

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES PAR SEQUENÇAGE A HAUT-DEBIT

Préparé par **Tony YAMMINE** (Doctorant en 1^{ère} année)

Travail réalisé en cotutelle entre l'USJ sous la direction du Dr. **Eliane CHOUERY KHOURY**
et l'UCBL1 sous la direction du **Pr. Damien SANLAVILLE**



Anomalies chromosomiques

de nombre

aneuploïdies

polyploïdies

de structure

équilibrées

déséquilibrées

Anomalies chromosomiques de structure

Déséquilibrées

A. Deletion:



B. Duplication:



C. Inversion:



Équilibrées

D. Translocation:

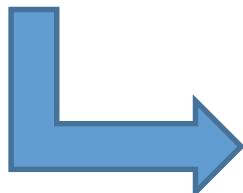


Un déséquilibre chromosomique explique le phénotype anormal chez le patient

Les remaniements chromosomiques apparemment équilibrés (RCAE) associés à un phénotype anormal sont des évènements rares et posent des difficultés pour le conseil génétique.

Le phénotype anormal peut être expliqué par 3 hypothèses :

- disruption de gènes
- formation d'un gène de fusion
- dérégulation génique liée à un effet de position



Nécessité de caractériser les points de cassure des RCAE chez des patients à phénotype anormal.

OBJECTIFS

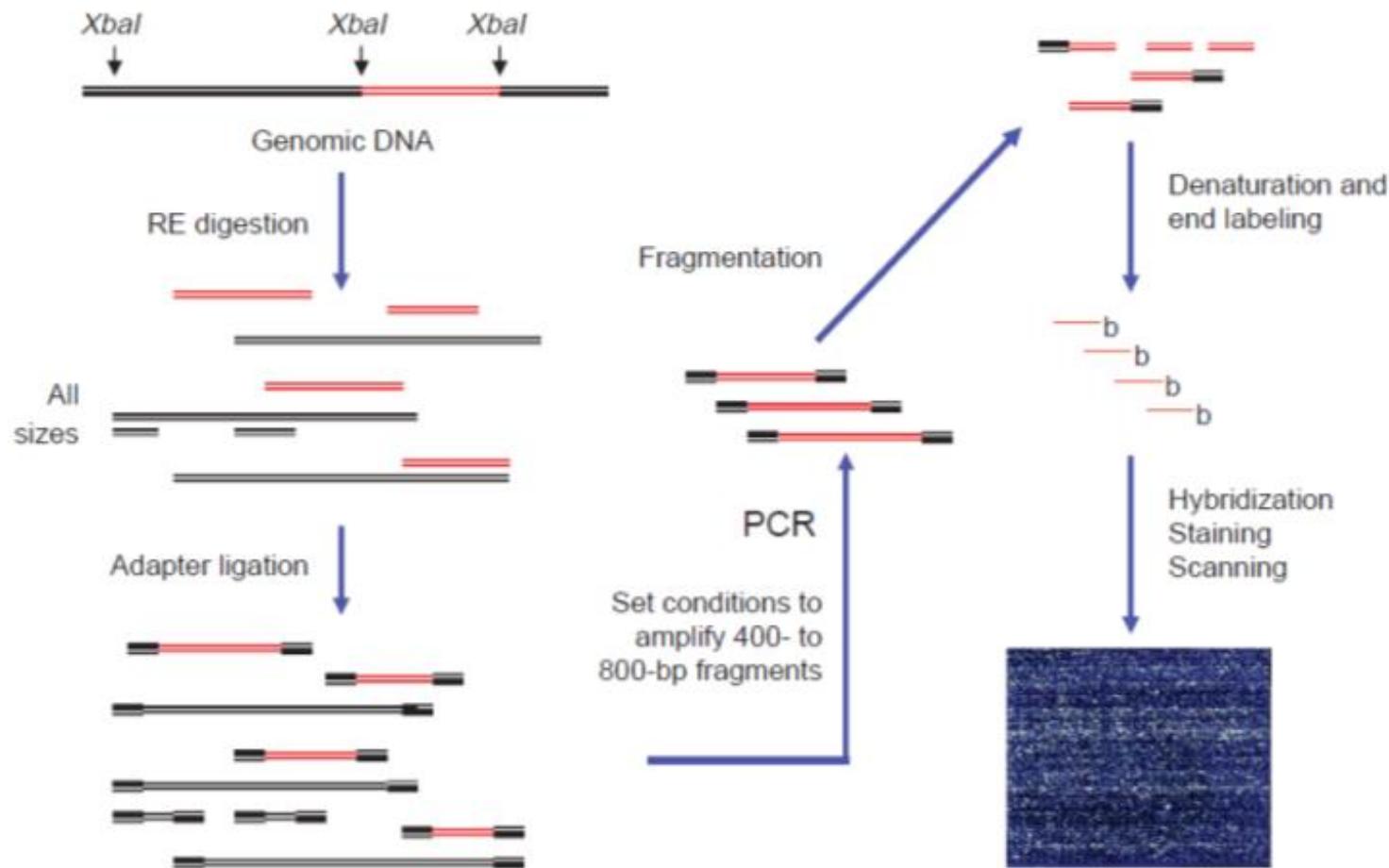
Caractériser au niveau moléculaire par WGS les points de cassure de RCAE chez 10 patients afin d'identifier les gènes impliqués dans la pathologie.

Etudier les mécanismes à l'origine de la survenue des RCAE et les conséquences fonctionnelles des points de cassure.

MÉTHODOLOGIE

- **10 patients** porteurs de RCAE identifiés par caryotype constitutionnel ont été recrutés soit à l'UGM de l'Université Saint-Joseph, soit au Service de Génétique de l'Hospices Civils de Lyon.
- Ces remaniements sont d'abord caractérisés en Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA).
- Si le résultat ACPA: - , un WGS sera fait

Principe de l' ACPA





AVANTAGES

Analyse globale du génome

Pas besoin de chromosomes du patient

Haute résolution



Inconvénients

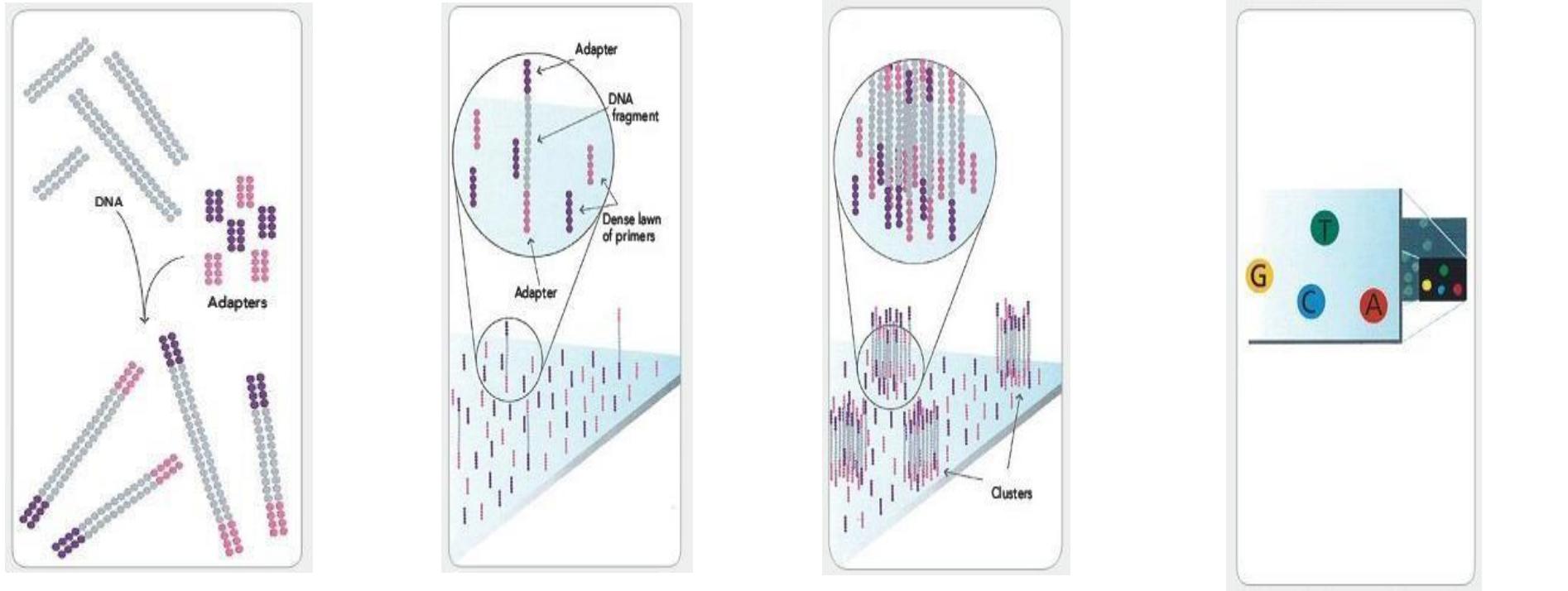
Ne détecte pas les remaniements équilibrés

