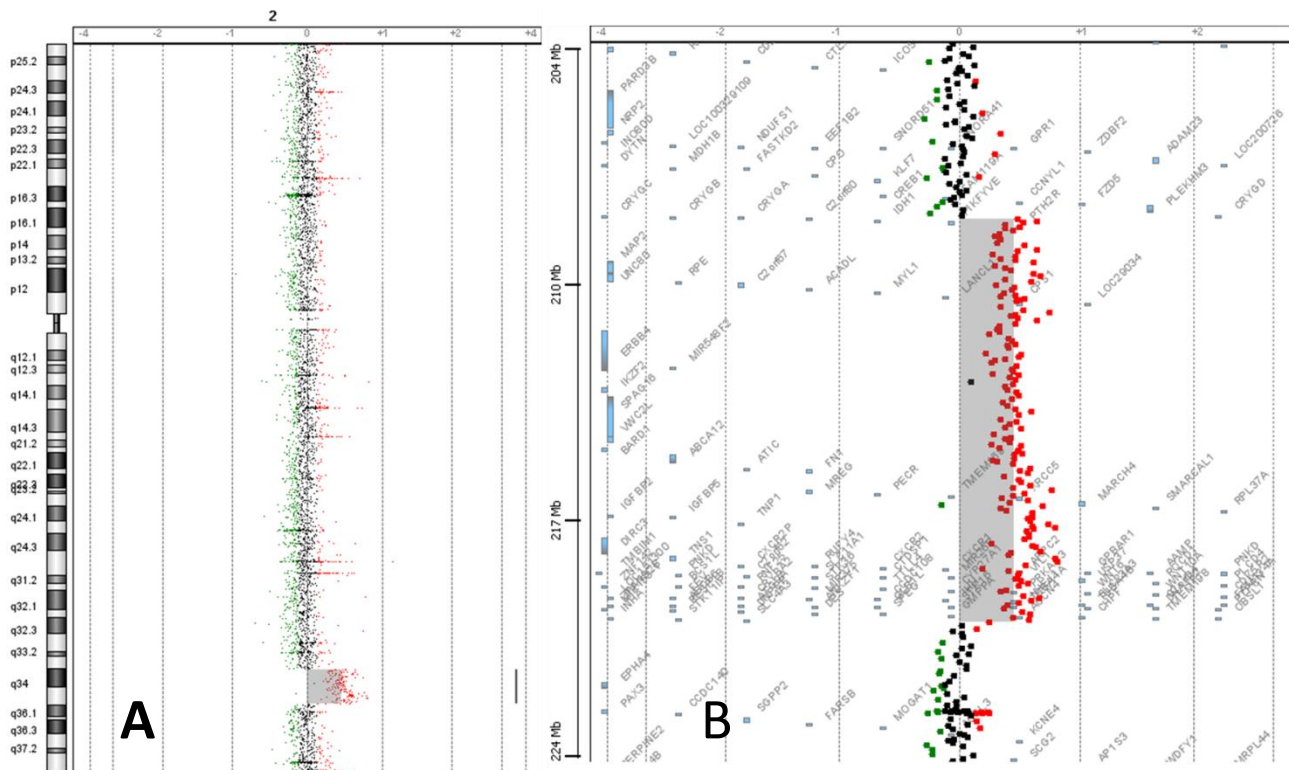


Figure 14 : Profil du chromosome 2 obtenu après analyse de la CGH array 60K Agilent réalisée chez le cas index (III-2). Les points noirs, rouges et verts, indiquent le log₂ des ratios d'intensités de fluorescence pour chaque sonde oligonucléotidique en nombre de copies normal, dupliquée ou délétée respectivement. A-Ideogramme du chromosome 2 entier. B-Vue détaillée de la région dupliquée (rectangle gris). Les symboles en italique correspondent aux gènes localisés dans la région dupliquée.

Cette duplication a été confirmée par FISH à l'aide des sondes RP11-431D02 et RP11-506C08 (ish dup(2)(q34q35)(RP11-431D02,RP11-506C08++)). Le frère (III-3) est également porteur de cette duplication. L'analyse par FISH chez le père est normale. La mère possède bien deux copies de la région 2q34-q35 mais une copie est insérée dans le bras long du chromosome 4 (Figure 15). Cette insertion interchromosomique maternelle est à l'origine des duplications chez les deux enfants atteints. L'aînée (III-1) a hérité du même génotype que sa mère (II-1). L'étude chez la grand-mère maternelle (I-1, Figure 12) a révélé qu'elle était également porteuse de l'insertion familiale à l'état équilibré, sans symptomatologie particulière.

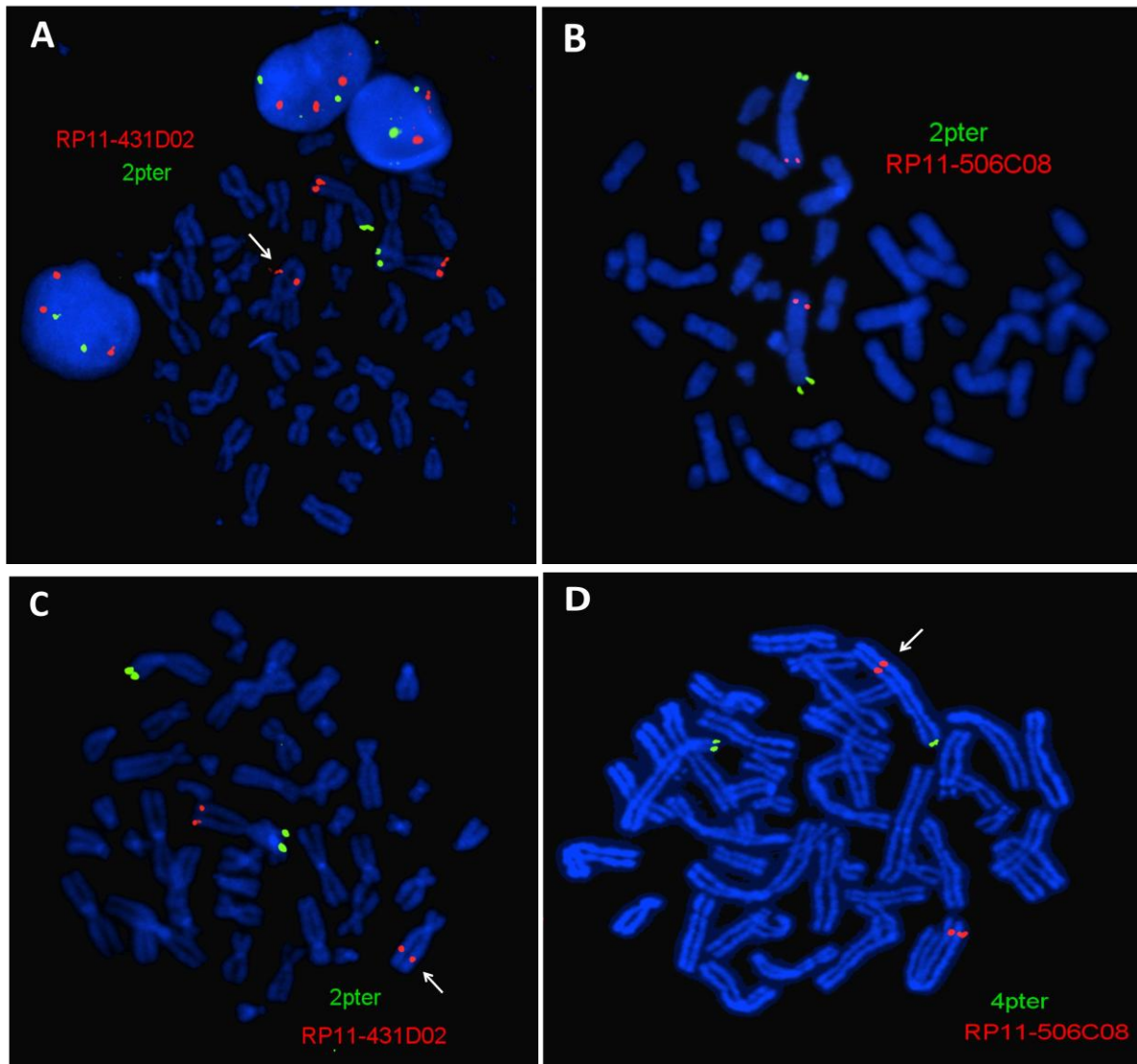


Figure 15 : Hybridations *in situ* sur métaphases réalisées chez les individus III-2, II-2 et II-1. Les sondes contrôles, en vert, sont localisées à l'extrémité des bras courts des chromosomes 2 (A-C) ou 4 (D). A-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu III-2 à l'aide de la sonde RP11-431D02, en rouge, spécifique de la région 2q34-q35 dupliquée. La flèche indique la troisième copie de la région insérée dans un autre chromosome. B-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu II-2 à l'aide de la sonde RP11-506C08, en rouge, spécifique de la région. Aucune anomalie n'est identifiée. C-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu II-1 à l'aide de la sonde RP11-431D02, en rouge, spécifique de la région. La flèche indique l'insertion de la région 2q34-q35 dans le bras long d'un chromosome d'une autre paire. Il n'existe que deux copies de la région, l'insertion est donc équilibrée. D-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu II-1 à l'aide de la sonde RP11-431D02, en rouge, spécifique de la région. La flèche indique l'insertion de la région 2q34-q35 dans le bras long du chromosome 4.

Une recherche d'expansion de triplets CGG dans le gène *FMR1* chez l'individu III-3 a permis d'exclure un syndrome de l'X fragile comme cause des difficultés d'apprentissage.

L'insertion de la région 2q34-q35 dans le bras long du chromosome 4 n'est pas évidente sur le caryotype de la mère (II-1) (Figure 16).

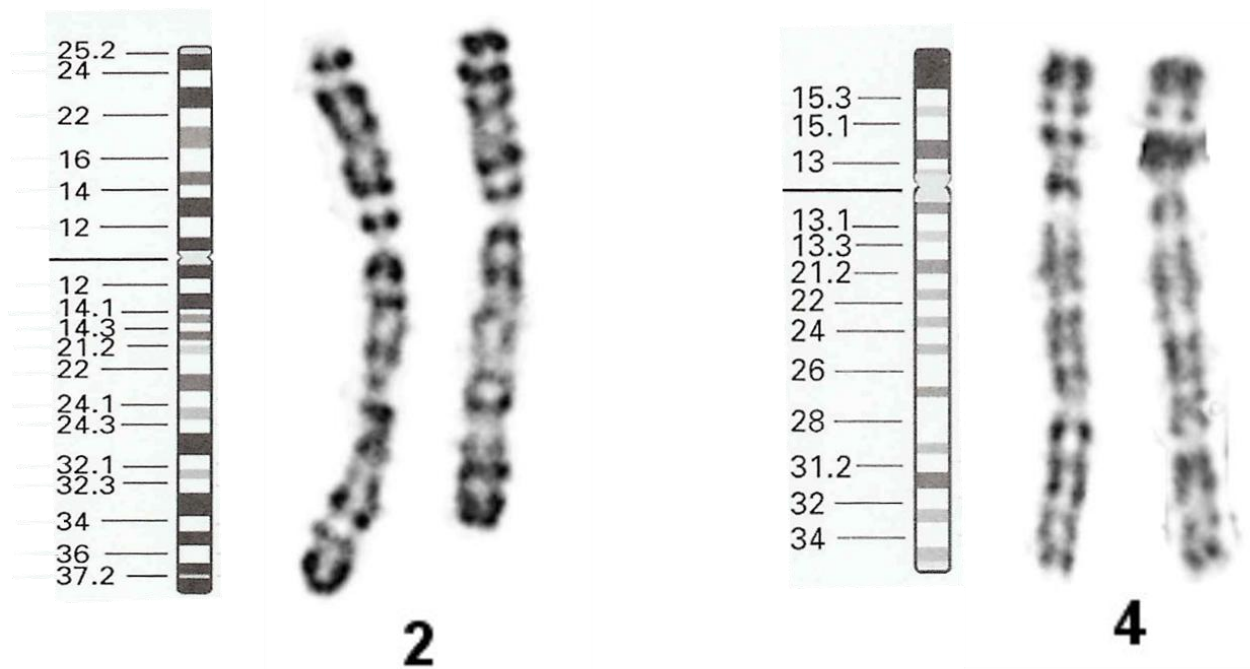


Figure 16 : Chromosomes 2 et 4 issus du caryotype de l'individu II-1 et les idéogrammes correspondants.

3. Discussion

La duplication retrouvée chez certains membres de cette famille n'a pas été rapportée dans les bases de données internationales répertoriant les variations du nombre de copies, pathogènes ou non, dispersées sur l'ensemble du génome.

La région dupliquée est grande (11,5 Mb) et contient un nombre important de gènes (121 gènes dont 21 associés à une maladie sur le site Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)). La duplication de la région 2q34-q35 joue donc un rôle certain dans les difficultés d'apprentissage rencontrées par le cas index (III-2) et son frère (III-3).

En 2012, une équipe a rapporté une trisomie partielle de la région 2q3-qter associée à une délétion du fragment 4q3-qter et a réalisé une revue de la littérature portant sur ces deux anomalies. Ils ont recensé 46 cas cliniques de duplication du bras long du chromosome 2 à partir de la bande 2q3 (Rashidi-Nezhad *et al.* 2012). L'ensemble des cas a permis de définir un « syndrome de duplication 2q3 » associant des symptômes peu spécifiques tels qu'un retard du développement à des degrés variables, des anomalies faciales et viscérales. Une description clinique précise est dressée dans le livre « Atlas des maladies chromosomiques » (de Grouchy et Turleau, 1982). La majorité des cas publiés ont une duplication plus large que celle observée dans la famille vue par le Dr Bénéteau et les patients de la littérature ont un phénotype plus sévère.

