

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

République du Mali  
**Un Peuple-Un But-Une Foi**

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies  
de Bamako (USTTB)



**Faculté de Pharmacie**



Année universitaire :2022-2023

N°.....

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES DE MASTER

# Diagnostic Moléculaire de la Trisomie 21 au Mali : Cas de Dix Patients

OPTION : BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 12 / 07 /2023 devant la Faculté de Pharmacie

Par

**Mme ONGOIBA Christine**

**Président du jury** : Pr Amadou B. Niangaly

**Membres** : Pr. Souleymane Dama,

Pr. Antoine Dara,

Dr Dinkorma Ouologuem

**Directeur** : Pr. Djénéba Koumba Dabitaou

**Co-Directeur** : Pr. Oumar Samassekou

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à l'endroit de tous mes enseignants de l'école catholique sœur Geneviève de Gao, de l'école George Biard de Bandiagara, du lycée de Bandiagara, de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie et de la Faculté de Pharmacie.

❖ Au Professeur Djénéba Koumba Dabitaou :

Merci d'avoir accepté de diriger ce travail. Votre disponibilité, votre simplicité et votre amour pour la recherche nous ont permis de mener à bien ce travail.

❖ Au Professeur Oumar Samassékou :

Votre collaboration m'a été d'une aide très précieuse. Vous avez été un père, un guide et une idole pour moi. Ce travail est aussi le vôtre. Recevez mes remerciements les plus sincères.

❖ Au Professeur Guida Landouré :

Votre humanisme, votre disponibilité et votre dévouement nous laisse sans voix. Vous avez su nous montrer que l'humilité est l'une des valeurs sociales les plus importantes, soyez-en remercié.

❖ Au Docteur Mamadou Keita :

Merci de votre disponibilité et de vos conseils, vous êtes un encadreur exemplaire et dévoué pour la cause des étudiants. Recevez toute notre profonde gratitude

❖ A toute l'équipe du Département de la Neurologie :

❖ A toute l'équipe de la Pharmacie « Les Hirondelles » :

Votre hospitalité et votre sens du savoir vivre en équipe sont d'une qualité inestimable. Docteur Deidia Mahamane Kattrra . Vous avez été une mère, une institutrice et un exemple à suivre pour moi.

❖ A mes camarades de la promotion du Master :

Vous avez su faire de cette classe une famille, merci à vous.

❖ A toute la famille Dara

❖ A toute la famille Traoré

## **HOMMAGES AUX DIRECTEURS DE MEMOIRE**

### **A notre Maitre**

#### **Professeur Djénéba Koumba Dabita**

Maitre de Conférences à la Faculté de Pharmacie ;

Spécialiste en Biologie Moléculaire et en Immunologie ;

Cheffe du Laboratoire ImmunoCore du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTTB.

Cher Maître, en plus du bon accueil que vous nous avez réservé, malgré vos multiples occupations vous avez su être disponible même à des heures tardives pour nous. Vous avez su nous orienter avec sagesse et éveiller notre intérêt pour le sujet. Votre rigueur, votre compétence, votre souci constant de transmettre le savoir faire et surtout votre honnêteté intellectuelle font de vous un être exceptionnel

### **A notre Maître**

#### **Professeur Oumar Samassekou**

Spécialiste en génétique médicale et pathologie moléculaire

Maitre de conférences en génétique et génomique à la F.M.O.S

Membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine

Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine

Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa)

Cher maître

Votre ardeur au travail, votre dévouement, l'amour du travail bien fait, le souci constant et permanent de la formation et votre compétence nous ont marqués et forcé notre admiration. Vous nous avez appris le travail en équipe et le savoir-vivre social, votre simplicité et votre générosité sont à salués.

Veillez recevoir ici notre profond respect et notre immense gratitude.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>2. OBJECTIFS</b> .....	2
<b>2.1. Objectif Général</b> .....	2
<b>2.2. Objectifs spécifiques :</b> .....	2
<b>3. GENERALITÉS</b> .....	3
<b>3.1. Définition :</b> .....	3
<b>3.2. Épidémiologie</b> .....	3
<b>3.3. Chromosome 21</b> .....	3
<b>3.4. Mécanisme et physiopathologie :</b> .....	3
3.4.1. Trisomie 21 libre .....	4
3.4.2. Trisomie mosaïque .....	5
3.4.3. Trisomie par translocation .....	6
<b>3.5. Diagnostic de la trisomie 21 :</b> .....	10
3.5.1. Diagnostic prénatal .....	10
3.5.2. Diagnostic clinique post-natal .....	10
3.5.3. Diagnostic cytogénétique et moléculaire .....	11
<b>3.6. Traitements</b> .....	12
<b>4. METHODOLOGIE</b> .....	13
<b>4.1. Cadre et lieu d'étude</b> .....	13
<b>4.2. Type et période d'étude</b> .....	13
<b>4.3. Population d'étude</b> .....	13
4.3.1. Critères inclusion .....	13
4.3.2. Critères de non-inclusion .....	13
<b>4.4. Collecte des données</b> .....	13
4.4.1. Données démographiques .....	13
4.4.2. Données génétiques .....	13
<b>5. RÉSULTATS</b> .....	17
<b>5.1. Les données sociodémographiques (Âge et sexe)</b> .....	17
<b>5.2. Données génétiques</b> .....	18
5.2.1. Réussite d'obtention des métaphases .....	18
5.2.2. Test de la sonde RUNX1 sur un échantillon normal .....	19
5.2.3. FISH sur métaphases .....	20
5.2.4. FISH sur noyaux interphasiques .....	23
5.2.5. Nomenclature cytogénétique des résultats FISH .....	25

<b>6. COMMENTAIRES ET DISCUSION .....</b>	<b>26</b>
<b>7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>29</b>
<b>7.1. Conclusion.....</b>	<b>29</b>
<b>7.2. Recommandations .....</b>	<b>29</b>
<b>8. REFERENCES .....</b>	<b>30</b>
<b>9. ANNEXES.....</b>	<b>32</b>

## **LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

**°C** : Degré Celsius

**µL** : Microlitre

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**CAV** : Canal atrioventriculaire

**CHU** : Centre hospitalier universitaire

**CIV** : Communication nterventriculaire

**DAPI** : 4', 6-diamidino-2-phénylindole

**FISH**: Fluorescence in situ hybridation

**h**: Heure

**KCL** : Chlorure de potassium

**ml** : Millilitre

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PDA** : Patent Ductus Arteriosus

**PHA** : Phytohémagglutinine

**Rob** : Robertosienne

**TBS** : Solution saline tamponnée au tris (Tris-Buffered Saline)

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Résumé des formes chromosomiques de trisomie 21 .....	8
<b>Tableau 2</b> : Répartition des patients selon l'âge et le sexe. ....	17
<b>Tableau 3</b> : Fréquence de réussite d'obtention des métaphases .....	18
<b>Tableau 4</b> : Analyse des métaphases après FISH.....	22
<b>Tableau 5</b> : Données relatives aux noyaux interphasiques .....	24
<b>Tableau 6</b> : Nomenclature cytogénétique des résultats FISH .....	25

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Schémas représentant des erreurs méiotiques conduisant à la trisomie 21 (16).....	4
<b>Figure 2</b> : Schéma illustratif d'une trisomie mosaïque.....	5
<b>Figure 3</b> Schéma illustratif des possibilités de fertilisation chez un individu porteur de la translocation rob(14;21). ....	7
<b>Figure 4</b> : Représentation des formes chromosomiques de trisomie 21.....	8
<b>Figure 5</b> : Position chromosomique de la sonde RUNX1 .....	15
<b>Figure 8</b> : Images de métaphase et noyaux de l'échantillon d'un sujet non trisomique 21 ....	19
<b>Figure 9</b> : Représentation de métaphases de trisomie libre.....	20
<b>Figure 10</b> : Représentation de métaphases de trisomie avec translocation .....	21
<b>Figure 11</b> : Représentations nucléaires après FISH de RUNX1 .....	23

## RESUMÉ

La trisomie 21 est due à une anomalie chromosomique de nombre avec la présence de trois copies de chromosomes 21 chez un individu causant un retard mental chez le malade.

Le caryotype et la technique Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) sont des tests de confirmation de cette pathologie. Malgré un taux élevé, il n'y a pas de test moléculaire de diagnostic au Mali. Par conséquent, il est impératif de pouvoir réaliser les tests de diagnostic au Mali pour assurer une meilleure prise en charge des patients. Notre étude était basée sur le diagnostic moléculaire de la trisomie 21 par le caryotype et la FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) en utilisant la sonde à locus spécifique du chromosome 21 RUNX1. Nous avons recruté 10 patients venant de l'association malienne des trisomiques 8 d'entre eux présentaient des cas de trisomie 21 libre et les 2 autres des cas de trisomie 21 par translocation. Par ailleurs nous n'avons pas rencontré des cas de trisomie mosaïque dans notre étude.

## SUMMARY

Trisomy 21 is due to a chromosomal abnormality of number with the presence of three copies of chromosome 21 in an individual causing mental retardation in the patient.

The Karyotype and the FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) technique are confirmatory tests for this pathology. Despite a high rate, there is no molecular diagnostic test for this pathology in Mali. Therefore, it is imperative to be able to carry out diagnostic tests in Mali to ensure better patient care. Our study was based on molecular diagnosis of trisomy 21 by karyotype and FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) using the chromosome 21-specific locus probe RUNX1. We recruited 10 patients from the Malian association of trisomics, 8 of them presented cases of free trisomy 21 and the other 2 cases of trisomy 21 by translocation. In addition, we did not encounter cases of trisomy mosaic in our study.

# 1.INTRODUCTION

La trisomie 21 ou syndrome de Down est une maladie génétique occupant le premier rang des étiologies du retard mental chez les enfants. Anciennement appelée mongolisme, elle est la première aberration chromosomique décrite chez l'homme. Elle se caractérise par la présence de trois copies du chromosome 21 chez un individu. Trois profils chromosomiques sont caractéristiques de la trisomie 21: la trisomie libre, la trisomie associée à une autre anomalie chromosomique telles que les translocations Robertsoniennes et la trisomie 21 en mosaïsme (1).