Ne met pas en évidence les anomalies en mosaïques < 20 %



Whole genome sequencing

Processus général du WGS



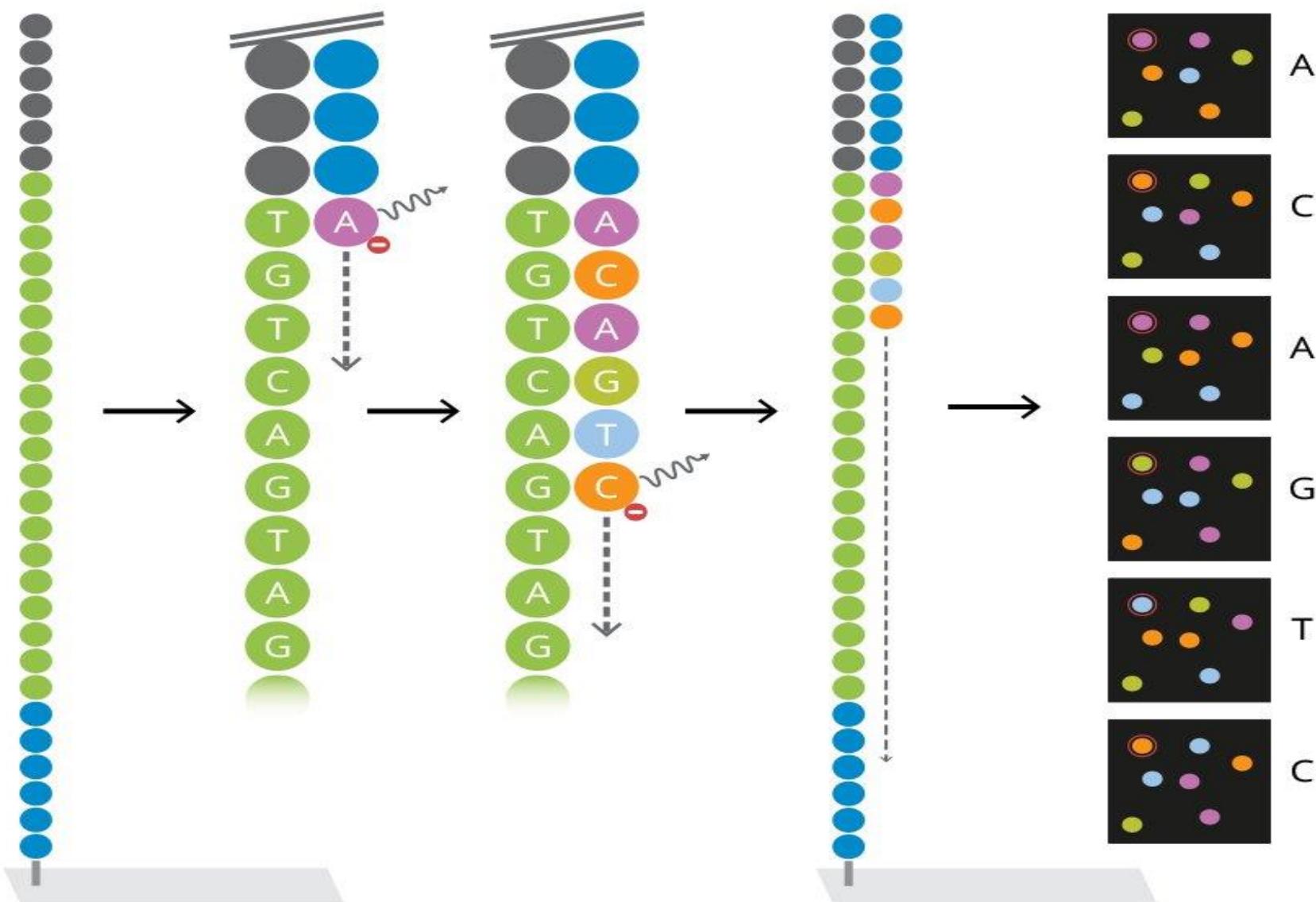
Préparation
de la librairie

Fixation au
support de
séquençage

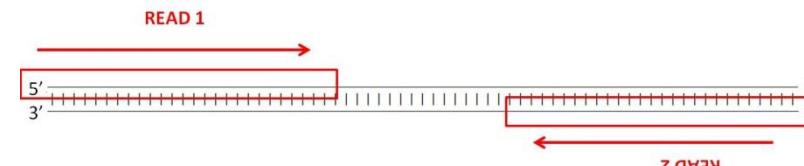
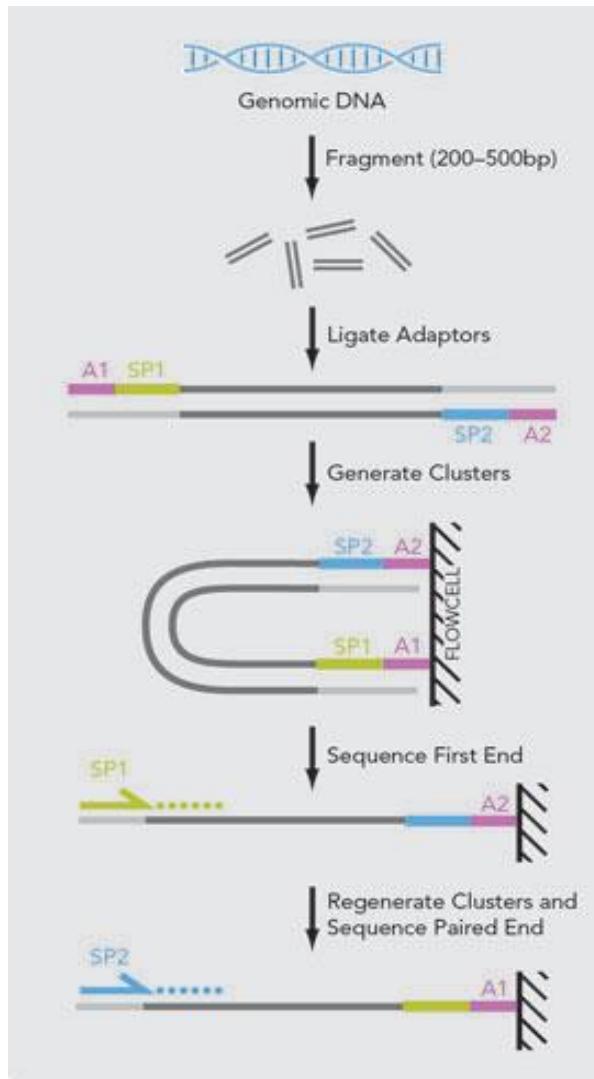
Amplification
clonale

