

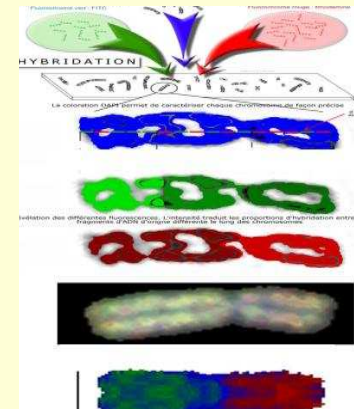
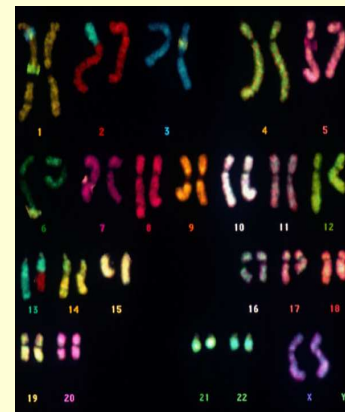
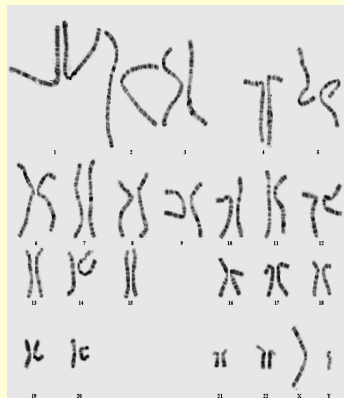


La CGH-array : une nouvelle technique de diagnostic en cytogénétique

Olivier Pichon (Ingénieur)

Laboratoire de cytogénétique de Nantes, Service de Génétique Médicale

Les techniques classiques de cytogénétique

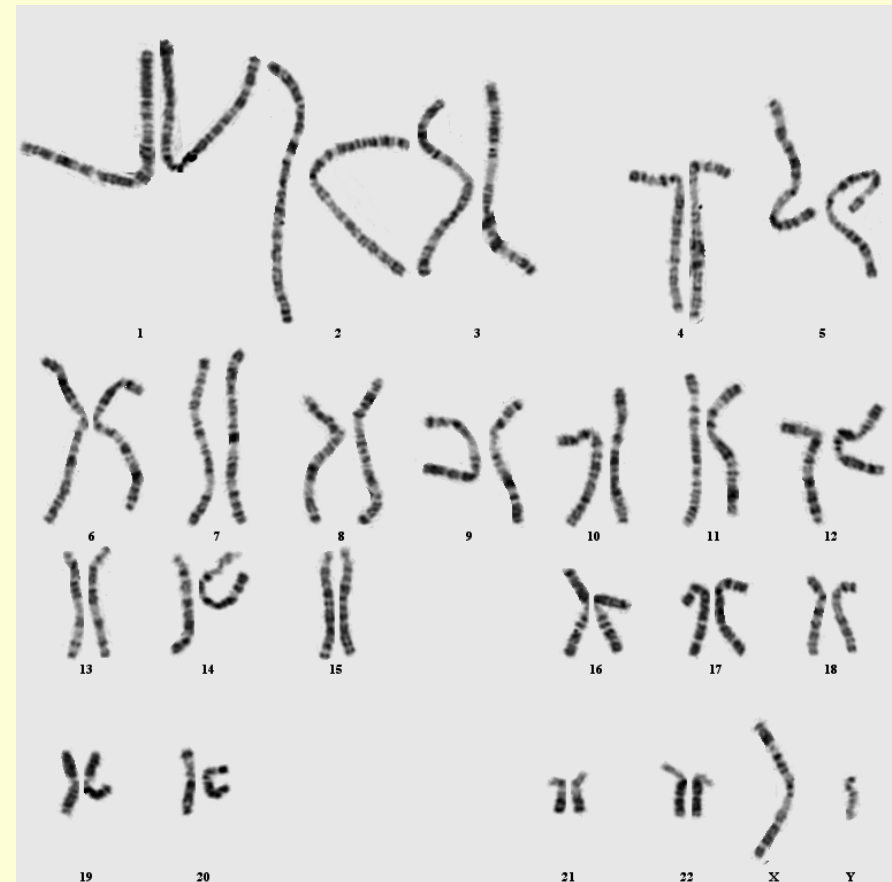


Le caryotype

Détection d'anomalies chromosomiques:

- Délétion
- Duplication
- Translocation et anneau

Mais la **résolution est faible** ($\sim 5\text{Mb}$)



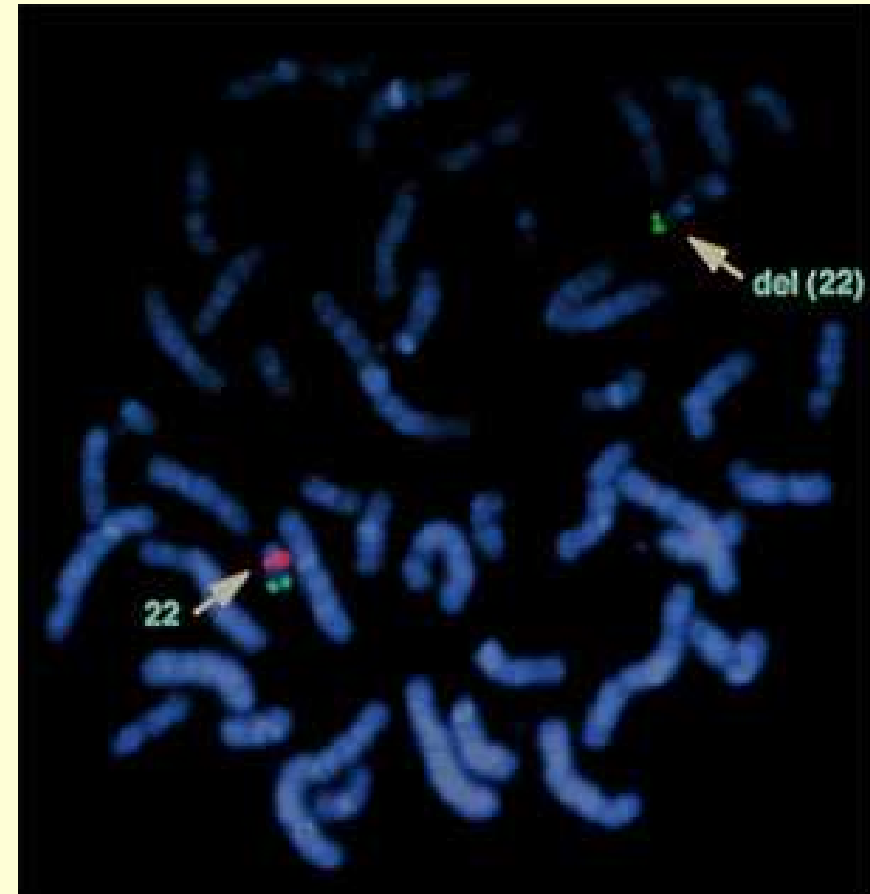
FISH (Hybridation en Fluorescence In Situ)

La suspicion clinique d'un syndrome va indiquer le choix de la sonde à hybrider (ex: Del 22q11.2).

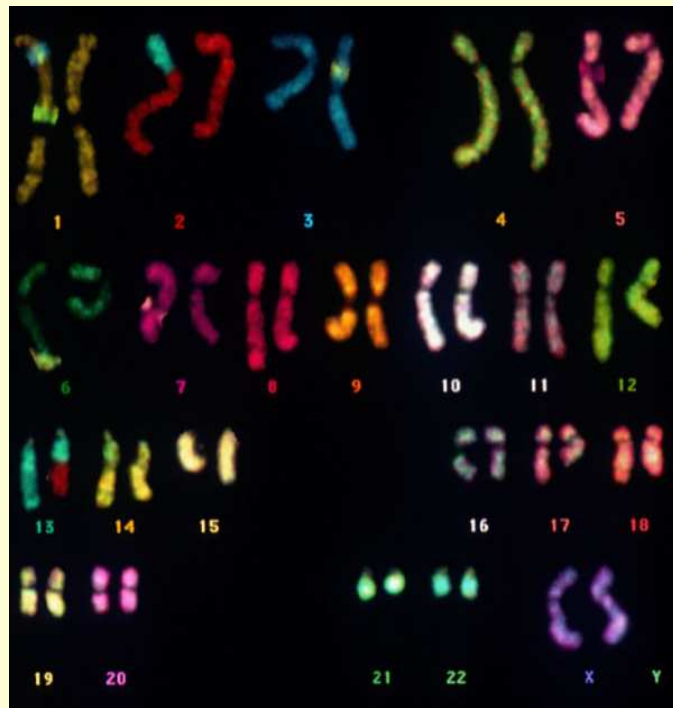
Détection d'anomalies chromosomiques:

