



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

Olivier Pichon (Ingénieur)

Laboratoire de cytogénétique de Nantes, Service de Génétique Médicale

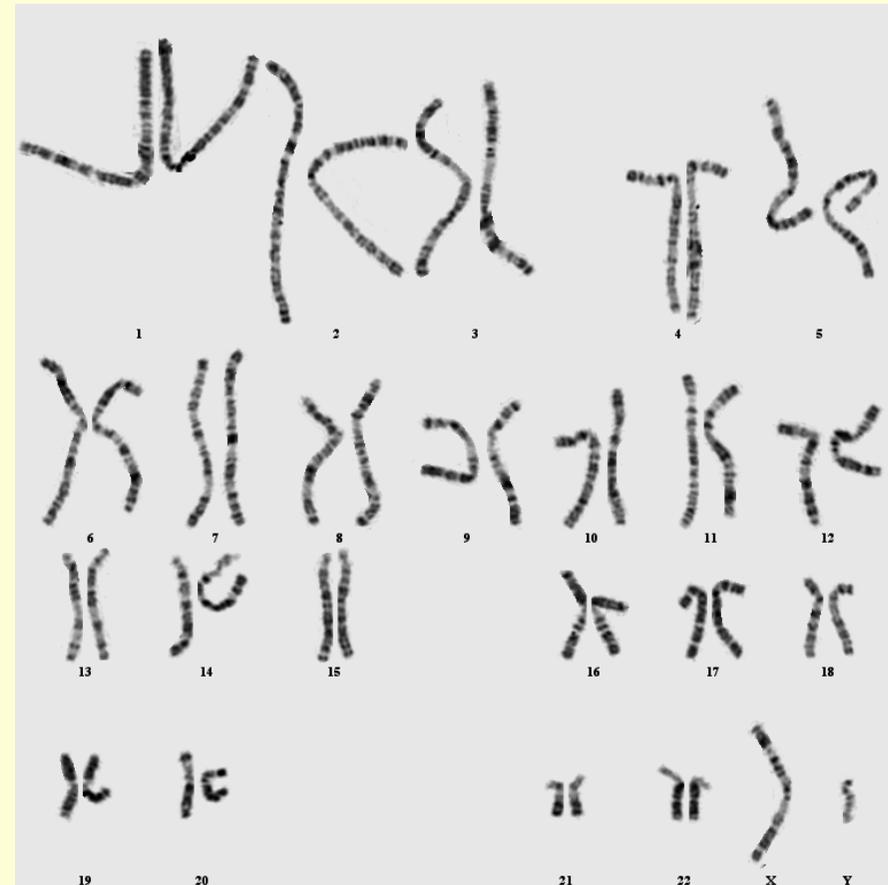


# Le caryotype

Détection d'anomalies chromosomiques:

- Délétion
- Duplication
- Translocation et anneau

Mais la **résolution est faible** (~ 5Mb)



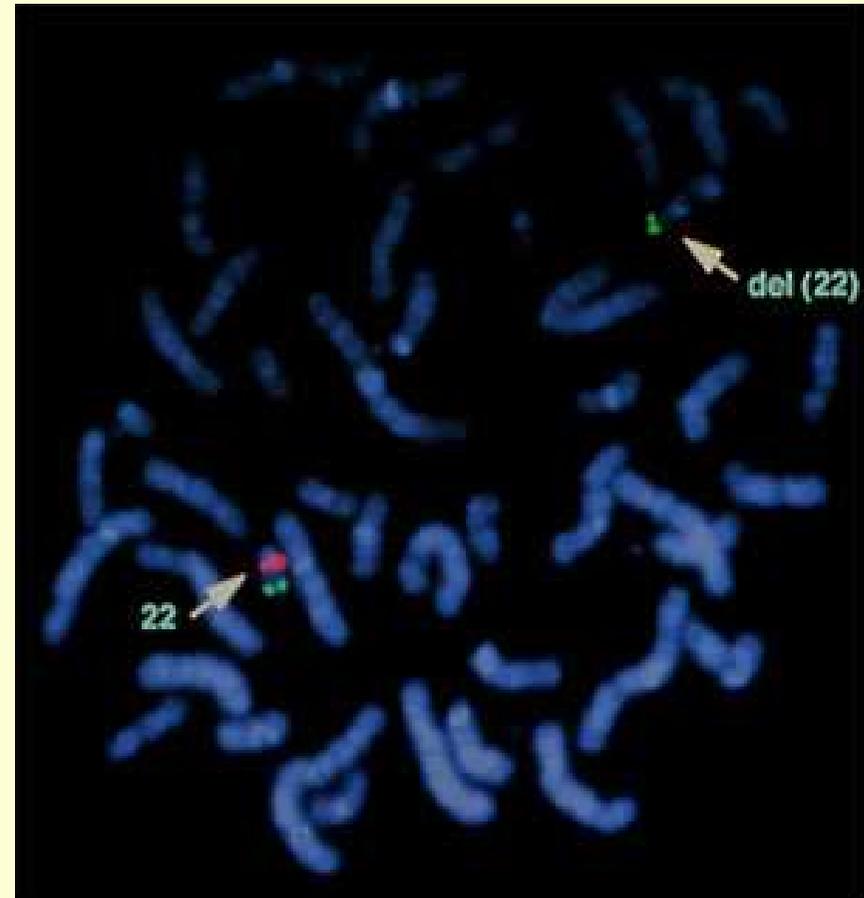
## FISH (Hybridation en Fluorescence In Situ)

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

Détection d'anomalies chromosomiques:

- Délétion
- Duplication
- Translocation
- Bonne Résolution

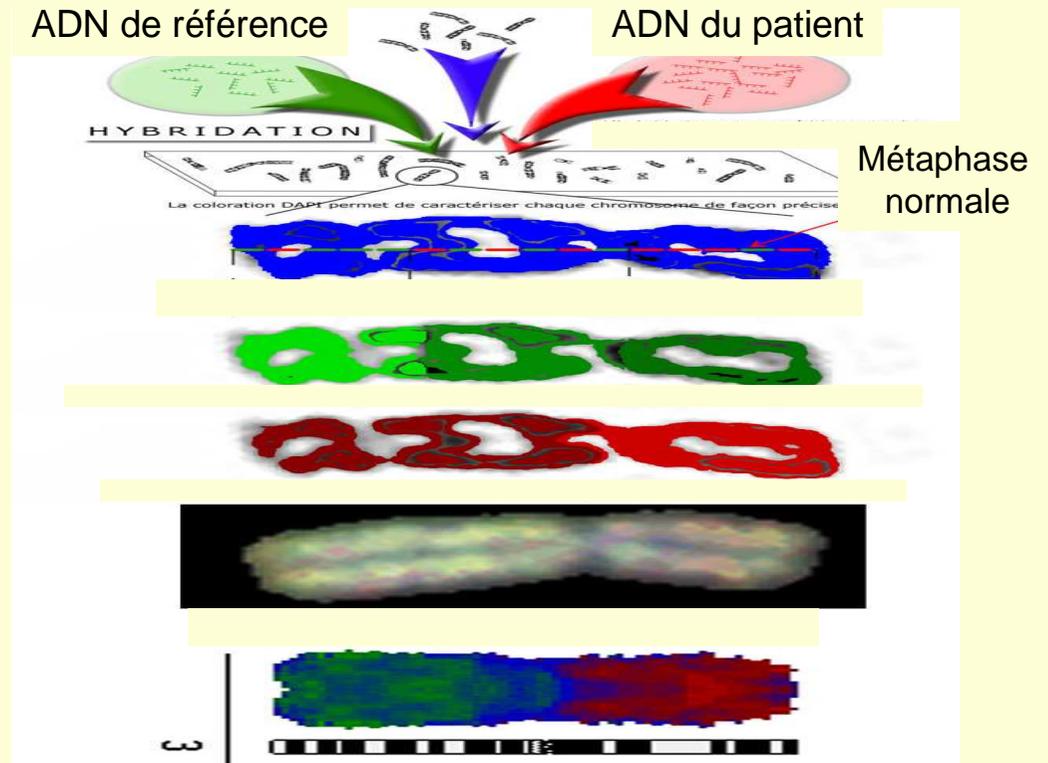
Mais il faut **choisir la sonde** :  
**Technique ciblée**