Cycles de
séquençage

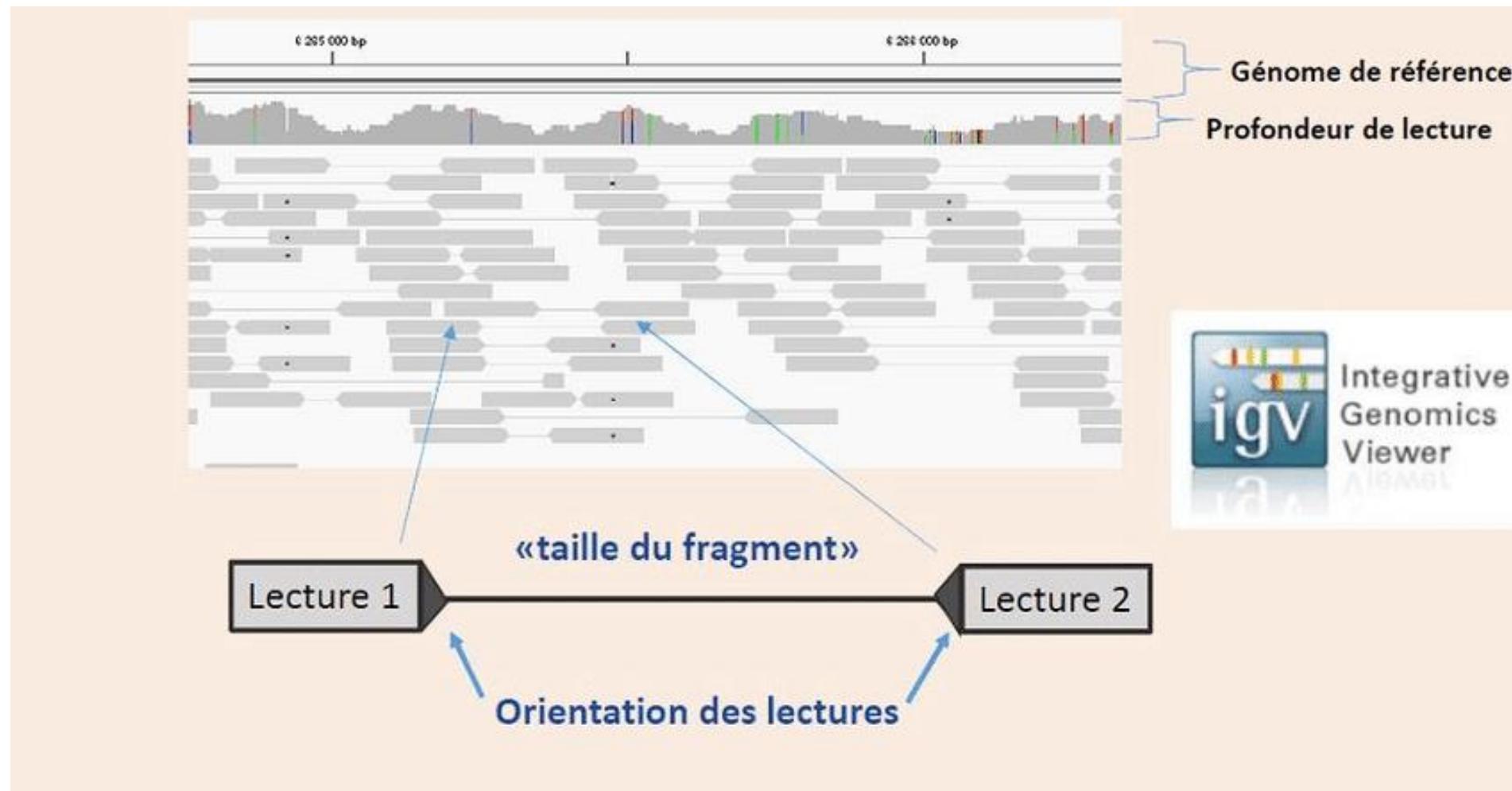
Séquençage de l'ADN



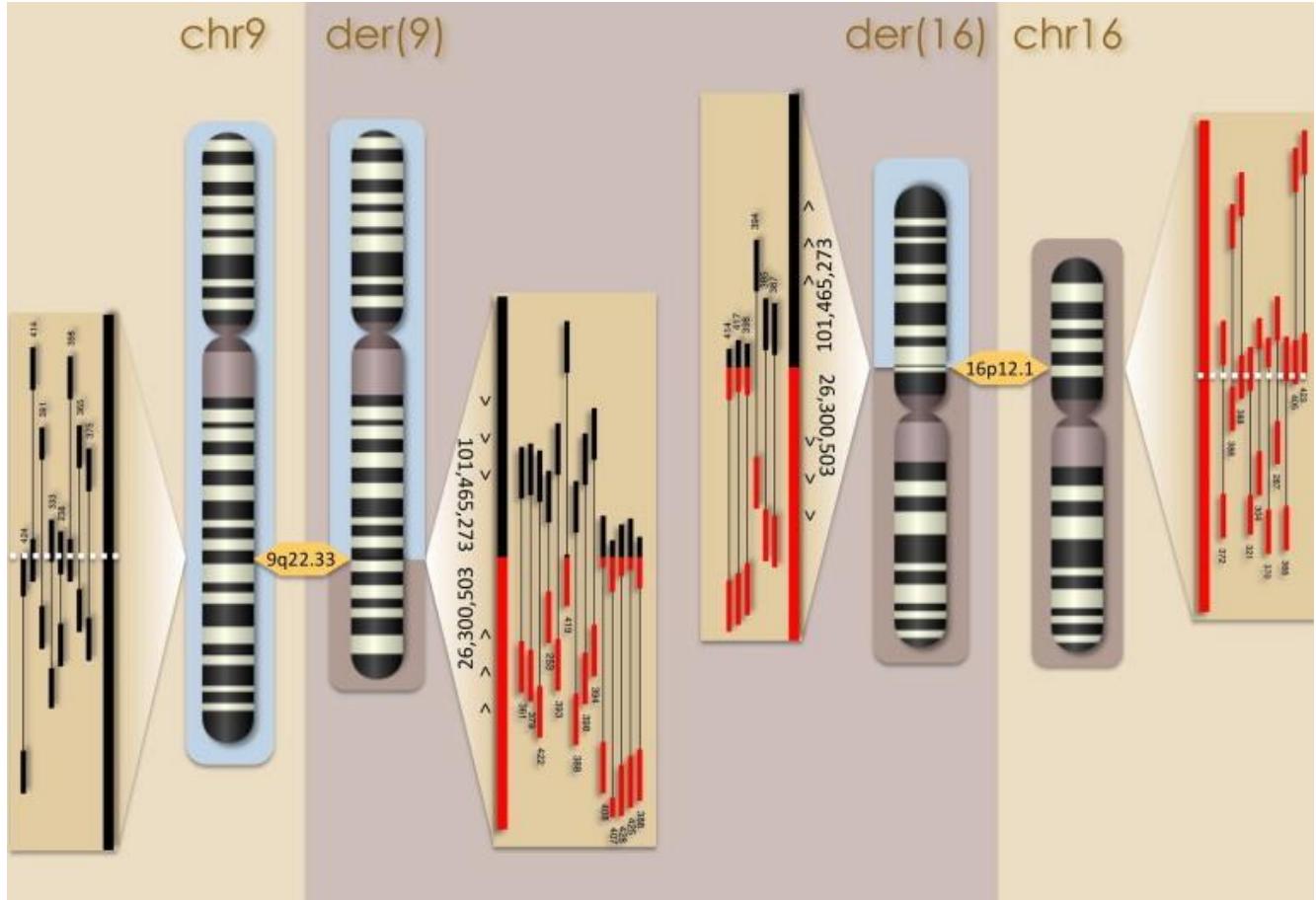
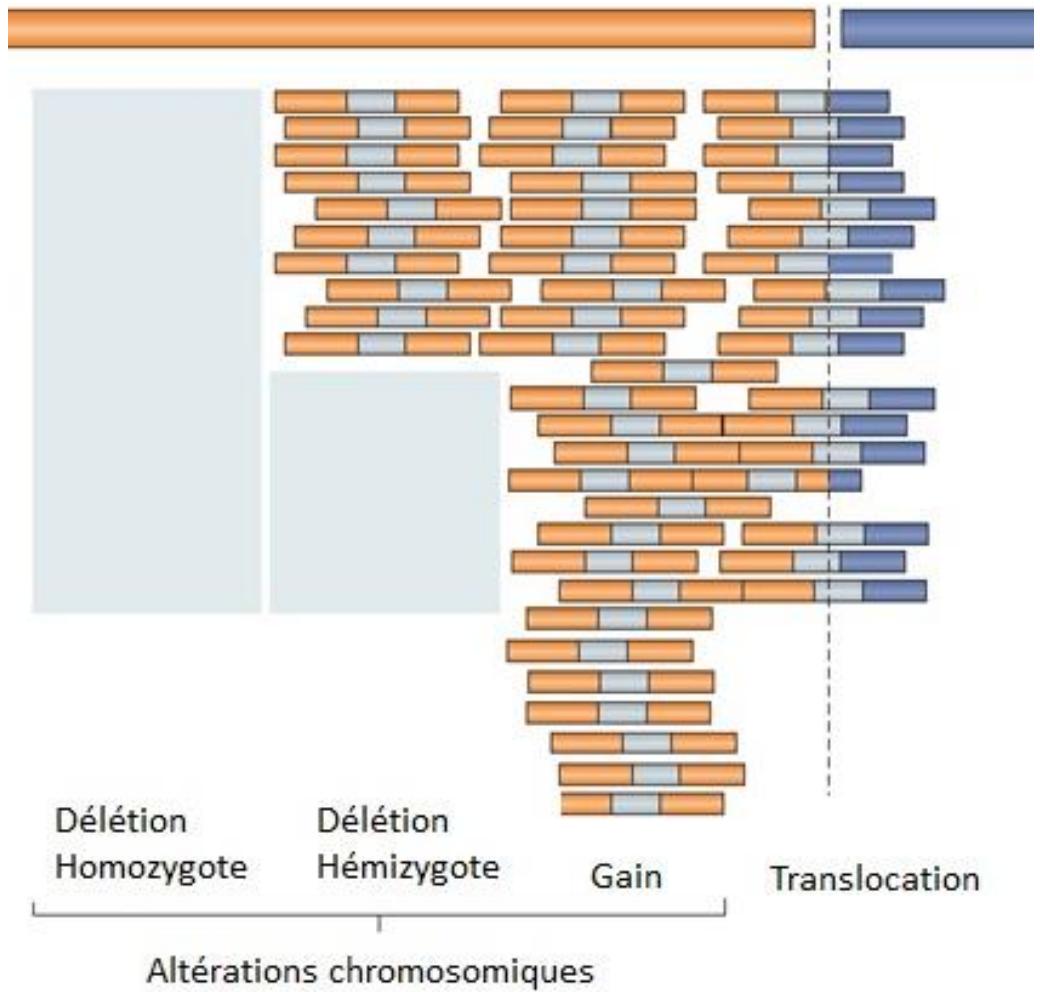
Séquencage: *Paired-end*