La fréquence de la trisomie est d'environ 1 cas pour 700 naissance vivantes, et les facteurs de risque reconnus sont principalement l'âge maternel et la présence d'aberration chromosomique équilibrée ou non chez l'un ou les deux parents (2,3). La trisomie 21 est associée à des dysmorphies et un retard psychomoteur. En outre, environ 40 à 50% des nouveau-nés présentent des malformations cardiaques, 5 à 10 % des enfants trisomiques ont des malformations gastro-intestinales et d'autres présentent des dysfonctionnements endocriniens comme l'hypothyroïdie congénitale primaire (4). Bien vrai qu'il n'y a pas actuellement de traitement curatif pour la trisomie 21, une prise en charge précoce et un accompagnement multidisciplinaire permet d'assurer l'autonomie des patients et leur insertion socio-économique et d'améliorer leur espérance de vie.

Une étude de thèse récente a été faite sur l'aspect clinique de la Trisomie 21 au Département de pédiatrie CHU-Gabriel Touré par Korotoumou A Traoré (2020). Par contre aucun aspect sur le diagnostic moléculaire n'a été souligné dans cette étude.

Au Mali, la prise en charge médicale et socio-éducative de la trisomie 21 est tardive à cause entre autres du manque de diagnostic génétique qui repose essentiellement sur des tests de cytogénétique et de génétique moléculaire. En plus de faire le diagnostic de la trisomie 21, ces tests permettent de préciser les formes chromosomiques dont la connaissance est essentielle dans la prise en charge des patients et l'accompagnement des parents. Vu l'indisponibilité de ces tests de diagnostic moléculaire au Mali nous avons jugé nécessaire de faire leur mise au point d'où l'objectif de notre étude.

## **2. OBJECTIFS**

### **2.1. Objectif Général**

L'objectif général de cette étude est de faire la mise au point des techniques de génétique pour diagnostiquer la trisomie 21 au Mali

### **2.2. Objectifs spécifiques :**

- Réaliser la culture cellulaire des lymphocytes
- Établir le protocole FISH sur métaphases et noyaux interphasiques pour diagnostiquer la trisomie 21
- Identifier le nombre de copies des chromosomes 21 chez dix patients
- Déterminer les formes chromosomiques de la trisomie 21 chez dix patients

## **3. GENERALITÉS**

### **3.1. Définition :**

Le syndrome de Down ou la trisomie 21 est une maladie génétique due à la présence de tout ou d'une partie d'un troisième chromosome 21. Le syndrome de Down a été décrit pour la première fois par John Langdon Down, en 1866, mais son association avec le chromosome 21 a été établie près de 100 ans plus tard par Jérôme Lejeune. La trisomie 21 est l'anomalie chromosomique constitutionnelle la plus fréquente chez l'homme (5,6).

### **3.2. Épidémiologie**

L'incidence de la trisomie 21 augmente avec l'âge maternel et varie selon les populations (1 sur 319 à 1 sur 1000 naissances vivantes avec une moyenne de 1 sur 700 naissance) (7). La fréquence des fœtus atteints du syndrome de Down est assez élevée au moment de la conception, mais 50 à 75 % de ces fœtus n'arrive pas à terme. Les autres trisomies autosomiques sont beaucoup plus fréquentes que la trisomie 21, mais la survie postnatale est très faible par rapport au syndrome de Down. Ce pourcentage élevé de survie des patients atteints de trisomie 21 serait dû à un petit nombre de gènes sur le chromosome 21, qui est le plus petit et le moins dense des autosomes (8).

### **3.3. Chromosome 21**

Chez l'homme, les cellules somatiques contiennent 46 chromosomes dont 44 autosomes. Les chromosomes 21 constituent la 21<sup>ème</sup> paire des autosomes et les plus petits des autosomes. Le chromosome 21, qui contient un peu moins de 2 % du génome, est l'un des autosomes acrocentriques (les autres sont les chromosomes 13, 14, 15, et 22). Il est constitué de 33,546,361 paire de base et contient environ 400 gènes (9,10).

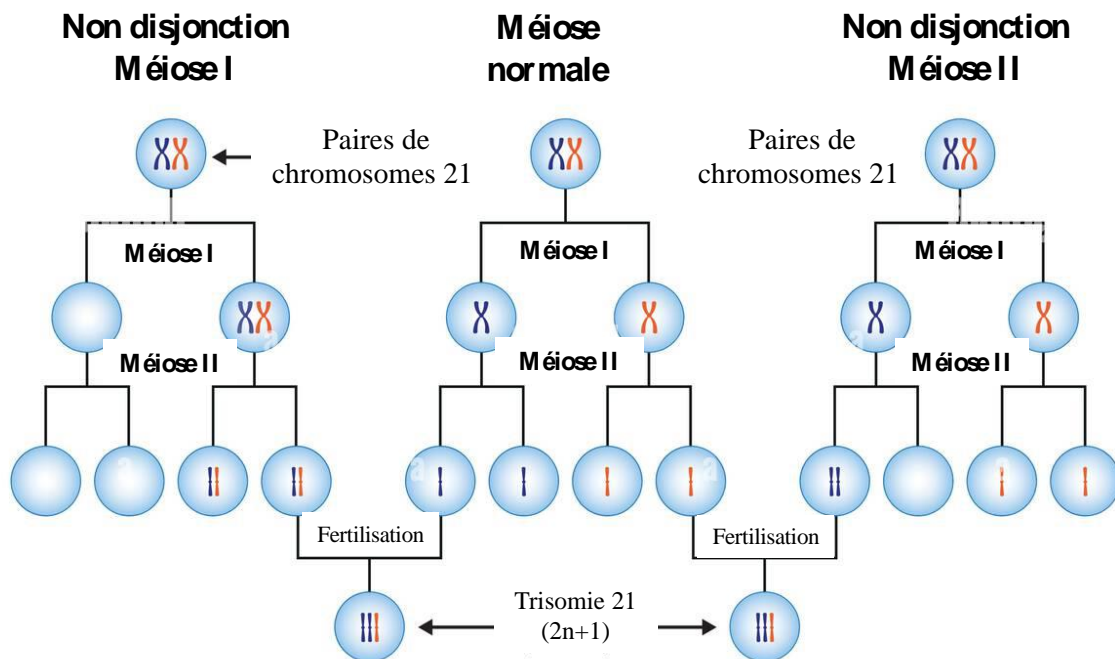
### **3.4. Mécanisme et physiopathologie :**

La plupart des individus (95 %) atteints de trisomie 21 ont trois copies libres du chromosome 21. Chez environ 3-4 % des patients, une copie est transloquée sur un autre chromosome acrocentrique, le plus souvent le chromosome 14 ou 21. Dans 1 à 2 % des cas de trisomie 21 libre, il existe un mosaïcisme caractérisé par la présence d'une lignée cellulaire trisomique et une normale (11,12).

### 3.4.1. Trisomie 21 libre

La division cellulaire qui conduit à la formation des spermatozoïdes ou ovules est appelée la méiose qui comprend une division réductionnelle (méiose I) et une division équationnelle (méiose II). Les erreurs qui surviennent lors la méiose I ou II peuvent aboutir à la survenue d'une non-disjonction du chromosome 21, cela est dû à un défaut de séparation lors de l'anaphase I ou II des chromosomes homologues ou des deux chromatides sœurs (13). Ainsi, à la fin de la méiose, des spermatozoïdes ou ovules pourraient acquérir deux copies du chromosome 21 au lieu d'une. La fécondation de cet ovule ou spermatozoïde avec un gamète normal (ayant une seule copie du chromosome 21) peut conduire à la trisomie 21 (Figure 1). La trisomie 21 est alors dite libre et homogène; libre, car il y a trois copies du chromosome 21 qui ne sont pas liés à un autre chromosome, donc le nombre de chromosomes est 47 ; homogène, car l'ensemble des cellules du zygote porte la trisomie (3).

La grande majorité des trisomies 21 est d'origine maternelle (93%), suivie de l'origine paternelle (5%) et d'erreur mitotique (2%). Les fréquences des erreurs méiotiques I (MI) et méiotiques II maternelles sont respectivement de 86% et 14%. La fréquence élevée des erreurs méiotiques est associée à l'âge maternelle d'où l'incidence élevée de la trisomie 21 chez les femmes de plus de 35 ans (14,15).

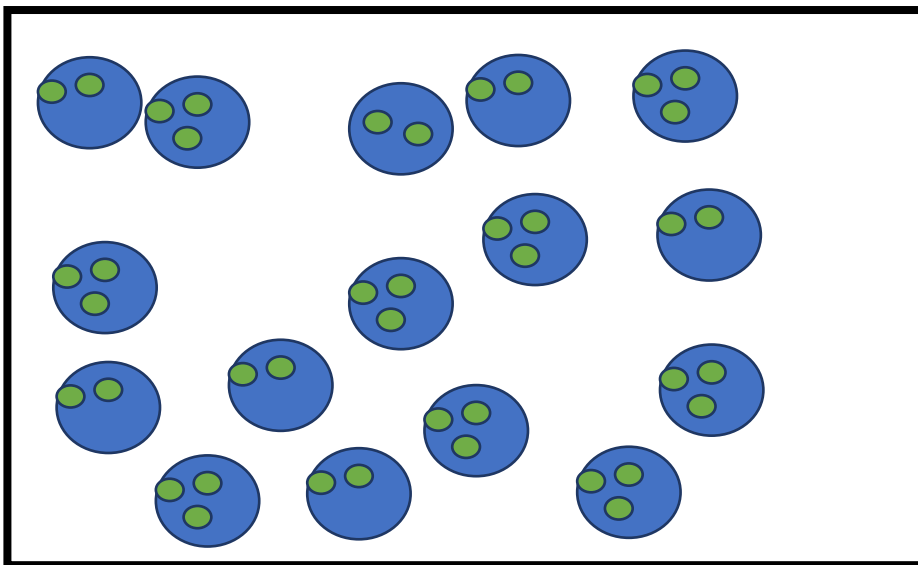


**Figure 1** : Schémas représentant des erreurs méiotiques conduisant à la trisomie 21 (16).

### 3.4.2. Trisomie mosaïque

Elle survient après la fécondation au cours d'une des différentes mitoses lors de l'embryogenèse. L'erreur est due à un défaut de migration d'un des chromosomes 21 lors de l'anaphase. Il s'agit d'une non-disjonction mitotique postzygotique. Ce phénomène conduit à la production d'une descendance de cellules porteuses de chromosomes 21 surnuméraires de cellules qui ne contiennent pas de chromosome 21 conduisant à une monosomie du chromosome 21. La monosomie 21 étant létale, la ou les cellules porteuses de cette monosomie seront éliminées par l'organisme. Ainsi deux lignées de cellules vont cohabiter dans l'organisme : une lignée normale avec 46 chromosomes (celle qui n'a pas subi l'erreur mitotique) et une lignée anormale avec 47 chromosomes dont un chromosome 21 surnuméraire. Les manifestations cliniques de la trisomie en mosaïque dépendent des populations cellulaires touchées et de leur pourcentage. Certaines personnes atteintes du syndrome de Down en mosaïque présentent des signes cliniques très subtils et peuvent avoir une intelligence normale

(17).