# Chromosome Painting CGH sur métaphase (Hybridation Génomique Comparative)



Information sur les chromosomes intéressés par un remaniement



## Puce à ADN et CGH array



# Technologies de fabrication des puces à ADN

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

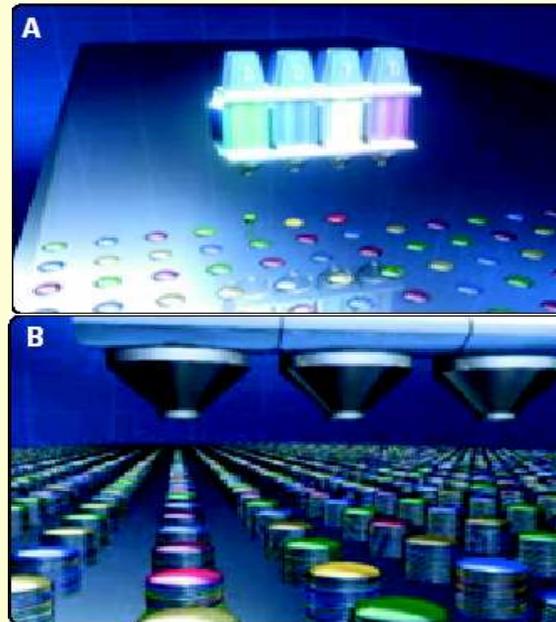
**Dépôt (= Spotting)**  
de produits de PCR  
BAC/PAC



<2000 spots/cm<sup>2</sup>

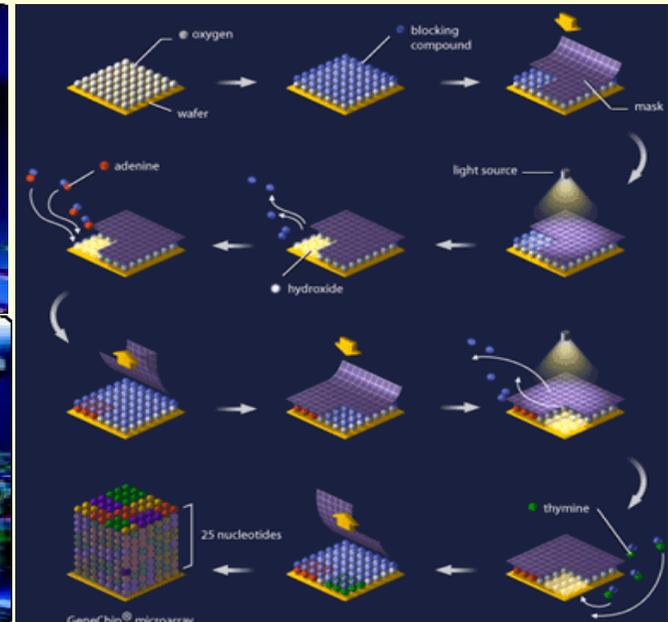
**Synthèse in situ (Oligomères de 20 à 60 nucléotides)**

Jet d'encre (Agilent)

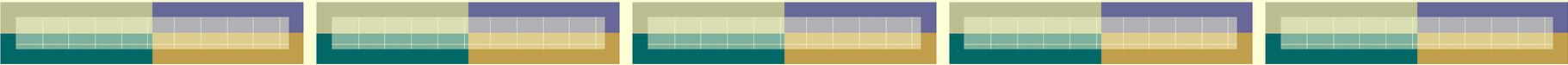


15000 spots/cm<sup>2</sup>

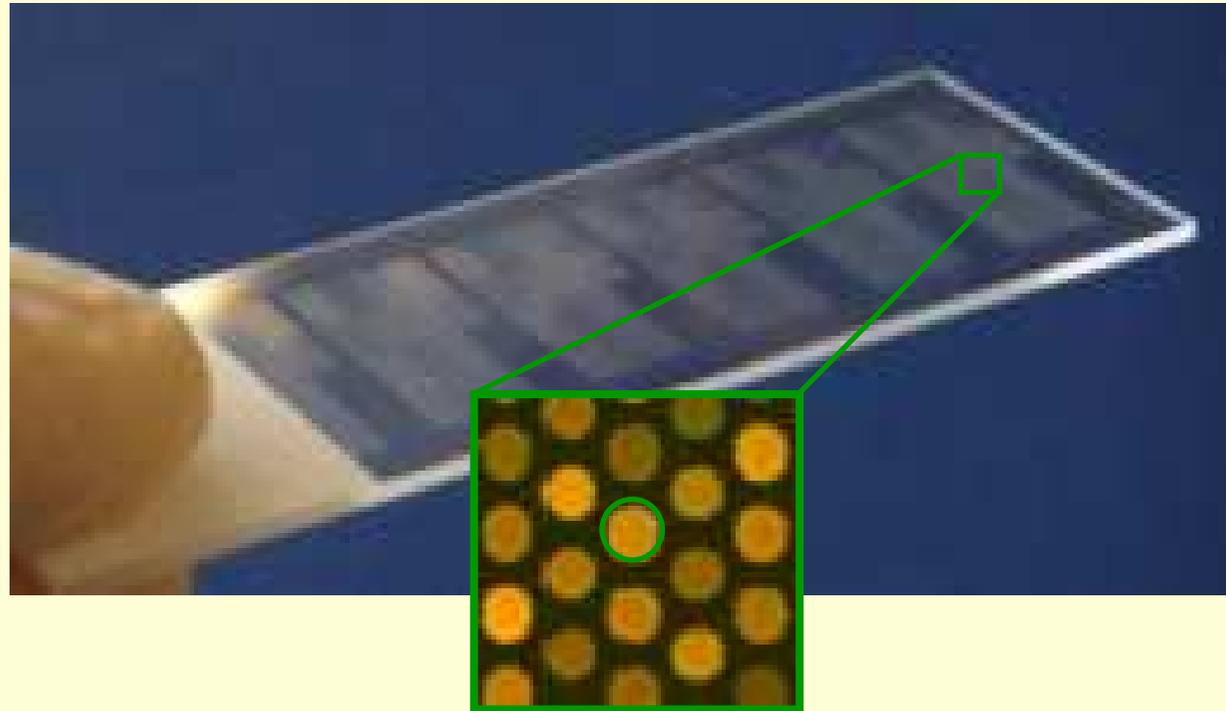
Photolithographie (Affy)



