

CHAPITRE VI: CYTOGENETIQUE ET ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

INTRODUCTION

La **cytogénétique** (ou génétique chromosomique) est l'étude des chromosomes et des anomalies chromosomique (nombre et structure).

Comment est-ce qu'elle se fait ? (Techniques cytogénétiques)

Elle est basée sur deux types de techniques :

- **Les techniques de cytogénétique classique ou conventionnelle** : représentées par la réalisation d'un caryotype.
- **Les techniques de cytogénétique moléculaire** : FISH et ses variantes, CGH array, PCR, PCR quantitative et parfois Southern blot. Qui ne doivent être faites **qu'après un caryotype**.

Quand est-ce qu'on la fait ? (Indications de l'étude cytogénétique):

Les anomalies chromosomiques sont impliquées dans plusieurs maladies :

- malformations congénitales,
- retards mentaux,
- troubles de la reproduction (avortements spontanés à répétition, mort-nés,...),
- cancers.

II- LE CARYOTYPE

Définition :

Le caryotype est une description de l'ensemble des chromosomes métaphasiques d'une cellule, comprenant :

- Leur **nombre**
- Leur **taille**
- Et les **caractéristiques morphologiques** de certains d'entre eux.

Réalisation d'un caryotype

Préparation des chromosomes :

On utilise, en routine, les **lymphocytes du sang périphérique** (mais d'autres cellules sont possibles, fibroblastes, moelle osseuse...).

Comme les chromosomes ne sont visibles qu'au stade de la **métaphase** :

- quelques gouttes de sang sont mises dans un milieu de culture comprenant un milieu nutritif et de la phytohémagglutinine (PHA) qui stimule les lymphocytes T.
- puis elles sont bloquées au stade de la métaphase par la colchicine,
- ensuite elles sont mises dans un milieu hypotonique pour disperser les chromosomes (choc hypotonique),
- enfin elles sont fixées par une solution alcool-acide et étalées sur lames.

Coloration

Le colorant le plus souvent utilisé est le **Giemsa** pour le marquage en bandes des chromosomes (ou *banding*).

Lecture

L'observation est effectuée au microscope optique et l'analyse se fait à partir des photographies.

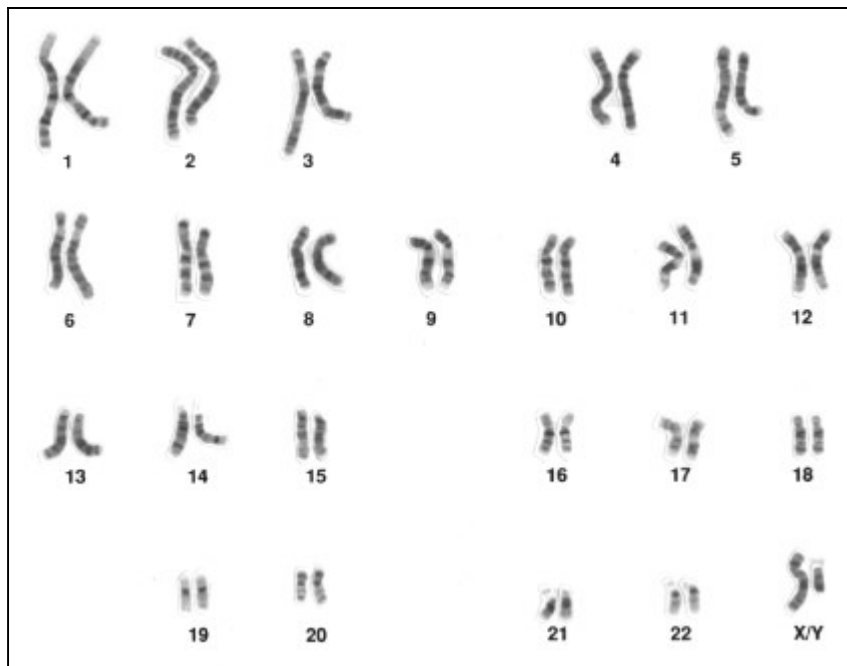
La coloration permet d'identifier chaque paire de chromosomes grâce à la succession de bandes caractéristiques de chaque chromosome : tel un **code-barres**.