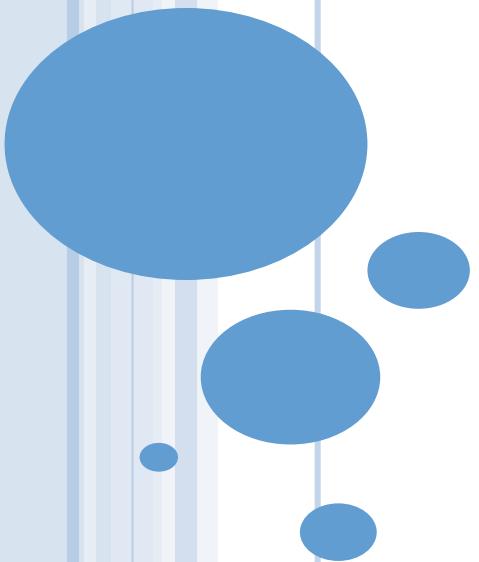
Analyse



Analyse

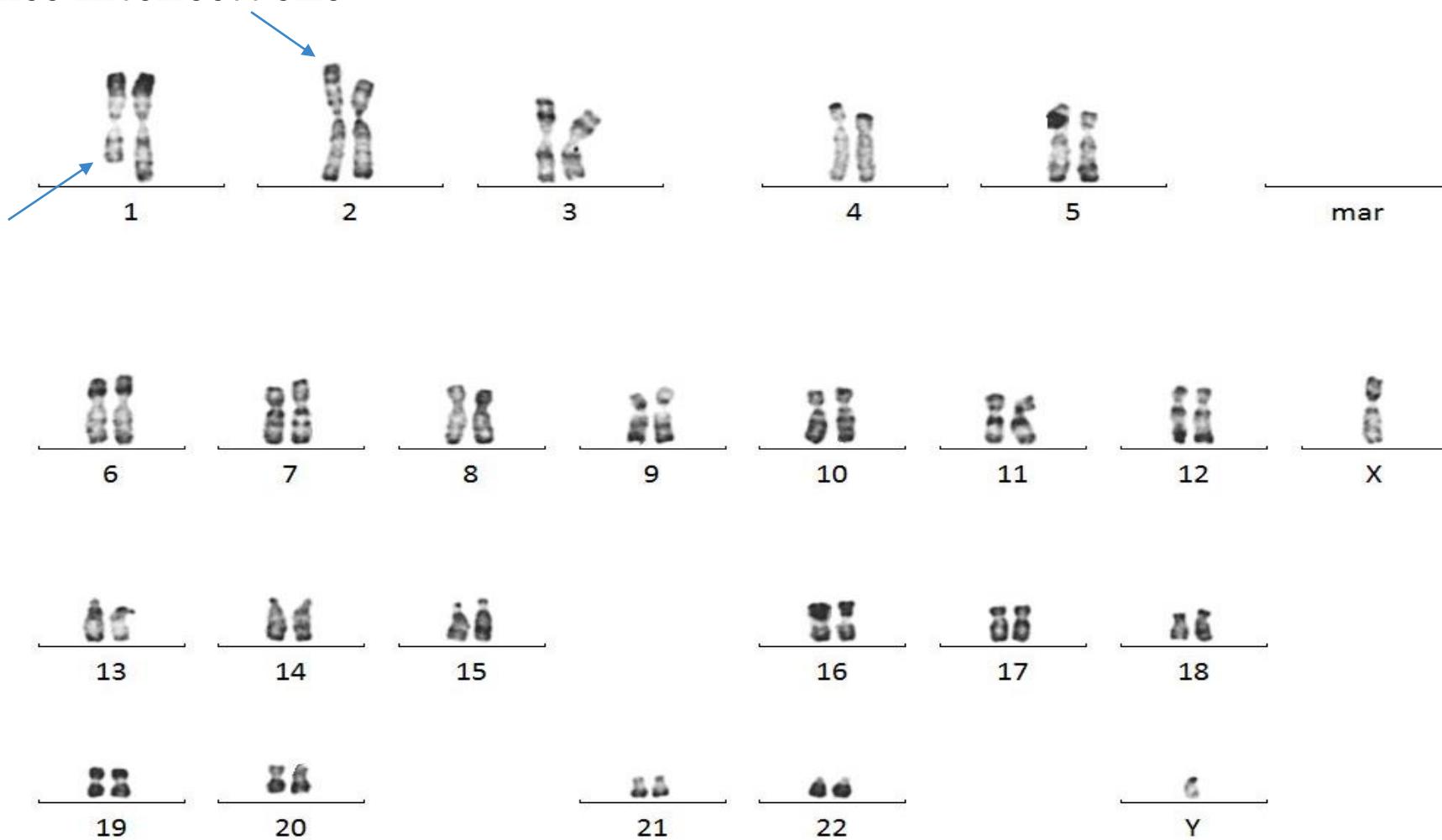


Etude de cas



Cas n°1

- Visage triangulaire, petit front, oreilles larges et décollées
- Implantation particulière du pouce droit
- Déficience intellectuelle



Cas n°1

File	CN	Type	Chr	Min	Cyto	Cyto	Max	Marker	Size (kbp)	Genes	Interpretation	Microarray Nomenclature
23455	3	Gain	1	962953	p36.33	p36.33	1038576	50	75,623	AGRN, RNF223, C1orf159	Benign	arr[hg19] 1p36.33(962,953-1,038,576)x3
23455	1	Loss	2	50598357	p16.3	p16.3	51707702	2137	1109,345	NRXN1	Benign	arr[hg19] 2p16.3(50,598,357-51,707,702)x1
										CAPN13, GALNT14, CAPN14, EHD3, XDH, SRD5A2, MEMO1, DPY30, SPAST, SLC30A6, NLRC4, YIPF4, BIRC6, MIR558, TTC27, MIR4765, LINC00486, LOC100271832, LTBP1, RASGRP3, FAM98A, MYADML, LOC100288911, CRIM1, FEZ2, VIT, STRN, HEATR5B, CCDC75, EIF2AK2, SULT6B1, LOC100505876, CEBPZ, C2orf56, PRKD3, QPCT,	Pathogenic	
23455	1	Loss	2	30908598	p23.1	p22.2	37914388	6112	7005,79	CDC42EP3		arr[hg19] 2p23.1p22.2(30,908,598-37,914,388)x1
23455	3	Gain	3	1,73E+08	q26.31	q26.31	173300180	52	60,328	NLGN1	Benign	arr[hg19] 3q26.31(173,239,852-173,300,180)x3
23455	1	Loss	5	73071601	q13.2	q13.3	73638483	490	566,882	RGNEF	Benign 1 CONTROLE	arr[hg19] 5q13.2q13.3(73,071,601-73,638,483)x1
23455	1	Loss	6	257048	p25.3	p25.3	294911	87	37,863	DUSP22	Benign	arr[hg19] 6p25.3(257,048-294,911)x1
23455	1	Loss	7	1,42E+08	q34	q34	142493638	84	46,661	PRSS1, PRSS3P2, PRSS2	Benign	arr[hg19] 7q34(142,446,977-142,493,638)x1
23455	1	Loss	7	38319295	p14.1	p14.1	38387020	92	67,725	LOC100506776	Benign	arr[hg19] 7p14.1(38,319,295-38,387,020)x1
23455	1	Loss	8	39254032	p11.22	p11.22	39386952	68	132,92	ADAM5P, ADAM3A	Benign	arr[hg19] 8p11.22(39,254,032-39,386,952)x1
										GPRIN2, PPYR1, LOC643650, LOC728643, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25G, FAM25C, AGAP9, BMS1P6, BMS1P2, FAM35B2, ANTXRL, ANXA8L2, FAM21B,		
23455	3	Gain	10	46996853	q11.22	q11.22	48174779	224	1177,926	CTSL1P2	Benign	arr[hg19] 10q11.22(46,996,853-48,174,779)x3
23455	1	Loss	11	55402800	q11	q11	55447452	68	44,652	OR4P4, OR4S2, OR4C6	Benign	arr[hg19] 11q11(55,402,800-55,447,452)x1
23455	1	Loss	11	18949329	p15.1	p15.1	18978207	86	28,878	MRGPRX1	Benign	arr[hg19] 11p15.1(18,949,329-18,978,207)x1
										ELK2AP, KIAA0125,		
23455	3	Gain	14	1,06E+08	q32.33	q32.33	106728149	208	648,327	ADAM6	Benign	arr[hg19] 14q32.33(106,079,822-106,728,149)x3
23455	1	Loss	14	22457090	q11.2	q11.2	22966727	747	509,637		Benign	arr[hg19] 14q11.2(22,457,090-22,966,727)x1
										MACROD2, MACROD2-AS1		
23455	1	Loss	20	14761709	p12.1	p12.1	14912034	126	150,325		Benign	arr[hg19] 20p12.1(14,761,709-14,912,034)x1
										MIR650, IGLL5		
23455	3	Gain	22	23065697	q11.22	q11.22	23258369	92	192,672		Benign	arr[hg19] 22q11.22(23,065,697-23,258,369)x3
23455	1	Loss	X	1024439	p22.33	p22.33	1101193	56	76,754		Benign	arr[hg19] Xp22.33 or Yp11.32(1,024,439-1,101,193 or 974,439-1,051,193)x1
23455	0	Loss	X	7933898	p22.31	p22.31	8022117	156	88,219		Benign	arr[hg19] Xp22.31(7,933,898-8,022,117)x0
										TTTY3B, TTTY3		
23455	0	Loss	Y	25856115	q11.223	q11.223	26137793	52	281,678		Benign	arr[hg19] Yq11.223(25,856,115-26,137,793)x0
23455	0	Loss	Y	28398856	q11.23	q11.23	28423206	59	24,35		Benign	arr[hg19] Yq11.23(28,398,856-28,423,206)x0