Sans être parfaitement identiques, quelques articles décrivent des patients porteurs de duplications proches. La première duplication de cette région (2q33.1-q35) a été publiée en 1994 (Romain *et al.* 1994). Le patient présentait un retard du développement global, un hypertélorisme associé à un épicanthus, une lèvre supérieure fine et un philtrum long et marqué, une scoliose importante, une nuque large, une clinodactylie du cinquième doigt de la main gauche et des pieds larges. Un autre cas de duplication identique a été publié en 2005 (Sebold *et al.* 2005). L'histoire clinique commençait en anténatal avec une menace d'accouchement prématuré dès la seizième semaine et un retard de croissance intra-utérin. Une hypotonie persiste depuis la naissance. Il partage le retard du développement, la clinodactylie des cinquièmes doigts, certains traits du visage avec le patient décrit en 1994. En plus, il a une brachycéphalie et une anomalie du septum atrium.

Le phénotype des patients examinés par le Dr Bénéteau, porteurs de la duplication, est plus modéré que les cas publiés. Le cas index semble plus proche mais aucune pathologie cutanée n'a été notée par les auteurs des deux articles. La principale différence, du point de vue chromosomique, est qu'il ne s'agit pas de duplications par insertion pour les patients de la littérature mais de duplications simples. De plus, la région dupliquée dans notre famille est plus petite que celle rapportée dans les deux articles.

Concernant le retentissement cutané, un gène contenu dans la région dupliquée semble intéressant. En effet, des mutations ponctuelles dans le gène *ABCA12* ont été identifiées dans l'ichtyose congénitale autosomique récessive de type 4A ou 4B (Harlequin). C'est une pathologie cutanée sévère avec un épaissement de la peau (hyperkératose) sur l'ensemble du corps. La peau a l'aspect d'une croûte plus ou moins brunâtre et craquelée. Cette pathologie engage le pronostic vital en raison des difficultés alimentaires et respiratoires ainsi que du risque infectieux. Le cas index de la famille présentée ici possède trois copies de ce gène et souffre d'une dermatite atopique très sévère nécessitant la prise d'immunosuppresseurs et de corticoïdes par voie orale.

D'autres gènes de la région ont une forte expression dans le tissu cutané : *ATIC*, *MREG* (gène de la mélanoréguline), *XRCC5*, *ARPC2*, *CYP27A1* et *CHPF* notamment et pourraient également être impliqués dans le tableau clinique présenté par la patiente.

L'individu III-3 est, lui aussi, porteur de la duplication de la région 2q34-q35. Il a, comme sa sœur, rencontré des difficultés d'apprentissage. Par contre, sur le plan cutané, il n'a présenté qu'un eczéma spontanément résolutif pendant l'enfance. Il existe donc, dans cette famille, une variabilité phénotypique très nette entre les deux porteurs de la duplication. Plusieurs hypothèses sont possibles. Soit l'anomalie a une pénétrance et une expressivité variable d'un individu à l'autre, soit un deuxième évènement moléculaire est survenu chez le cas index et n'existe pas chez son frère. On ne peut pas exclure, non plus, une participation environnementale ou une sensibilité plus importante de la sœur aux stimuli extérieurs rentrant en contact avec sa peau. Enfin, si l'on prend en compte l'eczéma que la mère a présenté jusqu'à l'adolescence, une autre hypothèse peut être formulée. La mère n'a pas de duplication mais une insertion équilibrée de cette région 2q34-q35 dans le bras long du chromosome 4. La cause du phénotype cutané, avec un retentissement plus ou

moins invalidant, pourrait ne pas être le dosage génique, mais la conséquence de la rupture ou de la dérégulation d'un gène au niveau d'un point de cassure.

B. Famille vue par le Dr Martin-Coignard

1. Description de la famille

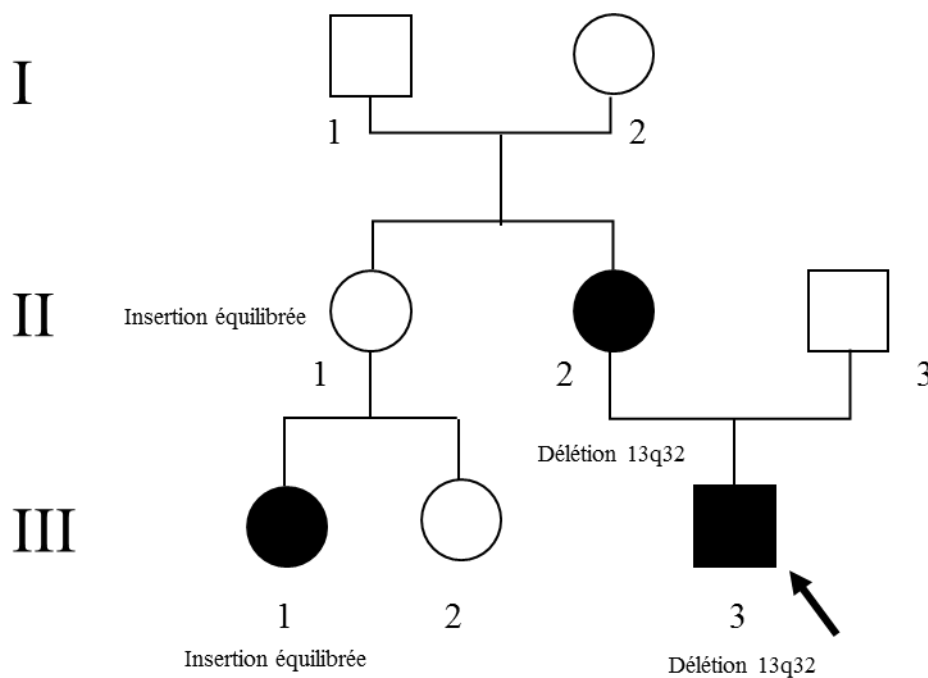


Figure 17 : Arbre généalogique de la famille. Le cas index est indiqué par la flèche noire. Les individus en noir présentent un retard mental. Les individus II-2 et III-3 ont une délétion de la région 13q32. Les individus II-1 et III-1 sont porteurs d'une insertion intrachromosomique équilibrée du fragment 13q32 en position sous-centromérique du chromosome 13.

Le cas index (III-3, Figure 17) est un garçon de 5 ans présentant un retard mental non syndromique. C'est l'enfant unique d'un couple non consanguin. Les biométries à la naissance sont une taille de 50 cm, un poids de 3,195 kg et un PC de 33 cm. La marche a été acquise à 1 an. L'acquisition du langage a eu lieu vers 4 ans et la propreté est survenue à 4 ans et demi. Ses difficultés cognitives ont nécessité une aide de vie scolaire à la maternelle. Il

a un comportement plutôt passif et entre peu en relation avec les autres enfants de l'école. Il n'a pas de dysmorphie notable (Figure 18).



Figure 18 : Photographies de l'individu III-3.

Sa mère (II-2, Figure 17) a également eu des difficultés scolaires importantes et présente un surpoids. Elle est aujourd'hui aide-soignante hospitalière.

La tante maternelle (II-1, Figure 17) a eu une scolarité difficile et présente une obésité. Elle travaille en cantine scolaire et a eu deux filles.

L'aînée (III-1, Figure 17) est née à 34 SA avec une taille de 44,5 cm et un poids de 2,240 kg. La marche a été acquise à 15 mois mais la propreté est survenue tardivement à 4 ans. Il existe un retard de langage. Sur le plan morphologique, elle présente un palais très creux et festonné et une mauvaise implantation dentaire avec une incisive médiane et une incisive manquante. On note aussi un hypotélorisme et un menton proéminent (Figure 19). Elle a présenté, à l'âge de 7 ans, un comportement d'automutilation. À 10 ans, ces troubles ne sont plus présents mais elle reste très timide. Par ailleurs, les parents rapportent une potomanie à environ 4 litres par jour. Elle est scolarisée dans un établissement spécialisé dans les troubles du langage.

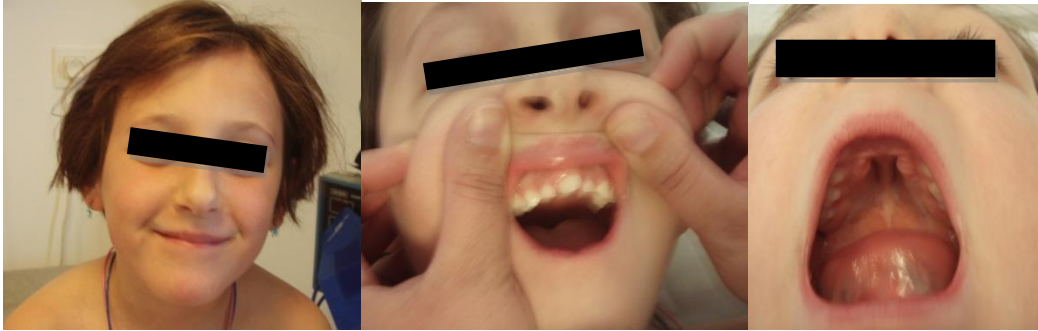


Figure 19 : Photographies de l'individu III-1. À gauche, on peut observer l'hypotélorisme, un nez bulbeux, un menton proéminent. Au centre, on peut noter la présence d'une incisive médiane et l'absence d'une incisive supérieure. Sur la photographie de droite on observe un palais très creux et festonné.

Sa petite sœur (III-2, Figure 17) est en maternelle et son développement commence à inquiéter ses parents. Elle sera testée si les difficultés persistent à l'école primaire.

2. Résultats

Le caryotype chez le cas index n'a pas révélé d'anomalie. Par contre, la CGH array a mis en évidence une délétion interstitielle de 1,3 Mb dans la région 13q32.2 (arr 13q32.2(97,937,749-99,247,856)x1)(Version du génome Hg19) (Figure 20). Celle réalisée chez sa cousine maternelle n'a pas mis en évidence de déséquilibre (180K, Hg18).

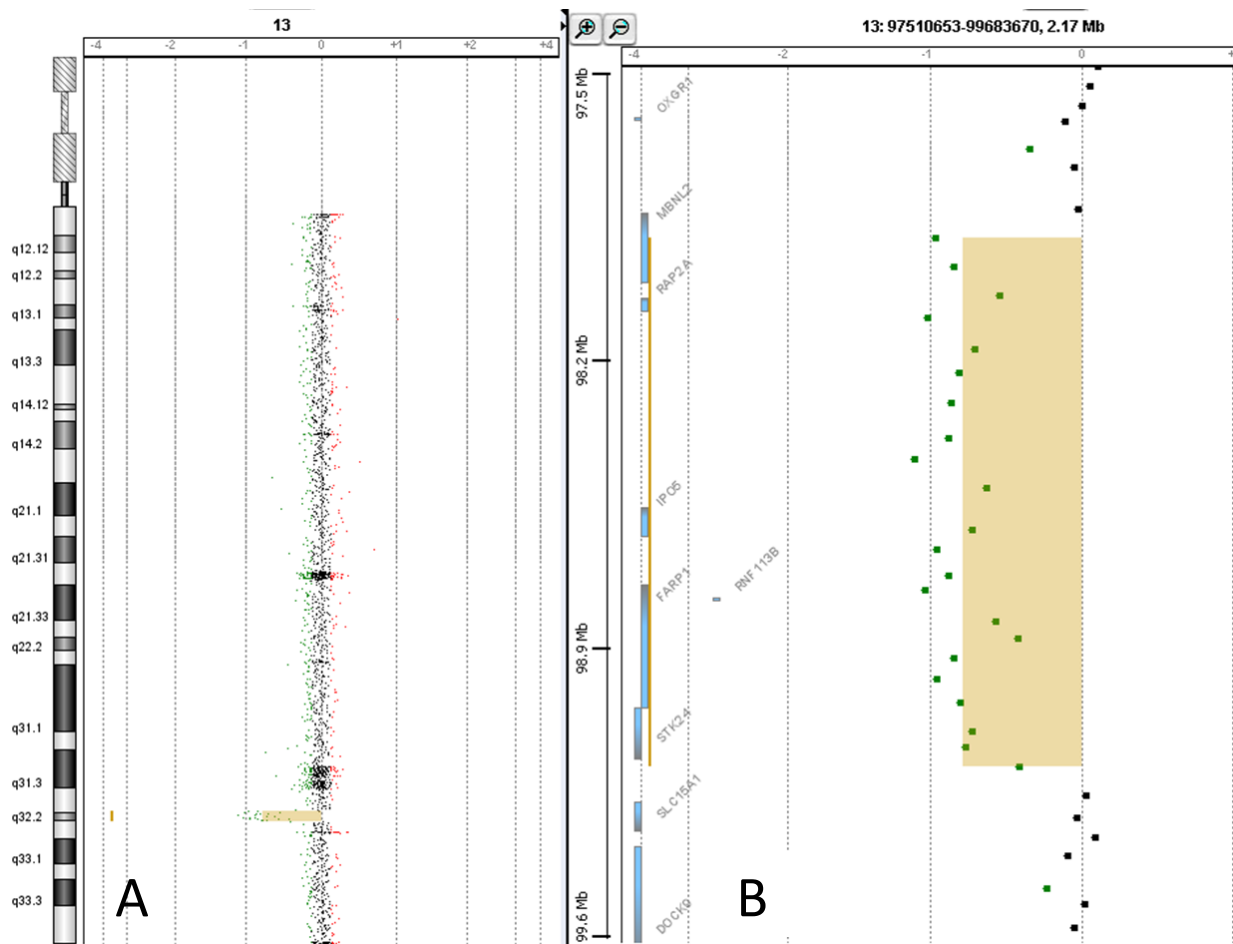


Figure 20 : Profil du chromosome 13 obtenu après analyse de la CGH array 60K Agilent réalisée chez le cas index (III-3). Les points noirs, rouges et verts, indiquent le log2 des ratios d'intensités de fluorescence pour chaque sonde oligonucléotidique en nombre de copies normal, dupliquée ou délétée respectivement. A-Idéogramme du chromosome 13 entier. B-Vue détaillée de la région délétée (rectangle beige). Les symboles en italique correspondent aux gènes localisés dans la région délétée.