Les deux types de bandes le plus souvent utilisées sont:

- **les bandes G** : elles sont obtenues après traitement des chromosomes par la trypsine: c'est une digestion protéolytique ménagée, suivie d'une coloration au Giemsa.

- les **bandes R** elles sont obtenues par un traitement à la chaleur: dénaturation thermique ménagée des chromosomes qui sont ensuite colorés au Giemsa.

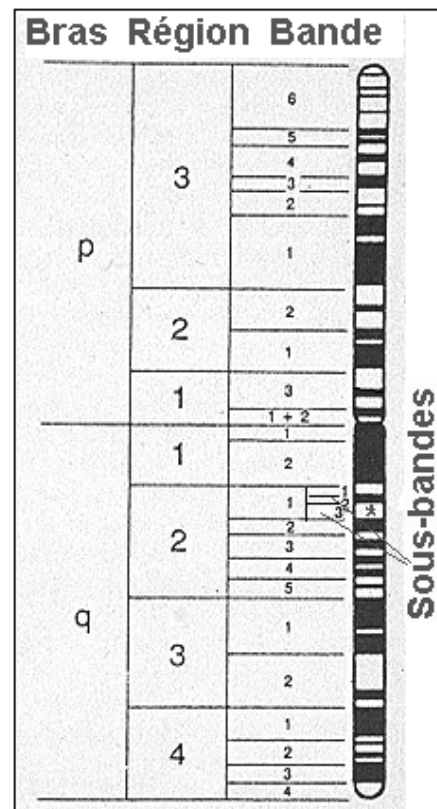
Ces deux techniques de coloration donnent un marquage réciproque, c'est-à-dire que là où l'on obtient une bande sombre avec l'une des deux techniques, on observe une bande claire avec l'autre.



Caryotype d'un sujet de sexe masculin.

Le caryotype humain normal comporte 46 chromosomes:

- 22 paires d'autosomes, notés de 1 à 22 en fonction de leur taille décroissante
- 1 paire de gonosomes, ou chromosomes sexuels: XX chez le sujet féminin, XY chez le sujet masculin. **On écrit : 46, XX ou 46, XY.**
- Chaque chromosome comporte :
 - Un centromère (**CEN**).
 - Un bras court (bras p), placé en haut sur un caryotype,
 - Un bras long (bras q), placé en dessous du centromère.
- Chaque bras se termine par un télomère (en **pter** et **qter**).
- Chaque bras est arbitrairement divisé en **régions**, notées de 1 et qui peut aller jusqu'à 4 en partant du centromère.
- Chaque région est divisée en **bandes**
- Chaque bande peut, si nécessaire, être divisée en **sous-bandes** (chromosomes en prométaphase, moins condensés, et donc montrant plus de détails) ...
- Ainsi, un emplacement sera défini par :
 - le numéro du chromosome où se trouve cet emplacement,
 - suivi de la lettre indiquant le bras impliqué,
 - suivie des numéros de région,
 - de bande,
 - voire de sous-bande.
 - Ex: l'emplacement noté d'un astérisque sur le schéma ci-contre est localisé par la nomenclature en 21q21.3.



Des aberrations aussi petites qu'environ **5 mégabases (Mb)** peuvent être détectées avec une analyse de bandes; de tels réarrangements chromosomiques sont appelés "**microscopiques**".

