

Cytogénétique moléculaire

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Serge Romana, Valérie Malan

Service d'Histo-Embryo-Cytogénétique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Cytogénétique moléculaire, aspects techniques.....	5
I.1	L'hybridation in situ fluorescente ou FISH (Fluorescence in situ hybridization).....	5
I.1.1	Un peu d'histoire.....	5
I.1.2	Les sondes.....	5
I.1.3	Le marquage.....	7
I.1.3.1	Principe général.....	7
I.1.3.2	Les fluorochromes.....	7
I.1.3.3	La multifuorescence.....	7
I.2	L'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH Array.....	11
I.2.1	Un peu d'histoire.....	11
I.2.2	Principe.....	12
I.2.3	Une variante : les puces à SNPs (figure 7).....	13
II	Cytogénétique moléculaire, applications cliniques.....	14
II.1	LA FISH.....	14
II.1.1	La FISH sur métaphase : un complément du caryotype.....	14
II.1.1.1	Le Diagnostic cytogénétique des syndromes microdélétionnels	14
II.1.1.2	Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes.....	15
II.1.1.3	Caractérisation d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype.....	15
II.1.1.4	Détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées.....	15
II.1.2	La FISH interphasique.....	15
II.1.2.1	Le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques.....	16
II.1.2.2	Le Diagnostic pré-implantatoire des anomalies chromosomiques (DPI).....	16
II.1.2.3	La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans hémopathies malignes	16

II.1.2.4 Le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires.....	17
II.2 LA CGH ARRAY.....	17
II.2.1 La CGH array, technique de recherche clinique en pathologie acquise.....	17
II.2.2 La CGH array : technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles.	17
II.2.2.1 Les indications de la CGH array	18
II.2.2.2 Comment interpréter une CGH array ?.....	18
II.2.2.2.1 Classification des CNVs (19) (20).....	19
II.2.2.2.2 Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents.....	20
II.2.2.2.3 Utilisation des bases de données de variants de structure du génome.....	21
II.2.3 CGH array et recherche clinique en pathologie constitutionnelle.....	21
II.2.4 Limites de la CGH array.....	21
NOTE(S) DU CHAPITRE	22
III La nouvelle cytogénétique.....	22
IV Annexes.....	23

Introduction

La cytogénétique médicale est en pleine révolution. Le caryotype mis au point en 1956, n'est désormais plus l'examen de première intention pour l'exploration des anomalies chromosomiques associées à une déficience intellectuelle et/ou aux malformations congénitales (DI et/ou MC). Il est aujourd'hui supplanté par l'hybridation génomique sur réseau d'ADN ou CGH array qui est l'aboutissement du développement des techniques de cytogénétique moléculaire dont le début remonte aux années 80. La CGH array détecte des déséquilibres génomiques avec une résolution 10 à 500 fois supérieure à celle du caryotype (qui est de 5 à 10 millions de paires de bases ou 5-10 Mb). De ce fait, la taille d'un segment chromosomique remanié peut être déterminée avec précision ce qui permet de connaître son contenu génique et donc de faciliter l'établissement des corrélations phénotype - génotype. La détection d'une perte ou d'un gain de matériel chromosomique chez des patients présentant une DI et/ou MC mais aussi chez des patients avec des pathologies psychiatriques ou neurologiques permet dans certains cas d'identifier le(s) gène(s) impliqué(s). Avec l'avènement de cette technique, le cytogénéticien « constitutionnaliste » devient un « interniste » de la pathologie génomique.

Dans les cancers et en particulier dans les hémopathies malignes, l'impact de la CGH array, pour le diagnostic des anomalies chromosomiques est plus limité. En effet, les anomalies chromosomiques qui leur sont associées, sont d'une part souvent équilibrées (la CGH ne détecte que les déséquilibres génomiques) et seules certaines d'entre elles sont recherchées pour le traitement. De ce fait, la FISH (qui est une technique de cytogénétique ciblée) et la RT-PCR restent les examens moléculaires de choix, avec le caryotype, pour le diagnostic en routine des anomalies présentes dans ces pathologies.

Par ailleurs, sur le plan de la recherche, la CGH array est un outil précieux pour l'identification de gènes impliqués dans des pathologies constitutionnelles et acquises.

Dans ce chapitre, nous exposerons dans un premier temps les bases techniques des principaux outils de la cytogénétique moléculaire utilisés en routine dans les laboratoires de cytogénétique puis nous présenterons les principales applications de ces techniques. Enfin, nous terminerons sur une réflexion concernant l'avenir de la cytogénétique.

I CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE, ASPECTS TECHNIQUES

I.1 L'HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE OU FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)

I.1.1 Un peu d'histoire

La toute première technique de cytogénétique moléculaire s'appelle l'hybridation in situ fluorescente. Elle repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN. Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les deux brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier de façon spécifique (étape appelée la renaturation).

En 1981, l'équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (du dUTP) couplé à de la biotine dans un fragment d'ADN (cette opération s'appelle le « marquage ») qui est alors appelé « sonde ». Dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées, la sonde est révélée par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, le FITC. Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde. Ainsi naquit l'hybridation *in situ* fluorescente, permettant l'observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme in situ (à la différence du *Southern blot* qui est l'hybridation d'une sonde sur de l'ADN fixé sur une membrane de nylon) (1). L'utilisation de plusieurs fluorochromes et de filtres microscopiques idoines ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d'hybrider plusieurs sondes de façon concomitante. Grâce à ces progrès, il est possible aujourd'hui d'étudier de façon simultanée plus de 20 loci sur des chromosomes.

I.1.2 Les sondes

Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome. Pour la FISH, on utilise des sondes spécifiques de régions chromosomiques ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée.

On distingue :

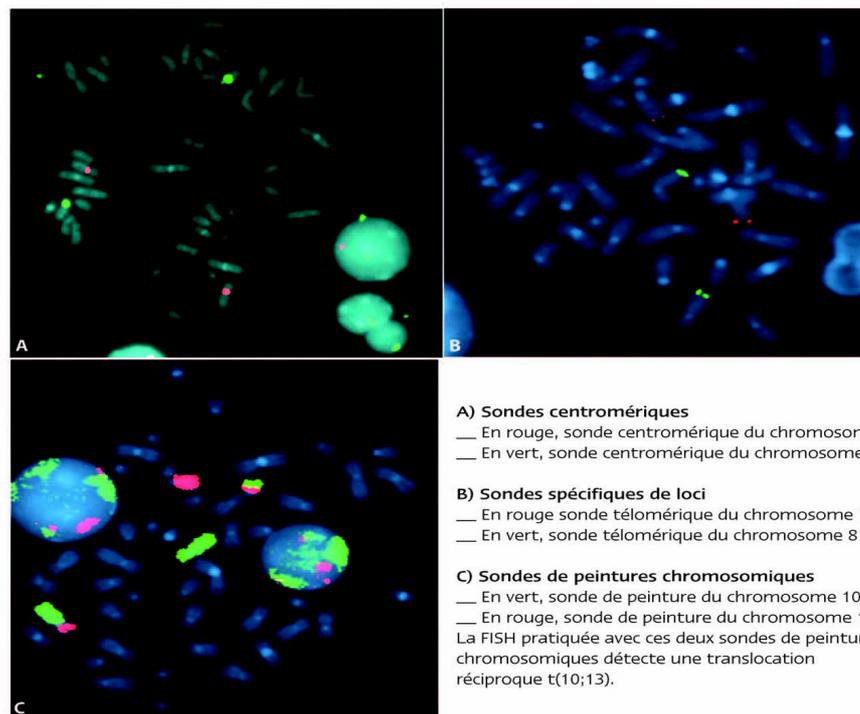
- **Les sondes composées de séquences spécifiques d'ADN répété.** Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilobase), mais s'hybrident sur des séquences spécifiques (centromères par exemple) répétées en tandem sur plusieurs

centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité (figure 1a).

