

Université de Montréal

Remaniements subtélomériques chez les fœtus avec malformations majeures

par
Jennifer Gignac

Programme de Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître es sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Décembre, 2006

© Jennifer Gignac, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Remaniements subtélomériques chez les fœtus avec malformations majeures

présenté par :
Jennifer Gignac

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Raouf Fetni, président-rapporteur
Dre. Emmanuelle Lemyre, directrice de recherche
Dre. Frédérique Tihy, co-directrice
Dre. Alessandra Duncan, membre du jury

Résumé

Les subtélomères sont des régions hautement dynamiques situées près des extrémités chromosomiques. Ces régions sont riches en gènes et très susceptibles aux remaniements chromosomiques. Des remaniements subtélomériques cryptiques ont été rapportés par plusieurs études chez environ 6% des patients avec retard mental et traits dysmorphiques/malformations congénitales. L'analyse de ces régions fait maintenant partie de l'investigation de routine du retard mental. Des malformations congénitales sont diagnostiquées chez le fœtus dans 3-4% des grossesses et leur étiologie demeure inconnue dans la majorité des cas. Il nous semblait donc intéressant d'étudier le rôle des remaniements subtélomériques cryptiques dans le développement des malformations fœtales ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Premièrement, nous avons dû déterminer la faisabilité technique de l'analyse multi-subtélomérique par FISH en prénatal. Pour ce faire, nous avons adapté une trousse de sondes multi-subtélomériques conçue pour les chromosomes de lymphocytes aux chromosomes d'amniocytes. Nous avons ensuite effectué l'analyse des régions subtélomériques pour 49 fœtus avec malformations majeures à l'échographie et un caryotype standard normal à une résolution minimale de 400 bandes. Nous avons identifié six anomalies subtélomériques : deux dérivés de translocation hérités, une amplification de signal de signification clinique indéterminée, deux polymorphismes connus ainsi qu'un nouveau variant familial. Ainsi la fréquence des remaniements subtélomériques cliniquement significatifs dans notre population est de 4-6%. Cette étude rapporte la faisabilité technique de l'analyse multi-subtélomérique prénatale sur une seule lame d'étalement chromosomique ainsi que l'intérêt d'offrir cette analyse dans un contexte clinique pour l'investigation des malformations fœtales.

Mots-clés : Fœtus, Malformations congénitales, Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), Remaniements subtélomériques

Abstract

Subtelomeres are dynamic regions of the genome found at chromosome extremities. These regions are gene rich and highly susceptible to chromosomal rearrangements. Cryptic subtelomeric rearrangements have been reported previously in approximately 6% of patients with mental retardation and dysmorphism/congenital malformations. Subtelomere analysis is now part of the routine investigation of mental retardation. Congenital fetal malformations are diagnosed through ultrasound in 3-4% of pregnancies and their etiology remains unclear in most cases. Therefore, our objective was to investigate the role of cryptic subtelomeric rearrangements in the development of fetal malformations which had never been done before. We first had to determine the technical feasibility of multi-subtelomere FISH analysis in the prenatal period. We did so by adapting a multiprobe subtelomere assay designed for lymphocyte chromosomes to amniocyte chromosomes. We then used the assay to study 49 fetuses with major malformations and a normal karyotype at a minimal resolution of 400 bands. We identified six subtelomeric abnormalities: two inherited derivative chromosomes, one signal amplification of undetermined clinical significance, two known polymorphisms as well as one novel family variant. These results show a 4-6% frequency of clinically significant subtelomeric rearrangements in our population of fetuses with major malformations. This study reports the technical feasibility of multi-subtelomere FISH analysis in the prenatal period on a single slide of metaphase spreads as well as the relevance of routine subtelomere screening in the investigation of fetal malformations.

Keywords: Fetus, Congenital malformations, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), Subtelomeric rearrangements

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des sigles et abréviations	viii
Liste des tableaux	ix
Remerciements	xiv
Section 1 : Introduction	1
1.1 Généralités	1
1.2 Structure des régions subtélomériques	2
1.2.1 Organisation de l'ADN subtélomérique humain.....	7
1.3 Évolution des subtélomères	11
1.4 Rôles des subtélomères	16
1.4.1 Diversification des gènes et évolution adaptative.....	17
1.4.2 Contrôle de l'effet de position télomérique	19
1.4.3 Maintien de l'intégrité des télomères en absence de télomérase	20
1.5 Effets pathologiques des remaniements subtélomériques	22
1.5.1 Les remaniements subtélomériques et le retard mental	29
1.5.2 Les remaniements subtélomériques et les avortements spontanés à répétition....	30
1.5.3 Les remaniements subtélomériques et les malformations congénitales.....	32
Section 2 : Hypothèse et objectifs	34
2.1 Hypothèse.....	34
2.2 Objectifs	35
Section 3 : Article	36
ABSTRACT	37
INTRODUCTION.....	38
MATERIALS AND METHODS	39
RESULTS	42

DISCUSSION	46
ACKNOWLEDGEMENTS	50
REFERENCES	51
TABLES	53
FIGURES	55
LEGENDS	57
Section 4 : Matériel et méthodes	58
4.1 Recrutement de patients	58
4.2 FISH multi-subtélomérique	58
4.2.1 Mise au point de la technique de culture cellulaire.....	61
4.2.2 Mise au point de la technique de FISH	63
4.3 Analyse des points de cassure	64
Section 5 : Résultats	73
5.1 Faisabilité technique	73
5.2 Fréquence des remaniements subtélomériques	73
5.2.1 Remaniements subtélomériques cliniquement significatifs.....	74
5.2.2 Nouveau variant familial.....	90
5.2.3 BACs mal cartographiés	95
Section 6 : Discussion et conclusion	96
6.1 Mise au point technique	96
6.2 Remaniements subtélomériques cliniquement significatifs	98
6.3 Polymorphismes et variants familiaux	104
6.4 BACs mal cartographiés	110
6.5 Impact clinique	110
6.6 Perspectives futures	113
6.6.1 FISH multicoloreurs	114
6.6.2 MAPH	115
6.6.3 MLPA.....	117

6.6.4	RT-PCR.....	119
6.6.5	Analyse de marqueurs polymorphiques.....	120
6.6.6	Criblage génomique.....	121
6.7	Conclusion.....	126
	Bibliographie.....	129

Liste des sigles et abréviations

ALT	<i>Alternative pathway for lengthening of telomeres</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i>
COBRA	<i>Combined binary ratio labelling</i>
DS	Duplication segmentaire
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
MAPH	<i>Multiplex amplifiable probe hybridization</i>
M-FISH	<i>Multiplex fluorescence in situ hybridization</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
M-TEL	<i>Telomeric multiplex fluorescence in situ hybridization</i>
PAC	<i>Phage P1-based artificial chromosome</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RS	Répétition subtélomérique
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
SKY	<i>Spectral karyotyping</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STS	<i>Sequence Tagged Site</i>
TM-FISH	<i>Telomeric multiplex fluorescence in situ hybridization</i>
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>

Liste des tableaux

Section 3 : Article

Table I : Clinical and Laboratory Findings for the Studied Patients

53

Liste des figures

Section 1 : Introduction

Figure 1 : Représentation schématique des morphologies chromosomiques chez l'humain.	1
Figure 2 : Modèle de structure subtélomérique en domaines selon Flint et al. [2005].	6
Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation de l'ADN subtélomérique selon Riethman et al. [2004].	9
Figure 4 : Deux modèles d'évolution des régions subtélomériques.	14
Figure 5 : Mécanisme de formation des remaniements subtélomériques lors de la méiose.	24
Figure 6 : Principe de la technique de FISH.	27

Section 3 : Article

Figure 1 : Multiprobe FISH analysis of patient 13.	55
Figure 2 : Multiprobe FISH analysis of patient 16.	55
Figure 3 : Multiprobe FISH analysis of patient 27.	56
Figure 4 : Multiprobe FISH analysis of patient 34.	56

Section 4: Matériel et méthodes

Figure 1 : Deux troussees commerciales de sondes subtélomériques.	60
Figure 2 : BACs du chromosome 2pter.	67
Figure 3 : BACs du chromosome 2qter.	68

Figure 4 : BACs du chromosome 12qter.	69
Figure 5 : BACs du chromosome 14qter.	70
Figure 6 : BACs du chromosome 16qter.	71
Figure 7 : Principe de la technique de marquage par déplacement de coupures.	72
 Section 5 : Résultats	
Figure 1 : Caryotype du patient 13 à une résolution de 400 bandes (46,XY).	76
Figure 2 : FISH subtélomérique sur les chromosomes lymphocytaires maternels du patient 13.	77
Figure 3 : Montage des chromosomes dérivés amniotiques fœtaux et lymphocytaires maternels du patient 13.	78
Figure 4 : Détermination du point de cassure du chromosome 14qter à l'aide de BACs pour le patient 13.	79
Figure 5 : Détermination du point de cassure du chromosome 16qter à l'aide de BACs pour le patient 13.	80
Figure 6 : Caryotype du patient 16 à une résolution de 400 bandes (46,XY).	82
Figure 7 : FISH subtélomérique sur les chromosomes lymphocytaires maternels du patient 16.	83
Figure 8 : Montage des chromosomes dérivés amniotiques fœtaux et lymphocytaires maternels du patient 16.	84
Figure 9 : Détermination du point de cassure du chromosome 2qter à l'aide de BACs pour le patient 16.	85
Figure 10 : Détermination du point de cassure du chromosome 12qter à l'aide de BACs pour le patient 16.	86
Figure 11 : Caryotype du patient 49 à une résolution de 400 bandes (46,XX).	88
Figure 12 : FISH subtélomérique pour le patient 49 et ses parents.	89

Figure 13 : Caryotype du patient 27 à une résolution de 400 bandes (46,XX).	91
Figure 14 : FISH subtélomérique sur les chromosomes lymphocytaires paternels du patient 27.	92
Figure 15 : Montage des chromosomes dérivés amniotiques fœtaux et lymphocytaires paternels du patient 27.	92
Figure 16 : Détermination du point de cassure du chromosome 2pter à l'aide de BACs pour le patient 27.	93
Figure 17 : FISH subtélomérique pour le patient 32.	94
Figure 18 : BACs mal cartographiés.	95

Section 6 : Discussion et conclusion

Figure 1 : Gènes possiblement dupliqués sur le chromosome 20qter.	103
Figure 2 : Gènes possiblement délétés sur le chromosome 2pter.	108
Figure 3 : Principe de la technique de MAPH.	116
Figure 4 : Principe de la technique de MLPA.	118
Figure 5 : Principe de la technique de CGH.	124

*À Jean-François, mon compagnon de vie,
mon amour et mon meilleur ami.*

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes directrices de recherche, Dre. Emmanuelle Lemyre et Dre. Frédérique Tihi, qui m'ont accueillie à bras ouverts au laboratoire et qui se sont investies pendant les trois dernières années dans mon apprentissage. J'ai énormément apprécié cette expérience et je vous en serai toujours très reconnaissante. Un gros merci à toutes les techniciennes du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine pour leur collaboration et aide technique ainsi que leur écoute et support moral. Je voudrais aussi remercier les familles qui ont participé à cette étude ainsi que l'équipe de généticiens du CHU Sainte-Justine sans qui mon projet de recherche n'aurait pas été possible.

Sur un plan plus personnel, je voudrais remercier mes parents qui m'ont donné bien plus que leurs chromosomes et sans qui je ne serais pas la même ainsi que mes frères et sœurs, Francis, Megan, Sylvie et Jonathan. Merci pour votre présence et support éternel. Je vous aime tous très fort.

Je voudrais également remercier ma belle famille, Lucie, Patrick et Manon pour leur écoute attentive et mots d'encouragement ainsi que Samuel et Roxanne qui, inconsciemment, me rappellent toujours les choses importantes de la vie avec leur sourire d'enfant.

Finalement, je voudrais remercier Jean-François qui a vécu cette aventure à mes côtés. Tu t'es réjoui avec moi dans les moments forts et tu m'as réconforté dans les moments plus difficiles. Tu as été mon pilier de force sur lequel je pouvais toujours compter et je te dois une grande partie de cet accomplissement. La réalisation de ma maîtrise a réellement été un travail d'équipe et je ne pourrais demander un meilleur coéquipier. Je t'aime de tout mon cœur mon cher mari et c'est avec énormément de bonheur que je passe à la prochaine étape de notre vie à tes côtés.

Section 1 : Introduction

1.1 Généralités

Le génome humain est réparti en 23 paires de chromosomes (22 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels). Chaque chromosome est composé d'une seule molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) associée à des protéines. Le tout s'enroule pour former une chromatide composée d'un bras court (p) et d'un bras long (q) qui sont séparés par le centromère. Les chromosomes humains peuvent prendre trois formes : métacentrique (bras p et q de la même taille), submétacentrique (bras p plus court que le bras q) et acrocentrique (bras p très court). L'extrémité des deux bras chromosomiques se termine par le télomère (Figure 1).

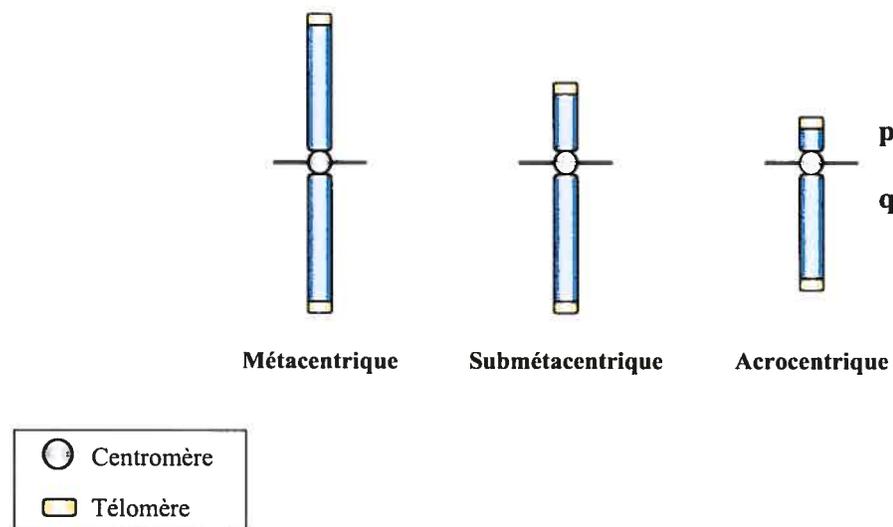


Figure 1 : Représentation schématique des morphologies chromosomiques chez l'humain.

Les télomères de tous les vertébrés sont composés d'une séquence d'ADN répété riche en TG. Chez l'humain, cette séquence télomérique est produite par la télomérase et est constituée de répétitions (TTAGGG)_n en tandem dont la longueur peut varier entre deux et quinze kilobases (kb) [Moyzis et al., 1988; Allshire et al., 1989]. En association avec des protéines spécifiques, les séquences télomériques jouent plusieurs rôles importants. Parmi ces rôles, on retrouve le maintien de la stabilité génomique, la réplication efficace des chromosomes, la régulation du cycle cellulaire, le vieillissement et l'immortalisation cellulaire, le déplacement et la localisation des chromosomes à l'intérieur du noyau ainsi que la régulation transcriptionnelle des gènes adjacents [Riethman et al., 2005]. La transition entre les séquences répétées télomériques et les séquences chromosomiques uniques est assurée par une région hautement dynamique de longueur variable appelée région subtélomérique.

1.2 Structure des régions subtélomériques

Les régions subtélomériques peuvent s'étendre sur des longueurs allant de 10 à 500 kb et sont composées majoritairement de différents segments d'ADN répété. Chacun de ces segments d'ADN répété constitue un bloc subtélomérique distinct. La taille des blocs subtélomériques est très variable (1 à > 200 kb). Chaque bloc subtélomérique est généralement présent en plus d'une copie dans le génome, mais le degré d'homologie de chaque bloc est variable; c'est-à-dire qu'un même bloc subtélomérique peut être présent aux extrémités de plusieurs chromosomes ou de seulement quelques chromosomes.

Cependant, un même bloc est rarement retrouvé en plus d'une copie à l'intérieur d'une même région subtélomérique. Ainsi, dans l'ensemble, les régions subtélomériques sont constituées d'une mosaïque de blocs. Cette structure particulière est le résultat de duplications des blocs subtélomériques et de leurs transferts à d'autres chromosomes au cours de l'évolution. Ces mécanismes ont lieu lors des interactions chromosomiques, particulièrement lors de la recombinaison méiotique [Mefford et Trask, 2002; Reithman et al., 2004].

Les subtélomères de diverses espèces, tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum* et *Drosophila melanogaster*, sont très semblables du point de vue de leur structure constituée d'une mosaïque de blocs d'ADN répété [Pryde et al., 1997]. De plus, pour tous les organismes eucaryotes étudiés jusqu'à présent, sauf *Caenorhabditis elegans*, les régions subtélomériques présentent beaucoup d'homologie entre les différents chromosomes de la même espèce [Wicky et al., 1996]. Toutefois, l'étendue des régions subtélomériques ainsi que les séquences répétées qui les composent varient énormément d'une espèce à l'autre.

Les régions subtélomériques des chromosomes humains présentent une grande homologie de séquence. En fait, aucun subtélomère humain ne semble avoir échappé aux mécanismes de duplication et de transfert de blocs subtélomériques entre les différentes extrémités chromosomiques qui ont eu lieu au cours de l'évolution. Cette très grande

homologie a été visualisée par plusieurs études d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*). Ces études ont utilisé des sondes produites par le clonage de segments subtélomériques. La présence de signaux fluorescents d'une seule sonde aux extrémités de plusieurs chromosomes indique qu'au moins une portion du segment subtélomérique couverte par la sonde en question est présente à plusieurs endroits dans le génome. Certains subtélomères humains, tel que celui du bras q du chromosome 7, ont une structure très simple peu homologue à d'autres chromosomes. Pour d'autres subtélomères, la structure en mosaïque d'une multitude de blocs subtélomériques entraîne des patrons d'homologie complexes entre un grand nombre de chromosomes. Par exemple, le subtélomère 3q comporte des segments d'ADN homologues à 35 autres régions subtélomériques [Mefford et Trask, 2002].

La complexité structurelle et la grande homologie des subtélomères humains font en sorte qu'il est très difficile d'analyser leur séquence et de construire des cartes génomiques exactes de ces régions. Les séquences subtélomériques sont sous-représentées dans les librairies de clones utilisées par les principaux centres de séquençage du génome. Ceci est probablement dû à la proximité des séquences répétées télomériques ainsi qu'aux patrons de restriction variables de l'ADN de ces régions. De ce fait, les subtélomères sont surreprésentés dans les banques de clones orphelins; c'est-à-dire des clones séquencés qui n'ont pas encore été assignés à un endroit spécifique du génome. Ainsi, les régions subtélomériques ne sont pas bien cartographiées dans les principales bases de données et la

localisation des clones subtélomériques est régulièrement remise à jour [Bailey et al., 2001].

Pour tenter d'élucider l'organisation structurale des régions subtélomériques chez l'humain, des études comparatives ont été effectuées et ont mis en évidence une structure particulière commune à plusieurs subtélomères : 4p, 4q, 9q, 10p, 10q, 13p, 15p, 16p, 18p, 20p, 21p, 22p, 22q et XqYq. Pour ces chromosomes, les blocs subtélomériques d'ADN répété semblent être organisés en deux domaines distincts : un domaine distal composé de blocs de courte taille (< 2 kb en moyenne) présentant de l'homologie avec un grand nombre de chromosomes et un deuxième domaine proximal composé de blocs de plus grande taille (10-50 kb en moyenne) présentant de l'homologie avec un nombre restreint de chromosomes. Ces domaines sont séparés par des blocs internes de séquences (TTAGGG)_n dégénérées et de séquences similaires à des origines de réplication (Figure 2) [Flint et al., 1997b; Chute et al., 1997]. Cette structure en deux domaines s'apparente à la structure subtélomérique de *S. cerevisiae* dans laquelle les domaines distal et proximal sont séparés par un « élément central X », souvent accompagné d'un bloc interne de séquences télomériques dégénérées [Flint et al., 1997b; Pryde et Louis, 1997]. Il est possible que les interactions chromosomiques ne soient pas de la même fréquence ou de la même nature entre les domaines distal et proximal du subtélomère. Ce phénomène pourrait expliquer les différents taux d'homologie inter-chromosomique pour ces deux domaines. Par conséquent, les blocs (TTAGGG)_n dégénérés internes pourraient avoir un rôle fonctionnel de

compartimentalisation des deux domaines subtélomériques pour contrôler les interactions entre chromosomes [Flint et al., 1997b]. Cependant, ce modèle de deux domaines ne s'applique pas de manière absolue. Par exemple, il existe des segments de séquences hautement homologues à l'intérieur de blocs subtélomériques présentant peu d'homologie et inversement, il existe des segments de séquences peu homologues à l'intérieur de blocs subtélomériques présentant beaucoup d'homologie [Trask et al., 1998]. Il n'est donc pas possible actuellement de déterminer la structure exacte des subtélomères humains.

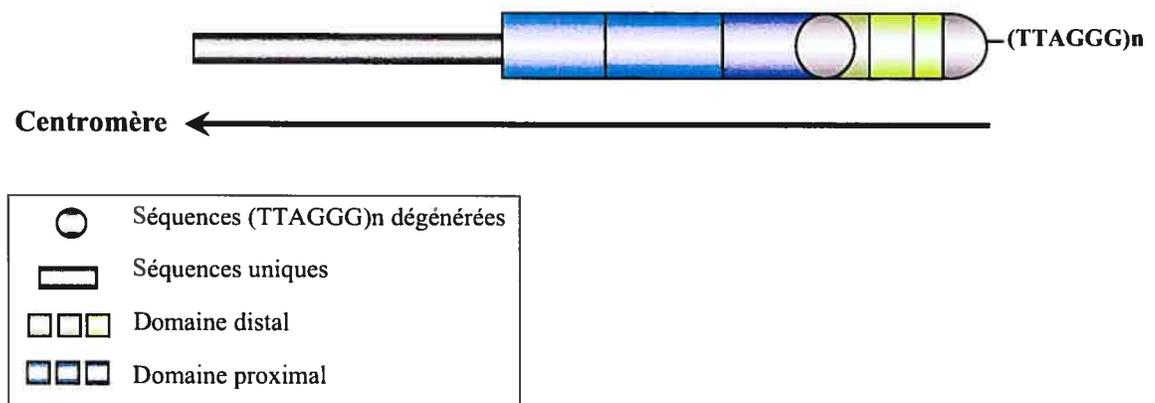


Figure 2 : Modèle de structure subtélomérique en domaines selon Flint et al. [2005]. Les domaines proximal et distal sont séparés par un bloc de séquences (TTAGGG)_n.

1.2.1 Organisation de l'ADN subtélomérique humain

L'ADN qui compose les régions subtélomériques peut être divisé en trois catégories : 1) les séquences d'ADN répété qui sont composées de répétitions subtélomériques (RS) et de duplications segmentaires (DS), 2) les séquences (TTAGGG)_n dégénérées internes et 3) les séquences d'ADN codants qui s'organisent en gènes uniques, familles de gènes et pseudogènes [Riethman et al., 2005].

Les RS se définissent comme étant des séquences présentant au moins 90% d'identité avec au moins une autre séquence subtélomérique et s'étendant sur une région de plus d'une kilobase. Les DS sont des séquences présentant au moins 90% d'identité avec une séquence externe aux subtélomères s'étendant également sur une région de plus d'une kilobase. En général, les RS sont concentrées dans des blocs distaux des subtélomères, flanquant les séquences télomériques (Figure 3). Par contre, au niveau de certains chromosomes, il existe des petits blocs de RS au travers des blocs de DS et de séquences uniques (2p, 2q, 3q, 5p, 7p, 8p et 12p). Les blocs de DS sont généralement adjacents aux blocs distaux de RS, mais le nombre et la localisation de ces blocs varient d'un subtélomère à l'autre (Figure 3) [Riethman et al., 2004]. Riethman et collègues [2005] ont avancé que les subtélomères sont constitués d'environ 13% de RS et de 8% de DS pour un total de 21% des deux types de séquences répétées dans l'ensemble de l'ADN subtélomérique. Le taux de répétitions dans l'ADN génomique est d'environ 5% ce qui fait que les subtélomères présentent quatre à cinq fois plus d'ADN répété que l'ensemble du génome.

Les séquences (TTAGGG) $_n$ dégénérées internes sont organisées en îlots dans l'ADN subtélomérique. Bien que leur distribution et leur fréquence puissent varier d'un subtélomère à l'autre, les îlots sont souvent plus concentrés aux intersections des blocs d'ADN de différents types (RS et DS) et pourraient agir comme barrière physique et/ou fonctionnelle entre les différents domaines subtélomériques (Figure 3). Selon Riethman et collègues [2004], l'ADN subtélomérique serait 25 fois plus riche en séquences télomériques dégénérées internes que l'ensemble de l'ADN génomique. De plus, les séquences (TTAGGG) $_n$ dégénérées subtélomériques sont plus longues et mieux conservées que celles présentes dans le reste du génome. Ceci suggère soit que ces îlots subtélomériques sont apparus plus récemment dans l'histoire de l'évolution des chromosomes humains, soit que leur mécanisme d'apparition n'est pas le même, ou encore qu'ils sont soumis à une pression sélective pour maintenir l'intégrité de leur séquence [Riethman et al., 2005].

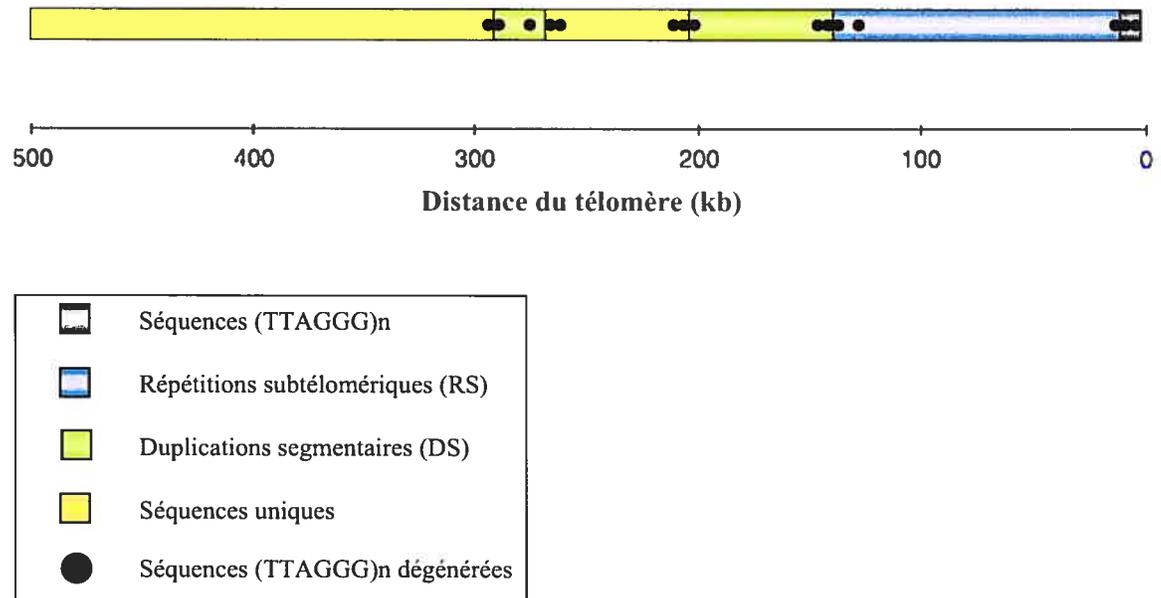


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation de l'ADN subtélomérique selon Riethman et al. [2004]. En partant du télomère, on retrouve dans l'ordre les RS, les DS et les séquences uniques. Les séquences (TTAGGG)_n dégénérées internes sont situées aux intersections des différents types d'ADN subtélomérique.

Les subtélomères humains sont des régions riches en gènes [Saccoone et al., 1992; Flint et al., 1997a; Flint et al., 1997b; Riethman et al., 2001]. En 2004, Riethman et al. ont démontré que tous les subtélomères humains produisaient des transcrits d'ARNm confirmant la présence de gènes et/ou de pseudogènes dans l'ADN subtélomérique. Jusqu'à présent, 1012 transcrits subtélomériques ont été isolés. De ce nombre, 732 proviennent d'ADN subtélomérique à séquence unique tandis que 280 proviennent d'ADN

subtélomérique répété de type RS ou DS. Ainsi, l'ADN subtélomérique est légèrement plus riche en séquences codantes (54 transcrits/mégabase (Mb)) que l'ensemble de l'ADN génomique (43 transcrits/Mb) [Richtman et al., 2005]. Une proportion inconnue, mais sans doute importante, de ces transcrits est probablement le produit de pseudogènes, particulièrement les transcrits provenant de l'ADN répété. Toutefois, ces transcrits de pseudogènes peuvent avoir des rôles biologiques importants tel que la régulation transcriptionnelle d'autres gènes [Riethman et al., 2004]. En plus des gènes uniques, plusieurs familles de gènes ont été identifiées au niveau des subtélomères humains. Ces gènes ont des fonctions variées et codent plusieurs types de protéines : des protéines de chaîne lourde d'immunoglobuline (14q), des protéines à doigt de zinc (4p, 5q, 8p, 8q, 12q et 19q) [Riethman et al., 2005], des récepteurs olfactifs (séquences uniques des subtélomères 1q, 5q, 10q, 15q et séquences répétées des subtélomères 1q, 6p, 8p, 11p, 15q, 19p et 3q) [Trask et al., 1998], ainsi que des récepteurs de cytokines, des tubulines, des facteurs de transcription et plusieurs protéines au rôle encore inconnu [Linardopoulou et al., 2005]. Puisque les gènes subtélomériques sont situés près des extrémités chromosomiques, ils sont très propices aux remaniements. De plus, les remaniements subtélomériques peuvent affecter l'ADN à séquence unique adjacent qui est également riche en gènes. Pour ces raisons, les subtélomères présentent un intérêt clinique particulier.

1.3 Évolution des subtélomères

La duplication et le transfert de blocs subtélomériques entre les différentes extrémités chromosomiques est probablement le résultat de plusieurs événements incluant : des duplications (entraînant la répétition d'un segment subtélomérique), des translocations (entraînant des échanges entre extrémités chromosomiques) ainsi que des conversions de gènes (entraînant le remplacement en partie ou en totalité d'un segment subtélomérique par un autre). En terme d'évolution, ces événements ont eu lieu récemment puisque la séquence subtélomérique d'une extrémité chromosomique donnée peut être très variable d'un individu à l'autre; c'est le phénomène de variabilité allélique. En effet, tous les blocs subtélomériques humains étudiés jusqu'à présent font preuve de variabilité interindividuelle de par leur emplacement chromosomique et par leur nombre de copies génomiques [Mefford et Trask, 2002]. Dans une étude récente, Linardopoulou et collègues [2005] ont démontré de la variabilité allélique pour 14 extrémités chromosomiques en analysant l'hybridation divergente de sondes spécifiques à seulement quatre blocs subtélomériques chez trois individus. Des études à plus grande échelle démontreront sans doute un taux de variation encore plus élevé.

La variabilité allélique peut être de taille et/ou de structure. Par exemple, les subtélomères 1p, 4q, 6p, 7p, 8p, 9q, 10q, 11p, 12p, 14q, 16p, 17p, 19q et 20q présentent des allèles dont la longueur varie de plus de 100 kb. Cette grande variation de taille est généralement due à l'addition de séquences d'ADN répété de type RS [Riethman et al.,

2005]. L'exemple de variabilité allélique de taille le plus remarquable du génome humain est celui du subtélomère du bras court du chromosome 16 pour lequel les tailles des trois allèles retrouvés dans la population diffèrent de 260 kb [Wilkie et al., 1991]. Pour ce qui est des subtélomères 1q, 2p, 2q, 5q, 6q, 7q, 8q, 12q, 13q, 15q, 16q, 18p, 18q, 19p et 21p, la variabilité de leurs allèles est plutôt structurelle; c'est-à-dire que l'organisation des blocs subtélomériques diffère [Riethman et al., 2005]. Par exemple, les deux allèles connus du subtélomère 19p divergent davantage par leur structure que par leur taille [Linardopoulou et al., 2005]. Les subtélomères sont donc des régions hautement polymorphiques ce qui complique davantage la cartographie ainsi que l'interprétation des résultats d'analyses cliniques de ces régions.

L'étude de la distribution du bloc subtélomérique f7501, qui contient des gènes de récepteurs olfactifs (famille *OR*), a confirmé l'évolution dynamique et récente des subtélomères humains. Le bloc f7501 est présent de sept à onze fois dans le génome humain, mais est en copie unique chez les primates. Ce bloc a donc été dupliqué et déplacé à plusieurs reprises tout au long de l'évolution divergente des chimpanzés et des humains (derniers 15 millions d'années). Chez l'humain, le bloc f7501 est présent de façon constante au niveau des subtélomères 3p, 15q et 19p. Ce patron indique que le bloc s'est intégré à ces trois chromosomes avant la migration des humains dans le monde entier. Le bloc f7501 est également présent de façon variable au niveau des subtélomères de 11 autres chromosomes qui ont probablement incorporé le bloc de façon plus récente [Trask et al.,

1998]. L'évolution et le déplacement constant du bloc f7501 est probablement un modèle applicable à l'évolution de la majorité des séquences subtélomériques humaines. En effet, des études similaires plus récentes ont identifié plusieurs autres polymorphismes de blocs subtélomériques [Der-Sarkissian et al., 2002; Martin et al., 2002; van Geel et al., 2002] et estiment qu'environ 49% des séquences subtélomériques actuelles ont été générées après l'évolution divergente des chimpanzés et des humains [Linardopoulou et al., 2005].

Deux modèles d'évolution subtélomérique ont été proposés. Dans le premier modèle, les blocs subtélomériques évoluent indépendamment les uns des autres selon leur emplacement chromosomique individuel. Des modifications nucléotidiques s'accumulent à l'intérieur des blocs et la divergence allélique ou chromosomique de la séquence nucléotidique est un indicateur de l'âge de la duplication initiale du bloc en question (Figure 4A). Cependant, des études récentes ont démontré la présence d'interactions méiotiques entre les subtélomères de chromosomes non homologues chez *S. cerevisiae* et *P. falciparum* ce qui suggère que le premier modèle ne reflète pas la réalité [Mefford et Trask, 2002]. Le deuxième modèle se base sur le fait que lors de la prophase méiotique, la recombinaison homologue est initiée par les régions télomériques [Harper et al., 2004]. Puisque les séquences subtélomériques présentent de l'homologie entre plusieurs chromosomes et peuvent grandement différer entre chromosomes homologues, les échanges de séquences subtélomériques entre chromosomes non homologues sont des événements relativement fréquents. Ce phénomène entraîne le brassage des blocs

subtélomériques lors de la recombinaison méiotique; phénomène appelé recombinaison ectopique. La recombinaison ectopique entraîne le mélange des modifications nucléotidiques qui s'accumulent à l'intérieur des blocs et rend très difficile, voir impossible, l'estimation de l'âge de la duplication initiale d'un bloc subtélomérique (Figure 4B). Ce deuxième modèle d'évolution de brassage de blocs est celui qui est considéré actuellement comme le plus plausible [Mefford et Trask, 2002].

