



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA
VIE**



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :

Sciences Biologiques appliquées et Santé

***Utilisation de la technique de FISH
dans le diagnostic du syndrome De
williams***

Présenté par : EL MANSOURI BOUCHRA

Encadré par :

Pr. Ouldim Karim C.H.U- Fès

Pr. Guissi Sanae Professeur à La FST de Fès

Soutenu le : 16/06/2015

Devant le jury composé de :

Pr Guissi Sanae : Présidente

Pr Tahri Jouti MA : Examineur

Pr Ouldim Karim : Encadrant

Année Universitaire : 2014/2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier infiniment Dieu le Tout puissant à qui je rends gloire.

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce mémoire.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadrante, **Mme. LE PROFESSEUR GUISSI SANAE** d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Votre compétence et vos qualités humaines exemplaires ont toujours suscité mon admiration.

Je tiens à remercier également **Mr. LE PROFESSEUR OULDIM KARIM**, pour sa gentillesse et sympathie. Votre dynamisme, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en moi une grande admiration et un profond respect.

Je désire remercier **Mr. Tahri jouti Ali** qui me fait l'honneur d'accepter de juger mon travail.

Abréviations

ADN:	acide Désoxyribonucléique
BAC:	chromosome artificiel de bactéries
DAPI:	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DGS:	Di-George syndrome
EDTA:	Ethylène Diamine Tétra-Acétate
ELN:	Elastin
FISH:	Hybridation in situ fluorescente
HTA:	Hypertension artérielle
Kb:	Kilobases
KCL:	Chlorure de Potassium
LIM K1:	Lim kinase 1
Mb:	Mégabases
NP40:	Nonidet P40 (nonyl phenoxyethoxyethanol)
P:	Bras court du chromosome
PAD :	Pression artérielle diastolique
PAS:	Pression artérielle systolique
Pb:	Paire de bases
Q:	Bras long du chromosome
QL:	Quotient intellectuel
SSC:	Sodium chloride, sodium citrate
STX1A:	Syntaxine 1 A
SWB:	Syndromes de Williams - beuren
YAC:	yeast artificial chromosome
μL :	Microlitre

Liste de figures

Figure 1 et 2 : Délétion

Figure 3 : Duplication

Figure 4 : Inversion péracentrique

Figure 5 : Inversion péricentrique

Figure 6 : Insertion

Figure 7 : Translocation réciproque

Figure 9 : La région de délétion commune dans le syndrome de williams.

Figure 10: Les différentes sondes utilisées en FISH

Figure 11 : arbre généalogique du nourrisson de l'observation 1

Figure 12 : arbre généalogique du nourrisson de l'observation 2

Figure 13 : arbre généalogique du nourrisson de l'observation 3

Figure 14: cytoscan

Figure 15 : Schéma de l'hybridation in situ fluorescente.

Figure 16 : Prétraitement par le 2XSSC et le PBS 1X

Figure 17 : ThermoBrite utilisé pour l'hybridation des sondes FISH

Figure 18 : Traitement des lames par la pepsine

Figure 19 : Centrifugation et vortex de la sonde

Figure 20 : Ajout de la sonde sur la lamelle

Figure 21 : Retourner la lame échantillon sur la lamelle, puis les sceller

par de la colle

Figure 22 : caryotype normal

Figure 23 : Cartographie des régions d'appariements des sondes LSI

Figure 24 : Cartographie des régions d'appariements des sondes LSI

ELN Spectrum orange et / D7S486 d7S522 Spectrum green

Figure 25 : Résultat de FISH

Lieu de stage

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J du CHU de Fès. Il représente un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales. Ce bâtiment comprend :

- une salle de réception;
- une salle de prélèvements;
- plusieurs laboratoires dont les principaux sont :
 - ✓ le laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
 - ✓ le laboratoire d'hématologie;
 - ✓ le laboratoire de bactériologie /Immunologie;
 - ✓ le laboratoire de parasitologie;
 - ✓ le laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique;
 - ✓ le laboratoire d'anatomie pathologique.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines (Clinique, cytogénétique et moléculaire). Elle assure des activités variées qui comprennent:

- la génétique clinique (activité clinique) :
- consultation de génétique (au centre du diagnostic) ;
- conseil génétique (au centre du diagnostic) ;
- consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
- avis du médecin généticien dans les services cliniques.
- La génétique chromosomique (analyse des chromosomes) :
- ✓ cytogénétique classique (caryotype) ;

✓ cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence) ;

- la génétique moléculaire (analyse des gènes : PCR, électrophorèse...).

Font partis des ressources humaines de l'unité de génétique moléculaire et d'oncogénétique :

- Pr. AMARTI RIFFI Afaf ; chef de service et Professeur de l'enseignement supérieur, Anatomopathologie ;
- Pr. OULDIM Karim ; Professeur agrégé de génétique médicale ;
- Pr. BENNIS Sanae ; Professeur assistant de biologie cellulaire ;
- Mme BOUGUENOUCHE Laila et Mme SAMRI Imane ; résidentes en génétique médicale
- Mme SAYEL Hanane et Mr. TRHANINT Said ; scientifiques en génétique médicale et en oncogénétique
- Mlle HAMD AOUI Hasnae et Mlle OTHMANI Ihsane ; techniciennes en génétique médicale.
- Mme BOUASSIS Nazha ; technicienne en oncogénétique

Objectif du projet

L'objectif de ce projet consiste en l'étude concrète d'une série diversifiée de patients souffrant de syndrome de Williams qui se sont présentés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès. L'étude va se focaliser, d'une part, sur le côté diagnostique cytogénétique par établissement du **caryotype** et **d'hybridation in Situ fluorescente (FISH)**, afin de préciser la constitution du matériel chromosomique du patient et de déceler la présence de toute anomalie de nombre ou de structure. D'autre part, de mettre en place la meilleure stratégie thérapeutique qui permettra au patient et à sa famille, de subir le minimum des dégâts et de vivre une vie très naturelle.

Table de matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures et tableaux	
Lieu de stage	
Objectif du projet	
Introduction.....	8
Etude bibliographique	
I) les anomalies chromosomiques :.....	9
a) anomalie de nombre :.....	9
• Aneuploïdie.....	9
• polyplôïdie.....	10
b) anomalie de structure.....	10
• Délétion.....	10
• Duplication.....	12
• Inversion.....	12
• Insertion.....	13
• Translocation réciproque.....	14
II) Syndrome de williams :.....	15
• Les signes cliniques.....	15
• Etiologie.....	17
a) Répartition dans le monde :.....	17
b) Traitement.....	17
c) Méthodes de détermination du syndrome	18
• Caryotype.....	18
• Fish	18
III) Matériel et méthodes.....	21
• Série d'étude.....	21
• Observations cliniques	21
• Prélèvement sanguin et conservation.....	22
• Caryotype :	23
➤ Principe du caryotype.....	23
➤ Protocole expérimental du caryotype.....	23
➤ Hybridation in situ fluorescente (FISH):.....	26
➤ Principe de Fish.....	26
➤ Protocole expérimental de Fish.....	27
IV) Résultats et discussion.....	31
Conclusion.....	34

Introduction :

La Cytogénétique moléculaire est une discipline qui augmente la valeur diagnostic et élargit la portée de l'analyse des chromosomes à l'aide des techniques de biologie moléculaire et de cytogénétique.

La Cytogénétique moléculaire implique des méthodes efficaces et rapides pour détecter des anomalies chromosomiques qui ne peuvent pas être réalisés par un diagnostic de cytogénétique classique. [1]

Les techniques utilisées sont principalement la réalisation de caryotype et les méthodes de FISH (Fluorescent In-Situ Hybridation : hybridation in-situ par des sondes fluorescentes).

Le caryotype est une technique qui permet l'étude des chromosomes d'un individu. Cette technique permet d'obtenir une image, en microscopie optique, des chromosomes d'une cellule au cours de la métaphase ou de la prométaphase de la mitose. [2]

Pour la technique de FISH, il s'agit d'une technique de cytogénétique permettant de voir des éléments situés à l'intérieur même de la cellule. Grâce à la FISH, il est maintenant possible de localiser directement un gène sur un chromosome, et de détecter des anomalies chromosomiques telles que les micro délétions du syndrome de prader willi , di George, wolf hirschhorn et de williams qui fait l'objet de notre étude .

Elle permet aussi d'apporter une réponse à des familles chez lesquelles une anomalie chromosomique est suspectée sans pouvoir la mettre en évidence par les techniques de haute résolution (translocations cryptique).

La précision qu'apporte cette technique, l'accessibilité des sondes du commerce et sa rapidité (24h- 48h) ont en fait une technique très précise et qui prend de l'ampleur de jour en jour.[3]

Etude bibliographique

I. Les anomalies chromosomiques :

Les malformations congénitales peuvent être dues à une anomalie du **nombre** ou de **structure** des chromosomes. C'est un problème qui survient durant le processus de la méiose I ou II.