L'utilisation de la sonde RP11-796G17, s'hybridant dans la région 13q32 et marquée en rouge, associée à une sonde télomérique du bras long du chromosome 13 (13qter) marquée en vert, a d'abord été utilisée pour tenter de confirmer la délétion 13q32.2 chez le cas index par FISH. Malheureusement, la sonde RP11-796G17 s'hybride également sur une autre paire de chromosomes (Figure 21). Pour s'affranchir de ce phénomène d'hybridation non spécifique, nous avons utilisé une autre sonde spécifique de la région 13q32.2 : la sonde RP11-599C08 également marquée en rouge. La sonde RP11-383J16, localisée en 13q31.3, est en place ce qui permet d'exclure une inversion paracentrique (Figure 22). L'étude parentale montre que cette délétion est héritée de la mère (II-2). L'analyse chez la tante maternelle (II-

1) indique la présence de deux copies de la région 13q32.2. Cependant, sur un chromosome 13, le signal de la sonde spécifique est beaucoup plus proximal qu'attendu. Cette même insertion intrachromosomique a été transmise à l'individu III-1. Des prélèvements des grands-parents maternels seraient nécessaires pour expliquer le mécanisme moléculaire à l'origine des réarrangements.

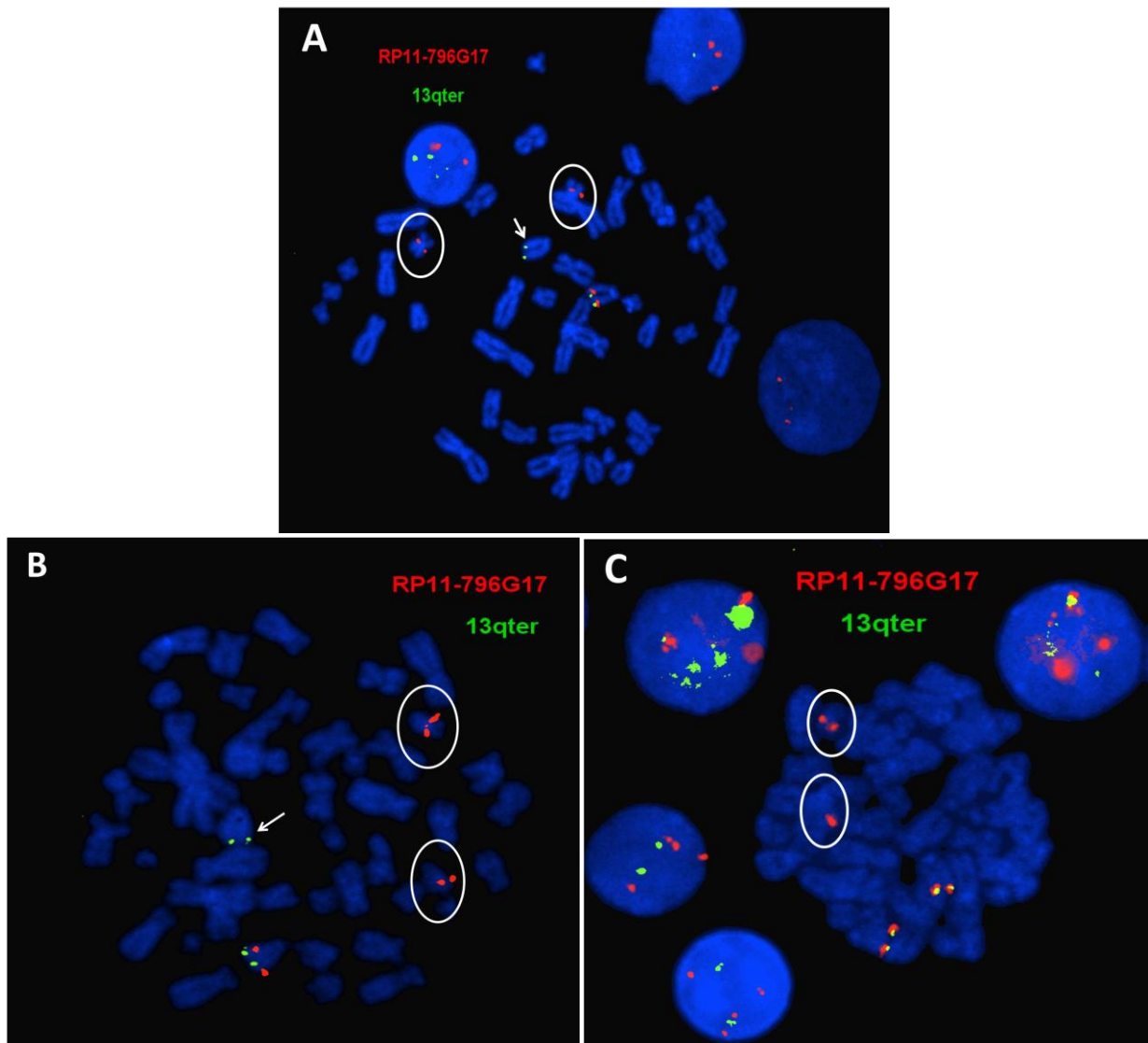


Figure 21 : Hybridations *in situ* sur métaphases réalisées chez les individus III-3, II-2 et II-3. La sonde RP11-796G17, en rouge, devait être spécifique de la région 13q32 et la sonde contrôle, en vert, est localisée sur la partie subtélomérique du bras long du chromosome 13 pour toutes les hybridations *in situ*. On observe une hybridation non spécifique de la sonde RP11-796G17 sur une autre paire de chromosomes chez les trois individus (cercles blancs). A-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu III-3. La délétion est indiquée par la flèche blanche. B-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu II-2. La délétion est indiquée par la flèche blanche. C-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu II-3. Aucune anomalie n'a été détectée.

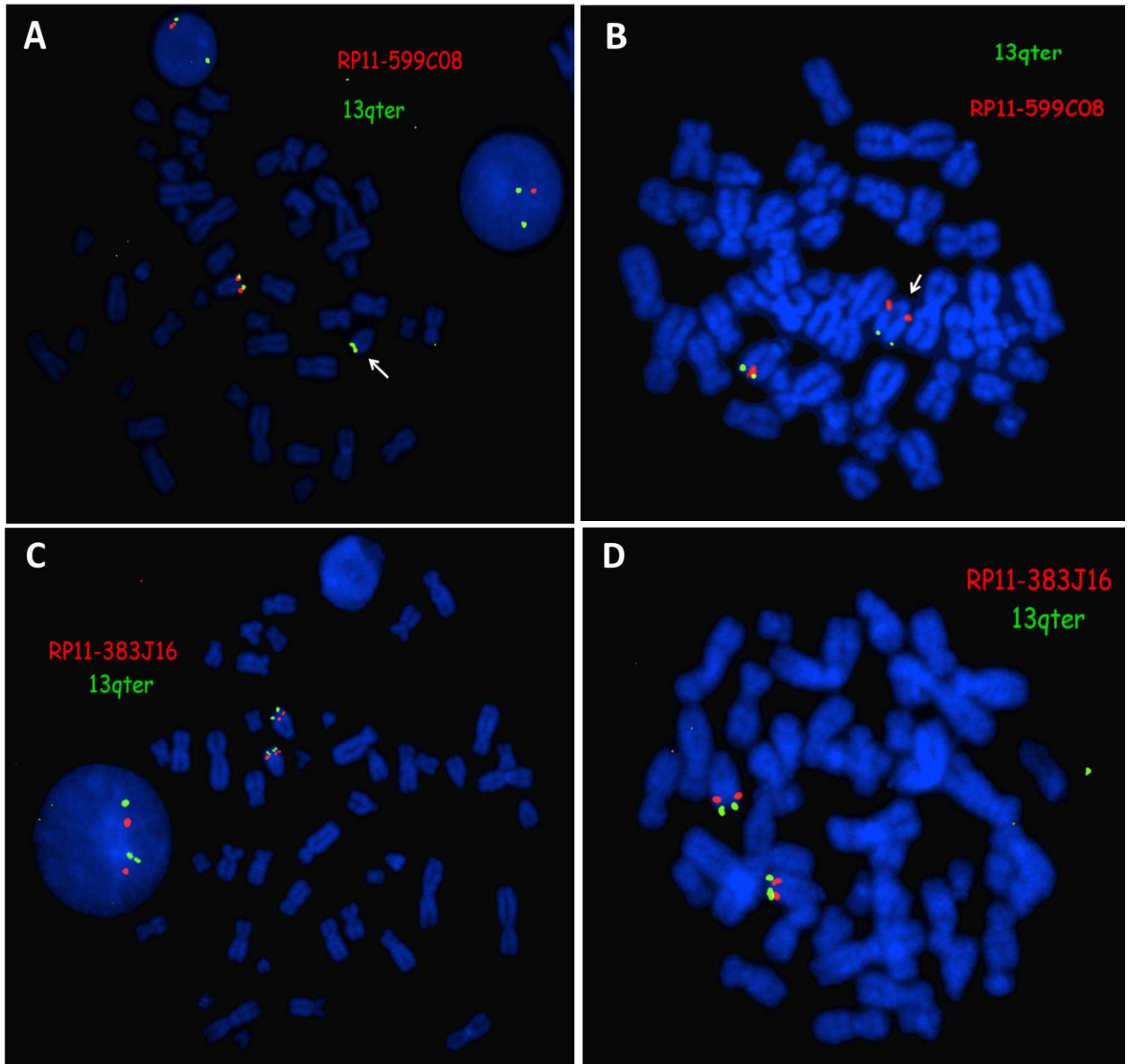


Figure 22 : Hybridations *in situ* sur métaphases réalisées chez les individus III-3, III-1 et II-1. La sonde contrôle 13qter, en vert, est localisée sur la partie subtélomérique du bras long du chromosome 13 pour toutes les hybridations *in situ*. A-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu III-3 à l'aide de la sonde RP11-599C08, en rouge, spécifique de la région 13q32 délétée. La flèche indique la délétion. B- Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu III-1 à l'aide de la sonde RP11-599C08, en rouge, spécifique de la région 13q32. La flèche indique l'insertion de la région 13q32 en sous-centromérique du chromosome 13. C et D- Hybridations *in situ* deux couleurs réalisées chez l'individu III-3 et II-1, respectivement, à l'aide de la sonde RP11-383J16, en rouge, spécifique de la région 13q31.3. La sonde est en place, il n'y a pas d'inversion paracentrique.

Le syndrome de l'X fragile a été exclu chez le cas index.

Du fait de l'existence d'une dysmorphie faciale et d'une incisive médiane unique, une étude des gènes de l'holoprosencéphalie chez la cousine (III-1) a été prescrite et s'est révélée négative.

3. Discussion

L'analyse familiale par FISH réalisée suite à la découverte de la délétion par CGH array chez le cas index (III-1) a permis de mettre en évidence l'insertion intrachromosomique à l'état équilibré chez sa tante (II-1) et sa cousine maternelle (III-1). Celle-ci n'avait pas pu être décelée par la CGH array réalisée antérieurement chez sa cousine puisqu'elle est équilibrée.

De plus, l'identification de cette insertion équilibrée chez la tante maternelle (II-1) du cas index a permis de recalculer un risque de récurrence théorique lors d'une éventuelle prochaine grossesse. En effet, en l'absence de crossing-over, il existe un risque sur deux pour chaque enfant de l'individu II-1 d'être porteur de l'insertion intrachromosomique équilibrée maternelle, comme pour sa fille (III-1). Si un crossing-over survenait entre les deux régions 13q32.2, cela pourrait entraîner soit une délétion soit une duplication de cette région ou des segments terminaux encadrant les deux localisations du fragment ou encore du segment compris entre les deux positions. Le porteur d'une délétion de la région concernée par l'insertion pourrait développer un retard mental comme les individus II-2 et III-3. Par contre, la prédiction du phénotype dans les autres cas reste délicate.

La plus grande sévérité du phénotype chez l'individu porteur d'une insertion équilibrée (III-1) par rapport au porteur de la délétion (III-3 ou II-2) est relativement surprenante dans cette famille.

La dysmorphie faciale et surtout l'existence de l'incisive médiane unique chez la cousine du cas index ont fait évoquer une holoprosencéphalie. Un des gènes responsables d'holoprosencéphalie se nomme *ZIC2*. Aucune anomalie n'a été retrouvée lors de l'exploration des gènes de l'holoprosencéphalie. Il est intéressant de noter que le gène *ZIC2* est situé en 13q32.3, soit à moins de 1,5 Mb du point de cassure distal du fragment

délocalisé chez cette enfant. L'éloignement de la région 13q32.2 pourrait-il avoir des conséquences sur l'expression ou la fonction du gène *ZIC2* et engendrer un phénotype évocateur d'holoprosencéphalie ? Il est difficile de répondre de manière certaine à cette question, mais l'individu II-1 porte également l'insertion équilibrée et ne présente pas de trait phénotypique pouvant évoquer une holoprosencéphalie. Il semble donc peu probable que le phénotype observé soit dû à un dysfonctionnement du gène *ZIC2*. Pour les mêmes raisons, l'hypothèse de la rupture d'un gène candidat localisé au site de l'insertion peut être écartée. Il est relativement fréquent qu'une même anomalie puisse conduire à une grande variabilité phénotypique. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité de l'existence d'un autre évènement responsable concomitant chez la fille et absent chez la mère.

De nombreuses délétions sur le bras long du chromosome 13 ont été rapportées et ont fait émerger un nouveau syndrome nommé « le syndrome 13q ». Ce syndrome a un spectre clinique large mais quelques symptômes sont constamment présents. Il s'agit d'un retard mental modéré à sévère, un retard de croissance, une dysmorphie faciale, des anomalies des membres (notamment des pouces) et d'autres malformations (cardiaques, oculaires, rénales ou cérébrales). La gravité est variable en fonction de la taille et de la bande de chromosome 13 délétée. Les deux individus délétés dans la famille présentée ici ne présentent qu'un retard mental modéré. Leur délétion est de petite taille (1,3 Mb) comparée à la plupart des délétions publiées. Cela rend la comparaison des cas difficile mais pourrait aider à élaborer une corrélation génotype-phénotype plus précise. Une délétion de 1,5 Mb proche de celle identifiée dans cette famille a été rapportée par une équipe rennais. Malheureusement, la comparaison est délicate, là aussi, puisque le cas rennais est celui d'un fœtus atteint d'holoprosencéphalie dont la délétion emporte le gène *ZIC2* (Quélin *et al.* 2009).