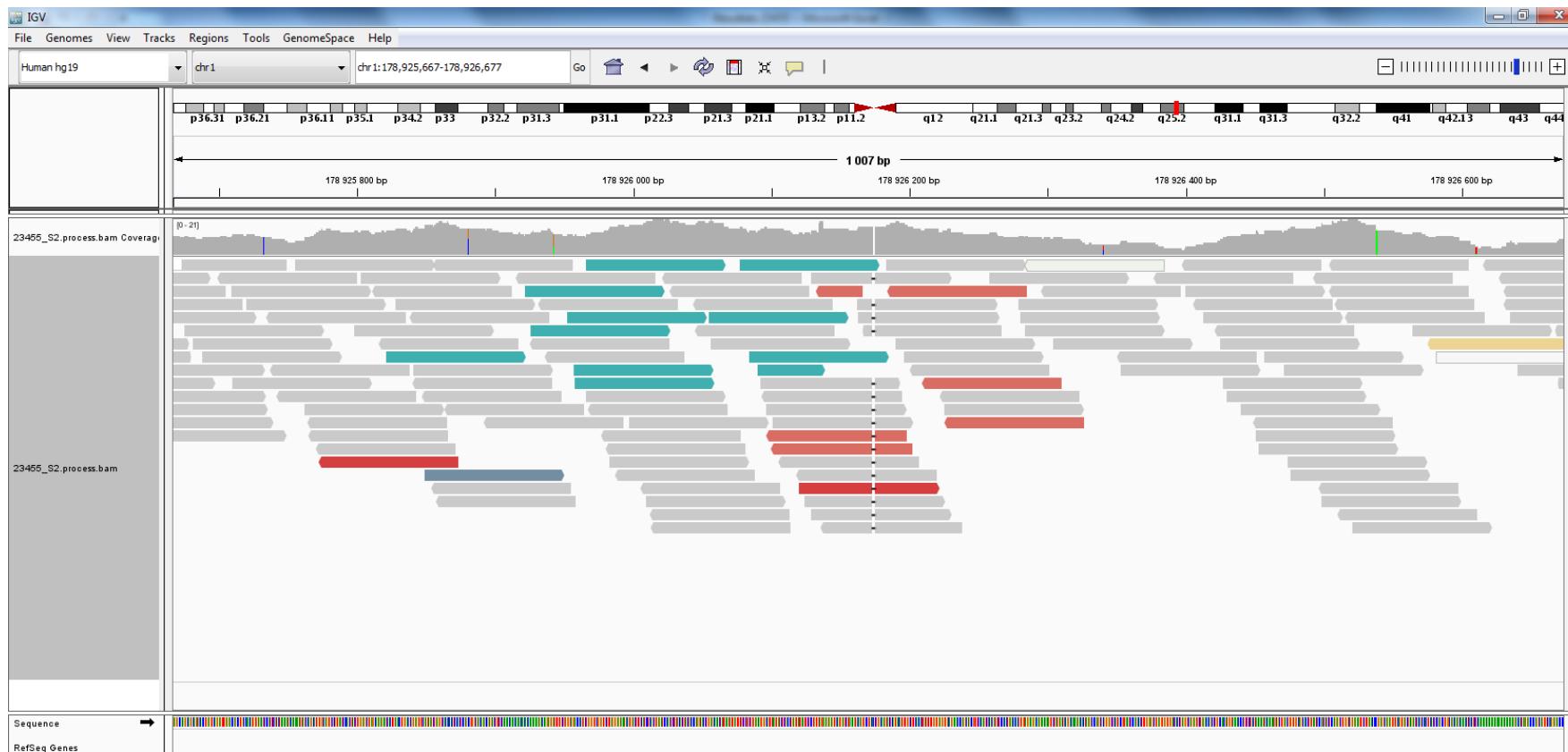
Cas n°1

chr1:178,764,804-178,764,842 en 1q25.2

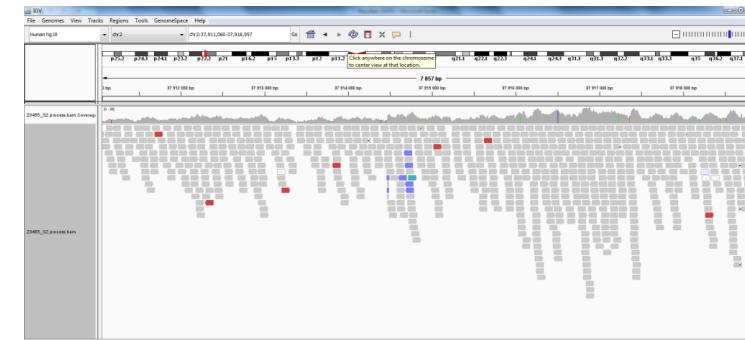
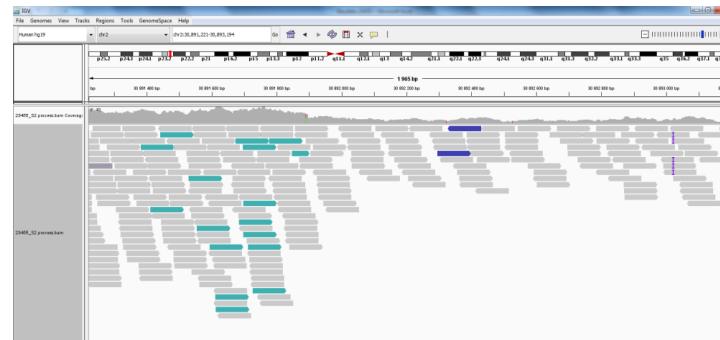


Cas n°1

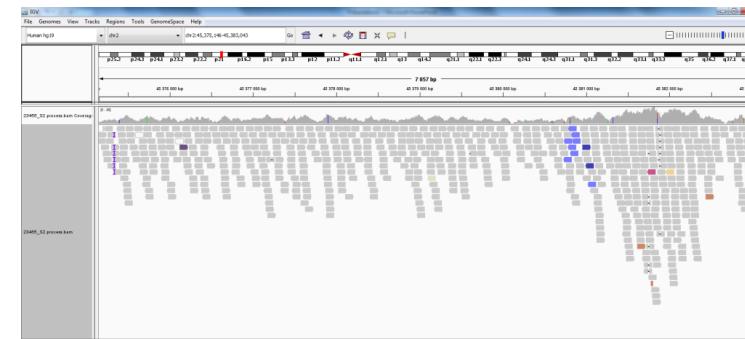
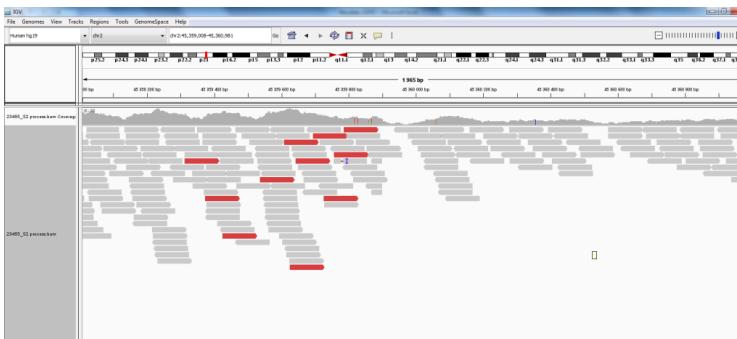
chr1: 178,926,138-178,926,212 en 1q25.2



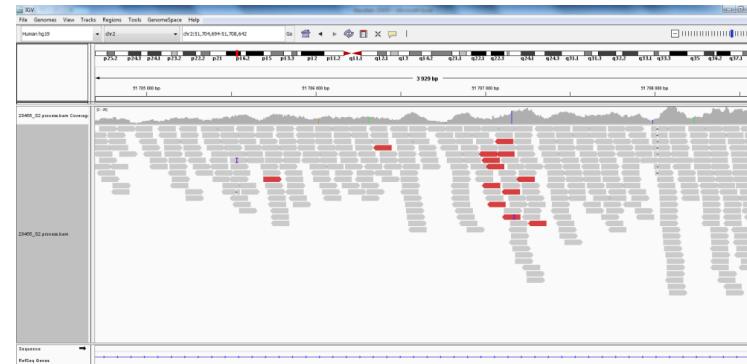
chr2: 30,891,877-37,914,615 en 2p22.1



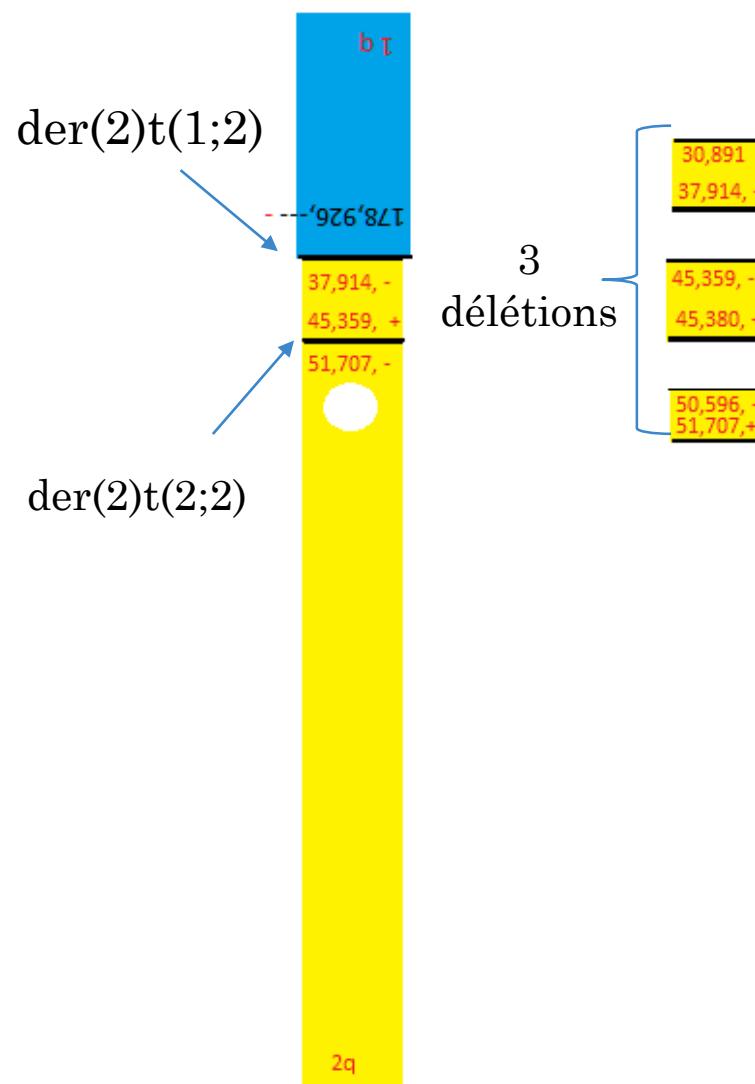
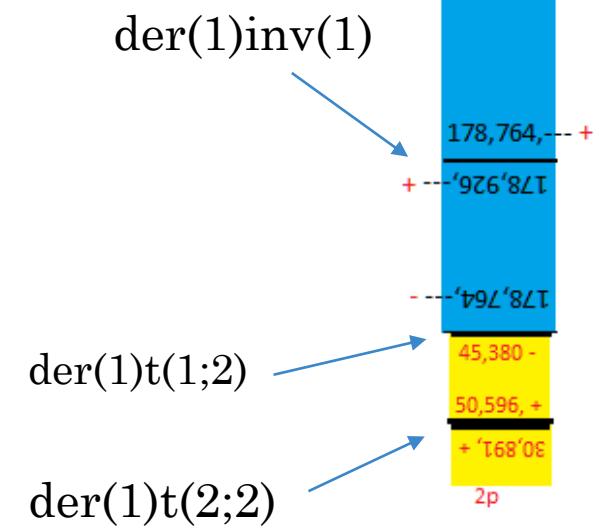
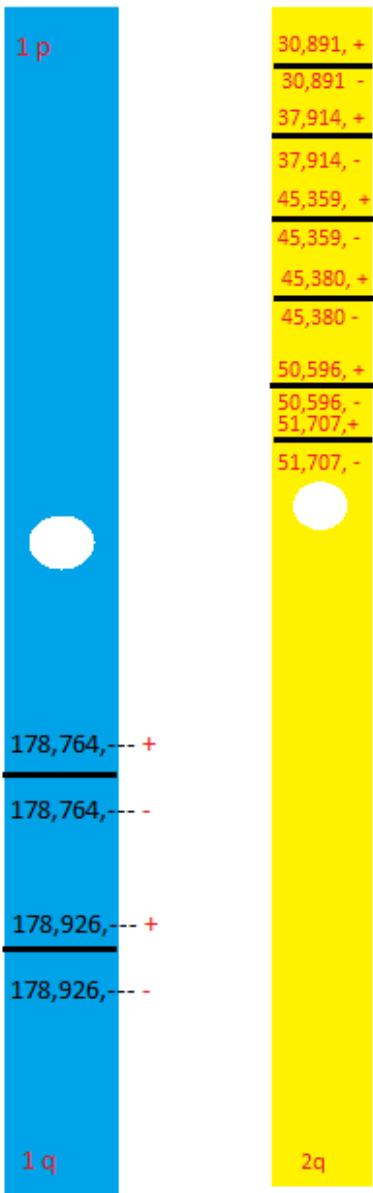
chr2: 45,359,886-45,380,781 en 2p22.1