Le caryotype « haute résolution »

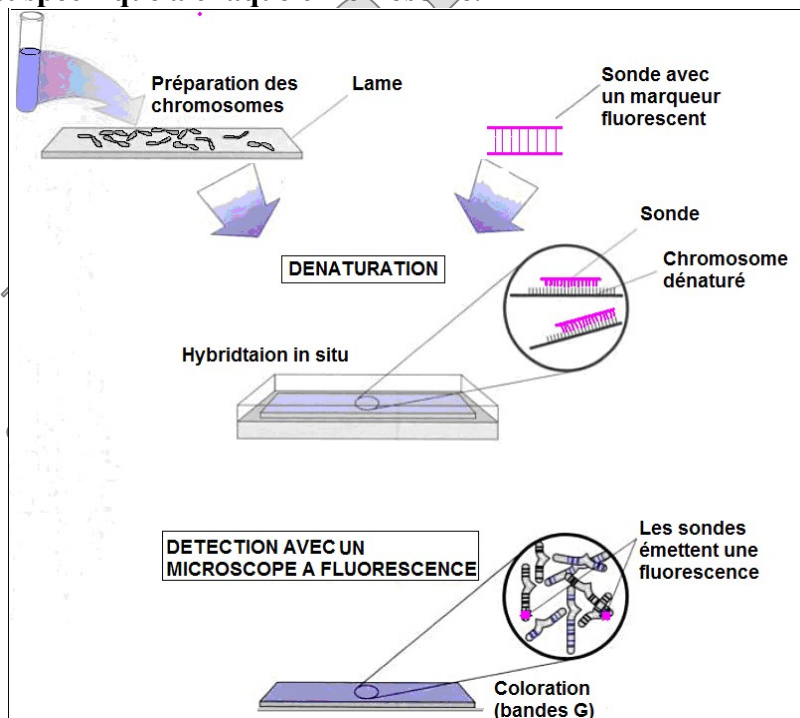
C'est une technique de haute résolution (précision) qui fait appel à une analyse des chromosomes à un stade plus précoce de la division, la **prométaphase** (étape entre la prophase et la métaphase), ceci afin d'étudier des chromosomes plus longs et d'augmenter ainsi la résolution de l'examen.

III- Hybridation in situ fluorescente ou FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire qui permet la détection de séquences données sur les chromosomes. Elle est **basée sur la propriété d'hybridation** (complémentarité des acides nucléiques).

Son principe général est illustré sur le schéma suivant:

- **Préparation des chromosomes** de la cellule (généralement en métaphase) qui sont déposés sur une lamelle de microscope.
- **Préparation des sondes**: ce sont des fragments d'ADN génomiques dont on connaît à quoi elles correspondent et qu'on a marqués par des fluorochromes. Elles peuvent correspondre à:
 - Un chromosome entier (c'est les peintures chromosomiques)
 - Un locus spécifique (correspondant à un petit fragment chromosomique) ;
 - Une région télomérique
 - Une région centromérique
- **Dénaturation** des chromosomes sur place (*in situ*) et, d'un autre côté, des sondes, puis mise en contact des deux, ce qui permet leur hybridation. Les sondes non hybridées sont éliminées par lavage.
- **Révélation**: les sondes hybridées sont visualisées grâce à un microscope à fluorescence. La coloration des chromosomes au Giemsa permet de détecter une **succession de bandes sombres et claires qui est spécifique à chaque chromosome**.

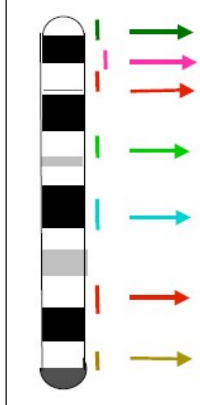
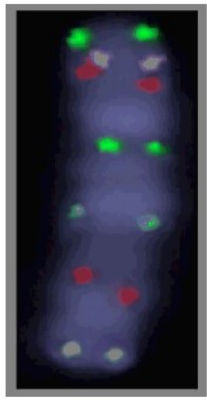
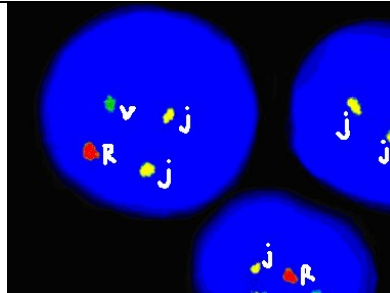
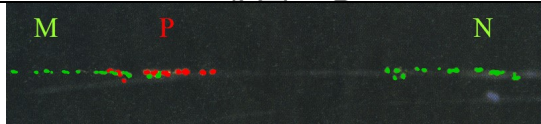