Aucun des 6 gènes (*MBNL2*, *RAP2A*, *IPO5*, *FARP1*, *RNF113B*, *STK24*) présents dans la région d'1,3 Mb délétée n'a été directement impliqué dans une pathologie humaine.

Le gène *MBLN2* (Muscleblind-like Protein 2) code une protéine capable de fixer des régions spécifiques d'ARN, notamment pour réguler l'épissage des pré-ARN messagers (Ho *et al.* 2004). Cette protéine co-localise avec l'expansion de triplets CTG de la région 3'UTR du gène *DMPK* et pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la myotonie de Steinert

(Mankodi *et al.* 2001, Miller *et al.* 2000). Par ailleurs, MBNL2 régulerait l'épissage de l'exon 5 de la Troponine T cardiaque et l'exon 11 du récepteur à l'insuline (Ho *et al.* 2004). Récemment, cette protéine a été impliquée dans la programmation et l'état de différenciation des cellules en régulant l'épissage alternatif des ARN messagers (Han *et al.* 2013).

RAP2A est une protéine à activité GTPasique qui interviendrait dans une voie signalétique impliquée dans l'extension des dendrites et donc dans le développement neuronal (Lerosey *et al.* 1991, Kawabe *et al.* 2010).

IPO5 ou importine 5 est aussi appelée RANBP5 pour RAN-binding Protein 5 ou karyophérine β 3. Cette protéine se fixerait à certaines nucléoportines et permettrait l'importation et la sécrétion des protéines nucléaires (Yaseen et Blobel. 1997).

FARP1 est une protéine exprimée principalement dans des chondrocytes à un stade différencié (Koyano *et al.* 1997).

Aucune fonction n'est connue pour le gène *RNF113B* (*Ring Finger Protein B*).

STK24 est une Sérine/Thréonine Kinase cytoplasmique à expression ubiquitaire mais préférentielle dans le cœur, les muscles squelettiques et le pancréas (Schinkmann et Blenis. 1997). Une autre isoforme est spécifiquement exprimée dans le cerveau (Zhou *et al.* 2000). L'inosine stimule la croissance axonale de certains types de neurones après lésion du système nerveux central. Elle stimule également l'activité kinase de STK24. Un analogue de l'inosine (la 6-thioguanosine) bloque la croissance axonale induite par un facteur neurotrophique en inhibant STK24 (Irwin *et al.* 2006).

STK24 et *RAP2A* interviennent dans le développement des cellules neuronales et pourraient contribuer à l'établissement des difficultés d'apprentissage chez les patients délétés, par haploinsuffisance, et chez les patients insérés, par dérégulation de leur expression.

C. Famille vue par le Dr David

1. Description de la famille

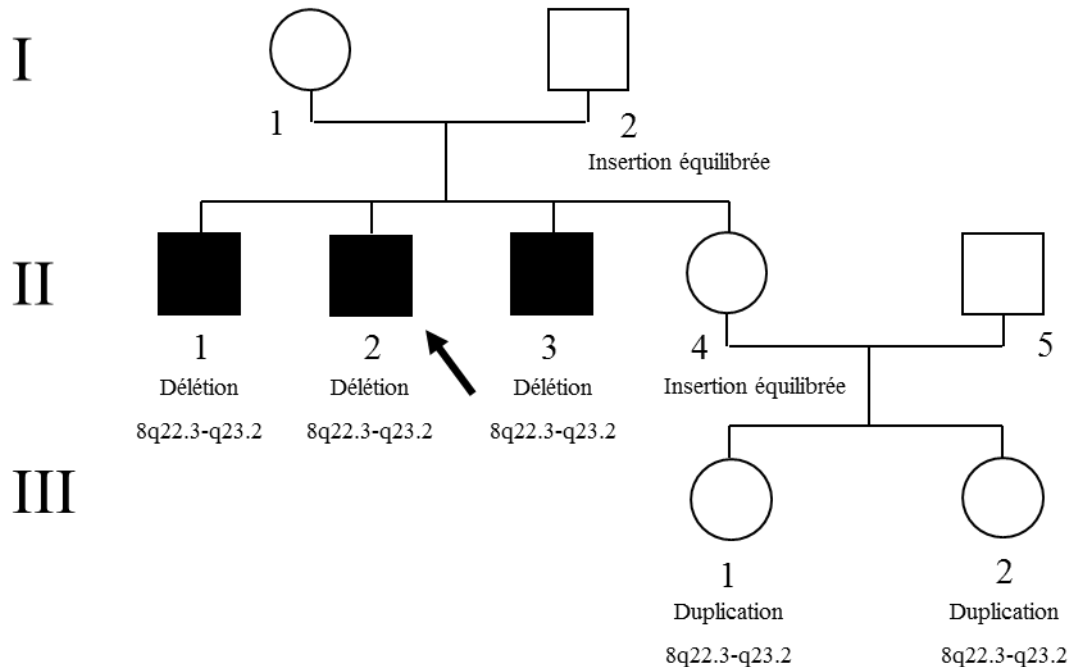


Figure 23 : Arbre généalogique de la famille. Le cas index est indiqué par la flèche noire. Les individus en noir présentent un retard mental en relation avec une délétion de la région 8q22.3q23.2. Les individus III-1 et III-2 sont porteurs d'une duplication de cette région. Les individus I-2 et II-4 présentent une insertion équilibrée de cette région dans le bras long du chromosome 6.

La famille suivante est venue en consultation de génétique sur demande de l'individu II-4 (Figure 23) pour savoir s'il existait un risque de récurrence de retard mental dont souffrent ses trois frères (II-1, II-2 et II-3, Figure 23) dans la descendance de ses filles (III-1 et III-2, Figure 23).

Les individus I-1 et I-2 (Figure 23) sont non apparentés et en bonne santé.

Le cas index (II-2, indiqué par une flèche sur la Figure 23) est âgé de 53 ans lors de la première consultation. Il a acquis la marche entre 18 et 24 mois. Sa déficience intellectuelle est sévère puisqu'à l'âge adulte, il prononce quelques mots isolés mais ne fait pas de phrase. Il ne sait ni lire ni écrire. À l'examen clinique, il présente un retard statural à -2,5 DS puisqu'il

mesure 160 cm, une microcéphalie à -2 DS (PC : 54 cm), un strabisme convergent de l'œil gauche, une dysmorphie faciale à type de visage allongé associé à une énoptalmie modérée, des sourcils arqués et des oreilles larges. Les testicules sont de petite taille. On note la présence de mouvements stéréotypés. Il n'a jamais convulsé.

Son frère aîné (II-1) présente les mêmes caractéristiques cliniques. À 56 ans, le retard statural est estimé à -2,2 DS puisqu'il mesure 162 cm pour un poids de 48 kg (-2,5 DS). Le PC est évalué à 52,5 cm ce qui caractérise une microcéphalie à -3,3 DS. L'exploration hormonale de l'axe gonadique met en évidence une élévation de l'hormone folliculo-stimulante ou FSH (30,2 mU/mL ; valeurs normales : 1-12 mU/mL) associée à un faible taux de testostérone (2,33 ng/mL ; valeurs normales : 3-10 ng/mL) suggérant une dysgénésie gonadique.

Le troisième frère (II-3) ressemble physiquement à ses aînés. Il a marché seul à 14 mois. À 51 ans, il mesure 161 cm (-2,3 DS), pèse 68 kg (+0,5 DS). Son PC est de 53 cm, il a donc une microcéphalie de -3 DS. Il sait faire des phrases mais ne sait ni lire ni écrire. Il présente, en plus des testicules de petite taille, un hypospade péno-scrotal. L'exploration hormonale de l'axe gonadique indique également une dysgénésie gonadique avec une FSH à 34,7 mU/mL et une testostérone à 1,2 ng/mL. Il est décrit comme quelqu'un ayant l'humeur changeante.

La seule fille de la fratrie (II-4) a eu une scolarité normale. Elle ne présente aucun phénotype notable. Elle a eu deux filles en bonne santé (III-1 et III-2). L'aînée est aide-soignante et vit en couple. À 29 ans, elle mesure 175 cm (+2 DS), n'a pas de déficience intellectuelle ni de dysmorphie. La cadette a également un phénotype sans aucune particularité. Elle est éducatrice spécialisée et vit en couple.

2. Résultats

La présence de retard mental uniquement chez les individus de sexe masculin de cette famille nous a fait évoquer un retard mental lié à l'X. Plusieurs gènes impliqués dans les retards mentaux liés à l'X (*FMR1*, *FRAXE*, *ARX*, *PQBP1*, *JARID1C*) ont été analysés chez le cas index ou chez son frère aîné sans mettre en évidence de mutation causale.

Devant la négativité de l'ensemble des analyses, une CGH array a été réalisée chez le cas index. De manière surprenante, aucun déséquilibre n'a été mis en évidence sur le chromosome X. Par contre, l'analyse a révélé une délétion de 9 Mb de la région 8q22.3q23.2 (arr 8q22.3q23.2(103,043,561x2,103,059,472-112,124,080x1,112,148,713x2), version Hg18 du génome humain) (Figure 24). L'analyse des deux parents (I-1 et I-2) n'a révélé aucun déséquilibre.

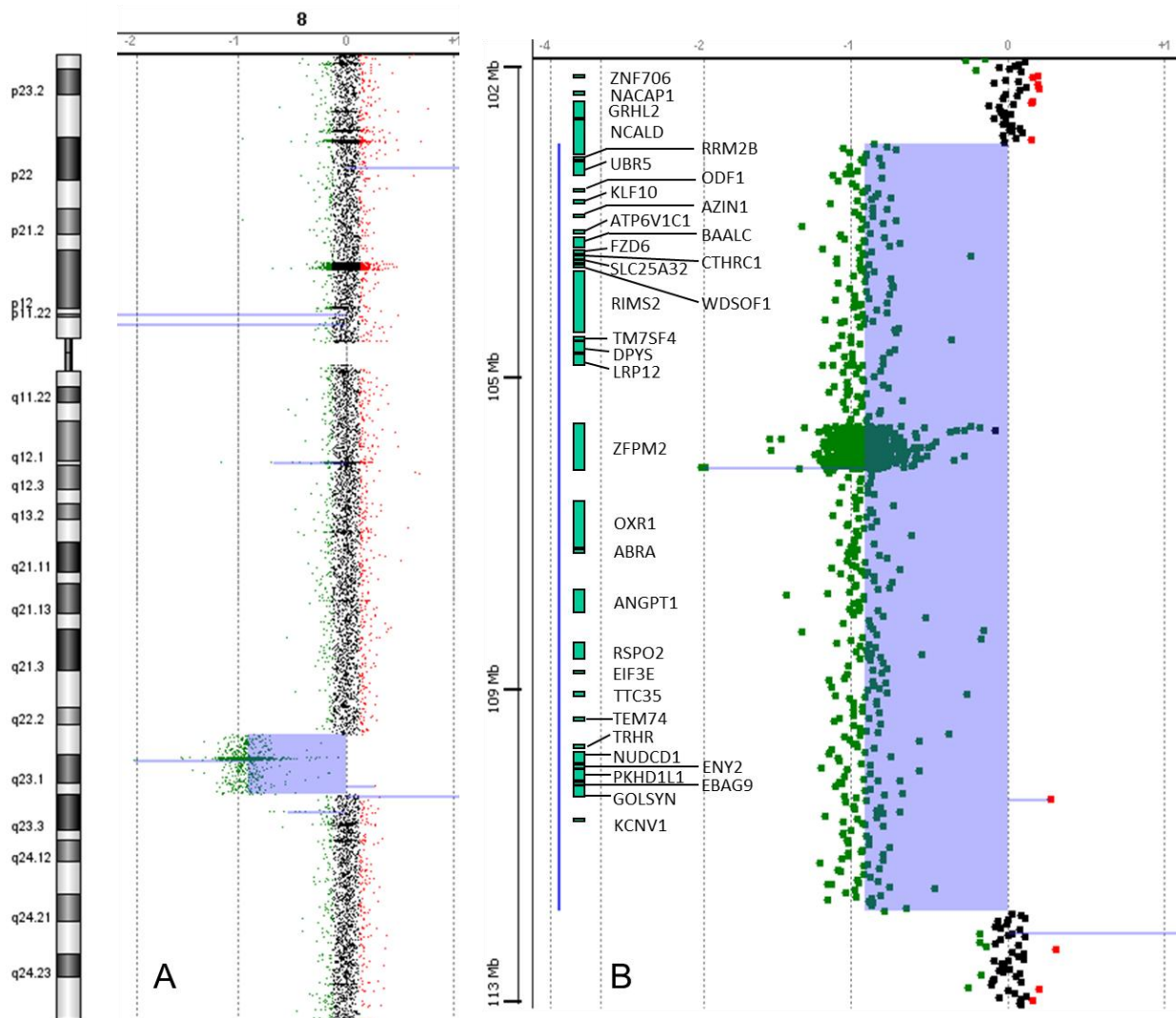


Figure 24 : Profil du chromosome 8 obtenu après analyse de la CGH array 180K Agilent réalisée chez le cas index (II-2). Les points noirs, rouges et verts, indiquent le log2 des ratios d'intensités de fluorescence pour chaque sonde oligonucléotidique en nombre de copies normal, dupliquée ou délétée respectivement. A-Ideogramme du chromosome 8 entier. B-Vue détaillée de la région délétée (rectangle bleu). Les symboles en italique correspondent aux gènes localisés dans la région délétée.

La délétion a été confirmée par FISH chez le cas index à l'aide d'une sonde spécifique de la région (RP11-188I06) et une sonde contrôle localisée sur le bras court du chromosome 8 (RP11-797C19). Les deux frères atteints sont également porteurs de la même délétion (Figure 25 A). Devant la récurrence de l'anomalie et l'absence de déséquilibre chez les parents, nous avons évoqué la possibilité d'un mosaïcisme germinale, c'est-à-dire la présence de la délétion 8q22.3-8q23.2 dans une partie des cellules germinales d'un des parents.