100000 spots/cm<sup>2</sup>



## Les sondes



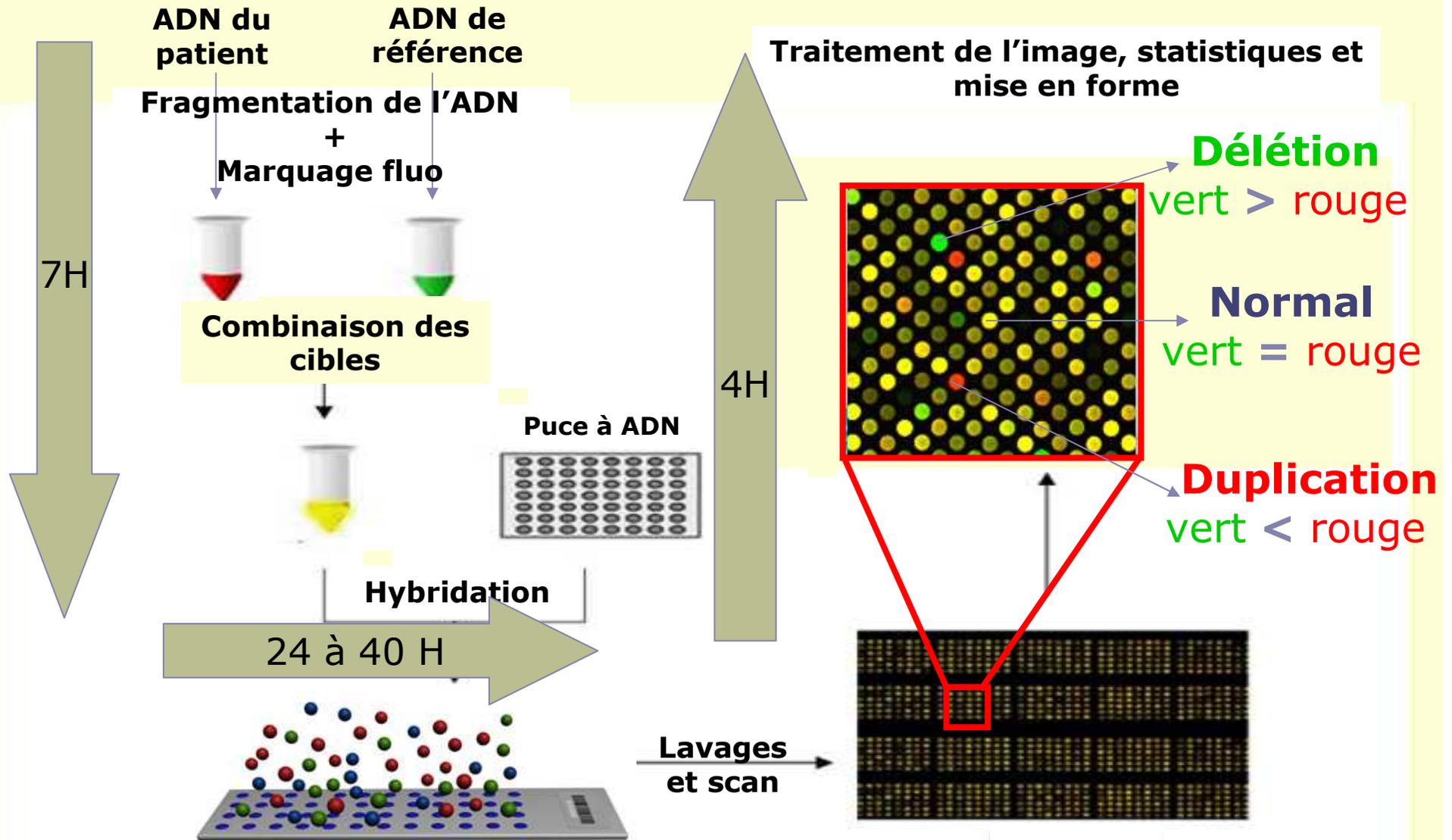
**1 spot = 1 séquence d'ADN présente en multiples copies.**

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

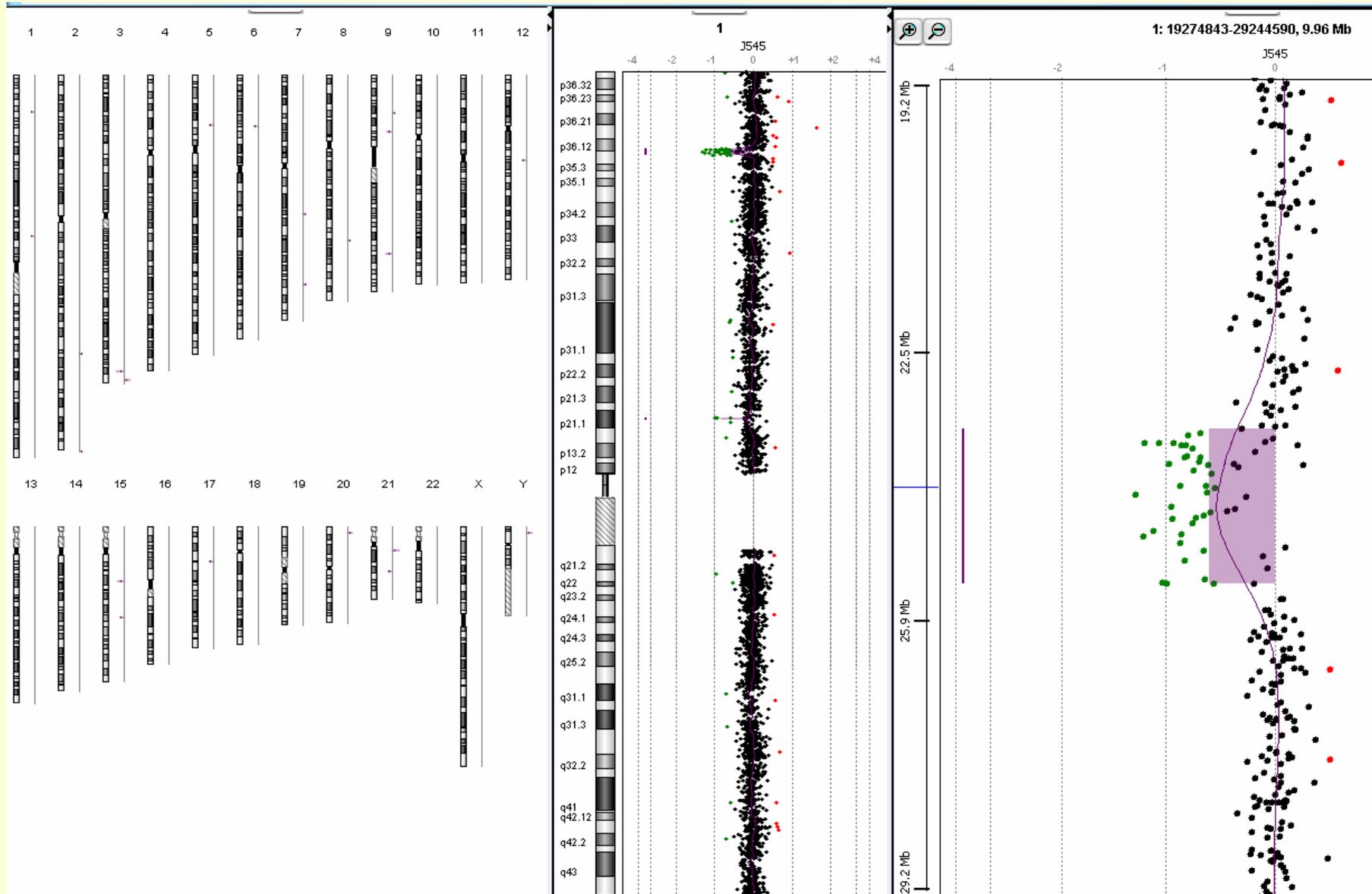
Plus il y a de sondes différentes sur la puce à ADN, meilleure sera la résolution de la puce (+ d'informations).

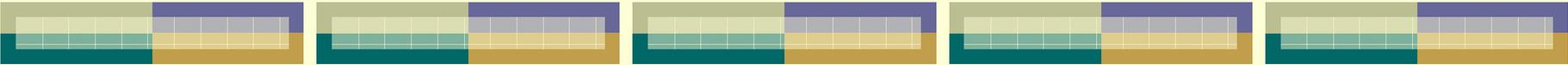


# La CGH array



# Le résultat de CGH array





## Avantages / Limites de la CGH array

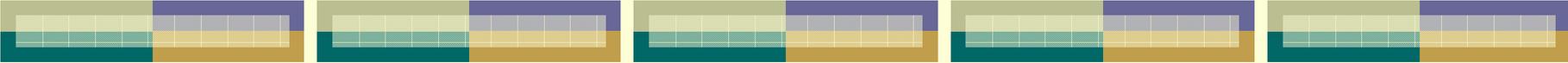
La CGH array est une méthode moléculaire qui permet **d'explorer simultanément et sur tout le génome les déséquilibres chromosomiques** entre l'ADN d'une référence et celui d'un patient (del / dup).