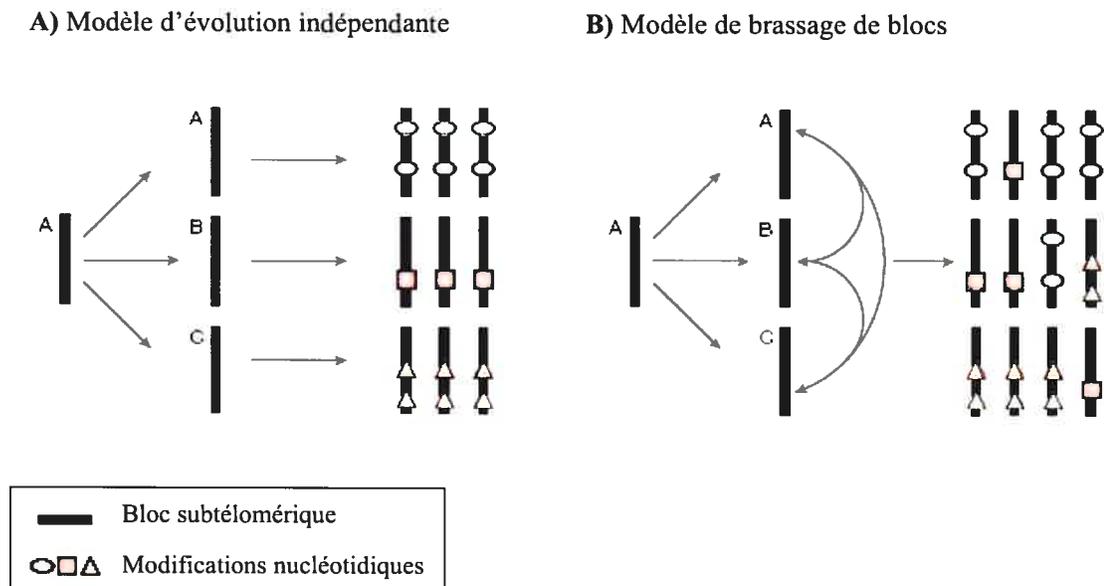


Figure 4 : Deux modèles d'évolution des régions subtélomériques. Les traits noirs représentent un bloc subtélomérique ayant été dupliqué au niveau de trois chromosomes. **A)** Dans le modèle d'évolution indépendante, le bloc subtélomérique accumule des modifications nucléotidiques spécifiques à un chromosome. **B)** Dans le modèle de brassage de blocs, le bloc subtélomérique est déplacé à plusieurs reprises au cours de l'évolution et il accumule des modifications nucléotidiques spécifiques à plusieurs chromosomes. Figure modifiée de Mefford et Trask [2002].

L'interaction des subtélomères au niveau des cellules somatiques est une autre cause probable de variabilité subtélomérique. Par exemple, les subtélomères des chromosomes 4q et 10q comportent plusieurs séquences homologues; ils s'échangent fréquemment des séquences répétées de type RS du bloc D4Z4. La taille du bloc D4Z4 de ces deux chromosomes est donc très variable d'un individu à l'autre. L'analyse des lymphocytes sanguins de certains individus a démontré une mosaïque de translocation (4;10)(qter;qter) ce qui suggère que les échanges subtélomériques peuvent se produire au niveau des cellules somatiques; par exemple, lors de la réparation des cassures double brins de l'ADN [van der Maarel et al., 2000; Linardopoulou et al., 2005]. En effet, les subtélomères 4q et 10q sont souvent associés l'un à l'autre dans les cellules interphasiques ce qui explique probablement leur taux élevé de recombinaison mitotique [Stout et al., 1999].

Pour conclure, l'insertion/délétion d'un segment d'ADN répété de type RS ou DS contribue grandement aux polymorphismes de taille des régions subtélomériques du génome humain. L'insertion/délétion d'ADN à copie unique semble beaucoup moins fréquente, mais un exemple a été identifié au niveau du chromosome 2q. Dans d'autres cas, le polymorphisme n'entraîne pas de variation de la taille du subtélomère, mais plutôt de l'organisation des blocs subtélomériques. Cette variabilité à grande échelle est causée par des mécanismes de recombinaisons ectopiques qui ont lieu principalement lors de la division méiotique et parfois lors de la mitose et de l'interphase. Ainsi, il sera probablement

impossible de documenter tous les polymorphismes subtélomériques puisque ces régions sont en évolution et variation constante [Riethman et al., 2005].

1.4 Rôles des subtélomères

Les régions subtélomériques ne semblent pas avoir de rôle commun conservé car il n'existe pas d'homologie entre les séquences subtélomériques de différentes espèces [Zakian, 1989]. De plus, des études de mutations ont démontré que la délétion de séquences subtélomériques chez *S. cerevisiae* et *F. falciparum* n'entraîne pas d'effet délétère sur la viabilité de l'organisme, ni sur la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire [Mefford et Trask, 2002]. Chez l'humain, plusieurs individus porteurs d'une délétion de la bande terminale du bras court du chromosome 16 (16p13.3) ont été identifiés. Ces individus sont atteints de l'alpha-thalassémie due à la délétion des gènes de l'alpha-globine (*HBA1* et *HBA2* qui se situent entre 162-168 kb du télomère). Les individus porteurs d'une délétion de 268 kb ou moins, pouvant entraîner la perte de jusqu'à 15 autres gènes, ne présentent aucune autre anomalie phénotypique [Daniels et al., 2001]. De plus, le chromosome 16 délété ségrègue normalement lors de la mitose et de la méiose [Flint et al., 1994; Wilkie et al., 1990a]. Toutefois, aucune expérience n'a étudié l'effet de l'absence de tous les subtélomères dans un organisme, et aucune mutation naturelle de ce type n'a été identifiée jusqu'à présent. Ainsi, il est possible que certains subtélomères soient nécessaires à la survie d'un organisme. Au cours des dernières années, les recherches se sont axées davantage sur les conséquences de la variabilité et de la plasticité des régions

subtélomériques plutôt que sur les aspects communs à tous les subtélomères ou à tous les individus. Cette approche a mené à l'identification de plusieurs rôles pour les régions subtélomériques.

1.4.1 Diversification des gènes et évolution adaptative

Le taux de duplication des gènes est quatre fois plus élevé dans les régions subtélomériques que dans l'ensemble du génome [Linardopoulou et al., 2005]. De plus, les nombreuses duplications de segments subtélomériques et le dynamisme de ces régions ont entraîné l'apparition de nouveaux gènes. Plusieurs auteurs ont suggéré que la plasticité des régions subtélomériques est en fait un mécanisme qui engendre la diversification des gènes de ces régions, permettant ainsi une évolution adaptative rapide. Des études menées sur *P. falciparum* et *S. cerevisiae* ont confirmé cette hypothèse [Mefford et Trask, 2002].

Les gènes codant les facteurs de virulence (gènes de la famille *VAR*) de *P. falciparum*, un des parasites causant la malaria, sont concentrés dans les régions subtélomériques des chromosomes du parasite. Ces gènes codent un antigène de surface variable, PFEMP-1, qui apparaît à la surface des érythrocytes infectés de l'hôte. Le fait que les subtélomères soient des régions hautement dynamiques entraîne des variations fréquentes des gènes *VAR* et ainsi de l'antigène PFEMP-1. Ce mécanisme fait en sorte que les antigènes érythrocytaires sont continuellement diversifiés et permet au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte [Scherf A, 2001; Mefford et Trask, 2002].

Chez *S. cerevisiae*, le brassage de gènes subtélomériques permet à l'organisme de s'adapter rapidement à différents environnements. Les gènes responsables du métabolisme des sucres de cet organisme s'organisent en familles distinctes (*Suc*, *Mel*, *Mal*, *Gal*, *Rtm* et autres) selon l'activité de l'enzyme qu'ils codent. Par exemple, les six gènes membres de la famille *Suc* produisent différentes formes de l'enzyme sucrose invertase [Carlson et al., 1985]. Ces familles de gènes sont localisées dans les subtélomères de *S. cerevisiae*. Les gènes membres d'une même famille ont été dispersés dans différentes régions subtélomériques par des mécanismes de recombinaison ectopique qui semblent avoir eu lieu de manière sélective [Carlson et Botstein, 1983; Louis et al., 1994; Louis, 1995]. Par exemple, les souches portant un grand nombre de gènes de la famille *Mel* portent généralement peu de gènes de la famille *Suc* et vice versa [Naumov et al., 1990]. De plus, toutes les souches utilisées pour la production de bière possèdent plusieurs gènes subtélomériques de la famille *Rtm* ce qui leur confère une résistance à la toxicité de la mélasse. Chez les souches utilisées pour la production du vin, où la résistance à la mélasse n'est pas nécessaire, les gènes de la famille *Rtm* sont rares ou absents. Les variations observées dans le complément de gènes subtélomériques des différentes souches de *S. cerevisiae* semblent donc être le résultat de l'adaptation de l'organisme à son environnement via la plasticité subtélomérique [Ness et Aigle, 1995; Denayrolles et al., 1997].

La plasticité des régions subtélomériques contribue également à la diversité des gènes humains, dont ceux de la famille *OR*. La famille *OR* est constituée de 1000 gènes dont plusieurs sont subtélomériques. Les gènes *OR* codent des récepteurs permettant la reconnaissance d'environ 10 000 odeurs différentes [Buck et Axel, 1991; Glusman et al., 2001]. Linardopoulou et collègues [2001] ont étudié 180 copies différentes d'un membre de la famille *OR* localisé au niveau du bloc subtélomérique f7501 : le gène *OR-A*. Sur les 180 copies étudiées, une seule n'était pas fonctionnelle. Ces résultats sont remarquables puisque seulement 50% des duplications de gènes résultent normalement en des copies fonctionnelles [Nadcau et Sankoff, 1997]. Les 180 copies du gène *OR-A* produisent 14 isoformes de la protéine qui diffèrent de 1 à 5 acides aminés. La variabilité de la séquence, du nombre de copies et de localisation chromosomique de ce gène a sans doute des effets phénotypiques, mais ceux-ci ne sont pas connus pour le moment [Linardopoulou et al., 2001]. Par exemple, si les isoformes du récepteur *OR-A* reconnaissent tous la même odeur, le nombre de copies du gène pourrait avoir un effet sur la sensibilité de l'individu face à l'odeur en question [Mefford et Trask, 2002]. Ces premières recherches effectuées sur les gènes de la famille *OR* démontrent la complexité de la régulation, de l'expression et de l'effet des nombreuses familles de gènes subtélomériques.

1.4.2 Contrôle de l'effet de position télomérique

Chez plusieurs organismes, les gènes situés près des séquences télomériques subissent une répression transcriptionnelle; ce phénomène est appelé effet de position

télomérique. Plusieurs auteurs ont proposé que les régions subtélomériques auraient l'effet de freiner cette répression [Mefford et Trask, 2002]. Chez *S. cerevisiae*, le taux de répression transcriptionnelle est influencé par la longueur de la séquence télomérique et par la distance séparant le gène du télomère; c'est-à-dire la taille de la région subtélomérique [Gottschling et al., 1990; Renauld et al., 1993]. De plus, l'ADN subtélomérique de *S. cerevisiae* comprend des éléments qui ont la capacité de bloquer et/ou d'accentuer l'effet de position télomérique [Fourel et al., 1999; Pryde et Louis, 1999]. Des études menées sur *D. melanogaster* ont démontré que les remaniements des régions subtélomériques avaient parfois des effets sur la transcription des gènes situés près des points de cassure [Golubovsky et al., 2001]. Une étude de Baur et al. [2001] a démontré que l'effet de position télomérique se manifestait également au niveau des cellules humaines. Dans cette étude, des cellules en culture, ayant un gène rapporteur situé à proximité du télomère, exprimaient dix fois moins ce gène que les cellules contrôles dans lesquelles le subtélomère se situait entre le gène rapporteur et le télomère. Lorsque la séquence télomérique était plus longue, l'expression du gène rapporteur des cellules tests diminuait davantage (deux à dix fois), mais pas celle des cellules contrôles. Ainsi, il est possible que les subtélomères humains aient le rôle d'inhiber l'effet de position télomérique.

1.4.3 Maintien de l'intégrité des télomères en absence de télomérase

Les séquences répétées télomériques protègent les extrémités chromosomiques contre la digestion enzymatique et les remaniements. À chaque division cellulaire, la

longueur des télomères diminue de l'ordre de 50-200 paires de bases [Lansdorp, 2000]. Cette perte de séquence télomérique à chaque phase de réplication engendre le vieillissement et éventuellement la mort cellulaire. Le maintien de l'intégrité des télomères est essentiel pour la stabilité chromosomique et pour la survie cellulaire. Chez la majorité des organismes eucaryotes, incluant l'humain, l'intégrité des séquences télomériques est maintenue par la télomérase [Greider et Blackburn, 1985]. Normalement, les cellules somatiques, ayant une durée de vie restreinte, n'expriment pas la télomérase alors que les cellules germinales, immortalisées ou tumorales expriment la télomérase en grande quantité [Colgin et Reddel, 1999; Stewart et Weinberg, 2000]. Cependant, certains types de cellules immortelles n'expriment pas la télomérase et un mécanisme alterne permet le maintien de l'intégrité de leurs télomères. Des études menées sur des cellules de levure et des cellules humaines ont démontré que ce mécanisme alterne est probablement la recombinaison inter-télomérique qui se produit grâce à l'homologie des séquences subtélomériques.

Chez la levure, lorsque certains gènes codant la télomérase ne peuvent être transcrits (*Tlc1* et *Est1*), la taille des télomères diminue progressivement et la plupart des cellules deviennent sénescents [Lundblad et Szostak, 1989; Signer et Gottschling, 1994]. Certaines cellules échappent à ce phénomène grâce à un mécanisme alterne contrôlé par Rad52, une protéine impliquée dans la recombinaison homologue [Lundblad et Blackburn, 1993]. Chez l'humain, certaines cellules tumorales n'expriment pas la télomérase, mais utilisent, elles aussi, un mécanisme alterne qu'on nomme ALT (de l'anglais *alternative*

pathway for lengthening of telomeres) [Mefford et Trask, 2002]. Dunham et collègues [2000] ont démontré que la recombinaison inter-télomérique était à la base de ce mécanisme grâce au marquage d'un subtélocère d'une lignée cellulaire ALT avec un marqueur pouvant être analysé par FISH. Après plusieurs divisions cellulaires, le marqueur avait été transmis à plusieurs autres télomères des cellules de la lignée. Lorsque le marqueur était inséré près des séquences subtélocériques, mais dans les séquences chromosomiques uniques, ce dernier n'était pas transmis à d'autres chromosomes. Ces résultats démontrent que seul l'ADN subtélocérique et télomérique est impliqué dans la recombinaison homologue du mécanisme ALT.

1.5 Effets pathologiques des remaniements subtélocériques

Les échanges de matériel chromosomique entre les subtélocères de chromosomes non homologues surviennent fréquemment lors de la méiose et possiblement lors de la mitose et de l'interphase [Speed, 1988; van der Maarel et al., 2000; Linardopoulou et al., 2005]. Lorsque ces remaniements sont confinés aux régions subtélocériques, il en résulte habituellement des effets bénéfiques tels que discutés dans les sections précédentes. Toutefois, les subtélocères sont des régions riches en gènes et les points de cassure des remaniements peuvent parfois altérer la fonction de ces gènes. De plus, l'appariement méiotique de séquences subtélocériques présentant de l'homologie peut entraîner des remaniements de plus grande taille au niveau de séquences répétées présentes sur tous les chromosomes, telles que les séquences *Alu*. Ainsi, l'échange de séquences chromosomiques

spécifiques résulte parfois en des translocations réciproques équilibrées entre chromosomes non homologues (Figure 5A) [Mefford et Trask, 2002]

La ségrégation normale des chromosomes de la cellule méiotique portant un tel remaniement peut se faire de manière à produire quatre types de gamètes : 1) porteurs des deux chromosomes normaux (Figure 5B I), 2 et 3) porteurs d'un des deux chromosomes remaniés (dérivé de translocation) et de l'autre chromosome normal (Figure 5B II et III) ou bien 4) porteurs des deux chromosomes remaniés (translocation équilibrée) (Figure 5B IV). Les gamètes de la première possibilité sont tout à fait normaux et les gamètes de la quatrième possibilité possèdent un complément chromosomique équilibré qui n'entraîne généralement pas d'effet phénotypique. Les gamètes de la deuxième et troisième possibilité possèdent des compléments chromosomiques déséquilibrés qui résulteront en une monosomie partielle du chromosome remanié et une trisomie partielle du chromosome normal suite à la fécondation. Ainsi, ces gamètes pourraient entraîner des effets phénotypiques néfastes sur la descendance. La sévérité du phénotype dépend de la taille du segment chromosomique remanié ainsi que du nombre de gènes et de la nature des gènes impliqués.

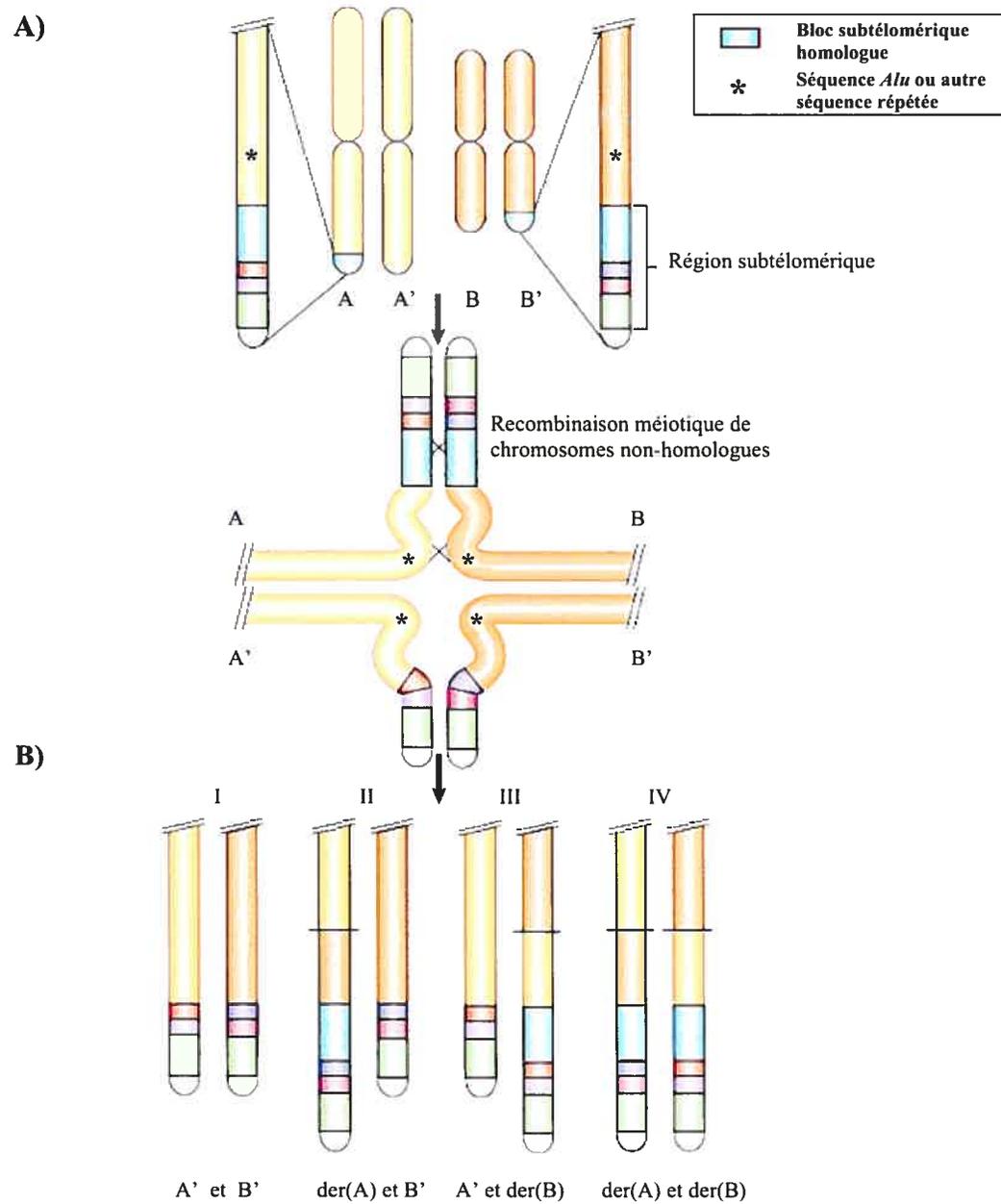


Figure 5 : Mécanisme de formation des remaniements subtélomériques lors de la méiose. **A)** Il y a recombinaison méiotique entre chromosomes non homologues via l'appariement des séquences subtélomériques homologues. **B)** Les gamètes produits peuvent avoir un complément chromosomique normal (I), anormal mais équilibré (IV) ou anormal et déséquilibré (II et III). Figure modifiée de Mefford et Trask [2002].

Les remaniements subtélomériques sont de plus en plus associés à des syndromes génétiques dysmorphiques : syndrome de délétion 1(p36) [Salvotinek et al., 1999], syndrome de Wolf-Hirschhorn (4p) [Altherr et al., 1991; Goodship et al., 1992], syndrome de dystrophie musculaire facioscapulohumérale (4q) [Wijmenga et al., 1992; Van Deutekom et al., 1993], syndrome du cri-du-chat (5p) [Overhauser et al., 1989], alpha-thalassémie avec retard mental (16p) [Lamb et al., 1989; Wilkie et al., 1990b], syndrome de Miller-Dicker (17p) [Kuwano et al., 1991] et syndrome de délétion 22(q13) [Phelan et al., 2001]. Ces remaniements sont souvent cryptiques, c'est-à-dire de trop petite taille (< 1-2 Mb) pour être détectés lors de l'analyse cytogénétique standard. L'effet pathologique des remaniements subtélomériques ne peut donc pas être évalué uniquement par l'étude du caryotype. Grâce aux techniques de cytogénétique moléculaire, la prévalence des remaniements subtélomériques chez des patients présentant des anomalies phénotypiques peut maintenant être évaluée. Les populations de patients actuellement d'intérêt sont celles qui présentent un risque élevé d'anomalies chromosomiques, mais pour qui l'étiologie demeure généralement inconnue.

La technique de marquage chromosomique de routine utilisée dans les laboratoires de cytogénétique clinique est le marquage en bandes G. Ce type de marquage ne révèle pas toujours les remaniements qui affectent des bandes avec une coloration de même intensité. Ceci présente un problème particulier pour la sensibilité de l'analyse des extrémités chromosomiques puisque les subtélomères sont généralement pâles en bandes G. La

sensibilité de l'analyse chromosomique varie également avec le niveau de résolution obtenue; c'est-à-dire la longueur des chromosomes. Lorsque la résolution chromosomique est faible, il est difficile de détecter les remaniements de petite taille tels que ceux des régions subtélomériques. Ce manque de sensibilité est particulièrement marqué pour les tissus où le niveau de résolution moyen obtenu est moindre. C'est le cas des cellules du liquide amniotique (amniocytes) utilisées pour le diagnostic prénatal où l'analyse cytogénétique standard atteint un niveau de résolution de 400 bandes en comparaison de 500-550 bandes pour les lymphocytes sanguins généralement utilisés pour le diagnostic en postnatal. La quantité d'ADN contenue dans une bande cytogénétique varie selon le niveau de résolution. Par exemple, à une résolution de 400 à 450 bandes, une bande chromosomique contient environ 10 Mb d'ADN, tandis que lors d'une étude à haute résolution de 600 à 850 bandes, la limite de détection cytogénétique se situe entre 2 et 5 Mb d'ADN.

Pour détecter les remaniements chromosomiques cryptiques, des techniques de cytogénétique moléculaire doivent être utilisées. La méthode la plus accessible aux laboratoires de cytogénétique clinique est actuellement le FISH. Cette technique consiste en l'hybridation d'une sonde d'ADN spécifique marquée par un fluorochrome avec l'ADN des chromosomes étalés sur une lame (Figure 6). Les sondes cytogénétiques sont généralement produites à partir de cosmides (taille moyenne de 40 kb), de chromosomes artificiels de phage P1 (PACs, de l'anglais, *phage P1-based artificial chromosome*) (taille de 100-300

kb) de chromosomes artificiels bactériens (BACs, de l'anglais *bacterial artificial chromosome*) (taille de 100-300 kb) ou de chromosomes artificiels de levures (YACs, de l'anglais *yeast artificial chromosome*) (taille pouvant aller jusqu'à 1Mb).

Préparation chromosomique sur lame

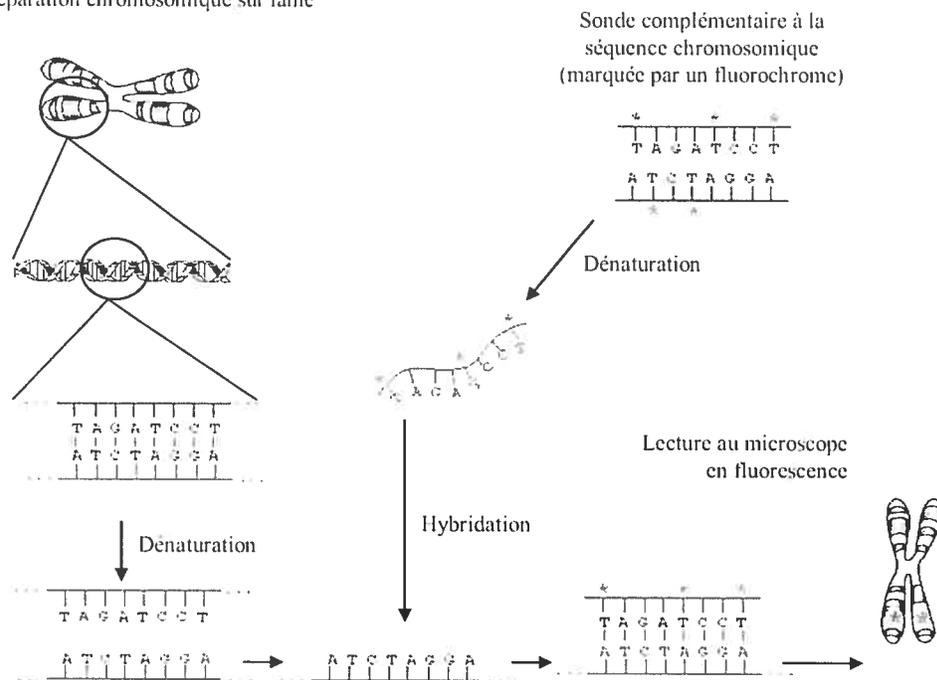


Figure 6: Principe de la technique de FISH. Figure modifiée de *MonMedLine* 2000 [<http://www.monmedline.com/medlegiinsan.html>]

Une première série complète de sondes subtélomériques spécifiques pour la séquence unique la plus distale possible de chaque bras chromosomique a été développée et mis en marché en 1996. Cette première génération de sondes était constituée majoritairement de clones de type cosmide et de quelques clones de type PAC. Comme les régions subtélomériques présentent beaucoup d'homologie et de polymorphisme, la petite taille de ces sondes faisait en sorte qu'elles manquaient de spécificité. Effectivement, quelques polymorphismes (2q, Xp, Yp) et plusieurs hybridations croisées (5p avec le bras p de chromosomes acrocentriques, 5q avec le centromère de chromosomes acrocentriques, 8p avec 1p, 11p avec 17p ainsi que 12p avec 6p et 20q) ont été rapportés pour la première génération de sondes subtélomériques. Une deuxième génération de sondes a par la suite été développée, cette fois uniquement à partir de clones de type P1 et de type BAC. Ces sondes sont d'une taille moyenne de 100 kb et présentent plus de spécificité, sans diminuer pour autant leur sensibilité. Cependant, en raison de la plasticité structurelle des subtélomères, les sondes hybrident à une distance variable (8-600 kb) du télomère pour chaque chromosome ce qui fait que les remaniements subtélomériques dont les points de cassure sont plus distaux que les loci spécifiques des sondes ne seront pas détectés par le FISH. De plus, le FISH ne permet pas la détection des duplications de petite taille, particulièrement dans le FISH métaphasiques alors que l'ADN est à son état le plus condensé. Ainsi, la limite de détection des sondes subtélomériques doit être considérée lors de l'interprétation des résultats d'analyse [Ning et al., 1996; Knight et al., 1997, Knight et Flint, 2000].

1.5.1 Les remaniements subtélomériques et le retard mental

Le retard mental est un handicap commun qui affecte environ 3% de la population. L'analyse cytogénétique standard détecte des anomalies chromosomiques chez environ 40% des patients avec un retard mental sévère et chez 10-20% des patients avec un retard mental modéré [Flint et al., 1995]. Au cours des dernières années, plusieurs études ont rapporté une fréquence élevée de remaniements subtélomériques chez les patients avec retard mental d'étiologie indéterminée, associé ou non à des traits dysmorphiques et des malformations congénitales, pour lesquels l'analyse cytogénétique standard était normale [Flint et al., 1995; Knight et al., 1999; Rossi et al., 2001; Baker et al., 2002]. La fréquence moyenne rapportée est de 6% [Biesecker, 2002] et ce chiffre a été confirmé dans notre population par une étude multicentrique québécoise menée par l'Axe de cytogénétique du Québec du Réseau de médecine génétique appliquée entre 2000 et 2004 [Frédérique Tihy et Emmanuelle Lemyre. Remaniements subtélomériques : du postnatal au prénatal. 6^e Journées Génétiques, RMGA, mai 2006).

L'analyse des régions subtélomériques par FISH sur les chromosomes de lymphocytes sanguins fait maintenant partie de l'investigation de routine du retard mental d'étiologie inconnue. Toutefois, les critères cliniques de l'analyse ne sont pas encore bien établis en raison du phénotype très variable des patients porteurs de ce type de remaniement. Les signes cliniques rencontrés peuvent aller d'un léger retard de développement à un retard mental sévère avec malformations congénitales majeures.

Toutefois, il semble exister une corrélation entre la sévérité du phénotype et la fréquence des remaniements subtélomériques. En effet, les patients avec retard mental sévère et traits dysmorphiques sont plus souvent porteurs de remaniements subtélomériques que les patients avec retard mental léger [Knight et al., 1999]. De plus, aucune anomalie subtélomérique n'a été détectée dans les deux cohortes de 72 et 104 individus autistes étudiées jusqu'à présent [Battaglia et Bonaglia, 2006; Wassink et al. 2006]. Ainsi, des systèmes de pointage ont été suggérés par de Vries et al. [2001] et Walters et al. [2004] pour tenter de standardiser les critères d'analyse subtélomérique pour les patients avec retard mental. Cependant, aucun de ces deux systèmes n'a fait preuve d'une sensibilité adéquate. Le défi actuel des cliniciens et des cytogénéticiens est de raffiner la sélection des patients admissibles à l'analyse.

1.5.2 Les remaniements subtélomériques et les avortements spontanés à répétition

Des avortements spontanés à répétition surviennent chez environ 2% des femmes fertiles [Stirrat, 1990]. Des remaniements chromosomiques équilibrés sont diagnostiqués chez 2-5% des couples présentant des avortements spontanés à répétition [Jacobs et al., 1992]. Chez les individus porteurs d'un remaniement chromosomique équilibré, une grande proportion des gamètes produits a un complément chromosomique déséquilibré pouvant être transmis à la progéniture. Ce phénomène peut entraîner des problèmes de fertilité, des avortements spontanés, un bébé mort-né ou la naissance d'un enfant avec anomalies [Jacobs et al., 1975].

Afin de vérifier s'il existe un lien entre les avortements spontanés répétés et les anomalies subtélomériques, des études ont été menées sur des couples individuels et sur quelques cohortes de patients. Ces études ont démontré que la fréquence des remaniements subtélomériques ne semble pas être plus élevée dans cette population de patients que dans la population contrôle rapportée par Joyce et al. en 2001 [Benzacken et al., 2002; Fan et Zhang, 2002; Cockwell et al., 2003]. Dans cette population contrôle de 150 individus, des anomalies subtélomériques ont été détectées chez deux individus (1,3%) apparemment phénotypiquement normaux : une délétion 4qter chez un individu dont la mère était porteuse du même variant ainsi qu'un dérivé Y d'une translocation (Y;17)(pter;q25.3) chez un individu dont la famille était porteuse d'une translocation (11;17)(pter;pter) [Joyce et al. en 2001].

Ces résultats suggèrent que les remaniements subtélomériques ne sont probablement pas impliqués dans le développement d'anomalies létales pour l'embryon ou le fœtus, ce qui peut être attribué à leur petite taille. En effet, la viabilité d'un fœtus ayant hérité d'un complément chromosomique déséquilibré varie en fonction du pourcentage du génome impliqué. Les compléments chromosomiques déséquilibrés viables ont généralement une petite taille : inférieure à 5% du génome haploïde total pour les trisomies et inférieure à 3% du génome haploïde total pour les monosomies [Cohen et al., 1994]. Vu la petite taille des remaniements subtélomériques, il n'est pas surprenant que ces derniers ne soient pas fréquemment en cause chez les couples avec avortements spontanés à répétition.

1.5.3 Les remaniements subtélomériques et les malformations congénitales

Les malformations congénitales surviennent de façon fréquente et constituent une cause majeure de morbidité et de mortalité infantile au Canada. La fréquence des malformations congénitales à la naissance a été estimée à 3% [Lemyre et al., 1999]. De plus, selon les dernières études statistiques de l'Institut Canadien en Santé Infantile [2000], le taux d'anomalies congénitales était deux fois plus élevé au Québec que la moyenne canadienne en 1996. Les anomalies congénitales sont donc responsables d'une grande proportion des hospitalisations chez les bébés et les enfants de notre population. L'étiologie de ces malformations est variable, mais demeure le plus souvent inconnue malgré des investigations complexes : mutations monogéniques (~20% des patients), anomalies chromosomiques (~10-20% des patients), infections virales (~2-10% des patients) et idiopathiques (> 50% des patients) [Queißer-Luft et al., 2002]. Un diagnostic spécifique permet un meilleur suivi des patients affectés et aide à l'évaluation de leur pronostic et du risque de récurrence. L'absence de diagnostic limite le conseil génétique pouvant être offert aux familles concernées.