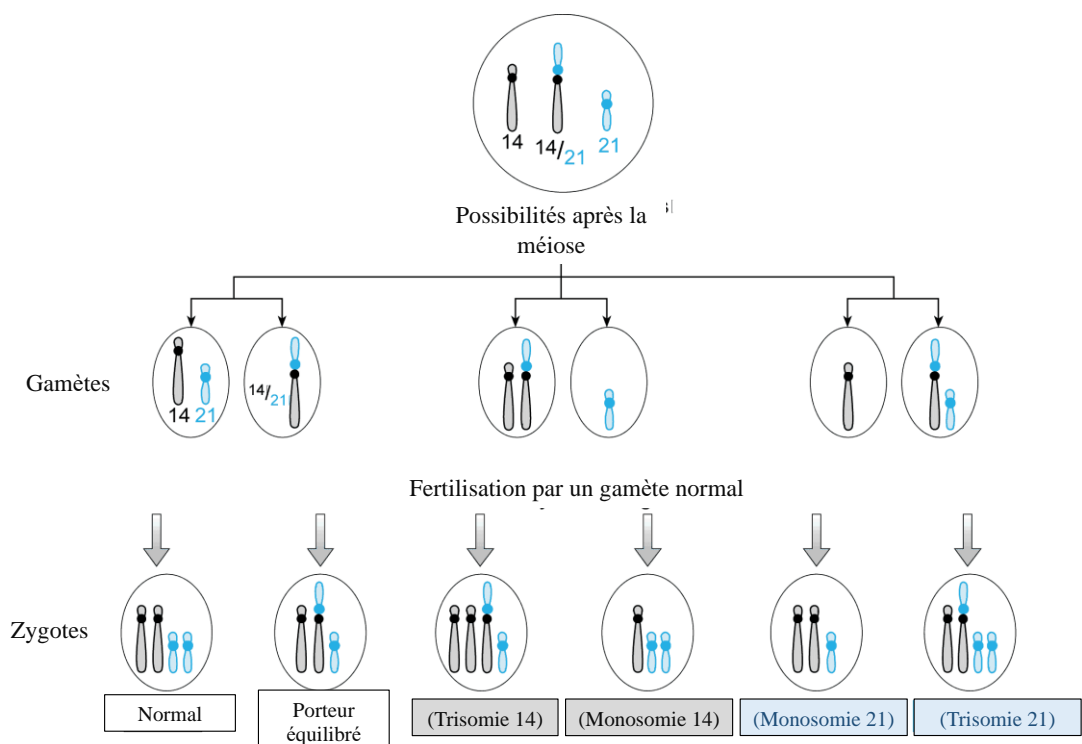


**Figure 2 :** Schéma illustratif d'une trisomie mosaïque

### 3.4.3. Trisomie par translocation

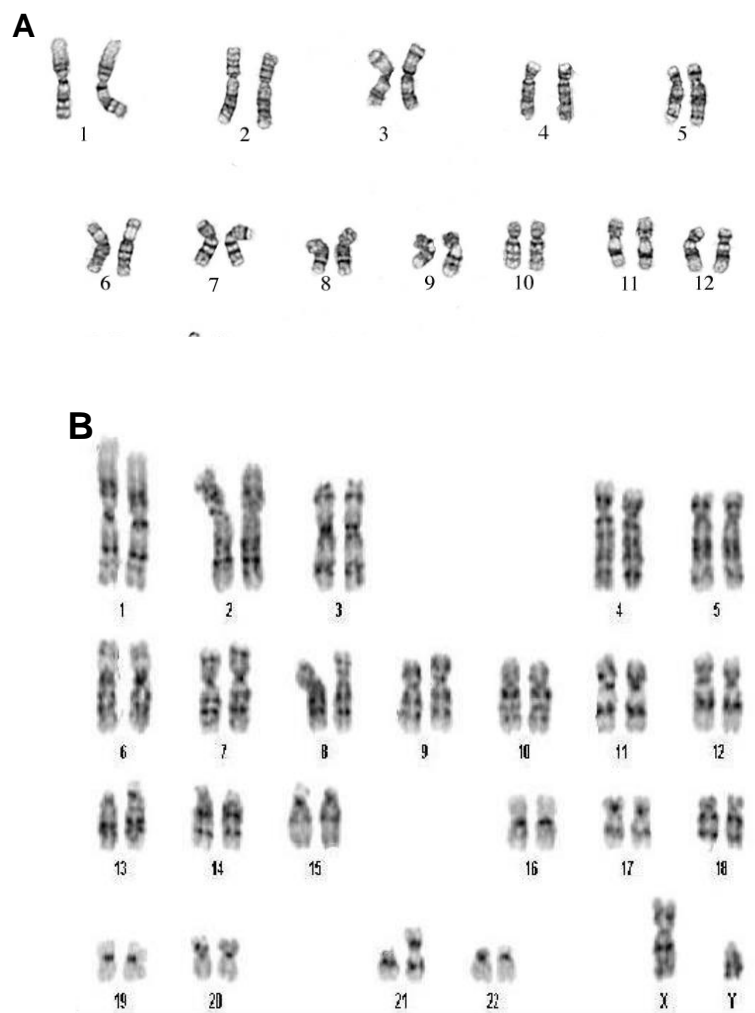
Environ 3-4 % des personnes atteintes du syndrome de Down ont un nombre normal de 46 chromosomes, mais un chromosome 21 supplémentaire qui est transloqué sur un autre chromosome. En général, c'est une translocation **robertsonienne** qui consiste à la fusion complète entre deux chromosomes acrocentriques. La translocation la plus courante est celle de rob (14;21) qui consiste à une fusion entre les bras longs des chromosomes 14 et 21. Chez environ la moitié des personnes présentant la translocation rob (14;21), les deux parents ont un caryotype normal, ce qui indique l'occurrence d'une translocation de novo au cours de la gamétogenèse chez l'un d'entre eux. Dans l'autre moitié, l'un des parents, bien que phénotypiquement normal, ne possède que 45 chromosomes avec la présence de la translocation rob (14;21). En théorie, le risque qu'une mère porteuse de cette translocation ait un enfant atteint du syndrome de Down est de 1/3 (Figure 2) (14,18).

La translocation rob (21;21) se produit lorsque les deux chromosome 21 fusent. Dans ce cas aussi, les sujets porteurs de cette translocation ont un phénotypiquement normal même s'ils ont 45 chromosomes avec deux copies du chromosome 21. Il est particulièrement important de déterminer si un des parents est porteur de la translocation. Si c'est le cas, chaque enfant du parent porteur de la translocation sera soit atteint du syndrome de Down soit d'une monosomie 21 (cette dernière n'est généralement pas compatible avec la vie) (14,18).



. **Figure 3** Schéma illustratif des possibilités de fertilisation chez un individu porteur de la translocation rob(14;21).

Étant donné que la trisomie 14, la monosomie 14 et la monosomie 21 ne sont pas viables, le risque d'avoir un enfant phénotypiquement normal est de  $2/3$  et celui d'un enfant trisomique est de  $1/3$  (19)



**Figure 4 :** Représentation des formes chromosomiques de trisomie 21

L'image A représente le caryotype d'un individu ayant une trisomie 21 libre. L'image B représente le caryotype d'un individu avec une trisomie 21 associée à une translocation Robertsonienne rob(21;21). Les images ont été tirées de la référence (20)

**Tableau 1 :** Résumé des formes chromosomiques de trisomie 21

	<b>TRISOMIE 21 LIBRE</b>	<b>TRISOMIE 21 MOSAÏQUE</b>	<b>TRISOMIE 21 PAR TRANSLOCATION</b>
<b>FREQUENCE</b>	92 % des cas	3 % des cas (rare)	4.8 % des cas (rare)
<b>CARYOTYPE</b>	47XX, + 21 ou 47, XY, + 21 La trisomie 21 a été observée dans toutes les cellules examinées (homogène)	Cellules à 47 chromosomes 47XX, + 21 ou 47, XY, + 21 et cellules à 46 Chromosomes 46,XX ou 46, XY	caryotype :2 chromosomes 21 libres, le troisième étant transloqué à un autre chromosome. la translocation 14,21(60 %): 46,XX,der(14;21),+21 ou 46,XY,der(14;21),+21



### **3.5. Diagnostic de la trisomie 21 :**

#### **3.5.1. Diagnostic prénatal**

Les méthodes utilisées pour détecter la trisomie 21 sont l'amniocentèse, la biopsie chorale et l'analyse de l'ADN fœtal. L'amniocentèse consiste à prélever 10 à 20 ml de liquide amniotique pour détecter des anomalies chromosomiques des cellules fœtales. Elle est pratiquée habituellement entre la 15<sup>ème</sup> et la 16<sup>ème</sup> semaine de grossesse. La biopsie chorale consiste à prélever un fragment de tissu (villosités chorioniques) provenant de l'œuf. Elle s'effectue dès la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Les prélèvements issus de ces procédures permettent de faire le caryotype ou la technique FISH pour établir le diagnostic de la trisomie 21. La PCR quantitative et le séquençage de nouvelle génération donnent aussi des indices très probants de diagnostic surtout lors du diagnostic prénatal dans les pays développés.(21).

Certains signes échographiques tels que l'épaississement de la nuque et certaines perturbations biochimiques peuvent orienter vers le diagnostic (22).