Avantages:

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

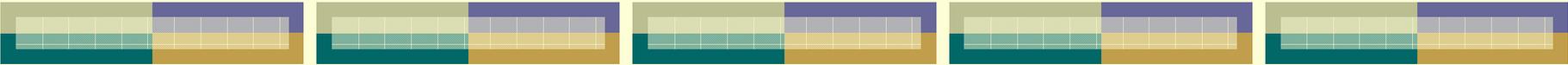
Limites:

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



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





## Le laboratoire de cytogénétique de Nantes

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

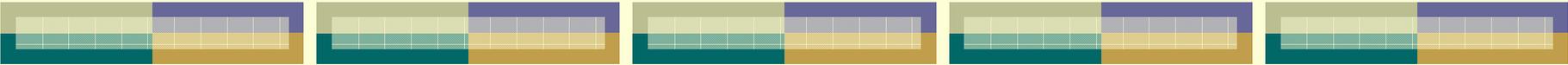
Activité 2007:

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

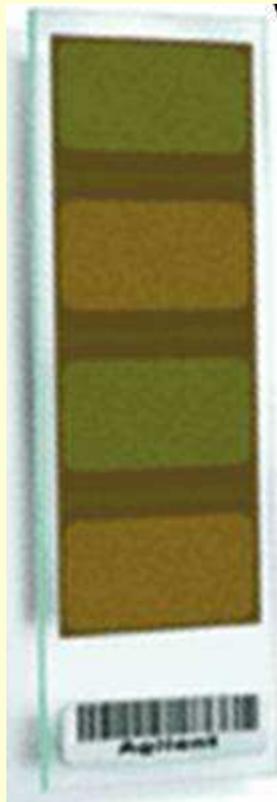
Menten *et al.* (J Med Genet. 2006 Aug;43(8):625-33):  
CGH array sur 140 patients atteints de RM/SPM, dont le caryotype et les télomères sont normaux. **20% (28/140) présentent une anomalie en CGH array (>1Mb) qui explique les phénotypes de RM et SPM.**