La majorité des malformations congénitales peuvent maintenant être diagnostiquées de façon prénatale grâce à l'évolution des technologies échographiques. L'analyse cytogénétique standard des cellules du liquide amniotique fait partie de l'investigation de routine des malformations fœtales et détecte une anomalie chromosomique chez environ

18% des fœtus affectés. Dans les cas de malformations fœtales multiples, la fréquence d'anomalies chromosomiques peut atteindre 29% [Eydoux et al., 1989].

Puisque plusieurs patients avec retard mental porteurs de remaniements subtélomériques avaient également des traits dysmorphiques et des malformations congénitales, il nous semblait possible que ces remaniements jouent un rôle dans le développement des malformations fœtales. Quelques cas de remaniements subtélomériques avaient été rapportés chez des fœtus avec malformations multiples [Kilby et al., 2001; Souter et al., 2003], mais leur prévalence n'avait pas encore été étudiée dans cette population de patients. En 2005, un autre cas a été publié [Iqbal et al., 2005] ainsi qu'une étude de cohorte utilisant l'hybridation génomique comparative (CGH, de l'anglais *comparitive genomic hybridization*) sur micro-puces rapportant une fréquence d'anomalies subtélomériques cryptiques de 4-6% dans une population de 49 fœtus avec malformations multiples [Le Caignec et al., 2005]. Cette fréquence n'a pas encore été confirmée par d'autres études.

Section 2 : Hypothèse et objectifs

2.1 Hypothèse

Les déséquilibres chromosomiques causent très souvent un retard mental. Il en est de même pour les remaniements subtélomériques cryptiques déséquilibrés qui sont diagnostiqués chez environ 6% des patients avec retard mental et caryotype standard normal. Un grand nombre des patients porteurs de tels remaniements présentent également des traits dysmorphiques et des malformations congénitales [Flint et al., 1995; Knight et al., 1999; Rossi et al., 2001; Baker et al., 2002]. De plus, une proportion significative de fœtus avec malformations à l'échographie développera un retard mental. Ainsi, il existe possiblement un chevauchement entre les phénotypes de ces deux populations. Il nous a donc semblé intéressant d'investiguer la pertinence de recourir à l'analyse par FISH des régions subtélomériques chez les fœtus avec malformations dont le caryotype ne révèle pas d'anomalie.

Nous avons établi l'hypothèse que les remaniements subtélomériques cryptiques peuvent être la cause de malformations fœtales majeures diagnostiquées à l'échographie et que leur fréquence est semblable ou supérieure au 6% des études postnatales puisque la résolution de l'analyse cytogénétique standard sur amniocytes est inférieure à celle sur les lymphocytes sanguins.

2.2 Objectifs

Dans un premier temps, nous avons voulu établir la faisabilité technique de l'analyse des régions subtélomériques par FISH sur les amniocytes cultivés *in situ* (directement sur des lames de microscopie) à l'aide d'une trousse multisondes. Ceci nous permettait de déterminer si l'analyse pouvait s'effectuer sur le liquide amniotique ou si elle nécessitait le prélèvement du sang fœtal par cordocentèse qui est une technique beaucoup plus invasive et risquée pour le fœtus.

Dans un deuxième temps, nous voulions 1) établir la fréquence des remaniements subtélomériques chez les fœtus avec malformations majeures diagnostiquées à l'échographie et ayant un caryotype standard normal à une résolution minimale de 400 bandes; 2) déterminer l'origine parentale des remaniements identifiés au cours de l'étude afin de raffiner le conseil génétique offert aux familles concernées; 3) cartographier les points de cassure des remaniements trouvés à l'aide de BACs afin d'établir des corrélations génotype-phénotype pour chacun des fœtus concernés et 4) ajouter des données sur les polymorphismes sans conséquence clinique des régions subtélomériques détectables par FISH.

Section 3 : Article

Prenatal Detection of Subtelomeric Rearrangements by Multi-subtelomere FISH in a Cohort of Fetuses with Major Malformations.

American Journal of Medical Genetics Part A 140A:2768-2775 (2006)

Jennifer Gignac^{1,2,3}, Karine Danis^{1,2}, Frédérique Tihy^{1,2}, Emmanuelle Lemyre^{1,2,3}

1. Laboratoire de cytogénétique prénatale, Service de génétique, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada.
2. Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada.
3. Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding author: Dr. Emmanuelle Lemyre

CHU Sainte-Justine, Service de génétique médicale, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, H3T 1C5, Québec, Canada

Telephone: 514-345-4727

Fax: 514-345-4766

E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Cryptic unbalanced subtelomeric rearrangements have been identified as an important contributor (~6%) to the etiology of mental retardation and dysmorphism. Our objective was to study the role of these rearrangements in the development of fetal malformations. Multi-subtelomere FISH was performed on cells from 48 fetuses with major malformations diagnosed by prenatal ultrasound with a normal karyotype at a minimal 400 band resolution. We developed a method of performing multi-subtelomere FISH on a single slide of amniocyte metaphase spreads. We identified five subtelomeric abnormalities: two derivative chromosomes inherited from a parent carrying a balanced translocation, two known polymorphisms and one novel familial variant. These results show a similar frequency (4%) of clinically significant subtelomeric rearrangements to that found in children with multiple malformations. This study adds to a growing number of reports of cryptic subtelomeric rearrangements associated with congenital malformations and highlights the relevance and technical feasibility of multi-subtelomere FISH screening of prenatal samples.

INTRODUCTION

Congenital malformations are an important cause of morbidity and mortality in newborn infants and are diagnosed in about 3% of the population. Technological evolution of ultrasound diagnosis has made it possible to detect most major malformations prenatally. Standard cytogenetic analysis of amniotic fluid cells is part of the routine investigation of these congenital malformations and reveals chromosomal aberrations in about 18% of the affected fetuses [Eydoux et al., 1989]. In cases of polymalformations, the frequency of chromosomal abnormalities rises as high as 29% [Eydoux et al., 1989]. However, in more than half of the patients, the etiology of congenital malformations remains unclear. This limits the evaluation of the prognosis and the recurrence risk. Cryptic subtelomeric rearrangements have been identified as a significant cause of mental retardation and malformations in children with a normal standard resolution karyotype [Flint et al., 1995; Knight et al., 1999; Rossi et al., 2001; Baker et al., 2002]. Previous studies have reported the molecular identification of subtelomeric rearrangements in this population of patients with an average detection rate of 6% [Biesecker, 2002]. Recently, Le Caignec et al. [2005] reported a frequency of 8-10% of chromosomal imbalances in a cohort of 49 fetuses with multiple malformations using array-based comparative hybridization (CGH) and about half of these (4-6%) were subtelomeric. These results have not yet been confirmed by other studies.

The aim of our study was to investigate the role of subtelomeric rearrangements in the development of fetal malformations. Subtelomeric abnormalities can be detected using

various molecular technologies including multi-subtelomere fluorescence *in situ* hybridization (FISH), array-based CGH and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) (reviewed by Rooms et al., [2005]). As array-based CGH is not available to most clinical laboratories due to the high cost and equipment required [Rooms et al., 2005], we chose multi-subtelomere FISH to screen for subtelomeric abnormalities. We adapted a multiprobe lymphocyte FISH assay for use in amniocytes, because amniotic fluid specimens are limited in volume and contain few cells.

MATERIALS AND METHODS

Patient selection

Sixty-three fetuses with major fetal malformations that were referred to our laboratory for standard prenatal cytogenetic analysis were recruited for this study between 2002 and 2005. For all patients, 400 band resolution cytogenetic analysis was performed and was normal. If the fetus had cardiac abnormalities, 22q11.2 FISH was performed. As the clinical relevance of some subtelomeric variants is not yet well understood, the parents were informed that the results of the study would not be available to them in the process of making a decision concerning the current pregnancy, but would be available to them later on. They were then asked to sign a consent form allowing the use of the backup cultures of amniocytes for this study. This study was approved by the Research Ethics Board.

Subtelomere FISH

Multi-subtelomere FISH was performed on *in situ* amniocyte subcultures from T25 flasks. “Epithelial cell-like” colonies in the flasks were eliminated with a cell scraper. The amniocytes were trypsinized and inoculated onto the surface of four to eight slides. The subcultures were incubated for 48 hours and harvested according to standard protocols.

We used a subtelomere multiprobe FISH kit (*Multiprobe-T, Cytocell Technologies*). For the first 20 amniotic fluid samples, the slides underwent the FISH pre-treatment recommended by the manufacturer. We then modified the protocol to adapt the use of the device to amniocytes as follows: slides were first washed in a 2 x SSC solution at 60 °C for 2 minutes and incubated in a pepsin (P7000, *Sigma-Aldrich*) solution (0.5mg/mL in 0.01 M HCl) at 37 °C for 4-6 minutes depending on the amount of cytoplasm and debris observed in contrast phase microscopy. Slides were then rinsed and fixed through a series of PBS, formaldehyde (F1635, *Sigma-Aldrich*)/PBS 2.5%, and then PBS solutions at room temperature for 5 minutes each. Finally, slides were dehydrated according to standard protocols. The slides were then divided into 24 sections with a diamond pencil and hybridization of the multiprobe device was performed according to the manufacturer’s instructions. If the results were ambiguous or when subtelomeric rearrangements needed to be confirmed, FISH was performed on a second slide with specific probes (*Cytocell Technologies or Vysis*). If available, peripheral blood lymphocytes from the parents and/or other relatives were studied when a subtelomeric rearrangement was found.

Other FISH studies

Bacterial artificial chromosome (BAC) clones mapping to the regions of interest were used to map the breakpoints of the rearrangements. These included: RP11-483K13, RP11-404P21, RP11-872J21, RP11-487K10, RP11-68I8, RP11-111F22 and RP11-128L1 for 14qter as well as RP11-457K7, RP11-542M13, CTB-8A9, RP11-863P13, RP11-21B21, RP11-46C24, RP11-7D23 and RP11-133L7 for 16qter (patient 13); RP11-110K9, RP11-118M12, RP11-475G3 and RP11-47F2 for 2qter as well as RP11-158L12, RP11-205M16, RP11-526P6 and RP11-91B1 for 12qter (patient 16); RP11-664N22, RP11-379N10 and RP11-168K7 for 2pter (patient 27) (*Invitrogen Life Technologies*). The localization of the breakpoints was estimated according to publicly available physical maps. BAC clones were cultured in 30 mL of Luria-Bertani (LB) broth containing chloramphenicol. DNA was extracted by the salting out method (*Qiagen, Inc*). DNA was then labeled with spectrumgreen-dUTP or spectrumred-dUTP (*Vysis*) using nick translation. Pre-treatment of the FISH slides was performed as described earlier and hybridization of the labeled probes was done according to standard protocols.

Electronic Databases:

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Ensembl (<http://dev.ensembl.org/index.html>)

RESULTS

Sixty-three patients were recruited for this study. We completed subtelomere FISH analysis for 48 of them. We were unable to obtain a complete result for 15 samples analyzed at the beginning of the study for various reasons (see discussion). The average age of cell cultures that produced successful results was 17 days as opposed to 32 days for the ones that were unsuccessful. Cell culture and FISH techniques were modified for 24 samples and 22 of these were successful (92%). Also, 14 samples were hybridized on the same day as the harvest and all were successful. Of the 48 samples for which we completed subtelomere analysis, 43 (90%) were normal, we identified subtelomeric rearrangements in two familial cases (4%), a novel family variant in one patient (2%) and known polymorphisms in two patients (4%). The overall frequency of clinically significant subtelomeric rearrangements in our cohort of 48 fetuses with major malformations is 4%. Details of the laboratory and clinical findings for all studied fetuses can be found in Table I.

Clinically significant subtelomeric rearrangements

Patient 13: The mother of this fetus was 27 years old and pregnant with her second child. The family history was significant for one maternal first cousin born with a congenital hand malformation. The ultrasound performed at 20 weeks of gestation revealed corpus callosum agenesis, ventriculomegaly, dorso-lumbar scoliosis, bilateral radial agenesis, rocker bottom feet and hyperflexion of fingers and toes, hydrops fetalis with increased nuchal fold measurement, possible esophageal atresia with non visualization of the stomach, truncus arteriosus with possibly anomalous great arteries and high forehead.

After having been offered genetic counselling, following the ultrasound results, the parents decided to terminate the pregnancy. The autopsy report confirmed the fetal abnormalities diagnosed by prenatal ultrasound and additional malformations were observed. These included: cystic hygroma, horseshoe kidneys, absence of pulmonary lobulation, ventricular septal defect, cleft palate, apparent hypertelorism, apparent microphthalmia, microstomia, micrognathia, pointed chin, long philtrum, short neck, high prominent forehead, low set ears and down-slanting palpebral fissures.

Multi-subtelomere FISH analysis detected the following rearrangement: ish der(14)t(14;16)(qter;qter)(D14S1420-,240G10+) (Figure 1A-B). BAC analysis localized the breakpoints to 14q32.2, between clones RP11-487K10 (96.9 Mb) and RP11-68I8 (97.8 Mb), at approximately 9 Mb from the telomere and to 16q24.3, between clones RP11-21B21 (87.2 Mb) and RP11-46C24 (87.7 Mb), at approximately 1 Mb from the telomere. The mother of this fetus was found to carry the balanced translocation.

Patient 16: The mother of this fetus was 22 years old and pregnant with her first child. The family history was significant for the maternal grandmother having multiple sclerosis and hydrocephalus and a maternal half-brother with polycystic kidneys and hydrocephalus. The father of the fetus also had a brother with hydrocephalus. Four ultrasounds performed between 18 and 30 weeks of gestation revealed complete corpus callosum agenesis, increased nuchal fold measurement, horseshoe kidneys with cortical cysts, right aortic arch and intra-uterine growth retardation. After genetic counselling,

following ultrasound and karyotype results, the parents decided to continue the pregnancy. The last post-natal clinical assessment at seven months of age confirmed the fetal abnormalities and additional malformations were diagnosed. These included: growth retardation (weight 6.275 kg (< 5%), length 61.2 cm (< 5%), head circumference 42 cm (< -2SD)), patent ductus arteriosus, atrial septal defect with arterial hypertension, a right multicystic dysplastic kidney, a left ectopic kidney resulting in renal failure, a right primary bronchus implantation anomaly, congenital glaucoma, hypertelorism (interpupillary distance 4.8 cm (> +2SD)), thin lips, downturned mouth and apparently small ears.

Multi-subtelomere FISH analysis detected the following rearrangement: ish der(12)t(2;12)(qter;qter)(D12S2343-,D2S2986+) (Figure 2A-B). BAC analysis localized the breakpoints to 2q37.3, between clones RP11-118M12 (241.4 Mb) and RP11-475G3 (242 Mb), at approximately 1 Mb from the telomere and to 12q24.32, between clones RP11-205M16 (126 Mb) and RP11-526P6 (126.7 Mb), at approximately 6 Mb from the telomere. The mother, maternal grandmother and maternal great grandmother of this fetus were found to carry the balanced translocation.

Novel family variant

Patient 27: The mother of this fetus was 25 years old and had had two previous miscarriages. The family history was significant for one paternal aunt with autism. An ultrasound performed at 23 weeks of gestation revealed ventricular septal defect, echogenic horseshoe kidneys with possible cortical cysts, hepatomegaly and severe polydramnios. A

fetal MRI was interpreted as suggestive of abnormal cortical gyration. After genetic counselling, following the ultrasound and karyotype results, the parents decided to continue the pregnancy. The post-natal clinical assessment confirmed the fetal abnormalities and additional malformations were diagnosed. These included: macrosomia (birth weight 4.420 kg (> 97%), birth length 54 cm (> 97%)), neonatal hypotonia, splenomegaly, hydronephrosis, atrial septal defect (type II), pectus excavatum, bifid uvula, high-arched palate, submucous cleft palate, macroglossia, as well as apparent hypertelorism, bulbous nose and macrostomia.

Multi-subtelomere FISH analysis detected the following anomaly: ish del(2)(pter)(D2S2983-, VIJyRM2052-) (Figure 3). BAC analysis localized the breakpoints to 2p25.3, between clones RP11-664N22 mapping to 137.5 Kb from the telomere and RP11-379N10 mapping to 330 Kb from the telomere. The unaffected father and paternal grandmother of this fetus were found to carry the same deletion. We concluded that this variant was not pathogenic. However, at least two genes map to the deleted region (*SHYLI* and *ACPI*). Therefore, we cannot rule out the recessive effect of these genes or the effect of maternally imprinted genes on the phenotype of the fetus.

Known polymorphisms

Patient 32: Multi-subtelomere FISH analysis detected the following variant: ish del(2)(qter)(D2S447+, D2S2986-). The parents of this fetus were not investigated since this 2qter variant is well documented [Hengstschläger et al., 2005].

Patient 34: Multi-subtelomere FISH analysis detected an enhancement of the signal on 4qter with the dJ963K6 (*Cytocell Technologies*) probe but not with the D4S2930 (*Vysis*) probe (Figure 4A-C). The parents of this fetus have not been available for investigation. A segmental dosage variant of this locus has been previously reported [Hengstschläger et al., 2005]. However, in our case, we did not observe a duplication or triplication of the signal in interphase cells.

DISCUSSION

Technical feasibility of prenatal multi-subtelomere FISH

The first objective of this study was to determine if it was possible to perform multi-subtelomere FISH on amniocytes cultured *in situ*. Of the 63 amniotic fluid samples that were available for this study, we completed subtelomere FISH analysis successfully in 48. For seven of the 15 unsuccessful assays analyzed early on in the study, we did not attempt multi-subtelomere FISH due to poor quality chromosome preparations. Therefore, successful analysis was obtained in 86% of samples where multi-subtelomere FISH was performed, but in 76% of samples overall (48/63).

Our first step towards adapting the multiprobe kit to amniocytes cultured *in situ* was to modify cell culture techniques. Amniocytes come from many different tissue types that do not all produce good quality chromosomes. We identified two cell types, resembling epithelial cells, that had a tendency to overgrow cell cultures and that did not produce good

quality chromosomes, particularly in flasks that had already been trypsinized for subculture and in older cell cultures. The overgrowth of “epithelial-like” cells was the cause of the poor quality of slides for nine of the 15 unsuccessful samples. This highlights the importance of early maintenance of cell cultures destined to subtelomere testing. To address this problem, we began to eliminate unwanted cell colonies with a cell scraper as well as maintain and subculture amniocytes early on. For three of the 15 unsuccessful samples, the slides were of good quality, but FISH was unsuccessful. Therefore, our second step towards adapting the multiprobe kit was to modify the pre-treatment of the FISH slides. We treated the slides with a pepsin/HCL solution to eliminate cytoplasm and debris that inhibit the hybridization of probes. We also noted that FISH results were of better quality when the slides were hybridized on the same day as the harvest (14/14). Overall, modification of cell culture and FISH techniques resulted in a 92% success rate (22/24).

We have determined that it is possible to perform multi-subtelomere FISH on a single slide of metaphase spreads from amniocytes cultured *in situ*. We believe the current success rate of the assay to be underestimated due to a number of early failures that occurred while adapting the device to amniocytes. In a clinical setting, in which all three conditions necessary for good quality results can be ensured: 1) young cell cultures, 2) treatment of slides with a pepsin/HCL solution prior to FISH and 3) hybridization of the device on freshly harvested metaphases, the success rate of amniocyte multi-subtelomere testing should be comparable to other well-established FISH techniques. We have recently begun to implement this approach by offering prenatal multi-subtelomere FISH in a clinical

setting. We have obtained successful results for the six samples analyzed so far and, depending on the quality of the cell cultures, we have been able to make the results available to physicians within six to 14 days of the karyotype result.

Clinically significant subtelomeric rearrangements

A total of five subtelomeric abnormalities were identified during this study: two inherited unbalanced rearrangements (patients 13, 16), two known polymorphisms (patients 32 and 34) and one novel family variant (patient 27). Of these five, two (4%) were of clinical significance. These data are consistent with the 4-6% frequency of such rearrangements detected by array-based CGH [Le Caignec et al., 2005].

Polymorphisms and family variants

We identified three subtelomeric polymorphisms in this study (6%). These results confirm those of other studies that suggest subtelomeric regions are prone to variation [Ballif et al., 2000]. This is likely due to their high content in repeat motifs [Flint et al., 1997]. These neutral polymorphisms complicate the clinical interpretation of subtelomeric abnormalities, particularly in cases of *de novo* rearrangements. Precaution should be taken when it is impossible to confirm the phenotypic significance of subtelomeric rearrangements. This is of particular importance in a prenatal diagnosis context where decisions must be taken within a timely fashion and can lead to the termination of a pregnancy. Furthermore, subtelomeric imbalances may be associated with a variable phenotype making it difficult to establish a clear relation between the chromosomal

abnormality and the fetal phenotype. It is important to identify and report novel familial variants as well as more common polymorphisms in order to establish the prevalence of these neutral rearrangements.

Subtelomere testing is currently recommended for patients presenting mental retardation/developmental delay and dysmorphism [Battaglia et al., 2003; Shevell et al., 2003]. There is an overlap of the clinical signs found in these patients and in the fetuses we have studied. Some patients with mental retardation tested for subtelomere abnormalities also have congenital malformations and it could be expected that some fetuses with malformations could also present mental retardation. However, most pregnancies with major fetal malformations are terminated making it difficult to evaluate the extent of this overlap. The malformations diagnosed in the patients described here were generally more severe than the ones seen in patients with mental retardation and it could have been expected that only large chromosomal rearrangements would have been implicated as is the case for couples with recurrent spontaneous abortions [Benzacken et al., 2002; Fan and Zhang, 2002; Cockwell et al., 2003]. However, one must consider that the standard cytogenetic resolution with amniocytes is lower than with lymphocytes [Horsman, 1994]. More studies are necessary to corroborate the 4-6% frequency of subtelomeric rearrangements, but it appears these rearrangements play an important role in the development of major congenital malformations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the “Fondation du CHU Sainte-Justine”. The authors would like to acknowledge the clinical geneticists of the “Service de génétique médicale du CHU Sainte-Justine” and the families that participated in this study as well as the “Département de pathologie du CHU Sainte-Justine” for their collaboration.

REFERENCES

- Baker E, Hinton L, Callen DF, Altree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E. 2002. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 107:285-293.
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. 2000. The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Med Genet* 67:1356-1359.
- Battaglia A and Carey JC. 2003. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet* 117C:3-14.
- Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F, Bucourt M, Uzan M, Wolf JP. 2002. Lack of submicroscopic rearrangements involving telomeres in reproductive failures. *Hum Reprod* 17:1154-1157.
- Biesecker LG. 2002. The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet* 107:263-266.
- Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ, Crolla JA. 2003. A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Hum Genet* 112:298-302.
- Eydoux P, Choiset A, Le Porrier N, Thépot F, Szpiro-Tapia S, Alliet J, Ramond S, Viel JF, Gautier E, Morichon N, Girard-Orgeolet S. 1989. Chromosomal prenatal diagnosis: study of 936 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment. *Prenat Diagn* 9:255-268.
- Fan Y-S, Zhang Y. 2002. Subtelomeric translocations are not a frequent cause of recurrent miscarriages. *Am J Med Genet* 109:154.
- Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-140.
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ. 1997. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 6:1305-1313.
- Hengstschläger M, Prusa A, Repa C, Deutinger J, Pollak A, Bernaschek G. 2005. Subtelomeric rearrangements as neutral genomic polymorphisms. *Am J Med Genet* 133A:48-52.

Horsman D. 1994. Minimum band level standards. *Appl Cytogenet* 20:59-60.

Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354:1676-1681.

Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM. 2005. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridization in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42:121-128.

Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. 2005. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: A comparison of detection methods. *Hum Mutat* 25:513-524.

Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Bricarelli FD, Bonaglia MC, Bedeschi MF, Borgatti R. 2001. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38:417-420.

Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD. 2003. Practice parameter: Evaluation of the child with global developmental delay. *Neurology* 60:367-380.

TABLES

Table I: Clinical and Laboratory Findings for the Studied Patients

Patients	Malformations diagnosed by prenatal ultrasound	Subtelomere FISH analysis
1	Cardiac malformation, macrocephaly, Dandy-Walker malformation with hydrocephaly and posterior fossa cyst	46.XX.ish subtel(41x2)
2	Pulmonary valve stenosis, severe hydrops fetalis	46.XX.ish subtel(41x2)
3	Thick myocardium, severe ascites, oligohydramnios, IUGR	46.XX.ish subtel(41x2)
4	Ventricular septal defect, conotruncal anomaly, short limbs, severe IUGR	46.XX.ish subtel(41x2)
5	Short humerus, cystic hygroma	46.XX.ish subtel(41x2)
6	Encephalocoele, microcephaly	46.XX.ish subtel(41x2)
7	Phocomelia, small thorax, possible micrognathia	46.XX.ish subtel(41x2)
8	Meningocele, Chiari malformation (type II), possibility of a foot malformation	46.XX.ish subtel(41x2)
9	Fetal akinesia, possible esophageal atresia, retrogathia, IUGR	46.XX.ish subtel(41x2)
10	Holoprosencephaly, heart malformation, hypertelorism	46.XX.ish subtel(41x2)
11	Cystic hygroma, hydrops fetalis, IUGR	46.XX.ish subtel(41x2)
12	Spina bifida, cerebellar hypoplasia, club feet, polyhydramnios	46.XX.ish subtel(41x2)
13	Corpus callosum agenesis, scoliosis, club hands, rocker bottom feet, hyperflexion of fingers and toes, hydrops fetalis, polyhydramnios, possible esophageal atresia, ventriculomegaly, possibility of abnormal great arteries, high forelead	46.XY.ish der(14)(14;16)(qter;qter)(RP11-483K13+,RP11-404P21+,RP11-872J21-,RP11-487K10+,RP11-68I8-,RP11-111F22-,RP11-128L1-,D14S1420-,RP11-457K7-,RP11-542M13-,CTB-8A9-,RP11-863P13-,RP11-21B21+,RP11-46C24+,RP11-7D23+,RP11-133L7+,240G10+)mat
14	Microcephaly, Chiari malformation (type I), small posterior fossa and subarachnoidal space, possible syndactyly	46.XX.ish subtel(41x2)
15	Choroid plexus cyst, bilateral cleft lip and palate	46.XX.ish subtel(41x2)
16	Complete corpus callosum agenesis, increased nuchal fold measurement, horseshoe kidneys with cortical cysts, right aortic arch, IUGR	46.XY.ish der(12)(2;12)(qter;qter)(RP11-158L12+,RP11-205M16+,RP11-526P6-,RP11-91B1-,D12S2343-,RP11-110K9-,RP11-118M12-,RP11-475G3+,RP11-47F2-,D2S2986+)mat
17	Ventriculomegaly, club feet, possible micrognathia	46.XX.ish subtel(41x2)
18	Cerebellar hypoplasia with vermis agenesis, supra cerebellar cyst, intracerebral calcifications, multiple intracerebral nodules	46.XX.ish subtel(41x2)
19	Posterior fossa cyst, ventriculomegaly, large bladder	46.XX.ish subtel(41x2)
20	Severe heart malformation, ascites, increased nuchal fold measurement, hyperechoic left lung	46.XX.ish subtel(41x2)
21	Severe heart malformation, two-vessel cord, oligohydramnios	46.XX.ish subtel(41x2)
22	Diaphragmatic hernia, horseshoe kidneys	46.XX.ish subtel(41x2)

Table I (continued)

Patients	Malformations diagnosed by prenatal ultrasound	Subtelomere FISH analysis
23	Hydrocephaly, thin cerebral cortex	46,XX,ish subtel(4) x2)
24	Vertebral anomaly, metatarsus adductus, rocker bottom feet, small thorax, brachycephaly, polyhydramnios, increased nuchal fold measurement, peritoneal calcification, absent nasal bone, flat facies, low set ears	46,XX,ish subtel(4) x2)
25	Vertebral anomalies, dextrocardia, transposition of great arteries	46,XX,ish subtel(4) x2)
26	Uretral valve atresia and megacystis, abdominal cystic mass	46,XX,ish subtel(4) x2)
27	Hepatomegaly, echogenic horseshoe kidneys with possible cortical cysts, ventricular septal defect, possible abnormal cortical gyration, severe polyhydramnios	46,XY,ish del(2)(pter)(D2S2983-,VIJyRM2052-,RP11-664N22-,RP11-379N10+,RP11-168K7+)pat
28	Complete corpus callosum agenesis, small cerebellum, severe hydrops fetalis, rocker bottom feet	46,XX,ish subtel(4) x2)
29	Segmentation defect with scoliosis, left hydronephrosis, urinoma	46,XX,ish subtel(4) x2)
30	Vertebral anomalies, scoliosis, hydronephrosis, hydrocephaly, meningocele, Chiari malformation (type II), club feet	46,XX,ish subtel(4) x2)
31	Hydrocephaly, heart malformation, short humerus	46,XX,ish subtel(4) x2)
32	Complete corpus callosum agenesis	46,XX,ish del(2)(qter)(D2S447+,D2S2986-)
33	Alobar holoprosencephaly, cyclopia, hydrannios	46,XX,ish subtel(4) x2)
34	Left ventricular hypoplasia, short and bowed femurs and humeri, short cubiti and radii, possible renal anomaly	46,XX,ish enh(4)(qter)(dJ963K6)
35	Small omphalocele, two-vessel cord	46,XX,ish subtel(4) x2)
36	Meningocele, severe heart malformation, vertebral anomalies	46,XX,ish subtel(4) x2)
37	Bilateral pes varus, post-axial bilateral polydactyly, oligohydramnios, possibility of low set ears	46,XX,ish subtel(4) x2)
38	Occipital encephalocele	46,XX,ish subtel(4) x2)
39	Absent right foot, left pes varus, hand flexion deformity	46,XX,ish subtel(4) x2)
40	Short limbs, short ribs, echogenic bowel, small posterior fossa, heart malformation, hypertelorism, prominent forehead	46,XX,ish subtel(4) x2)
41	Semi-lobar holoprosencephaly, posterior fossa cysts	46,XX,ish subtel(4) x2)
42	Omphalocele, hypoplastic left ventricle	46,XX,ish subtel(4) x2)
43	Omphalocele, tetralogy of Fallot, pelvic left kidney, ascites	46,XX,ish subtel(4) x2)
44	Hyperextension of left arm with club hand, flexion of right arm with normal hand position, oligohydramnios	46,XX,ish subtel(4) x2)
45	Mega cisterna magna	46,XX,ish subtel(4) x2)
46	Vertebral anomalies, right kidney hypoplasia, left utero-hydronephrosis, two-vessel cord	46,XX,ish subtel(4) x2)
47	Short limbs, hypospadias	46,XX,ish subtel(4) x2)
48	Short tibiae, humeri and radii, short and bowed femurs, echogenic bowel, choroid plexus cyst	46,XX,ish subtel(4) x2)

Legend: IUGR (Intra-uterine growth retardation)

FIGURES

Figure 1

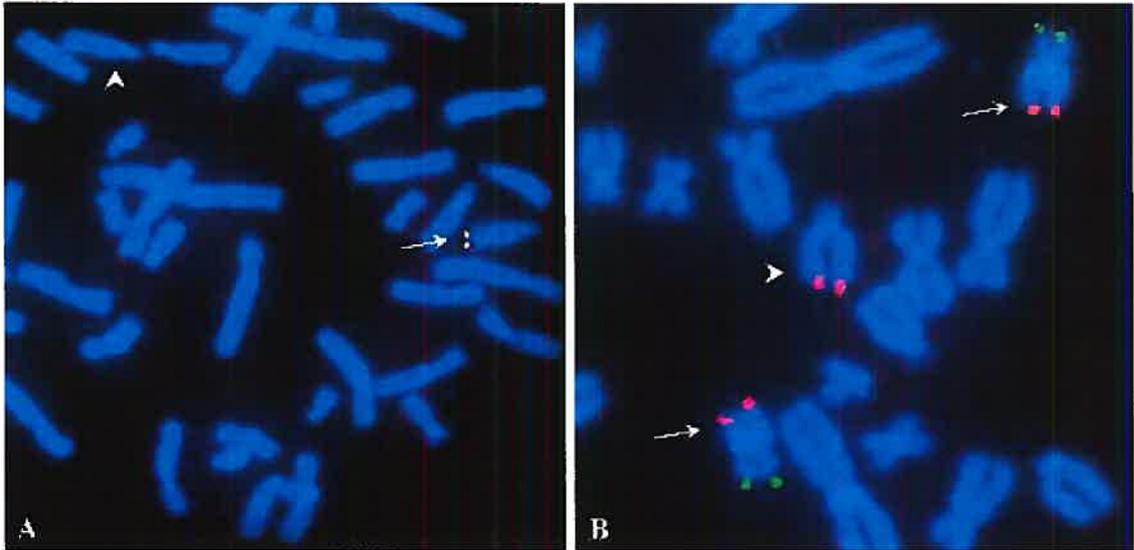


Figure 2

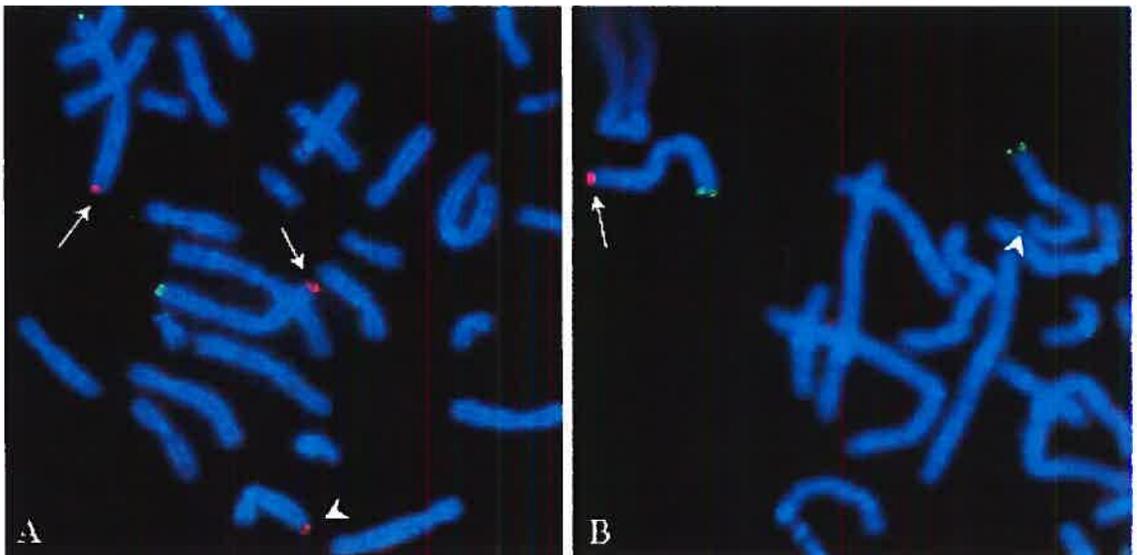
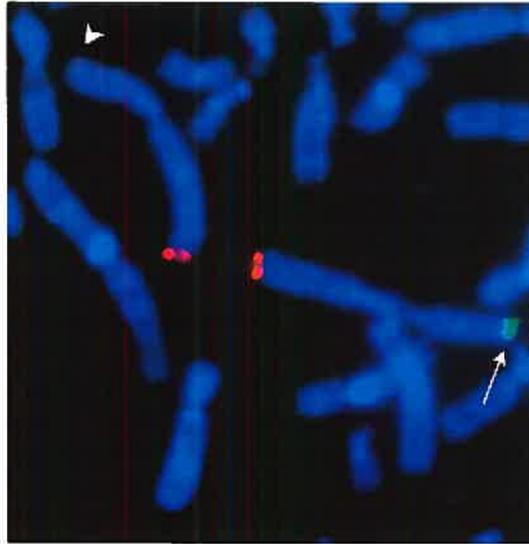
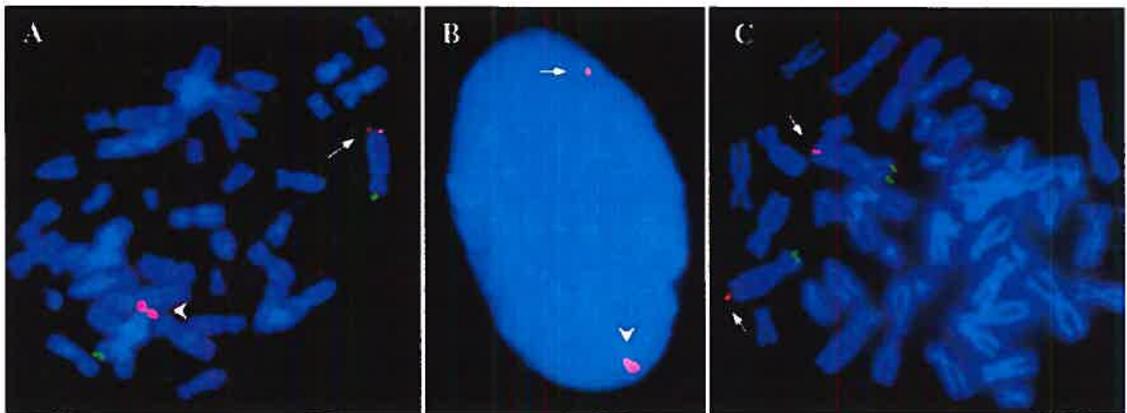


Figure 3**Figure 4**

LEGENDS

Figure 1: Multiprobe FISH analysis of patient 13. **A)** FISH of D14S1420 on one 14qter (arrow) and not on the homolog (arrowhead); **B)** FISH of 240G10 on both normal 16qter (arrows) as well as on one 14qter (arrowhead).