Les anomalies chromosomiques peuvent être mises en évidence par des **méthodes de coloration (marquage en bandes)**. Les chromosomes agrandis 1000X sont analysés d'après leur coloration. Ils apparaissent alors comme de petits bâtonnets rayés et après les avoir arrangés d'après leur longueur et la position de leurs centromères, ils forment le caryotype. Celui-ci révèle la présence de plusieurs groupes de chromosomes semblables.

De nos jours, les petites anomalies sont analysées à l'aide de **méthodes de cytogénétique moléculaire (FISH)**. L'hybridation in situ avec des sondes fluorescentes (FISH: fluorescent in situ hybridization) permet l'identification ciblée d'aneuploïdies partielles telles que les délétions, les duplications et les translocations déséquilibrées, qui ne sont pas détectables avec le pouvoir de résolution du microscope optique. [4]

Une anomalie chromosomique peut être :

- **De nombre :**

Les anomalies de nombres résultent d'une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire, les deux chromosomes d'une même paire migrent tous les deux vers la même cellule fille. Il en résulte une cellule fille avec trois copies du même chromosome (soit 47 chromosomes) et une deuxième cellule fille avec une seule copie soit (45 chromosomes). Ces malségrégations peuvent s'observer aussi bien au cours de la mitose qu'au cours de l'une des deux divisions de méiose. Dans ce dernier cas, un des gamètes formés aura deux copies d'un chromosome (œuf trisomique après fécondation) et son complémentaire une seule (œuf monosomique après fécondation).

Les malségrégations méiotiques sont habituellement accidentelles, mais elles sont favorisées par l'accroissement de l'âge maternel et par l'existence de certains remaniements chromosomiques chez l'un des parents. [5]

Aneuploïdie :

Une aneuploïdie est lorsqu'une cellule ne possède pas un nombre normal de chromosomes et ce, en conséquence d'une mutation. Cette anomalie peut concerner une absence ou au contraire une surabondance de chromosomes.

Chez l'être humain, l'aneuploïdie la plus courante est la Trisomie 21 : la personne possède 47 chromosomes au lieu de 46, ou 23 paires. Si le nombre anormal est plus élevé, l'aneuploïdie va provoquer une fausse couche de la femme enceinte.

Polyploïdie:

On parle de polyploïdie dans le cas où tout le lot chromosomique serait représenté plusieurs fois. Dans le cas d'une triploïdie, chaque chromosome est présent en trois exemplaires (69 chromosomes). La triploïdie résulte soit de la fécondation de l'œuf par deux spermatozoïdes, soit de la fécondation d'un oocyte diploïde. Il existe différentes anomalies liées à ce phénomène. Si tout le lot chromosomique est doublé ($4n$), il s'agit alors d'une tétraploïdie. Ces anomalies résultent souvent d'un problème survenu lors de la division mitotique. La triploïdie et la tétraploïdie sont présentes physiologiquement dans les cellules du foie et de la moelle osseuse. Les enfants avec un lot chromosomique triploïde ou tétraploïde ne survivent pas.

- **De structure :**

Les anomalies de structure sont le résultat de cassures des chromosomes durant la méiose. Une délétion, une duplication ou la formation d'un isochromosome se traduiront par un phénotype anormal, tandis que l'insertion, l'inversion, ainsi que la translocation peuvent être équilibrées. Ceci signifie que les porteurs de ces anomalies de structures sont phénotypiquement sains, car la totalité du matériel génétique est présente.[6]

Délétion :

Une délétion peut avoir lieu dans n'importe quel chromosome et peut atteindre n'importe quelle grandeur. Les conséquences d'une délétion dépendent de sa longueur et des gènes qui sont amputés.

Exemple : Une délétion partielle du bras court (p) du chromosome 5 est responsable de la maladie du Cri du chat.

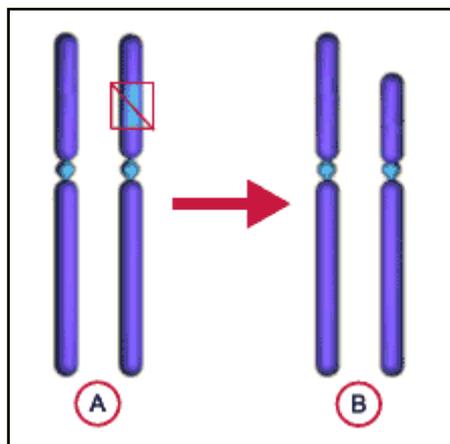


Fig 1 : Un fragment du chromosome 5 est manquant. Suivant le lieu des cassures et la longueur du fragment manquant, quelques, voir de nombreux gènes peuvent être perdus.

A : Paire de chromosomes 5 normaux

B : Délétion 5p

Parfois les bouts des chromosomes (télomères) peuvent se casser et être perdus. Dans ce cas, un chromosome en anneau résultant de la fusion des 2 bouts peut se former. Si aucune information génétique essentielle n'est perdue, ces réarrangements sont équilibrés et phénotypiquement invisibles. Des problèmes surviennent uniquement lors de la formation des gamètes.

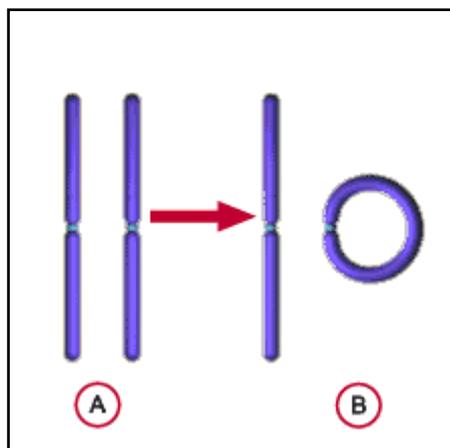


Fig 2 : La perte des bouts d'un chromosome peut amener à la formation d'un chromosome en anneau

A : paire de chromosomes normaux

B : chromosome en anneau

Duplication :

Une duplication désigne un fragment chromosomique dédoublé. La duplication est parfois décrite comme une "trisomie partielle". Lorsqu'il y a duplication, la personne possède 3 copies du gène qui se trouve dans le segment touché.

Cela signifie qu'il y a un surplus d'information (gènes) qui peut conduire à des malformations congénitales ou à des problèmes durant le développement.

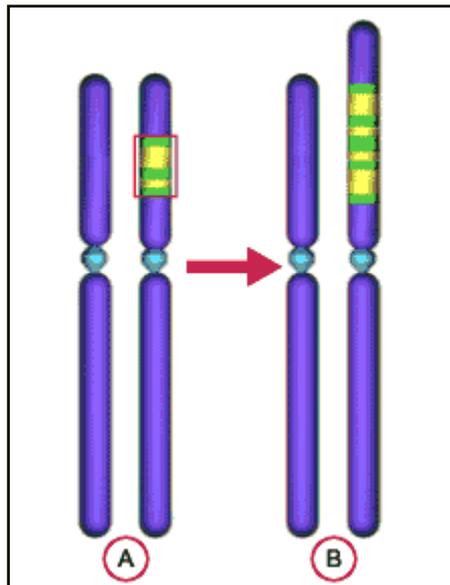


Fig 3 : Un segment du chromosome se dédouble et se réinsère dans le même chromosome

A : paire de chromosomes normaux
 b : chromosome avec une duplication

Inversion :

Une inversion résulte de la cassure d'un fragment de chromosome, suivie d'une rotation de 180°C de ce même fragment, puis de sa réintégration dans le même chromosome.
 Le phénotype associé à ce type de réarrangement est souvent invisible, étant donné qu'aucune information n'a été perdue. Lorsque la région touchée inclut le centromère, on parle de duplication péracentrique, par opposition à la duplication paracentrique.

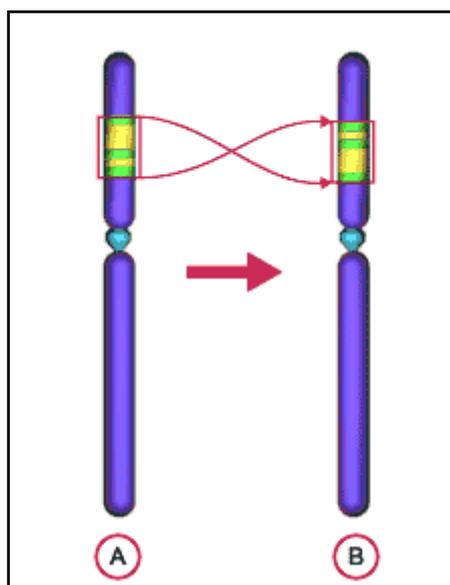


Fig 4: inversion paracentrique

A : chromosome normal

B : chromosome avec une inversion paracentrique

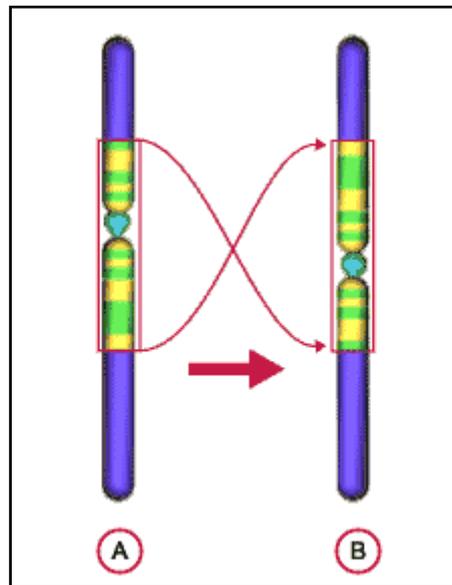


Fig 5 : inversion péricentrique

A : chromosome normal.