- **Les sondes composées de séquences uniques** On distingue les sondes spécifiques de loci et les sondes spécifiques d'un bras chromosomique ou d'un chromosome entier (figure 1b et 1c).
 - **Les sondes spécifiques de loci** : Pour être entièrement séquencé, le génome humain fut fragmenté en segments de 100-200 kb puis clonés dans des vecteurs appelés BACs (« chromosomes artificiels de bactéries »). Ces BACs sont aujourd'hui utilisés comme sondes pour la technique de FISH. Le choix du BAC se fait par l'intermédiaire de sites internet publics donnant leur position précise sur le génome humain (UCSC genome.ucsc.edu/ -, Ensembl www.ensembl.org/ -, Database of Genomic Variants projects.tcag.ca/variation). D'autres vecteurs peuvent être également utilisés comme sondes (fosmides, cosmides, phages, plasmides ou chromosomes artificiels de levure ou YACs).
 - **Les sondes de peinture chromosomique** : Par PCR à partir d'ADN de lignées d'hybrides somatiques contenant chacune un exemplaire d'une paire de chromosome humain ou de chromosomes obtenus par cytométrie de flux, il est possible d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN représentant un chromosome en entier. Ces fragments marqués vont s'hybrider sur une paire chromosomique donnée. L'ensemble de ces fragments s'appelle « sonde de peinture chromosomique » (2).

Figure 1 : Les sondes

Figure 1



Sondes et images : Hôpital Necker-Enfants-Malades

I.1.3 Le marquage

I.1.3.1 Principe général

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des fluorochromes. Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connues sont le *Random-priming* et la *Nick-translation*.

I.1.3.2 Les fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission.

Les fluorochromes couramment utilisés sont :

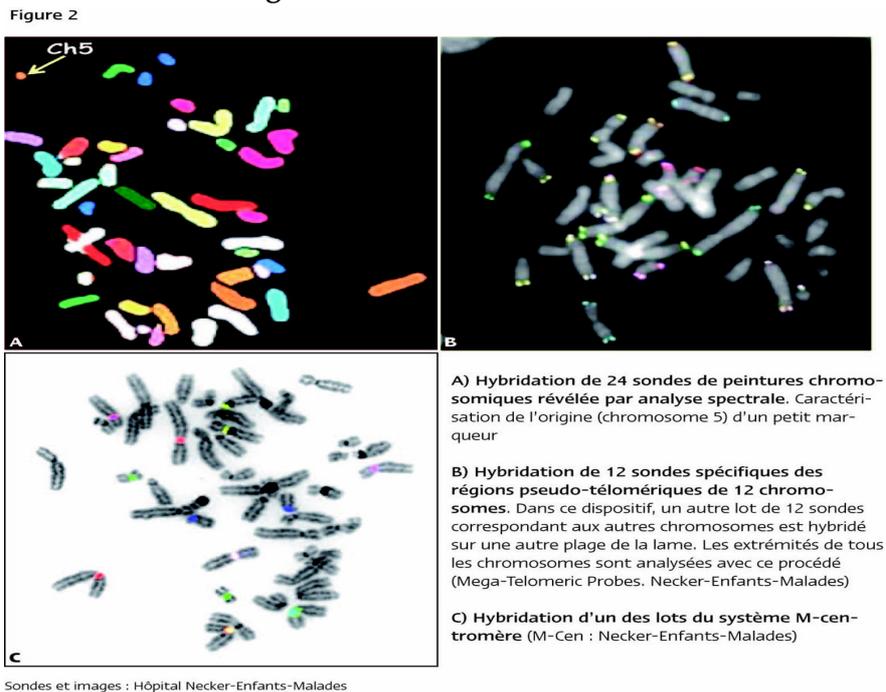
- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm - 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (λ_{exc} 495nm - λ_{em} 519nm) fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495nm - λ_{em} 519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red (λ_{exc} 589nm - λ_{em} 615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 (λ_{exc} 650nm - λ_{em} 670nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5.5 (λ_{exc} 675nm - λ_{em} 694nm) fluoresce dans le rouge

I.1.3.3 La multifuorescence

La FISH offre la possibilité d'étudier plusieurs loci simultanément lors d'une seule hybridation. Il suffit pour cela d'hybrider des sondes marquées avec des fluorochromes différents dont les spectres d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas.

Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes. On obtient alors une sonde dont la fluorescence est complexe, composée des longueurs d'émission des différents fluorochromes. Le signal de ce type de sonde ne peut être analysé qu'après numérisation (voir paragraphe e.i). En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes de peinture, chacune spécifique d'une paire chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multifuorescence (**figure2a**). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère (**figure2b et 2c**).

Figure 2 : La multifuorescence



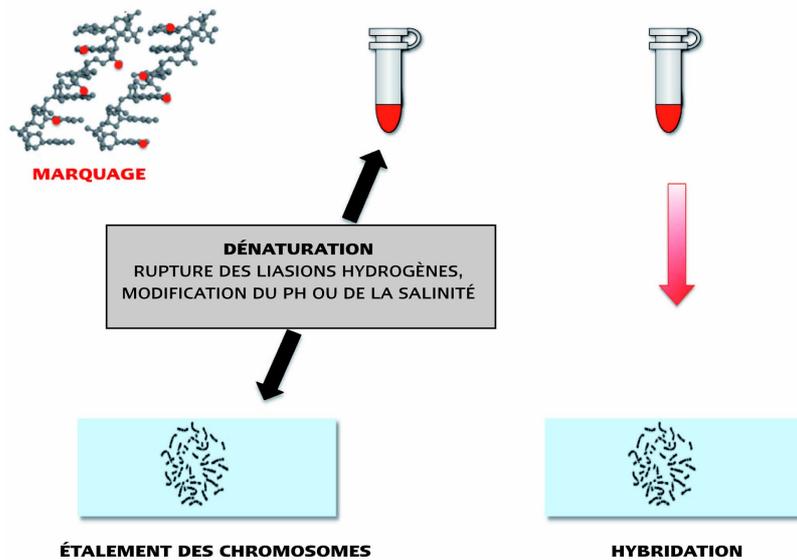
a) L'hybridation (figure 3)

C'est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Son efficacité dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d'hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, à 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

Dans la grande majorité des cas, l'hybridation est dite « compétitive ». En effet, l'ADN est composé de 40% de séquences répétées et de 65% de séquences uniques, ce qui correspond à la composition des sondes (à l'exception des sondes centromériques et télomériques). Après marquage, ces séquences répétées vont s'hybrider sur leurs cibles génomiques engendrant des signaux aspécifiques. Pour les éviter, Lengoer et al. en 1986 ont eu l'idée d'ajouter à l'ADN de la sonde un excès d'ADN non marqué riche en séquences répétées (appelé aujourd'hui ADN Cot1). Ainsi cet ADN s'hybride non seulement sur les séquences

répétées de la sonde mais aussi sur celles des cibles génomiques. Cette méthode appelée hybridation « compétitive » permet d'éviter les signaux aspécifiques (3).