**Potentiellement, 60 diagnostics supplémentaires / an !**





## CGH array à Nantes: exploration des causes de retard mental



La puce utilisée: 4x44K d'Agilent

1 puce : 4 patients simultanément

44000 sondes : 1 sonde tous les 60 kb en moyenne

1 déséquilibre: 3 sondes consécutives anormales soit 180Kb minimum



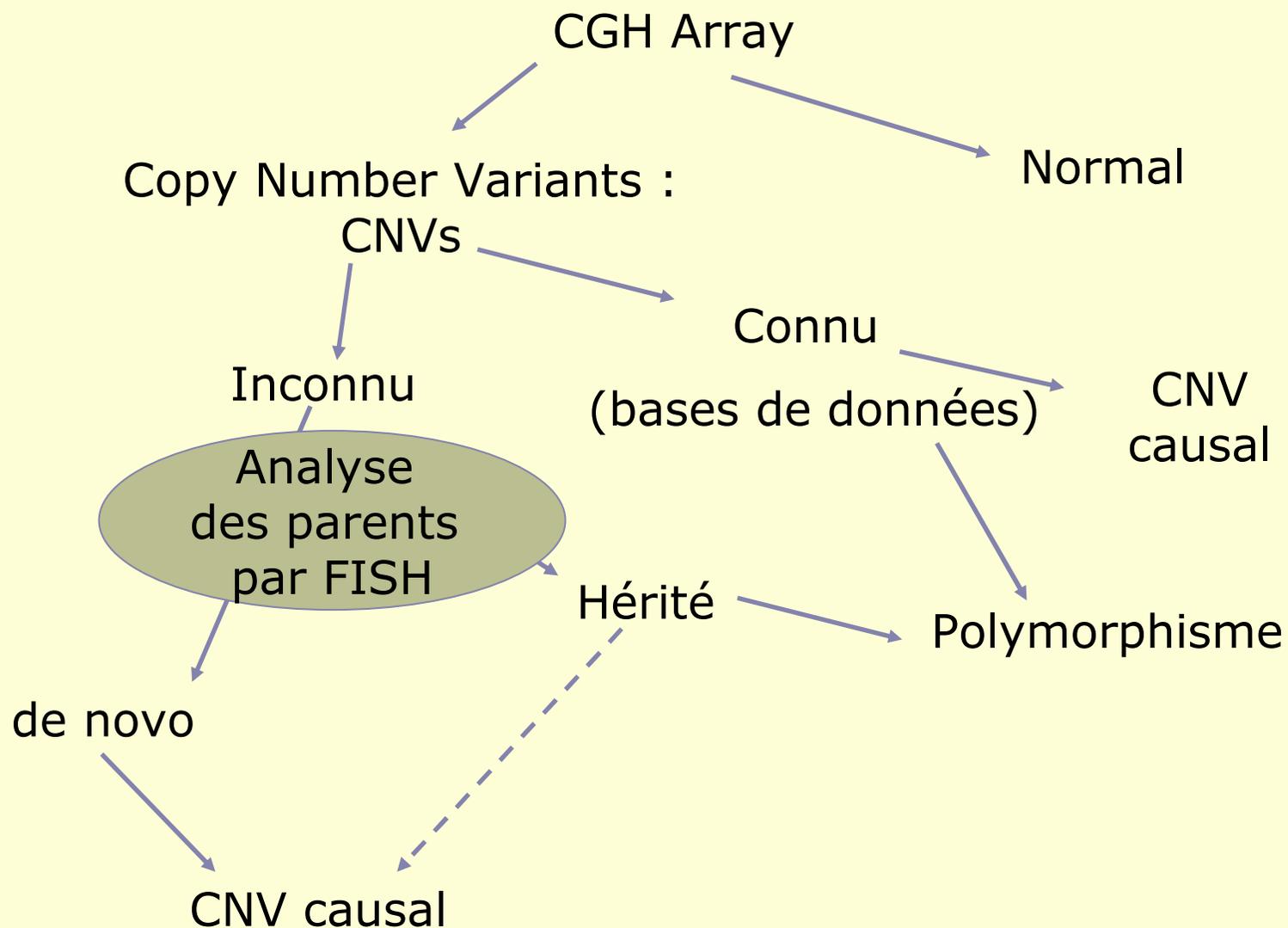
## ARTICLES

## Global variation in copy number in the human genome

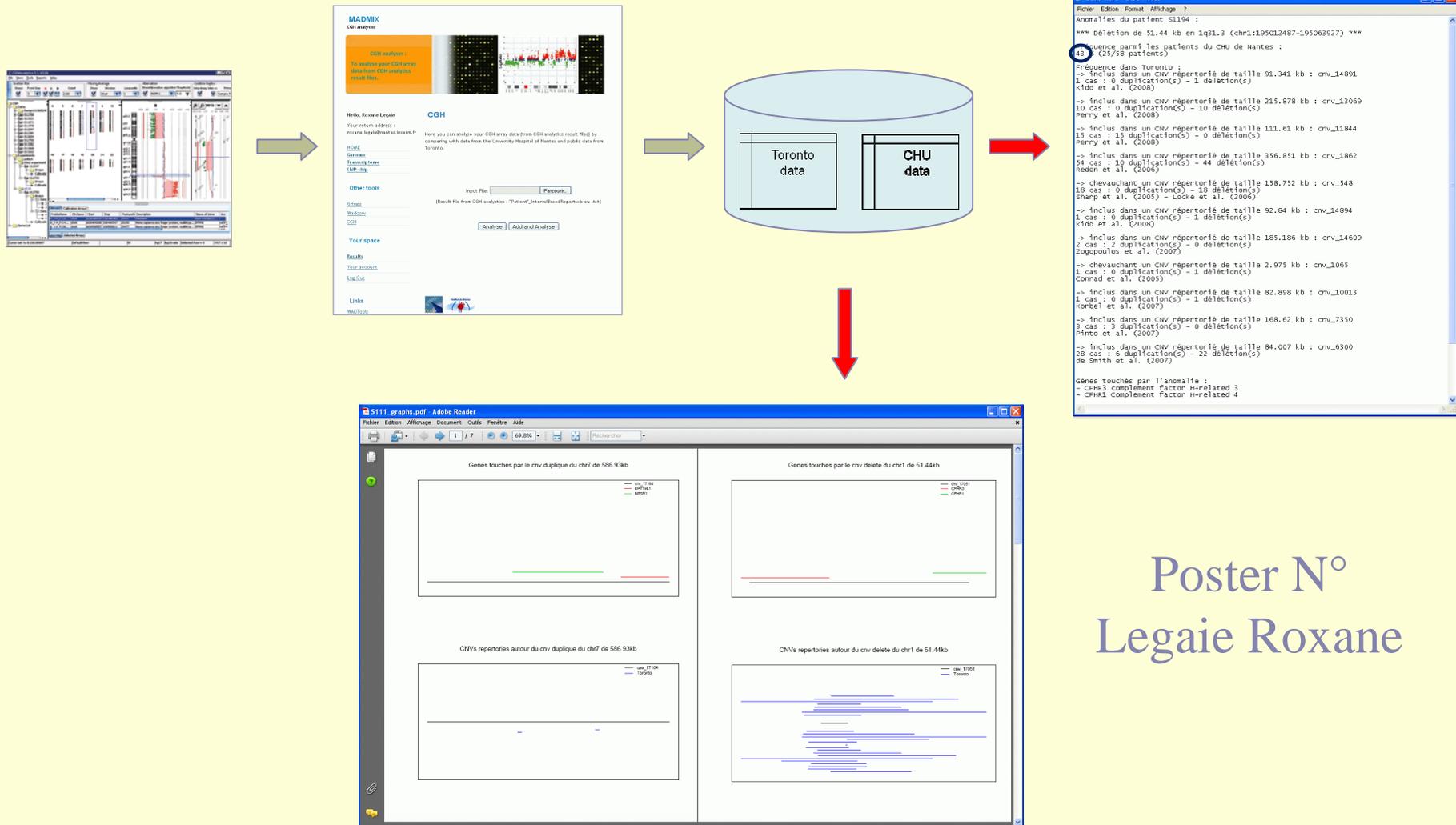
Richard Redon<sup>1</sup>, Shumpei Ishikawa<sup>2,3</sup>, Karen R. Fitch<sup>4</sup>, Lars Feuk<sup>5,6</sup>, George H. Perry<sup>7</sup>, T. Daniel Andrews<sup>1</sup>, Heike Fiegler<sup>1</sup>, Michael H. Shapero<sup>4</sup>, Andrew R. Carson<sup>5,6</sup>, Wenwei Chen<sup>4</sup>, Eun Kyung Cho<sup>7</sup>, Stephanie Dallaire<sup>7</sup>, Jennifer L. Freeman<sup>7</sup>, Juan R. González<sup>8</sup>, Mònica Gratacòs<sup>8</sup>, Jing Huang<sup>4</sup>, Dimitrios Kalaitzopoulos<sup>1</sup>, Daisuke Komura<sup>3</sup>, Jeffrey R. MacDonald<sup>5</sup>, Christian R. Marshall<sup>5,6</sup>, Rui Mei<sup>4</sup>, Lyndal Montgomery<sup>1</sup>, Kunihiro Nishimura<sup>2</sup>, Kohji Okamura<sup>5,6</sup>, Fan Shen<sup>4</sup>, Martin J. Somerville<sup>9</sup>, Joelle Tchinda<sup>7</sup>, Armand Valsesia<sup>1</sup>, Cara Woodwark<sup>1</sup>, Fengtang Yang<sup>1</sup>, Junjun Zhang<sup>5</sup>, Tatiana Zerjal<sup>1</sup>, Jane Zhang<sup>4</sup>, Lluís Armengol<sup>8</sup>, Donald F. Conrad<sup>10</sup>, Xavier Estivill<sup>8,11</sup>, Chris Tyler-Smith<sup>1</sup>, Nigel P. Carter<sup>1</sup>, Hiroyuki Aburatani<sup>2,12</sup>, Charles Lee<sup>7,13</sup>, Keith W. Jones<sup>4</sup>, Stephen W. Scherer<sup>5,6</sup> & Matthew E. Hurles<sup>1</sup>

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

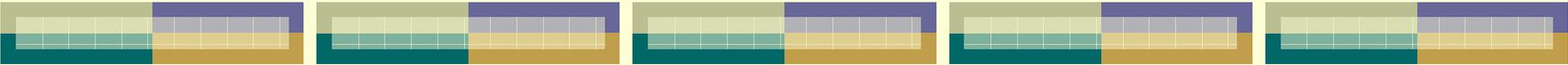
# Démarche de l'examen et interprétation des résultats



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



Poster N°  
Legais Roxane



## Exploration d'une cohorte par CGH array

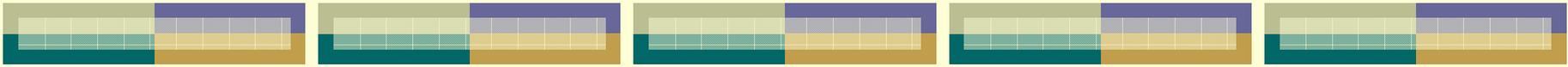
64 patients atteints de RM +/- SPM dont les caryotypes sont normaux.

### Résultats:

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

Confirmation par FISH et / ou par Q-PCR

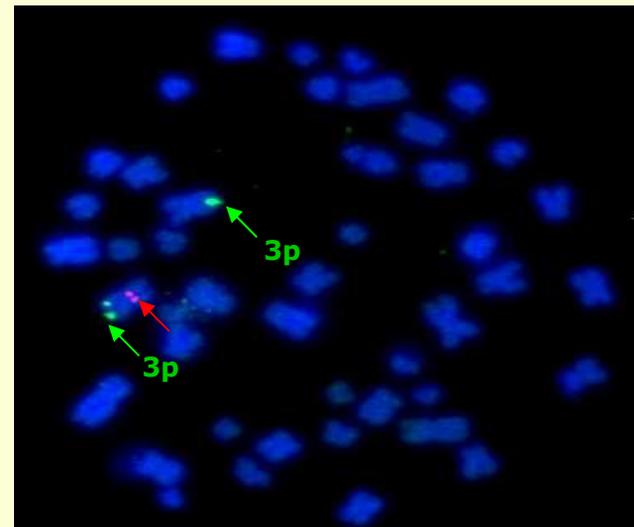
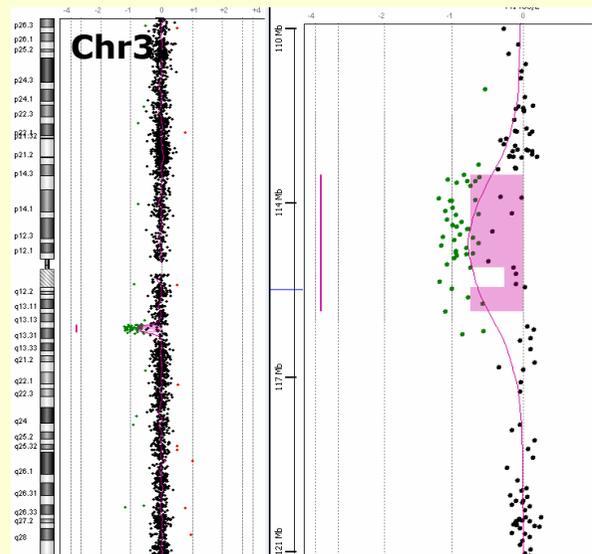
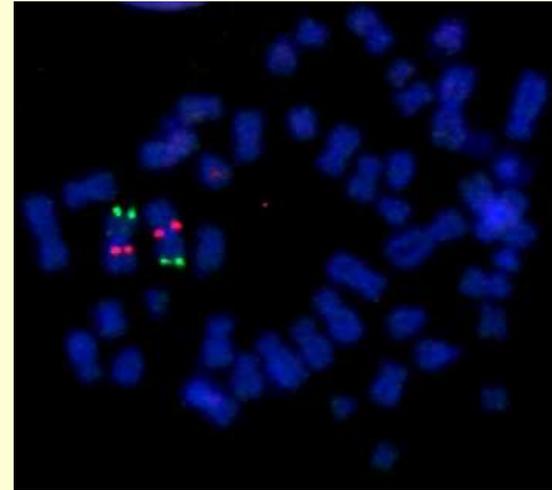
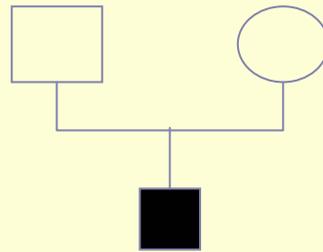
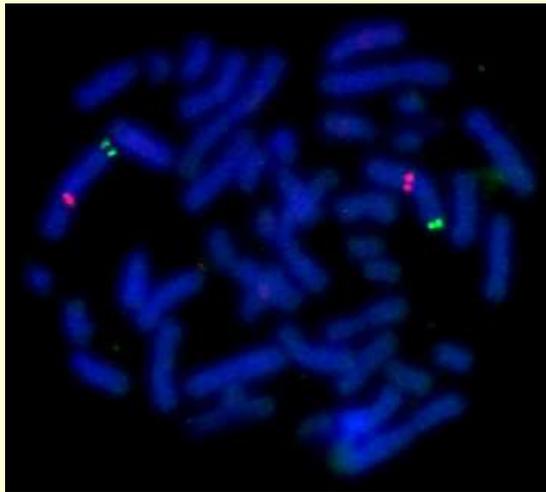