- Délétion
- Duplication
- Translocation
- Bonne Résolution

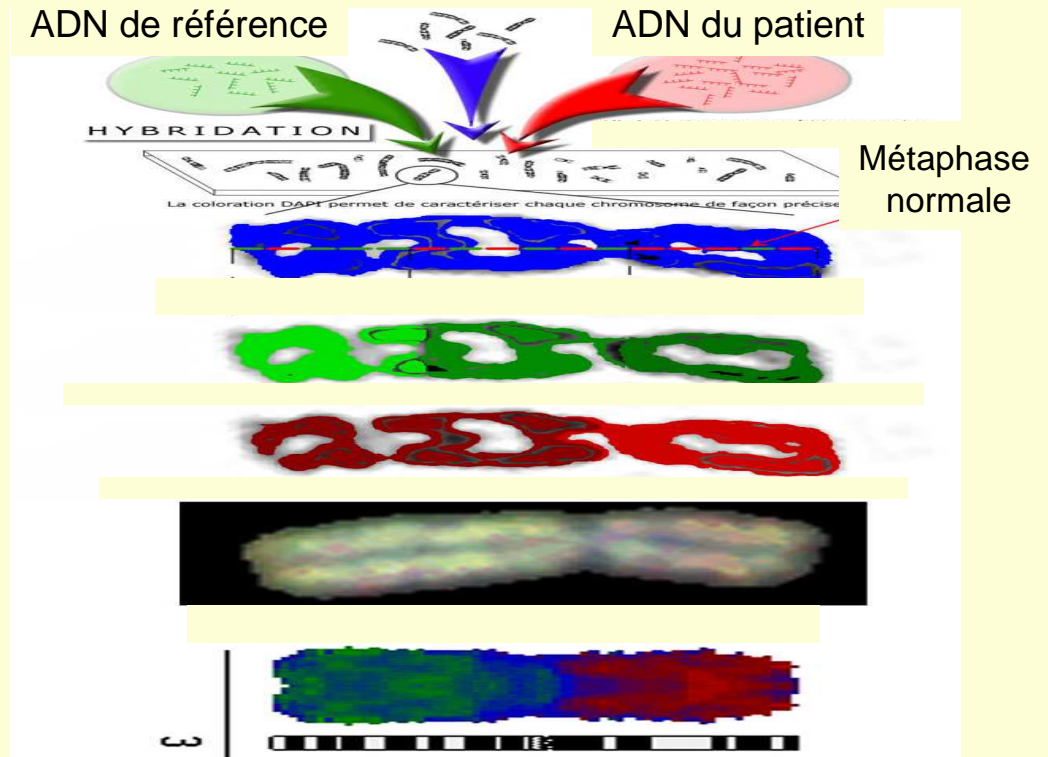
Mais il faut **choisir la sonde :**
Technique ciblée



Chromosome Painting CGH sur métaphase (Hybridation Génomique Comparative)



Information sur les chromosomes intéressés par un remaniement



Résolution faible (8-10Mb)

Puce à ADN et CGH array



Technologies de fabrication des puces à ADN

Microarray : support en verre sur lequel sont déposées ou synthétisées *in situ* des molécules (ADN, Protéines, lipides ...)

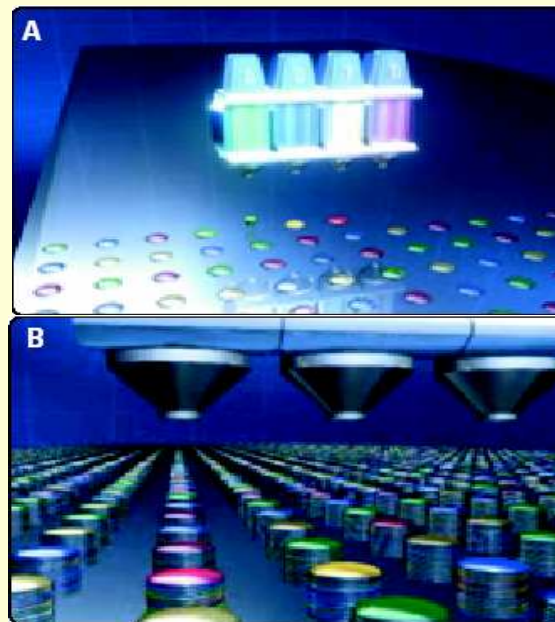
Dépôt (= Spotting)
de produits de PCR
BAC/PAC



<2000 spots/cm²

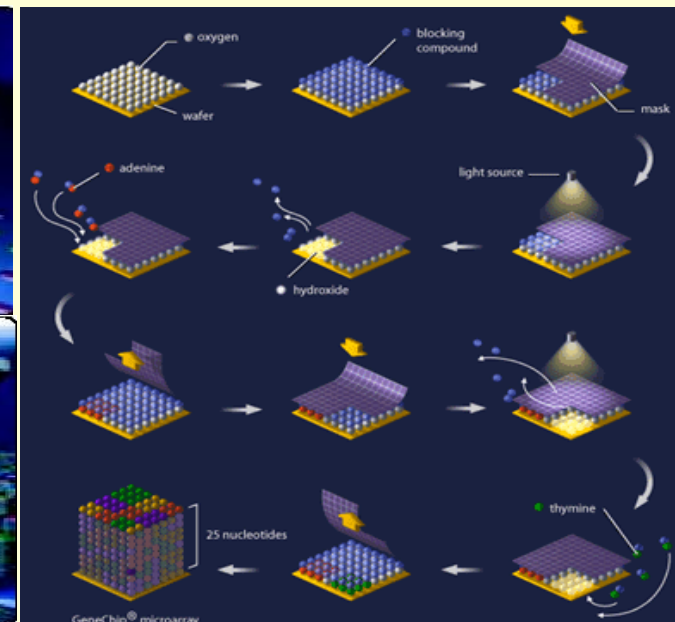
Synthèse in situ (Oligomères de 20 à 60 nucléotides)

Jet d'encre (Agilent)



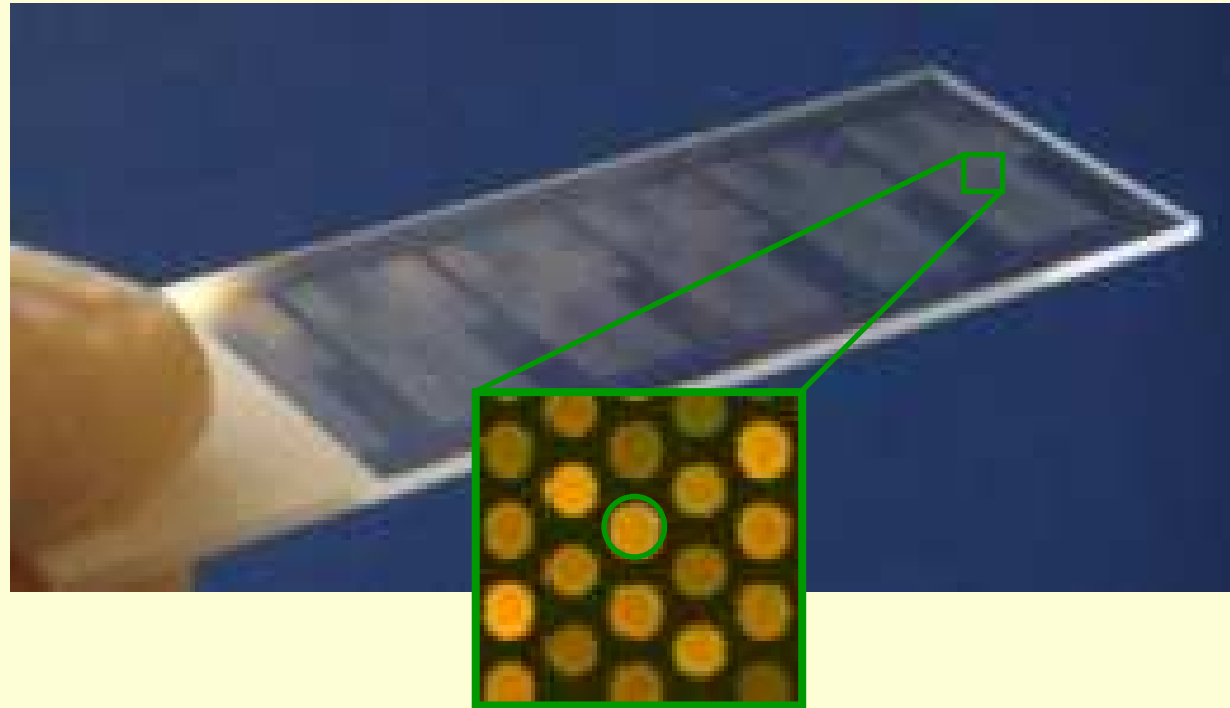
15000 spots/cm²

Photolithographie (Affy)