Figure 3 : L'hybridation



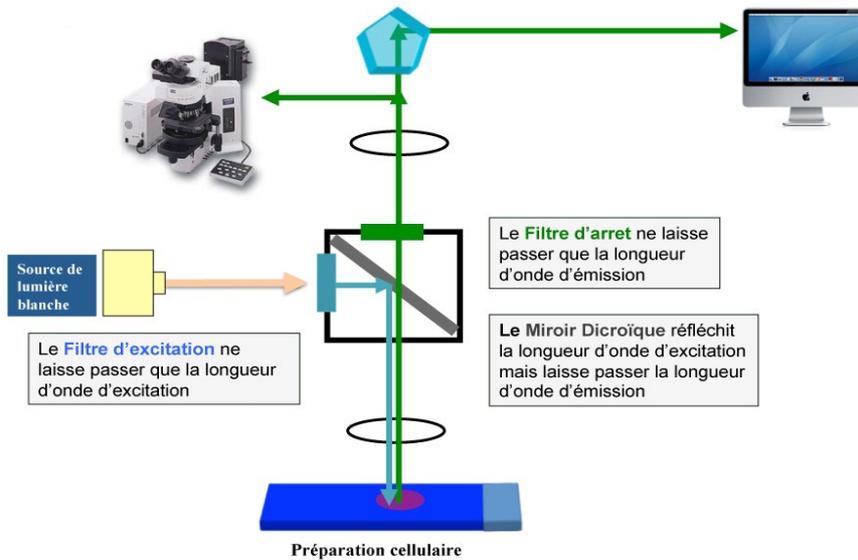
b) La microscopie en épifluorescence

Principe général

La figure 4 illustre la microscopie en épifluorescence. Un rayon lumineux de lumière blanche (contenant l'ensemble des longueurs d'onde de l'ultra violet aux infrarouges) est généré par des lampes à mercure (donnant des pics d'intensité dans les longueurs d'onde du visible) ou à Xénon (pics d'intensité homogène pour toutes les longueurs d'onde).

Cette lumière est transmise au niveau d'un dispositif contenant deux filtres et un miroir dichroïque. Le premier filtre sélectionne une longueur d'onde d'excitation (correspondant au fluorochrome intégré dans la sonde d'intérêt) qui est ensuite réfléchi par le miroir dichroïque sur la lame hybridée. Une fois le fluorochrome excité, il émet une longueur d'onde d'émission, d'intensité plus faible, qui peut alors passer à travers le miroir dichroïque pour arriver ensuite au filtre d'émission de façon à éliminer des longueurs d'onde parasites. Cette longueur d'onde d'émission est par la suite transmise aux oculaires du microscope pour être observée par l'œil de l'observateur ou au niveau d'une caméra qui numérise ce signal. En changeant de filtres, on peut alors étudier de cette façon plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents.

Figure 4 : La microscopie en épifluorescence



La multifuorescence

La possibilité de marquer des sondes avec plusieurs fluorochromes, le développement des caméras permettant la numérisation des signaux et la mise au point de différents logiciels d'analyse des signaux, ont permis le développement du caryotype en multifuorescence. Deux procédés sont utilisés :

Le premier repose sur la numérisation successive par la caméra des différents signaux émis par les sondes hybridées. Souvent, la première image capturée est celle générée par le DAPI. La superposition de l'ensemble des signaux sur un écran d'ordinateurs permettra d'étudier précisément les loci correspondant aux sondes hybridées. En utilisant 23 sondes de peinture avec un logiciel ayant intégré les combinaisons des fluorochromes spécifiques de chaque paire chromosomiques, Speicher et al (1996) ont été capables d'établir un caryotype en multifuorescence en classant des chromosomes d'après leur fluorescence spécifique (4).

Le deuxième procédé repose sur l'analyse spectrale des signaux. C'est une méthode d'analyse des signaux plus complexe qui nécessite un interféromètre dont le rôle est de décomposer et d'analyser, en un seul temps, le contenu en longueurs d'onde d'une lumière complexe. Ce procédé fut décrit en 1996 par l'équipe de Schrock et al (5)

c) La limite de la technique de FISCH

La FISH avec des sondes spécifiques de loci est une technique d'étude ciblée, à la différence du caryotype qui permet d'explorer l'ensemble du génome. La FISH avec les sondes de peinture a une résolution de 1,5Mb pour la détection des translocations télomériques. En

cas d'insertion chromosomique, elles ne permettent pas de déterminer la région chromosomique impliquée. Enfin, elle ne sont pas d'une grande utilité pour la détection des duplications.

I.2 L'HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE SUR RÉSEAU D'ADN OU CGH ARRAY