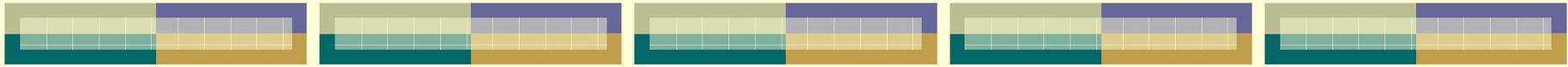


## Exemples ...

### 1. Cas simple : Délétion *de novo*

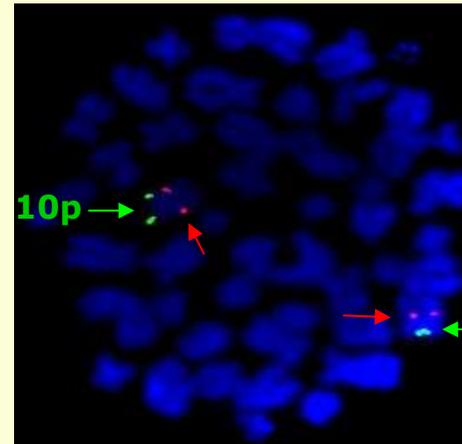
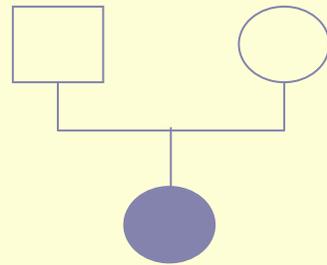
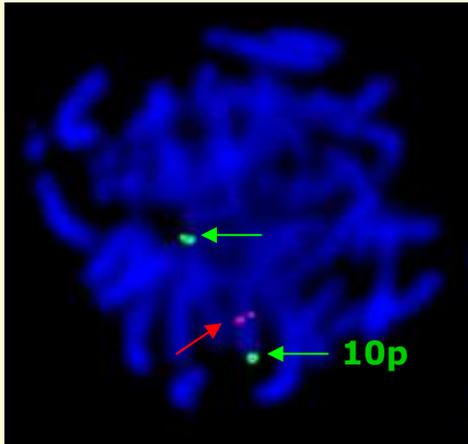
délétion de 3Mb non recensée sur les bases de données



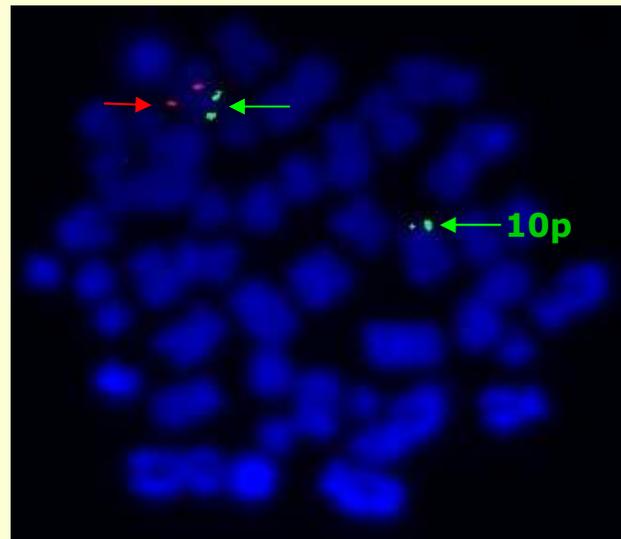
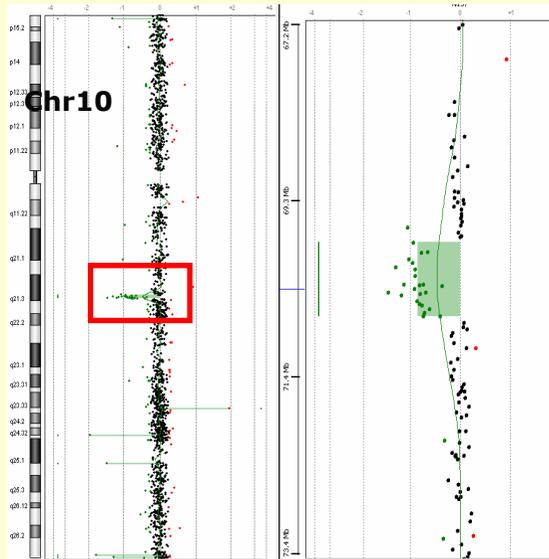


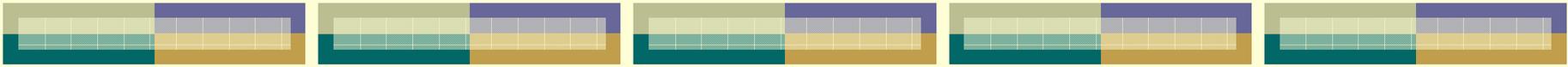
# 1. Cas simple : Délétion héritée

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



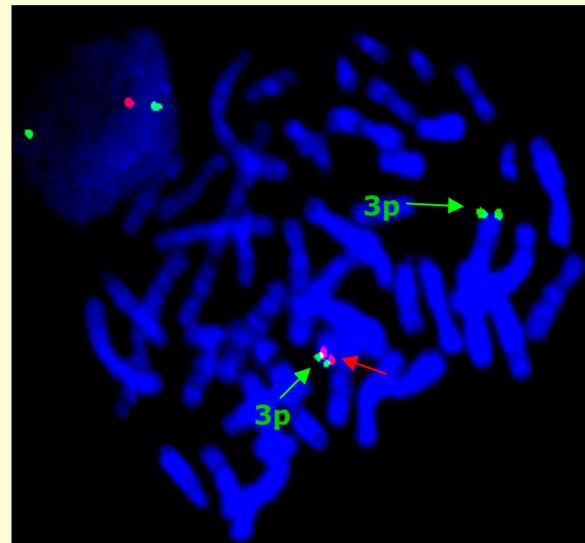
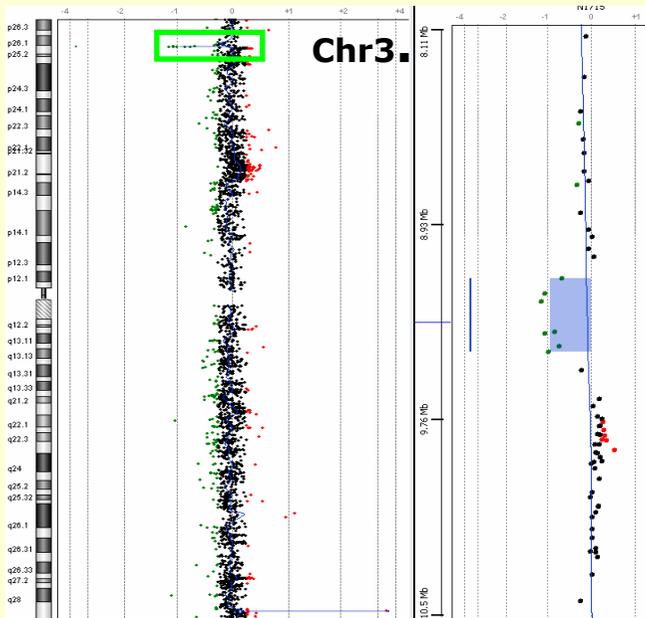
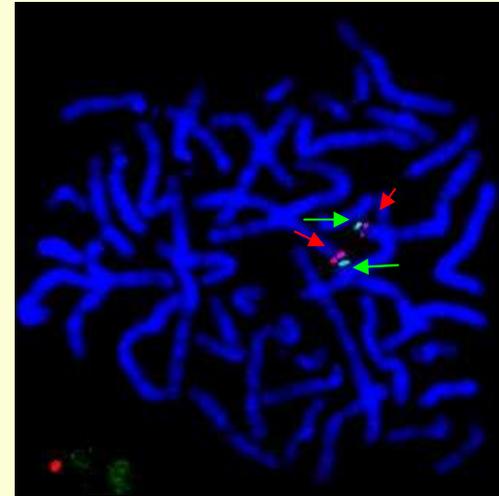
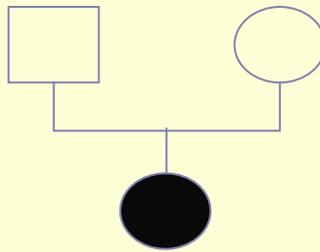
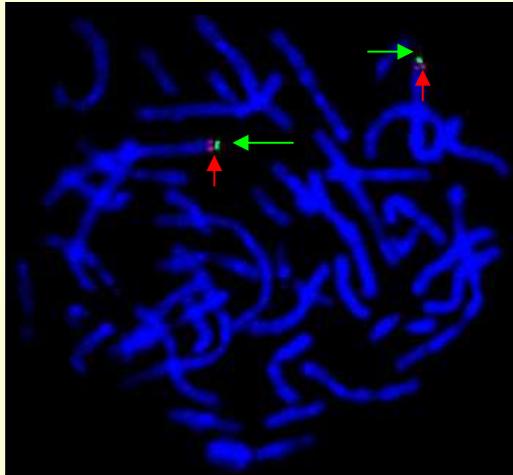
Délétion héritée : pas délétère