Figure 2: Multiprobe FISH analysis of patient 16. **A)** FISH of D2S2986 on both normal 2qter (arrows) as well as on one 12qter (arrowhead); **B)** FISH of D12S2343 on one 12qter (arrow) and not on the homolog (arrowhead).

Figure 3: Multiprobe FISH analysis of patient 27. FISH of D2S2983 on one 2pter (arrow) and not on the homolog (arrowhead).

Figure 4: Multiprobe FISH analysis of patient 34. FISH of dJ963K6 on **A)** fetal metaphase chromosomes and **B)** fetal interphase cells showing a normal signal on one 4qter (arrows) and an enhanced signal on the homolog (arrowheads); **C)** FISH of D4S2930 on fetal metaphase chromosomes showing normal signals on both 4qter (arrows).

Section 4 : Matériel et méthodes

4.1 Recrutement de patients

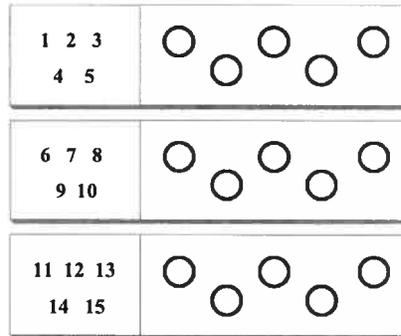
Les patientes recrutées pour cette étude étaient d'abord référées en clinique de génétique suite à la présence de malformations fœtales à l'échographie. Un prélèvement de liquide amniotique était fait pour analyse cytogénétique standard. Suivant un résultat de caryotype normal (résolution minimale de 400 bandes), les parents étaient rencontrés en conseil génétique. Le généticien demandait alors le consentement des parents pour l'utilisation des amniocytes de réserve (en flacon T-25) pour l'analyse des régions subtélomériques. En raison de la présence de polymorphismes dans ces régions, rendant l'interprétation des résultats parfois difficile, les parents devaient signer un formulaire de consentement stipulant que les résultats de l'analyse ne seraient pas disponibles pour prendre une décision sur la grossesse en cours, mais leur seraient dévoilés plus tard. Nous avons recruté de cette manière 63 échantillons de liquide amniotique ainsi que deux échantillons de sang de cordon pour un total de 65 fœtus recrutés pour l'étude.

4.2 FISH multi-subtélomérique

La série complète des sondes subtélomériques est disponible commercialement sous forme de deux trousse : la trousse *ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures* (Vysis) [<http://www.vysis.com>] et la trousse de *Cytocell Technologies* [<http://www.cytocell.com>].

Chaque trousse consiste en une série de 41 sondes subtélomériques spécifiques au bras court et au bras long de chaque chromosome avec l'exception du bras court des cinq chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22). Ceux-ci sont constitués d'ADN répété ribosomique et les remaniements de ces régions n'ont pas d'effet phénotypique. La trousse de *Vysis* est constituée de 15 mélanges de sondes. Chaque mélange est composé des sondes spécifiques au subtélomère du bras p (marquée en vert) et du bras q (marquée en rouge) d'un chromosome et parfois du subtélomère du bras p ou q d'un deuxième chromosome (marquée en jaune). Cette trousse nécessite l'hybridation d'au moins trois lames de préparation chromosomique par patient (cinq régions d'hybridation par lames) (Figure 1A). Cet aspect présente un désavantage important pour les échantillons plus pauvres en cellules, tels que les échantillons de liquide amniotique. La trousse de *Cytocell Technologies* consiste en une lamelle de verre divisée en 24 carrés. Sur chaque carré, il y a les sondes lyophilisées spécifiques au subtélomère du bras p (marquée en vert) et du bras q (marquée en rouge) d'un seul chromosome ce qui simplifie l'analyse. Cette trousse permet également l'hybridation de la série complète de sondes subtélomériques sur une seule lame de préparation chromosomique du patient ce qui économise le matériel cellulaire et diminue les délais d'analyse (Figure 1B). De plus, cette deuxième trousse est moins coûteuse que la première ce qui est un aspect important à considérer dans l'éventualité où l'analyse serait transférée dans un contexte clinique. Nous avons donc choisi d'utiliser la trousse *Multiprobe-T (Cytocell Technologies)* pour cette étude.

A) Lames d'étalements chromosomiques dénaturés



Ajout d'une mixture (1 à 15) de sondes dénaturées par région d'hybridation

Hybridation/Lavages

Analyse au microscope en fluorescence

B) Lame d'étalement chromosomique

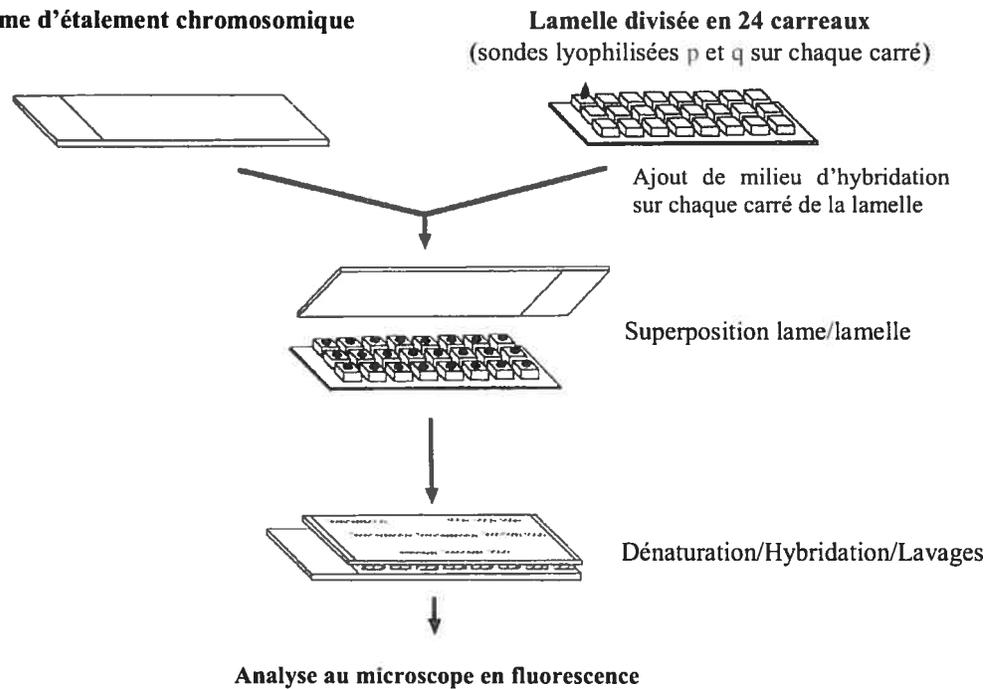


Figure 1 : Deux trousse commerciales de sondes subtélomériques. A) Trousse *ToTelVysion Multi-color DNA Probe Mixtures (Vysis)* qui nécessite l'hybridation d'au moins trois lames d'étalement chromosomique du patient. B) Trousse *Multiprobe-T (Cytocell Technologies)* qui permet l'hybridation de toutes les sondes subtélomériques sur une seule lame d'étalement chromosomique du patient. Figure modifiée de Knight et Flint [2002].

La trousse multisondes que nous avons utilisée est conçue pour les chromosomes de lymphocytes sanguins. Nous avons donc dû modifier le protocole du fabricant pour adapter la trousse aux amniocytes cultivés *in situ* pour les 63 échantillons de liquide amniotique. Le protocole adapté aux amniocytes est décrit sommairement dans l'article (Section 3, page 40). Ici, nous abordons chaque étape de la mise au point de manière plus détaillée, la détermination de la faisabilité technique de l'analyse subtélomérique sur les chromosomes d'amniocytes étant le premier objectif de cette étude.

4.2.1 Mise au point de la technique de culture cellulaire

Pour que l'hybridation de toutes les sondes de la trousse soit possible, les cellules doivent être disposées sur la surface entière des lames de façon à ce qu'il y ait des chromosomes vis-à-vis de chaque carré de la lamelle. Puisque les lymphocytes poussent en suspension, il est possible d'obtenir un étalement adéquat en déposant une goutte de suspension cellulaire vis-à-vis de chaque carré de la lamelle. Les amniocytes, qui ne poussent pas en suspension, donnent une meilleure qualité lorsqu'ils sont cultivés directement sur des lames de microscopie. Ainsi, il est difficile d'obtenir des lames où la croissance des amniocytes est homogène et recouvre la surface entière des lames. De plus, les amniocytes proviennent de plusieurs tissus différents et ne produisent pas tous des chromosomes de bonne qualité. Nous avons donc dû modifier la méthode de culture cellulaire pour assurer l'obtention de lames de qualité homogène.

Les lames utilisées pour l'hybridation avec la trousse multisondes ont été faites à partir de cultures d'amniocytes de réserve en flacons T-25 puisque les parents étaient généralement sollicités pour l'étude à la suite de l'analyse cytogénétique standard. Il était important que les cellules recouvrent la surface entière des lames, sans que les cultures ne deviennent trop confluentes, afin d'obtenir des étalements chromosomiques adéquats. Pour assurer ces conditions, nous avons dû modifier la technique de passage des cultures de réserves sur lames de microscopie. Nous avons d'abord augmenté le facteur de dilution des amniocytes trypsinisés pour le passage d'environ trois fois. Nous avons ensuite modifié la technique d'ensemencement de manière à ce que la suspension cellulaire recouvre la surface entière des lames pour assurer une croissance homogène des amniocytes. Par ailleurs, au cours de l'étude, nous avons identifié deux types de cellules qui ressemblaient aux cellules épithéliales et qui ne produisaient pas des étalements chromosomiques de bonne qualité. Ces cellules avaient tendance à envahir les cultures et inhiber la croissance des autres cellules, produisant des chromosomes adéquats. Ce phénomène s'observait particulièrement dans des flacons qui avaient déjà été trypsinisés et dans les vieilles cultures cellulaires que nous ne traitons pas en attente du consentement des parents. Suite à cette observation, nous avons développé une méthode de sélection du meilleur type d'amniocytes en éliminant les colonies cellulaires de type épithélial à l'aide d'un grattoir. Nous avons également commencé à entretenir les cultures de cette façon plus précocement et à conserver les préparations chromosomiques à -20°C jusqu'à l'analyse subtélomérique

par FISH. La récolte et l'étalement des chromosomes ont été faits selon les méthodes standard utilisées au laboratoire.

Pour ce qui est des deux échantillons de sang de cordon, la culture et la récolte ont été faites selon des méthodes standard. Les chromosomes de lymphocytes ont ensuite été étalés en déposant une petite goutte (4 μ L) de suspension cellulaire vis-à-vis de chaque carré de la lamelle multisondes selon les recommandations du manufacturier (*Multiprobe T, Cytocell Technologies*).

4.2.2 Mise au point de la technique de FISH

La croissance *in situ* des amniocytes entraîne une accumulation de débris sur les lames. De plus, la croissance plutôt confluyente des cellules fait en sorte que le cytoplasme n'est pas complètement éliminé lors de l'étalement des chromosomes. La présence de débris cellulaires et de cytoplasme à la surface des lames diminue l'hybridation des sondes. Ainsi, nous avons dû modifier le prétraitement des lames pour le FISH multi-subtélomérique.

La principale modification que nous avons effectuée est le prétraitement des lames avec une solution de pepsine (0,5 mg/mL dans HCl 0,01 M) . Ce traitement élimine les substances protéiques présentes à la surface des lames et permet l'hybridation des sondes subtélomériques. Le temps d'incubation (quatre à six minutes) des lames dans la solution

de pepsine dépendait de l'appréciation au microscope en contraste de phase de la quantité de cytoplasme et de débris.

Au cours de l'étude, nous avons également observé que l'hybridation des sondes était de meilleure qualité lorsque les lames étaient hybridées le même jour que la récolte des chromosomes ou avant d'avoir été entreposées à -20°C . Toutefois, ces deux derniers critères étaient difficiles à respecter dans un contexte de recherche puisque nous devons attendre le consentement des parents avant de pouvoir effectuer l'analyse des subtélomères.

Pour ce qui est des échantillons de sang de cordon, nous avons remarqué que le protocole recommandé par le manufacturier (*Multiprobe-T, Cytocell Technologies*) ne donnait pas une hybridation de bonne qualité. Nous avons donc tenté d'utiliser le protocole d'hybridation que nous avons mis au point pour les amniocytes ce qui n'a pas donné de meilleurs résultats. Finalement, nous avons effectué l'analyse des sangs de cordon en hybridant la trousse multisondes selon les recommandations du manufacturier (*Multiprobe-T, Cytocell Technologies*), mais avec des lames fraîchement étalées ce qui a amélioré légèrement la qualité des résultats.

4.3 Analyse des points de cassure

Nous avons analysé les points de cassure des remaniements subtélomériques identifiés au cours de notre étude, par FISH, à l'aide de BACs. La sélection des BACs s'est

faite à l'aide des cartes génomiques des régions subtélomériques concernées dans deux bases de données : *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] et *Ensembl* [<http://dev.ensembl.org/index.html>]. Nous avons choisi des clones, préférablement déjà cartographiés par FISH, distancés d'environ une mégabase de manière à couvrir l'ensemble de la région d'intérêt pour chacun des remaniements subtélomériques trouvés : 2p25.3-2pter (dix clones) (Figure 2), 2q37.2-2qter (neuf clones) (Figure 3), 12q24.31-12qter (neuf clones) (Figure 4), 14q32.2-14q32.32 (neuf clones) (Figure 5) et 16q24.1-16qter (neuf clones) (Figure 6). Ces régions d'intérêts ont été sélectionnées après révision des caryotypes fœtaux et parentaux.

L'ADN des BACs a été préparé selon la procédure recommandée par le fournisseur telle que décrite dans l'article (Section 3, page 41) et a, par la suite, été marqué par la méthode de déplacement de coupures à l'aide d'une trousse commerciale (*Nick Translation Kit, Vysis*). Dans cette réaction, l'ADN est mis en présence d'un mélange d'enzymes (DNase I et ADN pol I) et d'un mélange de nucléotides dont un est marqué par un fluorochrome vert (*spectrumgreen-dUTP*) ou rouge (*spectrumred-dUTP*). La DNase I a pour fonction d'introduire aléatoirement des coupures simple-brin dans l'ADN. Ces coupures stimulent l'activité exonucléasique de l'ADN pol I ce qui entraîne l'hydrolyse des nucléotides sur une courte distance dans le sens de la synthèse de l'ADN (5' → 3'). Ceci stimule l'activité polymérase de l'ADN pol I et il y a synthèse d'ADN complémentaire avec incorporation de nucléotides marqués. L'ADN pol I ne comble pas complètement les coupures initiales ce qui entraîne l'obtention de fragments de sondes marqués (Figure 7).

Cette réaction se fait pendant 12-16 heures à 15°C et est stoppée par une incubation de 10 minutes à 70°C. Par la suite, 0,2 volume d'ADN COT-1 (1µg/ µL), 0,4 volume d'ADN de sperme de saumon (1µg/ µL) et 0,8 volume d'eau purifiée sont ajoutés à la solution de marquage en préparation à la précipitation des sondes. L'étape de précipitation est réalisée en ajoutant 0,1 volume de NaOAc (3 M, pH 5,5) et 2,5 volumes d'éthanol (100%). Le tout est incubé à -80°C pendant 15 minutes et centrifugé à 12 000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant est décanté et le culot de sonde séché à la température de la pièce pendant 10-15 minutes. Finalement, la sonde est resuspendue et conservée dans un tampon d'hybridation standard à -20°C.

Nous avons procédé à la détermination des points de cassure en hybridant tout d'abord deux BACs simultanément (un marqué en vert et l'autre en rouge) localisés aux extrémités de chaque région subtélomérique étudiée ainsi que deux autres BACs localisés à l'intérieur de la région d'intérêt. Nous avons ensuite sélectionné les BACs suivants à hybrider en fonction des résultats de la première hybridation. Ainsi, selon la présence ou l'absence de chaque BAC, la région à analyser devenait de plus en plus restreinte jusqu'à ce que le point de cassure du remaniement soit situé entre deux BACs distancés d'une mégabase ou moins. L'hybridation des BACs a été faite selon le protocole que nous avons préalablement mis au point pour la trousse multisondes (Section 3, page 40). Les points de cassure ont par la suite été confirmés sur les chromosomes de lymphocytes sanguins des parents grâce à des techniques d'hybridation standard.

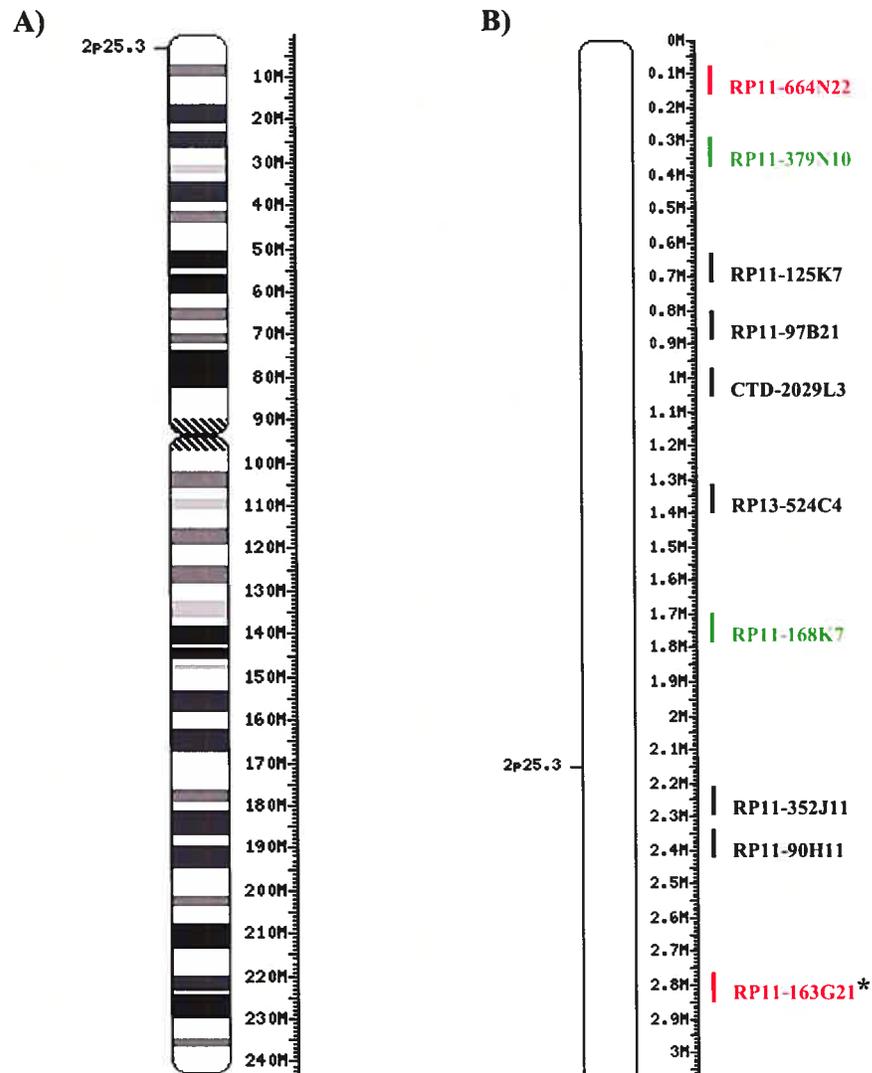


Figure 2 : BACs du chromosome 2pter. **A)** Idiogramme du chromosome 2 montrant la taille de 243 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 3 Mb d'ADN terminal du chromosome 2p (2p25.3-2pter) montrant la localisation des dix BACs couvrant la région d'intérêt. Les BACs utilisés pour déterminer le point de cassure sont en rouge ou en vert selon le fluorochrome qui a été utilisé pour les marquer. Le BAC identifié par un astérisque (RP11-163G21) n'était pas bien localisé; il a hybridé sur le chromosome 12p. Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>].

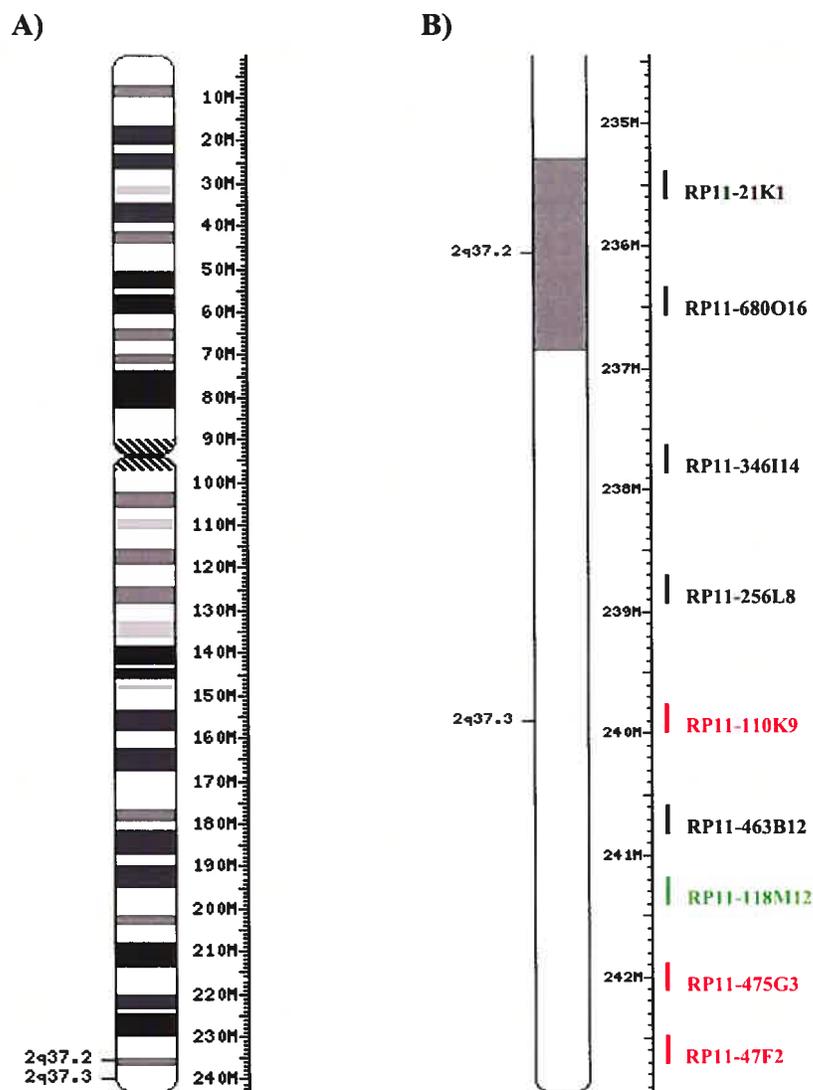


Figure 3 : BACs du chromosome 2qter. **A)** Idiogramme du chromosome 2 montrant la taille de 243 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 8 Mb d'ADN terminal du chromosome 2q (2q37.2-2qter) montrant la localisation des neuf BACs couvrant la région d'intérêt. Les BACs utilisés pour déterminer le point de cassure sont en rouge ou en vert selon le fluorochrome qui a été utilisé pour les marquer. Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>].

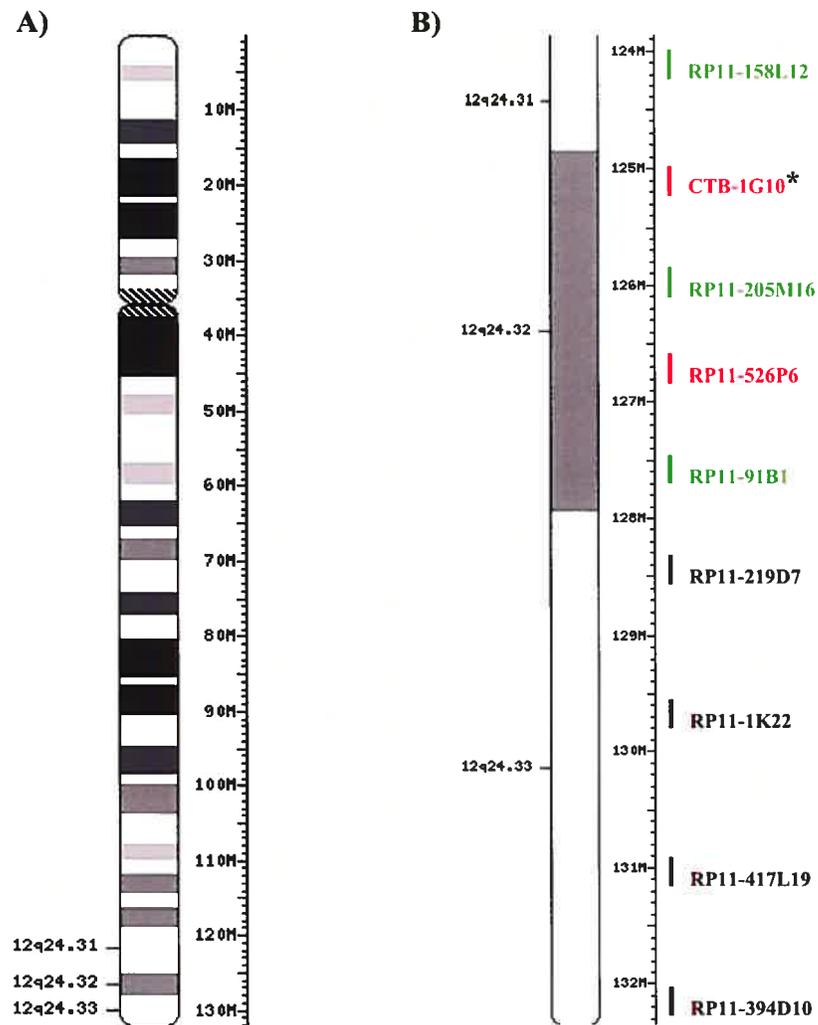


Figure 4 : BACs du chromosome 12qter. **A)** Idiogramme du chromosome 12 montrant la taille de 132 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 8 Mb d'ADN terminal du chromosome 12q (12q24.31-12qter) montrant la localisation des neuf BACs couvrant la région d'intérêt. Les BACs utilisés pour déterminer le point de cassure sont en rouge ou en vert selon le fluorochrome qui a été utilisé pour les marquer. Le BAC identifié par un astérisque (CTB-1G10) n'était pas bien localisé; il a hybridé sur un chromosome acrocentrique. Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>].

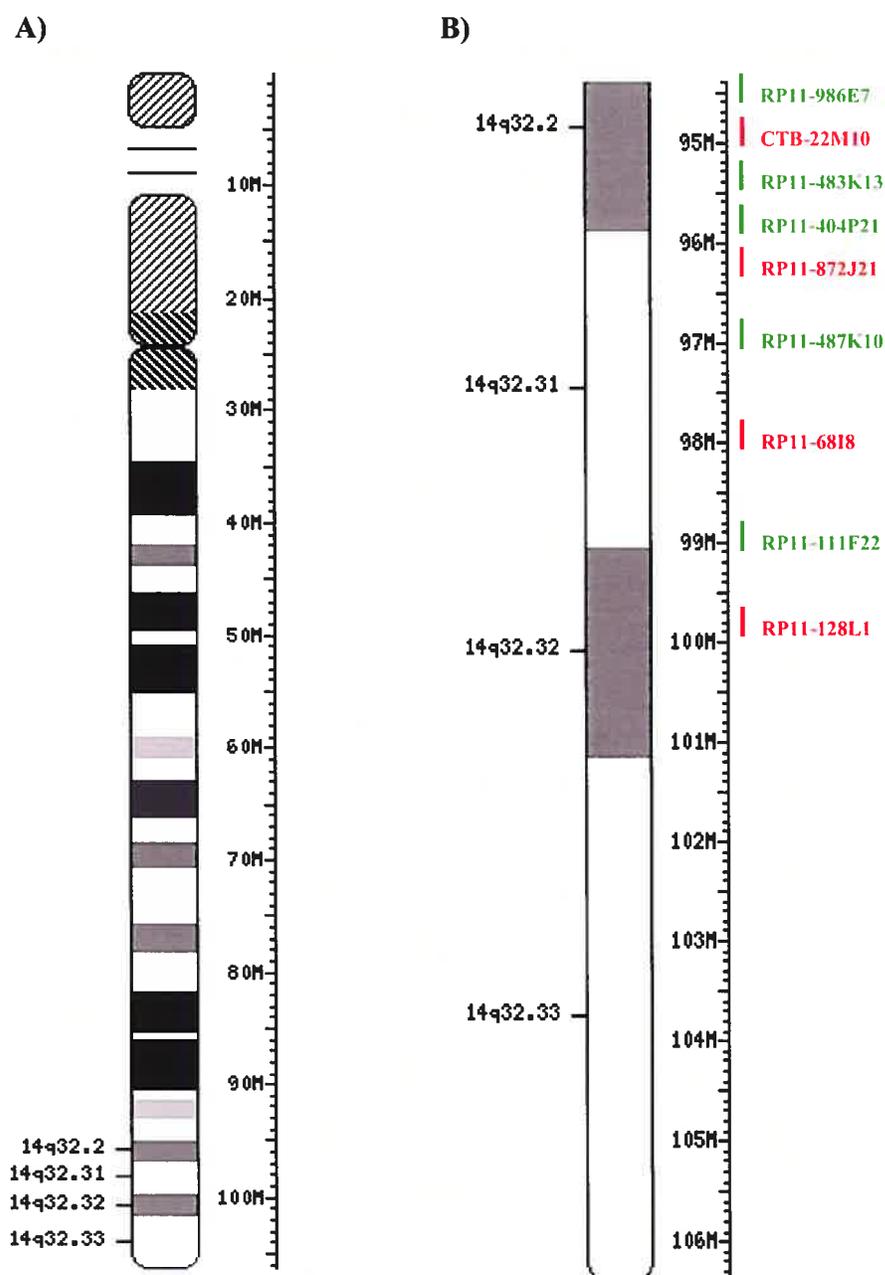


Figure 5 : BACs du chromosome 14qter. **A)** Idiogramme du chromosome 14 montrant la taille de 106 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 12 Mb d'ADN terminal du chromosome 14q (14q32.2-14qter) montrant la localisation des neuf BACs, marqués en rouge ou en vert, couvrant la région d'intérêt (14q32.2-14q32.32). Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>].

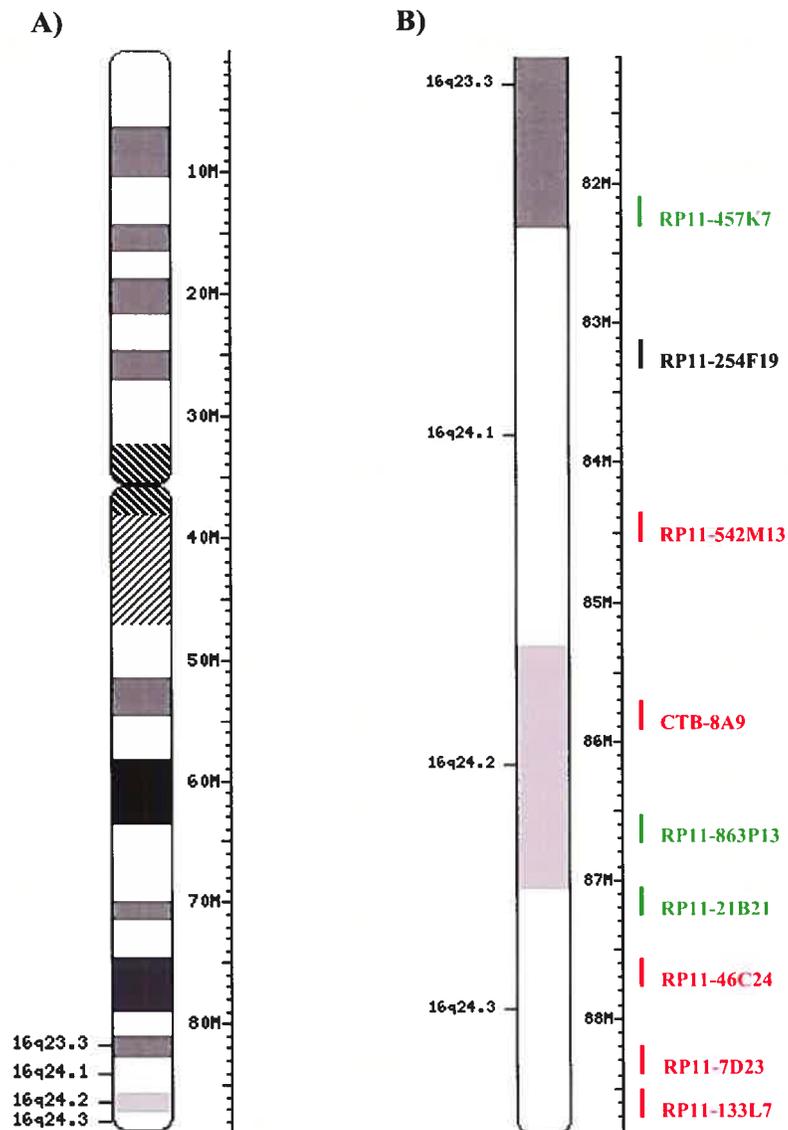


Figure 6 : BACs du chromosome 16qter. **A)** Idiogramme du chromosome 16 montrant la taille de 89 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 8 Mb d'ADN terminal du chromosome 16q (16q23.3-16qter) montrant la localisation des neuf BACs couvrant la région d'intérêt. Les BACs utilisés pour déterminer le point de cassure sont en rouge ou en vert selon le fluorochrome qui a été utilisé pour les marquer. Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>].