Cependant, l'étude parentale par FISH a révélé une insertion équilibrée chez le père (I-2) puisque une copie du fragment 8q22.3-8q23.2 (sonde spécifique RP11-695B04) est présente au sein du bras long du chromosome 6 (sonde contrôle en position terminale du bras court du chromosome 6) (Figure 25 B). Par la suite, cette insertion équilibrée a été mise en évidence chez la sœur du cas index (II-4). Les filles de cette dernière (III-1 et III-2), quant à elles, ne présentent pas de phénotype particulier mais sont porteuses de trois copies du fragment 8q22.3-8q23.2, elles sont dupliquées (Figure 25 C).

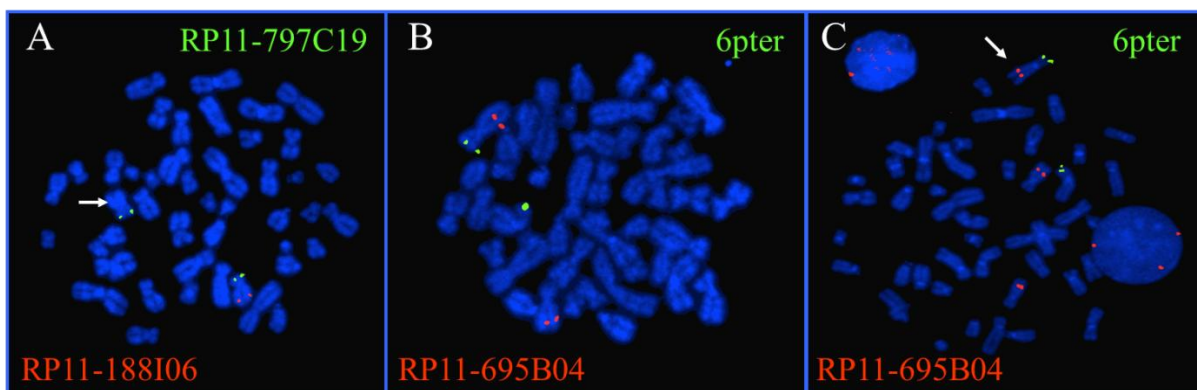


Figure 25 : Hybridations *in situ* sur métaphases réalisées chez les individus II-1, son père (I-1) et sa nièce (III-1). A-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu II-1 à l'aide de la sonde RP11-188I06, en rouge, spécifique de la région 8q22.3-8q23.2 délétée et de la sonde contrôle RP11-797C19, en vert, localisée sur le bras court du chromosome 8. La flèche indique la délétion. B-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu I-1 à l'aide de la sonde RP11-695B04, en rouge, spécifique de la région 8q22.3-8q23.2 et de la sonde contrôle, en vert, localisée sur la partie subtélomérique du bras court du chromosome 6. La région 8q22.3-8q23.2 est insérée dans le bras long du chromosome 6. C-Hybridation *in situ* deux couleurs réalisée chez l'individu III-1 à l'aide de la sonde RP11-695B04, en rouge, spécifique de la région 8q22.3-8q23.2 et de la sonde contrôle, en vert, localisée sur la partie subtélomérique du bras court du chromosome 6. La flèche indique l'insertion du fragment 8q22.3-8q23.2 dans le bras long du chromosome 6 et donc la duplication.

3. Discussion

Dans cette famille, seuls les garçons de la fratrie sont atteints de retard mental, microcéphalie, et dysgénésie gonadique. Cela nous a fait évoquer une transmission liée à l'X. La sœur (II-4) aurait donc eu un risque de 50% d'hériter de l'X anormal. Dans ce cas, elle aurait eu 50% de risque d'avoir un garçon délété avec un phénotype similaire à celui de ses frères. La CGH array a permis d'identifier une anomalie autosomale remettant en question la prédiction du risque de transmission de la maladie dans la famille et modifiant d'autant le conseil génétique délivré. L'analyse par hybridation *in situ* est la seule technique pouvant mettre en évidence l'insertion équilibrée à l'origine de la délétion. Ce nouveau résultat a sensiblement modifié le conseil génétique délivré à la famille. En effet, un porteur d'insertion équilibrée a un risque théorique de 25% de transmettre son insertion équilibrée, 25% d'avoir un enfant porteur d'une délétion de la région insérée, 25% d'avoir un enfant porteur d'une duplication de la région insérée. La sœur de la fratrie (II-4), ayant héritée de l'insertion équilibrée de son père, n'a plus que 25% de chance d'avoir des enfants sans réarrangement. La poursuite de l'étude familiale a en effet permis d'identifier une duplication chez ses deux filles (III-1 et III-2).

En ce qui concerne la corrélation phénotype-génotype au sein de la famille, les porteurs de l'insertion équilibrée (I-1 et II-4) n'ont pas de phénotype particulier. La délétion de la région 8q22.3-8q23.2 entraîne un retard mental associé à une petite taille, une microcéphalie et une dysgénésie gonadique tandis que la duplication réciproque n'engendre pas d'anomalie phénotypique ni de perturbation des capacités intellectuelles. Cette observation est concordante avec les descriptions faites dans la littérature sur le fait que les délétions sont habituellement responsables de phénotypes plus sévères que les duplications. De larges duplications ont parfois été identifiées chez des individus phénotypiquement normaux. Balikova *et al.* ont rapporté, chez un individu sain, une duplication de 7,8 Mb en 10qter et impliquant 78 gènes (Balikova *et al.* 2007). De la même manière, Spreiz *et al.* ont décrit une femme porteuse d'une duplication de 11,3 Mb sans phénotype particulier (Spreiz *et al.* 2010). Plusieurs arguments peuvent expliquer la différence de sévérité entre délétions et duplications. Une délétion peut démasquer une mutation présente sur l'allèle résiduel qui ne se serait pas exprimée en présence d'une deuxième copie normale du gène. C'est le

phénomène de démasquage d'allèle récessif. Dans le cas de cette famille, un second déterminant sur le chromosome X pourrait expliquer le phénotype sévère des garçons délétés et le phénotype normal des filles dupliquées.

La région 8q22.3-8q23.2 comprend 34 gènes dont 6 ont été impliqués dans des maladies OMIM. Le gène *ZFPM2* (*Zinc Finger Protein Multiple 2*) aussi appelé *FOG2* (*Friend Of GATA 2*) a retenu notre intérêt puisque la description d'un patient atteint de dysgénésie gonadique et porteur d'une translocation t(8;10) interrompant le gène *ZFPM2* (Finelli *et al.* 2007). De plus, des expérimentations chez la souris ont prouvé son implication dans la dysgénésie gonadique (Tevosian *et al.* 2002), symptôme présent chez les trois frères délétés.

Les autres gènes de la région sont *RRM2B*, *FZD6*, *CTHRC1*, *DPYS* et *TRHR*. Ils ont été impliqués dans l'ophtalmoplégie externe progressive autosomique dominante de type 5, la dysplasie congénitale des ongles, l'adénocarcinome œsophagien ou l'œsophage de Barrett, des cas symptomatiques ou asymptomatiques de dihydropyrimidinurie et des hypothyroïdies centrales, respectivement (Tynismaa *et al.* 2009, Fröjmark *et al.* 2011, Orloff *et al.* 2011, Hamajima *et al.* 1998, Bonomi *et al.* 2009, Collu *et al.* 1997). Aucun de ces symptômes n'a été retrouvé chez nos patients.

Quelques articles de la littérature ont préalablement rapporté des délétions interstitielles du bras long du chromosome 8. Celle qui ségrège dans notre famille chevauche partiellement celle décrite par Kuechler *et al.* en 2011. Certains traits phénotypiques, comme le retard de développement associé à une limitation du langage, la petite taille et la microcéphalie, sont communs à leurs patients et aux nôtres. Un des patients décrits dans leur article est porteur d'une délétion partielle de *ZFPM2* et présente un hypospade glandulaire et des testicules non descendues. Ce résultat ainsi que la présence de testicules de petite taille chez les trois garçons délétés de notre famille renforcent l'implication de ce gène dans la dysgénésie gonadique. Par contre, le manque de précision dans la localisation des points de cassure du fait de la faible résolution des techniques employées dans les articles publiés précédemment rend difficile l'étude de corrélations génotype-phénotype avec nos patients.

Concolino *et al.* ont rapporté un nouveau patient porteur d'une duplication 8q22.2-24.3 *de novo* et fait une revue de la littérature des articles traitant de duplications partielles

du 8q pour tenter d'établir des corrélations génotype-phénotype (Concolino *et al.* 2012). Les symptômes les plus fréquemment observés sont : un hypertélorisme, une microrétrognathie, un télécanthus, et un retard mental modéré à sévère. Les duplications 8q décrites sont significativement plus larges et plus télomériques que celle que nous avons pu observer et peuvent difficilement être comparées à nos patients.

V. Discussion

D'un point de vue moléculaire, les insertions sont les conséquences d'erreurs d'appariement lors de la réparation de cassures double-brin survenues simultanément dans la cellule. Plusieurs processus de réparation peuvent intervenir avec des spécificités propres à chacun. Il est facilement concevable qu'en dehors de l'existence d'homologies sur deux extrémités libres, leur appariement (via la NHEJ) ait plus probablement lieu si elles sont physiquement proches dans le noyau. Dans la littérature, certaines équipes tendent à penser que le noyau possède une organisation en territoires dans lesquels sont regroupés des gènes ayant une fonction proche ou complémentaire pour mener à bien un processus cellulaire au moment requis. Il semblerait donc que l'organisation nucléaire et le timing de réplication pourraient expliquer la plus grande probabilité de survenue d'un appariement plutôt qu'un autre. Ce phénomène expliquerait, en partie, l'association récurrente entre le gène *BCR* et le gène *ABL* puisqu'ils sont répliqués tous les deux pendant la phase S du cycle cellulaire et seraient situés à proximité dans le noyau (De et Michor 2011, Lukášová *et al.* 1997). Cette théorie peut en partie expliquer la survenue des anomalies récurrentes mais de nombreuses anomalies sont « spécifiques » à une famille.

Le faible nombre d'individus porteurs d'une anomalie strictement identique limite la pertinence de la corrélation génotype-phénotype. Cette corrélation peut être envisagée chez les porteurs de délétions pour lesquelles l'haploinsuffisance d'un ou plusieurs gènes peut être en rapport avec la clinique présentée par le patient. Dans le cas des insertions déséquilibrées, en plus du retentissement clinique provoqué par le dosage génique comme dans les duplications simples, une part du phénotype peut être imputée à la dérégulation de l'expression des gènes. Ce phénomène peut concerner les gènes contenus dans la région insérée ou situés à proximité des points de cassure. Ces influences réciproques entre les éléments régulateurs des différents fragments nouvellement rapprochés ou éloignés par le remaniement peuvent également, à elles-seules, dans le cas des insertions équilibrées, induire un phénotype particulier bien que l'ensemble du génome soit présent en deux copies.

Une variabilité inter-individuelle est très fréquemment observée quel que soit le type d'anomalie moléculaire décrite. Les insertions chromosomiques ne font pas exception. L'exemple de la mère et sa fille porteuses de l'insertion intrachromosomique dans la famille vue en consultation par le Dr Martin-Coignard, qui ne partagent absolument pas le même phénotype, illustre très bien ce phénomène. La difficulté réside dans le fait de conclure à une expression variable de l'anomalie chromosomique ou d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un autre évènement génétique responsable de la sévérité de la pathologie chez la fille. De la même manière, la différence de phénotypes entre frère et sœur porteurs de la duplication 2q34-q35 dans la première famille pose les mêmes interrogations vis-à-vis de la responsabilité de l'anomalie chromosomique dans le retentissement cutané.

Une partie du phénotype peut également être causée par l'interruption d'un gène au niveau d'un point de cassure. Malgré l'amélioration des techniques et l'augmentation de leur résolution pour identifier les anomalies chromosomiques, l'identification précise des points de cassure peut s'avérer difficile. Les points de cassure du chromosome donneur sont plus facilement identifiables puisqu'ils peuvent être visualisés, avec une résolution plus ou moins importante, sur une puce à ADN réalisée chez le porteur d'une délétion ou d'une duplication de la région insérée chez le parent. Malheureusement, le point de cassure du chromosome receveur n'est pas visible sur une puce à ADN. Il peut être défini de manière approximative sur un caryotype ou par FISH mais souvent la résolution n'est pas suffisamment importante pour savoir si un gène est interrompu par l'insertion. Le séquençage est la seule technique permettant de connaître, à la base près, le point de cassure exact. Pour entreprendre le séquençage d'un point de cassure, il faut au préalable et dans la mesure du possible, réduire au maximum la région candidate à l'aide de sondes FISH contiguës, voire des fosmidés, spécifiques du point de cassure potentiel. Lorsque l'insertion est suffisamment grande, la sonde chevauchant le point de cassure est visualisée par deux faibles signaux observés de part et d'autre de l'insertion. Des amorces de PCR sont alors désignées (l'une située à une extrémité du chromosome receveur et une seconde à une extrémité du fragment inséré) pour séquencer la région et connaître, à la base près, le site de l'insertion. En pratique, le séquençage des points de cassure, notamment sur le chromosome receveur, est rarement réalisé.

Leur identification est désormais facilitée par l'émergence des nouvelles générations de séquençage. Les points de cassure survenant dans un exon peuvent être mis en évidence par exome tandis que ceux survenant en dehors des séquences couvertes par l'exome ne peuvent être détectés que par séquençage du génome entier.

Comme ont pu l'illustrer les trois exemples développés dans ce manuscrit, il n'existe pas de clinique évocatrice d'une insertion du fait de l'infinie diversité des régions impliquées et des configurations moléculaires possibles. Il est donc primordial de mettre en place des investigations adéquates permettant de les identifier même lorsque le mode de transmission supposé n'est pas typique d'une insertion.