## Exemples ...

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



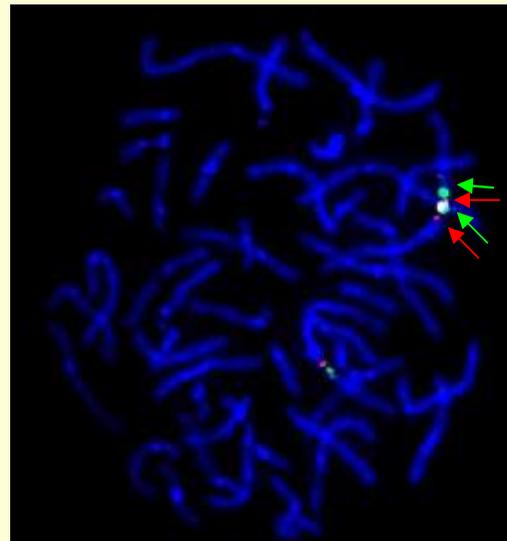
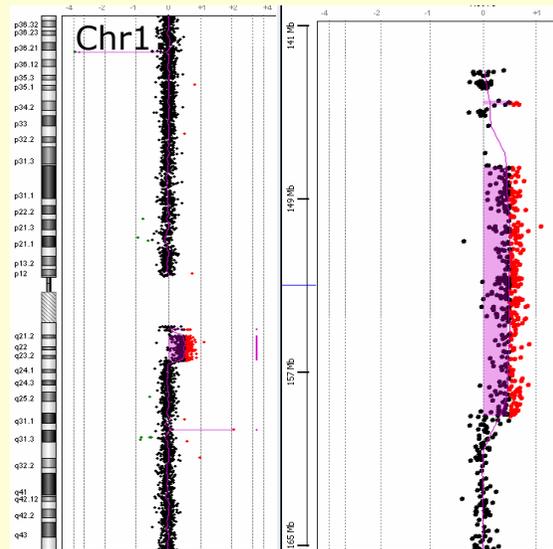
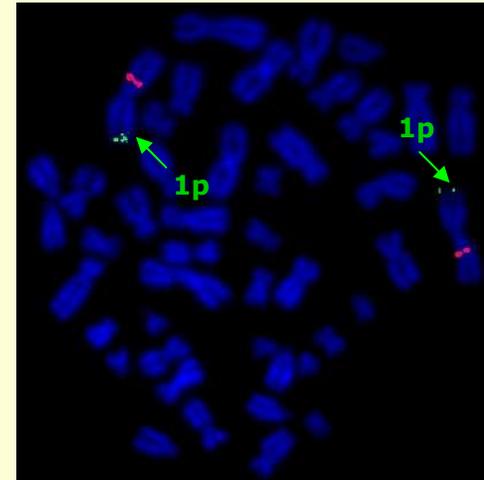
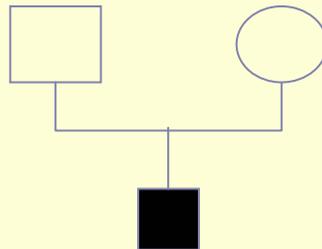
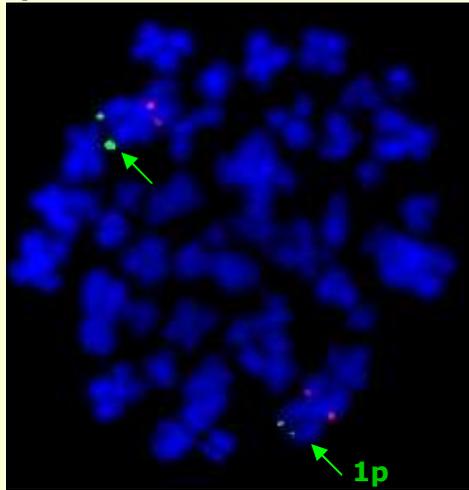
Gène majeur du syndrome 3p- ?



## Exemples ...

### 3. Cas simple : Duplication de novo

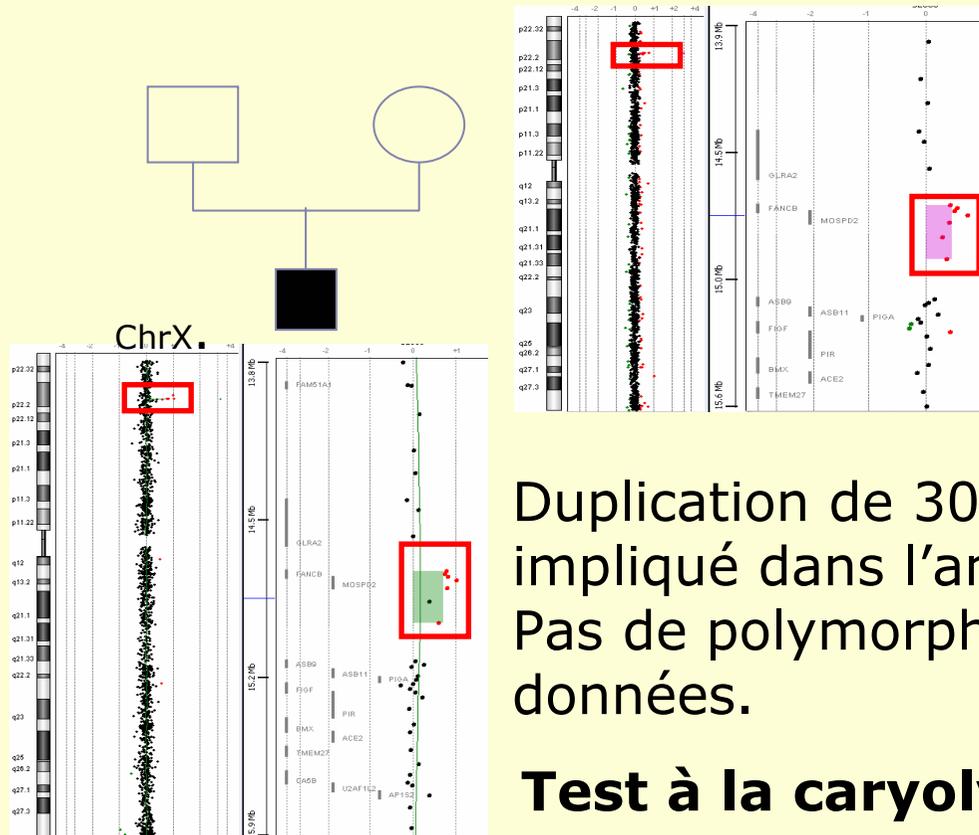
Duplication de 11Mb non recensée sur les bases de données