#### **3.5.2. Diagnostic clinique post-natal**

**À la naissance les signes cliniques sont dominés par :**

- Hypotonie très prononcée associée à un faciès typique
- Crâne : microcéphalie, brachycéphalie, occiput plat/excès de peau nuque face ronde, profil plat;
- Yeux : fentes palpébrales obliques en haut en dehors (mongoloïdes) ;
- Nez : ensellure du nez déprimée ;
- Oreilles : petites, rondes ;
- Bouche : Petite, ouverte et protrusion de la langue;
- Mains : pli palmaire unique transverse, brachymésophalangie, clinodactylie ;
- Pieds : espacement entre les deux premiers orteils (sandale gap) ;
- Malformation des organes internes : Cardiopathie (50%) dont 50% de CAV (canal atrioventriculaire) simples, la tétralogie de Fallot, CIV (communication interventriculaire), PDA (patent ductus arteriosus) -Atrésie duodénale (10%), une imperforation anale et Hirschsprung ;
- Neurologie : Hypotonie constante et persistante

Plusieurs pathologies peuvent être associées à la trisomie 21 et d'apparition progressive au cours de la vie adulte : cardiopathies, dysthyroïdies, troubles neurosensoriels, cancer du testicule, apnées du sommeil, maladie d'Alzheimer (22)

### **3.5.3. Diagnostic cytogénétique et moléculaire**

Le diagnostic repose sur le caryotype, la technique FISH, PCR (Polymérase Chain Reaction) quantitative et le séquençage. Le caryotype est la technique de référence car il permet de distinguer les formes chromosomiques. La FISH est complémentaire au caryotype surtout dans la recherche de mosaïsme

#### **3.5.3.1 Analyse des chromosomes (Caryotype)**

Le caryotype consiste à classer les chromosomes d'un organisme en fonction de leurs caractéristiques structurelles. On analyse le caryotype humain pour détecter des anomalies chromosomiques de nombre telles que la trisomie 21 et des changements structurels plus subtils, tels que des délétions, duplications, translocations ou inversions chromosomiques.

Pour effectuer le caryotype on utilise divers types de tissus tels que ceux à partir d'échantillons de sang périphérique, de biopsie de la peau, de liquide amniotique ou de villosités chorales. On commence par une culture cellulaire de courte durée. Après une période de croissance et de multiplication cellulaire, les cellules en division sont arrêtées en métaphase ou prométaphase du cycle cellulaire. À cette étape, les chromosomes prennent leurs conformations les plus condensées. Ensuite, les cellules sont traitées avec une solution hypotonique qui provoque la turgescence des noyaux et l'éclatement des cellules. Les chromosomes et les noyaux sont ensuite traités avec un fixateur chimique puis étalés sur une lame. Le traitement par diverses colorations telles que le Giemsa ou le DAPI permet de révéler des profils de bandes qui sont spécifiques à chaque chromosome. Après la prise des images de métaphases au microscope, des logiciels aident à la classification des chromosomes en fonction de leurs caractéristiques structurelles (23).

#### **3.5.3.2 Hybridation *in situ* en fluorescence**

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est une technique de cytogénétique moléculaire qui utilise des sondes fluorescentes, et celles-ci se lient aux séquences d'acide nucléique avec un degré élevé de complémentarité. La FISH est souvent utilisée pour détecter et localiser la présence ou l'absence d'une séquence d'ADN ou d'ARN dans des cellules

interphasiques ou sur des métaphases (24). Cela se traduit sur le plan cytogénétique par la détermination d'anomalies chromosomiques telles que des délétions, des duplications, des amplifications, des inversions, et des translocations etc. (25).

Le principe de la technique FISH est fondé sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. La séquence cible (ADN ou ARN) et une sonde (acide nucléique modifié ou non) ont un degré de complémentarité très élevé entre leurs brins. La sonde qui est couplée à un fluorochrome et la séquence cible sont rendues monocaténaïres par dénaturation et mises en contact dans des conditions permettant leur hybridation. Celle-ci a lieu grâce à la complémentarité entre les bases de la sonde et celles de la séquence cible. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminées par des lavages successifs. Enfin l'observation par un microscope à épifluorescence permet de visionner la séquence cible marquée par un fluorochrome dans des noyaux ou sur des métaphases (24).

### **3.6. Traitements**

À l'heure actuelle, aucun des traitements proposés pour pallier au déficit intellectuel des personnes trisomiques n'a démontré scientifiquement son efficacité. La prise en charge très tôt des affections cardiaques, infectieuses, hématologique et gastro-intestinale a permis de d'augmenter considérablement l'espérance de vie des trisomiques 21. Une rééducation adaptée psychomotrice a facilité leur insertion socio-économique (26).

## **4. METHODOLOGIE**

Le but de cette étude est de faire le diagnostic moléculaire de la trisomie 21 au Mali.

### **4.1. Cadre et lieu d'étude**

Cette étude s'est déroulée dans le laboratoire de neuroscience de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB). Le prélèvement des patients a été effectué au centre des trisomiques situé à Fadjguila, Bamako.

### **4.2. Type et période d'étude**

Il s'agissait d'une étude descriptive et prospective qui s'est déroulée de juin 2022 à décembre 2022.

### **4.3. Population d'étude**

#### **4.3.1. Critères inclusion**

Nous avons inclus dans cette étude dix individus présentant un phénotype clinique évocateur de la trisomie 21. Ils étaient des volontaires référés par l'Association Malienne de la Trisomie 21. Un autre critère d'inclusion était le consentement des parents ou de leurs tuteurs légaux. Les dix patients ont été choisis par l'Association Malienne de Trisomie 21 selon leur registre d'adhésion.

#### **4.3.2. Critères de non-inclusion**

Étaient exclus de l'étude, toute personne ne présentant pas les signes cliniques évocateurs de la trisomie 21 ou le non-consentement d'un des parents ou du tuteur légal.

### **4.4. Collecte des données**

#### **4.4.1. Données démographiques**

Nous avons collecté les données démographiques (âge, sexe, résidence) de chaque patient. Une base de données Excel MS nous a permis de recueillir ces données.

#### **4.4.2. Données génétiques**

Après avoir recueilli chez chaque patient 4 ml de sang périphérique veineux dans un tube Vacutainer à bouchon vert (contenant de l'héparine sodique) à 20-25°C, nous avons fait la culture cellulaire, la récolte des chromosomes et leurs étalements, la FISH et l'analyse microscopique.

#### **4.4.2.1. Culture cellulaire**

Le principe de la culture cellulaire est d'induire une division cellulaire afin de multiplier les cellules pour ensuite obtenir les chromosomes à la métaphase dans un environnement artificiel hors de leur milieu naturel. Dans cette étude, nous avons fait la culture cellulaire des lymphocytes en mettant 500-750 µl sang périphérique dans 10 ml milieu de culture, enrichi d'oligoéléments et d'acides aminés et contenant la phytohémagglutinine (PHA) qui stimule les lymphocytes T. Le milieu de culture et l'échantillon sont maintenus à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 heures (Voir annexe 1 pour plus de détails).

#### **4.4.2.2. Récolte des chromosomes**

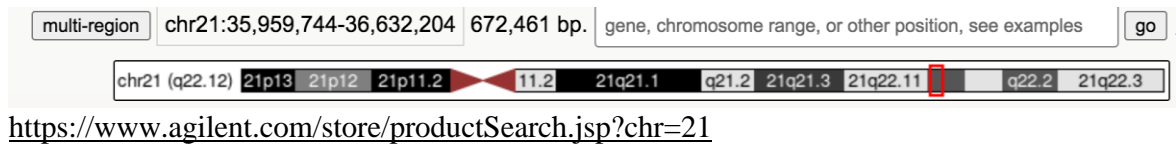
Après la culture cellulaire de 72 heures, nous avons fait la récolte des chromosomes en arrêtant la division des cellules à la métaphase par un agent anti-mitogène notamment la colchicine qui est un toxique des microtubules et inhibe ainsi la formation de fuseau mitotique. Ensuite, les cellules ont subi un choc hypotonique par le chlorure de potassium (KCl) qui provoque la turgescence cellulaire, indispensable à l'obtention d'un étalement adéquat des chromosomes. Enfin, nous avons fait la fixation des cellules et des chromosomes qui permet de mieux préserver la morphologie (structure) des chromosomes. Cette fixation se fait par un mélange d'acide acétique et de méthanol. (Voir annexe 2 pour plus de détails).

La récolte des chromosomes a été suivie de leur étalement sur une lame qui a été vieillie à 37°C pendant 24 heures avant de procéder à la technique FISH.

#### **4.4.2.3. FISH**

Nous avons effectué la FISH sur des noyaux interphasiques ou chromosomiques. Nous avons utilisé la sonde RUNX1 (Agilent, Canada) spécifique au locus *RUNX1* située sur le bras long du chromosome 21 (21q22.12) (figure 3). Cette sonde était couplée à un fluorochrome vert. Après dénaturation de la sonde et de l'ADN, l'hybridation a été effectuée à 37°C pendant de 24 heures. Ensuite, nous avons fait des lavages successifs et utilisé la contre coloration 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) qui colore les chromosomes en bleu et permet de distinguer des bandes chromosomiques (Voir annexe 3 pour plus de détails concernant le protocole).

**Figure 5: Position chromosomique de la sonde RUNX1**  
**SureFISH 21q22.12 RUNX1 DF 672kb, spectum green, Cytobands q22.12**



#### **4.4.2.4. Données Microscopiques**

Nous avons utilisé le système microscopique Zeiss Imager 2 (Zeiss, MA, USA) associé à une camera CoolCube 1m 1360 x 1024 pixels ; 6.45 µm x 6.45 µm 2/3" CCD, monochrome et le logiciel ISIS (MetaSystem, Germany).

Après la technique FISH, nous avons capturé les images nucléaires et de métaphases par l'objectif 100X sous huile d'immersion. Pour chaque patient, nous avons analysé 20 métaphases et 200 noyaux interphasiques. Dans une cellule ou une métaphase normale, nous avons obtenu deux signaux verts dans le noyau ou un signal vert sur chaque chromosome 21. Nous avons utilisé l'échantillon d'un sujet normal comme control de sonde RUNX1 qui doit être spécifique au chromosome 21. Dans la technique FISH, ce control est réalisé pour chaque nouveau lot de sonde. Pour cette étude, nous avons utilisé le même lot de sonde. En cas de trisomie 21, nous devons avoir trois signaux verts dans le noyau et un signal vert sur chacun des trois chromosomes 21. Le logiciel ISIS (MetaSystem, Germany) a permis de faire l'analyse des images. Le résultat est exprimé en termes de pourcentage, c'est-à-dire la proportion du nombre de cellules présentant trois copies de RUNX1 sur le nombre total de cellules examinées, autant pour les métaphases. Nous avons caractérisé les anomalies chromosomiques en utilisant « International System for Human Cytogenomic Nomenclature » (27).