La technique de FISH est définitivement reconnue comme technique de choix pour mettre en évidence les différents types d'insertions. Elle a l'avantage d'être à la fois quantitative (nombre de copies) et qualitative (localisation) pour la région étudiée.

L'identification d'une insertion chez un apparenté d'un individu porteur d'un déséquilibre chromosomique permet une meilleure évaluation du risque de récurrence pour les prochaines grossesses. Le conseil génétique dans la famille plus ou moins proche est donc très largement impacté par la recherche de ces anomalies chromosomiques.

Dans certains cas, les insertions équilibrées sont identifiées chez des individus qui rencontrent des difficultés à procréer, ayant vécu plusieurs fausses-couches spontanées. En effet, certains déséquilibres ne sont pas viables et aboutissent à des avortements spontanés.

Ces difficultés sont également rencontrées dans le cas de translocations réciproques. Les couples peuvent aujourd'hui avoir recours au diagnostic préimplantatoire (DPI) pour augmenter leur chance d'avoir un enfant sain. Cette technique consiste à stimuler la production d'ovocytes, afin de réaliser un nombre conséquent de fécondation *in vitro* lors d'un même cycle. Plusieurs embryons sont alors obtenus et mis en culture. Trois jours après la fécondation, une ou deux cellules (blastomères) sont extraites (biopsiées) et analysées par FISH, en ce qui concerne les anomalies cytogénétiques. La FISH sur les noyaux permettra de connaître le nombre de copies des régions d'intérêt. Seuls les embryons possédant deux copies de chaque région seront potentiellement transférables le lendemain de la biopsie.

Les insertions chromosomiques sont plus rares que les translocations réciproques. De ce fait, peu de publications ont fait l'objet de diagnostic préimplantatoire pour des insertions chromosomiques. La possibilité de crossing-over complique la mise au point de l'analyse et l'interprétation d'un diagnostic préimplantatoire sur un noyau unique.

En 2003, un article est paru sur des diagnostics préimplantatoires réalisés pour des réarrangements chromosomiques divers. Parmi les patients, se trouvait un couple dont la femme portait une insertion intrachromosomique impliquant le chromosome 7. Après un cycle de stimulation, seize ovocytes ont été ponctionnés et fécondés. Onze embryons ont été biopsiés et 70% d'entre eux étaient normaux ou équilibrés et 30% porteurs d'un déséquilibre. Deux embryons ont été réimplantés et la grossesse s'est poursuivie et a donné naissance à un enfant sain (Simopoulou *et al.* 2003).

La patiente décrite par Simopoulou *et al.* en 2003 a réalisé un autre diagnostic préimplantatoire qui a été publié en 2010 par Xanthopoulou *et al.*. L'article expose aussi les résultats du DPI effectué chez le frère de la patiente, également porteur de l'insertion intrachromosomique équilibrée. Il a eu, de manière naturelle, un garçon dupliqué présentant un phénotype modéré, une fille dupliquée décédée à l'âge de 10 mois et un autre garçon avec un caryotype normal. Les deux premiers cycles de DPI chez le frère n'ont pas abouti à une grossesse et le troisième n'a pas permis de transfert d'embryon. Pour la sœur, le deuxième cycle de DPI s'est terminé par une grossesse extra-utérine. L'analyse des embryons non transférés a permis d'étudier la ségrégation d'une même insertion dans les ovocytes ou les spermatozoïdes. Les déséquilibres étaient deux fois plus fréquents dans les spermatozoïdes que dans les ovocytes et préférentiellement des duplications. Cette différence pourrait être la conséquence d'un plus grand nombre de crossing-overs chez la femme par rapport à l'homme ou un empaquetage différent dans les ovocytes et dans les spermatozoïdes (Xanthopoulou *et al.* 2010).

Le premier DPI pour insertion interchromosomique a été rendu public en 2004. Le couple a eu un garçon bien portant et deux autres garçons présentant un retard mental sévère en rapport avec une duplication par insertion de la région 2q31-q35 dans le bras long du chromosome 14. L'insertion équilibrée a été retrouvée chez la mère. Le diagnostic prénatal lors de la quatrième grossesse a permis de mettre à nouveau en évidence une

trisomie partielle et la grossesse a été interrompue. Le couple a alors demandé une prise en charge en DPI. Deux cycles de stimulation ont été réalisés et ont permis d'obtenir 27 ovocytes. Dix-sept ont été fécondés et dix embryons ont été biopsiés. Quatre paraissent normaux ou équilibrés. Malheureusement, aucun des quatre embryons implantés n'a abouti à une grossesse (Melotte *et al.* 2004).

Pour conclure, les trois histoires familiales présentées ici et les exemples tirés de la littérature illustrent la diversité clinique observable chez les porteurs d'insertions. L'enquête familiale réalisée suite à leur identification permet de dépister des insertions équilibrées chez des individus asymptomatiques. Ils pourront alors bénéficier d'un conseil génétique approprié et d'un diagnostic prénatal à chaque grossesse du fait du risque de déséquilibre chromosomique pour la descendance. Bien que ces remaniements soient relativement rares, il est donc indispensable de pouvoir les mettre en évidence. L'hybridation *in situ* est la technique la plus adaptée et doit donc, dans la mesure du possible être utilisée pour confirmer un déséquilibre chromosomique décelé en CGH array et lors de l'étude familiale.

Bibliographie

Abuelo *et al.* 1988. Insertional translocations: report of two new families and review of the literature. *Am J Med Genet.* 31(2):319-329.

Balikova *et al.* 2007. Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum. Mutat.* 28:958-967.

Ballif *et al.* 2004. Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet.* 114(2):198-206.

Baptista *et al.* 2005. Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals. *Eur J Hum Genet.* 13(11):1205-1212.

Baptista *et al.* 2008. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet.* 82(4):927-936.

Bauters *et al.* 2008. Nonrecurrent *MECP2* duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res.* 18(6):847-858.

Belin *et al.* 1998. *SHOX* mutations in dyschondrosteosis (Leri-Weill syndrome). *Nat Genet.* 19(1):67-69.

Bonomi *et al.* 2009. A family with complete resistance to thyrotropin-releasing hormone. *N. Engl. J. Med.* 360:731-734.

Collu *et al.* 1997. A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1561-1565.

Colnaghi *et al.* 2011. The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 22(8):875-885.

Concolino *et al.* 2012. A de novo 8q22.2-24.3 duplication in a patient with mild phenotype. *Eur. J. Med. Genet.* 55:67-70.

De et Michor. 2011. DNA replication timing and long-range DNA interactions predict mutational landscapes of cancer genomes. *Nat Biotechnol.* 29(12):1103-1108.

De Grouchy et Turleau. 1982. Atlas des maladies chromosomiques. Expansion scientifique française. Pages 34-37.

Finelli *et al.* 2007. Disruption of *friend of GATA 2* gene (*FOG-2*) by a *de novo* t(8;10) chromosomal translocation is associated with heart defects and gonadal dysgenesis. *Clin. Genet.* 71:195-204.

Friedrich *et al.* 2000. Microdissection of chromosome 2--between-arm intrachromosomal insertion. *Eur J Hum Genet.* 8(5):393-395.

Fröjmark *et al.* 2011. Mutations in frizzled 6 cause isolated autosomal-recessive nail dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 88 (6):852-860.

Fryns *et al.* 1984. *De novo* complex chromosomal rearrangement (CCR) in a severely mentally retarded boy. *Ann Genet.* 27(1):62-64.

Gu *et al.* 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 1(1):4.

Hamajima *et al.* 1998. Dihydropyrimidinase deficiency: structural organization, chromosomal localization, and mutation analysis of the human dihydropyrimidinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 63 (3):717-726.

Han *et al.* 2013. MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature.* 498(7453):241-245.

Hastings *et al.* 2009. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet.* 5(1):e1000327.

Helleday *et al.* 2007. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst).* 6(7):923-935.

Ho *et al.* 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* 4;23(15):3103-3112.

Irwin *et al.* 2006. Mst3b, a purine-sensitive Ste20-like protein kinase, regulates axon outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(48):18320-18325.

Kang *et al.* 2010. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am. J. Med. Genet. A* 152A:1111-1126.

Kawabe *et al.* 2010. Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Neuron.* 65(3):358-372.

Koyano *et al.* 1997. Molecular cloning and characterization of CDEP, a novel human protein containing the ezrin-like domain of the band 4.1 superfamily and the Dbl homology domain of Rho guanine nucleotide exchange factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 241(2):369-375.

Kuechler *et al.* 2011. Five patients with novel overlapping interstitial deletions in 8q22.2q22.3. *Am. J. Med. Genet.* 155A:1857-1864.

Lander *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature.* 409(6822):860-921.

Lee *et al.* 2006. Role of genomic architecture in *PLP1* duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mol Genet.* 15(14):2250-2265.

Lee *et al.* 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell.* 131(7):1235-1247.

Lerosey *et al.* 1991. The product of the *rap2* gene, member of the ras superfamily. Biochemical characterization and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 266(7):4315-4321.

Lieber *et al.* 2010. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem.* 50:279-296.

Liehr *et al.* 2002. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med.* 9(4):335-339.

Lodish *et al.* 2004. *Molecular Biology of the Cell*. WH Freeman: New York, NY. 5th ed. Page 963.

Lukášová *et al.* 1997. Localisation and distance between *ABL* and *BCR* genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet.* 100(5-6):525-535.

Madan et Menko. 1992. Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet.* 89(1):1-9.

Mankodi *et al.* 2001. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet.* 10(19):2165-2170.

Melotte *et al.* 2004. Preimplantation genetic diagnosis for an insertional translocation carrier. *Hum Reprod.* 19(12):2777-2783.

Miller *et al.* 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19(17):4439-4448

Mladenov *et al.* 2013. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol.* 3:113.

Morrow *et al.* 1997. "Break copy" duplication: a model for chromosome fragment formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 147(2):371-382.

Neill *et al.* 2011. Recurrence, submicroscopic complexity, and potential clinical relevance of copy gains detected by array CGH that are shown to be unbalanced insertions by FISH. *Genome Res.* 21:535-544.

Ogata *et al.* 2000. Short stature homeobox-containing gene duplication on the der(X) chromosome in a female with 45,X/46,X, der(X), gonadal dysgenesis, and tall stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(8):2927-2930.

Orloff *et al.* 2011. Germline mutations in *MSR1*, *ASCC1*, and *CTHRC1* in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *JAMA* 306 (4):410-419.

Payen *et al.* 2008. Segmental duplications arise from Pol32-dependent repair of broken forks through two alternative replication-based mechanisms. *PLoS Genet.* 4(9):e1000175.

Pellestor *et al.* 2011. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update.* 17(4):476-494.

Quélin *et al.* 2009. Twelve new patients with 13q deletion syndrome: genotype-phenotype analyses in progress. *Eur J Med Genet.* 52(1):41-46.

Rashidi-Nezhad *et al.* 2012. 2q34-qter duplication and 4q34.2-qter deletion in a patient with developmental delay. *Eur J Med Genet.* 55(3):203-210.

Reiter *et al.* 1998. Human meiotic recombination products revealed by sequencing a hotspot for homologous strand exchange in multiple HNPP deletion patients. *Am J Hum Genet.* 62(5):1023-1033.

Robertson *et al.* 2000. Homozygous deletion of *SHOX* in a mentally retarded male with Langer mesomelic dysplasia. *J Med Genet.* 37(12):959-964.

Romain *et al.* 1994. Partial trisomy for 2q in a patient with dir dup(2) (q33.1q35). *J Med Genet.* 31(8):652-653.

Schinkmann et Blenis. 1997. Cloning and characterization of a human STE20-like protein kinase with unusual cofactor requirements. *J Biol Chem.* 272(45):28695-28703.

Sebold *et al.* 2005. Partial trisomy 2q: report of a patient with dup (2)(q33.1q35). *Am J Med Genet A.* 134A(1):80-83.

Sharp. 2009. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum Mutat.* 30(2):135-144.

Shears *et al.* 1998. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene *SHOX* cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet.* 19(1):70-73.

Simopoulou *et al.* 2003. Preimplantation genetic diagnosis of chromosome abnormalities: implications from the outcome for couples with chromosomal rearrangements. *Prenat Diagn.* 23(8):652-662.

Smeets. 2004. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem.* 37(6):439-446.

Spreiz *et al.* 2010. Phenotypic variability of a deletion and duplication 6q16.1/q21 due to a paternal balanced ins(7;6)(p15;q16.1q21). *Am. J. Med. Genet. A* 152A:2762-2767.

Tevosian *et al.* 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal *Sry* expression in mice require direct interaction between transcription partners *GATA4* and *FOG2*. *Development* 129:4627-4634.

Thierry *et al.* 2013. Autosomal insertional translocation mimicking an X-linked mode of inheritance. *Eur J Med Genet.* 56:46-49.

Thomas *et al.* 2009. Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human *SHOX* gene reveal a variable effect on stature. *Am J Med Genet A.* 149A(7):1407-1414.

Tynismaa *et al.* 2009. A heterozygous truncating mutation in *RRM2B* causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2):290-295.

Van der Aa *et al.* 2009. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 52(2-3):94-100.

Van Esch *et al.* 1999. Partial DiGeorge syndrome in two patients with a 10p rearrangement. *Clin Genet.* 55(4):269-276.

Van Hemel et Eussen. 2000. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet.* 107(5):415-432.

Van Hulle *et al.* 2007. Inverted DNA repeats channel repair of distant double-strand breaks into chromatid fusions and chromosomal rearrangements. *Mol Cell Biol.* 27(7):2601-2614.

Wang *et al.* 1994. Direct and inverted reciprocal chromosome insertions between chromosomes 7 and 14 in a woman with recurrent miscarriages. *Am J Med Genet.* 52(3):349-351.

Wang *et al.* 2009. A bcr3/short form *PML-RARalpha* transcript in an acute promyelocytic leukemia resulted from a derivative chromosome 17 due to submicroscopic insertion of the *PML* gene into the *RARalpha* locus. *Am J Clin Pathol.* 131(1):64-71.