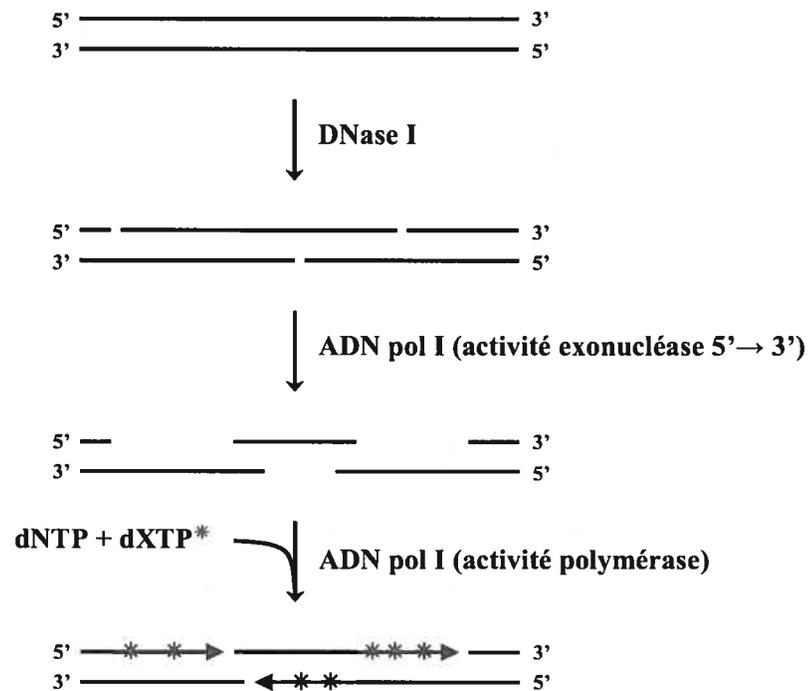


Figure 7 : Principe de la technique de marquage par déplacement de coupures. La DNase I induit des coupures simple-brin à l'ADN. L'activité exonucléase de l'ADN pol I enlève les nucléotides terminaux dans le sens 5'→3'. L'activité polymérase de l'ADN pol I permet l'incorporation de nucléotides, dont un est marqué par un fluorochrome. Le produit final constitue des fragments de sondes marqués.

Section 5 : Résultats

Nous avons recruté un total de 65 fœtus avec malformations majeures diagnostiquées à l'échographie dont le caryotype était normal à une résolution minimale de 400 bandes. De ce nombre, nous avons des échantillons de liquide amniotique pour 63 fœtus et des échantillons de sang de cordon pour deux fœtus (exclus de l'article). L'ajout de ces deux derniers échantillons change la valeur de certains résultats rapportés dans l'article.

5.1 Faisabilité technique

L'analyse des régions subtélomériques par FISH a été tentée pour deux échantillons de sang de cordon et a été techniquement impossible pour un des deux. Cependant, les résultats de ces deux échantillons ne sont pas considérés pour l'évaluation de la faisabilité technique de l'analyse sur les chromosomes d'amniocytes. Ainsi, les résultats de l'article demeurent inchangés pour ce premier aspect de l'étude (Section 3, page 42).

5.2 Fréquence des remaniements subtélomériques

Avec l'ajout de l'échantillon de sang de cordon pour lequel l'analyse subtélomérique a été possible, nous avons étudié une cohorte de 49 fœtus au total : 48 liquides amniotiques (patients 1 à 48) et un sang de cordon (patient 49). De ce chiffre, 43 échantillons étaient normaux (88%) et nous avons identifié des anomalies subtélomériques dans six échantillons : deux dérivés de translocation familiaux (patients 13 et 16) (4%), une

amplification de signal dont la signification phénotypique demeure incertaine (patient 49) (2%), un nouveau variant familial (patient 27) (2%) ainsi que deux polymorphismes subtélomériques connus (patients 32 et 34) (4%). La fréquence des remaniements subtélomériques cliniquement significatifs dans notre cohorte de 49 fœtus est de 4-6%, selon la signification finale de l'amplification de signal du patient 49. Les résultats d'analyse subtélomérique ainsi que la description clinique sommaire des 48 fœtus pour lesquels nous avons analysé des échantillons de liquide amniotique sont présents dans le Tableau I de l'article (Section 3, page 53). Ici, nous décrivons de façon plus détaillée les patients présentant des anomalies subtélomériques, incluant le patient 49 qui n'est pas décrit dans l'article.

5.2.1 Remaniements subtélomériques cliniquement significatifs

Patient 13 : Les descriptions cliniques prénatale et autopsique de ce fœtus sont détaillées dans l'article (Section 3, page 42). L'analyse cytogénétique standard a donné un résultat normal à une résolution de 400 bandes (Figure 1). L'analyse subtélomérique des amniocytes a mis en évidence le remaniement suivant : ish der(14)t(14;16)(qter;qter)(D14S1420-,240G10+) (Figure 1 de la Section 3, page 55). Cette anomalie chromosomique a été héritée de sa mère qui est porteuse de la translocation équilibrée suivante : ish t(14;16)(qter;qter)(D14S1420-,240G10+; 240G10-,D14S1420+) (Figure 2). L'analyse des chromosomes lymphocytaires de la mère a démontré que la translocation était davantage visible sur le dérivé 16qter que le dérivé 14qter (Figure 3).

Nous avons analysé les points de cassures de ce remaniement subtélomérique sur les amniocytes fœtaux et sur les lymphocytes sanguins maternels à l'aide de BACs : RP11-986E7, CTB-22M10, RP11-483K13, RP11-404P21, RP11-872J21, RP11-487K10, RP11-68I8, RP11-111F22 et RP11-128L1 pour le chromosome 14qter (Figure 4) ainsi que RP11-457K7, RP11-542M13, CTB-8A9, RP11-863P13, RP11-21B21, RP11-46C24, RP11-7D23 et RP11-133L7 pour le chromosome 16qter (Figure 5). Les points de cassures du remaniement se situent entre les BACs RP11-487K10 (96,9 Mb) et RP11-68I8 (97,8 Mb) en 14q32.2 à environ 9 Mb du télomère (Figure 5 de la Section 4, page 70) ainsi qu'entre les BACs RP11-21B21 (87.2 Mb) et RP11-46C24 (87.7 Mb) en 16q24.3 à environ 1 Mb du télomère (Figure 6 de la Section 4, page 71).

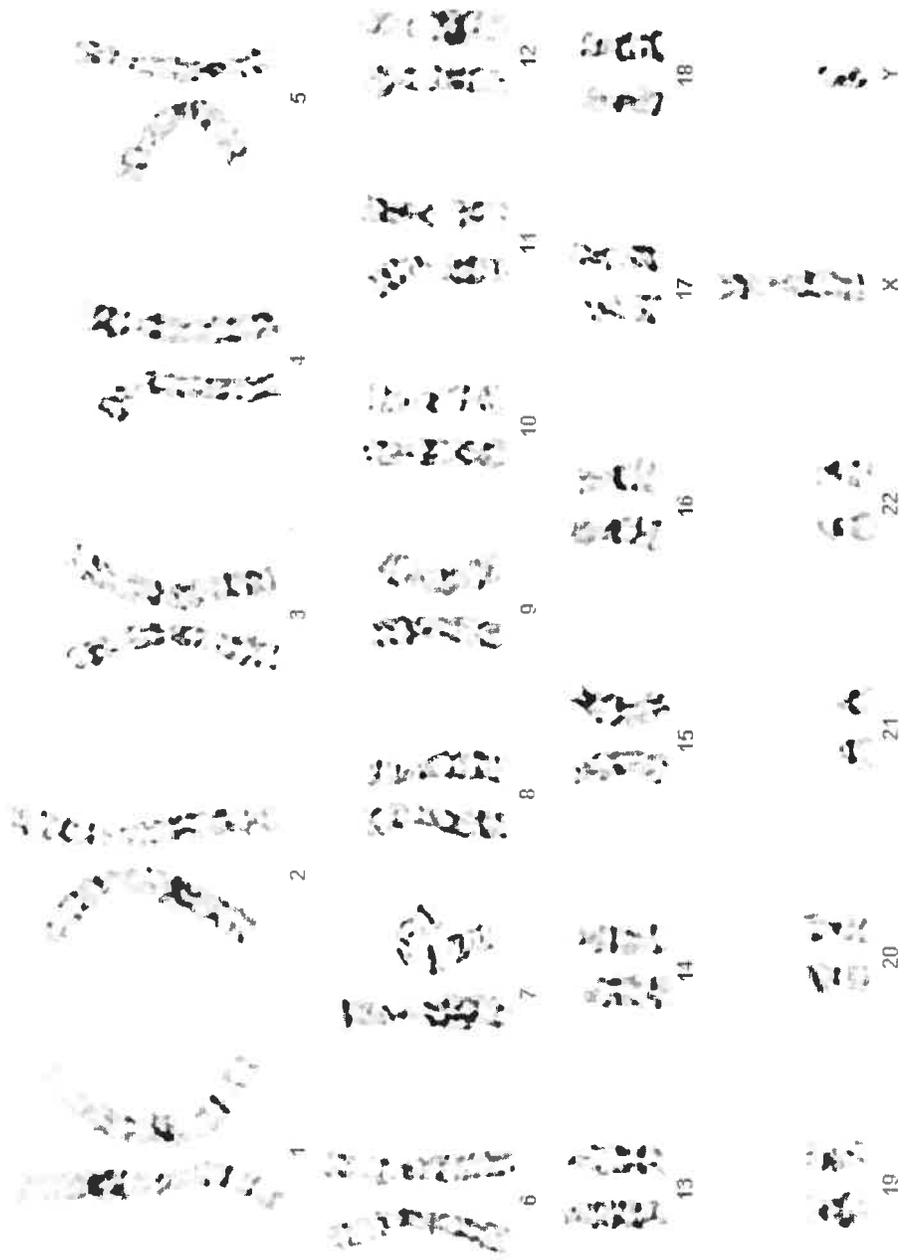


Figure 1 : Caryotype du patient 13 à une résolution de 400 bandes (46,XY). Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine.

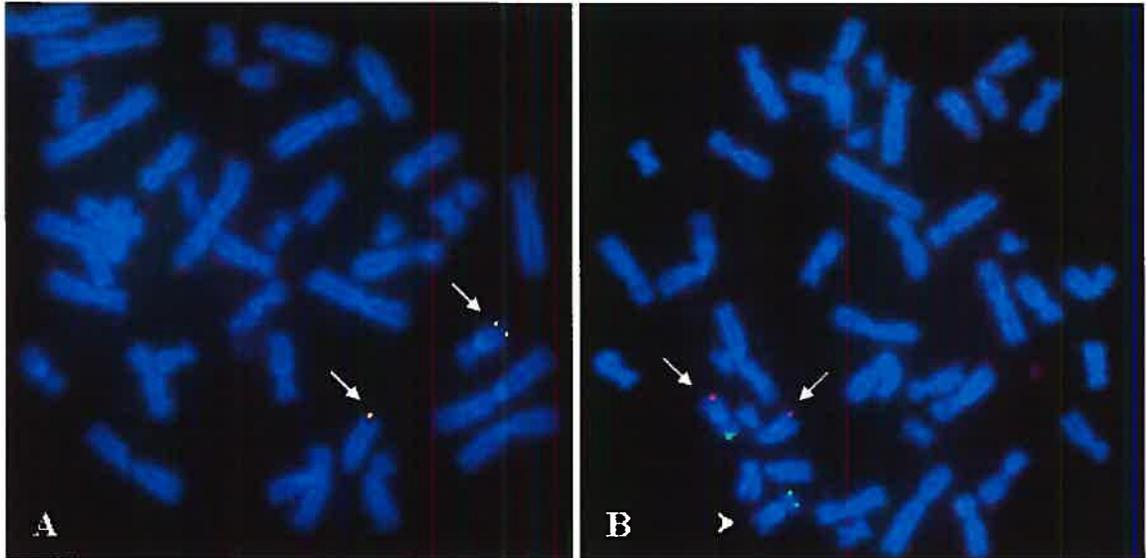


Figure 2 : FISH subtélomérique sur les chromosomes lymphocytaires maternels du patient 13. **A)** Hybridation de la sonde D14S1420 (jaune) sur le chromosome 14qter normal ainsi que sur le chromosome 16qter transloqué (flèches), mais pas sur le chromosome 14qter transloqué. **B)** Hybridation de la sonde 240G10 (rouge) sur le chromosome 16qter normal ainsi que sur le chromosome 14qter transloqué (flèches), mais pas sur le chromosome 16qter transloqué (tête de flèche).



Figure 3 : Montage des chromosomes dérivés amniotiques fœtaux et lymphocytaires maternels du patient 13. **A)** Montage du $der(14)t(14;16)(qter;qter)$ du patient 13 montrant que l'anomalie est difficilement visible à une résolution de 400 bandes. **B)** Montage de la $t(14;16)(qter;qter)$ maternelle du patient 13 montrant que la résolution à >450 bandes permet de mieux visualiser le remaniement chromosomique et que celui-ci est davantage visible sur le dérivé 16qter que sur le dérivé 14qter. Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine.

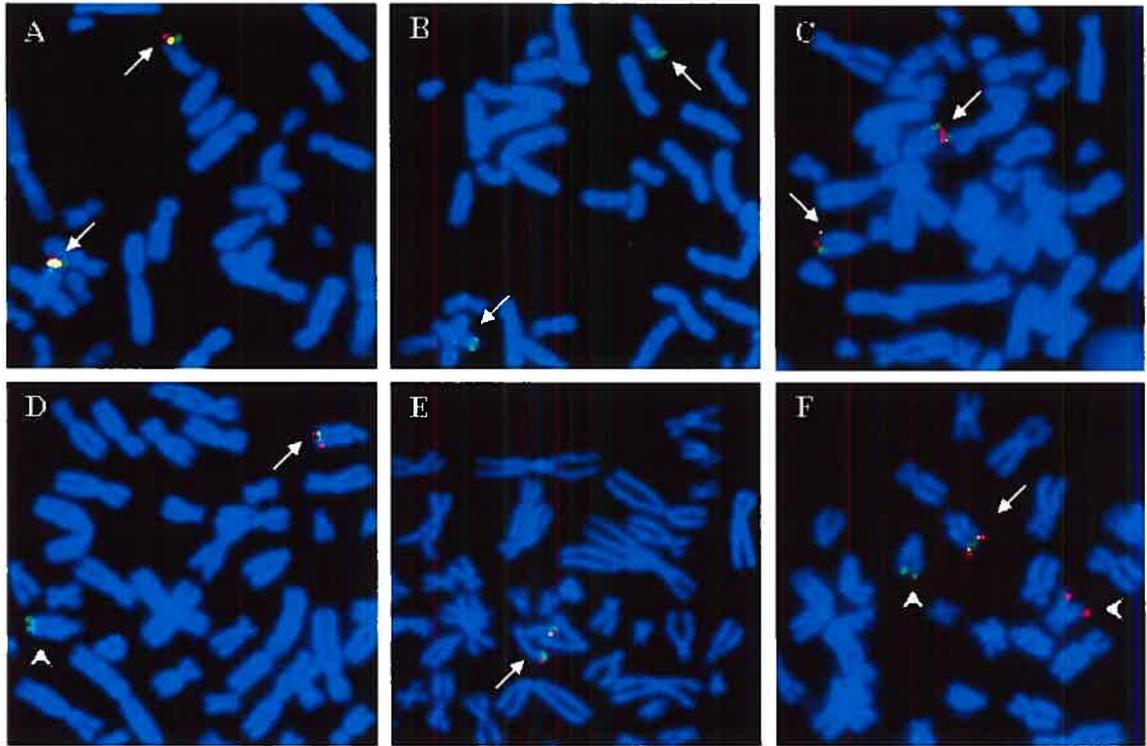


Figure 4 : Détermination du point de cassure du chromosome 14qter à l'aide de BACs pour le patient 13. **A)** Hybridation de RP11-968E7 (vert) et de CTB-22M10 (rouge) sur les deux chromosomes 14qter (flèches). **B)** Hybridation de RP11-483K13 (vert) sur les deux chromosomes 14qter (flèches). **C)** Hybridation de RP11-404P21 (vert) et de RP11-872J21 (rouge) sur les deux chromosomes 14qter (flèches). **D)** Hybridation de RP11-487K10 (vert) sur les deux chromosomes 14qter et hybridation de RP11-68I8 (rouge) sur le chromosome 14qter normal (flèche), mais pas sur le chromosome 14qter remanié (tête de flèche) indiquant que le point de cassure se situe entre ces deux BACs. **E)** Hybridation de RP11-111F22 (vert) et de RP11-128L1 (rouge) sur un seul des deux chromosomes 14qter (flèche). **F)** Confirmation du point de cassure sur les chromosomes lymphocytaires de la mère. Hybridation de RP11-487K10 (vert) sur les deux chromosomes 14qter et hybridation de RP11-68I8 (rouge) sur le chromosome 14qter normal (flèche) ainsi que sur le chromosome 16qter transloqué mais pas sur le chromosome 14qter transloqué (têtes de flèche).

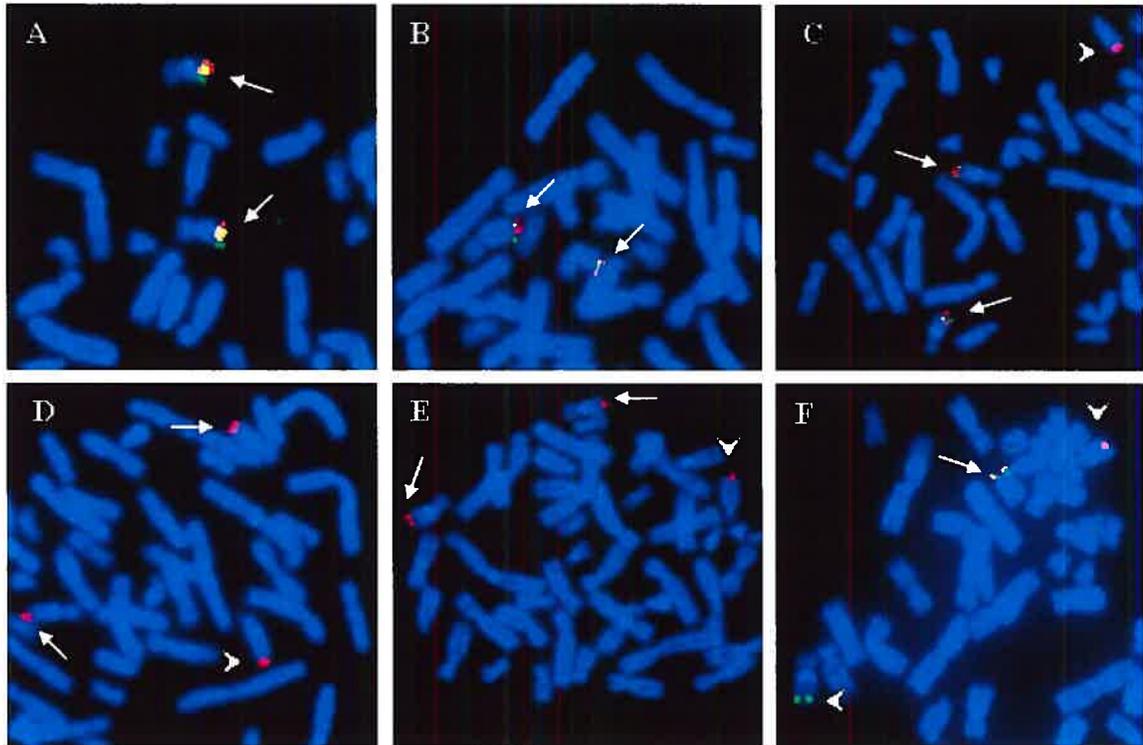


Figure 5 : Détermination du point de cassure du chromosome 16qter à l'aide de BACs pour le patient 13. **A)** Hybridation de RP11-457K7 (vert) et de RP11-542M13 (rouge) sur les deux chromosomes 16qter (flèches). **B)** Hybridation de CTB-8A9 (rouge) et de RP11-863P13 (vert) sur les deux chromosomes 16qter (flèches). **C)** Hybridation de RP11-21B21 (vert) sur les deux chromosomes 16qter et hybridation de RP11-46C24 (rouge) sur les deux chromosomes 16qter (flèches) ainsi que sur le chromosome 14qter remanié (tête de flèche) indiquant que le point de cassure se situe entre ces deux BACs. **D)** Hybridation de RP11-7D23 (rouge) sur les deux chromosomes 16qter (flèches) ainsi que sur le chromosome 14qter remanié (tête de flèche). **E)** Hybridation de RP11-133L7 (rouge) sur les deux chromosomes 16qter (flèches) ainsi que sur le chromosome 14qter remanié (tête de flèche). **F)** Confirmation du point de cassure sur les chromosomes lymphocytaires de la mère. Hybridation de RP11-21B21 (vert) sur les deux chromosomes 16qter et hybridation de RP11-46C24 (rouge) sur le chromosome 16qter normal (flèche) ainsi que sur le chromosome 14qter transloqué, mais pas sur le chromosome 16qter transloqué (têtes de flèche).

Patient 16 : Les descriptions cliniques prénatale et postnatale de ce patient sont détaillées dans l'article (Section 3, page 43). L'analyse cytogénétique standard a donné un résultat normal à une résolution de 400 bandes (Figure 6). L'analyse subtélomérique des amniocytes a mis en évidence le remaniement suivant : ish der(12)t(2;12)(qter;qter)(D12S2343-,D2S2986+) (Figure 2 de la Section 3, page 55). Cette anomalie chromosomique a été héritée de sa mère qui est porteuse de la translocation équilibrée suivante : ish t(2;12)(qter;qter)(D2S2986-,D12S2343+;D12S2343-,D2S2986+) (Figure 7). L'analyse des chromosomes lymphocytaires de la mère a démontré que la translocation était détectable à une meilleure résolution de >500 bandes et était davantage visible sur le dérivé 2qter que sur le dérivé 12qter (Figure 8). La grand-mère et l'arrière-grand-mère maternelles de ce fœtus sont également porteuses de la même translocation équilibrée.

Nous avons analysé les points de cassure de ce remaniement subtélomérique sur les amniocytes fœtaux et sur les lymphocytes sanguins maternels à l'aide de BACs : RP11-110K9, RP11-118M12, RP11-475G3 et RP11-47F2 pour le chromosome 2qter (Figure 9) ainsi que RP11-158L12, RP11-205M16, RP11-526P6 et RP11-91B1 pour le chromosome 12qter (Figure 10). Les points de cassure de ce remaniement se situent entre les BACs RP11-118M12 (241.4 Mb) et RP11-475G3 (242 Mb) en 2q37.3 à environ 1 Mb du télomère (Figure 3 de la Section 4, page 68) ainsi qu'entre les BACs RP11-205M16 (126 Mb) et RP11-526P6 (126.7 Mb) en 12q24.32 à environ 6 Mb du télomère (Figures 4 de la Section 4, page 69).

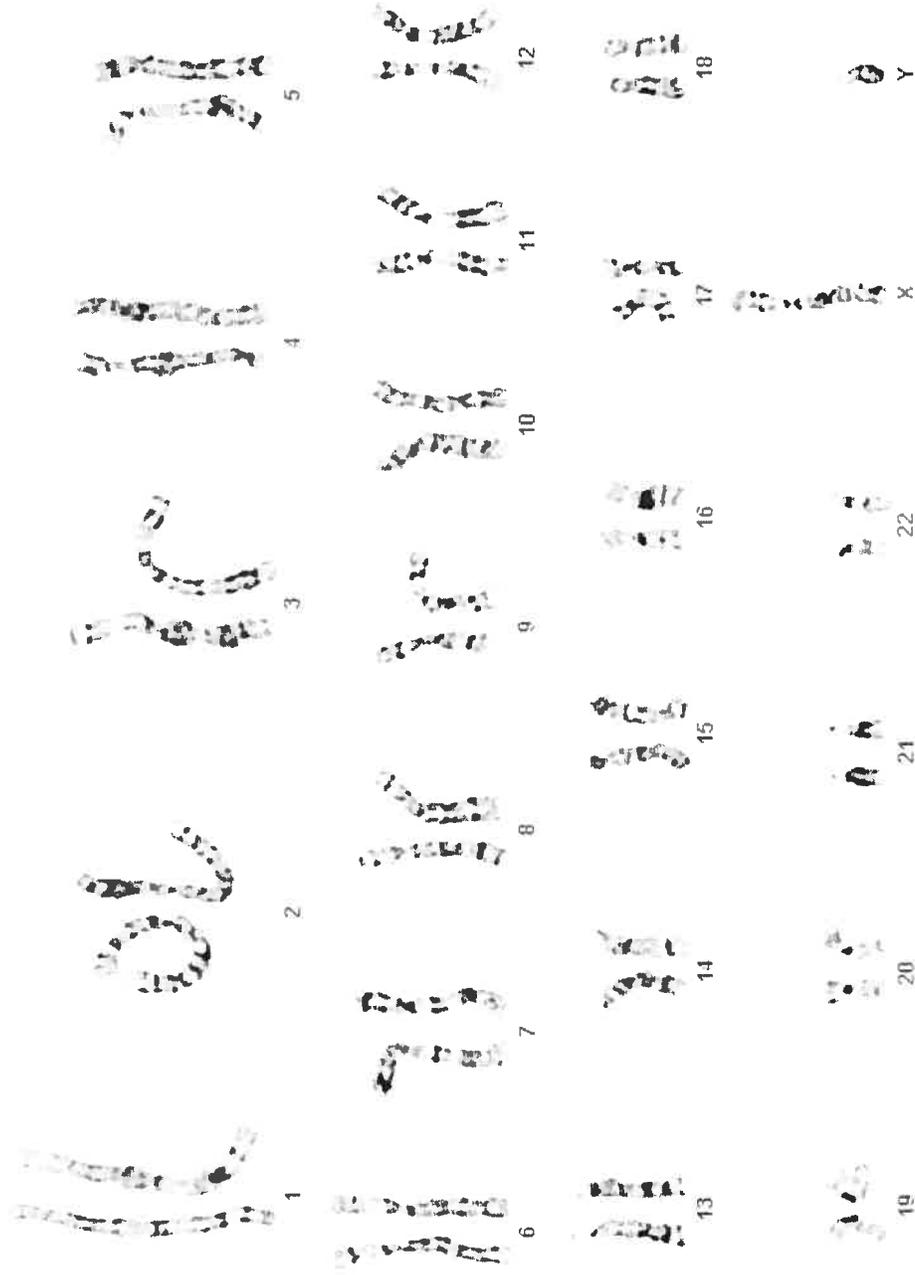


Figure 6 : Caryotype du patient 16 à une résolution de 400 bandes (46,XY). Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine

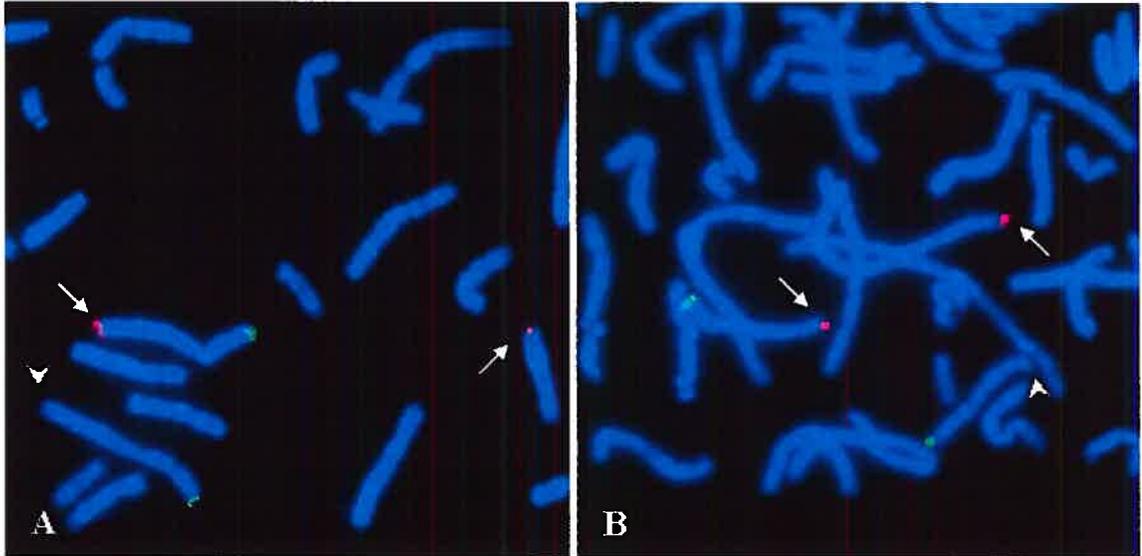


Figure 7 : FISH subtélomérique sur les chromosomes lymphocytaires maternels du patient 16. **A)** Hybridation de la sonde D2S2986 (rouge) sur le chromosome 2qter normal ainsi que sur le chromosome 12qter transloqué (flèches), mais pas sur le chromosome 2qter transloqué (tête de flèche). **B)** Hybridation de la sonde D12S2343 (rouge) sur le chromosome 12qter normal ainsi que sur le chromosome 2qter transloqué (flèches), mais pas sur le chromosome 12qter transloqué (tête de flèche).

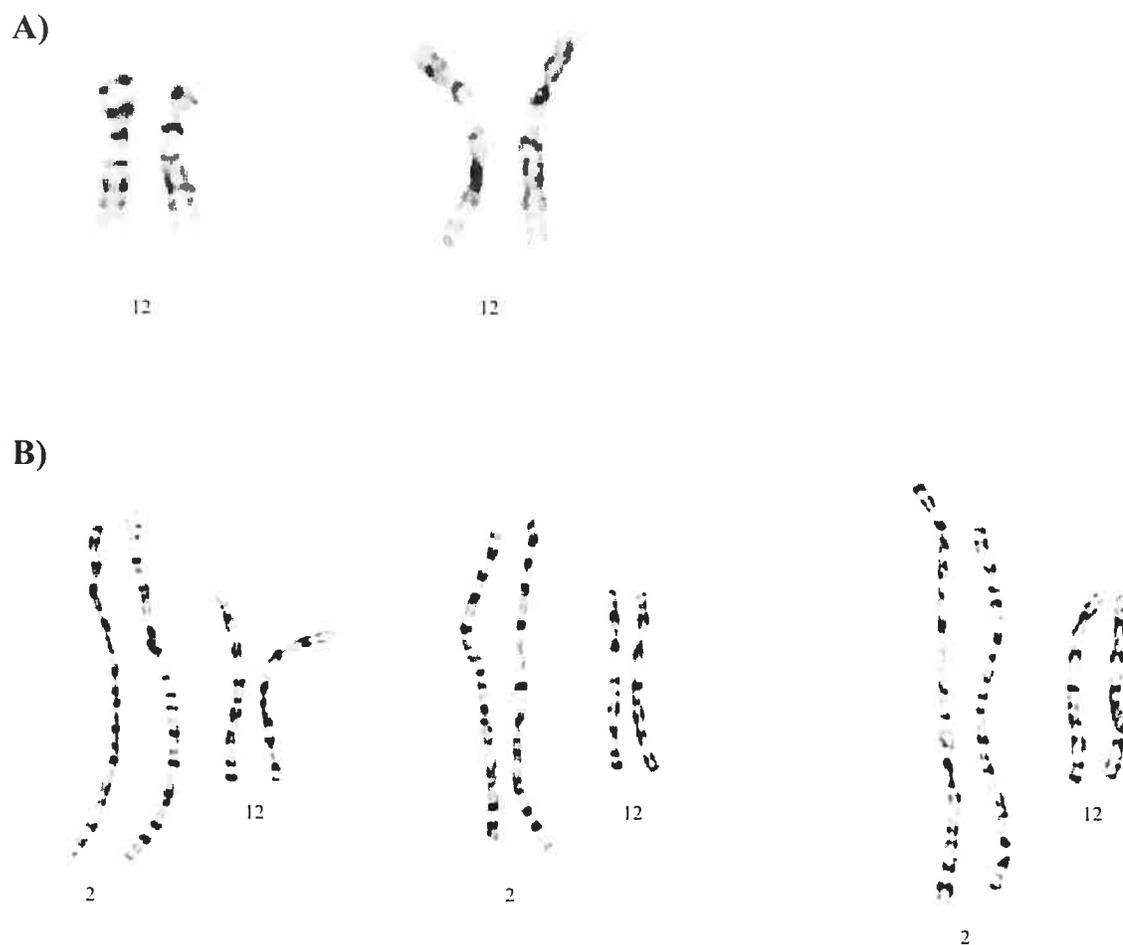


Figure 8 : Montage des chromosomes dérivés amniotiques fœtaux et lymphocytaires maternels du patient 16. **A)** Montage du der(12)t(2;12)(qter;qter) du patient 16 montrant que l'anomalie est difficilement visible à une résolution de 400 bandes. Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine. **B)** Montage de la t(2;12)(qter;qter) maternelle du patient 16 montrant que la résolution à >500 bandes permet de mieux visualiser le remaniement chromosomique et que celui-ci est davantage visible sur le dérivé 2qter que sur le dérivé 12qter. Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique du CHU Sainte-Justine.