Intérêt de la FISH:

- La séquence de la sonde peut être cartographiée d'après l'**emplacement approximatif** sur le chromosome avec lequel elle s'hybride, en notant sa **position par rapport**
 - aux **profils de bandes**,
 - au **centromère**
 - aux **télomères**.
 - Ou bien une sonde spécifique d'un marqueur ou plus dont la localisation est connue
- La coloration des chromosomes entiers (**peintures chromosomiques**) permet aussi de donner la localisation de cette séquence de sonde quand elle a une couleur différente.

Résolution (précision) de la FISH

- La résolution **varie selon le stade d'enroulement des chromosomes** lors de l'étude, elle est d'autant plus importante que les chromosomes sont déroulés.

<p>Bandes d'un chromosome</p>  <p>FISH</p> 		
<p>FISH métaphasique Distinction entre 2 loci s'ils sont distants d'au moins 1 Mb (1000 kb)</p>	<p>FISH interphasique Distinction entre 2 loci s'ils sont distants d'au moins 50kb.</p>	<p>La "fiber FISH" Distinction de 2 loci espacés d'au moins 5-10kb</p>

IV- L'Hybridation Génomique Comparative ou CGH array

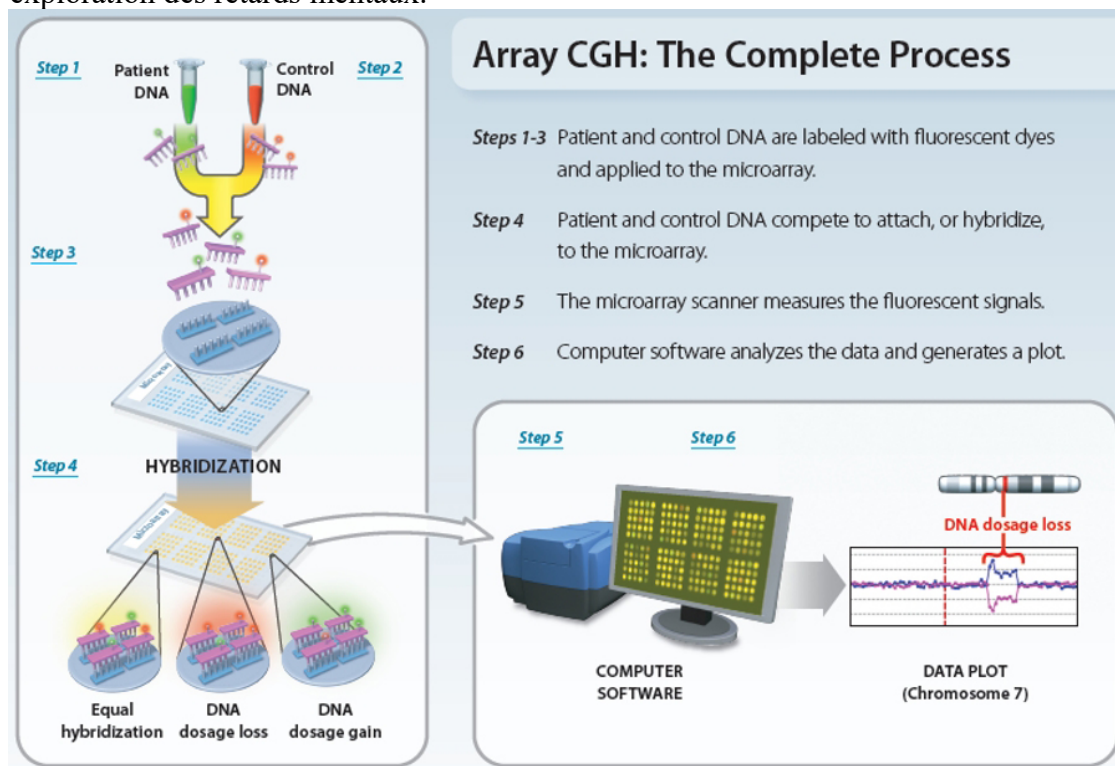
L'ADN est extrait d'un échantillon test (du patient) puis marqué avec un colorant fluorescent d'une couleur spécifique, tandis que l'ADN d'un échantillon de contrôle (de référence) normal est marqué avec un colorant de couleur différente. Les deux ADN génomiques, test et référence, sont ensuite mélangés ensemble et appliqués sur une micropuce (micro-array). Comme les ADN ont été dénaturés, ils sont simples brins; ainsi, lorsqu'ils sont appliqués à la puce, ils tentent de s'hybrider avec les sondes monocaténaïres mises en réseau. Ensuite, des systèmes d'imagerie numérique sont utilisés pour capturer et quantifier les intensités de fluorescence relatives des sondes d'ADN marquées qui se sont hybridées à chaque cible. Le rapport de fluorescence des signaux d'hybridation du « test » et de la « référence » est déterminé à différentes positions le long du génome, et il fournit des informations sur le nombre de copies relatives des séquences dans le génome du « test » par rapport au génome normal.