B : chromosome avec une inversion péricentrique.

Insertion :

Une insertion résulte de l'intégration d'un fragment de chromosome à un autre endroit que son lieu d'origine. Les porteurs d'une insertion peuvent être phénotypiquement sains, car aucune information n'a été perdue.

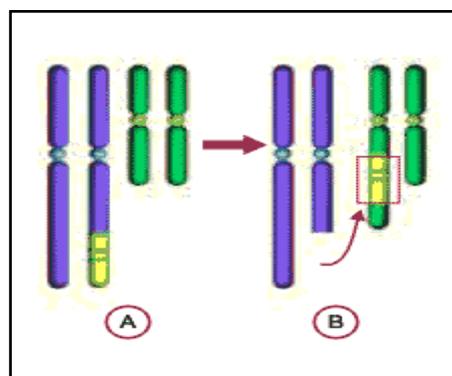


Fig 6 : insertion

A : 2 paires normales de chromosomes

B : insertion dans un autre chromosome d'un fragment provenant d'un chromosome de la première paire

Translocation réciproque :

Une translocation réciproque est un échange de fragments chromosomiques entre 2 chromosomes non homologues

Les translocations réciproques sont souvent équilibrées, car la totalité de l'information génétique est présente.

Les problèmes surgissent lors de la formation des gamètes.

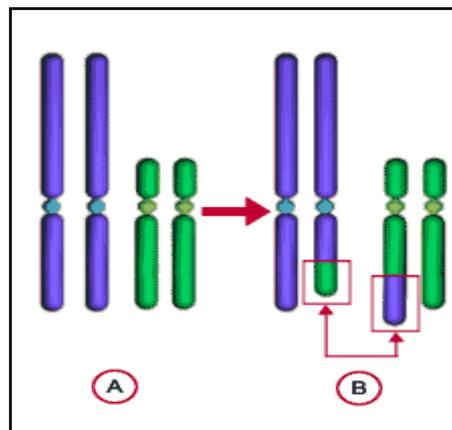


Fig 7 : translocation réciproque

2 fragments de chromosomes provenant de 2 chromosomes différents ont été échangés et ont fusionnés avec le bout de l'autre chromosome cassé.

A : 2 paires de chromosomes non homologues

B : translocation réciproque

II. Le syndrome de Williams

Le syndrome de Williams, appelé aussi syndrome de Williams-Beuren, est une maladie génétique chromosomique monosomique liée à la perte d'un petit fragment d'un chromosome (Microdélétion). Elle associe un déficit intellectuel, une malformation du cœur, des caractéristiques physiques et comportementales particulières, un retard de croissance et des anomalies endocriniennes. [7]

Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1961 par le Dr Williams, cardiologue néo-zélandais, et en 1964 par le Dr Beuren, cardiologue allemand. [8]

Le syndrome de Williams est dû à la perte (délétion) de plusieurs gènes. Les gènes sont des morceaux d'ADN qui est la substance constituant les chromosomes et contenant notre patrimoine génétique. Un gène équivaut à un « code » qui donne les instructions pour produire des protéines. Les protéines ont des fonctions très variées : elles contribuent au fonctionnement normal de chaque cellule et, plus globalement, de l'organisme. La perte d'un

petit morceau du chromosome 7, dans une région appelée 7q11.23, est en cause dans ce syndrome. Cette perte chromosomique est appelée microdélétion. Elle est de taille relativement constante d'un malade à l'autre et elle contient au moins 28 gènes. Le syndrome de Williams est « un syndrome des gènes contigus » puisqu'il est lié à la perte de plusieurs gènes situés les uns à côté des autres. La région délétée mesure environ 1.5Mb d'ADN, elle comprend le gène codant l'élastine (ELN). Outre le gène de l'élastine, la délétion englobe au moins 28 autres gènes. Le tableau clinique résulte de l'amplification de plusieurs gènes, chacun pouvant être responsable d'une partie du phénotype. L'observation de formes partielles de SWB, dues à des microdélétions de plus petite taille que la délétion classique et concernant donc moins de gènes, a permis de mettre en évidence la responsabilité de l'hémizygotie de quelques gènes dans certains aspects particuliers du SWB. [9]

Le syndrome de Williams, dans la majorité des cas, n'est pas héréditaire il peut se manifester dans des familles sans antécédents de ce trouble. C'est le résultat d'un événement aléatoire qui se produit lors de la formation des gamètes chez le parent d'un patient. Il existe un petit pourcentage de cas où les gens héritent de la délétion chromosomique associée au syndrome de Williams d'un parent avec la maladie. [10]

Les signes cliniques :

A la naissance, après une grossesse souvent normale, les enfants atteints de syndrome de Williams –Beuren pèsent en moyenne 2760g, ils présentent parfois une hypercalcémie idiopathique qui disparaît spontanément entre 18 et 24 mois. Des anomalies réno-urétérales sont fréquentes chez les sujets atteints de syndrome de Williams –Beuren, une néphrocalcinose peut compliquer une hypercalcémie initiale. Une insuffisance rénale peut apparaître avec l'âge, sur le plan endocrinien, une hypothyroïdie et une puberté précoce ne sont pas rares. Parmi les principales malformations associées à ce syndrome [11].

a) Dysmorphie : Les enfants ont un visage très caractéristique : la racine du nez est aplatie avec une extrémité bulbuse, une grande bouche avec la lèvre inférieure large et éversée, les joues pleines, un œdème périorbitaire épicanthus et souvent des iris stellaires[12].



Fig 8 : enfant présentant le syndrome de Williams

B) malformation du cœur et des vaisseaux (cardiovasculaires) :

Les malformations cardiovasculaires peuvent ne donner aucune manifestation (asymptomatique), ou au contraire, entraîner des difficultés respiratoires et une difficulté à prendre du poids (le nourrisson s'essouffle rapidement et doit s'arrêter au milieu des tétées). Le plus souvent, elles entraînent des bruits anormaux détectés par le médecin à l'auscultation du cœur sous forme d'un souffle cardiaque. Ce dernier peut être détecté très tôt, avant les autres manifestations de la maladie. Rarement, on observe une cyanose (coloration bleutée des lèvres et des extrémités) quand le rétrécissement des artères pulmonaires est sévère. Exceptionnellement, les enfants ayant un syndrome de Williams ont des complications liées à un rétrécissement des artères coronaires qui vascularisent le cœur. Cette anomalie est d'une grande gravité et doit être traitée de façon urgente pour éviter un infarctus du myocarde. [13]

C) Déficit intellectuel, troubles du langage et de l'apprentissage :

Environ 90% de la population générale a un quotient intellectuel (QL) supérieur à 85, par contre, celui des personnes atteintes de syndrome se situe aux alentours de 60. L'acquisition du langage, bien qu'un peu tardive, est normale. [14]

D) Alimentation :

Les nouveau-nés ayant un syndrome de Williams prennent difficilement du poids et ont souvent des problèmes digestifs avec des vomissements, dus à une augmentation du calcium dans le sang (hypercalcémie). Ils peuvent aussi avoir fréquemment des régurgitations (reflux gastro-œsophagien). [15]

E) Développement et posture :

A l'âge adulte, la plupart des personnes atteintes du syndrome de Williams, ont une taille un peu au-dessous de la moyenne (environ 70 % à 80 % de la normale) ils ont souvent une démarche un peu raide avec les genoux pliés, les épaules sont tombantes et la position debout peut être assez pénible. [16]

F) Hypercalcémie:

Les personnes atteintes du syndrome de Williams ont des taux de calcium sanguin élevé. Cette anomalie peut déclencher des vomissements lors de la prise des gouttes de vitamine D. [17]

Etiologie :

Il s'agit d'une maladie génétique causée par la perte de 28 gènes sur l'un des deux chromosomes 7.