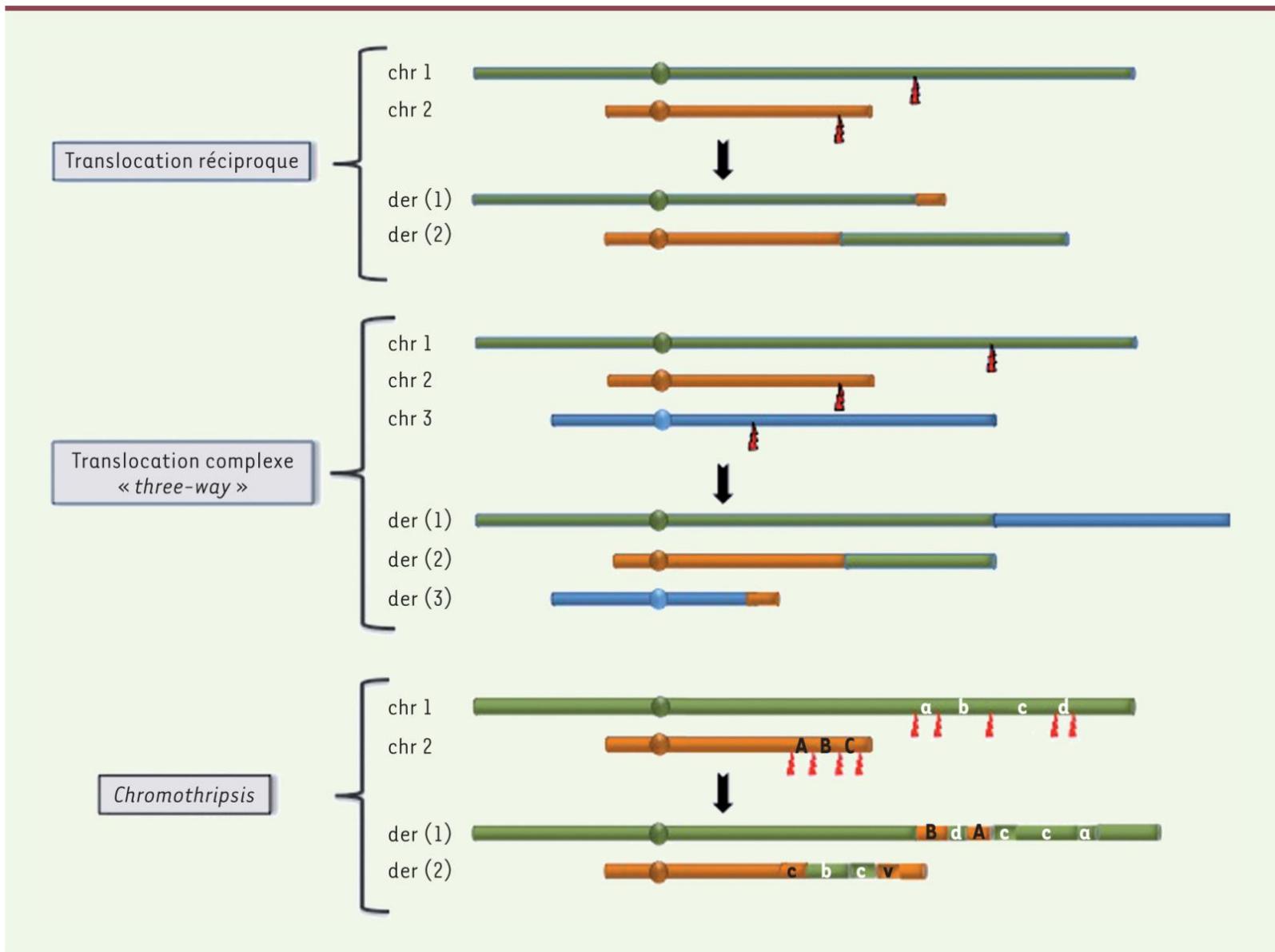


chr2: 50,596,290-51,707,042 en 2p16.3

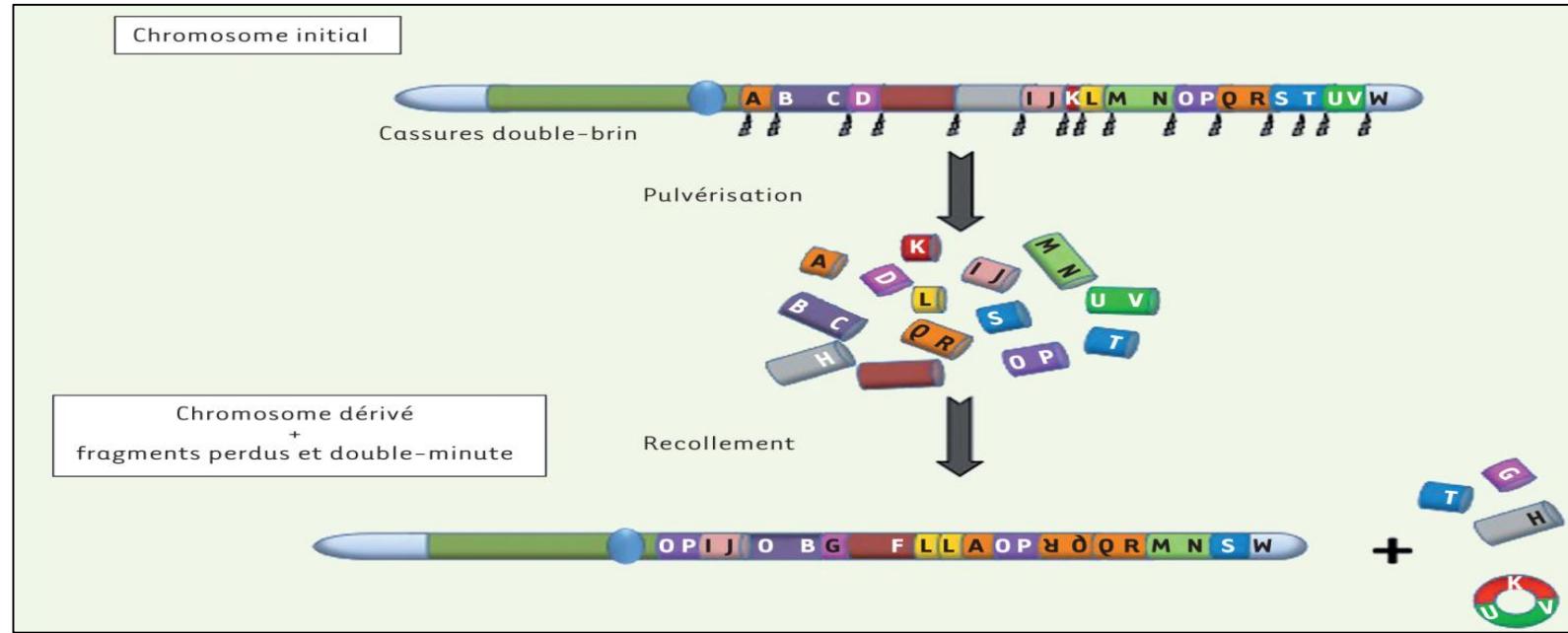


Cas n°1





chromothripsis (du grec *chromo* pour chromosome, et *thripsis* pour briser en éclat), se caractérise par la pulvérisation d'un (ou de quelques) segment(s) chromosomique(s) et le réassemblage aléatoire des fragments chromosomiques générés.