Ces puces sont créées par le dépôt et l'immobilisation de petites quantités d'ADN (appelées sondes) sur un support solide, tel qu'une lame de verre, d'une manière ordonnée. Les tailles des sondes sont variables selon les zones d'intérêt (25-85 à 80 000-200 000 paires de bases). Comme les sondes ont plusieurs ordres de grandeur plus petits que les chromosomes en métaphase, la résolution théorique de la « CGH array » est proportionnellement plus élevée que celle de la fish métaphasique. Le niveau de résolution est déterminé en considérant à la fois la taille de la sonde et la distance génomique entre les sondes d'ADN. Par exemple, une micropuce avec des sondes sélectionnées à partir de régions à travers le

génomique distantes de 1 Mb sera incapable de détecter les changements de nombre de copies de la séquence intermédiaire.

Intérêt :

- détecter simultanément les aneuploïdies, les délétions, les duplications et / ou les amplifications de tout locus représenté sur une puce.
- Détection des réarrangements chromosomiques sub-microscopiques (< 5Mb), notamment lors de l'exploration des retards mentaux.



III- ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

On appelle anomalie chromosomique tout **remaniement du nombre ou de la structure** des chromosomes.

- **Les anomalies de nombre :** un ou plusieurs chromosomes surnuméraires (en plus) ou manquants
- **Les anomalies de structure :** cassures/recollements chromosomiques.

Selon le stade de survenue de l'anomalie chromosomique, elle peut être :

- **Une anomalie constitutionnelle :** Elle survient
 - o avant la fécondation, dans l'un des gamètes,
 - o ou peu après la fécondation, dans le zygote.
 Elle existe donc dans tous les organes de l'individu qui va naître.
- **Une anomalie acquise :**
 - o Elle survient après la naissance dans les cellules de l'un des organes, les autres organes sont normaux.
 - o Le plus souvent il s'agit d'une anomalie à l'origine d'un **cancer**.

Selon l'homogénéité des cellules d'un tissu, elle peut être :

- **Une anomalie homogène :** si toutes les cellules d'un tissu examiné portent la même anomalie.
- **Une anomalie en mosaïque :** si certaines cellules d'un tissu portent l'anomalie alors que d'autres sont normales.