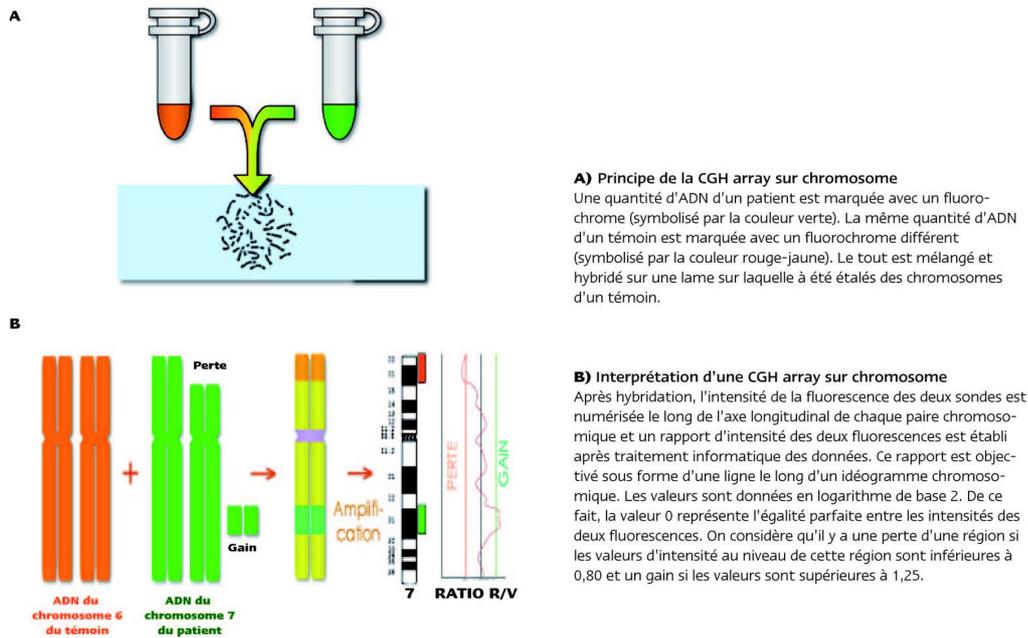
I.2.1 Un peu d'histoire

En 1992, l'équipe de Dan Pinkel mit au point une nouvelle technique de cytogénétique appelée hybridation génomique comparative (CGH) (6). Le principe est de comparer le nombre de molécules d'une même quantité d'ADN de deux individus en les marquant chacune par un fluorochrome différent puis en les hybridant ensemble sur des métaphases d'un témoin. Après l'étape d'hybridation, les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés et un rapport de leur intensité respective – patient sur témoin (reflétant le rapport du nombre de molécule d'ADN du patient par rapport à celle du témoin) - est établi au niveau des bandes de chacune des paires chromosomiques. Le ratio d'intensité des deux fluorochromes au niveau d'une bande aura une valeur théorique proche de 1 si le nombre de molécules des deux génomes est identique au niveau de la bande observée. En cas de délétion, ce rapport théorique sera de 0,5 et de 1,5 en cas de trisomie (**figure 5**). Une des limites de la CGH sur métaphases, est de ne détecter que des déséquilibres génomiques. Les anomalies chromosomiques équilibrées et les anomalies en faible mosaïque ne sont pas mis en évidence.

Ainsi, cette technique a permis de s'extraire de l'analyse morphologique des chromosomes d'un patient en analysant son contenu global en ADN. Mais la résolution de la CGH sur métaphases reste celle de la bande chromosomique (5–10 Mb), car le ratio d'intensité des fluorochromes est établi au niveau de chaque bande chromosomique.

Vers la fin des années 1990, Solinas-Toldo (7) et Pinkel et al. (8) proposent une autre technique de CGH sur des lames sur lesquelles sont fixés des fragments d'ADN. Il s'agit de la CGH sur réseau d'ADN ou CGH array !

Figure 5: Principe de la CGH sur chromosome



I.2.2 Principe

À la fin des années 90, ces auteurs démontrent qu'il est possible d'effectuer une CGH sur des fragments d'ADN fixés sur des lames de verre. Très rapidement, avec le séquençage du génome, il fut possible de fixer sur ces lames, des séquences génomiques, appelées « sondes », représentant une partie plus ou moins importante du génome. Ces lames furent appelées « puce à ADN » ou *microarray*. Comme pour la CGH sur métaphases, une même quantité d'ADN témoin et d'ADN patient marquée par deux fluorochromes différents (ce mélange est appelé « cible ») sont déposées sur la lame. Le rapport d'intensité de fluorescence est calculé au niveau de chaque fragment d'ADN fixé (appelé « sonde »). Un traitement statistique des données est ensuite réalisé grâce à des logiciels dédiés. Les résultats sont donnés sous forme graphique où un « point » correspond à la valeur du ratio d'intensité de fluorescence au niveau d'une sonde (**figure 6**). L'ensemble des « points » est placé sur un idéogramme pour chaque chromosome. À la différence de la CGH sur métaphases, l'existence d'un déséquilibre génomique sera objectivée par une déviation du ratio d'intensité de fluorescence non plus au niveau d'une bande chromosomique, mais au niveau des sondes fixées sur la lame. De leur nombre et de leur localisation sur le génome dépendra la résolution de la puce utilisée.

Les premières « puces pangénomiques » (représentant l'ensemble du génome), furent construites avec 3000 clones dont la localisation correspondait à des loci espacés toutes les mégabases. Le génome étant d'une taille de 3 milliards de paires de base, ces puces avait une résolution moyenne d'une mégabase, soit 5 fois celle d'un caryotype en haute résolution. Ishkanian et al. (9) en utilisant 32 433 BACs chevauchants sur tout le génome ont

pu obtenir une puce avec une résolution de l'ordre de 30 kb.

Depuis le milieu des années 2000, les puces à oligonucléotides firent leur apparition. Il s'agit de lames sur lesquelles sont fixés des oligonucléotides d'environ 60-80 bases (ou « mer ») qui peuvent être déposés ou directement synthétisés dessus. Le nombre d'oligonucléotides peut atteindre plusieurs millions ce qui permet d'obtenir une résolution d'environ mille paires de base. Ces lames sont aujourd'hui commercialisées par de nombreuses compagnies.

La CGH array permet la détection de déséquilibres chromosomiques dont la taille varie avec la résolution de la puce utilisée. Parce que la CGH est une comparaison de nombre de molécules d'ADN d'un individu par rapport à un autre, un déséquilibre génomique de plus de 1 kb détecté par cette technique a été appelé CNV pour « *Copy Number Variant* » ou en français « Variation de Nombre de Copies ».

I.2.3 Une variante : les puces à SNPs (figure 7)

Il est possible de fixer sur les lames, des oligonucléotides contenant des « *Single Nucleotide Polymorphisms* » ou SNPs. Ce sont des variations portant sur une seule paire de base, et distribuées uniformément dans le génome humain. On estime le nombre de SNPs à plus de 10 millions avec une répartition d'un SNP tous les 100 à 1000 paires de bases (1kb). La carte des SNPs étant établie, différents procédés ont été mis au point pour synthétiser des oligonucléotides contenant pour un locus donné les 2 allèles du SNP. L'avantage de l'utilisation de ces puces dites puces à SNPs est de pouvoir détecter les situations d'isodisomies uniparentales (perte d'hétérozygotie) et de déterminer l'origine parentale d'un remaniement (avec l'étude des parents). Pour la plupart des sondes, l'hybridation s'effectuera sur les deux allèles. En cas de perte d'hétérozygotie, un seul allèle sera détecté. Celle-ci aura une signification lorsqu'elle impliquera plusieurs sondes adjacentes.

Ces puces ont initialement été développées à des fins d'haplotypage et d'analyse de liaison. Cependant, elles donnent également une information sur le nombre de copies d'ADN aux loci étudiés.

Ces deux techniques sont aujourd'hui totalement automatisables et permettent de ce fait l'étude des déséquilibres génomiques à haut débit. L'acronyme ACPA qui signifie « Analyse Chromosomique sur Puces à ADN » (acronyme choisi par le réseau français AChro-Puce, (<http://www.renapa.univ-montp1.fr>) désigne aussi bien la technique de CGH array que celle des puces à SNPs.

II CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE, APPLICATIONS CLINIQUES

II.1 LA FISH

Le caryotype est resté pendant plus de 50 ans le seul examen d'étude globale du génome. Il a été déterminant pour le diagnostic et la prise en charge de nombreuses pathologies constitutionnelles et acquises, notamment dans les hémopathies malignes (nosologie et choix thérapeutique). Ses principales limites sont sa résolution (au maximum 5 millions de paires de bases, 5Mb), la difficulté de caractériser certaines anomalies (les bandes noires, grises ou blanches de différents chromosomes se ressemblent respectivement), la nécessité d'obtenir des mitoses et l'impossibilité d'établir un rapport phénotype - génotype précis c'est-à-dire au niveau moléculaire. L'utilisation de la FISH sur des métaphases et sur des noyaux a permis de dépasser certaines de ces limites.

II.1.1 La FISH sur métaphase : un complément du caryotype

II.1.1.1 Le Diagnostic cytogénétique des syndromes microdélétionnels

Les syndromes microdélétionnels sont liés à des pertes de fragments chromosomiques d'une taille en général comprise entre 500 000 paires de bases (500kb) et 4 000 000 de paires de bases (4 Mb), non décelables dans l'immense majorité d'entre eux par les techniques de bandes. La cause chromosomique de la plupart de ces syndromes individualisés cliniquement dans les années 1960, n'a pu être identifiée que grâce à la découverte de translocations ou autres remaniements visibles sur le caryotype standard permettant de cibler une région précise¹ (*cf.note : Note*). Avec des sondes des régions impliquées utilisées en FISH, il est possible de les diagnostiquer si le tableau clinique est évocateur.

L'exemple le plus connu est celui du syndrome de DiGeorge/vélo-cardio-facial (DGS/VCF) (**figure 6a**), correspondant à une délétion d'environ 3 Mb dans la sous-bande 22q11.2 (ou plus rarement à des plus petites délétions de 1.5 Mb). Il existe aujourd'hui une cinquantaine de syndromes microdélétionnels (10). Cependant, la variabilité phénotypique et l'absence de spécificité clinique de certains de ces syndromes sont à l'origine d'une valeur prédictive positive faible des examens de FISH ciblés. À titre d'exemple, dans notre expérience, seulement 7% des études FISH réalisés pour rechercher une délétion 22q11.2 sont positives et 0,5% pour la délétion 22q13 (qui est associée au syndrome de Phelan-MacDermid). En revanche, la recherche par FISH de la délétion 7q11.23 associée au syndrome de Williams est positive dans 50% des cas en raison de signes cliniques très évocateurs dans cette pathologie.

II.1.1.2 Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes

La majorité des anomalies chromosomiques de structure impliquées dans la pathogénèse des leucémies et des lymphomes sont clonales, récurrentes, non aléatoires et souvent spécifiques d'un type d'hémopathies malignes. Il s'agit souvent de translocations équilibrées qui entraînent une recombinaison de deux gènes au point de cassure. Il y a donc formation d'un « gène de fusion » codant une protéine chimérique à l'origine de la prolifération maligne. Le diagnostic par FISH de ces remaniements géniques est réalisé par l'utilisation de sondes spécifiques du locus ou des gènes impliqués. C'est par exemple le cas des remaniements du gène MLL, gène remanié avec plus de 70 partenaires, localisé en 11q23, qui sont facilement détectés par l'utilisation d'une sonde comme l'indique la **figure 6b**.

II.1.1.3 Caractérisation d'anomalies chromosomiques détectées par caryotype

Une autre application majeure de la technique de FISH est la caractérisation d'une anomalie chromosomique décelée sur le caryotype. Parfois, l'observation des bandes chromosomiques ne permet pas d'interpréter certains remaniements qu'ils soient complexes ou non. Par exemple, l'origine de petits marqueurs surnuméraires non identifiables par les méthodes classiques peut se faire à l'aide de sondes centromériques. Les sondes de peinture qui marquent la totalité d'un chromosome sont également très utiles pour caractériser ces marqueurs ou d'autres types de remaniements complexes. Dans ces situations, les techniques de multifuorescence (SKY ou M-FISH) sont particulièrement indiquées (**figure 6c**).

II.1.1.4 Détection de translocations télomériques cryptiques équilibrées

Certaines translocations ne sont pas détectables par les techniques de bandes. C'est le cas lorsque les anomalies sont de petites tailles ou lorsque les segments échangés sont de même taille et même aspect. Les chromosomes dérivés ressemblent alors à ceux qui ne sont pas remaniés. Dans ces situations, la FISH sur métaphase avec des sondes de peinture ou des sondes télomériques peut être d'un grand intérêt. C'est fut le cas lors de la découverte de la translocation la plus fréquente associée aux leucémies aiguës lymphoblastique de la lignée B de l'enfant : la $t(12.21)(p13;q21)$ (2)

II.1.2 La FISH interphasique

La FISH interphasique est une technique qui s'est rapidement imposée car elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. En effet, les signaux d'hybridation générés par les sondes d'une taille de plus de 150 kb sont visibles sur les noyaux. Un plus grand nombre de cellules (les noyaux sont 10 à 50 fois plus nombreux que les métaphases sur une préparation

de cellules cultivées) peuvent être ainsi étudiées. Ses applications concernent la détection d'anomalies chromosomiques associées à des pathologies constitutionnelles ou acquises. Parmi les principales applications, on peut citer le diagnostic prénatal des principales aneuploïdies, le diagnostic pré-implantatoire et celui des anomalies chromosomiques associées aux cancers.

II.1.2.1 Le diagnostic anténatal des anomalies chromosomiques

L'une des applications les plus connues de la FISH interphasique est le diagnostic des trisomies 13, 18 et 21 sur amniocytes non cultivées mise au point dès les années 1994 (11). À partir de cellules obtenues par ponction de liquide amniotique, l'hybridation de sondes spécifiques de loci des chromosomes 13, 18 et 21 permet en 24 heures, sans attendre 10 à 15 jours de culture, la détection d'une aneuploïdie impliquant ces 3 chromosomes (**figure 7a**).

II.1.2.2 Le Diagnostic pré-implantatoire des anomalies chromosomiques (DPI)

L'une des applications les plus spectaculaires de la FISH est certainement le diagnostic pré-implantatoire des anomalies chromosomiques (12). La situation la plus fréquente est celle où l'un des parents est porteur d'une translocation équilibrée (cela concerne 1 couple sur 300). La ségrégation méiotique peut générer des gamètes déséquilibrés à l'origine de trisomies ou de monosomies partielles conduisant, selon l'importance du déséquilibre génomique, à des fausses couches spontanées, des morts fœtales *in utero* ou des enfants présentant une DI et/ou des MC. Après fécondation *in vitro*, il est possible de prélever des blastomères d'une morula non compactée et de détecter par FISH les embryons porteurs d'un déséquilibre génomique. Pour cela, on utilise 3 sondes télomériques, dont deux spécifiques des télomères des segments chromosomiques transloqués. Comme le montre la **figure 7b**, l'étude du nombre de signaux après hybridation de ces sondes sur les deux blastocystes prélevés permet de repérer les embryons sans déséquilibre chromosomique.