Cette microdélétion, survenant la plupart du temps de façon sporadique, entraîne la suppression de plusieurs gènes comme l'élastine, *LIMK-1*, *NCF1*, *STX1A*, *GTF2I*, *CLIP2*

- Le gène *ELN* contient les informations pour exprimer une protéine appelée élastine. comme son nom l'indique, elle joue un rôle important dans l'élasticité de certains tissus du corps, notamment de la peau, des vaisseaux sanguins, des poumons et des articulations.
- Le gène *NCF1* contient les informations pour exprimer la protéine P47phox, impliquée dans le vieillissement de la paroi des artères.
- Le gène *LIMK* permet l'expression de la protéine LIMK-1.
- Le gène *STX1A* contient le code Pour la Syntaxine 1A.

- Le gène *GTF2I* contient les informations pour exprimer la protéine GTFIRD1.
 - le gène *CLIP2* exprime la protéine CLIP-115.
- Les 4 dernières protéines jouent un rôle important dans le fonctionnement du cerveau. [18]

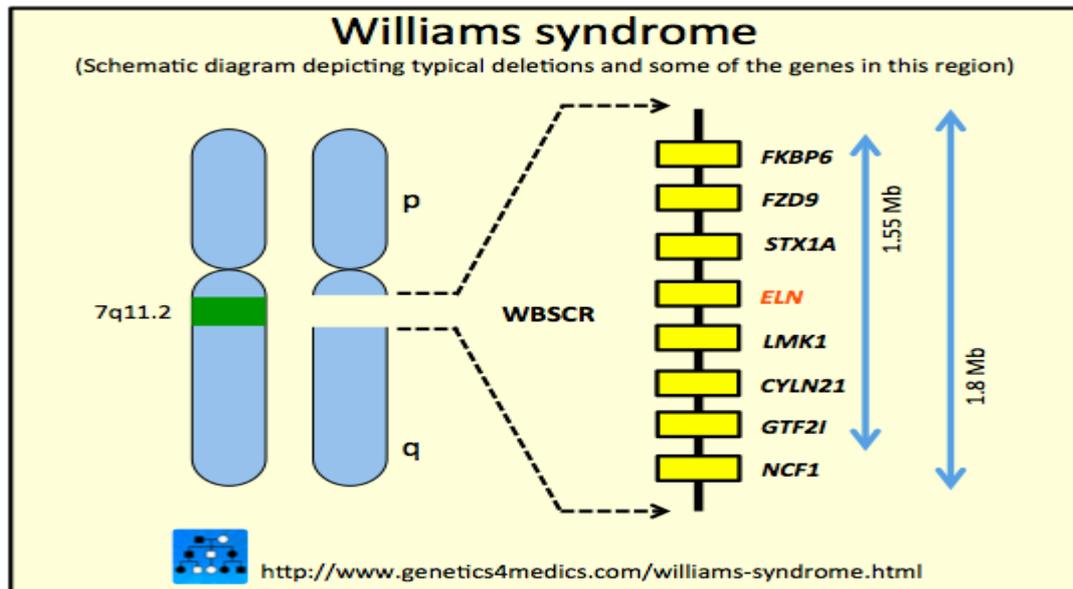


Fig 9: La région de délétion commune dans le SWB

a) Répartition dans le monde :

La prévalence exacte de la maladie (nombre de personnes atteintes dans une population à un moment donné) n'est pas connue. Le syndrome concernerait environ 1 naissance sur 7 500 à 1 naissance sur 12 000 selon les **études [19]**

b) Traitement :

A l'heure actuelle, la médecine ne sait pas « remplacer » le petit fragment de chromosome manquant et il n'existe pas de traitement du syndrome de Williams. La prise en charge, adaptée au cas par cas, est centrée sur les symptômes de l'enfant. Elle comporte toujours une surveillance cardiologique au long cours, notamment pour contrôler la tension artérielle, dépister de nouvelles sténoses et suivre l'évolution des sténoses existantes. Si une hypertension artérielle apparaît, son traitement repose généralement sur un médicament anti-hypertenseur et sur une réduction des apports alimentaires en sel.

Une prise en charge en kinésithérapie et/ou en psychomotricité est souvent proposée pour améliorer la motricité globale et la motricité fine, ainsi que les difficultés d'orientation et de spatialisation. Elle peut être complétée par des séances d'ergothérapie, en particulier s'il existe d'importants troubles des praxies. La prise en charge orthophonique doit être débutée précocement, d'abord pour travailler sur la tonification buco-faciale (avec des conséquences bénéfiques sur la mastication, la déglutition et la prononciation), ensuite pour accompagner la mise en place et le développement du langage et de la parole. Un suivi psychologique régulier peut être profitable. [20]

c) Méthodes de détermination du syndrome :

À la naissance, le diagnostic peut être suspecté sur l'association d'une malformation du cœur et d'une hypercalcémie. En revanche, dans les cas où il n'y a ni cardiopathie ni hypercalcémie, le diagnostic à cet âge est difficile.

Le diagnostic est évoqué principalement sur les caractéristiques physiques et le déficit intellectuel. Il est confirmé dans 95 % des cas par la mise en évidence de l'anomalie génétique, à savoir la microdélétion du chromosome 7 en 7q11.23. Cette anomalie n'est pas visible sur un caryotype (examen des chromosomes) standard. Il faut recourir à une technique plus sophistiquée (hybridation in situ ou FISH) qui permet de visualiser des anomalies très petites. [21]

➤ caryotype :

Le caryotype est une photographie de l'ensemble des chromosomes d'une cellule. Il permet de dépister d'éventuelles anomalies chromosomiques. Il est en général effectué sur des cellules normales mais dans certains cas, l'analyse se fait sur des cellules anormales afin de dépister d'autres anomalies. [22]

➤ L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) :

L'hybridation in situ en fluorescence permet de localiser sur des chromosomes métaphasiques la ou les molécule(s) d'ADN complémentaire(s) d'une séquence donnée d'acides nucléiques. Cette technique, réalisée pour la première fois en 1969 sur des chromosomes d'amphibiens fut appliquée à l'homme quelques années plus tard pour localiser les séquences d'ADN satellite. Néanmoins, jusqu'en 1981, l'utilisation de l'HIS était limitée, soit à la localisation de séquences d'ADN répétées un grand nombre de fois dans le génome, soit à la localisation de séquences uniques sur les chromosomes tout à fait particuliers que sont les chromosomes polythènes de certaines espèces animales. L'hybridation in situ peut être réalisée sur des coupes tissulaires ou sur des préparations cellulaires. Les progrès techniques réalisés, comme l'utilisation de sondes clonées et l'adjonction de sulfate de dextran à la solution d'hybridation permettent actuellement de localiser par HIS n'importe quelle séquence unique d'une taille au moins égale à 500 paires de bases.

Cette technique permet de détecter le signal d'hybridation directement au sein du matériel biologique dont il fait partie et non pas après d'éventuels traitements de ce matériel. Cette possibilité de détection permet de faire des études dans des domaines divers tels que :

- Construction de cartes physiques des chromosomes
- Analyse de la structure des chromosomes et leurs aberrations
- Etude de structure évolution et fonctions des chromosomes et des génomes en général
- Détermination de l'expression « spatiale » et « temporelle » des gènes
- Identification et caractérisation des virus, des séquences virales, et des bactéries dans les tissus mêmes
- Détermination du sexe
- Localisation de séquences transformations et oncogéniques.

Cette technique est utilisée pour identifier la présence de chromosomes spécifiques ou des régions chromosomiques par hybridation de sondes d'ADN fluorescentes marquées à l'ADN chromosomique dénaturé. L'examen sous l'éclairage fluorescent détecte la présence du signal

fluorescent hybridé (et donc la présence du matériel chromosomique) ou l'absence du signal fluorescent hybridé (et donc l'absence de matériel chromosomique).

La FISH intéresse tous les domaines de la cytogénétique classique, constitutionnelle, *post et prénatale* ainsi que récemment le diagnostic *préimplantatoire* [23]

Il existe quatre types de sondes actuellement utilisées pour la technique FISH :

Sondes télomériques : elles sont spécifiques des extrémités terminales des bras courts et longs des chromosomes. Elles permettent de mettre en évidence des anomalies chromosomiques impliquant les régions télomériques des chromosomes, difficiles à visualiser avec d'autres techniques.

Sondes centromériques : elles s'hybrident au niveau des centromères des chromosomes. Les séquences dont elles sont complémentaires sont naturellement présentes en un grand nombre d'exemplaires au niveau des centromères. Le signal obtenu est donc en général intense car la sonde s'hybride sur chacune des séquences complémentaires présentes. Ces sondes sont surtout utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase et pour identifier l'origine des chromosomes marqueurs.