#### **4.4.2.5. Considérations éthiques**

Étant donné que l'étude devrait recueillir des données génomiques des patients, il était nécessaire d'avoir le consentement des parents ou tuteurs légaux des patients avant la collecte des données. Par conséquent, chaque parent ou tuteur légal a bénéficié d'une explication de l'étude afin d'obtenir leur consentement libre et éclairé. Le but de cette explication était de s'assurer que chaque parent ou tuteur légal ait compris les détails concernant la participation à l'étude qui étaient : le caractère volontaire, la possibilité de se retirer à tout moment, le but, les critères de participations, les procédures, les risques liés à la participation à l'étude.

La confidentialité des données a été garantie. Le nom des patients ne figure dans aucun document relatif aux résultats de notre étude. Cette étude a été menée dans le cadre d'un protocole clinique sur les maladies génétiques approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie et de la Faculté de pharmacie (numéro 2020/129/CE/FMOS/FAPH)

## 5. RÉSULTATS

### 5.1. Les données sociodémographiques (Âge et sexe)

**Tableau II** : Répartition des patients selon l'âge et le sexe.

<b>Patients</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>
<b>Âge</b>	13	10	10	14	9	10	15	8	11	7mois
<b>Sexe</b>	M	M	M	F	M	M	F	F	M	F

Parmi les dix patients, six étaient de sexe masculin ce qui représente 60% de l'ensemble des patients. Le sexe ratio était 3/2 en faveur des hommes

L'âge médian des patients était 120 mois (10 ans) avec des extrêmes de 7 mois et 168 mois correspondant respectivement à 0,58 et 14 ans

## 5.2. Données génétiques

### 5.2.1. Réussite d'obtention des métaphases

**Tableau 3** : Fréquence de réussite d'obtention des métaphases

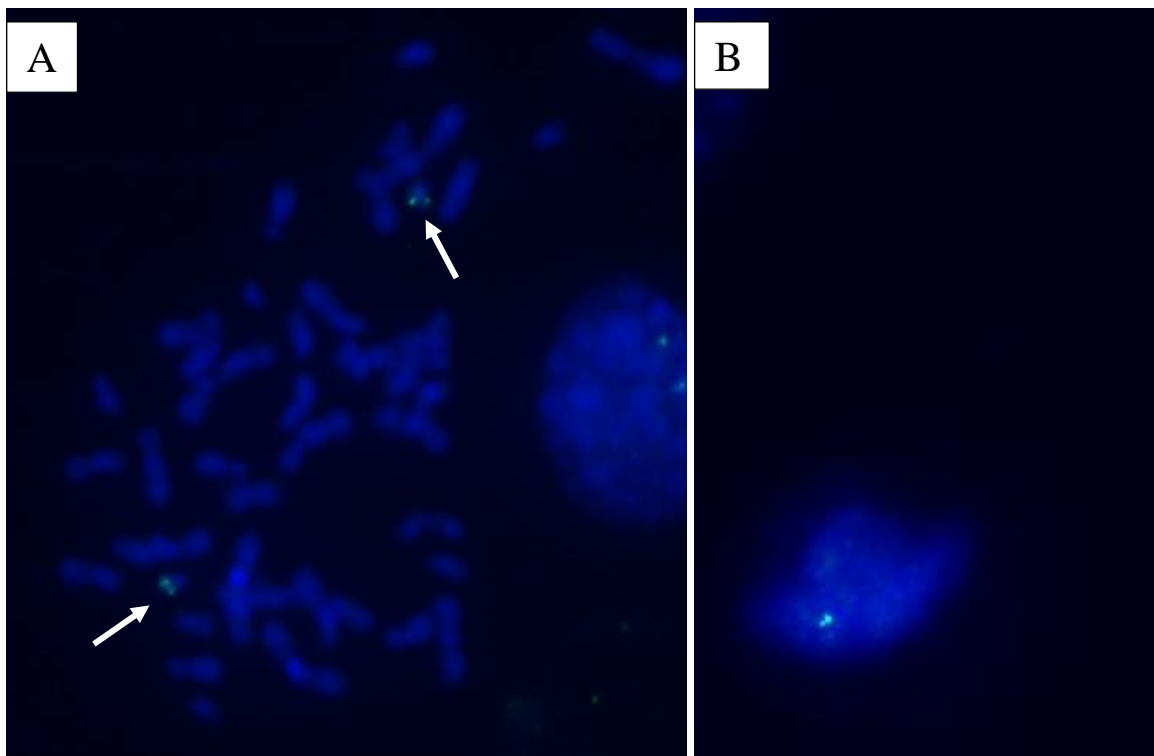
<b>Patients IDs</b>	<b>Culture cellulaire</b>	<b>Récolte des chromosomes</b>
<b>P1</b>	+	+
<b>P2</b>	+	-
<b>P3</b>	+	+
<b>P4</b>	+	+
<b>P5</b>	+	+
<b>P6</b>	+	+
<b>P7</b>	+	+
<b>P8</b>	+	+
<b>P9</b>	+	+
<b>P10</b>	+	+
<b>Totale</b>	10	9
<b>Fréquence</b>	100%	90%

+ = Positif

- = négatif

Sur les dix échantillons de patients mis en culture, neuf ont produit des chromosomes après la récolte des chromosomes, ce qui représente un taux de réussite de 90%. Nous n'avons pas obtenu de métaphases chez le patient P2.

### 5.2.2 Test de la sonde RUNX1 sur un échantillon normal

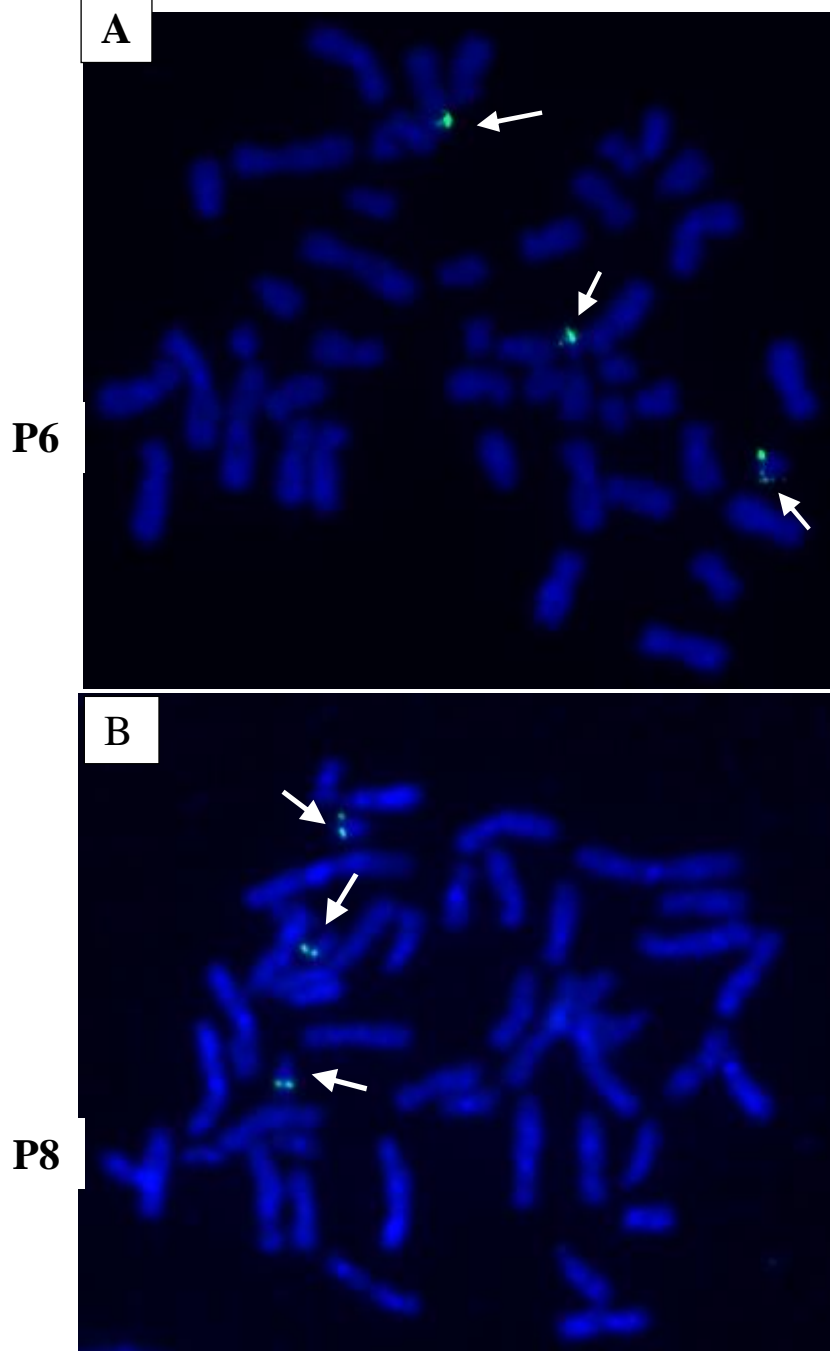


- DAPI
- Fluorescence des zones hybridées

**Figure 6 :** Images de métaphase et noyaux de l'échantillon d'un sujet non trisomique 21

Nous avons testé la sonde RUNX1 sur l'échantillon d'un sujet ne présentant pas de trisomie 21. La sonde RUNX1 que nous avons utilisée est spécifique aux deux chromosomes 21 comme l'atteste la présence de signaux verts sur le bras long des deux chromosomes 21 (indiqués par les flèches blanches sur l'image de métaphase- A). Dans les noyaux interphasiques (image B), nous avons aussi remarqué deux signaux de RUNX1 indicatifs de la présence des deux loci de RUNX1 (chromosomes 21).