100000 spots/cm²

Les sondes

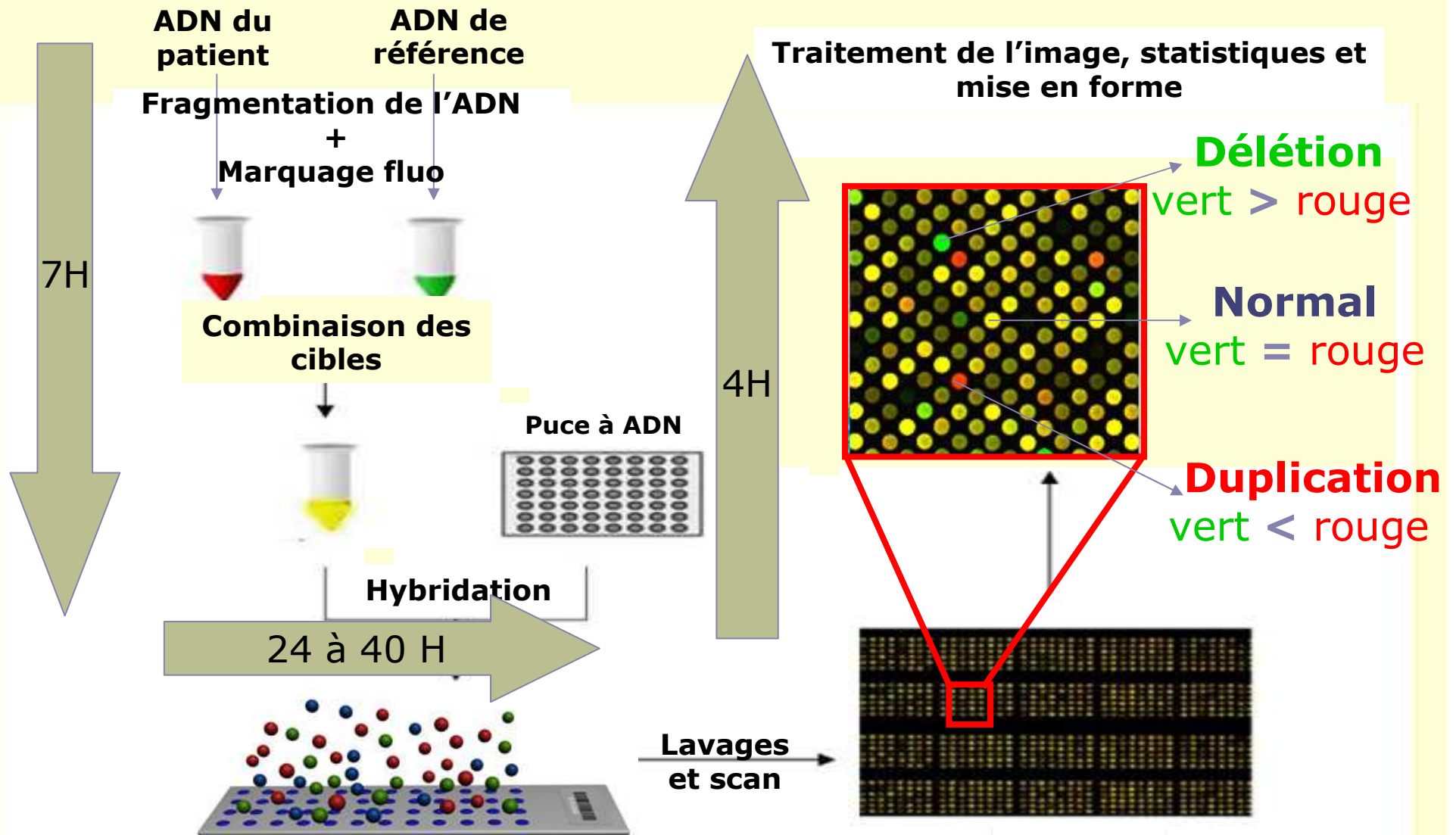


1 spot = 1 séquence d'ADN présente en multiples copies.

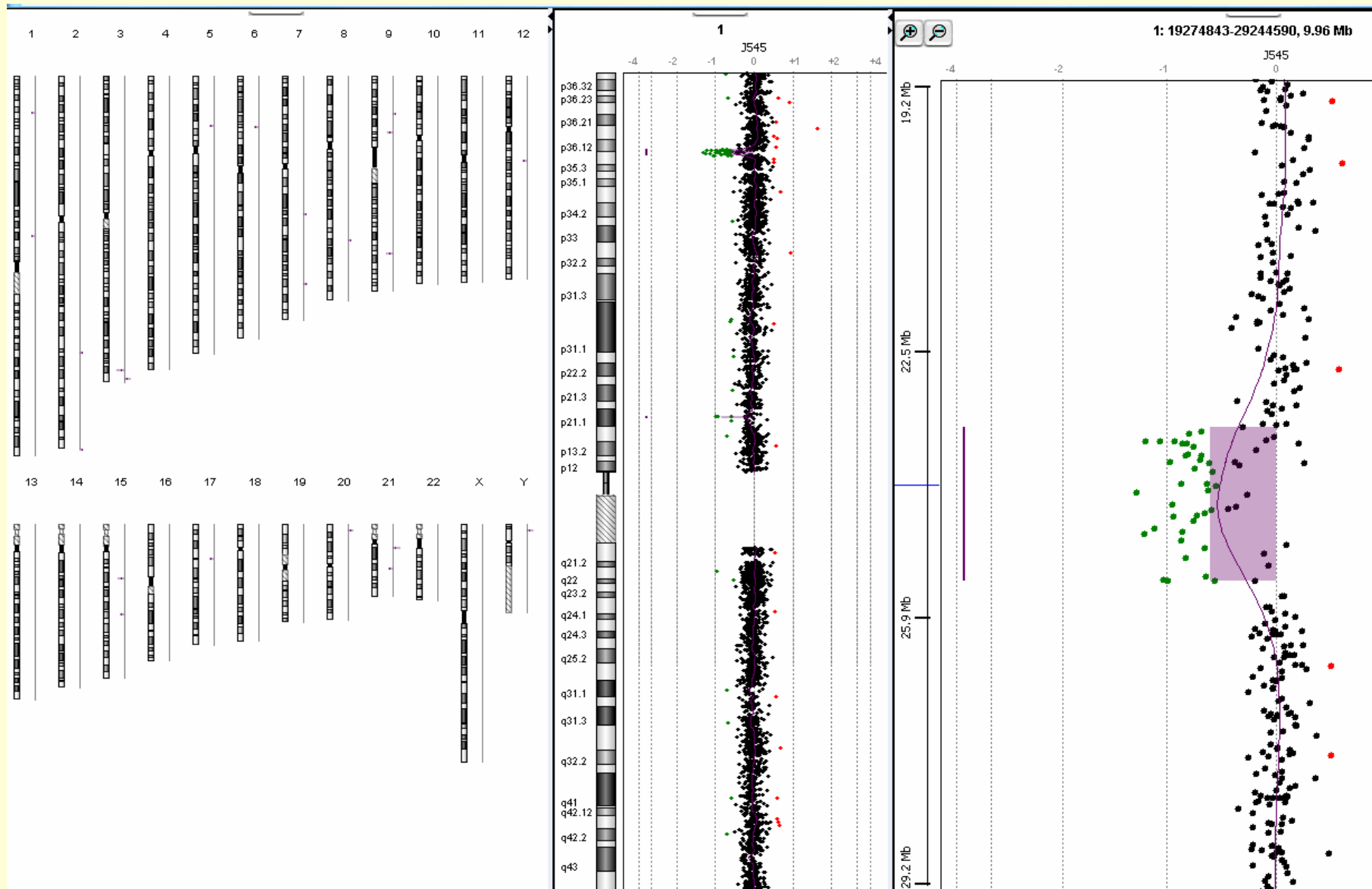
1 bonne sonde = **séquence d'ADN unique présente dans le génome humain.**

Plus il y a de sondes différentes sur la puce à ADN, meilleure sera la résolution de la puce (+ d'informations).