Sondes à locus spécifique : comme leur nom l'indique, ces sondes de petite taille permettent d'identifier une région très précise du génome. Elles sont obtenues par marquage de l'ADN cloné dans différents vecteurs (plasmides, cosmides, YACS, BACs...). Leur intérêt principal réside dans la mise en évidence rapide de remaniements impliquant une région chromosomique précise (amplifications, microdélétions, translocations, inversions ...). Ces sondes peuvent être employées seules ou être combinées entre elles pour obtenir un marquage multicolore permettant une interprétation plus aisée de certains remaniements

Sondes de peinture chromosomique : elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome. Ces sondes sont obtenues après isolement et marquage de l'ADN d'un chromosome. Leur réalisation ne nécessite pas de connaître la séquence de cet ADN. Après hybridation, on observe un marquage de tout le chromosome. Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques. Ces sondes sont très utiles pour interpréter certaines translocations complexes, mettre en évidence des échanges de petite taille, ou identifier précisément l'origine d'un fragment non identifié.

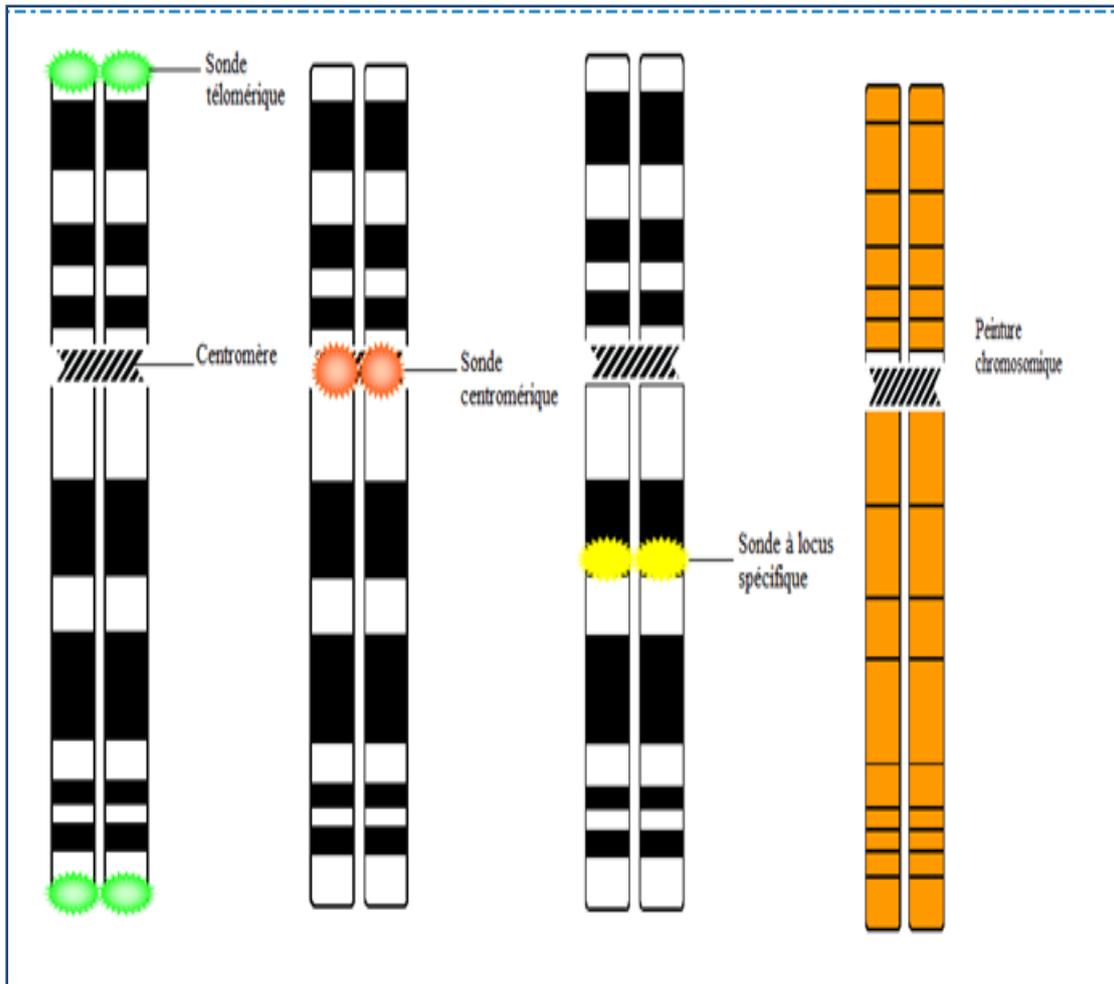


Fig 10 : les différentes sondes utilisés en FISH

III) Matériel et méthodes

1) Série d'étude :

La série d'étude comprend 3 patients qui ont une microdélétion constitutionnelle qui se sont présentés à l'unité de génétique médicale.

❖ Les observations cliniques :

Dans cette partie, sera évoquée l'observation des patients montrant des signes cliniques du syndrome de Williams et dont le diagnostic a été confirmé par la technique de FISH.

Observation 1 :

Il s'agit d'un nourrisson de 8 mois, de sexe féminin dont la mère est âgée de 27 ans, et le père de 34 ans, non mutualiste. Ce nourrisson présente :

- Une dysmorphie faciale : visage triangulaire, épicanthus, nez bulbeux, lèvre inférieure charnue et éversée avec une clinodactylie. Les parents sont de phénotype normal.
- L'Echographie cardiaque montre une sténose pulmonaire au dépend de l'artère pulmonaire droite.
- Notion de mauvaise prise pondérale et accès de cyanose péri-buccale.

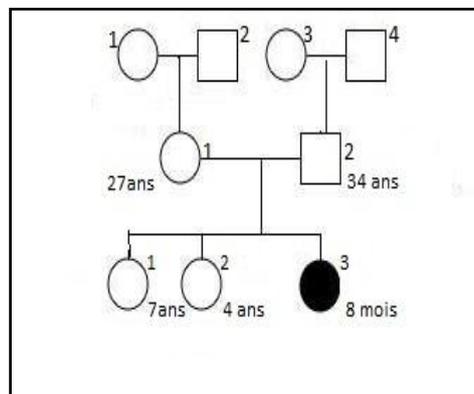


Fig 11 : Arbre généalogique du nourrisson de l'observation 1

Observation 2 :

Il s'agit d'une fille de 9 ans, dont la mère est âgée de 42 ans, et le père de 45 ans, mutualiste. Cette fille présente :

- Une dysmorphie faciale : racine de nez aplatie avec extrémité bulbeuse, grande bouche avec lèvre inférieure large et éversée, épicanthus et des iris stellaires. Les parents sont phénotypiquement normaux.
- L'échocardiographie montre une hypertrophie ventriculaire gauche (complication d'une HTA sans sténose de l'artère rénale) une hypertension artérielle (PAS : 16mm hg, PAD : 11mm hg).
- Des troubles du sommeil, des vomissements chroniques avec constipation.
- Un retard psychomoteur (marche et parole à 3 ans), un retard staturo-pondéral.
- Profil cognitif : hypersensibilité au bruit

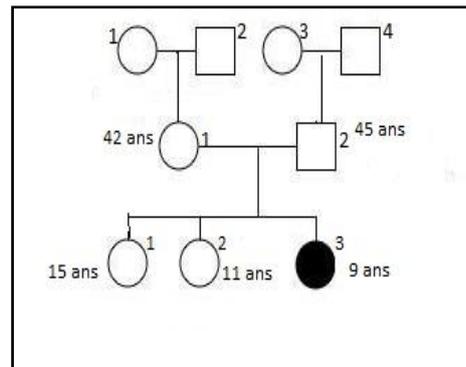


Fig 12 : Arbre généalogique de la fille de l'observation : 2

Observation3 :

Il s'agit d'un nourrisson de 20 mois, de sexe féminin, dont la mère est âgée de 29ans, et le père de 40 ans, non mutualiste. Le nourrisson présente :

- Une dysmorphie faciale : lèvres charnues, racine du nez large, strabisme, hypertélorisme. Les parents sont de phénotype normal.
- Un retard psychomoteur, un retard de croissance.

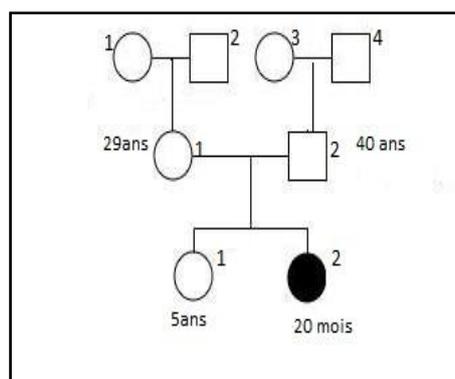


Fig 13 : Arbre Généalogique du nourrisson de l'observation 3

2) Prélèvement sanguin & Conservation :

Pour chaque patient, un prélèvement de sang veineux (de 3 à 5 ml) a été effectué et ensuite stocké dans deux tubes:

_ Tube Héparine (Lithium Heparin) consacré pour l'étude cytogénétique. Ce tube est conservé à +4°C et ne doit pas dépasser trois jours de stockage pour obtenir une culture Optimale.

_ Tube EDTA (Ethylène Diamine Tetra-acétique acide) consacré pour la DNAtèque.