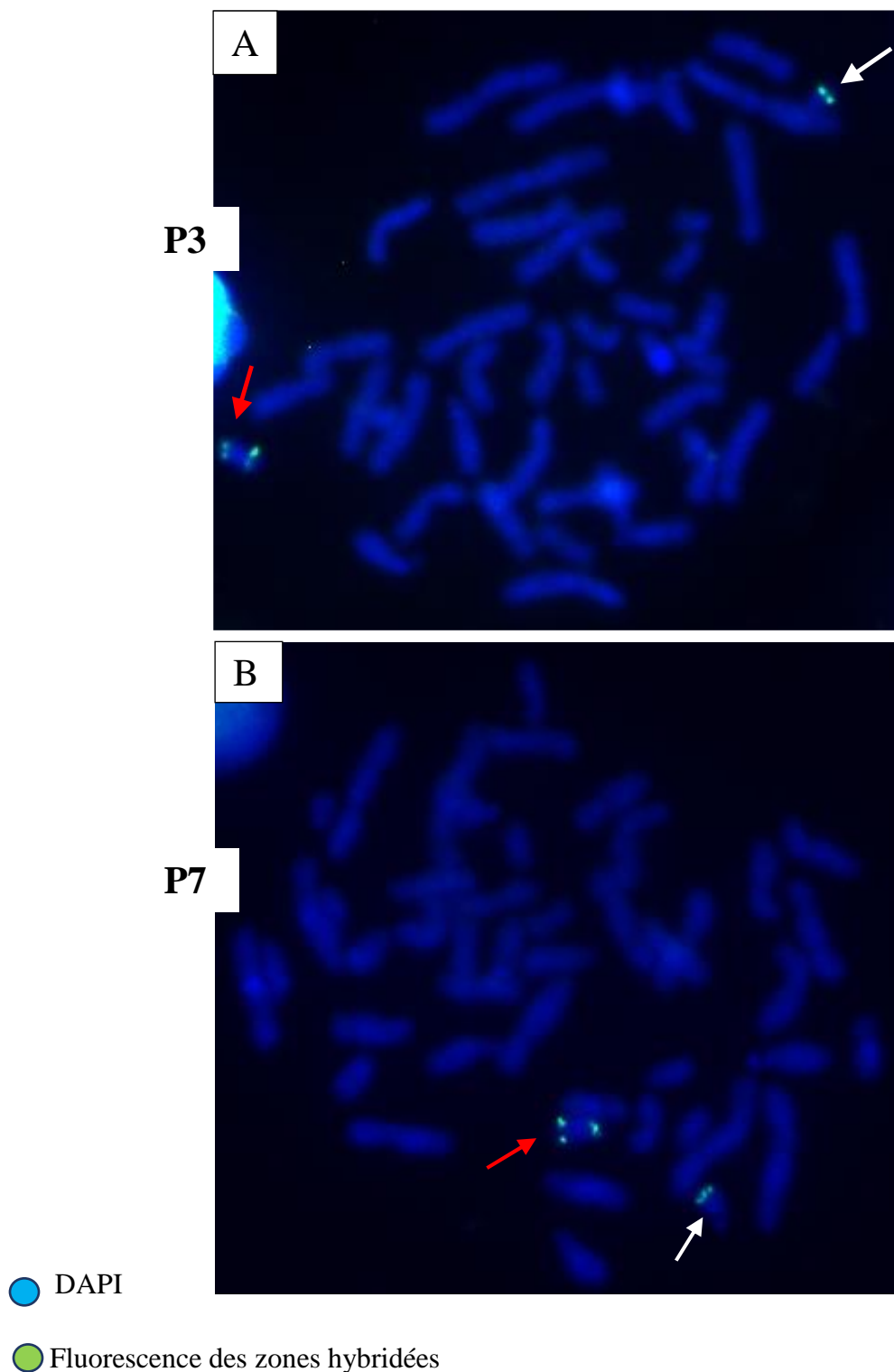
### 5.2.3. FISH sur métaphases



- DAPI
- Fluorescence des zones hybridées

**Figure 7:** Représentation de métaphases de trisomie libre

Les images de métaphases sont celles de deux patients (P6 et P8) présentant une trisomie libre, qui est définie comme une trisomie avec trois copies du chromosome 21 sans autres anomalies chromosomiques associées. Sur le bras long de chaque du chromosome 21 se trouve le signal de RUNX1 (indiqué par les flèches blanches). Cinq autres patients ont présenté le même profil de trisomie libre comparable à celui des deux patients représentés par cette figure.



**Figure 8:** Représentation de métaphases de trisomie avec translocation

Les images de métaphases sont celles de deux patients (P3 et P7) présentant une translocation rob (21;21) associée à une trisomie 21. Sur le bras long du chromosome 21 non transloqué se trouve le signal de RUNX1 (indiqué par les flèches blanches). Sur les deux extrémités du chromosome transloqué (indiqué par la flèche rouge) se trouvent deux signaux de RUNX1

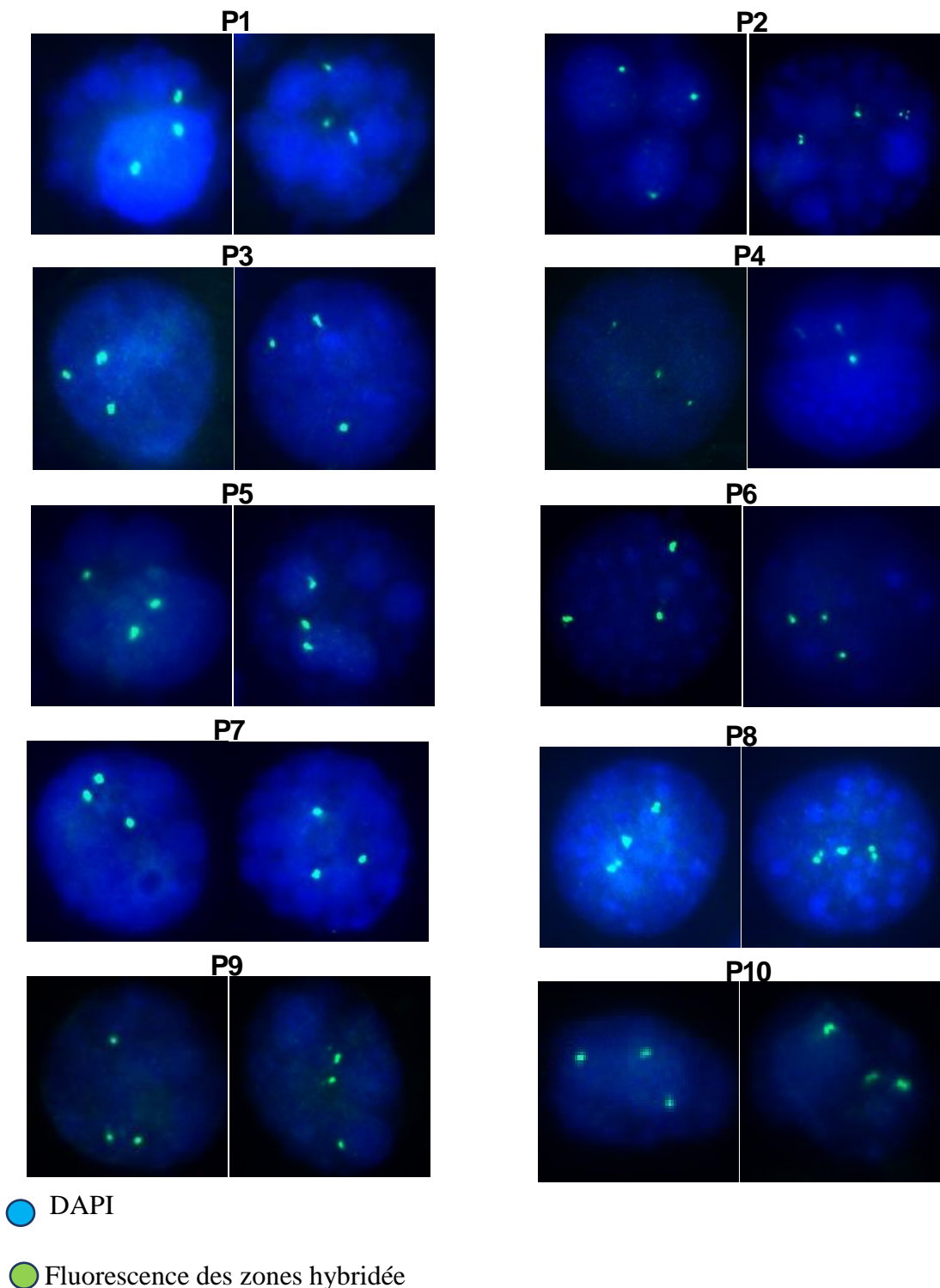
**Tableau 4:** Analyse des métaphases après FISH

<b>Patients</b>	<b>Métaphases analysée</b>	<b>Métaphases montrant deux copies de <i>RUNX1</i></b>	<b>Métaphases montrant trois copies de <i>RUNX1</i></b>
<b>P1</b>	20	0	20
<b>P2</b>	N/A	N/A	N/A
<b>P3</b>	20	0	20
<b>P4</b>	20	0	20
<b>P5</b>	20	0	20
<b>P6</b>	20	0	20
<b>P7</b>	20	0	20
<b>P8</b>	20	0	20
<b>P9</b>	20	0	20
<b>P10</b>	20	0	20

N/A : Non applicable

Nous avons analysé 20 métaphases par échantillon et chacune de ces métaphases montrait trois copies de *RUNX1* sur le chromosome 21.

#### 5.2.4. FISH sur noyaux interphasiques



**Figure 9:** Représentations nucléaires après FISH de RUNX1

Chaque patient est représenté par deux images nucléaires. Le noyau est en bleu (DAPI) et les signaux verts indiquent la sonde RUNX1 sur le chromosome 21. Les noyaux de l'ensemble des patients avaient trois signaux de RUNX1 indicatifs de trois copies du chromosome 21

**Tableau 5:** Données relatives aux noyaux interphasiques

<b>Patients</b>	<b>Noyaux interphasiques analyses</b>	<b>Noyaux montrant deux copies de <i>RUNX1</i></b>	<b>Noyaux montrant trois copies de <i>RUNX1</i></b>
<b>P1</b>	200	0	200
<b>P2</b>	200	0	200
<b>P3</b>	200	0	200
<b>P4</b>	200	0	200
<b>P5</b>	200	0	200
<b>P6</b>	200	0	200
<b>P7</b>	200	0	200
<b>P8</b>	200	0	200
<b>P9</b>	200	0	200
<b>P10</b>	200	0	200

Nous avons analysé 200 noyaux interphasiques par échantillon et chaque noyau comprenait 3 copies du gène *RUNX1*

### 5.2.5. Nomenclature cytogénétique des résultats FISH

**Tableau 6:** Nomenclature cytogénétique des résultats FISH

Patients	FISH-Métaphase	FISH-Interphase
<b>P1</b>	47, XY, +21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nu ihs 21q22(RUNX1x3)
<b>P2</b>	NA	Nu ihs 21q22(RUNX1x3)
<b>P3</b>	46, XY, +21, rob (21 ;21) (q10 ; q10). ihs der(21;21)(q22.1;q22.1)(RUNX1+;RUNX1+ ,21(q22.1)(RUNX1+)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P4</b>	47,XX,+21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P5</b>	47,XY,+21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P6</b>	47,XY,+21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P7</b>	46, XX,+21,rob(21;21)(q10;q10).ish der(21;21)(q22.1;q22.1)(RUNX1+;RUNX1+ ,21(q22.1)(RUNX1+)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P8</b>	47,XX,+21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P9</b>	47,XY,+21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)
<b>P10</b>	47,XX,+21.ish 21q22.21(RUNX1x3)	Nuc ish 21q22(RUNX1x3)

N/A : Non applicable

Nous avons suivi la nomenclature cytogénomique de « International System for Human Cytogenomic Nomenclature ». Cette nomenclature permet de préciser les anomalies chromosomiques et des signaux de FISH.