Selon la conséquence de l'anomalie génétique, on dit que l'anomalie chromosomique est :

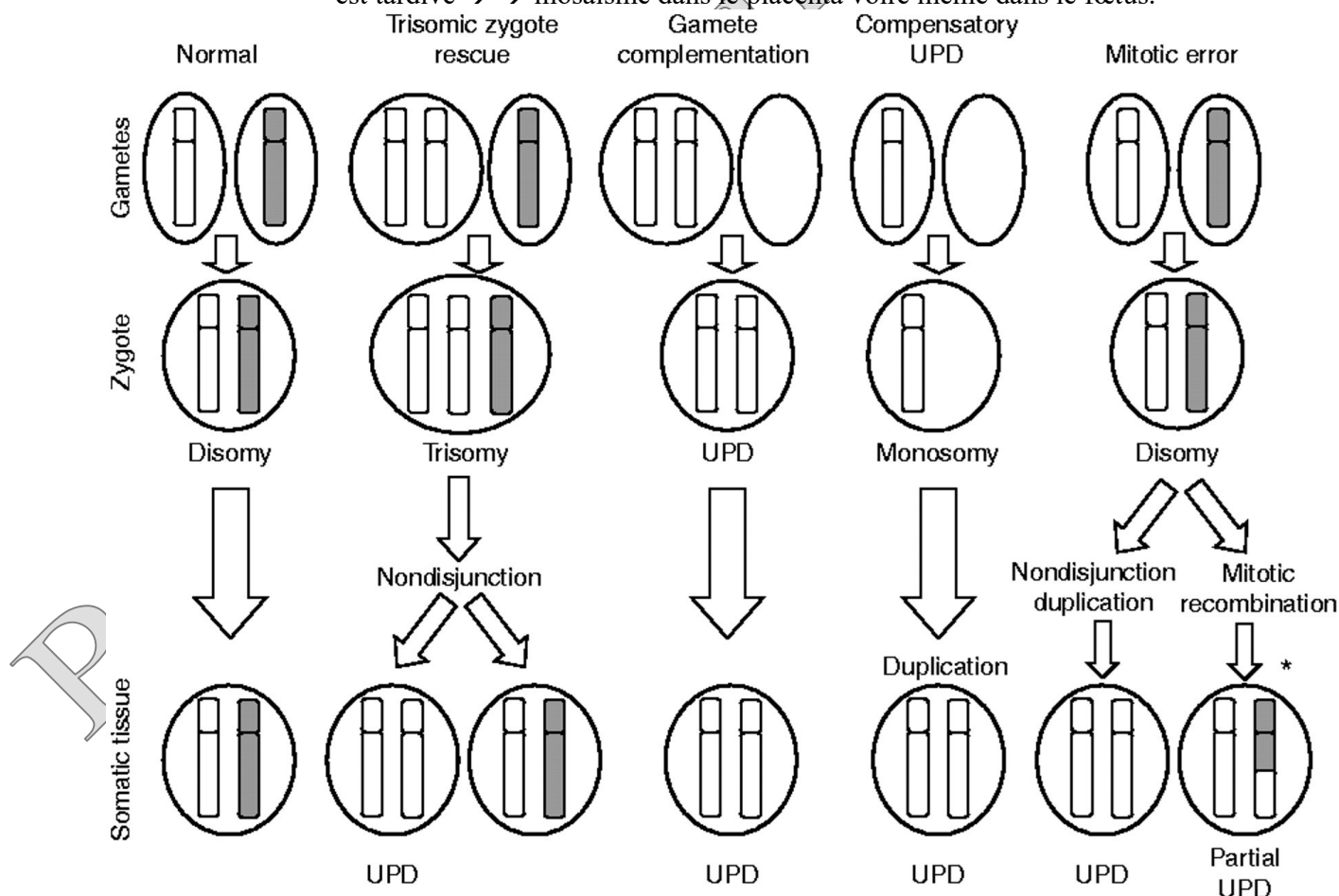
- o **Équilibrée :** sans perte ou gain de matériel génétique
- o **Déséquilibrée :** perte ou gain de matériel génétique.