3) caryotype :

Cette technique permet l'obtention d'une image en microscope optique des chromosomes de l'individu, en utilisant différents colorants (chaque colorant révèle une succession de bandes qui est différente en fonction des techniques).

➤ Principe

Le caryotype est le processus d'appariement et de mise en ordre des chromosomes d'un individu, qui sert à détecter les anomalies chromosomiques que se soient de nombres ou de structures.

Les lymphocytes sanguins sont mis en culture stimulés par la phytohemagglutinine (PHA), puis bloqués en métaphase par la colchicine qui perturbe les fuseaux mitotiques. Par la suite, les chromosomes seront dispersés par un choc hypotonique, puis fixés par un fixateur à base d'alcool et d'acétate.

Ces chromosomes seront sujets à une technique de marquage par bandes, permettant de mettre en évidence 400 à 500 bandes constantes et caractéristiques d'une paire chromosomique donnée.

Plusieurs marquages sont utilisés notamment celui des bandes R obtenues après dénaturation thermique ménagée des chromosomes puis coloration par Giemsa.

Enfin un logiciel va permettre de classer les différents chromosomes ainsi obtenu sous un ordre de taille décroissant.

➤ Mode d'opérateur :

➤ Accumulation des cellules en métaphase :

Après avoir effectué un prélèvement de la moelle osseuse, pour 2ml de sang, seront ajoutés sous hôte, 11ml d'un milieu de culture prêt à l'emploi (MARROW MAX™ Karyotyping middle Invitrogen). La culture cellulaire dure 24h à 48h, à l'intérieur d'une étuve, sous une température de 37°C en position inclinée.

➤ Blocage des cellules en métaphase :

Après 24h de culture, 0,25ml de colchicine sont ajoutés sous hôte, dans chaque tube. Après avoir bien mélangé le contenu des tubes, ces derniers sont remis dans l'étuve à 37°C en position inclinée pendant 30 minutes.

➔ **Choc hypotonique :**

Une heure avant le choc, la solution KCl 0,065 M (1,4 g de KCl qsp 30ml) est préparée extemporanément et puis mise à 37°C.

Après 50 min d'incubation en position inclinée, les tubes sont mélangés doucement puis centrifugés à 1500 tr/mn à 25°C pendant 10 min. A la fin de la centrifugation, le surnageant est aspiré et puis éliminé.

Ensuite, dans chaque tube, quelques gouttes de la solution hypotonique KCl sont ajoutées et le culot est suspendu à l'aide d'une pipette Pasteur, puis complété à 7ml avec la solution hypotonique de KCl.

Après une bonne homogénéisation des solutions, elles seront remises à l'intérieur de l'étuve pendant 20 minutes à 37°C.

➔ **Fixation :**

Le fixateur est mis dans un flacon propre et sec en verre, stocké à 4°C. Il faut toujours prévoir 300ml de fixateur par tube.

➔ **Préfixation :**

2,5ml de fixateur frais sont ajoutés dans chaque tube, et une centrifugation e à 1500 tr/min pendant 10 minutes est .ensuite réalisée.

➔ **Première fixation :**

Le culot est remis en suspension dans quelques gouttes de Carnoy I préparé extemporanément puis complété à 7ml avec le fixateur. Une centrifugation immédiate à 1500tr/min pendant 10 min est effectuée.

➔ **Deuxième fixation :**

Les fixations sont répétées jusqu'à ce que le culot cellulaire soit propre (3 fixations minimum). Le culot est remis délicatement en suspension dans quelques gouttes de Carnoy I et complété à 7ml.

➔ **Etalement :**

L'étalement nécessite un travail sous des conditions de température et d'hygrométrie particulières. Généralement, la lame est étalée dans une pièce à température de 22°C (+/- 2°C) et à 45% (+/- 5) d'humidité minimum.

Le surnageant est retiré et le culot est remis en suspension dans du Carnoy I et ensuite aspiré dans l'effilure de la pipette tenue horizontalement. Deux gouttes par lame sont ajoutées à côté de l'humidificateur, puis laissés sécher à température ambiante.

Finalement, la richesse des lames en mitose est observée au microscope inverse.

➔ **Dénaturation-coloration :**

Les lames sont laissés vieillir pendant quatre jours à 37°C : Le vieillissement a pour but de parfaire la déshydratation cellulaire et la fixation.

Au quatrième jour après l'étalement, la dénaturation thermique est effectuée dans la solution Earl à 87°C pendant 45mn, suivie d'une coloration avec du Giemsa 5% pendant 8 minutes. Des bandes R (reverses) sont donc obtenues, c'est la technique RHG.

Les techniques de banding chromosomique permettent de caractériser chaque chromosome par la présence de bandes. Chaque bande est définie comme une partie de chromosome distinguée des segments adjacents par l'apparition de segments plus sombres ou plus clairs à l'aide d'une ou plusieurs techniques de banding. Une bande paraissant sombre avec une technique donnée peut apparaître claire avec une autre technique, par exemple les bandes R sont obtenues après dénaturation thermique ménagée des chromosomes puis Giemsa.

➔ **Lecture :**

La lame est séchée pour la lire sous un microscope relié à un ordinateur appelé cytoscan qui va permettre à l'aide du logiciel "Applied Imaging CytoVision™ 3.6" (Figure 14) d'organiser les chromosomes sous la forme du caryotype classique.

Les liaisons A=T dénaturées par l'Earl ne peuvent plus absorber le colorant et apparaissent claires sous microscope, alors que les liaisons G≡C qui sont restées intactes absorbent le colorant et apparaissent sombres sous microscope.



Fig 14: *cytoscan "Applied Imaging CytoVision™ 3.6"*

4) Hybridation in situ fluorescente (FISH):

➤ **Principe :**

La FISH consiste à faire hybrider une sonde marquée (par fluorochrome) avec sa séquence spécifique (locus spécifique, partie télomériques ou centromérique, ou encore un chromosome entier) supposée présente au niveau d'une préparation chromosomique grâce à la complémentarité de bases, et ceci selon des conditions de température, de salinité et de pH bien précises. La fluorescence est ensuite visualisée sous microscope à épifluorescence.

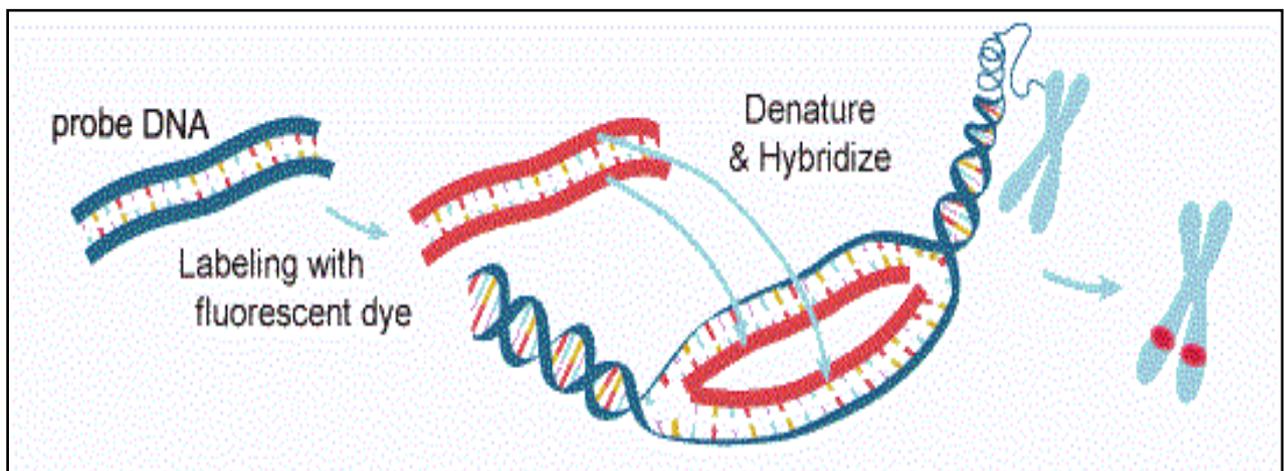


Fig 15 : Schéma de l'hybridation in situ fluorescente

- **Étapes de la technique:**
- **Préparation des lames pour la FISH :**

Avant de démarrer toute technique, il faut penser à mettre au bain marie les solutions utilisées à chaud. Il ne faut pas démarrer les étapes tant que les solutions n'ont pas atteint la température requise.

- **Prétraitement**

- les lames sont immergées dans la solution 2XSSC, 70% Formamide à 37°C pendant 30 min, puis dans du PBS une fois pendant 1 minute.