Parmi les neuf patients chez lesquels nous avons obtenu des métaphases, deux d'entre eux (**P3** et **P7**) présentaient une translocation robertsonienne qui a été détectée par l'analyse des chromosomes et la FISH. Les signaux de RUNX1 étaient sur les deux bras longs du chromosome transloqué [der(21;21)(q22.1;q22.1)(RUNX1+;RUNX1+)] et l'autre chromosome 21 avait aussi un signal de RUNX1 [21(q22.1)(RUNX1+)]. Les autres patients ayant des métaphases présentaient un signal de RUNX1 sur chacun des chromosomes 21. Chez tous les patients, nous avons trouvé trois signaux de RUNX1[21q22(RUNX1x3)].

## 6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Cette étude avait pour objectif de faire la mise au point des techniques de génétique pour diagnostiquer la trisomie 21 au Mali. Elle a porté sur dix patients présentant une symptomatologie évocatrice de trisomie 21, et ces patients étaient des volontaires référés par l'Association Malienne de Trisomie 21. La cohorte de patients de cette étude était dominée par des hommes avec une fréquence de 60% (6 des 10 patients) et une étude récente faite au CHU du Gabriel Touré de Bamako a aussi trouvé que le sexe masculin était le plus dominant avec un sexe ratio 3/2 en faveur des hommes (13). L'âge moyen des patients était de 10 ans avec des extrêmes de 7 mois et 14 ans. Par contre l'étude de Traoré K. a trouvé que la majorité des patients (52,4%) était diagnostiquée entre 1-12 mois (13). Certaines différences entre cette étude et la nôtre étaient la petite taille de l'échantillon de notre étude et du cadre distinct des deux études. L'étude faite par Traoré K incluait que des patients hospitalisés alors que la nôtre incluait des sujets non-hospitalisés référés par une association. Une autre différence entre les deux études était leur objectif. En effet, la nôtre avait pour objectif de faire la mise au point des techniques de génétique à partir des sujets volontaires alors que celui de Traore K.A. était de faire une description clinique des patients hospitalisés (13).

La récolte des chromosomes à partir de la culture cellulaire et la FISH sont les deux techniques que nous avons mises au point pour diagnostiquer la trisomie 21. L'analyse des chromosomes se fait après leur récolte et permet d'identifier la nature chromosomique de la trisomie 21 notamment les translocations robertsoniennes, et la FISH aide à l'évaluation du mosaïsme (27). Après la culture cellulaire, nous avons pu obtenir des métaphases analysables dans tous les échantillons sauf un. Le seul échantillon qui n'a pas produit de métaphases après la culture cellulaire s'expliquaient par la présence de micro-coagulations dans le prélèvement du patient rendant ainsi très difficile la récolte de chromosomes analysables. Cet échec de récolte de chromosomes était lié à une des conditions pré-analytiques les plus susceptibles d'induire un échec de culture à partir des prélèvement de sang périphérique chez les enfants qui sont plus prompt à se coaguler si les conditions de prélèvements ne sont pas optimales (27).

La technique FISH a été réalisable chez l'ensemble des patients avec un taux de succès de 100%. Ce taux de réussite est dû à l'expérience qu'à développer notre laboratoire à faire la technique FISH dans le diagnostic et la recherche de plusieurs pathologies (28, 29). La combinaison de l'analyse des chromosomes et la FISH a permis de confirmer le diagnostic de la trisomie 21 chez l'ensemble des patients. Bien vrai que cette étude a été la première à faire

le diagnostic de la trisomie 21 par la FISH au Mali, une étude précédente était la première à diagnostiquer par l'analyse du caryotype la trisomie 21 au Mali (30). Parmi les neuf patients chez lesquels nous avons pu obtenir les métaphases, sept présentaient trois copies du chromosome 21 avec une formule chromosomique de 47 chromosomes. Les deux autres patients avaient une formule chromosomique de 46 chromosomes associée à une translocation robertsonienne impliquant deux des trois chromosomes 21. Les translocations robertsoniennes sont rares et constituent 3,7% de l'ensemble des formes chromosomiques des trisomies (11). Bien vrai que notre échantillon était de petite taille, nous avons quand même retrouvé une fréquence élevée (2/9) dont 22% de translocation rob(21;21)(q10;q10) alors la littérature rapporte une fréquence moindre de l'ordre de 1,6% de l'ensemble des anomalies chromosomiques rencontrées dans la trisomie 21 (11).

La recherche de la translocation robertsonienne est l'une des indications majeures du caryotype en cas de suspicion de trisomie 21 car sa présence évoquerait une probabilité de 50% qu'elle soit héritée d'un des parents ayant la même translocation robertsonienne équilibrée (14). La recherche de la translocation robertsonienne chez un des parents permet de guider le conseil génétique. En effet, sa présence chez un des parents permet de déterminer le risque de survenue d'une grossesse avec un fœtus trisomique ou les causes des avortements spontanés chez la mère. Le risque de récurrence d'avoir un enfant trisomique 21 dans un couple dont un des parents est porteur de la translocation équilibrée rob(21;21)(q10;q10) est de 100% et 50% des grossesses conduiraient aux avortements spontanés (28). Par conséquent, la recherche d'une translocation équilibrée rob(21;21)(q10;q10) chez un des parents et le conseil génétique sont fortement recommandés en cas de trisomie 21 associée à la translocation rob(21;21)(q10;q10). Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas fait le caryotype des parents car l'objectif principal de l'étude était de faire la mise au point des techniques et la découverte de ces translocations était fortuite.

En plus de l'analyse chromosomique, nous avons aussi déterminé le degré de mosaïsme dans les cellules nucléées sanguines des patients. La technique FISH qui permet d'analyser un nombre très important de noyaux aide à déterminer un degré très faible de mosaïsme. Nous avons trouvé que l'ensemble des patients avaient 100% de cellules trisomiques dans leur sang. Nous n'avons pas trouvé de mosaïsme dans les cellules nucléées sanguines. La recherche de mosaïsme est très importante dans la prise en charge médicale et surtout socio-éducative des patients. Le mosaïsme évoque la présence d'une certaine proportion de cellules normales chez le patient. Par conséquent, le degré de sévérité de la

maladie et surtout du déficit intellectuel est moindre. L'insertion socio-économique de ce type de patient est moins difficile (17).

## **7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **7.1. Conclusion**

Au terme de cette étude, nous avons démontré qu'il est possible de faire des tests de diagnostic génétique de la trisomie 21 au Mali. Nous avons mis au point deux tests complémentaires de diagnostic de trisomie 21. Ces tests permettent de recueillir des informations essentielles dans la prise en charge médicale. Enfin, ces tests aident au conseil génétique surtout pour les familles des patients présentant les translocations robertsoniennes. L'utilisation de ces tests dans la routine clinique sera d'un grand bénéfice pour les patients trisomiques, leurs parents et le personnel soignant. Dans le futur nous espérons pouvoir faire le diagnostic précoce anténatal et mener des investigations sur les parents des enfants ayant la trisomie 21 avec translocation Robertsonienne pour un conseil génétique.

### **7.2. Recommandations**

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

1. Introduire dans la routine clinique les tests génétiques de diagnostic de la trisomie 21
2. Former le personnel de laboratoire pour réaliser les tests génétiques de diagnostic de trisomie 21
3. Rendre économiquement accessibles aux patients les tests génétiques de diagnostic de la trisomie 21.

## 8. REFERENCES

1. Abbassi H. Trisomie 21 (A propos de 95 cas). [Thèse de médecine]. Université Cadi Ayyad de Marrakech (Maroc); 2008.
2. Dr Renaud Touraine.Orphanet.[en ligne].modifié en septembre 2019.[cité 5 févr 2023]. Disponiblesur:[https://www.orpha.net/consor/cgibin/OC\\_Exp.php?Lng=FR&Expert=870](https://www.orpha.net/consor/cgibin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=870).
3. Rodolphe Dard, Gilles Furelaud.La trisomie 21 : origines et quelques chiffres [en ligne]. Planet-Vie.modifié le 21 nov 2018 [cité 5 févr 2023]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/sante/pathologies/la-trisomie-21-origines-et-quelques-chiffres>.
4. Trisomie 21 - Programme québécois de dépistage prénatal de la trisomie 21 - Professionnels de la santé - MSSS modifié le 26 mars 2021 [en ligne]. [cité 5 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/perinatalite/programme-quebecois-de-depistage-prenatal-de-la-trisomie-21/trisomie-21/>.
5. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.* oct 2004;5(10):725-38.
6. Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C. R. Acad. Sci.* 248: 1721-1722, 1959.
7. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. “Down syndrome: an insight of the disease”. *J Biomed Sci.* déc 2015;22(1):41.
8. Roper RJ, Reeves RH. Understanding the Basis for Down Syndrome Phenotypes. *PLoS Genet.* 31 mars 2006;2(3):e50.
9. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature.* 18 mai 2000;405(6784):311-9.
10. Gardiner K, Costa ACS. The proteins of human chromosome 21. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 15 août 2006;142C(3):196-205.
11. Morris JK, Alberman E, Mutton D, Jacobs P. 2012. Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome: England and Wales 1989–2009. *Am J Med Genet Part A.* 158A:1151–1157.
12. Mikkelsen M. Down syndrome: Cytogenetical epidemiology. *Hereditas.* 1977;86(1):45-9.
13. K.A.Traore. Étude clinique de la Trisomie 21 Département de pédiatrie CHU-Gabriel Touré. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2020.
14. Shaffer LG, Jackson-Cook CK, Stasiowski BA, Spence JE, Brown JA. Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations. *Am J Med Genet.* 1 août 1992;43(6):957-63.
15. Antonarakis SE. Parental Origin of the Extra Chromosome in Trisomy 21 as Indicated by Analysis of DNA Polymorphisms. *N Engl J Med.* 28 mars 1991;324(13):872-6.