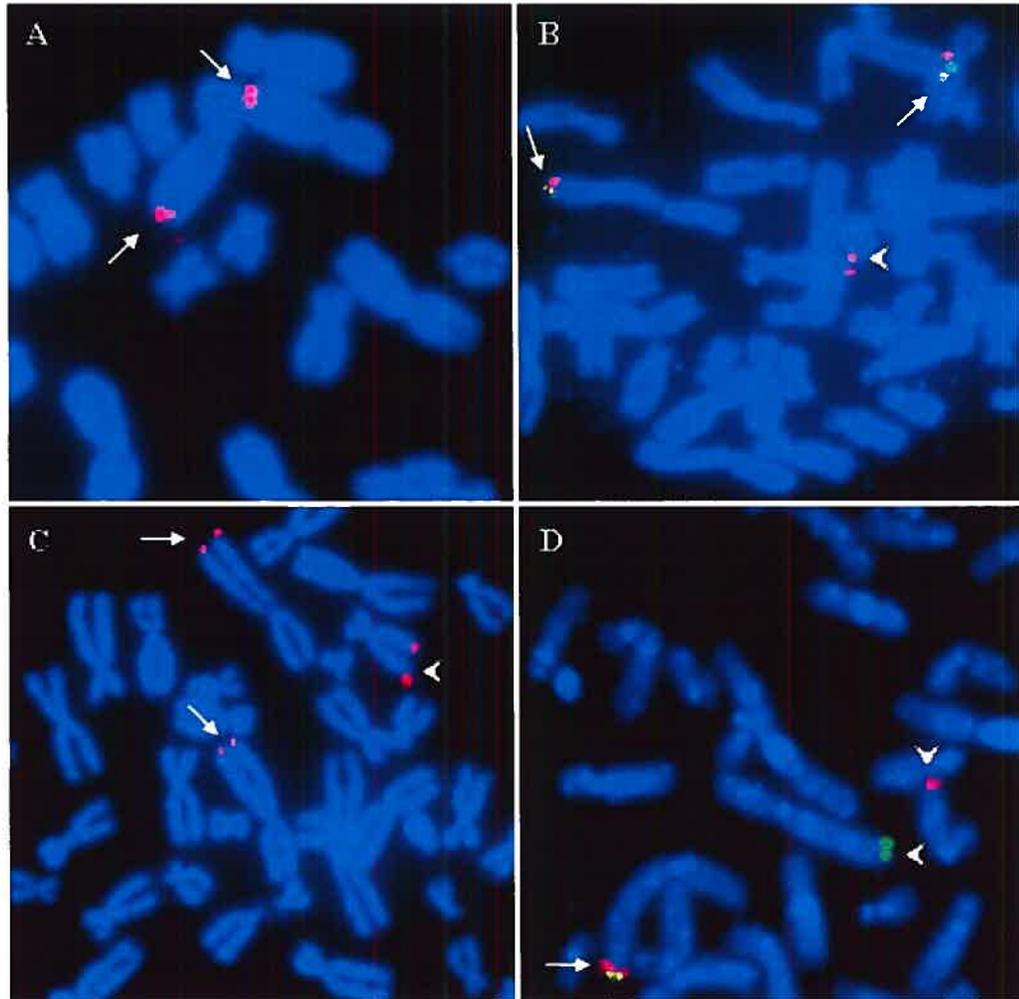


Figure 9 : Détermination du point de cassure du chromosome 2qter à l'aide de BACs pour le patient 16. **A)** Hybridation de RP11-110K9 (rouge) sur les deux chromosomes 2qter (flèches). **B)** Hybridation de RP11-118M12 (vert) sur les deux chromosomes 2qter et hybridation de RP11-475G3 (rouge) sur les deux chromosomes 2qter (flèches) ainsi que sur le chromosome 12qter remanié (tête de flèche) indiquant que le point de cassure se situe entre ces deux BACs. **C)** Hybridation de RP11-47F2 (rouge) sur les deux chromosomes 2qter (flèches) ainsi que sur le chromosome 12qter remanié (tête de flèche). **D)** Confirmation du point de cassure sur les chromosomes lymphocytaires de la mère. Hybridation de RP11-118M12 (vert) sur les deux chromosomes 2qter et hybridation de RP11-475G3 (rouge) sur le chromosome 2qter normal (flèche) ainsi que sur le chromosome 12qter transloqué, mais pas sur le chromosome 2qter transloqué (têtes de flèche).

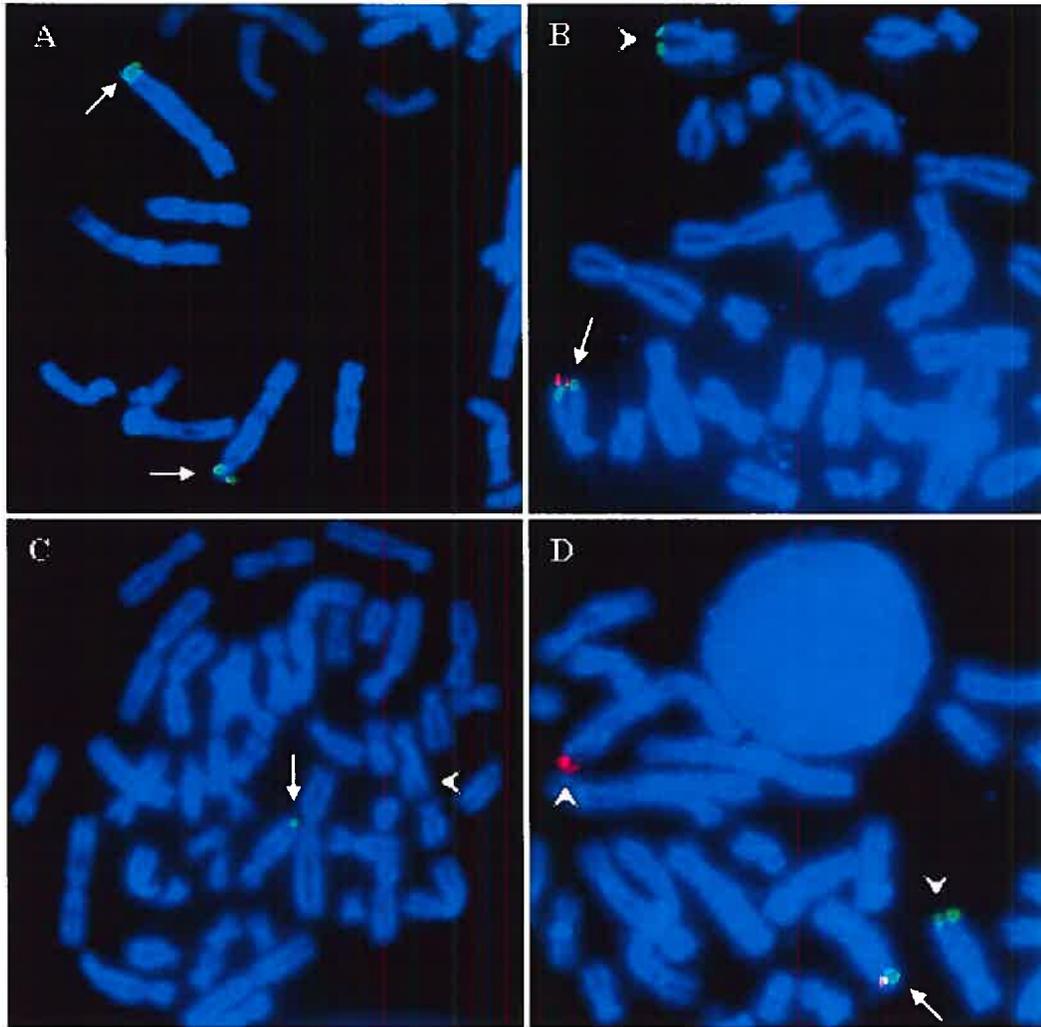


Figure 10 : Détermination du point de cassure du chromosome 12qter à l'aide de BACs pour le patient 16. **A)** Hybridation de RP11-158L12 (vert) sur les deux chromosomes 12qter (flèches). **B)** Hybridation de RP11-205M16 (vert) sur les deux chromosomes 12qter et hybridation de RP11-526P6 (rouge) sur le chromosome 12qter normal (flèche), mais pas sur le chromosome 12qter remanié (tête de flèche) indiquant que le point de cassure se situe entre ces deux BACs. **C)** Hybridation de RP11-91B1 (vert) sur le chromosome 12qter normal (flèche), mais pas sur le chromosome 12qter remanié (tête de flèche). **D)** Confirmation du point de cassure sur les chromosomes lymphocytaires de la mère. Hybridation de RP11-205M16 (vert) sur les deux chromosomes 12qter et hybridation de RP11-526P6 (rouge) sur le chromosome 12qter normal (flèche) ainsi que sur le chromosome 2qter transloqué, mais pas sur le chromosome 12qter transloqué (têtes de flèche).

Patient 49 : Il s'agissait d'une première grossesse chez une femme de 25 ans. L'histoire familiale n'était pas pertinente. Une échographie effectuée à 21 semaines de gestation a démontré des tissus mous occipitaux augmentés, un front fuyant, une microcéphalie, une holoprosencéphalie semi-lobaire et une scoliose à double courbure de 50 degrés avec anomalie de segmentation vertébrale. Suite au conseil génétique, les parents ont décidé d'interrompre la grossesse. Un prélèvement de sang de cordon a été réalisé à l'expulsion du fœtus. Le rapport de l'autopsie fœtale a confirmé les anomalies diagnostiquées à l'échographie et a démontré d'autres trouvailles : hypertélorisme, langue longue, microtie droite, oreille gauche au lobe volumineux, traits grossiers, brachydactylie, pli transverse unique droit et anomalie des vertèbres sacrées.

L'analyse cytogénétique standard a donné un résultat normal à une résolution de 400 bandes (Figure 11). L'analyse des régions subtélomériques par FISH a mis en évidence une amplification du signal 20qter avec les sondes 81F12 (*Cytocell Technologies*) et 20QTEL14 (*Vysis*) pour un des deux chromosomes 20 : ish enh(20)(qter)(81F12,20QTEL14) (Figure 12A). L'amplification du signal des deux sondes était également visible en noyau interphasique (Figure 12B). Cette anomalie subtélomérique semblait *de novo* car les lymphocytes sanguins des parents ne présentaient pas l'amplification du signal 20qter (Figure 12C-D). Le remaniement n'a pu être analysé plus en profondeur car les lames d'étalement chromosomique d'amniocytes ont été éliminées en 2003 et la suspension cellulaire, effectuée à partir des lymphocytes sanguins fœtaux, a été épuisée.



Figure 11 : Caryotype du patient 49 à une résolution de 400 bandes (46,XX). Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine

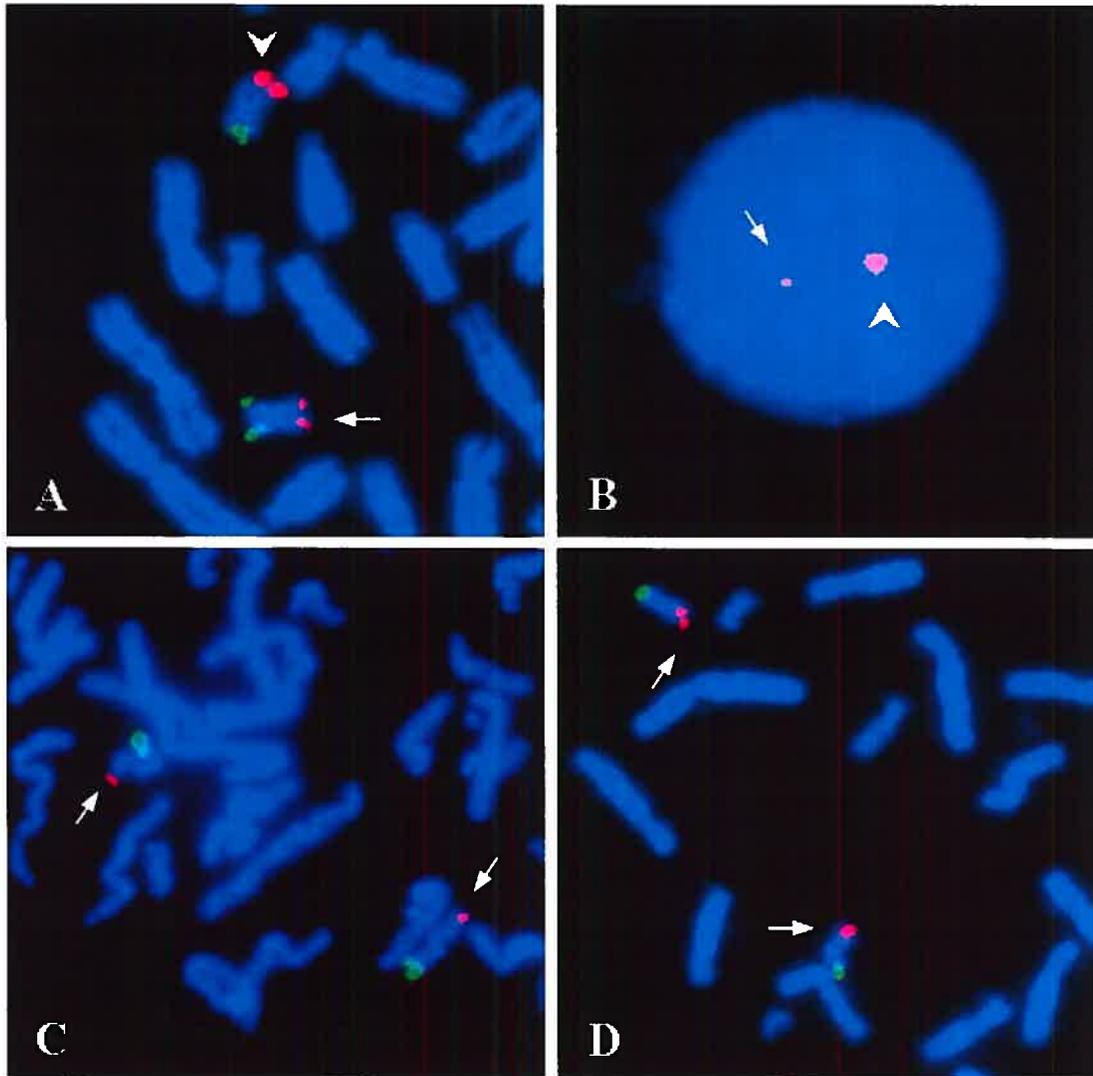


Figure 12 : FISH subtélomérique pour le patient 49 et ses parents. **A et B)** Hybridation de la sonde 81F12 (rouge) sur **A)** les chromosomes lymphocytaires métaphasiques du fœtus et **B)** les noyaux interphasiques lymphocytaires du fœtus montrant un signal normal pour un des deux chromosomes 20qter (flèche) et un signal amplifié pour l'autre (tête de flèche). **C et D)** Hybridation de la sonde 81F12 (rouge) sur les chromosomes lymphocytaires métaphasiques de **C)** la mère du fœtus et **D)** le père du fœtus montrant des signaux de taille normale pour les deux chromosomes 20qter.

5.2.2 Nouveau variant familial

Patient 27 : Les descriptions cliniques prénatale et postnatale du fœtus sont détaillées dans l'article (Section 3, page 44). L'analyse cytogénétique standard a donné un résultat normal à une résolution de 400 bandes (Figure 13). L'analyse subtélomérique a mis en évidence une délétion au niveau du subtélomère 2pter avec les sondes D2S2983 (*Cytocell Technologies*) et VIJyRM2052 (*Vysis*) (Figure 3 de la Section 3, page 56). Cette anomalie subtélomérique a également été mise en évidence chez le père (Figure 14) et la grand-mère paternelle, phénotypiquement normaux. L'analyse des chromosomes lymphocytaires paternels à une résolution de >500 bandes n'a pas permis de mieux visualiser la délétion 2pter (Figure 15).

Nous avons analysé le point de cassure de ce remaniement subtélomérique sur les amniocytes fœtaux et sur les lymphocytes sanguins paternels à l'aide de BACs : RP11-664N22, RP11-379N10 et RP11-168K7 (Figure 16). Le point de cassure se situait entre les BACs RP11-664N22 localisé à 137,5 kb du télomère et RP11-379N10 localisé à 330 kb du télomère en 2p25.3 (Figure 2 de la Section 4, page 67).



Figure 13 : Caryotype du patient 27 à une résolution de 400 bandes (46,XX). Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine

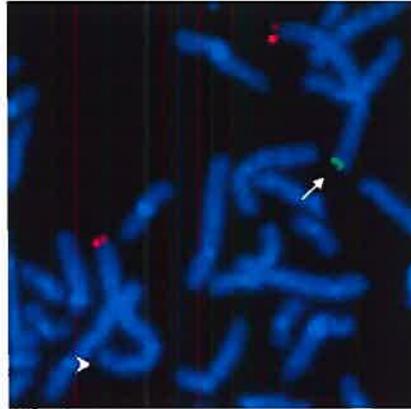


Figure 14 : FISH subtélomérique sur les chromosomes lymphocytaires paternels du patient 27. Hybridation de la sonde D2S2983 (vert) sur le chromosome 2pter normal (flèche), mais pas sur le chromosome 2pter délété (tête de flèche).

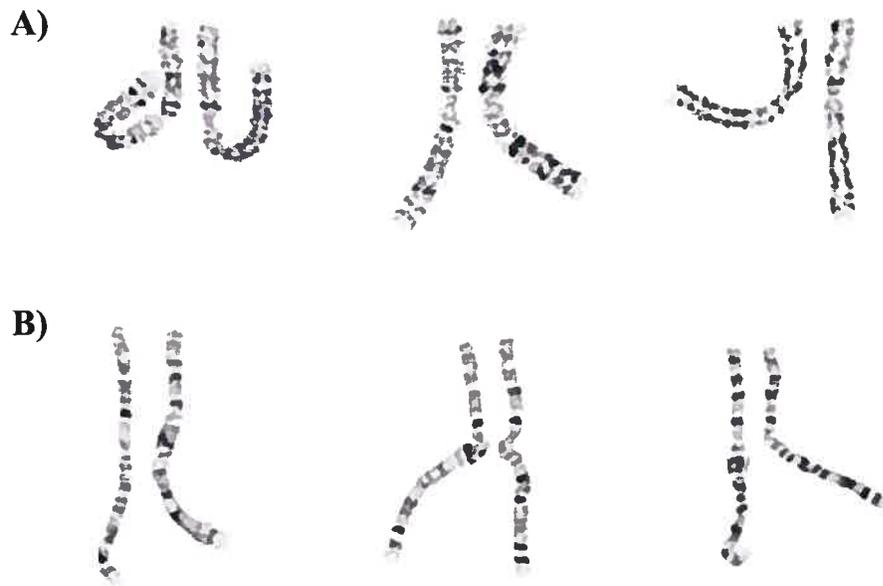


Figure 15 : Montage des chromosomes dérivés amniotiques fœtaux et lymphocytaires paternels du patient 27. **A)** Montage de la del(2)(pter) du patient 27 montrant que l'anomalie n'est pas visible à une résolution de 400 bandes. **B)** Montage de la del(2)(pter) du patient 16 montrant que l'anomalie est difficilement visible à une résolution de >500 bandes. Gracieuseté du laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine.

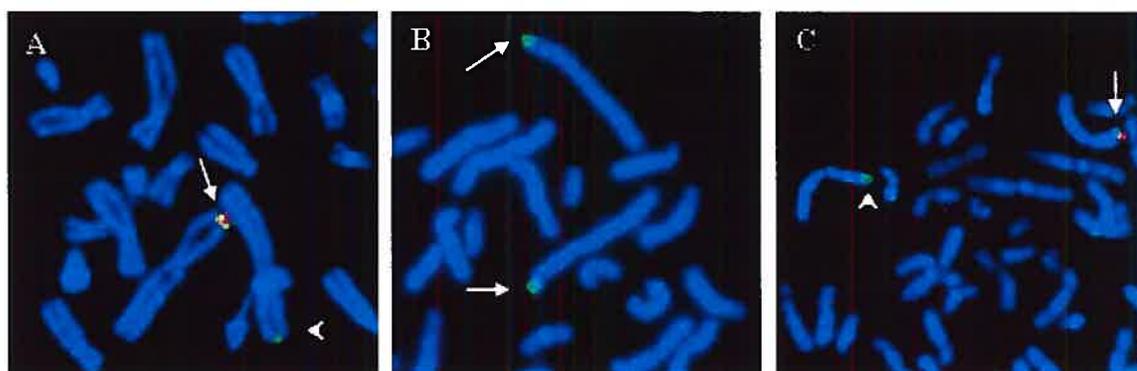


Figure 16 : Détermination du point de cassure du chromosome 2pter à l'aide de BACs pour le patient 27. **A)** Hybridation de RP11-664N22 (rouge) sur le chromosome 2pter normal (flèche), mais pas sur le chromosome 2pter délété (tête de flèche) et hybridation de RP11-379N10 (vert) sur les deux chromosomes 2pter indiquant que le point de cassure se situe entre ces deux BACs. **B)** Hybridation de RP11-168K7 (vert) sur les deux chromosomes 2pter (flèches). **C)** Confirmation du point de cassure sur les chromosomes lymphocytaires du père. Hybridation de RP11-664N22 (rouge) sur le chromosome 2pter normal (flèche), mais pas sur le chromosome 2pter délété (tête de flèche) et hybridation de RP11-379N10 (vert) sur les deux chromosomes 2pter.

Polymorphismes connus

Patient 32 : L'analyse subtélomérique a mis en évidence un polymorphisme fréquent de délétion au niveau du subtélomère 2qter avec la sonde D2S2986 (*Cytocell Technologies*), mais pas avec la sonde D2S447 (*Vysis*) (Figure 17).

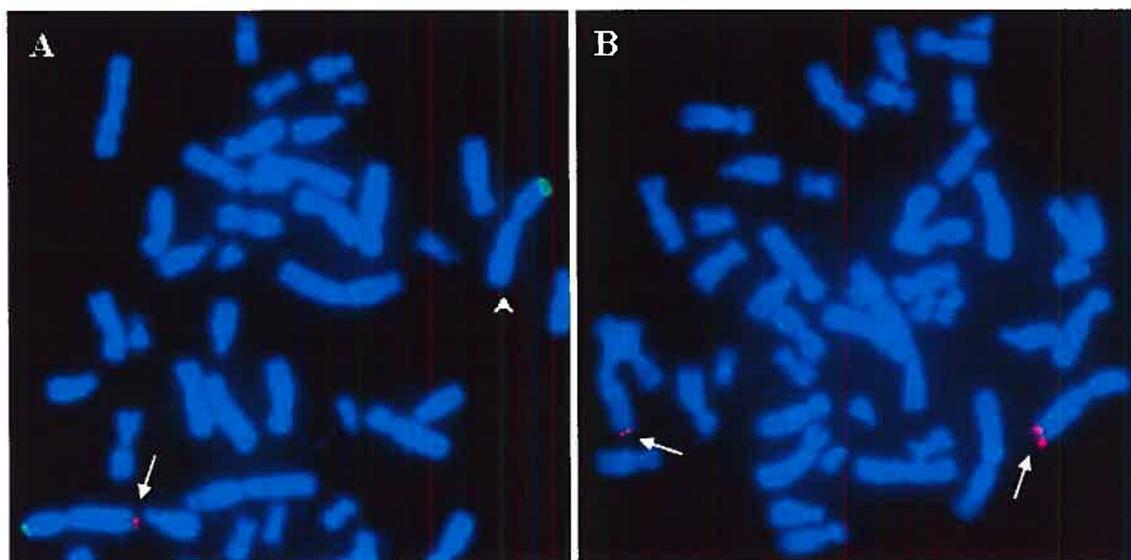


Figure 17 : FISH subtélomérique pour le patient 32. **A)** Hybridation de la sonde D2S2986 (rouge) sur un des deux chromosomes 2qter (flèche), mais pas sur l'autre (tête de flèche). **B)** Hybridation de la sonde D2S447 (rouge) sur les deux chromosomes 2qter (flèches).

Patient 34 : L'analyse subtélomérique a mis en évidence un polymorphisme rare d'amplification du signal 4qter avec la sonde dJ963K6 (*Cytocell Technologies*), mais pas avec la sonde D4S2930 (*Vysis*) (Figure 4 de la Section 3, page 56).

5.2.3 BACs mal cartographiés

Sur l'ensemble des 26 BACs que nous avons hybridés au cours de cette étude, deux d'entre eux (7%) n'avaient pas été bien cartographiés. Selon les bases de données que nous avons consultées, les clones RP11-163G21 et CTB-1G10 devaient être localisés sur les subtélomères 2p et 12q respectivement, mais le clone RP11-163G21 a hybridé sur le bras p du chromosome 12 (Figure 18A) et le clone CTB-1G10 a hybridé sur le bras q d'un chromosome acrocentrique (13, 14 ou 15) (Figure 18B).

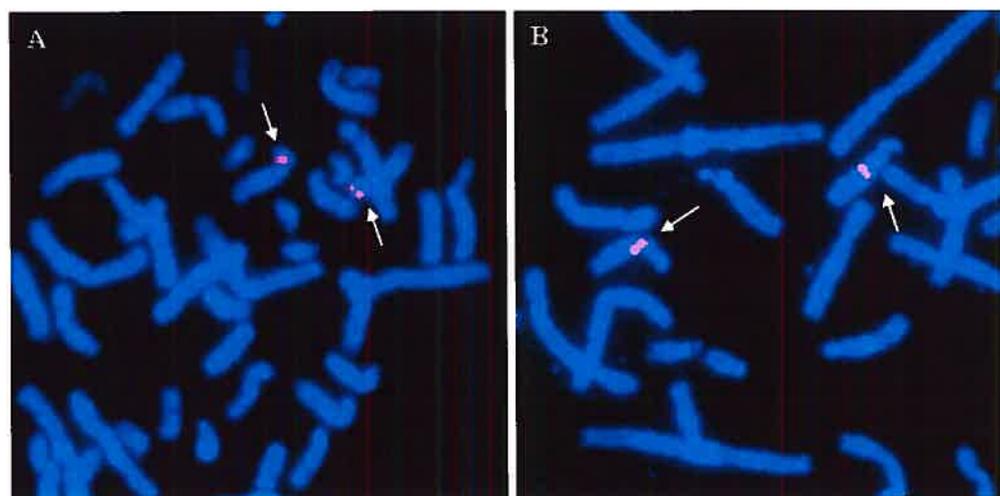


Figure 18 : BACs mal cartographiés. **A**) Hybridation de RP11-163G21 (rouge) sur le chromosome 12p (flèches) et non sur le chromosome 2pter. **B**) Hybridation de CTB-1G10 (rouge) sur un chromosome acrocentrique (flèches) et non sur le chromosome 12qter.

Section 6 : Discussion et conclusion

6.1 Mise au point technique

Le premier objectif de cette étude était de déterminer si l'analyse multi-subtélomérique par FISH était possible pour les chromosomes d'amniocytes cultivés *in situ*. Sur l'ensemble des 63 échantillons de liquide amniotique que nous avons recrutés, l'analyse complète a été possible pour 48 (76%) échantillons et impossible pour 15 échantillons (24%). Toutefois, très tôt dans l'étude, avant les mises au point techniques, nous n'avons pas tenté l'analyse pour un total de sept échantillons car les préparations chromosomiques n'étaient pas d'une qualité suffisante. Ainsi, l'analyse multi-subtélomérique par FISH a été possible pour 86% des échantillons pour lesquels nous avons tenté l'analyse (48/56).

Dans l'ensemble, les échecs ont eu lieu de façon précoce dans l'étude au moment où nous travaillions à mettre la technique au point. En plus des sept échantillons pour lesquels nous n'avons pas tenté l'analyse, des préparations chromosomiques de piètre qualité ont été analysées sans succès pour deux autres échantillons. Nous avons donc apporté plusieurs modifications à nos techniques de culture cellulaire et de récolte chromosomique ainsi que d'entreposage des lames tel que décrit dans la section matériel et méthodes (Section 4, page 61). Pour trois autres échantillons, les préparations chromosomiques étaient de relativement bonne qualité, mais les sondes subtélomériques ne s'hybridaient pas aux préparations chromosomiques ce qui nous a amené à modifier le prétraitement des lames pour le FISH.

Ces modifications sont également décrites dans la section matériel et méthodes (Section 4, page 63). Ainsi, sur l'ensemble des 15 échecs que nous avons connus au cours de l'étude, seulement trois échecs demeurent sans explication. Vers la fin de l'étude, 24 échantillons ont été analysés selon les nouvelles conditions de culture et de FISH que nous avons mis au point. Sur ce nombre, l'analyse a été possible et complète pour 22 échantillons (92%).

Nous avons donc atteint notre premier objectif en déterminant que l'analyse multi-subtélomérique par FISH est possible pour les chromosomes d'amniocytes cultivés *in situ*. Nous sommes confiantes que le transfert de l'analyse dans un contexte clinique aura comme effet d'améliorer le rendement de la technique car les trois conditions nécessaires à la réussite de l'analyse pourront être respectées sans contraintes : 1) le passage de cultures cellulaires jeunes sur lames, 2) le traitement des lames de préparations chromosomiques avec une solution de pepsine/HCl avant le FISH et 3) l'hybridation de la trousse multisondes sur des lames de préparations chromosomiques fraîchement récoltées. Le laboratoire clinique a maintenant commencé à offrir cette analyse dans un contexte clinique. Un résultat complet a été obtenu pour les 13 échantillons analysés jusqu'à présent et les résultats ont été transmis aux cliniciens dans un délai raisonnable (6-14 jours après l'analyse du caryotype).

Nous avons également tenté l'analyse pour deux échantillons de sang de cordon et l'analyse a été impossible pour l'un d'eux. Pour l'autre échantillon, l'analyse a été possible,

mais difficile, et nous avons dû reprendre l'hybridation de plusieurs sondes individuelles. Bien que les préparations chromosomiques aient été de bonne qualité et que la trousse *Multiprobe-T* (*Cytocell Technologies*) soit conçue pour les chromosomes de lymphocytes, l'hybridation n'a pas semblé efficace pour les échantillons de sang de cordon. Ceci s'explique probablement par la présence de protéines dans le sang de cordon qu'on ne retrouve pas dans le sang périphérique après la naissance. Les échantillons de sang de cordon sont généralement contaminés par le tissu conjonctif muqueux de soutien du cordon ombilical (gelée de Wharton). Ainsi, le protocole d'hybridation recommandé par le fabricant n'est pas idéal pour ce type d'échantillon. Nous avons donc tenté le prétraitement de FISH que nous avons mis au point pour les chromosomes d'amniocytes cultivés *in situ* pour ces deux échantillons et ce, sans succès. Nous n'avons pas analysé un nombre suffisant de spécimens de sang de cordon pour affirmer que le protocole de multisondes standard n'est pas efficace pour ce type d'échantillon, mais nos résultats suggèrent que les spécimens de sang de cordon devront être traités différemment des spécimens de sang veineux et de liquide amniotique pour l'analyse multi-subtélomérique.

6.2 Remaniements subtélomériques cliniquement significatifs

En plus des cinq remaniements subtélomériques décrits dans l'article, nous avons identifié une sixième anomalie d'intérêt clinique possible dans l'échantillon de sang de cordon du patient 49. Il s'agit d'une amplification de signal apparemment *de novo*. La fréquence des remaniements subtélomériques cliniquement significatifs dans notre

population de 49 fœtus avec malformations majeures et caryotype normal est donc de 4-6% (2-3/49) tout dépendant si nous considérons cette sixième anomalie comme significative ou non. Cette fréquence est identique à celle rapportée récemment par Le Caignec et al. [2005] dans une autre population de 49 fœtus avec malformations multiples.

Chez le patient 13, le fœtus a hérité un dérivé d'une translocation équilibrée maternelle résultant en une monosomie 14qter et une trisomie 16qter. Chez le patient 16, le fœtus a également hérité un dérivé d'une translocation équilibrée maternelle résultant dans ce cas en une trisomie 2qter et une monosomie 12qter. Cette même translocation a été identifiée chez d'autres membres de la famille. Dans les deux cas, la translocation équilibrée était visible sur les chromosomes lymphocytaires maternels à plus haute résolution, surtout pour un des deux dérivés de translocation (le dérivé 16qter pour le patient 13 et le dérivé 2qter pour le patient 16). Dans les deux cas, le fœtus a hérité de l'autre dérivé de translocation rendant le remaniement d'autant plus cryptique à une résolution de seulement 400 bandes. Ces résultats soulignent les limites de l'analyse cytogénétique prénatale et montrent que certains remaniements chromosomiques peuvent être plus difficiles à distinguer à l'état déséquilibré en raison de la présence d'un dérivé pour lequel l'anomalie est moins apparente.

Les remaniements subtélomériques des patients 13 et 16 ont été hérités d'un parent porteur d'une translocation équilibrée. Ainsi, deux des trois remaniements subtélomériques

ayant une signification clinique possible sont familiaux. Une fréquence élevée (50%) de remaniements subtélomériques familiaux a déjà été rapportée par plusieurs études [Knight et al., 1999; Flint and Knight, 2003; Adeyinka et al., 2005]. De plus, la fréquence des remaniements chromosomiques familiaux semble être encore plus élevée (65%) lorsqu'il s'agit d'un dérivé de translocation comme c'est le cas pour nos deux patients 13 et 16 [Adeyinka et al., 2005].

Chez le patient 13, les anomalies fœtales diagnostiquées à l'échographie et à l'autopsie corrélaient avec plusieurs traits phénotypiques décrits dans la littérature, pour soit la monosomie 14qter (menton pointu et petite bouche) [de Vries et al., 2003; van Karnebeek et al., 2002], soit la trisomie 16qter (anomalies rénales, pulmonaires, vertébrales et cérébrales ainsi que hyperflexion des doigts et des orteils) [Brisset et al., 2002] soit les deux types d'anomalies chromosomiques (anomalies cardiovasculaires, hypertélorisme, implantation basse des oreilles, fissures palpébrales basses, microstomie, philtrum long, fente palatine, cou court, micrognathie ainsi que front haut et proéminent) [de Vries et al., 2003; van Karnebeek et al., 2002; Brisset et al., 2002]. Ainsi, le phénotype de ce fœtus semble être le résultat de la combinaison des deux aberrations chromosomiques et donc des gènes distaux situés en 14qter et en 16qter.

Chez le patient 16, les anomalies sévères diagnostiquées à l'échographie et à l'examen clinique postnatal ne corrélaient pas avec le phénotype décrit dans la littérature pour la trisomie 2qter. Les seules malformations majeures rapportées pour la trisomie 2qter

sont des anomalies cardiaques et du système urinaire [Bird et Mascarello, 2001]. Le phénotype très sévère de ce patient est donc possiblement davantage causé par la monosomie 12qter pour laquelle il n'existe actuellement aucune description dans la littérature. Il est possible que la monosomie 12q de plus grande taille ne soit pas viable, mais que la perte du petit segment de 6 Mb de notre patient ne soit pas suffisante pour engendrer un avortement spontané. Nous avons ainsi publié la première description clinique de la monosomie 12qter dans le cadre de cette étude.