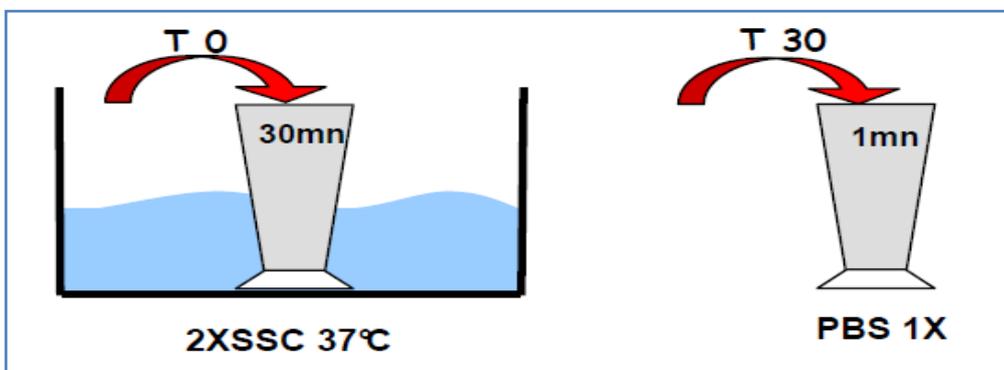


Figure 16 : Prétraitement par le 2XSSC et le PBS 1X

- **Traitement à la pepsine :**

- les lames sont placées sur le ThermoBrite (Abbott 7J9120) à 37°C et la section recouverte avec la pepsine diluée.



Figure 17: ThermoBrite utilisé pour l'hybridation des sondes FISH

- L'incubation dure entre 10 et 20 minutes, et les lames sont ensuite immergées dans du PBS une seule fois pendant 2 minutes ;
- les lames sont déshydratées dans un gradient d'ETOH 70, 85, 100% 2 minutes chacun et ensuite séchées avant de procéder à l'étape d'Hybridation.

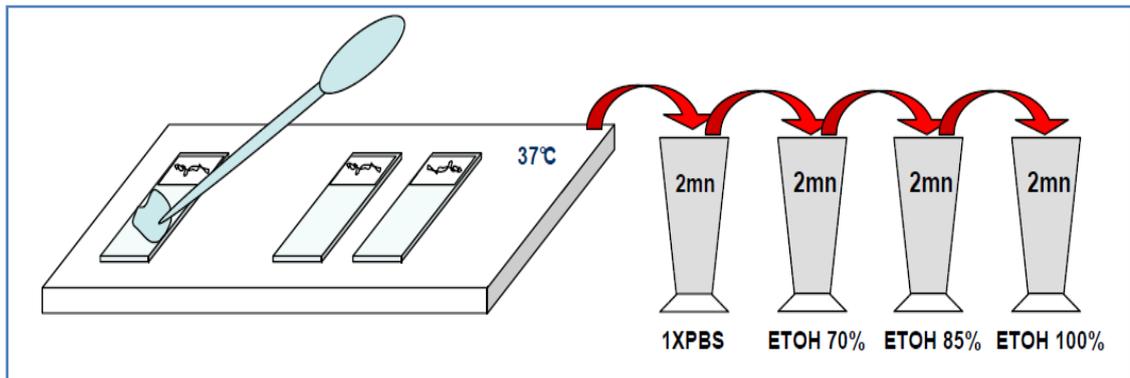


Figure 18: Traitement des lames par la pepsine.

➤ **Hybridation des échantillons :**

- La sonde et le tampon d'hybridation sont portés du congélateur à une température ambiante.
- La sonde et le tampon sont centrifugés, puis vortexés et à nouveau centrifugés.

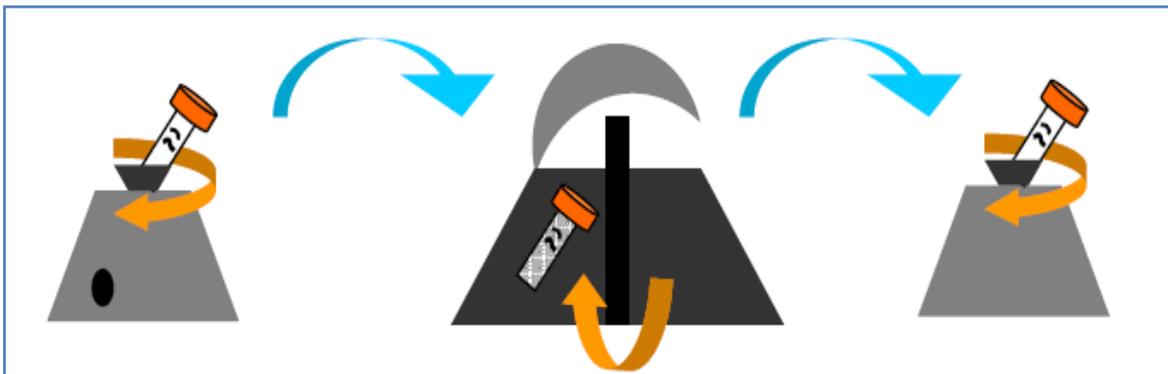


Figure 19: Centrifugation et vortex de la sonde

- 10µL de sonde sont déposés sur une lamelle.

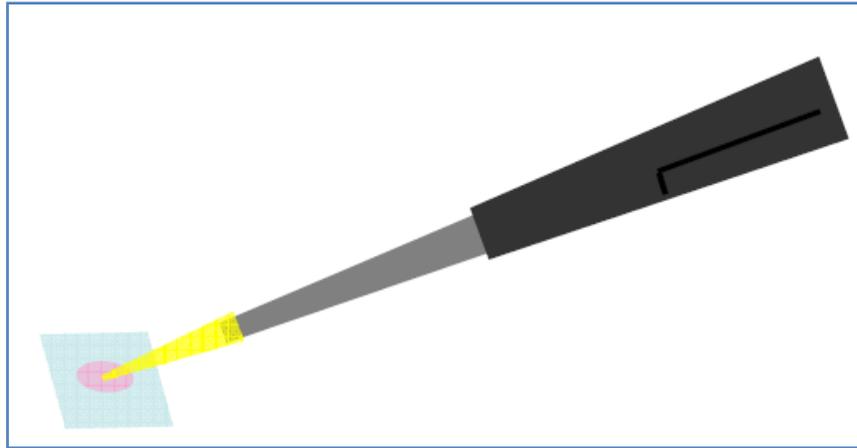


Figure 20: Ajout de la sonde sur la lamelle

- La lame échantillon est retournée sur la lamelle, et scellée à l'aide de rubber cement.

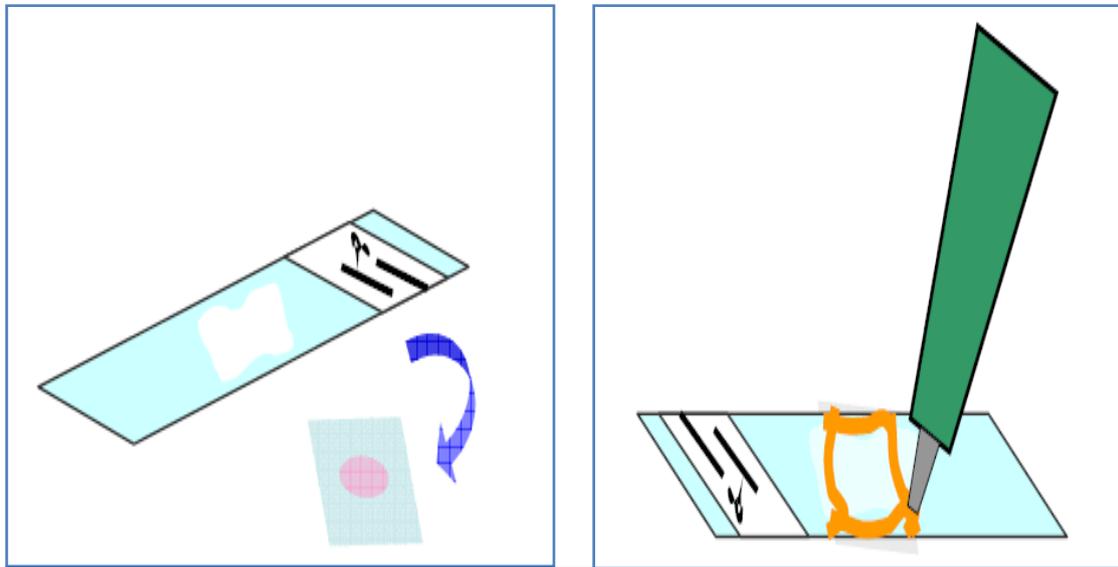


Figure 21 :Retourner la lame échantillon sur la lamelle, puis les sceller par de la colle

- La lame est placée dans le ThermoBrite et laissée incuber à 37°C pendant environ 5 minutes avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation :
- température de dénaturation: 73°C / Temps de dénaturation : 1 minute /
- Température d'hybridation: 37°C / temps d'hybridation 20 h.
- **Lavage post-hybridation :**

A partir de cette étape, il est impératif de travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames.