Woodward *et al.* 2005. Heterogeneous duplications in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease suggest a mechanism of coupled homologous and nonhomologous recombination. *Am J Hum Genet.* 77(6):966-987.

Xanthopoulou *et al.* 2010. Male and female meiotic behaviour of an intrachromosomal insertion determined by preimplantation genetic diagnosis. *Mol Cytogenet.* 3(1):2.

Yaseen et Blobel. 1997. Cloning and characterization of human karyopherin beta3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9):4451-4456.

Zhou *et al.* 2000. Identification of a human brain-specific isoform of mammalian STE20-like kinase 3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 275(4):2513-2519.

Zhu *et al.* 2011. X-linked congenital hypertrichosis syndrome is associated with interchromosomal insertions mediated by a human-specific palindrome near *SOX3*. *Am J Hum Genet.* 88(6):819-826.

Zickler et Kleckner. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet.* 33:603-754.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>

Short clinical report

Autosomal insertional translocation mimicking an X-linked mode of inheritance

Gaelle Thierry^a, Olivier Pichon^a, Annaig Briand^a, Damien Poulain^a, Yves Sznajder^b, Albert David^a, Cédric Le Caignec^{a,c,*}^a CHU Nantes, Service de Génétique Médicale, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes, France^b Center for Human Genetics, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium^c INSERM, UMR1087, l'Institut du thorax, Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2012

Accepted 5 October 2012

Available online 26 October 2012

Keywords:

Mental retardation

X-linked intellectual disability

Insertion

Deletion

Duplication

ZFPM2

ABSTRACT

Unbalanced insertional translocations are a rare cause of intellectual disability. An unbalanced insertional translocation is a rare chromosomal imbalance, which may result from a balanced insertional translocation present in a phenotypically normal parent. We report here three brothers with intellectual disability, short stature, microcephaly, craniofacial anomalies and small testes. Since their parents and their sister were all phenotypically normal, the pattern of the family suggested an X-linked mode of inheritance. Surprisingly, we identified by array comparative genomic hybridization (aCGH) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in the three brothers an 8q22.3q23.2 deletion resulting from a balanced insertional translocation present in their healthy father. The deletion encompassed the *ZFPM2* gene known to be involved in gonadal development, which is consistent with the small testes and abnormal endocrine dosages in the affected brothers. The present report also illustrates that parental analyses by aCGH or qPCR methods are not sufficient when a *de novo* deletion or duplication is identified in an affected child and that FISH analysis should be performed on metaphase spreads in both parents to deliver an accurate genetic counseling.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Intellectual disability (ID) represents the most frequent cause of severe handicap in children and one of the main reasons for referral in clinical genetic practices. Causes of ID are extremely heterogeneous and can result from chromosomal rearrangements, monogenic disorders, and/or environmental factors. Despite clinical examination and extensive complementary investigations, no etiology is identified in up to 50% of the patients with moderate to severe ID [1], hampering accurate genetic counseling and clinical follow-up.

Among the chromosomal rearrangements, unbalanced insertional translocations are a rare cause of ID [2,3]. An unbalanced insertional translocation may result from a balanced insertional translocation present in a phenotypically normal parent. Balanced insertional translocation is defined by the intercalation of a part of one chromosome into another non-homologous chromosome (interchromosomal insertion) or into another part of the same chromosome (intrachromosomal insertion). We report here

a family with three brothers with ID, short stature, microcephaly, craniofacial anomalies and small testes and a phenotypically normal sister. Both parents were phenotypically normal suggesting an X-linked mode of inheritance. Surprisingly, we identified by array comparative genomic hybridization (aCGH) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in the three brothers an 8q22.3q23.2 deletion resulting from a balanced insertional translocation present in their father.

2. Materials and methods

2.1. Clinical report

The proband (individual II-2) is a male born from healthy unrelated parents (individuals I-1 and I-2) (Fig. 1). He was referred for ID to our medical genetic department at the age of 53 years old. Walking alone was acquired between 18 and 24 months old. At 53 years old, he was able to speak isolated words but could not make sentences nor read and write. At physical examination, he presented with short stature (160 cm; -2.5 SD), microcephaly (OFC: 54 cm, -2 SD), convergent strabismus of the left eye, craniofacial dysmorphic features including a long face with a mild enophthalmia, arched eyebrows and large ears, and small testes. He had stereotyped movements. No seizures were mentioned.

* Corresponding author. CHU Nantes, Service de Génétique Médicale, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes, France. Tel.: +33 2 40 08 42 84; fax: +33 2 40 08 39 43. E-mail address: cedric.lecaignec@chu-nantes.fr (C. Le Caignec).



Fig. 1. Pedigree of the present family. Normal: no imbalance identified by aCGH. The arrow indicates the proband. IT: Insertional translocation.

His older brother (individual II-1) presented with the same clinical features including small and soft testes. Endocrine evaluation of pituitary gonadal axis showed elevated serum follicle stimulating hormone (FSH) (30.2 mU/ml; normal range 1–12 mU/ml) with low total testosterone (2.33 ng/ml; normal range 3–10 ng/ml) indicating gonadal dysgenesis. In addition, he had major speech disorder with stuttering. At the age of 56 years old, his weight, height and OFC were 48 kg (–2.5 SD), 162 cm (–2.2 SD) and 52.5 cm (–3.3 SD), respectively.

The youngest brother (individual II-3) physically seemed like the elders. He could walk alone at 14 months old. He could make sentences but was not able to write or read. Physical examination showed a peno-scrotal hypospadias in addition to small and soft testes. Endocrine evaluation of pituitary gonadal axis showed elevated serum follicle stimulating hormone (FSH) (34.7 mU/ml; normal range 1–12 mU/ml) with low total testosterone (1.2 ng/ml; normal range 3–10 ng/ml) indicating gonadal dysgenesis. At the age of 51 years old, his weight, height and OFC were 68 kg (+0.5 SD), 161 cm (–2.3 SD) and 53 cm (–3 SD), respectively. He was described as someone with changing mood.

The fourth and last infant of the couple (individual II-4) was a healthy woman who attended higher education. At 46 years old, she had two phenotypically normal daughters (individuals III-1 and III-2). Her older daughter (individual III-1) attended a regular school and is working as a nurse's aide. She lives as husband and wife. At 29 years old, she was 175 cm tall (+2 SD) and had normal intelligence and no dysmorphic features. Her younger sister (individual III-2) also had a normal phenotype. She attended higher education and is working as a special needs worker. She also lives as husband and wife.

3. Cytogenetic and molecular tests

Informed consent for genetic analyses was obtained from all individuals according to local ethical guidelines. Karyotyping based on R-banding Thymidine Buder Giemsa (RTBG) was performed using standard methods on metaphase spreads from peripheral blood of the patients. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using standard protocols. Mutation screening in the *FRAXA*, *FRAXE*, *ARX*, *PQBPI* genes was performed in patient II-1 and in the *JARID1C* gene in patient II-2. Array CGH experiments were performed using Agilent Human Genome CGH 180K oligonucleotide arrays (Agilent, Santa Clara, CA; www.agilent.com) with the ISCA design (www.iscaconsortium.org) following the protocols provided by Agilent. The arrays were analyzed with the Agilent scanner and the Feature Extraction software (v. 9.1.3). Graphical overview was

obtained using the CGH analytics software (v.3.5.14). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed in individuals I-1, I-2, II-1, II-2, II-3, II-4 and III-1 with two different probes located in the 8q deleted region (RP11-188106 and RP11-695B04 probes), the RP11-797C19 probe in the 8p subtelomeric region and the CTB-62111 probe in the 6p subtelomeric region used as control probes (<http://bacpac.chori.org/home.htm>).

4. Results

The pedigree of the family led us to hypothesize an X-linked mode of inheritance (Fig. 1). Mutation screening in several genes responsible for X-linked mental retardation was normal in patient II-1 (*FRAXA*, *FRAXE*, *ARX*, *PQBPI*) and in patient II-2 (*JARID1C*). Surprisingly, an aCGH analysis showed normal results on the X chromosome but revealed a 9 Mb deletion in the 8q22.3q23.2 region (arr 8q22.3q23.2(103,043,561x2,103,059,472–112,124,080x1,112,148,713x2) (coordinates based on hg18 build) (Fig. 2). Array CGH analyses showed normal results in both parents (individuals I-1 and I-2).

FISH analyses using the RP11-188106 and RP11-797C19 probes confirmed the 8q deletion in the proband and showed that the other two affected brothers also carried the same deletion (Fig. 3A). At this stage, we hypothesized that the recurrence of this chromosomal imbalance in the three brothers could be due to a gonadal mosaicism of the deletion in one of the parents. However, FISH analyses in the parents of the proband showed a balanced insertional translocation in the father, for whom the 8q22.3q23.2 region was inserted in the long arm of chromosome 6 (Fig. 3B). Subsequently, this balanced insertional translocation was also identified in the phenotypically normal sister of the proband (individual II-4). The daughters of individual II-4 (individuals III-1 and III-2) were phenotypically normal but both carried a duplication of the 8q22.3q23.2 region (Fig. 3C).

5. Discussion

Balanced insertional translocations are chromosomal rearrangements that require at least three breaks in the chromosomes involved and thus qualify as complex chromosomal rearrangements (CCR). The frequency of unbalanced insertional translocation is estimated to be between 1/1400 and 1/500 in patients referred for ID and/or congenital anomalies carrying apparently *de novo* copy-number variant (CNV) [2–4]. When only autosomes are implicated in the rearrangement, both sexes may be affected and patients may present with ID and/or malformations. In the present report, three brothers presented with ID while their sister and their parents were normal suggesting an X-linked mode of inheritance. Surprisingly, no anomaly on the X chromosome was present but an unbalanced autosomal insertional translocation was identified in the three affected brothers. FISH analysis showed that the genomic imbalance was inherited from the phenotypically normal father who carried a balanced insertional translocation.

In this family, carrying the 8q22.3q23.2 deletion led to an abnormal phenotype while individuals with the reciprocal 8q22.3q23.2 duplication were normal. This is consistent with the fact that deletions are usually responsible for a more severe phenotype than duplications. Large duplications may even be observed in phenotypically normal individuals, as here for the two women carrying the 8q22q23.2 duplication. Balikova et al. [5] previously reported a phenotypically normal individual with a 10qter duplication encompassing 7.8 Mb and involving 78 genes. Similarly, Spreiz et al. [6] described a woman carrying an 11.3 Mb duplication with an almost unremarkable phenotype. Several explanations might explain the discrepancy between the benign

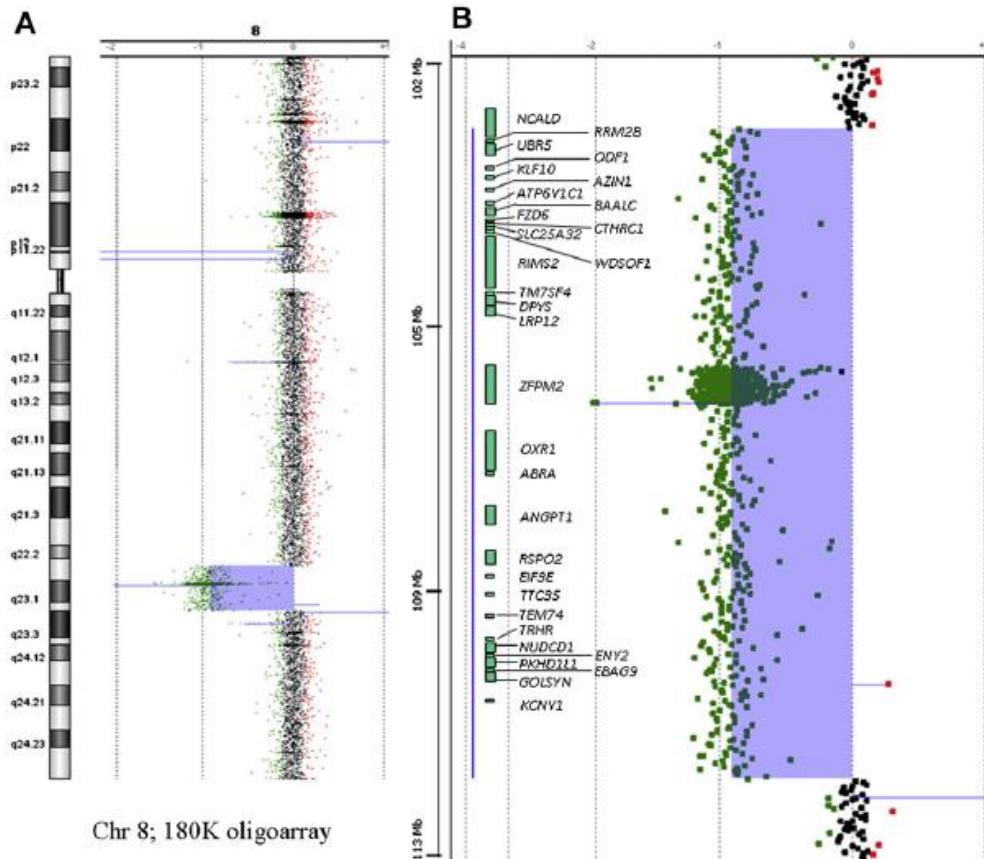


Fig. 2. The agilent 180K array-derived profile of chromosomes 8 performed on patient II-2. Black, red and green dots indicate the log₂-transformed fluorescence intensity ratios for normal, duplicated or deleted (respectively) oligonucleotide probe falling outside the threshold setting used (ADM-2 algorithm at a threshold of 6.0 using CGH Analytics version 4.0). (A) The ideogram and the fluorescence intensity ratio for each oligonucleotide probe of the entire chromosome 8. (B) Detailed view of the deletion. The horizontal axis indicates the log₂-transformed fluorescence intensity ratio for each oligonucleotide probe and the vertical axis indicates their physical position on chromosome 8. The aberrant area (arr 8q22.3q23.2(103,059,472–112,124,080)x1) is indicated by blue rectangle. Italic symbols indicate the genes located in the deleted region.