Chez le patient 49, le signal du bras q était amplifié pour un des deux chromosomes 20 avec les deux sondes subtélomériques 81F12 (*Cytocell Technologies*) et 20QTEL14 (*Vysis*) qui sont produites à partir du même marqueur STS (de l'anglais *Sequence Tagged Site*) (20QTEL14). Ceci suggère que la région couverte par les sondes pourrait être dupliquée. Généralement, les duplications peuvent être visualisées et confirmées par le FISH sur noyaux interphasiques qui peut montrer deux signaux distincts puisque les chromosomes sont moins condensés. Toutefois, le FISH interphasique chez ce fœtus a montré un signal amplifié sans révéler de duplication du signal 20qter. Il est également possible que l'amplification du signal 20qter soit simplement un polymorphisme détecté par les deux sondes ou un variant subtélomérique sans conséquence phénotypique. Cependant, aucun cas semblable n'a été décrit dans la littérature et puisque l'anomalie n'est pas portée par les parents du fœtus, on ne peut éliminer la possibilité d'un effet phénotypique. Quatre gènes sont localisés dans la région d'hybridation des sondes

subtélomériques selon la carte génique NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) : *OPRL1*, *NPBWR2*, *MYT1* et *PCMT2* (Figure 1). De plus, des malformations du système nerveux central ont été diagnostiquées chez ce fœtus et trois de ces gènes sont impliqués dans le développement ou le fonctionnement de ce système : *OPRL1* code un récepteur de protéine G qui est possiblement impliqué dans plusieurs activités cérébrales (particulièrement la régulation des réactions instinctives et émotionnelles), *NPBWR2* code un récepteur de protéine G exprimé dans le cortex frontal et *MYT1* code un facteur de transcription de la myéline neurospécifique. Il serait donc intéressant d'investiguer davantage l'amplification de signal 20qter observée au FISH métaphasique et interphasique.

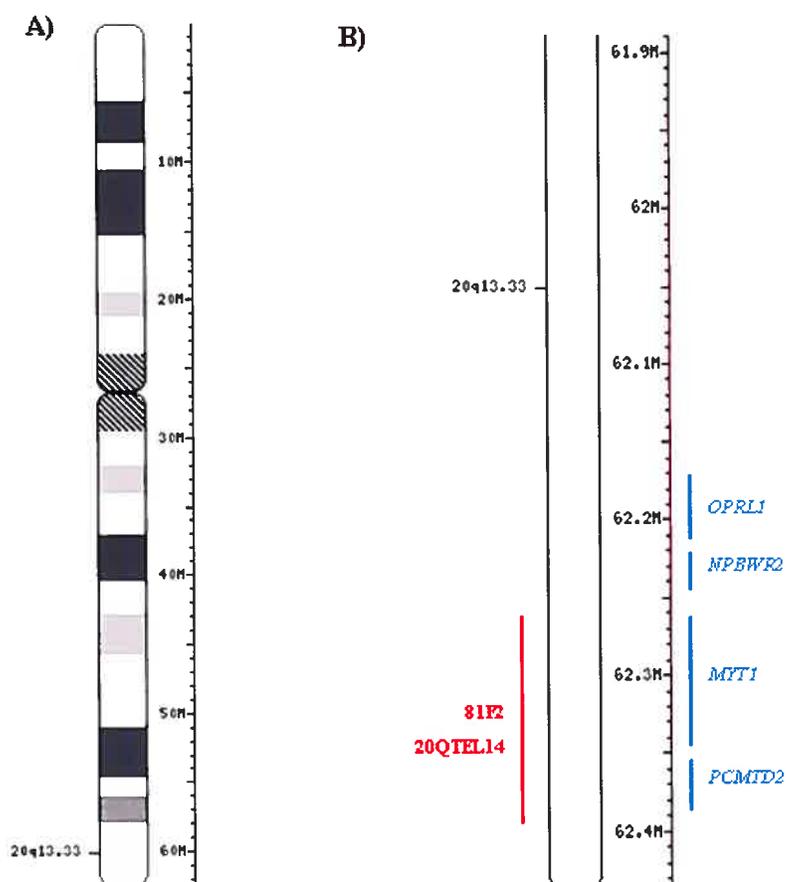


Figure 1 : Gènes possiblement dupliqués sur le chromosome 20qter. **A)** Idiogramme du chromosome 20 montrant la taille de 62 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 500 kb d'ADN terminal du chromosome 20q (20q13.33) montrant la localisation des sondes subtélomériques commerciales (rouge) produites à partir du marqueur STS 20QTEL14 ainsi que les quatre gènes (bleu) localisés dans la région d'hybridation des sondes. Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>].

La technique de *Fiber-FISH* avec les deux mêmes sondes subtélomériques 81F12 (*Cytocell Technologies*) et 20QTEL14 (*Vysis*) aurait permis de mieux étudier l'amplification du signal 20qter chez le patient 49. Cette technique consiste à étirer mécaniquement la chromatine chromosomique en des filaments avant l'hybridation des sondes ce qui nous aurait permis de visualiser une duplication de très petite taille (1 kb) par la présence de deux signaux fluorescents séparés. Cependant, la suspension de cellules fixées du fœtus a été épuisée, ce qui nous a empêché de tenter cette technique. Toutefois, du tissu fœtal hépatique serait disponible. Il serait donc possible d'effectuer une technique de RT-PCR (de l'anglais, *real time polymerase chain reaction*) à partir d'amorces spécifiques aux quatre gènes de la région 20qter. La comparaison du nombre de copies des gènes de l'ADN du foie foetal et de l'ADN lymphocytaire des deux parents permettrait de confirmer s'il s'agit réellement d'une duplication vraie affectant des gènes actifs ou d'un simple polymorphisme détectée par les sondes subtélomériques.

6.3 Polymorphismes et variants familiaux

Les subtélomères sont des régions hautement polymorphiques en raison de leur structure complexe et de l'homologie des blocs subtélomériques de différents chromosomes. Ces caractéristiques favorisent la recombinaison ectopique qui, en retour, crée d'autres polymorphismes [Mefford et Trask, 2002]. Un taux élevé de polymorphismes sans conséquence clinique des régions subtélomériques a été rapporté par plusieurs études

[Ballif et al., 2000]. Nous avons observé le même phénomène dans notre population de fœtus avec malformations majeures en identifiant trois polymorphismes ou variants subtélomériques (6%). La présence de polymorphismes dans ces régions peut compliquer considérablement l'interprétation des résultats d'analyse, particulièrement dans les cas de remaniements subtélomériques *de novo*. De plus, les polymorphismes détectés par les sondes subtélomériques commerciales ne sont pas encore tous bien décrits. En effet, dans le cadre de notre étude, nous avons identifié un polymorphisme fréquent (patients 32), un polymorphisme décrit une seule fois dans la littérature (patient 34) ainsi qu'un nouveau variant familial jamais été décrit auparavant (patient 27). Il est donc important de rapporter les polymorphismes détectés par les sondes subtélomériques des trousseaux commerciales afin de déterminer leur fréquence et permettre une meilleure interprétation des résultats d'analyse.

Chez le patient 32, la sonde D2S2986 (*Cytocell Technologies*) n'a pas hybridé au niveau du subtélomère du bras q d'un des deux chromosomes 2. Toutefois, la sonde D2S447 (*Cytocell Technologies*) localisée à 17 kb en proximal de D2S2986 était présente. Ce polymorphisme de délétion 2qter a déjà été rapporté dans 54 cas et semble être le polymorphisme subtélomérique le plus fréquent [Hengstschläger et al., 2005]. En 2000, Ballif et collègues ont rapporté une fréquence de 5% dans une cohorte de 154 patients. Toutefois, la fréquence réelle de ce polymorphisme est difficile à évaluer car la majorité des groupes de recherche ne le rapporte plus. Pour permettre la détection de ce

polymorphisme, les deux sondes subtélomériques, D2S2986 et D2S447, sont maintenant présentes dans la trousse *Multiprobe-T* (*Cytocell Technologies*).

Chez le patient 34, le signal du bras q d'un des deux chromosomes 4 était amplifié avec la sonde dJ963K6 (*Cytocell Technologies*), mais pas avec la sonde D4S2930 (*Vysis*). Ce polymorphisme a déjà été rapporté une fois dans la littérature. Dans le cas rapporté, l'amplification de signal apparaissait comme une duplication ou une triplication sur noyaux interphasiques, nous n'avons pas observé ce phénomène chez notre patient [Hengstschläger et al., 2005]. Un autre polymorphisme 4q a déjà été observé au laboratoire avec la même sonde subtélomérique. Dans ce cas, le signal 4qter était très faible chez un enfant avec retard mental ainsi que chez sa mère normale [Frédérique Tihy et Emmanuelle Lemyre. 2006. Remaniements subtélomériques : du postnatal au prénatal. 6^e Journées Génétiques, RMGA]. De plus, dans l'étude d'une population contrôle, une délétion 4q a été rapportée chez deux individus normaux [Joyce et al., 2001]. Malheureusement, les parents du patient 34 n'étaient pas disponibles pour confirmer que l'amplification de signal 4qter du fœtus était héritée.

Chez le patient 27, les deux sondes subtélomériques D2S2983 (*Cytocell Technologies*) et VIJyRM2052 (*Vysis*) n'ont pas hybridé au niveau du bras p d'un des deux chromosomes 2 indiquant une délétion 2pter. Le père et la grand-mère paternelle sains du fœtus portent la même anomalie subtélomérique ce qui suggère que la délétion n'explique

probablement pas le phénotype anormal du fœtus. Toutefois, selon la carte génique NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], deux gènes sont localisés dans la région chromosomique possiblement délétée : *SH3YL1* dont le rôle est inconnu et *ACPI* qui code une phosphotyrosine phosphatase (Figure 2). Ainsi, nous ne pouvons éliminer la possibilité d'un effet récessif de ces gènes sur le phénotype du fœtus. Le phénotype normal des porteurs de cette microdélétion pourrait aussi être expliqué par un effet d'empreinte maternel, mais le phénomène d'empreinte parentale n'a pas été rapportée dans cette région du génome jusqu'à présent [Heide et al., 2000]. Ainsi, l'hypothèse la plus plausible est qu'il s'agisse d'un variant familial rare.

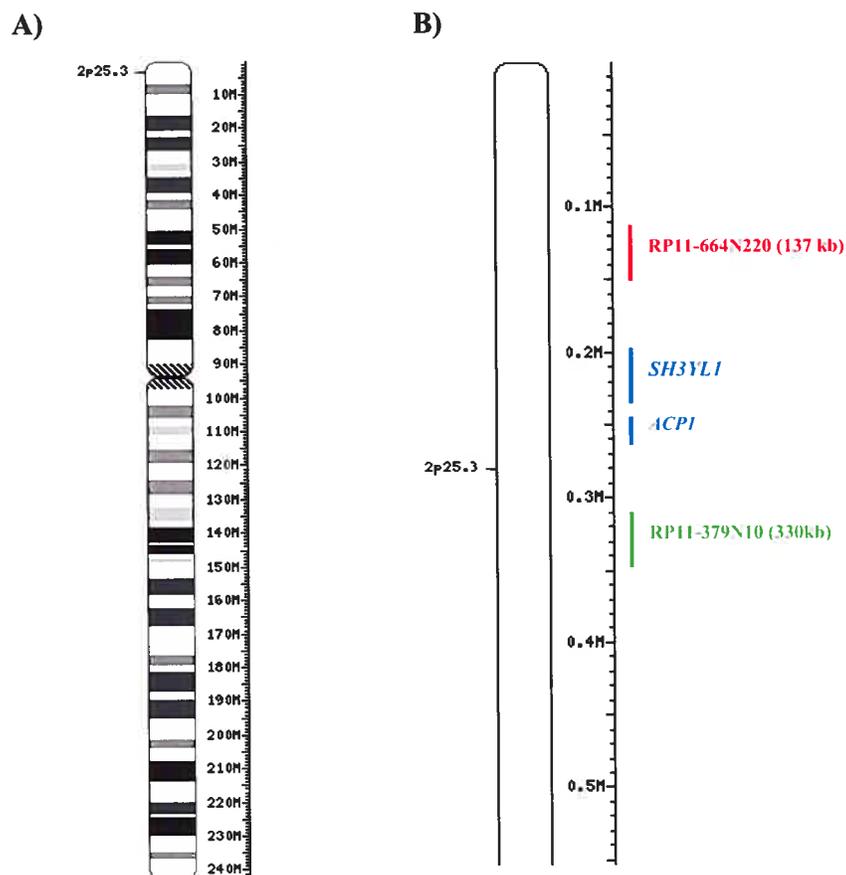


Figure 2 : Gènes possiblement délétés sur le chromosome 2pter. **A)** Idiogramme du chromosome 2 montrant la taille de 243 Mb du chromosome complet. **B)** Grossissement des 500 kb d'ADN terminal de 2pter (2p25.3) montrant les deux BACs (rouge et vert) délimitant le point de cassure situé entre 137-330 kb du télomère ainsi que les deux gènes (bleu) localisés dans la région possiblement délétée. Figure modifiée de NCBI *Map Viewer* [www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/].

En effet, de plus en plus de variants chromosomiques familiaux sans conséquence phénotypique commencent à être décrits depuis l'instauration des techniques de marquage de haute résolution et de cytogénétique moléculaire en laboratoire clinique. Ces variants familiaux sont généralement de deux types : 1) les anomalies chromosomiques déséquilibrées où le nombre de copies de plusieurs gènes est soit diminué ou augmenté d'une copie suite à une délétion ou une duplication et 2) les variants euchromatiques qui résultent d'une variation du nombre de copies d'un segment d'ADN contenant des gènes et des pseudogènes qui sont polymorphiques dans la population générale et qui apparaissent comme des duplications lorsque de multiples copies sont présentes. Barber [2005] a étudié les conséquences phénotypiques de 200 familles dont 130 portaient des anomalies chromosomiques déséquilibrées et 70 portaient un des cinq variants euchromatiques documentés jusqu'à présent : 8p23.1, 9p12, 9q12, 15q11.2 et 16p11.2. Les résultats de cette étude démontrent que pour 54% des familles porteuses d'un variant euchromatique, aucun individu ne présente un phénotype anormal comparativement à seulement 18% des familles porteuses d'une anomalie chromosomique déséquilibrée. Inversement, seulement 2% des familles porteuses d'un variant euchromatique comportent plusieurs individus ayant des traits phénotypiques anormaux communs comparativement à 59% des familles porteuses d'une anomalie chromosomique déséquilibrée. Ces résultats soulignent l'importance de déterminer l'origine de l'absence, et plus particulièrement de l'amplification, d'un signal lors des techniques de cytogénétique moléculaire et de demeurer vigilant lors de l'interprétation de la signification clinique de ces résultats [Barber, 2005].

6.4 BACs mal cartographiés

Un total de 7% (2/26) des BACs que nous avons hybridés pour déterminer les points de cassure des remaniements subtélomériques étaient mal cartographiés. Ces résultats sont comparables à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature. En 2005, Bejjani et al. ont étudié par FISH 906 BACs sélectionnés à partir des cartes génomiques des bases de données NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] et *UCSC Genome Browser* [<http://genome.ucsc.edu/>]. Sur ces 906 BACs, ils ont trouvés des problèmes avec 317 clones (35%) : 61 BACs (7%) étaient mal cartographiés, 149 BACs (16%) présentaient de l'hybridation croisée et 107 BACs (12%) ne s'hybridaient pas selon les conditions expérimentales standard. Ces résultats démontrent qu'il est primordial de localiser les BACs sur un contrôle avant de les utiliser, même s'ils ont déjà été cartographié par d'autres groupes de recherche comme c'était le cas pour nos deux BACs mal cartographiés. Les BACs étudiés par Bejjani et al. [2005] ainsi que ceux que nous avons utilisés au cours de notre étude n'étaient pas tous situés au niveau des subtélomères et on peut supposer qu'un plus grand nombre de clones seront mal cartographiés et présenteront de l'hybridation croisée au niveau de ces régions due à leur structure hautement variable et à leur homologie.

6.5 Impact clinique

La fréquence moyenne des remaniements subtélomériques chez les enfants avec retard mental est d'environ 6% [Bicseker et al., 2002]. Certains auteurs estiment qu'environ

50% des remaniements subtélomériques sont détectables à une résolution chromosomique de 500-550 bandes ce qui suggère que la fréquence des remaniements réellement cryptiques est peut-être surévaluée dans les études postnatales [Jalal et al., 2003; Yu et al., 2005]. Effectivement, la plus importante étude de cohorte publiée jusqu'à présent a rapporté une fréquence de remaniements subtélomériques cryptiques de seulement 2,5% dans une cohorte de 11 688 patients avec retard de développement et caryotype normal à une résolution de 550 bandes [Ravnan et al., 2005]. La résolution standard de l'analyse cytogénétique prénatale des amniocytes est moindre que celle des lymphocytes sanguins, soit 400 bandes [Horsman, 1994]. Nous avons rapporté une fréquence de remaniements subtélomériques de 4-6% dans une cohorte de 49 fœtus avec malformations majeures à l'échographie et un caryotype normal à une résolution standard d'au moins 400 bandes. Il en est de même pour la seule autre étude de cohorte prénatale publiée jusqu'à présent [Le Caignec et al., 2005]. À priori, notre hypothèse s'est avérée valable avec une fréquence de remaniements subtélomériques chez les fœtus avec malformations comparable à celle retrouvée chez les enfants avec retard mental. Cependant, d'autres études similaires seront nécessaires pour confirmer nos résultats et vérifier la validité de cette hypothèse.

Nos résultats semblent montrer que les remaniements subtélomériques jouent un rôle important dans le développement de malformations congénitales. De plus, le résultat de l'analyse multi-subtélomérique a un impact majeur pour la famille. La détection de ce type de remaniement dans la période prénatale permet d'offrir aux parents un conseil génétique

approprié afin qu'ils soient en mesure de prendre une décision éclairée sur la poursuite ou l'interruption de la grossesse. Il est cependant important de noter que la nature hautement polymorphique des subtélomères fait en sorte qu'il faut être très prudent lors de l'interprétation des résultats d'analyse; surtout lorsque la signification clinique d'un remaniement subtélomérique n'est pas confirmée, et ce, particulièrement dans un contexte prénatal. À plus long terme, les résultats de l'analyse multi-subtélomérique sont utiles pour le suivi médical des bébés et des autres membres de la famille porteurs de remaniements subtélomériques ainsi que pour la planification de futures grossesses. Il nous semble donc indiqué d'offrir cette analyse dans un contexte clinique, ce qui a été implanté dans le laboratoire clinique depuis quelques mois.

Il a été difficile jusqu'à présent de déterminer les indications cliniques de l'analyse dans les populations postnatales [de Vries et al., 2001; Walter et al., 2004]. Les critères d'inclusion sont très différents d'une étude à l'autre, ce qui explique probablement la grande variabilité dans la fréquence de remaniements subtélomériques rapportée par les différents groupes de recherche (2-29%) [Ravnan et al., 2005]. Pour le moment, nous avons observé que tous les fœtus présentant un remaniement subtélomérique dans notre population et dans les autres cas rapportés jusqu'à présent avaient des malformations multiples [Kilby et al., 2001; Souter et al., 2003; Iqbal et al., 2005; Le Caignec et al., 2005 et autres]. Ainsi, les indications de l'analyse multi-subtélomérique prénatale devraient

probablement inclure la présence de plus d'une malformation majeure à l'échographie, mais un plus grand nombre d'études sera nécessaire pour raffiner ces indications cliniques.

6.6 Perspectives futures

Même si les critères cliniques de l'analyse seront mieux définis dans quelques années grâce à un plus grand nombre d'études, il est fort possible que ceux-ci demeureront larges comme c'est le cas chez les enfants avec retard mental. Cependant, les remaniements subtélomériques sont souvent des dérivés de translocation impliquant deux chromosomes ce qui contribue largement à la variabilité des phénotypes observés. Ainsi, le phénotype clinique donne rarement des indices sur les chromosomes impliqués dans les remaniements ce qui engendre la nécessité d'analyser tous les chromosomes pour chaque patient. L'analyse multi-subtélomérique est susceptible d'être effectuée pour un grand nombre de fœtus ce qui risque de surcharger les laboratoires cliniques. Effectivement, une centaine des échantillons référés au laboratoire de cytogénétique prénatale du CHU Sainte-Justine présentent des anomalies fœtales majeures à l'échographie et un caryotype normal. Ce chiffre se traduit en 200-300 cas par année pour l'ensemble de la province du Québec. Le FISH multi-subtélomérique est actuellement la technique la plus utilisée et la plus accessible aux laboratoires cliniques, mais elle requiert beaucoup de temps. Ainsi, il sera intéressant de trouver d'autres méthodes possiblement automatisables si l'analyse subtélomérique prénatale devient une pratique courante en laboratoire clinique. Nous discutons ici des avantages et désavantages des principales méthodes d'analyse possibles.

6.6.1 FISH multicoloreurs

Au cours des dernières années, plusieurs techniques de FISH multicoloreurs ont été développées permettant la visualisation du caryotype entier dont le SKY (de l'anglais, *spectral karyotyping*), le M-FISH (de l'anglais, *multiplex fluorescence in situ hybridization*) et le COBRA (de l'anglais, *combined binary ratio labeling*). Ces techniques sont basées sur l'utilisation de sondes de peinture chromosomique et de différentes combinaisons de fluorochromes. Elles permettent ainsi d'attribuer une couleur particulière à chacune des paires de chromosomes. Elles sont très utiles pour l'analyse des cellules cancéreuses puisqu'elles permettent la visualisation simultanée plusieurs remaniements d'un complément chromosomique [Speicher et al., 1996; Tanke et al., 1999]. Cependant, les techniques de FISH multicoloreurs ne permettent pas la détection de certaines anomalies impliquant l'ADN d'un même chromosome, telles que les délétions et les inversions. De plus, ces techniques ne permettent pas une résolution suffisante pour la détection des remaniements subtélomériques de petite taille puisque les sondes disponibles contiennent peu de séquences spécifiques à ces régions [Holinski-Feder et al., 2000].

Des techniques de FISH multicoloreurs utilisant des sondes spécifiques aux régions subtélomériques ont donc été développées tels que les techniques de FISH télomériques multiplex (M-TEL et TM-FISH de l'anglais, *telomeric multiplex fluorescence in situ hybridization*). Ces techniques utilisent différentes combinaisons de fluorochromes produisant un nombre suffisant de différentes couleurs pour visualiser les régions subtélomériques de tous les chromosomes après deux hybridations successives dans le cas

du M-TEL et après une seule hybridation pour le TM-FISH [Brown et al., 2001; Henegariu et al., 2001]. Le principal avantage de ces techniques est leur rapidité d'exécution et d'analyse par rapport au FISH multi-subtélomérique standard qui est beaucoup plus ardu puisqu'il faut analyser chaque chromosome individuellement. Cependant, les techniques de FISH multicolores sont très coûteuses et très peu de laboratoires cliniques possèdent actuellement l'équipement informatique et microscopique nécessaire à l'analyse.

6.6.2 MAPH

Récemment, le MAPH (de l'anglais, *multiplex amplifiable probe hybridization*) a été développé pour déterminer l'altération du nombre de copies de différents segments génomiques spécifiques [Armour et al., 2000; White et al., 2004]. Le principe de cette méthode est l'hybridation de sondes spécifiques à l'ADN génomique immobilisé sur une membrane de nylon. Après l'hybridation, les sondes liées à la membrane de nylon sont amplifiées par PCR (de l'anglais, *polymerase chain reaction*) grâce à des amorces marquées à la fluorescence ou à la radioactivité (Figure 3). Les fragments amplifiés sont séparés sur gel en fonction de leur taille ce qui permet de déterminer le nombre de copies de chaque segment génomique [Rooms et al., 2005]. Différentes séries de sondes permettant l'analyse simultanée des régions subtélomériques de tous les chromosomes (avec l'exception du subtélomère du bras p des chromosomes acrocentriques) ont été développées dont une incluant des sondes spécifiques à des segments interstitiels [Sismani et al., 2001; Hollox et al., 2002; Kriek et al., 2004]. La détection de microduplications de plus petite taille que le FISH, la possibilité d'analyser des segments interstitiels et les

faibles coûts de l'analyse sont les principaux avantages du MAPH. Toutefois, cette technique ne détecte pas les remaniements chromosomiques équilibrés ce qui est un inconvénient majeur puisque la détection de ce type de remaniement a un impact important sur le conseil génétique offert aux familles concernées pour la planification de futures grossesses. De plus, les résultats d'analyse doivent être confirmés par une autre méthode, telle que le FISH [Rooms et al., 2005].

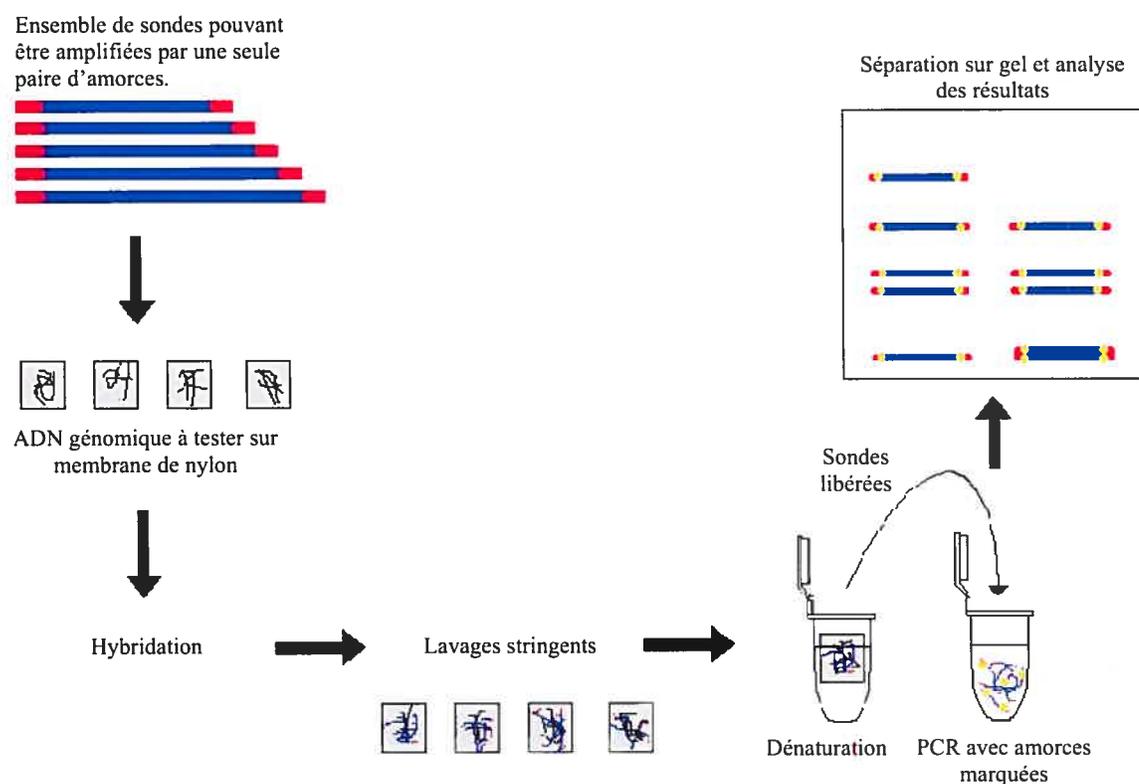


Figure 3 : Principe de la technique de MAPH. Figure modifiée de *Leiden Muscular Dystrophy pages* 2004 [http://www.dmd.nl/DMD_MAPH.html].

6.6.3 MLPA

La méthode de MLPA (de l'anglais, *Multiplex ligation-dependent probe amplification*) est semblable au MAPH, mais elle est techniquement plus simple puisqu'elle ne requiert pas l'immobilisation de l'ADN génomique sur une membrane de nylon [Schouten et al., 2002; White et al., 2004]. Cette technique consiste en l'hybridation de sondes adjacentes qui sont par la suite liées par une étape de ligation. Comme dans le MAPH, suite à l'hybridation, les sondes sont amplifiées par PCR grâce à des amorces marquées à la fluorescence ou à la radioactivité (Figure 4). Les fragments d'ADN amplifiés sont par la suite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire sur gel ce qui permet de déterminer le nombre de copies de chaque segment génomique [Rooms et al., 2005]. Cette méthode présente les mêmes avantages et inconvénients que le MAPH.

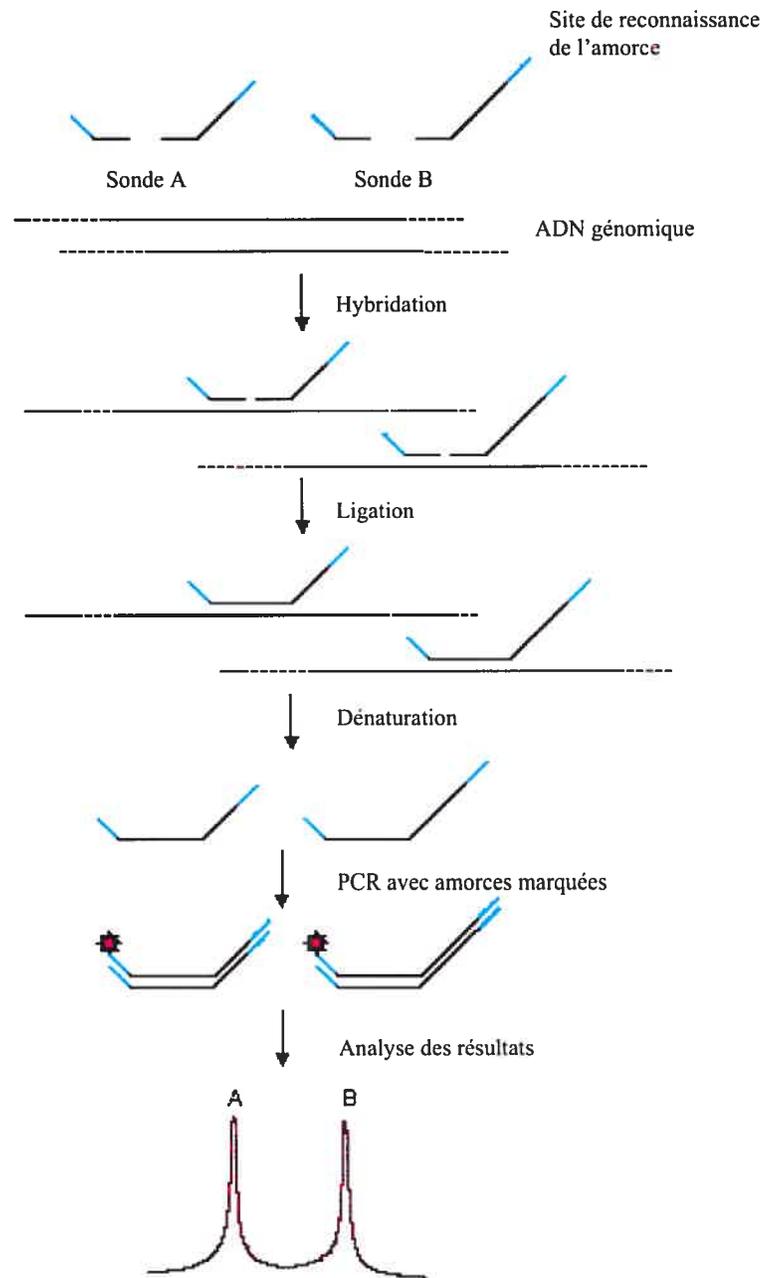


Figure 4 : Principe de la technique de MLPA. Figure modifiée de Sellner et Taylor [2004].

6.6.4 RT-PCR

Le principe du RT-PCR (de l'anglais, *Real time polymerase chaine reaction*) se base sur le fait que la quantité d'ADN dans l'échantillon du patient détermine le nombre de cycles d'amplification qui est nécessaire pour atteindre un plateau. La quantification de l'ADN amplifié se fait en ajoutant un fluorochrome intercalant tel que le SYBR-green dans le milieu réactionnel. Cette étape permet de déterminer le nombre de copies de chaque segment d'ADN amplifié et assure la détection de microduplications de plus petite taille que le FISH [Rooms et al., 2005]. Une série d'amorces permettant l'amplification des régions subtélomériques de tous les chromosomes, incluant les chromosomes acrocentriques, a été développée et testée sur une cohorte de 20 patients ayant des remaniements subtélomériques connus et 20 contrôles négatifs. Dans cette étude, tous les remaniements ont été identifiés et aucun résultat faussement positif n'a été détecté ce qui démontre l'intérêt clinique potentiel de cette méthode [Boehm et al., 2004]. De plus, cette technique est automatisable et permet l'ajout d'amorces spécifiques à des segments interstitiels. Curieusement, aucune étude de cohorte de patients avec retard mental n'a été rapporté jusqu'à présent ce qui serait nécessaire pour mieux évaluer l'intérêt et la faisabilité de cette technique dans un contexte clinique. Les principaux désavantages du RT-PCR sont, tout comme les autres techniques décrites, l'impossibilité de détecter les remaniements chromosomiques équilibrés et la nécessité de confirmer les résultats par une autre technique comme le FISH [Rooms et al, 2005].

6.6.5 Analyse de marqueurs polymorphiques

L'analyse de marqueurs polymorphiques situés près des télomères peut être utilisée pour détecter les remaniements subtélomériques [Overhauser et al., 1989; Wilkie, 1993]. Des études de cohortes utilisant des marqueurs VNTR (de l'anglais, *variable number tandem repeat*) et des marqueurs de type microsatellite ont été rapportées jusqu'à présent [Flint et al., 1995; Slavotinek et al., 1999]. L'analyse des VNTR est trop laborieuse pour être applicable à un contexte clinique puisque cette méthode requiert l'analyse de l'ADN du patient et des deux parents par buvardage de type *Southern*. L'analyse des marqueurs de type microsatellite ne présente pas ce problème puisqu'il est possible d'automatiser la technique [Colleaux et al., 2001]. Cependant, il n'est pas possible d'analyser les régions subtélomériques de tous les chromosomes d'un patient par l'analyse de marqueurs microsatellites. Malgré le polymorphisme de ces marqueurs, chaque patient est homozygote pour un certain nombre d'entre eux au niveau de quelques extrémités chromosomiques. Dans ces cas, il n'est pas possible de reconnaître la différence entre l'homozygotie et la délétion d'un marqueur [Rooms et al., 2005]. Théoriquement, ce problème peut être évité en analysant un plus grand nombre de marqueurs pour les chromosomes concernés [Borgione et al., 2001]. Cependant, peu de marqueurs microsatellites sont situés près des télomères et il n'est pas toujours possible dans la pratique d'en analyser un plus grand nombre. Les principaux avantages de l'analyse des marqueurs polymorphiques est que ces techniques permettent la détection de la disomie uniparentale et des duplications de très petite taille ce qui n'est pas le cas des techniques de FISH. Toutefois, ces techniques ne

défectent pas les remaniements chromosomiques équilibrés. De plus, plusieurs résultats faussement positifs ont été rapportés jusqu'à présent dû à des polymorphismes de taille des régions subtélomériques ce qui engendre la nécessité de confirmer les résultats d'analyse par une autre méthode, telle que le FISH [Rooms et al., 2005; Rosenberg et al., 2001].