- A la fin de l'hybridation, il faut faire sortir les lames du ThermoBrite.
- Le rubber cement est retiré, **sans retirer la lamelle**, la lame est placée dans la solution de lavage 2XSSC/0,1% NP40 à t° ambiante pour faciliter le décollement de la lamelle (quelques secondes). Pour plus de facilité, les lames peuvent être placées dos à dos.
- Ensuite les lamelles sont retirés délicatement et transférés dans la solution 0,4XSSC/0,3% NP40 à 73°C. Une agitation rapide est effectuée et le chronomètre réglé à 2 minutes est lancé.
- Les lames sont retirées de la solution à 73°C et un rinçage à t° ambiante 30s à 1 minute est effectué.
- Les lames sont mises à sécher à l'obscurité.
- **Contre coloration des noyaux au DAPI :**
- 10µl de DAPI sont déposés sur une lamelle couvre-objet.
- La lame échantillon est retournée sur la lamelle (même technique que pour la sonde d'hybridation) ;

Lecture :

- Les lames sont placées à 4°C pendant au moins 5min avant de procéder à la lecture sous microscope.
- L'observation des résultats de FISH se fait à l'obscurité sur cytoscan.

IV) Résultats et discussion

D'après les observations cliniques des patients recrutés dans cette étude, le syndrome de williams (une microdélétion 7q11.23) a été suspecté.

Afin de confirmer ces observations, un caryotype a été réalisé pour éliminer la possibilité d'une anomalie chromosomique de structure ainsi que pour mettre en évidence toute éventuelle anomalie de structure visible à la résolution du caryotype. Dans ce but, un caryotype en bandes R a été alors établi pour tous les patients.

Résultats des caryotypes :

Les trois patients (3 observations) présentent un caryotype normal ne montrant aucune anomalie chromosomique de structure.



Fig 22: caryotype normal obtenu à partir des 3 patients.

L'absence d'aberrations chromosomiques visibles sur caryotype, nous a poussés à réaliser une FISH sur préparation chromosomique pour toutes les observations.

Pour confirmer une microdélétion lors d'une suspicion, des sondes spécifiques qui s'hybrident au chromosome en question sont utilisées. Deux types de sondes sont utilisées : une sonde de contrôle et l'autre pour le test.

Pour les suspicions de syndrome de williams :

La sonde de contrôle utilisée est **LSI D7S486, D7S522** qui s'hybride au milieu du bras q du chromosome 7 (7q31) en le marquant d'une tache fluorescente verte. (fig23)

La sonde test utilisée est **LSI ELN** qui s'hybride à l'extrémité proximale (7q11.23) en le marquant d'une tache fluorescente orange.fig(23)



Fig 23 : Cartographie des régions d'appariements des sondes LSI ELN Spectrum orange et / D7S486 d7S522 Spectrum green

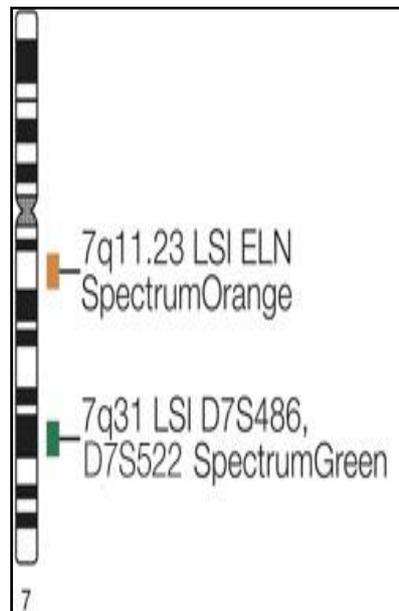


Fig 24: Cartographie des régions d'appariements des sondes LSI ELN spectrum orange et / D7S486 d7S522 Spectrum green

Résultats obtenus par FISH

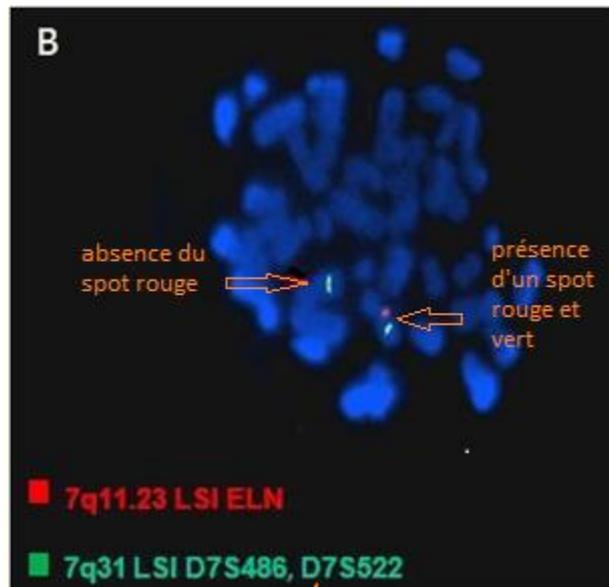


Fig 25 : le résultat de Fish

Le diagnostic du Syndrome de Williams a été confirmé par FISH pour les observations 1,2 et 3 : une microdélétion chromosomique hémizygote en position 7q11.23 a été observée. La flèche montre l'absence du spot rouge sur un de deux chromosomes 7 témoignant d'une microdélétion. Il y a Présence d'un spot rouge et deux spots verts sur noyaux colorés par le DAPI

Nos patients 1 et 2 présentent une malformation cardiaque, une hypertrophie ventriculaire gauche et une sténose pulmonaire. La plupart des malformations cardiaques résultent de la mutation ou de la délétion du gène élastine sur le chromosome 7. La perte de ce gène provoque la perte subséquente de sa fonction qui est l'élasticité nécessaire pour les tissus comme les poumons, le derme et les gros vaisseaux sanguins. L'un des principaux résultats de cette mutation étant l'artériopathie élastine.

Le profil neuropsychologique se caractérise principalement par un retard cognitif modéré, un langage relativement préservé, des déficits visuospatiaux et une hypersociabilité.

Le profil cognitif et comportemental n'a pas été très bien étudié chez l'observation 3 vu son âge (20 mois). Pour la patiente de l'observation 2, âgée de 9 ans, elle présente un profil cognitif et comportemental particulier regroupant une hypersensibilité au bruit

Les parents des patients présentant le syndrome de Williams sont phénotypiquement normaux. Il n'y a pas d'indication d'explorer les parents par FISH car la survenue de ce syndrome s'explique par une microdélétion de novo. Il n'y a jamais eu de cas rapporté de microdélétion en 7q11.23 avec un phénotype normal.

Conclusion :

Le syndrome de williams est une entité clinique et génétique homogène .Le diagnostic est facile à confirmer par un examen en FISH recherchant une microdélétion en 7q11.23.L'atteinte la plus grave est l'atteinte cardiaque qui doit être suivie par une équipe spécialisée. Il faut rester vigilant sur la surveillance de la tension artérielle à l'âge adulte .La grosse difficulté est le devenir de ces enfants à l'âge adulte : ils seront rarement autonomes. Il existe de rares cas de formes partielles auxquelles il faut savoir penser devant le phénotype comportemental spécifique.

Références

- [1] Pr Bruno DELOBEL ; 2011 ; Cytogénétique Moléculaire.
- [2] Dr Cédric Le Caignec ; 2010-2011 ; Caryotype humain : Technique - Indications.
- [3] M. Christine Perrier- Wail; Sep 1996; hybridation in situ.
- [4] [5] [6] M.-L. Briard ; 1997 ; Anomalies chromosomiques ; p11.
- [7] [8] [10] Howard Lenhoff et al ; Février 1998 ; Pour la science, N244, p78.
- [11] Metcalfe K; 1999; Williams's syndrome: on update on clinical and molecular aspects. Arch Dis Child;. 81/ 98-200
- [12] Brigitte gilbert- dussardier ; décembre 2006 ; le syndrome de Williams.orphanet ; la revue de praticien.
- [13] Eronen M ; Peipo M ; Hiipala A, 2002 et al .carduovascular manifestation in 75 patients with williams syndrome.J Med Genet ; 39 : 554-8
- [14] [15] [16] Dr Christine ; Juillet 2012 ; Les syndromes de williams Orphanet Grand Public.
- [17] [18] Brigitte gilbert- dussardier ; décembre 2006 ; le syndrome de Williams.orphanet ;la revue de praticien.
- [19] Damien Bonnet ; Février 2014 ; syndrome de Williams ; les handicapés mentaux .
- [20] Dr Brigitte Gilbert-Dussardier ; le 08 /11 /2011 ; Williams et Beuren ; autour de williams .
- [21] Pr Damien Bonnet ; Février 2014 ; Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Syndrome de Williams-Beuren Orphanet Grand Public ; p7
- [22] Pierrick HORDE ; Juin 2014 ; Caryotype - Définition et détermination
- [23] O'Connor C; 2008; Fluorescence in situ hybridation (Fish).Nature education (1).