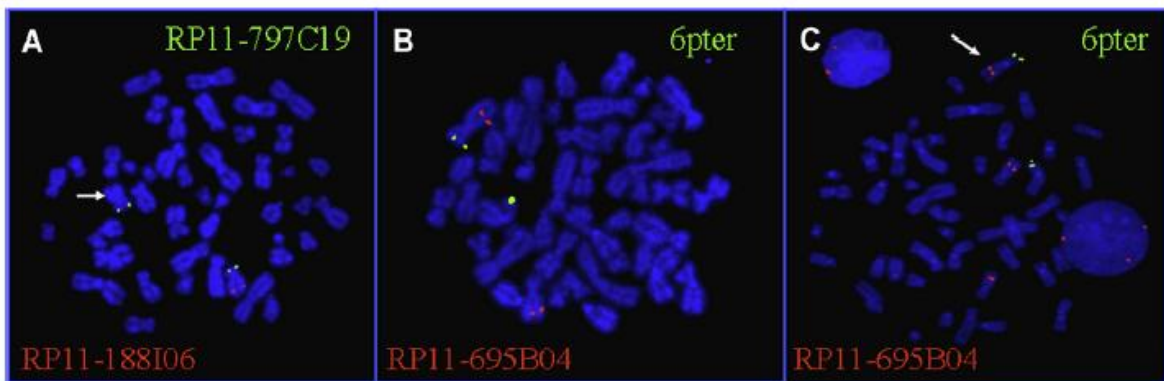


Fig. 3. FISH analyses performed on patient II-1, his father (individual I-1) and his niece (individual III-1). (A) Dual-color FISH analyses performed on metaphases of patient II-1. FISH with RP11-188I06 BAC clone located in the 8q22.3q23.2 deleted region and RP11-797C19 probe in 8p used as a control confirmed the deletion (probes were labeled with SpectrumOrange and SpectrumGreen, respectively). The arrow marks the deletion observed on metaphases. (B) Dual-color FISH analyses performed on metaphases of individual I-1. FISH with RP11-695B04 BAC clone located in the 8q22.3q23.2 deleted region and a 6p subtelomeric probe used as a control showed the balanced insertional translocation (probes were labeled with SpectrumOrange and SpectrumGreen, respectively). The 8q22.3q23.2 region is inserted in the long arm of chromosome 6. (C) Dual-color FISH analyses performed on metaphases of individual III-1. FISH with RP11-695B04 BAC clone located in the 8q22.3q23.2 duplicated region and a 6p subtelomeric probe used as a control. The arrow indicates the 8q22.3q23.2 region inserted in the long arm of chromosome 6 and thus duplicated (probes were labeled with SpectrumOrange and SpectrumGreen, respectively). 6pter: 6p subtelomeric probe.

phenotype associated with the duplication and the severity of the deletion in our family. The deletion may uncover a recessive phenotype with a second mutation on the maternal allele. A second explanation may involve the need of a second genetic determinant, possibly located on the X-chromosome. This would explain the severe phenotype in deleted males but a normal phenotype in duplicated females.

In our family, the deleted region in the three brothers encompasses 34 RefSeq genes including 6 OMIM genes implicated in human diseases. The *ZFPM2* (*Zinc Finger Protein Multiple 2*) also named *FOG2* (*Friend Of GATA 2*) is of particular interest since it has been involved in gonadal dysgenesis [7]. Finelli et al. [7] reported a patient with gonadal dysgenesis and a *de novo* balanced translocation t(8; 10) disrupting *ZFPM2*. Experiments in mice highlighted the role of *ZFPM2* in gonado-genesis. Tevosian et al. [8] studied *Zfpm2*^{-/-} mouse male and female fetuses and observed an abnormal development of gonads in both sex. Gonads were reduced in size and did not migrate to their physiological localization. At the same time, these transgenic mice showed a significant decrease of *Sry* expression by semi-quantitative RT-PCR with approximately 25% of the level reached in controls. The three brothers described here presented with small testes and abnormal levels of hormones of pituitary gonadal axis, which is consistent with these data. Although mutations in *ZFPM2* have also been identified in patients with congenital heart defects, no cardiopathy has been detected in our patients.

Mutations in other genes present in the deletion are responsible for different diseases. Mutations in *RRM2B* have been associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia 5 in two families [9]. Mutations in *FZD6* have been identified in patients with congenital nail dysplasia [10]. Mutations in *CTHRC1* (*Collagen Triple-Helix Repeat-Containing Protein 1*) have been involved in pathogenesis of some cases of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma [11]. Mutations in the dihydropyrimidinase (*DPYS*) seem responsible for symptomatic and asymptomatic dihydropyrimidinuria [12]. The gene encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor (*TRHR*) is also localized in 8q23.1. Mutated receptors are unable to bind TRH and patients develop central hypothyroidism [13,14]. None of these disorders was observed in the three affected brothers.

There are few comparable reports of interstitial 8q deletions. Our deletion partially overlaps with interstitial deletions of the 8q22.2q22.3 region reported by Kuechler et al. [15]. Developmental delay with limited speech, short stature and microcephaly were frequently noted in their patients and in our family. One of their patients carried a partial deletion of *ZFPM2* and presented with a glandular hypospadias and undescended testes. These findings, added to the presence of small testes in the three brothers of our family, strengthened the role of this gene in gonadal dysgenesis. The lack of precise localization of breakpoints due to the limited resolution of the cytogenetic analyses used in the other previously published reports hampered genotype–phenotype correlations with our patients.

Regarding the interstitial 8q duplications, Concolino et al. [16] reported a patient carrying a *de novo* 8q22.2–24.3 duplication and made a review of the previously published cases of partial duplication of 8q to try to establish genotype–phenotype correlations. Several clinical features were frequently observed in these patients such as hypertelorism, microretrognathia, telecanthus and mild to severe mental retardation. Since most of these patients presented with significantly larger and more telomeric 8q duplications, they can not be compared to our patients.

In conclusion, unbalanced insertional translocations are a rare cause of ID but their identification is essential to deliver an accurate

genetic counseling. When a *de novo* deletion or duplication is identified in an affected child, parental analyses by aCGH or qPCR methods are not sufficient and FISH analysis should be performed on metaphase spreads in both parents to exclude or diagnose a balanced insertional translocation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to the family who participated in this study.

References

- [1] J. Chelly, M. Khelifaoui, F. Francis, B. Chérif, T. Bienvenu, Genetics and pathophysiology of mental retardation, *Eur. J. Hum. Genet.* 14 (2006) 701–713.
- [2] S.H. Kang, C. Shaw, Z. Ou, P.A. Eng, M.L. Cooper, A.N. Pursley, T. Sahoo, C.A. Bacino, A.C. Chinault, P. Stankiewicz, A. Patel, J.R. Lupski, et al., Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results, *Am. J. Med. Genet. A* 152A (2010) 1111–1126.
- [3] B.A. Nowakowska, N. de Leeuw, C.A. Ruivenkamp, B. Sikkema-Raddatz, J.A. Crolla, R. Thoelen, M. Koopmans, N. den Hollander, A. van Haeringen, A.M. van der Kevie-Kersemaekers, R. Pfundt, H. Mieloo, et al., Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently *de novo* CNVs in patients with developmental anomalies, *Eur. J. Hum. Genet.* 20 (2012) 166–170.
- [4] N.J. Neill, B.C. Ballif, A.N. Lamb, S. Parikh, J.B. Ravnar, R.A. Schultz, B.S. Torchia, J.A. Rosenfeld, L.G. Shaffer, Recurrence, submicroscopic complexity, and potential clinical relevance of copy gains detected by array CGH that are shown to be unbalanced insertions by FISH, *Genome Res.* 21 (2011) 535–544.
- [5] I. Balikova, B. Menten, T. de Ravel, C. Le Caignec, B. Thienpont, M. Urbina, M. Doco-Fenzy, M. de Rademaeker, G. Mortier, F. Kooy, J. van den Ende, K. Devriendt, J.P. Fryns, F. Speleman, J.R. Vermeesch, Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 958–967.
- [6] A. Spreiz, D. Müller, S. Zotter, U. Albrecht, M. Baumann, C. Fauth, M. Erdel, J. Zschodke, G. Utermann, D. Kotzot, Phenotypic variability of a deletion and duplication 6q16.1 → q21 due to a paternal balanced ins(7;6)(p15;q16.1q21), *Am. J. Med. Genet. A* 152A (2010) 2762–2767.
- [7] P. Finelli, A.I. Pincelli, S. Russo, M.T. Bonati, M.P. Recalcati, M. Masciadri, D. Giardino, F. Cavagnini, L. Larizza, Disruption of friend of GATA 2 gene (*FOG2*) by a *de novo* t(8;10) chromosomal translocation is associated with heart defects and gonadal dysgenesis, *Clin. Genet.* 71 (2007) 195–204.
- [8] S.G. Tevosian, K.H. Albrecht, J.D. Crispino, Y. Fujiwara, E.M. Eicher, S.H. Orkin, Gonadal differentiation, sex determination and normal *Sry* expression in mice require direct interaction between transcription partners *GATA4* and *FOG2*, *Development* 129 (2002) 4627–4634.
- [9] H. Tyynismaa, E. Ylikallio, M. Patel, M.J. Molnar, R.G. Haller, A. Suomalainen, A heterozygous truncating mutation in *RRM2B* causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions, *Am. J. Hum. Genet.* 85 (2) (2009) 290–295.
- [10] A.S. Fröjmark, J. Schuster, M. Sobol, M. Entesarian, M.B. Kilander, D. Gabrikova, S. Nawaz, S.M. Baig, G. Schulte, J. Klar, N. Dahl, Mutations in frizzled 6 cause isolated autosomal-recessive nail dysplasia, *Am. J. Hum. Genet.* 88 (6) (2011) 852–860.
- [11] M. Orloff, C. Peterson, X. He, S. Ganapathi, B. Heald, Y.R. Yang, G. Bebek, T. Romigh, J.H. Song, W. Wu, S. David, Y. Cheng, et al., Germline mutations in *MSR1*, *ASCC1*, and *CTHRC1* in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma, *JAMA* 306 (4) (2011) 410–419.
- [12] N. Hamajima, M. Kouwaki, P. Vreken, K. Matsuda, S. Sumi, M. Imaeda, S. Ohba, K. Kidouchi, M. Nonaka, M. Sasaki, N. Tamaki, Y. Endo, et al., Dihydropyrimidinase deficiency: structural organization, chromosomal localization, and mutation analysis of the human dihydropyrimidinase gene, *Am. J. Hum. Genet.* 63 (3) (1998) 717–726.
- [13] M. Bonomi, M. Busnelli, P. Beck-Peccoz, D. Costanzo, F. Antonica, C. Dolci, A. Pilotta, F. Buzi, L. Persani, A family with complete resistance to thyrotropin-releasing hormone, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 731–734.
- [14] R. Collu, J. Tang, J. Castagné, G. Lagacé, N. Masson, C. Huot, C. Deal, E. Delvin, E. Faccenda, K.A. Eidne, G. Van Vliet, A novel mechanism for isolated central hypothyroidism: inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 1561–1565.
- [15] A. Kuechler, K. Buysse, J. Clayton-Smith, C. Le Caignec, A. David, H. Engels, J. Kohlhasse, F. Mari, G. Mortier, A. Renieri, D. Wiczczonek, Five patients with novel overlapping interstitial deletions in 8q22.2q22.3, *Am. J. Med. Genet. A* 155A (2011) 1857–1864.
- [16] D. Concolino, M.A. Iembo, M.T. Moricca, M. Rapsomaniki, R. Marotta, O. Galesi, M. Fichera, C. Romano, P. Strisciuglio, A *de novo* 8q22.2–24.3 duplication in a patient with mild phenotype, *Eur. J. Med. Genet.* 55 (2012) 67–70.

Vu, la Présidente du Jury,

Berthe-Marie IMBERT

Vu, le Directeur de Thèse,

Cédric LE CAIGNEC

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénoms : THIERRY Gaëlle, Christine, Marion

Titre du mémoire-thèse : Insertions chromosomiques en pathologie constitutionnelle.

Résumé du mémoire-thèse :

Les insertions sont des réarrangements chromosomiques rares résultant d'erreurs de réparation d'au moins trois points de cassures double-brin. Elles sont définies par la délocalisation d'un fragment intercalaire d'un chromosome ailleurs dans le génome. On les qualifie d'inter- ou intrachromosomiques, équilibrées ou déséquilibrées, directes ou inversées. Les porteurs d'une insertion chromosomique équilibrée peuvent être asymptomatiques mais risquent de transmettre des déséquilibres chromosomiques pouvant être responsables de retard mental et/ou de malformations, ou de fausses-couches spontanées. Les trois familles décrites dans ce manuscrit illustrent plusieurs types d'insertions et survenant dans des contextes cliniques très différents. Il n'existe pas de phénotype typique d'une insertion chromosomique. Leur découverte dans une famille implique un risque de récurrence d'un déséquilibre chromosomique à chaque grossesse. Il est donc indispensable de pouvoir les identifier pour délivrer un conseil génétique adapté à la famille. L'analyse, à la fois qualitative et quantitative d'une région chromosomique d'intérêt permise par l'hybridation *in situ*, en fait une technique de choix pour la détection des insertions chromosomiques.

Mots Clés

INSERTIONS CHROMOSOMIQUES, CARYOTYPE, FISH, CGH ARRAY, CONSEIL GÉNÉTIQUE

Jury

Présidente : Mme IMBERT Berthe-Marie, Professeur de Virologie-Nantes
Assesseurs : M. LE CAIGNEC Cédric, Professeur de Génétique-Nantes
M. BEZIEAU Stéphane, Professeur de Génétique-Nantes
Mme JAILLARD Sylvie, Maître de Conférences en Cytogénétique-Rennes
Mme LODE Laurence, PH en Biologie moléculaire en hématologie-Nantes

Adresse de l'auteur : Melle THIERRY Gaëlle - 30 avenue Praud 44300 NANTES