La CGH array



Le résultat de CGH array






Avantages / Limites de la CGH array

La CGH array est une méthode moléculaire qui permet **d'explorer simultanément et sur tout le génome les déséquilibres chromosomiques** entre l'ADN d'une référence et celui d'un patient (del / dup).

Avantages:

- 25 à 1000 fois + résolutives que le caryotype haute résolution
- Localisation génomique précise des déséquilibres
- Identification du matériel dupliqué

Limites:

- Anomalies chromosomiques équilibrées : translocations, inversions, anneaux
 - Interprétations des résultats
- 



Démarche de l'examen, interprétation des résultats et techniques de validation





Le laboratoire de cytogénétique de Nantes

Personnel: 3 ETP médecins, 1 ETP ingénieur, 6 ETP techniciens, 1 ETP secrétaire.

Activité 2007:

- Prénatal: ~1000 caryotypes
- Post-Natal: ~ **1000** caryotypes dont ~ **360** pour une indication de **Retard Mental** (RM) et / ou **Syndrome Polymalformatif** (SPM) **10,5% diagnostiqués au caryotype.**

Menten *et al.* (J Med Genet. 2006 Aug;43(8):625-33):
CGH array sur 140 patients atteints de RM/SPM, dont le caryotype et les télomères sont normaux. **20% (28/140) présentent une anomalie en CGH array (>1Mb) qui explique les phénotypes de RM et SPM.**

Potentiellement, 60 diagnostics supplémentaires / an !