II.1.2.3 La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans hémopathies malignes

L'une des difficultés de l'étude chromosomique dans les hémopathies malignes est l'existence de mosaïcismes et de chromosomes très remaniés, peu reconnaissables. De plus, il peut être difficile dans certains types de cancers, d'obtenir un nombre de mitoses suffisant issues des cellules cancéreuses pour établir avec certitude un diagnostic. L'utilisation de la FISH en interphase est le moyen le plus facile dans ces situations pour détecter les anomalies chromosomiques spécifiques dont dépendent le diagnostic et le pronostic de l'hémopathie étudiée. Les remaniements du gène MLL dans les leucémies aiguës (voir paragraphe iii) peuvent facilement être recherchés sur noyaux en interphase comme le montre la **figure 6b**. Il existe des pathologies, dans lesquelles certaines équipes ne pratiquent que la FISH interphasique comme examen des chromosomes. C'est le cas des leucémies

lymphoïdes chroniques pour lesquelles elles ne recherchent par FISH interphasique que les délétions des gènes P53, et *ATM* et du locus 13q14 ainsi que la trisomie 12, anomalies dont dépend le pronostic.

II.1.2.4 Le diagnostic des anomalies chromosomiques sur coupes tissulaires

Il est possible d'hybrider des sondes sur des coupes fines de tissus fixés par de la paraffine et sur des cellules obtenues par apposition de coupes de tissus congelés. Ces techniques de FISH sont d'une très grande utilité en fœtopathologie ou en pathologie cancéreuse, lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir du tissu vivant ou des cultures du tissu concerné. La **figure 7c** montre la détection d'un remaniement du gène *cMYC* sur des coupes de ganglions d'un patient atteint d'un syndrome de Burkitt.

En résumé, la FISH sur métaphase est devenu le complément indispensable du caryotype. Sur noyau interphasique, elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire. Cependant, elle reste un examen ciblé du génome qui nécessite de connaître l'anomalie à rechercher.

II.2 LA CGH ARRAY

II.2.1 La CGH array, technique de recherche clinique en pathologie acquise

Les anomalies chromosomiques impliqués dans le diagnostic et le pronostic des cancers sont souvent équilibrés. Dans les hémopathies malignes, près de 400 anomalies chromosomiques récurrentes et équilibrées ont été rapportées. Pour ces raisons (anomalies équilibrées, mosaïcisme et anomalies ciblées), la CGH *array* n'est pas, en 2012, un examen de première intention pour le diagnostic cytogénétique de ces pathologies. Néanmoins, en recherche, elle a permis l'identification de nouveaux oncogènes grâce à la détection de déséquilibres chromosomiques récurrents. L'une des découvertes majeure fut la mise en évidence de délétions du gène *IKAROS* à l'origine de l'acutisation des leucémies myéloïdes chroniques (13)

II.2.2 La CGH array : technique de référence pour l'étude des anomalies chromosomiques dans les pathologies constitutionnelles.

À l'inverse des pathologies acquises, la CGH est aujourd'hui l'examen de choix pour l'étude en routine des pathologies associées aux anomalies chromosomiques constitutionnelles. En effet, outre de très rares anomalies de structures équilibrées *de novo* (inversions ou translocations), ce sont les déséquilibres génomiques (gains ou pertes de matériel chromosomique) qui sont les principales causes chromosomiques de DI et/ou MC.

La CGH *array*, permet non seulement de détecter les anomalies chromosomiques

déséquilibrées détectées par le caryotype (taille supérieure à 5 et 10 Mb) mais aussi celles qui sont cryptiques. Aujourd'hui, c'est une technique fiable, reproductible et automatisable.

Tous ces éléments font qu'elle doit remplacer le caryotype dans les laboratoires de cytogénétique pour l'exploration des patients avec une DI et/ou MC.

II.2.2.1 Les indications de la CGH array

Chez les patients présentant une DI et/ou MC, la CGH *array* détecte 10 à 15% d'anomalies en plus de celles décelées par le caryotype (14). La plupart correspondent à des anomalies dispersées dans le génome et peu d'entre elles sont récurrentes. Les CNVs détectés sont en général associés à un phénotype d'autant plus sévère que la taille du déséquilibre chromosomique est grande et comprend de nombreux gènes. Le plus souvent, les CNV associés à une DI et/ou MC correspondent à des délétions (70% des cas). Par ailleurs, l'utilisation de la CGH *array* a révélé des déséquilibres génomiques associés à des pathologies psychiatriques et neurologiques. Par exemple, des délétions de 300 kb à 1Mb comprenant le locus du gène *CHRNA7*, localisé en 15q13, peuvent être associées à des épilepsies isolées (**figure 9**).

Dans ces pathologies, il existe une très grande variabilité phénotypique intra et inter familiale et une pénétrance incomplète. C'est ainsi que les délétions du gène *CHRNA7*, peuvent être responsables hormis l'épilepsie, de troubles psychiatriques (autisme, schizophrénie, troubles bipolaires), ou de déficience intellectuelle (15). Par ailleurs, des délétions en 16p11.2 d'une taille de 200 kb sont associées à une obésité alors que des duplications de cette même région sont associées à des retards de croissance et à des formes d'anorexie car elles impliquent le gène *SHB2* qui joue un rôle clé dans le contrôle cérébral des signaux qui régissent le stockage des graisses, l'utilisation de sucre, le bilan énergétique et le poids (16) (17). Ainsi, le champ de pathologies associées aux CNVs devient de plus en plus large.

Les indications de la CGH *array* dépassent donc largement aujourd'hui celles du caryotype. Elles concernent en plus des patients présentant une DI et/ou MC, ceux ayant des troubles neuropsychiatriques mais aussi dans certains cas, des anomalies cardiaques, rénales, squelettiques ou autres isolées.

II.2.2.2 Comment interpréter une CGH array ?

La signification d'un CNV identifié dans la pathogénèse du phénotype observé peut parfois être très difficile à établir. Certains CNVs sont clairement pathogènes mais parfois avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable alors que d'autres posent des problèmes d'interprétation. D'autres encore sont considérés comme bénins.

II.2.2.2.1 Classification des CNVs (19) (20)

- **Les CNVs bénins**

Jusqu'à récemment, il était communément admis que l'ADN entre deux individus était identique à 99,9%. Seules les variations « qualitatives » de l'ADN liées à des modifications de bases nucléotidiques étaient alors connues. L'étude génomique de témoins par CGH *array* a mis en évidence l'existence de CNVs considérés comme bénins (18). L'étude de ces CNVs a montré qu'il s'agissait le plus souvent de répétitions en tandem de cassettes d'ADN de taille variable (la plupart d'entre elles ont une taille inférieure à 100kb) pouvant comprendre des séquences codantes et non codantes. Le nombre de répétition de ces cassettes (de 0 à plus de 20) varie d'un individu à l'autre et définit les allèles du CNV qui se transmettent de manière mendélienne. Lorsque ces CNVs sont retrouvées chez plus de 1% de la population, on parle de polymorphismes ou Copy Number Polymorphisms ou CNPs. S'ils sont présents dans moins de 1% de la population, on parle de « variants bénins privés ». La majorité de ces CNPs sont sans conséquence phénotypique actuellement décelée alors que d'autres sont associés à des maladies multifactorielles fréquentes (comme le lupus) ou sont le témoin de l'adaptation humaine à l'environnement (21) (22).