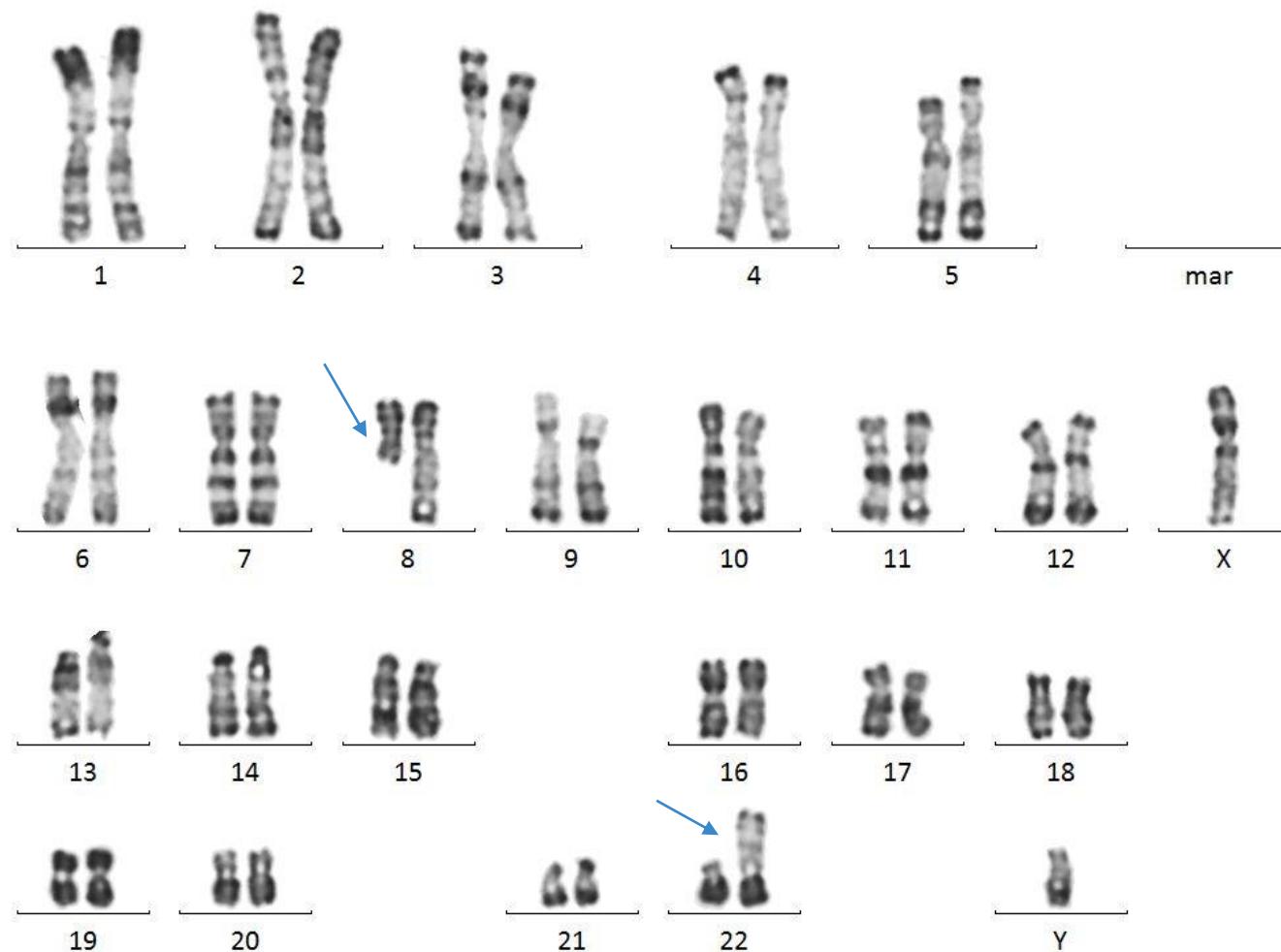


Le WGS nous a permis ainsi d'identifier un cas de chromothripsis. On avait longtemps cru qu'un mécanisme pareil n'existe qu'en somatique dans les cellules tumorales.

Cas n°2

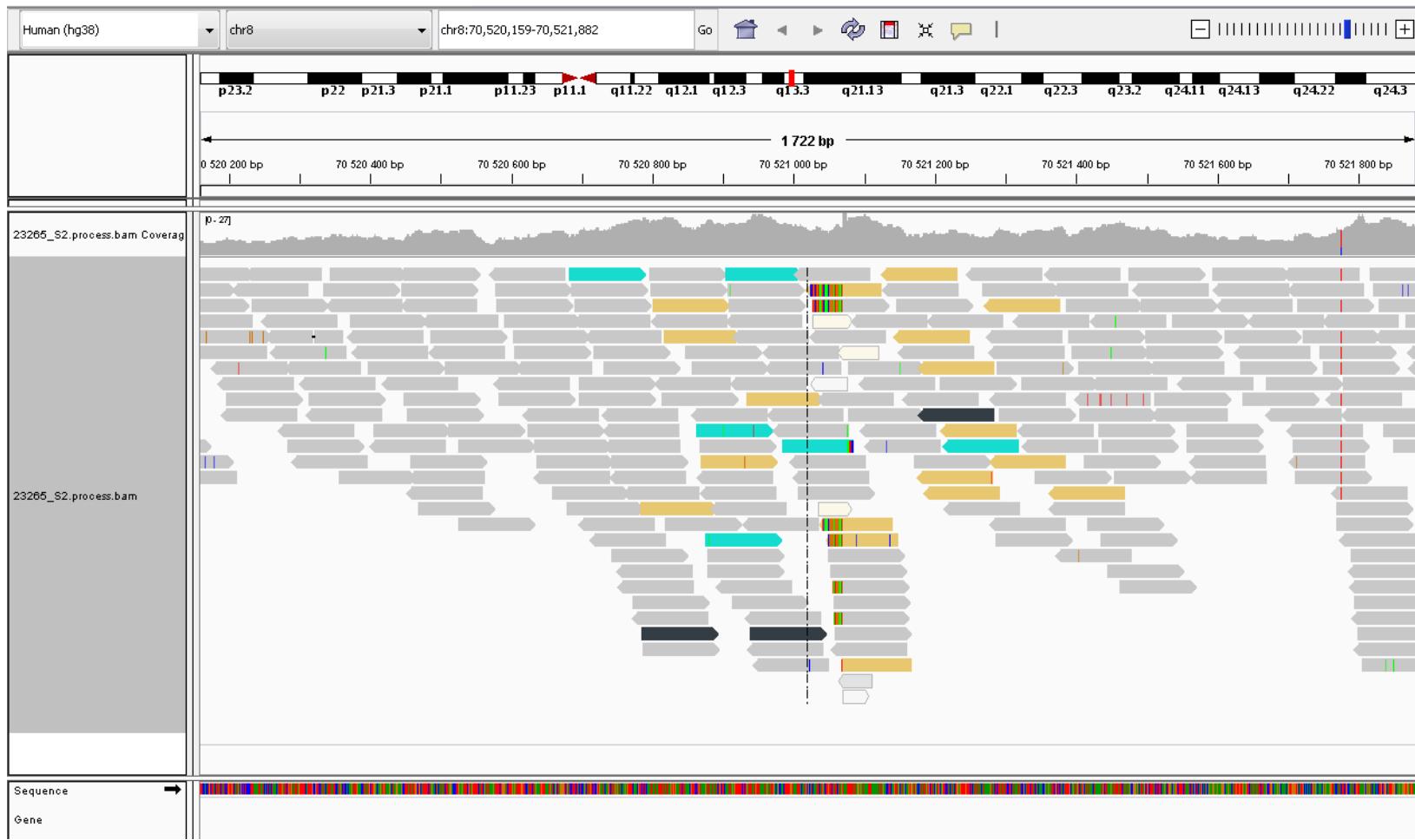
Signe clinique:
Azoospermie

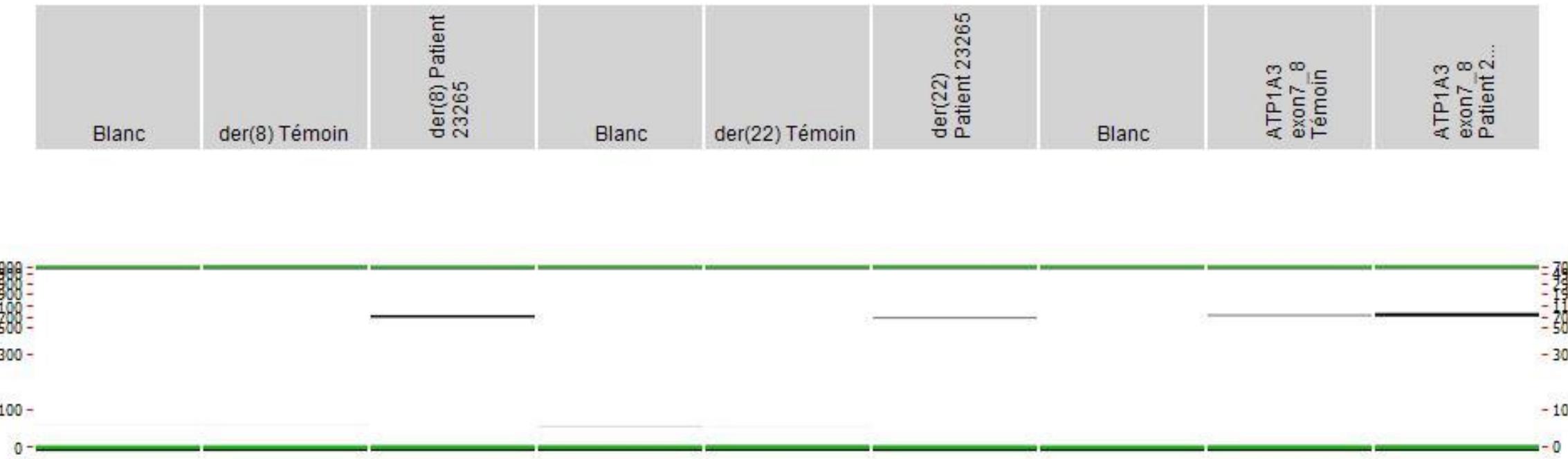
46,XY,t(8;22)(q1?1;p11)