CGH array à Nantes: exploration des causes de retard mental



La puce utilisée: 4x44K d'Agilent

1 puce : 4 patients simultanément

44000 sondes : 1 sonde tous les 60 kb en moyenne

1 déséquilibre: 3 sondes consécutives anormales soit 180Kb minimum

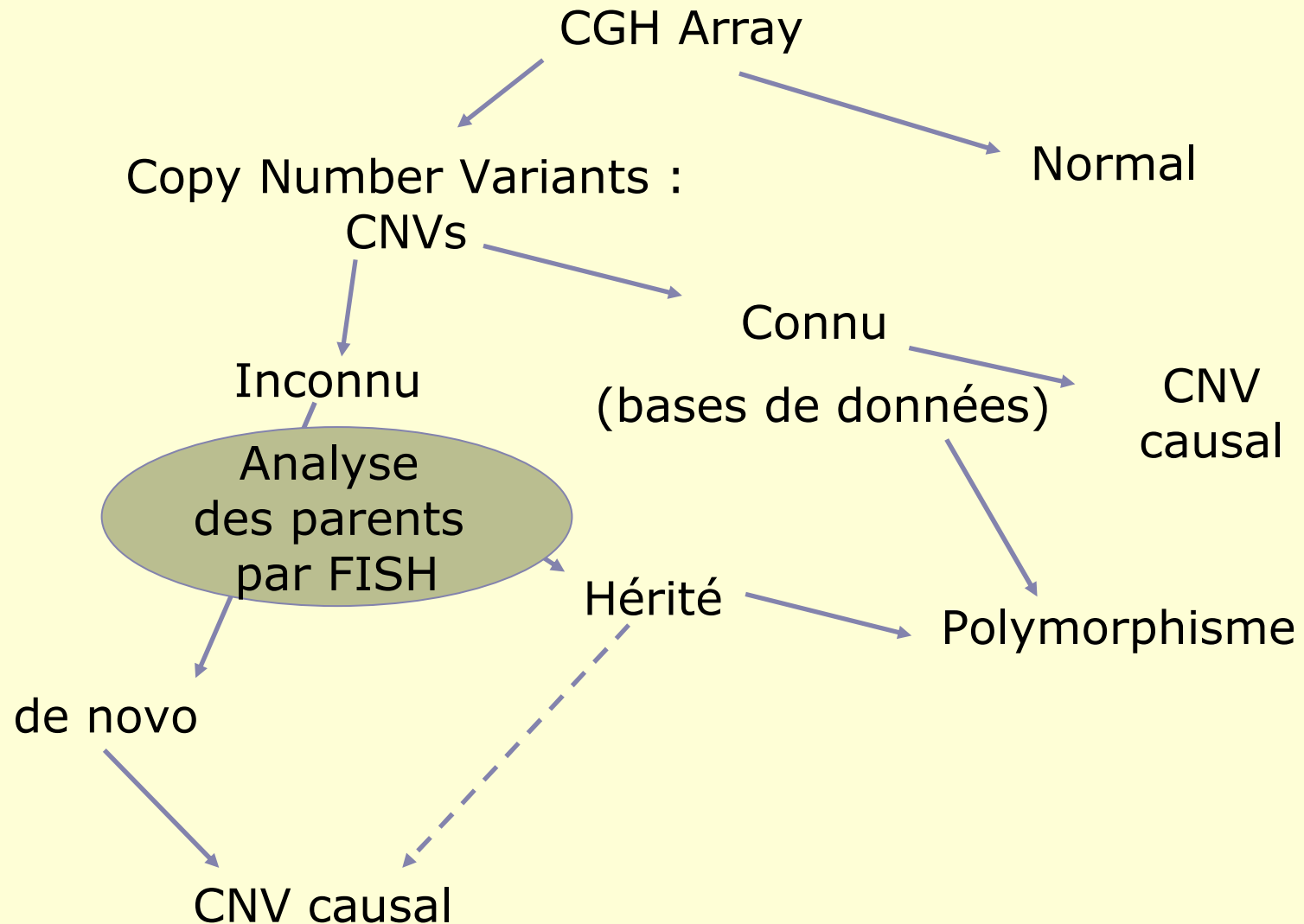
ARTICLES

Global variation in copy number in the human genome

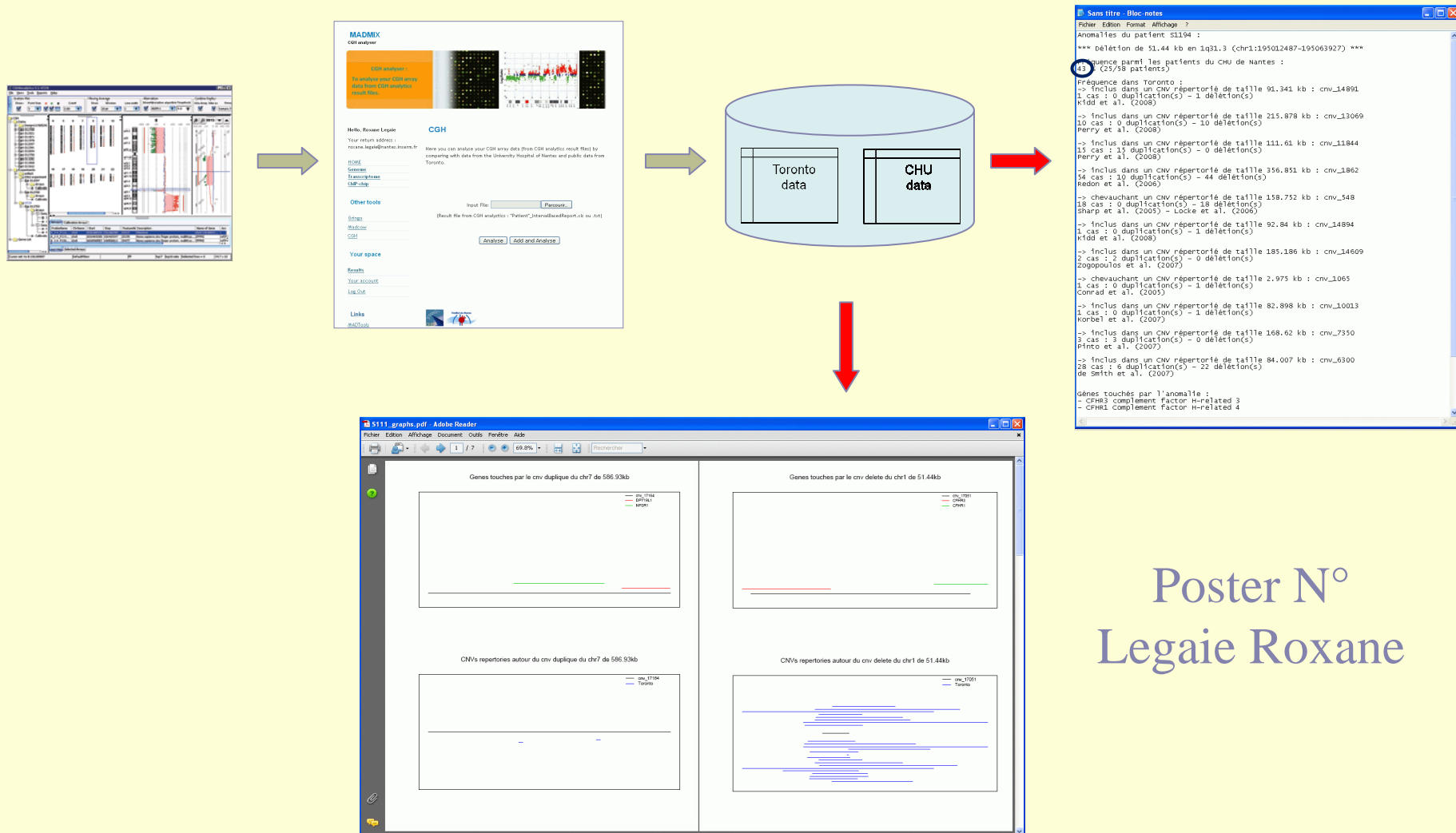
Richard Redon¹, Shumpei Ishikawa^{2,3}, Karen R. Fitch⁴, Lars Feuk^{5,6}, George H. Perry⁷, T. Daniel Andrews¹, Heike Fiegler¹, Michael H. Shapero⁴, Andrew R. Carson^{5,6}, Wenwei Chen⁴, Eun Kyung Cho⁷, Stephanie Dallaire⁷, Jennifer L. Freeman⁷, Juan R. González⁸, Mònica Gratacòs⁸, Jing Huang⁴, Dimitrios Kalaitzopoulos¹, Daisuke Komura³, Jeffrey R. MacDonald⁵, Christian R. Marshall^{5,6}, Rui Mei⁴, Lyndal Montgomery¹, Kunihiro Nishimura², Kohji Okamura^{5,6}, Fan Shen⁴, Martin J. Somerville⁹, Joelle Tchinda⁷, Armand Valsesia¹, Cara Woodward¹, Fengtang Yang¹, Junjun Zhang⁵, Tatiana Zerjal¹, Jane Zhang⁴, Lluís Armengol⁸, Donald F. Conrad¹⁰, Xavier Estivill^{8,11}, Chris Tyler-Smith¹, Nigel P. Carter¹, Hiroyuki Aburatani^{2,12}, Charles Lee^{7,13}, Keith W. Jones⁴, Stephen W. Scherer^{5,6} & Matthew E. Hurles¹

Copy number variation (CNV) of DNA sequences is functionally significant but has yet to be fully ascertained. We have constructed a first-generation CNV map of the human genome through the study of 270 individuals from four populations with ancestry in Europe, Africa or Asia (the HapMap collection). DNA from these individuals was screened for CNV using two complementary technologies: single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays, and clone-based comparative genomic hybridization. A total of 1,447 copy number variable regions (CNVRs), which can encompass overlapping or adjacent gains or losses, covering 360 megabases (12% of the genome) were identified in these populations. These CNVRs contained hundreds of genes, disease loci, functional elements and segmental duplications. Notably, the CNVRs encompassed more nucleotide content per genome than SNPs, underscoring the importance of CNV in genetic diversity and evolution. The data obtained delineate linkage disequilibrium patterns for many CNVs, and reveal marked variation in copy number among populations. We also demonstrate the utility of this resource for genetic disease studies.

Démarche de l'examen et interprétation des résultats



Développement d'un outil bioinformatique permettant une analyse automatique des CNV identifiés par CGH oligoarray Agilent



Poster N°
Legae Roxane



Exploration d'une cohorte par CGH array

64 patients atteints de RM +/- SPM dont les caryotypes sont normaux.

Résultats:

- 38/64 (57.5%) de normaux.
- 26/64 (42.5%) d'anormaux : 20 anomalies *de novo* (31,25%) et 6 cas restants à explorer.

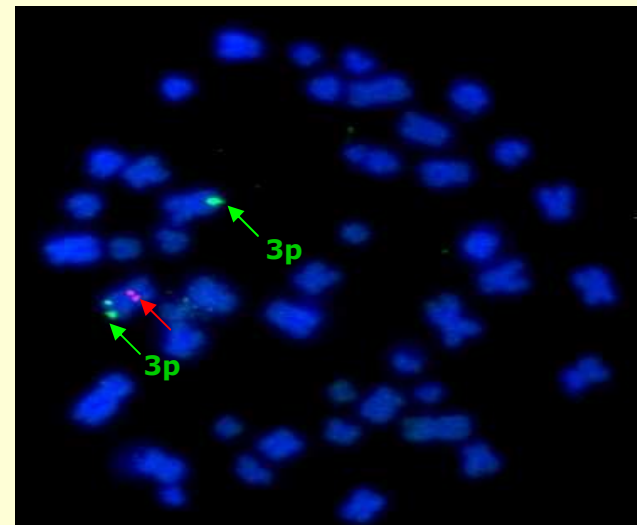
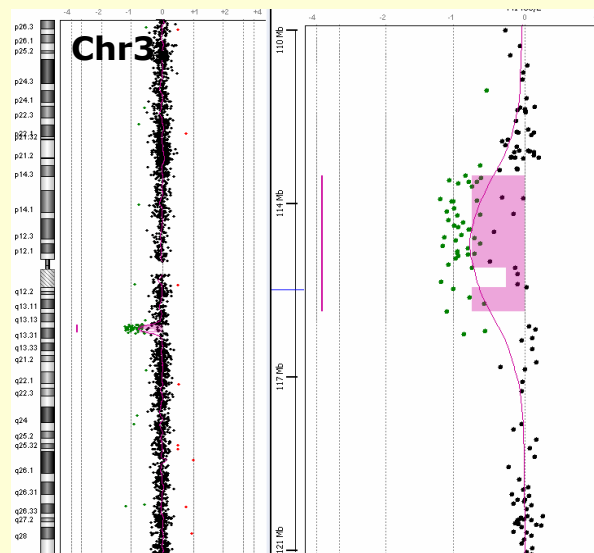
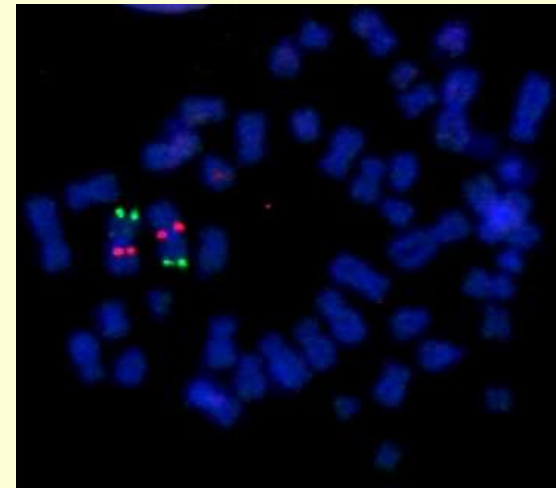
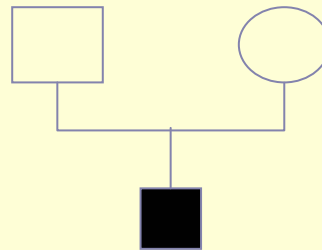
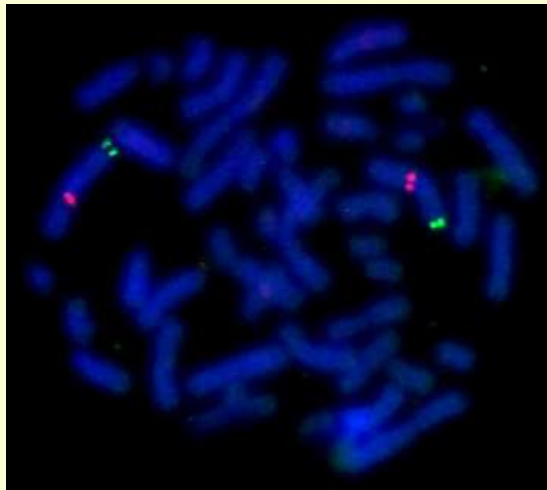
Confirmation par FISH et / ou par Q-PCR



Exemples ...