- **Les CNV pathogènes**

D'autres CNV sont clairement associés à un phénotype anormal. Ce sont souvent des CNV d'une taille supérieure à 400 kb. Dans les grandes séries de patients avec DI et/ou MC testés par CGH *array*, des CNVs pathogènes cryptiques sont retrouvés dans environ 10 à 15% des cas. Classiquement, ils surviennent *de novo*, correspondent à des délétions (70% des cas) et sont plutôt de grande taille (en moyenne de 2,8 Mb). On admet qu'à partir de 1,5Mb, un CNV est quasiment toujours associés à la pathologie observée (10).

- **Les CNV pathogènes avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable**

Certains CNV identifiés chez des patients avec un phénotype anormal sont nécessaires à la survenue de la pathologie mais ils ne sont pas suffisants en raison de leur présence chez un des deux parents sains ou des individus normaux. Ces CNV rares confèrent un risque plus ou moins important de développer la pathologie. Un exemple éloquent où il a été mis en évidence un CNV rare avec une pénétrance incomplète correspond au syndrome TAR (Thrombopénie et Absence de Radius). Cette pathologie associe une thrombopénie centrale et une absence bilatérale de radius. On note une grande variabilité phénotypique incluant, à des degrés divers, des anomalies cardiaques, gastro-intestinales, squelettiques et hématologiques. Par une approche CGH *array* Klopocki E and al. (23) ont mis en évidence une délétion 1q21 d'environ 200 kb chez tous les patients présentant un syndrome TAR. Cette délétion n'a pas été retrouvée chez 700 individus contrôles et n'est pas répertoriée dans la Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>). Cependant, environ 75% des parents sont porteurs de l'anomalie sans être atteints. Des facteurs

génétiques ainsi que des facteurs épigénétiques et environnementaux peuvent modifier la pénétrance et l'expressivité d'une pathologie génétique. Dans le syndrome TAR, la présence d'un ou de plusieurs gène(s) modificateur(s) pourrait expliquer la pénétrance incomplète et l'expressivité variable de la maladie. Une meilleure compréhension des interactions entre ces différents facteurs permettrait d'établir des corrélations génotype-phénotype et ainsi de proposer un conseil génétique plus précis.

- **Les CNV dont la signification clinique est incertaine**

Environ 10% des CNV soulèvent des difficultés d'interprétation. Ils correspondent le plus souvent à des duplications (70% des cas) d'une taille d'environ 700kb et héritées de l'un des deux parents sains ou retrouvés dans des populations témoins (10).

Plusieurs éléments sont à considérer pour déterminer si le CNV identifié est délétère ou non. Miller et al. (24) ont ainsi proposé une table avec différents critères d'évaluation des CNV pour aider à l'interprétation des résultats. Les arguments majeurs pour affirmer qu'un CNV est pathogène sont : son caractère de novo, sa taille supérieure à 400 kb, son contenu riche en gènes et l'existence d'autres patients avec le même CNV dont le phénotype est anormal (il peut s'agir de syndromes connus ou non). A l'inverse, un CNV hérité d'un parent sain, décrit chez des individus normaux dans les bases de données, pauvre en gènes et de petite taille est très souvent bénin.

En routine, pour éviter de détecter des CNV bénins et de signification incertaine, il est préconisé de fixer le seuil de détection d'une anomalie à 400 kb pour le diagnostic des microremaniements chez les patients avec DI et/ou MC (24).

Du fait de la difficulté d'interprétation de certains CNVs ou de la possible détection d'un CNV ayant un impact médical sans lien avec l'indication initiale, il est important qu'une information claire doit être fournie aux parents. Le recueil d'un consentement spécifique en vue de la réalisation de cette analyse est nécessaire.

II.2.2.2.2 *Nécessité de vérifier et de caractériser l'anomalie chez le proposant et chez les parents*

Il est toujours nécessaire de vérifier par une autre technique un CNV mis en évidence par CGH array. Il convient en effet d'exclure un faux positif (ce qui est aujourd'hui rare avec les puces à oligonucléotides) mais surtout de déterminer le mécanisme chromosomique sous-jacent du remaniement. Par exemple, un gain de matériel chromosomique peut être le résultat de la présence d'une duplication « *in situ* », d'un dérivé d'une insertion ou d'un marqueur chromosomique (**figure 8**). On peut utiliser des techniques de biologie moléculaire (qPCR, QMPSF..., en particulier lorsqu'il s'agit d'une duplication de petite taille) mais la technique de référence reste la FISH sur chromosome car, réalisée sur le

proposant et ses parents, elle renseigne sur le mécanisme chromosomique à l'origine du CNV et sont caractère *de novo* ou non.

II.2.2.2.3 Utilisation des bases de données de variants de structure du génome

Pour aider à l'interprétation des résultats, il existe différentes bases de données. La Database of Genomic Variant (<http://projects.tcag.ca/variation>), répertorie les CNV bénins identifiés chez des témoins. Les bases de données DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk>) et ECARUCA (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca>) colligent les CNV retrouvées chez des patients avec DI et/ou MC. Les informations fournies sont précieuses car elles aident le cytogénéticien dans l'établissement du rapport phénotype - génotype.

II.2.3 CGH array et recherche clinique en pathologie constitutionnelle

Du fait de la connaissance du contenu en gènes du segment remanié, le cytogénéticien peut rechercher le(s) gène(s) potentiellement impliqué(s) dans le phénotype. Par ailleurs, la comparaison d'anomalies chevauchantes chez plusieurs patients permet d'identifier des régions et/ou des gènes contribuant à un signe clinique spécifique voir à l'ensemble des symptômes du syndrome. Par exemple, l'étude par CGH *array* de patients porteurs de délétions chevauchantes de la région 5q14.3q15 a permis l'identification du gène majeur (MEF2C) responsable du phénotype cognitif. En effet, des mutations dans ce gène ont été mises en évidence chez des patients avec une déficience intellectuelle sévère (25).

La recherche systématique d'anomalies chromosomiques cryptiques chez les patients présentant une DI et/ou MC a été à l'origine, par l'analyse rétrospective des patients, de la description de nouveaux syndromes associés à des microdélétions ou microduplications. Classiquement, les syndromes ont été initialement décrits cliniquement et les bases génétiques n'ont été découvertes que secondairement. La CGH *array* permet un processus inverse où l'indentification de l'anomalie chromosomique précède la description phénotypique. Ainsi, la CGH *array* permet d'aller du génotype au phénotype. De nombreux syndromes ont été ainsi décrits cliniquement comme la délétion 17q21.31 (26).