16. Limited A. Conception scientifique de la non-disjonction en trisomie 21. Symboles colorés. Illustration vectorielle Image Vectorielle Stock - Alamy [Internet]. [cité 2 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.alamyimages.fr/conception-scientifique-de-la-non-disjonction-en-trisomie-21-symboles-colo-res-illustration-vectorielle-image488000063.html>.
17. Papavassiliou P, Charalsawadi C, Rafferty K, Jackson-Cook C. Mosaicism for trisomy 21: A review. *Am J Med Genet A*. janv 2015;167(1):26-39.
18. Wilch ES, Morton CC. Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1044:1-14. doi:10.1007/978-981-13-0593-1\_1.
19. Strachan T and Read A. *Human Molecular Genetics* 5<sup>th</sup> Edition. 2018.
20. Kalpana, V L et al. Robertsonian Translocations t(21q;21q) and t(14q;21q) in Down Syndrome. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 2017, 6(12): 53-58.
21. Landry Thérèse. Trisomie 21 : étude de consanguinité et d'apparentement au Saguenay Lac St-Jean. [Mémoire de maîtrise]. Ste Foy- Québec (Canada) : Université du Québec à Chicoutimi ; 1997.
22. Verloes A. Trisomie 21: du phénotype au genotype; Mayotte, France. 2016 [cite 03/2023]. Disponible sur: [www.reseaux-sante-mayotte.fr/repema/document/verloes-a-trisomie-21-du-phenotype-au-genotype-67-p](http://www.reseaux-sante-mayotte.fr/repema/document/verloes-a-trisomie-21-du-phenotype-au-genotype-67-p).
23. O'Connor, C. (2008) Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nature Education* 1(1):27).
24. Liehr T. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide*. 2nd -ed. Berlin: Springer; 2017.
25. Marilyn S. Arsham, Margaret J. Barch, Helen J. Lawce. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 4th Edition. Hoboken, New Jersey :Wiley-Blackwell, 2017.
26. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. *ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature* (2016). 2016;139.
27. Suzan Zneimer M. *Cytogénétic Abnormalities: Chromosomal, FISH and Microarray-Based Clinical Reporting*. 1<sup>st</sup> edition. Wiley-Blackwell; 2014.
28. C.O Sidibe. *Exploration Cytogénétique de la Leucémie Myéloïde Chronique par la Technique FISH Au MALI*. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2020.
29. Ongoiba C. *Évaluation de l'Hétérogénéité Tumorale et l'Instabilité Génomique dans le Cancer du Sein par la Télégénomique Cellulaire*. [Thèse de Pharmacie]. Bamako (Mali) : Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2022.
30. Traore M, Toure A, Keita MM, Traore MS. Étude cytogénétique chez 13 enfants présentant une polymalformation à Bamako. *Médecine d'Afrique Noire* : 1997, 44 (10).

## 9. ANNEXES

### Annexe 1: Protocole de culture cellulaire des lymphocytes T

#### A. Réactifs

Milieu complet : 100 ml

RPMI-1640 : 88,5 ml

Sérum de veau : 8 ml (8%)

Glutamax 100x: 1ml (1%)

Antibiotique-antimycotique 100 x : 1 ml (1%)

Phytohemagglutinin : 1,5 ml (1,5%)

#### B. Procédure

Toute la manipulation se fait sous la hotte (biosécurité de niveau 2).

Le Nettoyage et la manipulation sous la hotte se font selon les SOPs (Standard Operating Procedure) en vigueur.

1. Préparer un milieu complet de RPMI contenant 8% de sérum de veau, 1% de Glutamax, 1% d'Antibiotic-Antimycotic (100X), 1,5% de Phytohemagglutinin et 88,5% de RPMI. Une grande quantité de ce milieu complet peut être préparé et aliquoté en 10 ml dans des tubes coniques de 15 ml puis congelé à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Décongeler deux tubes 10 ml de RPMI complet aliquoté à température pièce pendant 30 minutes. Ensuite, placer les tubes à 37°C pendant une heure.

3. Ajouter 0,750 ml de sang total dans chaque tube

4. Serrer les bouchons. Mélanger en retournant plusieurs fois. Desserrez suffisamment les bouchons pour permettre l'échange de gaz.

5. Incuber la culture à 37 ° C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 heures. En inclinant pour former un angle de 45°C.

6. Mélanger le milieu de culture et les cellules en retournant plusieurs fois les tubes deux fois par jour (matin et soir).

### Annexe 2: Protocole de récolte et étalement des chromosomes

#### A. Réactifs

Colcémide (10 µg/ml)

Solution hypotonique KCl 0.56%

5,6 g de la poudre de KCl

1 L d'eau distillée

Solution de fixation (Carnoy) : 100 mL fraîchement préparée

75 ml de méthanol (3 volumes)

25 ml d'acide acétique (1 volumes)

## **B. Procédure**

1. Après 72 heures de culture cellulaire, ajouter 50  $\mu$ L de solution de colcémide dans chaque tube, à partir de 72 heures de culture et incuber dans l'incubateur à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 30 minutes.

2. Centrifuger 200 x g pendant 10 minutes.

3. Retirer le surnageant et remettre en suspension le culot cellulaire.

4. Ajouter goutte par goutte 10 ml de KCl et incuber pendant 20 minutes à la température ambiante (20-25°C).

5. Ajouter doucement (goutte par goutte) 1 ml de solution de fixation de Carnoy fraîchement préparé dans chaque tube, fermer et inverser les tubes doucement.

6. Centrifuger 200 g pendant 10 minutes.

7. Retirer le surnageant en laissant 0,5 ml de suspension. Remettre en suspension le culot cellulaire.

8. Ajouter doucement (goutte par goutte) 1 ml de solution de fixation de Carnoy en mixant immédiatement. Ensuite, ajouter goutte par goutte du Carnoy en ajustant le volume à 5 ml tout en appliquant une agitation très douce.

9. Centrifuger 200 g pendant 15 minutes.

10. Répéter les étapes 5-10 deux fois.

11. Retirer le surnageant en ajustant le volume en fonction du culot cellulaire et laisser l'échantillon à température ambiante (20-25°C) pendant 30 minutes avant de procéder à l'étalement. Remettre en suspension le culot cellulaire et garder à 4°C si l'étalement doit se faire un autre jour.

12. Étiqueter les lames

13. Laisser soigneusement 10 $\mu$ L de la suspension cellulaire de l'étape 16 à tomber sur la lame.

14. Laisser sécher la lame.

15. Examiner la lame sous un microscope à contraste de phase pour évaluer la qualité de la préparation et l'étendue de l'étalement des chromosomes. Si la qualité est satisfaisante, préparez des diapositives supplémentaires en utilisant la même technique.

16. Incuber les lames pendant une nuit à 37°C afin de les vieillir.

### **Annexe 3: Protocole de la Technique FISH pour déterminer le nombre de copies de RUNX1 ou du chromosome 21**

#### **Réactifs**

TBS (Tirs buffer saline) 1X, pH 7,5

50 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

Éthanol 80%

Ajouter 10 ml d'eau distillée

40 ml d'éthanol 100%

Éthanol 90%

Ajouter 5 ml d'eau distillée

45 ml d'éthanol 100%

Éthanol 100%

Mettre 50 ml d'éthanol 100% dans le copling jar

Sonde RUNX1 (Agilent, Canada)

Température de stockage = -20°C

Solution de rinçage 100X (Agilent, Canada)

Température de stockage = 4-8°C

Solution de lavage 100X (Agilent, Canada)

Température de stockage = 4-8°C

DAPI/Vectachield (150ng/ml) (Vector laboratories, Canada)

Température de stockage = 2-8°C

#### **B. Procédure**

1. Mettre 35-40 ml de TBS dans un Coplin jar.
2. Préparer de l'éthanol dilué à 80%, 90% et 100% dans des Coplin jar différents pour un volume totale de 45 ml et les fermés.
3. Mettre les lames dans du 1XTBS pendant 10 minutes.

4. Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 80% pendant 2mn
5. Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 90% pendant 2mn
6. Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 100% pendant 2mn
7. Placer les lames à la température de la pièce pendant 5-10 mn
8. Mettre 8µl de la sonde sur la lame et mettez une lamelle là-dessus dans la pièce sombre ou semi-éclairée

**NB :** la manipulation de la sonde se fait dans la pièce sombre et les lames contenant la sonde ne doivent pas être exposées à la lumière du jour.

9. Programmer le Thermobrite à 75°C pour la dénaturation pendant 10 min et 37°C pour l'hybridation pendant 24 h. Ensuite, placez les lames dans le Thermobrite pour l'hybridation.

10. Mettre 1ml de solution de lavage sur 50 ml d'eau distillé dans un Coplin jar
11. Mettre 1ml de la solution rinçage sur 50 ml d'eau distillé dans un autre Coplin jar
12. Placer les deux Coplin dans le bain marie chauffer à 72°C pendant 60mn
13. Décoller doucement la lamelle sur la lame avec la main mouillée à l'eau
14. Mettre les lames dans la solution de rinçage avant qu'elle ne sèche pendant 3mn

**NB :** secouer le tube à chaque minute

15. Mettre les lames dans la solution de lavage pendant 3mn

**NB :** Secouer le tube à chaque minute

16. Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 80% pendant 2mn
17. Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 90% pendant 2mn
18. Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 100% pendant 2mn
19. Placer les lames dans la température ambiante (20-25°C) pendant 5-10mn pour sécher
20. Mettre 30µl de Dapi/Vectachield sur les lames couvertes par la lamelle dans la pièce obscure.
21. Emballer les lames avec un papier aluminium et les conserver à -20°C jusqu'à l'observation microscopique.