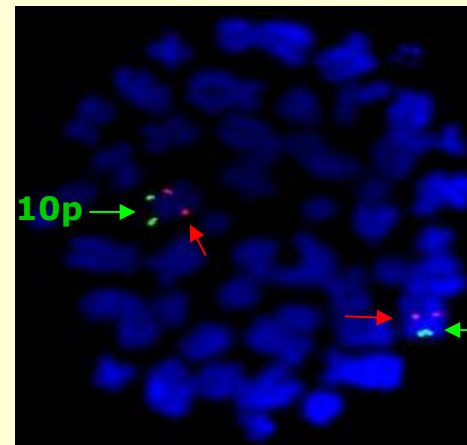
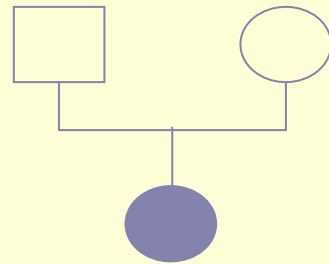
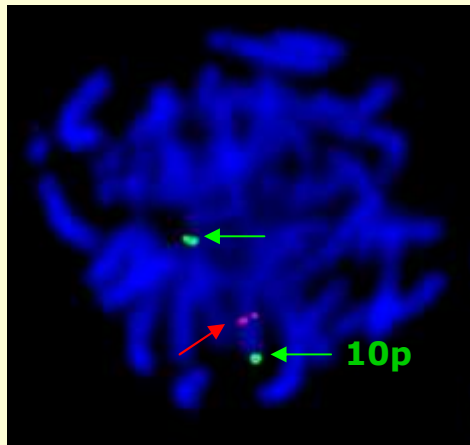
1. Cas simple : Délétion *de novo*

délétion de 3Mb non recensée sur les bases de données

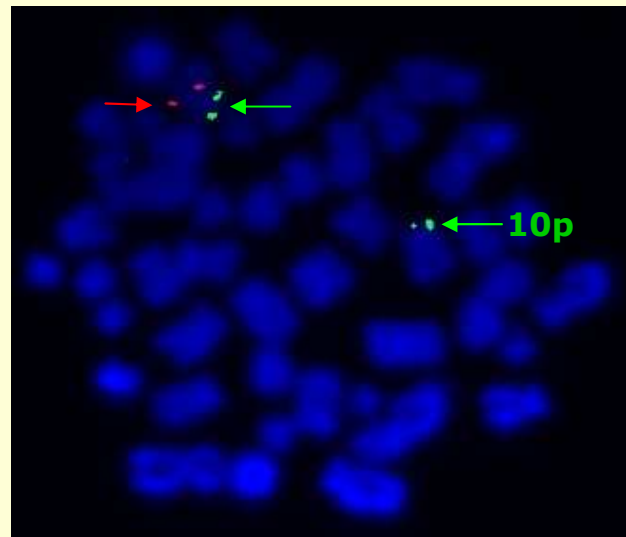
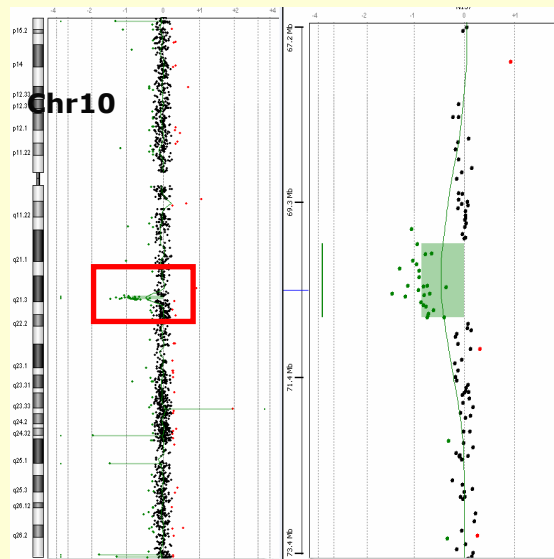


1. Cas simple : Délétion héritée

délétion de 1Mb sur le chr 10 non recensée sur les bases de données

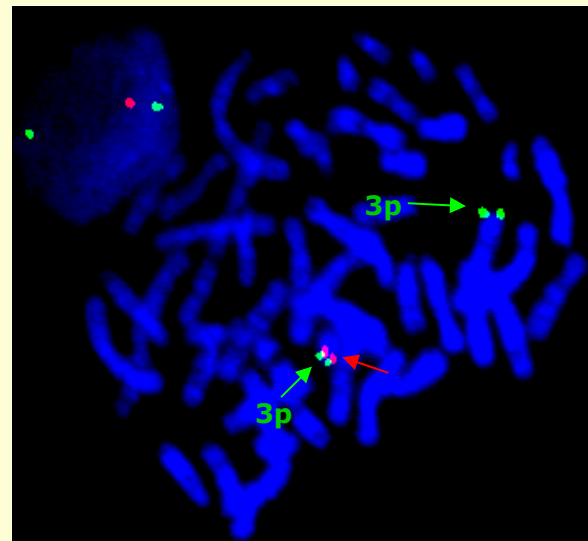
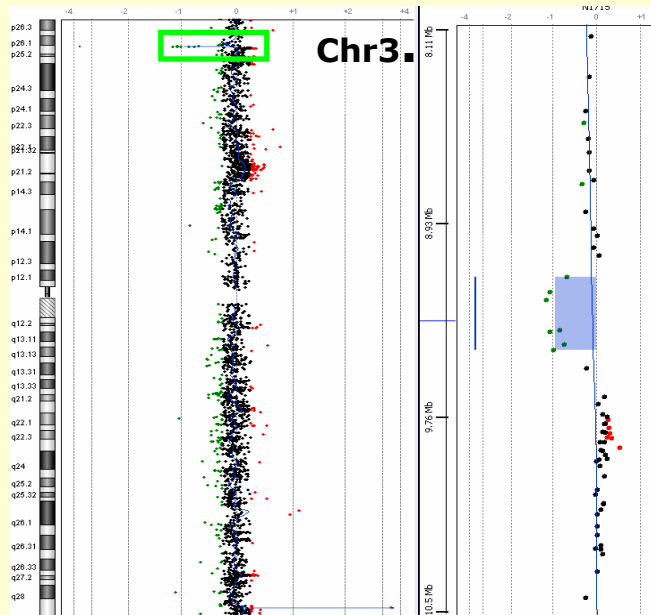
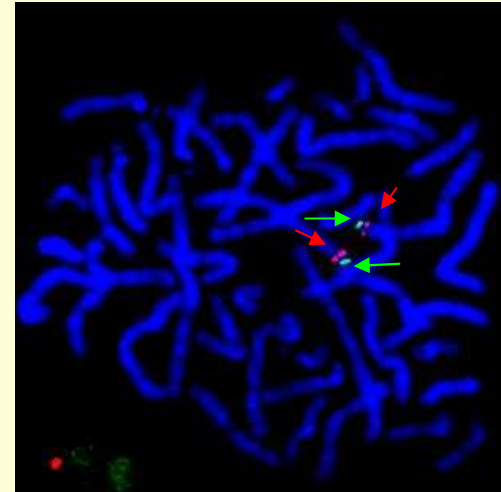
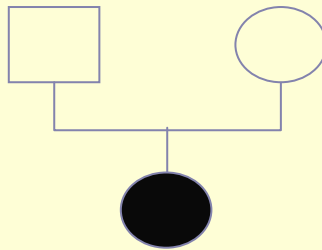
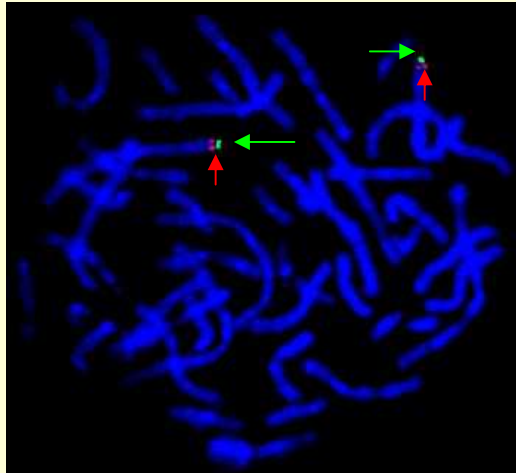


Délétion héritée :
pas délétère



Exemples ...