II.2.4 Limites de la CGH array

Contrairement au caryotype la CGH *array* ne détecte pas les anomalies chromosomiques équilibrées. Une étude récente a montré qu'une translocation ou inversion *de novo* équilibrée ne serait pas détectée dans environ 0.23% des cas (27). Les anomalies équilibrées sont le plus souvent retrouvées chez des individus sains. Leur découverte se fait dans le cadre d'un bilan de fausses couches à répétition (liées à la transmission du remaniement sous forme déséquilibrée à la descendance), d'hypofertilité ou de manière fortuite. Le caryotype conserve donc sa place dans ces indications. Dans les rares cas où un remaniement équilibré

de novo est retrouvé chez un patient avec une DI et/ou des MC, il est très difficile d'affirmer qu'il est à l'origine des signes cliniques observés. Enfin, la CGH *array* ne détecte pas les remaniements déséquilibrés présents en mosaïque dans moins de 10-20% des cellules, ce qui peut être le cas pour les marqueurs chromosomiques.

NOTE(S) DU CHAPITRE

Note : La récurrence de certains de ces remaniements est liée à l'architecture du génome car ils sont médiés par des structures génomiques appelées duplicons ou LCRs (Low copy repeats). Ces répétitions segmentaires correspondent à des séquences d'ADN de 10 kb à 400 kb de longueur, présentes en plusieurs copies dans le génome, espacées de 500 kb à 4 Mb et ayant une grande homologie de séquence (95-99%). Elles sont particulièrement présentes dans les régions centromériques et télomériques. Lors de la méiose, la grande homologie de séquence de ces blocs d'ADN favorise les recombinaisons homologues non-alléliques (NAHR). Ainsi, la région comprise entre deux duplicons de même orientation sera délétée ou dupliquée suite à cette recombinaison illégitime. Lorsque ce mécanisme est à l'origine d'un déséquilibre chromosomique, la taille du segment remanié est toujours identique entre les patients et les points de cassure se situent dans les duplicons. Ces remaniements sont appelés « désordre génomique », terme introduit par Lupski en 1998 pour désigner les pathologies qui résultent de ce mécanisme par opposition aux mutations géniques. Actuellement, le terme de « désordre génomique » s'applique aussi à des pathologies associées à des délétions chromosomiques qui ne répondent pas au mécanisme de NAHR.

III LA NOUVELLE CYTOGÉNÉTIQUE

L'émergence de la CGH *array* a bouleversé la cytogénétique médicale. Pendant plus de 40 ans, le diagnostic cytogénétique a reposé sur l'analyse morphologique des chromosomes ou des signaux fluorescents d'hybridation *in situ* sur des métaphases ou des noyaux interphasiques. Aujourd'hui, l'analyse du génome par CGH *array* s'effectue à partir de l'ADN de milliers de ? cellules d'un individu. Technique complémentaire du caryotype en bandes durant 25 ans, la cytogénétique moléculaire s'affirme aujourd'hui comme l'élément central de l'activité des laboratoires de cytogénétique. Il s'agit d'une véritable rupture culturelle, scientifique et pratique qui s'amplifiera avec l'arrivée, dans les toutes prochaines années, des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS). Cela entraîne des changements radicaux dans l'organisation des laboratoires de cytogénétique ainsi que dans leur rapport avec les laboratoires de génétique moléculaire. De plus, cette nouvelle approche implique l'acquisition d'autres compétences techniques et médicales.

Aujourd'hui, l'activité principale du cytogénéticien, n'est plus l'étude de la morphologie des chromosomes. Il consacre l'essentiel de son temps à l'établissement d'un rapport phénotype-génotype au niveau moléculaire c'est à dire à déterminer si le CNV détecté est à l'origine du phénotype observé. La généralisation de la technique de CGH *array* au sein des

laboratoires a augmenté considérablement les données sur les CNV identifiés. Au fil des années, une cartographie précise des phénotypes liés aux anomalies de régions du génome sera établie. Partant de toutes ces données pour déterminer le lien entre le CNV et le phénotype, le cytogénéticien devient un « interniste du génome ».

Enfin, l'automatisation de la CGH *array* et l'arrivée du séquençage haut débit ouvrent la voie de l'étude des anomalies de structure du génome à haut débit. Cela nécessite une concentration des moyens technologiques d'autant qu'il est nécessaire de disposer d'une banque de sondes couvrant l'ensemble du génome pour la vérification et la caractérisation des anomalies par FISH. Cela suppose une organisation nationale de l'activité de cytogénétique avec l'existence de quelques plate-formes nationales en relation étroite avec les différents centres hospitaliers.

IV ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. : Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Nov;78(11):6633-7.
- (10) Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. : A copy number variation morbidity map of developmental delay. Nat Genet 2011; 43:838-46.
- (11) Romana SP, Tachdjian G, Druart L, et al. : A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. Eur J Hum Genet. 1993;1(3):245-51.
- (12) Penketh RJ, Delhanty JD, van den Berghe JA et al. : Rapid sexing of human embryos by non-radioactive in situ hybridization: potential for preimplantation diagnosis of X-linked disorders. Prenat Diagn. 1989 Jul;9(7):489-99.
- (13) Charles G. Mullighan, M.D. et al. : Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2009 January 29; 360(5): 470-480.
- (14) Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. : Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 2010; 86:749-64.
- (15) Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C et al. : A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. Nat Genet. 2008 Mar;40(3):322-8.

- (16) Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A et al. : A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463, 671-675 (2010).
- (17) Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F et al. : Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature*. 2011 Aug 31;478(7367):97-102
- (18) Redon R, Ishikawa S, Fitch KR et al. : Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444:444-54
- (19) Perry G, Dominy N, Claw K et al. : Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet*. 2007 October ; 39(10): 1256-1260.
- (2) Romana SP, Le Coniat M, Berger R. : t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Mar;9(3):186-91.
- (20) Mamtani M, Anaya J-M, He W and SK Ahuja. : Association of copy number variation in the FCGR3B gene with risk of autoimmune diseases. *Genes and Immunity* (2010) 11, 155-160
- (21) Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR : Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:451-81
- (22) Sudmant P, Kitzman, J, Antonacci, F et al. : Diversity of Human Copy Number Variation and Multicopy Genes. *Science* 2010; 330 : 641 - 646
- (23) Klopocki E, Schulze H, Strauss G, et al. : Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; 80:232-40.
- (24) Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. : Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86:749-64
- (25) Mikhail FM, Lose EJ, Robin NH et al. : Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *Am J Med Genet A*. 2011 Oct;155A(10):2386-96.
- (26) Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, et al. : A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 2006; 38:999-1001
- (27) Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, et al. : Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet*. 2009; 52:161-9

- (3) Landegent JE, Jansen in de Wal N et al. : Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization.. Hum Genet. 1987 Dec;77(4):366-70.
- (4) Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. : Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet. 1996 Apr;12(4):368-75.
- (5) Schröck E, du Manoir S, Veldman T et al : Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.
- (6) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. : Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
- (7) Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S et al. : Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer. 1997 Dec;20(4):399-407.
- (8) Pinkel D, Se Graves R, Sudar D et al. : High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998 Oct;20(2):207-11.
- (9) Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK et al. : A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. Nat Genet. 2004 Mar;36(3):299-303. Epub 2004 Feb 15.