## Exemples ...

### 5. Cas + difficile: les duplications de petites tailles

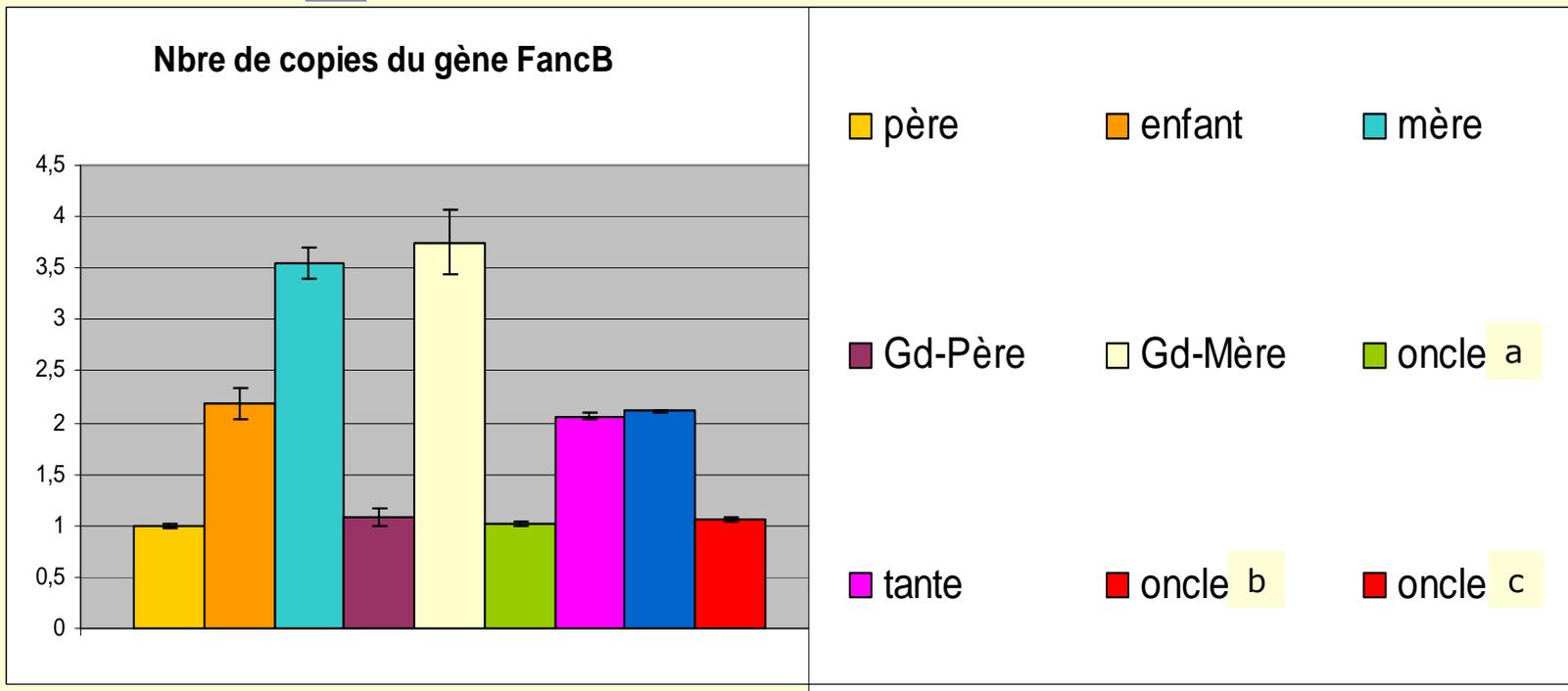
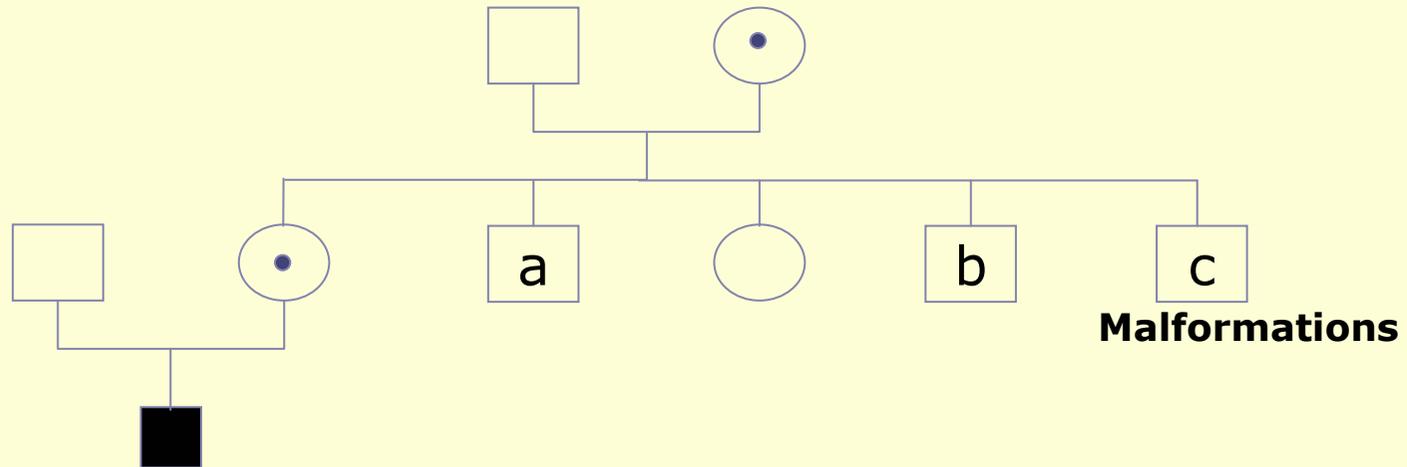
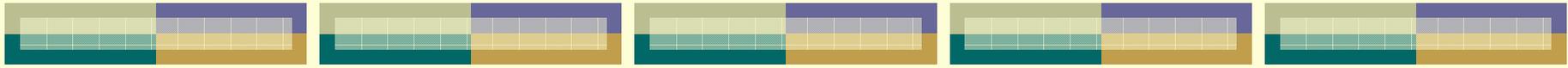


Duplication de 300 Kb, incluant le gène *FANCB* impliqué dans l'anémie de Fanconi.  
Pas de polymorphisme dans les bases des données.

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

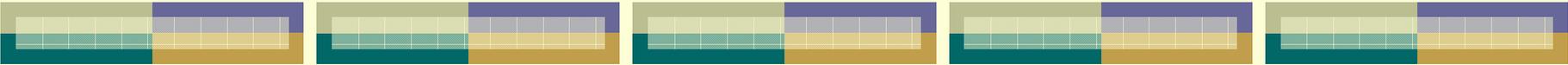
**Malformation cardiaque** et des **extrémités des mains**

Difficile de valider une duplication < 500Kb par FISH



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





## Conclusions

### **Critères retenus pour le diagnostic :**

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

### **Interprétation des données :**

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

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

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



# Remerciements

**Dr Jean-Marie Rival**

**Dr Cédric Le Caignec**

**Dr Michelle Boceno**

**Dr Philippe Piloquet**

**Claire Lecointre (interne)**

**Dr Albert David**

**Dr Bertrand Isidor**

**Roxane Legaie (bioinformatique)**

**Julie Lamourre**

**Brigitte Menanteau**

**Aurélie Moriceau**

**Marie-line Bichon**

**Marie-jo Ostromon**

**Josseline Havard**

**Bernard Auffray**