2. Cas simple : microdélétion *de novo*: < 300Kb

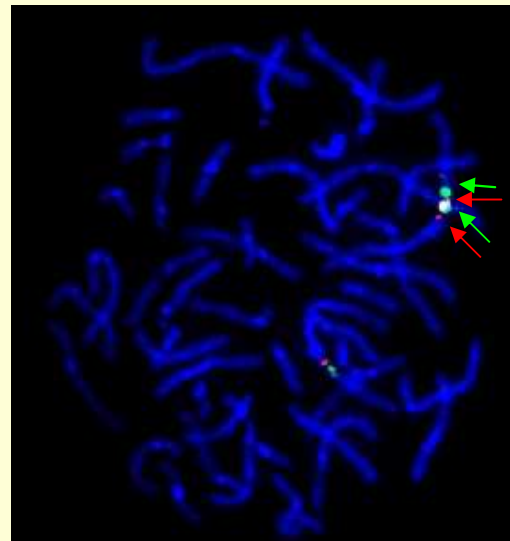
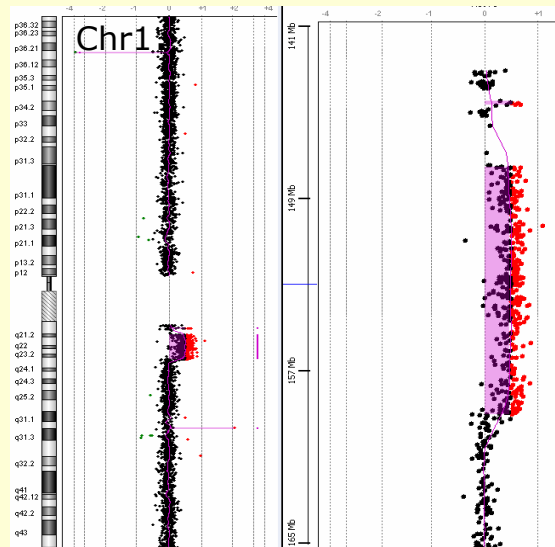
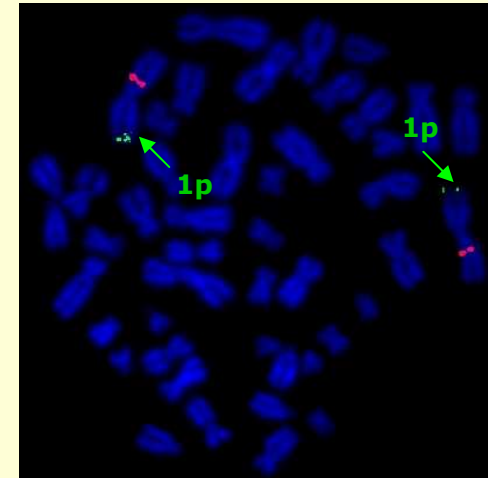
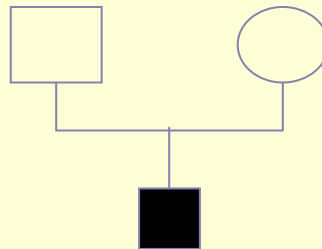
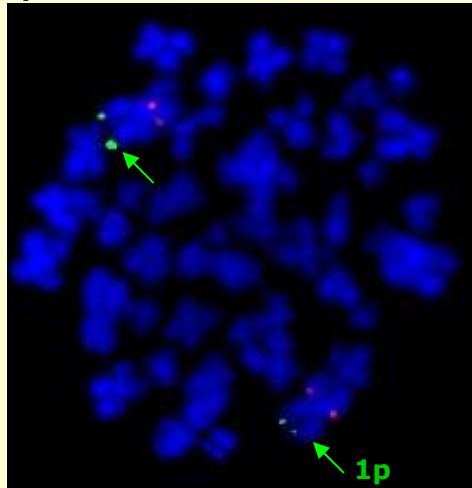


Gène majeur du syndrome 3p- ?

Exemples ...

3. Cas simple : Duplication de novo

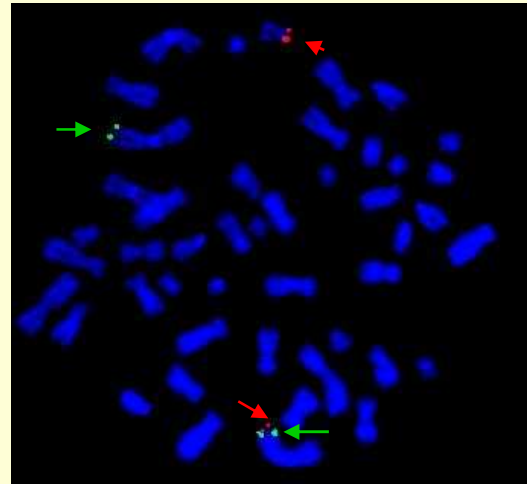
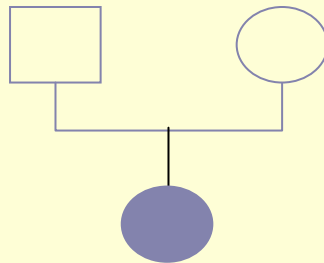
Duplication de 11Mb non recensée sur les bases de données



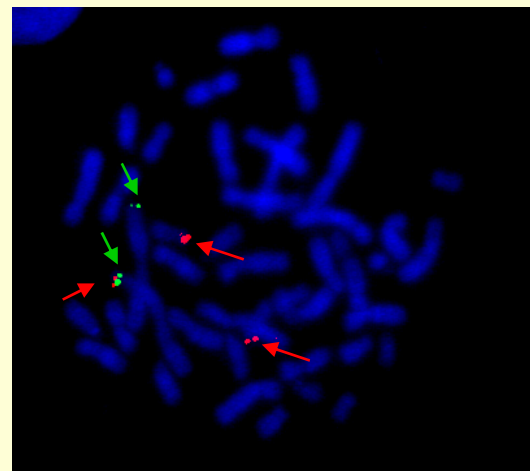
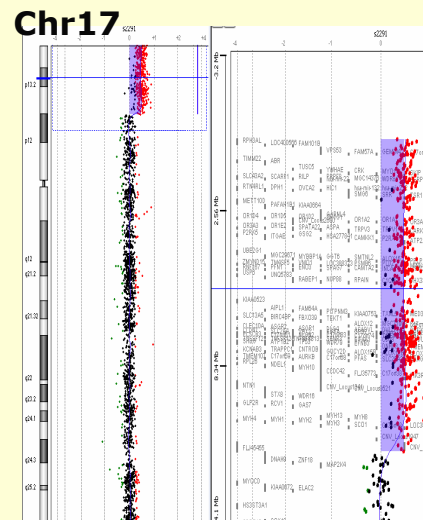


Exemples ...

4. Cas simple: duplication de 11Mb issue d'une translocation parentale



Translocation
équilibrée 17p
sur 1p



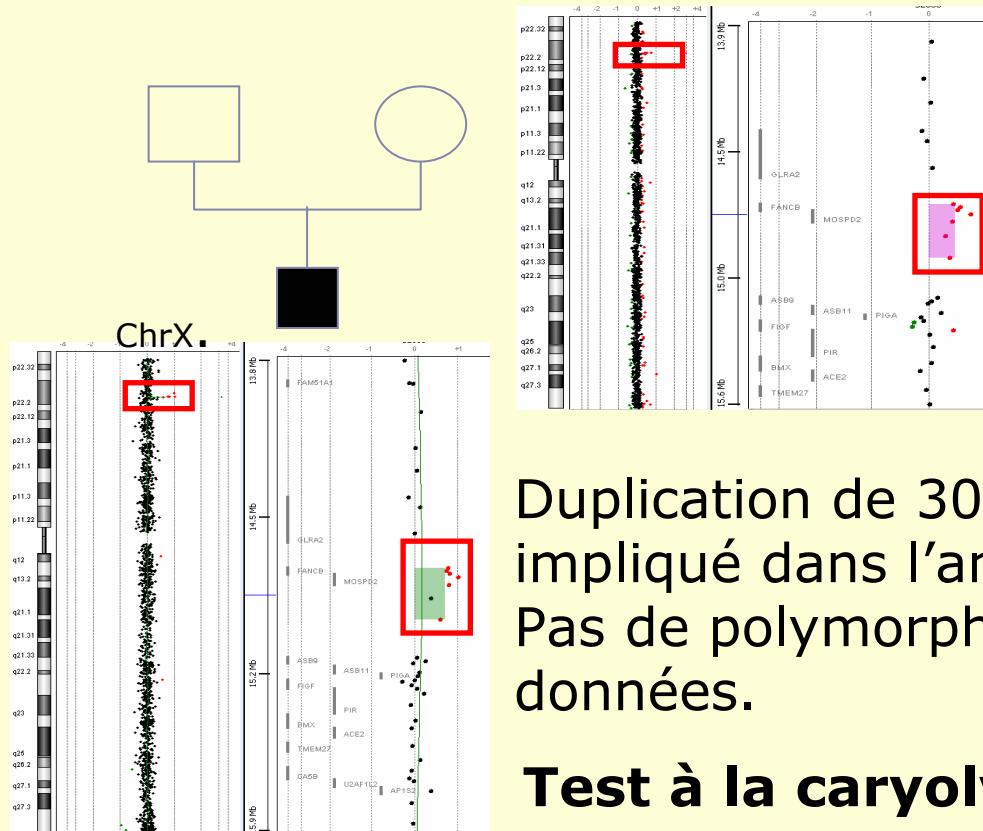
Duplication 17p sur 1p

Translocation maternelle héritée



Exemples ...