6.6.6 Criblage génomique

Les nouvelles techniques permettent la détection de microremaniements chromosomiques dans l'ensemble du génome; elles ne sont pas restreintes aux régions subtélomériques. Le CGH est une méthode conçue à partir d'une modification du FISH. Dans cette technique, l'ADN génomique du patient (marqué par un fluorochrome vert) et d'un contrôle (marqué par un fluorochrome rouge) sont hybridés sur une lame de préparation de chromosomes métaphasiques normaux. Des altérations du nombre de copies de segments génomiques de l'ADN du patient sont détectées par la différence du ratio des deux fluorochromes : un gain d'ADN se voit en vert alors qu'une perte d'ADN se voit en rouge (Figure 5A). Ainsi, le CGH permet d'étudier toute la longueur des chromosomes et non seulement les régions subtélomériques. Cependant, la résolution de la technique du CGH est limitée (~3-10 Mb) puisque l'hybridation est effectuée sur des chromosomes métaphasiques ce qui a amené le développement du CGH sur micropuces [Rooms et al., 2005].

Les micropuces de CGH consistent en un support solide sur lequel sont fixés des clones (BACs) génomiques. L'hybridation de l'ADN génomique du patient et de l'ADN génomique d'un contrôle (marqué respectivement en vert et en rouge) permet la détection de duplications et de délétions de plus petite taille que le CGH standard et augmente considérablement la résolution de l'analyse (Figure 5B) [Solinas-Toldo et al., 1997]. La série de sondes subtélomériques commerciales a été optimisée et adaptée au CGH sur micropuces par Veltman et al. en 2002. Par la suite, une micropuce de CGH constituée de BACs distancés de 1-3 Mb couvrant l'ensemble du génome a été développée [Snijders et al., 2001; Fiegler et al., 2003; Vissers et al., 2003] et commercialisée (*Academia/Spectral Genomics*) permettant la détection des duplications et délétions subtélomériques et interstitielles. Plus récemment, une micropuce composée de plus de 32 000 clones distancés de seulement 100 kb pour couvrir l'ensemble du génome a été développée [Ishkanian et al., 2004] et est maintenant disponible sur le marché (*Academia*).

Des cohortes de patients avec retard mental ont commencé à être étudiées avec cette micropuce et la fréquence des microremaniements chromosomiques retrouvée est d'environ 10% (5-20%) [Vissers et al., 2003; Shaw-Smith et al., 2004; Schoumans et al., 2005]. Ces résultats postnataux sont comparables à la fréquence de 8-10% de microremaniements chromosomiques rapportés dans la seule cohorte prénatale de fœtus avec malformations à l'échographie étudiée par CGH sur micropuce [Le Caignec et al. 2005]. Certains groupes de recherche ont commencé à investiguer l'application de cette analyse dans un contexte

clinique prénatal [Larrabee et al., 2004; Rickman et al., 2006; Sahoo et al., 2006, Van den Veyver et Beaudet, 2006]. Cependant, comme les polymorphismes détectables par les BACs utilisés ne sont pas encore décrits, il est très difficile d'évaluer la signification clinique des résultats de l'analyse. De plus, on estime qu'environ 35% des clones utilisés pour construire les micropuces ne sont pas efficaces pour des raisons variables : mal cartographiés, hybridation croisée et absence d'hybridation.

Malgré que le CGH sur micropuces soit une technique très rapide et sensible, elle est peu utilisée actuellement car elle est très coûteuse et la majorité des laboratoires cliniques ne possèdent pas l'équipement nécessaire. De plus, il faut demeurer très prudent lors de l'interprétation des résultats en raison des polymorphismes possibles et du manque de spécificité des clones. Pour ces raisons, l'ADN des parents doit toujours être analysé parallèlement à l'ADN du patient ce qui triple les coûts. Un autre désavantage considérable de cette technique est qu'elle ne permet pas la détection des remaniements chromosomiques équilibrés.

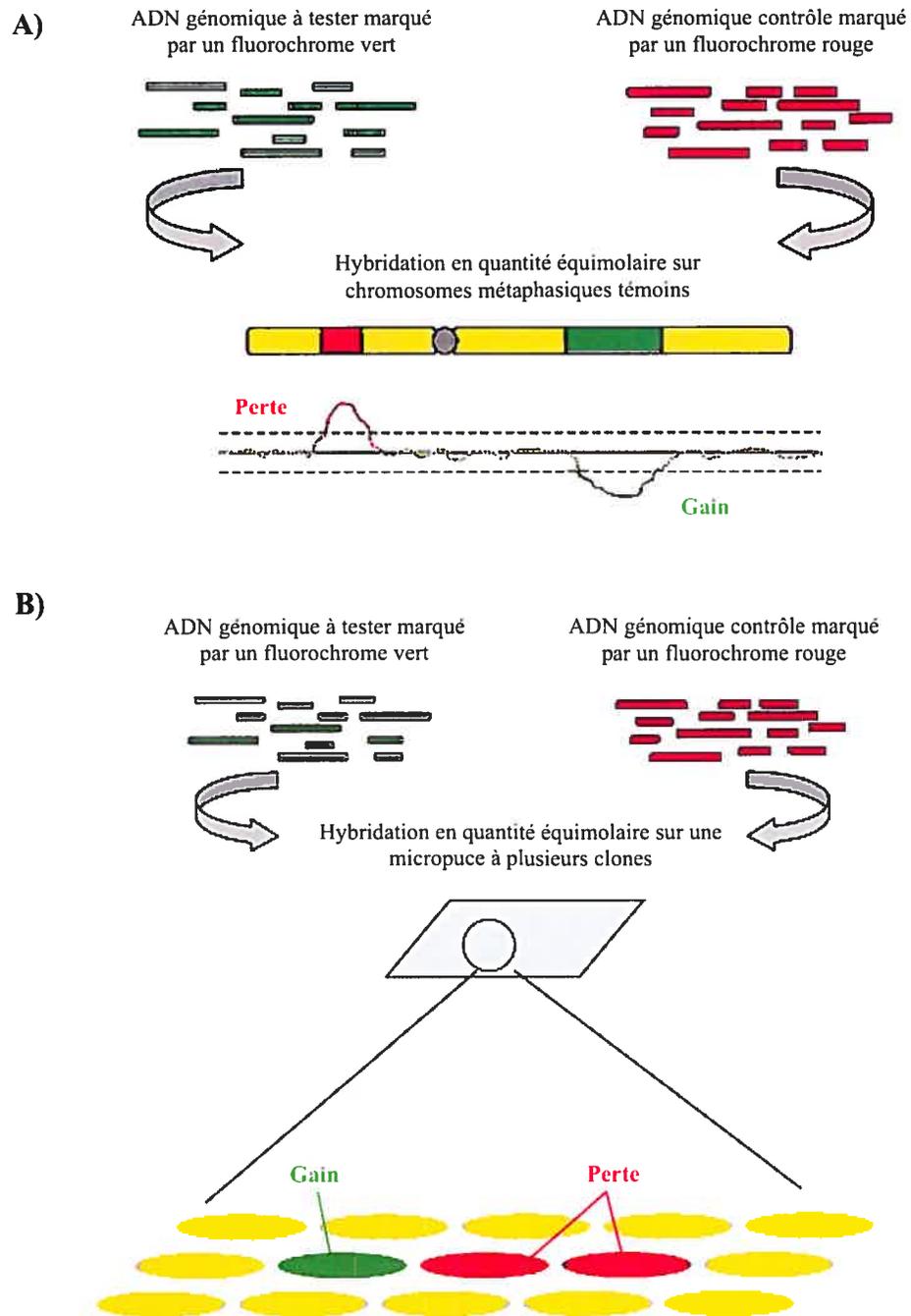


Figure 5 : Principe de la technique de CGH. **A)** CGH sur chromosomes métaphasiques. **B)** CGH sur micropuce. Figure modifiée de Siffroi et Chantot-Bastaraud [2004].

Récemment, un autre type de micropuce a été développé permettant l'analyse du génome complet à l'aide de marqueurs polymorphiques de type SNP (de l'anglais, *single nucleotide polymorphism*). Le principe de la technique se base sur l'hybridation d'une très petite quantité d'ADN génomique (marqué par un fluorochrome) sur un support solide contenant des oligonucléotides spécifiques à des SNPs couvrant l'ensemble du génome. L'analyse de l'ADN du patient et de ses deux parents doit se faire en parallèle. Lors de l'analyse des résultats, les duplications/délétions sont identifiées en comparant les ratios de fluorescence de chaque SNP du patient et de ses parents. Ainsi, cette méthode est simple, efficace et automatisable. De plus, l'analyse des SNPs permet de la disomie uniparentale ce qui constitue avantage considérable [Altug-Teber et al., 2005; Bruce et al., 2005; Slater et al., 2005].

Friedman et al. [2006] ont étudié la fréquence des remaniements chromosomiques cryptiques à l'aide de micropuces de SNPs dans une cohorte de 100 enfants avec retard mental et ont rapporté une fréquence de 11%. Ce résultat est comparable à ceux des études avec les micropuces de CGH, mais les remaniements détectés étaient de plus petite taille ($\geq 37,6$ kb). En effet, les micropuces de SNPs offre une meilleure résolution que le CGH. Au cours des dernières années, des micropuces constituées de SNPs distancées 300 kb, 30 kb, 10 kb et 6 kb ont été développées [Rauch et al., 2004; Slater et al., 2005; Friedman et al., 2006; Peiffer et al., 2006] et commercialisées (*Affymetrix/Illumina*). Ainsi, le criblage génomique par des marqueurs SNPs est actuellement la méthode offrant la meilleure

résolution pour la détection des microremaniements chromosomiques ce qui fait qu'elle est très attrayante. Le désavantage majeur de cette méthode par rapport au CGH sur micropuces est la sous-représentation des SNPs dans les régions subtélomériques. Aussi, comme pour les autres études de marqueurs polymorphiques, les polymorphismes détectés ne sont pas décrits, les remaniements chromosomiques équilibrés ne sont pas détectés et les résultats anormaux doivent être confirmés par une autre technique comme le FISH.

6.7 Conclusion

Nous avons mis au point une technique de FISH multi-subtélomérique efficace pour la détection des remaniements subtélomériques sur les chromosomes d'amniocytes. À l'aide de cette technique, nous avons identifié une fréquence significative (4-6%) de remaniements subtélomériques cryptiques dans une première cohorte québécoise de fœtus avec malformations majeures à l'échographie. De plus, nos résultats confirment ceux de la seule autre étude de cohorte publiée jusqu'à présent [Le Caignec et al., 2005]. Il nous semble donc indiqué d'offrir cette analyse dans un contexte clinique prénatal.

Malgré son efficacité, le FISH multi-subtélomérique est une technique laborieuse et cet aspect devra être considéré pour l'implantation de l'analyse subtélomérique de façon routinière dans l'investigation des malformations fœtales. Nous avons discuté plusieurs autres méthodes de détection des remaniements subtélomériques qui ont été développées au cours des dernières années. Cependant, il est difficile de comparer le rendement de ces

différentes techniques puisque plusieurs d'entre elles n'ont été testées que sur des remaniements connus. De plus, les critères d'inclusion des patients diffèrent largement dans les différentes études de cohorte. Ainsi, le choix de la méthode d'analyse devra se faire en fonction du nombre de patients à analyser et des infrastructures de chaque laboratoire.

Les techniques permettant le criblage de l'ensemble du génome pour des remaniements cryptiques subtélomériques et interstitiels sont d'un intérêt clinique particulier. Des microdélétions interstitielles connues sont responsables de plusieurs syndromes dysmorphiques : syndrome de DiGeorge (délétion 22q11), syndrome de Prader-Willi (délétion paternelle 15q11-13), syndrome d'Angelman (délétion maternelle 15q11-13), syndrome de Williams-Beuren (délétion 7q11.23) et syndrome de Smith-Magenis (délétion 17p11.2) [Budarf et Emanuel, 1997]. En sachant qu'environ 6% des enfants avec retard mental et que 4-6% des fœtus avec malformations majeures présentent des remaniements subtélomériques, on peut supposer qu'un pourcentage significatif de ces deux populations de patients présentera également des remaniements chromosomiques cryptiques interstitiels. Les études récentes effectuées à l'aide de micropuces de CGH ou de SNPs tendent à confirmer cette hypothèse en rapportant une fréquence d'environ 10% de microremaniements chromosomiques, tant chez les patients avec retard mental que chez les fœtus avec malformations à l'échographie.

Les recherches des prochaines années se pencheront sans doute davantage sur le criblage génomique à l'aide de micropuces de CGH ou de SNPs afin de connaître le rôle de l'ensemble des remaniements chromosomiques cryptiques dans le développement du retard mental et des malformations congénitales ainsi que la pertinence d'offrir l'analyse. Cependant, il est important de considérer que les régions subtélomériques, qui sont riches en gènes et très propices aux remaniements, ne sont pas bien représentés dans les banques de clones et d'oligonucléotides utilisées pour construire ces micropuces, particulièrement pour les micropuces de SNPs. De plus, nous manquons actuellement de connaissances sur les polymorphismes détectés par ces méthodes.

Malgré que le criblage génomique soit d'un intérêt marqué, cette technique ne démontre pas encore une fiabilité suffisante pour une implantation en clinique. Ceci est particulièrement vrai dans un contexte prénatal où les résultats d'analyse peuvent mener à l'interruption d'une grossesse. De plus, les méthodes de criblage génomique ne permettent pas la détection des remaniements chromosomiques équilibrés ce qui limite le conseil génétique pouvant être offert aux parents ainsi que le dépistage prénatal lors d'une prochaine grossesse. Le FISH demeure donc la méthode la plus sûre, la plus accessible et la plus utilisée actuellement pour la détection des remaniements subtélomériques cryptiques dans les laboratoires cliniques.

Bibliographie

Adeyinka A, Adams SA, Lorentz CP, Van Dyke DL, Jalal SM. 2005. Subtelomeric deletions and translocations are frequently familial. *Am J Med Genet* 135A:28-35.

Altug-Teber O, Dufke A, Poths S, Mau-Holzmann UA, Bastepe M, Colleaux L, Cormier-Daire V, Eggermann T, Gillessen-Kaesbach G, Bonin M, Riess O. 2005. A rapid microarray based whole genome analysis for detection of uniparental disomy. *Hum Mutat* 26:153-159.

Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* 17:4611-4627.

Altherr MR, Bengtsson U, Elder FF, Ledbetter DH, Wasmuth JJ, McDonald ME, Gusella JF, Greenberg F. 1991. Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. *Am J Hum Genet* 49:1235-1242.

Armour JAL, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. 2000. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28:605-609.

Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. 2001. Segmental duplications: Organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 11:1005-1017.

Baker E, Hinton L, Callen DF, Altree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E. 2002. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 107:285-293.

Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. 2000. The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 67:1356-1359.

Barber JCK. 2005. Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. *J Med Genet* 42:609-629.

Battaglia A, Bonaglia MC. 2006. The yield of subtelomeric FISH analysis in the evaluation of autistic spectrum disorders. *Am J Med Genet* 142C:8-12.

Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. 2001. Telomere position effect in human cells. *Science* 292:2075-2077.

- Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG. 2005. Use of targeted array-based CGH for clinical diagnosis of chromosomal imbalances: Is less more? *Am J Med Genet* 134A:259-267.
- Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F, Bucourt M, Uzan M, Wolf JP. 2002. Lack of submicroscopic rearrangements involving telomeres in reproductive failures. *Hum Reprod* 17:1154-1157.
- Biesecker LG. 2002. The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet* 107:263-266.
- Bird LM, Mascarello JT. 2001. Chromosome 2q duplications: case report of a de novo interstitial duplication and review of the literature. *Am J Med Genet* 100:13-24.
- Boehm D, Herold S, Kuechler a, Liehr T, Laccone F. 2004. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat* 23:368-378.
- Borgione E, Giudice ML, Galesi O, Castiglia L, Failla P, Romano C, Ragusa A, Fichera M. 2001. How microsatellite analysis can be exploited for subtelomeric chromosomal rearrangement analysis in mental retardation. *J Med Genet* 38:E1.
- Brisset S, Joly G, Ozilou C, Lapierre JM, Gosset P, LeLorc'h M, Raoul O, Turleau C, Vekemans M, Romana SP. 2002. Molecular characterization of partial trisomy 16q24.1-qtter: clinical report and review of the literature. *Am J Med Genet* 113:339-345.
- Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. 2001. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Hat Med* 7:497-501.
- Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, Kivinen K, Dahlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, Hannula-Jouppi K, Kere J. 2005. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet* 42:847-851.
- Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187.
- Budarf ML, Emanuel BS. 1997. Progress in the autosomal segmental aneusomy syndromes (SASs): single or multi-locus disorders? *Hum Mol Genet* 6:1657-1665.
- Carlson M, Botstein D. 1983. Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. *Mol Cell Biol* 3:351-359.

Carlson M, Celenza JL, Eng FJ. 1985. Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol Cell Biol* 5:2894-2902.

Chute I, Le Y, Ashley T, Dobson MJ. 1997. The telomere-associated DNA from human chromosome 20p contains pseudotelomere structure and shares sequences with the subtelomeric regions of 4q and 18p. *Genomics* 46:51-60.

Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ, Crolla JA. 2003. A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Hum Genet* 112:298-302.

Cohen O, Cans C, Mermet M-A, Demongeot J, Jalbert P. 1994. Viability thresholds for partial trisomies and monosomies. A study of 1,159 viable unbalanced reciprocal translocations. *Hum Genet* 93:188-194.

Colgin LM, Reddel RR. 1999. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Genet Dev* 9:97-103.

Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, Gosset P, Raoult O, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Le Merrer M, Picq M, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Cornelis F, Vekemans M, Munnich A. 2001. A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet* 9:319-27.

Daniels RJ, Peden JF, Lloyd C, Horsley SW, Clark K, Tufarelli C, Kearney L, Buckle VJ, Doggett NA, Flint J, Higgs D. 2001. Sequence, structure and pathology of the fully annotated terminal 2 Mb of the short arm of human chromosome 16. *Hum Mol Genet* 10:339-352.

Denayrolles M, De Villechenon EP, Lonvaud-Funel A, Aigle M. 1997. Incidence of SUC-RTM telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces*. *Curr Genet* 31:457-461.

Der-Sarkissian H, Vergnaud G, Borde Y-M, Thomas G, Londoño-Vallejo J-A. 2002. Segmental polymorphisms in the proterminal regions of a subset of human chromosomes. *Genome Res* 12:1673-1678.

de Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OWJ, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. 2001. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 38:145-150.

De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. 2003. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 40:385-98.

Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26:447-450.

Eydoux P, Choiset A, Le Porrier N, Thépot F, Szpiro-Tapia S, Alliet J, Ramond S, Viel JF, Gautier E, Morichon N, Girard-Orgeolet S. 1989. Chromosomal prenatal diagnosis: study of 936 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment. *Prenat Diagn* 9:255-268.

Fan Y-S, Zhang Y. 2002. Subtelomeric translocations are not a frequent cause of recurrent miscarriages. *Am J Med Genet* 109:154.

Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetric D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. 2003. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36:361-374.

Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Galanello R, Cao A, Wood WG, Ayyub H, Higgs DR. 1994. Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet* 55:505-512.

Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. 1995. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-140.

Flint J, Thomas K, Micklem G, Raynham H, Clark K, Doggett NA, King A, Higgs DR. 1997a. The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nat Genet* 15:252-257.

Flint J, Bates GP, Dorman A, Willingham D, Roc BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ. 1997b. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 6: 1305-1314.

Flint J, Knight S. 2003. The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 13:310-316.

Fourel G, Revardel E, Koering CE, Gilson E. 1999. Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J* 18:2522-2537.

Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao M, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra MA. 2006. Oligonucleotide microarray analysis of genome imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* 79:500-513.

Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D. 2001. The complete human olfactory subgenome. *Genome Res* 11:685-702.

Golubovsky MD, Konev AY, Walter MF, Biessman H, Masson JM. 2001. Terminal retrotransposons activate a subtelomeric *white* transgene at the 2L telomere in *Drosophila*. *Genetics* 158:1111-1123.

Goodship J, Curtis A, Cross I, Brown J, Emslie J, Wolstenholme J, Bhattacharya S, Burn J. 1992. A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent *in situ* hybridisation. *J Med Genet* 29:451-454.

Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63:751-762.

Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405-13.

Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ. 2004. A bouquet of chromosomes. *J Cell Sci* 117:4025-4032.

Heide E, Heide KG, Rodewald A. 2000. Maternal uniparental disomy (UPD) for chromosome 2 discovered by exclusion of paternity. *Am J Med Genet* 92:260-263.

Hengariu O, Artan S, Grealley JM, Chen XN, Korenberg JR, Vance GH, Stubbs L, Bray-Ward P, Ward DC. 2001. Cryptic translocation identification in human and mouse using several telomeric multiplex fish (TM-FISH) strategies. *Lab Invest* 81:483-91.

Hengstschläger M, Prusa A, Repa C, Deutinger J, Pollak A, Bernaschek G. 2005. Subtelomeric rearrangements as neutral genomic polymorphisms. *Am J Med Genet* 133A:48-52.

- Holinski-Feder E, Reyniers E, Uhrig S, Golla A, Wauters J, Kroisel P, Bossuyt P, Rost I, Jedele K, Zierler H, Schwab S, Wildenauer D, Speicher MR, Willems PJ, Meitinger T, Kooy RF. 2000. Familial mental retardation syndrome ATR-16 due to an inherited cryptic subtelomeric translocation, t(3;16)(q29;p13.3). *Am J Hum Genet* 66:16-25.
- Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA. 2002. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet* 39:790-795.
- Horsman D. 1994. Minimum Band Level Standards. *Appl Cytogenet* 20:59-60.
- Institut Canadien de la Santé Infantile. 2000. La santé des enfants du Canada. Troisième édition. 316 pages.
- Iqbal MA, Ramadan S, Ali FA, Kurdi W. 2005. Complex de novo cryptic subtelomeric rearrangements in a fetus with multiple ultrasonographic abnormalities and a normal karyotype at amniocentesis. *Prenat Diagn* 25:1142-1149.
- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL. 2004. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 73:299-303.
- Jacobs PA, Frackiewicz A, Law P, Hilditch CJ, Morton NE. 1975. The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. *Clin Genet* 8:169-178.
- Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. 1992. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29:103-108.
- Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Lorentz CP, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenaer R, Anderson MH Jr, Michels VV. 2003. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 5:28-34.
- Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne. 2001. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding FISH. *Hum Genet* 109:440-451.
- Kilby MD, Brackley KJ, Walters JJ, Morton J, Roberts E, Davison EV. 2001. First-trimester prenatal diagnosis of a familial subtelomeric translocation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 17:531-533.

Knight SJ, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DL, Flint J, Kearney L. 1997. Development and clinical application of an innovative fluorescence *in situ* hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet* 5:1-8.

Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354:1676-1681.

Knight SJL, Flint J. 2000. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37:401-409.

Knight SJL, Flint J. 2002. Multi-Telomere FISH. Fan YS. *Methods in Molecular Biology, Volume 204: Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications* (pp. 157). Totowa, NJ. Humana Press Inc.

Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwerse HG, Hansson KB, Nijhuis JV, Bakker B, van Ommen GJ, den Dunnen JT, Breuning MH. 2004. Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet* 41:249-55.

Kuwano A, Ledbetter SA, Dobyns WB, Emanuel BS, Ledbetter DH. 1991. Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by *in situ* hybridization. *Am J Hum Genet* 49:707-714.

Lamb J, Wilkie AO, Harris PC, Buckle VJ, Lindenbaum RH, Barton NJ, Reeders ST, Weatherall DJ, Higgs DR. 1989. Detection of breakpoints in submicroscopic chromosomal translocations, illustration of an important mechanism for genetic disease. *Lancet* 7:819-824.

Lansdorp PM. 2000. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* 1:23-34.

Le Caignec C, Boceno M, Saugier-veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM. 2005. Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridization in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42:121-128.

Lemyre E, Infante-Rivard C, Dallaire L. 1999. Prevalence of congenital anomalies at birth among offspring of women at risk for a genetic disorder and with a normal second-trimester ultrasound. *Teratology* 60:240-244.

Linardopoulou E, Mefford HC, Nguyen O, Friedman C, van den Engh G, Farwell DG, Coltrera M, Trask BJ. 2001. Transcriptional activity of multiple copies of a subtelomerically located olfactory receptor gene that is polymorphic in number and location. *Hum Mol Genet* 10:2373-2383.

Linardopoulou EV, Williams EM, Fan Y, Friedman C, Young JM, Trask BJ. 2005. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 437:94-100.

Louis EJ, Naumova ES, Naumov G, Haber JE. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* 136:789-802.

Louis EJ. 1995. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:1553-1573.

Martin CL, Wong A, Gross A, Chung J, Fantes JA, Ledbetter DH. 2002. The evolutionary origin of human subtelomeric homologies – or where the ends begin. *Am J Hum Genet* 70:972-984.

Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E, Lucas M, Wilber K, LeShane ES, Tantravahi U, Cowan JM, Bianchi DW. 2004. Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. *Am J Hum Genet* 75:485-491.

Lundblad V, Szostak JW. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57:633-643.

Lundblad V, Blackburn EH. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1-senescence. *Cell* 73:347-360.

Mefford NC, Trask BJ. 2002. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet* 3:91-102.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6622-6626.

Nadeau JH, Sankoff D. 1997. Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics* 147:1259-1266.

Naumov G, Turakainen H, Naumova E, Aho S, Korhola M. 1990. A new family of polymorphic genes in *Sccharomyces cerevisiae*: α -galactosidase genes MEL1-MEL7. *Mol Gen Genet* 224:119-128.

- Ness F, Aigle M. 1995. *RTM1*: a member of a new family of telomeric repeated genes in yeast. *Genetics* 140:945-956.
- Ning Y, Roschke A, Smith ACM, Macha M, Precht K, Riethman H, Ledbetter DH, Flint J, Horsley S, Regan R, Kearney L, Knight S, Kvaloy K, Brown WRA. 1996. A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet* 14:86-89.
- Overhauser J, Bengtsson U, McMahon J, Ulm J, Butler MG, Santiago L, Wasmuth JJ. 1989. Prenatal diagnosis and carrier detection of a cryptic translocation by using DNA markers from the short arm of chromosome 5. *Am J Hum Genet* 45:296-303.
- Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, Garcia F, Haden K, Li J, Shaw CA, Belmont J, Cheung SW, Shen RM, Barker DL, Gunderson KL. 2006. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 16:1136-1148.
- Phelan MC, Rogers RC, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, McDermid H, Shaw SR, Claytor J, Willis J, Kelly DP. 2001. 22q13 deletion syndrome. *Am J Med Genet* 101:91-99.
- Pryde FE, Gorham HC, Louis EJ. 1997. Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* 7:822-828.
- Pryde FE, Louis EJ. 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J* 18:2538-2550.
- Qucißer-Luft A, Stolz G, Wiesel A, Schlaefer K, Spranger J. 2002. Malformations in newborn: results based on 30 940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). *Arch Gynecol Obstet* 266:163-167.
- Rauch A, Ruschendorf F, Huang J, Trautmann U, Becker C, Thiel C, Jones KW, Reis A, Nürnberg P. 2004. Molecular karyotyping using SPN array for genome-wide genotyping. *J Med Genet* 41:916-922.
- Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. 2006. Subtelomere FISH analysis of 11,688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43:478-89.
- Rickman L, Fiegler H, Shaw-Smith C, Nash R, Cirigliano V, Voglino G, Ng BL, Scott C, Whittaker J, Adinolfi M, Carter NP, Bobrow M. 2006. Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *J Med Genet* 43:353-361.

- Riethman HC, Xiang Z, Paul S, Morse E, Hu X-L, Flint J, Chi H-C, Grady DL, Moyzis RK. 2001. Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence. *Nature* 15:948-951.
- Reithman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu X-L, Mundunuri U, Paul S, Wei J. 2004. Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res* 14:18-28.
- Reithman H, Ambrosini A, Paul S. 2005. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Res* 13:505-515.
- Renauld H, Aparicio OM, Zierath PD, Billington BL, Chhablani SK, Gottschling DE. 1993. Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev* 7:1133-1145.
- Rosenberg MJ, Killoran C, Dziadzio L, Chang S, Stone DL, Meck J, Aughton D, Bird LM, Bodurtha J, Cassidy SB, Graham JM Jr, Grix A, Guttmacher AE, Hudgins L, Kozma C, Michaelis RC, Pauli R, Peters KF, Rosenbaum KN, Tiftt CJ, Wargowski D, Williams MS, Bicsecker LG. 2001. Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum Genet* 109:311-318.
- Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, Di Rocco M, Faravelli F, Bricarelli FD, Bonaglia MC, Bedeschi MF, Borgatti R. 2001. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 38:417-420.
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. 2005. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: A comparison of detection methods. *Hum Mutat* 25:513-524.
- Saccoone S, De Sario A, Valle GD, Bernardi G. 1992. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4913-4917.
- Sahoo T, Cheung SW, Ward P, Darileck S, Patel A, del Gaudio D, Kang SHL, Lalani SR, Li J, McAdoo S, Burke A, Shaw CA, Stankiewicz P, Chinault C, Van den Veyver IB, Roa BB, Beaudet AL, Eng C. 2006. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med* 8:719-727.
- Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK. 1999. Monosomy 1p36. *J Med Genet* 36:657-63.

Scherf A, Figueiredo LM, Freitas LH Jr. 2001. *Plasmodium* telomeres: a pathogen's perspective. *Curr Opin Microbiol* 4:409-414.

Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjold M. 2005. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 42:699-705.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.

Sellner LN, Taylo GR. 2004. MLPA and MAPH: New techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat* 23:413-419.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman I, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. 2004. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 41:241-248.

Siffroi J-P, Chantot-Bastaraud S. 2004. L'avenir de la cytogénétique après le séquençage du génome humain. *Morphologie* 88:19-23.

Signer MS, Gottschling DE. 1994. *TLC1*: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266:404-409.

Sismani C, Armour JA, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC. 2001. Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet* 9:527-532.

Slater HR, Bailey DK, Ren H, Cao M, Bell K, Nasioulas S, Henke R, Choo KH, Kennedy GC. 2005. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. *Am J Hum Genet* 77:709-726.

Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. 2001. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29:263-264.

- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.
- Souter VL, Glass IA, Chapman DB, Raff ML, Parisi MA, Opheim KE, Disteché CM. 2003. Multiple fetal anomalies associated with subtle subtelomeric chromosomal rearrangements. *Ultrasound Obstet Gynecol* 21:609-615.
- Speed RM. 1988. The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human oocytes. *Hum Genet* 78:260-266.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12:368-75.
- Stewart SA, Weinberg RA. 2000. Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 10:399-406.
- Stirrat GM. 1990. Recurrent miscarriage. *Lancet* 336:673-675.
- Stout K, van der Maarel S, Frants RR, Padberg GW, Ropers HH, Haaf T. 1999. Somatic pairing between subtelomeric chromosome regions: implications for human genetic disease? *Chromosomes Res* 7:323-329.
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookovec V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J. 1999. New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: Combined Binary Ratio labelling. *Eur J Hum Genet* 7:2-11.
- Trask BJ, Friedman C, Martin-Gallardo A, Rowen L, Akinbami C, Blankenship J, Collins C, Giorgi D, Iadonato S, Johnson F, Kuo W-L, Massa H, Morrish T, Naylor S, Nguyen OTH, Rouquier S, Smith T, Wong DJ, Yongblom J, Engh G. 1998. Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 7:13-26.
- Van den Veyver IB, Beaudet AL. 2006. Comparative genomic hybridization and prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:185-191.
- van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJLF, van Overveld PGM, van der Wielen M, Hewitt JE, Sandkuijl L, Bakker B, van Ommen G-JB, Padberg GW, Frants RR. 2000. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: Frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *Am J Hum Genet* 66:26-35.

van Deutekom JC, Wijmenga C, van Tienhoven EA, Gruter AM, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR. 1993. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Hum Mol Genet* 2:2037-2042.

van Geel M, Eichler EE, Beck AF, Shan Z, Haaf T, van der Maarel SM, Frants RR, de Jong PJ. 2002. A cascade of complex subtelomeric duplications during the evolution of the hominoid and old world monkey genomes. *Am J Med Genet* 70:269-278.

van Karnebeek CD, Quik S, Sluijter S, Hulsbeek MM, Hoovers JM, Hennekam RC. 2002. Further delineation of the chromosome 14q terminal deletion syndrome. *Am J Med Genet* 110:65-72.

Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. 2002. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 70:1269-1276.

Vissers LE, de Vries BB, Osogawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 73:1261-1270.

Walter S, Sandig K, Hinkel GK, Mitulla B, Ounap K, Sims G, Sitska G, Utermann B, Viertel P, Kalscheuer V, Bartsch O. 2004. Subtelomere FISH in 50 children with mental retardation and minor anomalies, identified by a checklist, detects 10 rearrangements including a de novo balanced translocation of chromosome 17p13.3 and 20q13.33. *Am J Med Genet* 128A:364-373.

Wassink TH, Losh M, Piven J, Sheffield VC, Ashley E, Westin ER, Patil SR. 2006. Systematic Screening for Subtelomeric Anomalies in a Clinical Sample of Autism. *J Autism Dev Disord* (Epub ahead of print).

White SJ, Breuning MH, den Dunnen JT. 2004. Detecting copy number changes in genomic DNA: MAPH and MLPA. *Methods Cell Biol* 75:751-768.

Wicky C, Villeneuve AM, Lauper N, Codourey L, Tobler H, Müller F. 1996. Telomeric repeats (TTAGGC)_n are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8983-8988.

Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R, van Ommen G-JB, Padberg GW, Frants RR. 1992. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 2:26-30.

Wilkie AO, Lamb J, Harris PC, Finney RD, Higga DR. 1990a. A truncated human chromosome 16 associated with α -thalassemia is stabilized by addition of telomeric repeat (TTAGGG)_n. *Nature* 346:868-871.

Wilkie AOM, Buckle VJ, Harris PC, Lamb J, Barton NJ, Reeders ST, Lindenbaum RH, Nicholls RD, Barrow M, Bethlenfalvay NC, Hutz MH, Tolmie JL, Weatherall DJ, Higgs DR. 1990b. Clinical features and molecular analysis of the α thalassemia/mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. *Am J Hum Genet* 46:1112-1126.

Wilkie AO, Higgs DR, Rack KA, Buckle VJ, Spurr NK, Fischel-Ghodsian N, Ceccherini I, Brown WR, Harris PC. 1991. Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell* 64:595-606.

Wilkie AO. 1993. Detection of cryptic chromosomal abnormalities in unexplained mental retardation: a general strategy using hypervariable subtelomeric DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 53:688-701.

Yu S, Baker E, Hinton L, Eyre HJ, Waters W, Higgins S, Sutherland GR, Haan E. 2005. Frequency of truly cryptic subtelomere abnormalities – a study of 534 patients and literature review. *Clin Genet* 68:436-441.

Zakian VA. 1989. Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 23:579-60.