CGH Normale

CHR8:70,520,159-70,521,882





der(8)t(8;22): chr8:70,520,169::chr22

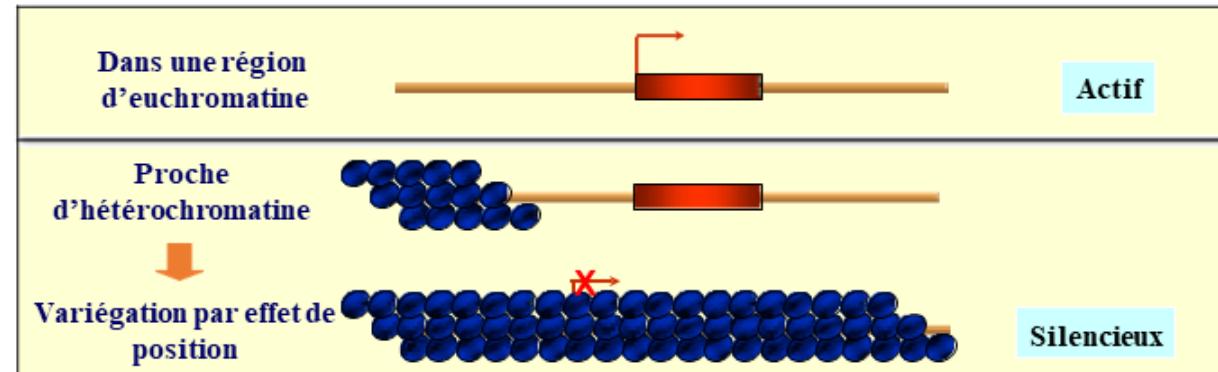
Chr8	GGAATTCTAGCTAT <u>CCCAGGGT</u> GATGAGAACTGGATTCTTGATTGT
der (8)	GGAATTCTAGCTAT <u>CCCAGGGT</u> GAT <u>CAGGCCAA</u> AGCACTAGAGGTAAAA
Chr22	CTGGTGACAGCATGACAGAA <u>TACACAGGCCAA</u> AGCACTAGAGGTAAAA

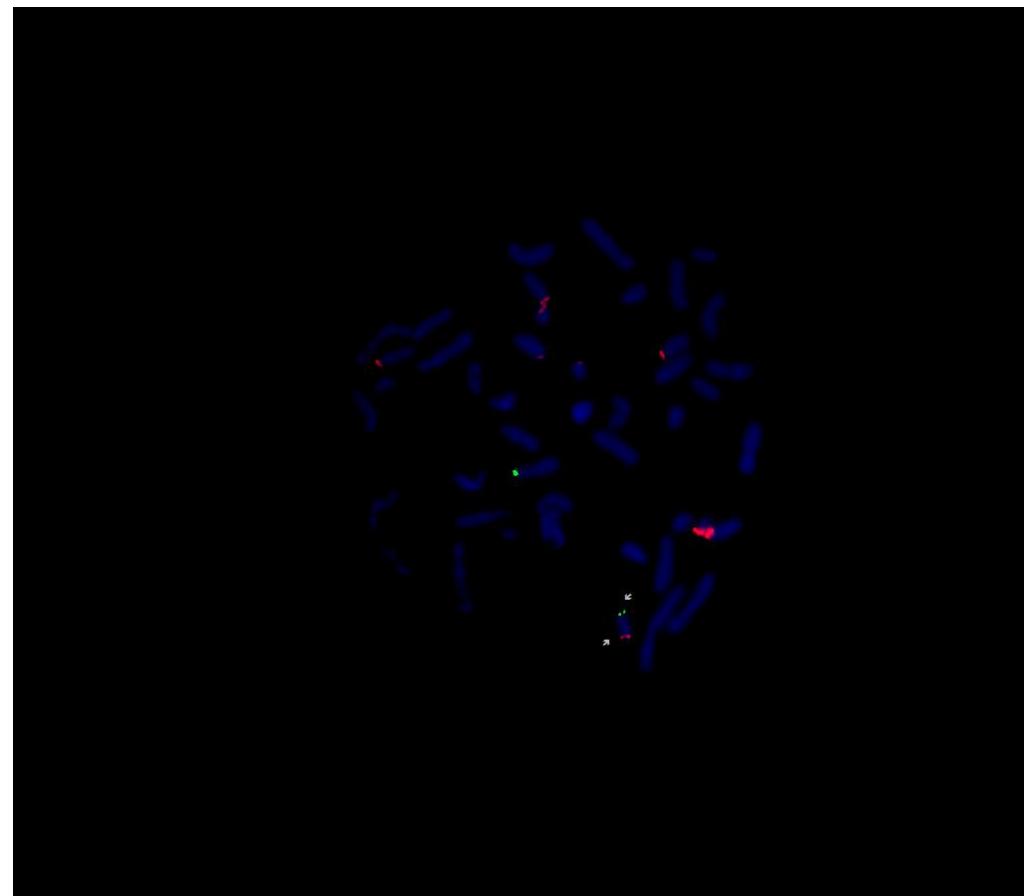
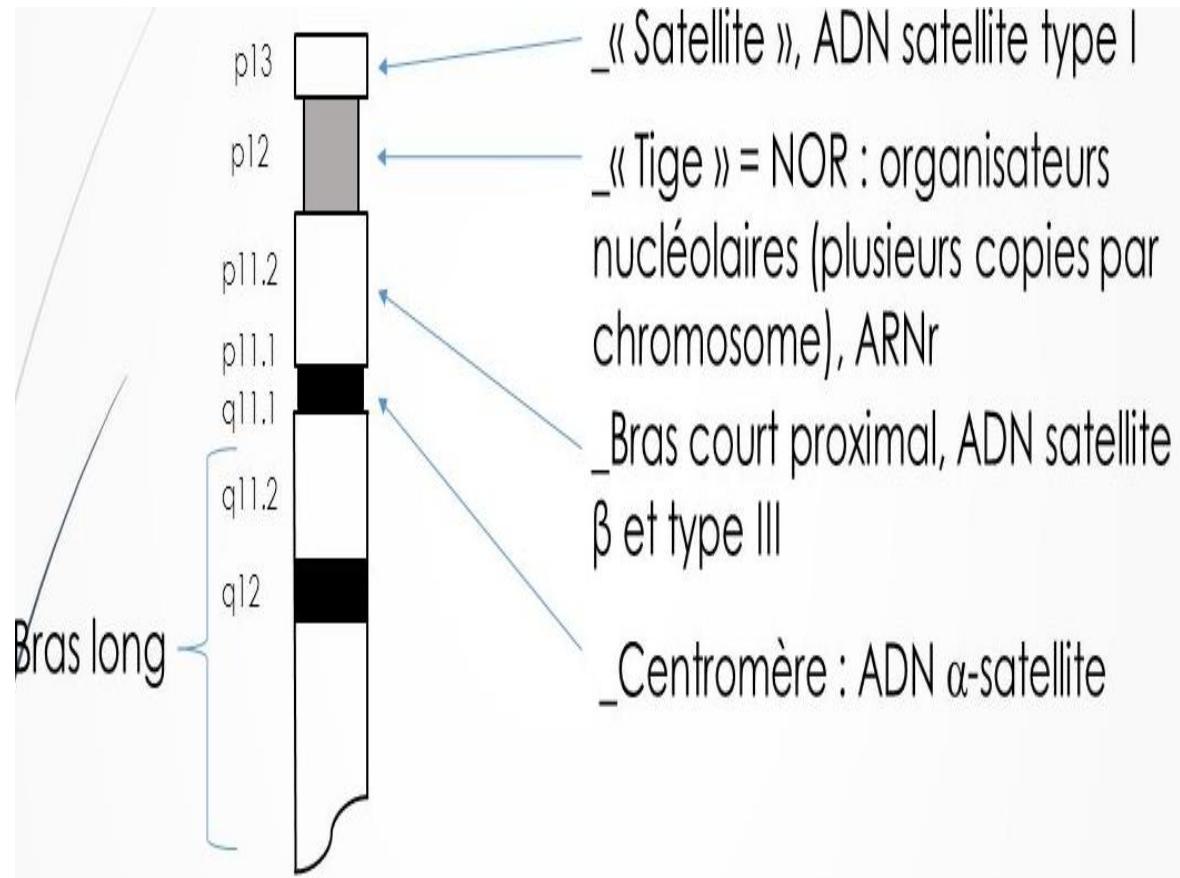
EFFET DE POSITION

Modification de l'expression d'un gène du fait de la modification de son environnement chromatinien

2 cas se présentent:

- Le gène a perdu son promoteur, site d'initiation de la transcription
- L'hétérochromatine a un effet suppresseur de l'expression du gène





La région transloquée du chromosome 8 sur le dérivé du chromosome 22 est très proche de l'hétérochromatine qui va inhiber l'expression du gène en question

CONCLUSIONS

- Ce projet nous a permis pour l'instant de confirmer que le WGS est le seul moyen efficace pour détecter le chromothripsis, un mécanisme cellulaire qui peut être responsable de nombreux désordres congénitaux.
- Le WGS nous a permis d'identifier un nouveau gène impliqué dans l'infertilité. Ceci présente un intérêt majeur sur le plan fondamental et clinique en terme de diagnostic moléculaire et conseil génétique.

Remerciements

Direction

Pr Roland Tomb
RP Pr Michel Scheuer
Pr Roger Lteif
Dr Carine Chammas, MD
Dr Eliane Chouery, PhD
Dr Hampig Kourié, MD
Dr Nadine Jalkh, PhD
Dr Cybel Mehawej, PhD
Dr Carole Keserwani, MD

Administration

Mme Mireille Kassis Harb
Mlle Salwa Lahoud

Dépistage Néonatal

M. Issam Khneisser
Mme Maya Azzi
Mlle Manale Mezher

Cytogénétique Constitutionnelle

M. Tony Yammine
Mme Nagham El Ali
Mlle Rita Esber

Cytogénétique Hématologique

Mme Rima Ghostine
Mlle Wardé Semaan
M. Alain Chebly

Biologie Moléculaire

Mme Nabiha Salem
Mme Joelle Hobeika
Mlle Sandra Corbani
Mlle Rouba Ghosn

Génomique Fonctionnelle

Mme Joelle Hobeika
Bioinformatique
M. Elias Farah

Des personnes qui ont laissé leurs empreintes

RP Pr Jacques Loiselet
Pr André Mégarbané
Dr Valérie Delague
Mme Noelle Souraty
Mme Leila Samaras
Mme Lola Ghanem
Mme Rima Chédid
Mme Raymonde Jabra