5. Cas + difficile: les duplications de petites tailles

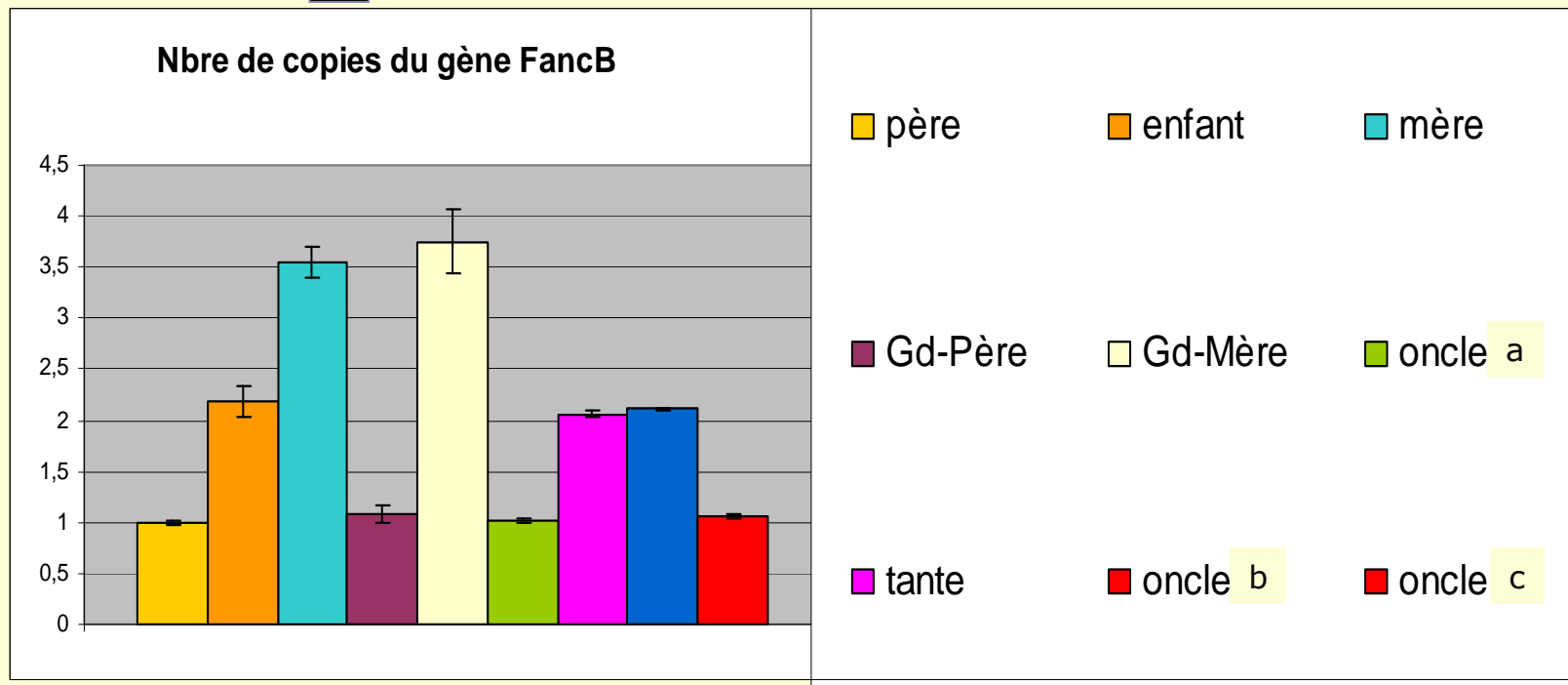
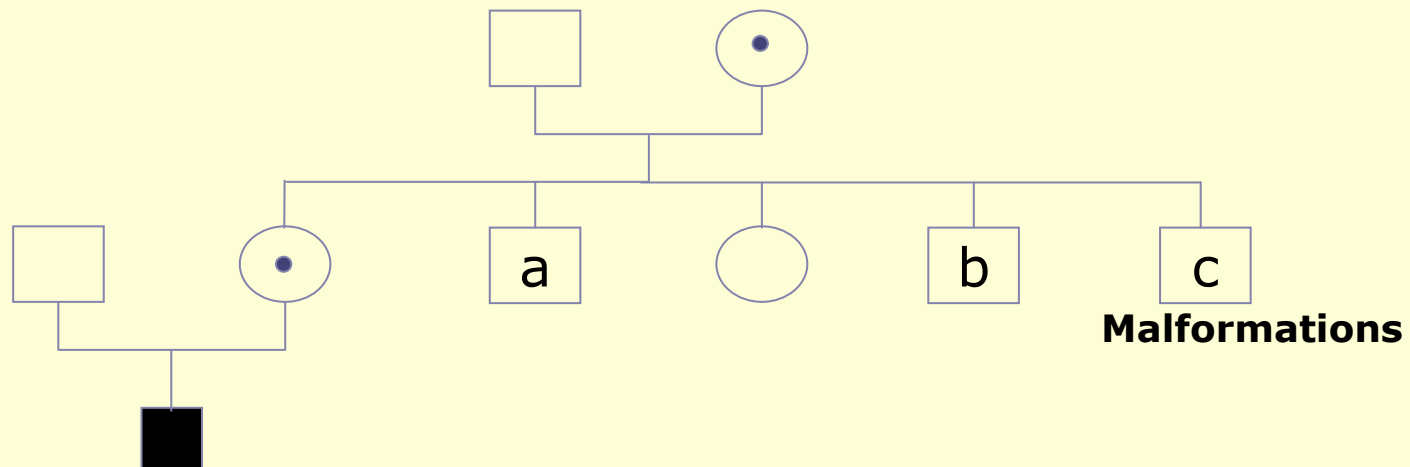


Duplication de 300 Kb, incluant le gène *FANCB* impliqué dans l'anémie de Fanconi.
Pas de polymorphisme dans les bases des données.

Test à la caryolysine (test de cassure): **négatif**

Malformation cardiaque et des **extrémités des mains**

Difficile de valider une duplication < 500Kb par FISH



Donc, il n'y a pas d'arguments pour dire que cette duplication est délétère.



Conclusions

Critères retenus pour le diagnostic :


- Caractère *de novo*
- Présence de l'anomalie sur les bases de données publiques
- Taille de l'anomalie
- Gènes candidats contenus dans l'anomalie

Interprétation des données :

- Bases de données : quelles sont les régions du génome qui varient en nombre de copies (CNV) chez des individus normaux ?
- Cas particulier: duplication héritée localisée sur l'X chez les hommes

La CGH array est un **outil de diagnostic** qui est **25 à 1000 fois plus résolutif** que le caryotype haute résolution.
15 à 20% de diagnostics RM/SPM en plus !

2008: Coût / patient (4X44K) = 250 euros (réactif)



Remerciements

Dr Jean-Marie Rival
Dr Cédric Le Caignec
Dr Michelle Boceno
Dr Philippe Piloquet
Claire Lecointre (interne)

Dr Albert David
Dr Bertrand Isidor

Roxane Legaie (bioinformatique)

Julie Lamourre
Brigitte Menanteau
Aurélie Moriceau
Marie-line Bichon
Marie-jo Ostromon
Josseline Havard
Bernard Auffray