IV- ANOMALIES DU NOMBRE DES CHROMOSOMES

Un organisme normal possède 46 chromosomes, on parle alors de **Diploïdie ou Euploïdie (2n chromosomes)**.

Les anomalies du nombre de chromosomes peuvent être classées en **deux grands types**.

- **L'aneuploïdie** : nombre de chromosomes = $2n \pm 1, 2$, ou 3 , par exemple :
 - $2n-1=45 \rightarrow$ **monosomie**
 - $2n+1=47 \rightarrow$ **trisomie**
 - $2n+2=48 \rightarrow$ **tétrasomie**
 - $2n-2=44 \rightarrow$ **nulosomie**
 - **Disomie uniparentale (DUP)**: 2 chromosomes d'une paire provenant du même parent alors que l'autre parent ne donne rien.
 - Si ces deux chromosomes sont homologues \rightarrow **Hétérodisomie**.
 - Si ces deux chromosomes sont des copies identiques \rightarrow **Isodisomie**.
 - **Mécanismes possibles d'une DUP** :
 - **Complémentation gamétique** : Zygote formé par un gamète disomique + gamète nullosomique
 - **DUP compensatoire** : Zygote **monosomique** puis **duplication** du chromosome \rightarrow isodisomie.
 - **Correction d'une trisomie** : Zygote trisomique + **Correction précoce de la trisomie**, ce qui peut conduire dans 1/3 des cas à une disomie. Si la correction est tardive \rightarrow mosaïsme dans le placenta voire même dans le fœtus.



▪ Conséquences possibles de la DUP :

- Apparition d'une **maladie soumise à empreinte parentale** (exp : 30% des cas de syndrome de Prader Willi et 5% des cas de syndrome d'Angelman).

- Apparition d'une **maladie AR** chez un enfant alors que seul l'un des deux parents est **hétérozygote** (situation rare dans la mucoviscidose).

- **La polyploïdie** : il peut s'agir de,
 $3n=69$ triploïdie
 $4n=92$ tétraploïdie

Les anomalies du nombre de chromosomes résultent de **3 mécanismes possibles** :

- **la non disjonction méiotique (méiose 1 ou 2) lors de la gamétogenèse** (voir figure suivante).
- **ou d'une anomalie de la fécondation**
- **ou de la non disjonction mitotique** : survenant après la fécondation et responsable de mosaïque cellulaire chez un même individu.

Anomalies par non disjonction des autosomes

En cas d'autosomes, on peut avoir les anomalies suivantes :

Trisomie :

Nombre total des de chromosomes dans la cellule = $2n+1 = 47$ chromosomes.

Elle est due à la présence d'un gamète ayant un chromosome en excès.

De nombreuses trisomies ne sont **pas viables** (fausses couches ou mort précoce après la naissance).

Seule la trisomie 21 (syndrome de Down) est viable.

- C'est la trisomie la plus fréquente.
- **Phénotype** : anomalies faciales, cardiaques, digestifs et retard mental d'intensité variable.
- On distingue :

○ La trisomie 21 libre

- 90% des cas
- Sa fréquence augmente avec l'âge de la mère (>35 ans ++).
- Due à une non disjonction méiotique
- Le caryotype dans ce cas s'écrit : 47, XX, +21 ou 47, XY, +21.

○ La trisomie 21 par translocation

- 10% des cas :
- Elle ne dépend pas de l'âge de la mère.
- translocation Robertsonienne entre le chromosome 21 et un autre chr : 14 ou 22, chez l'un des 2 parents qui est sain mais ses enfants peuvent avoir une trisomie 21.
- C'est la forme héréditaire de la trisomie 21.

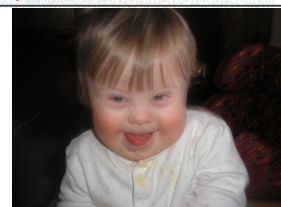
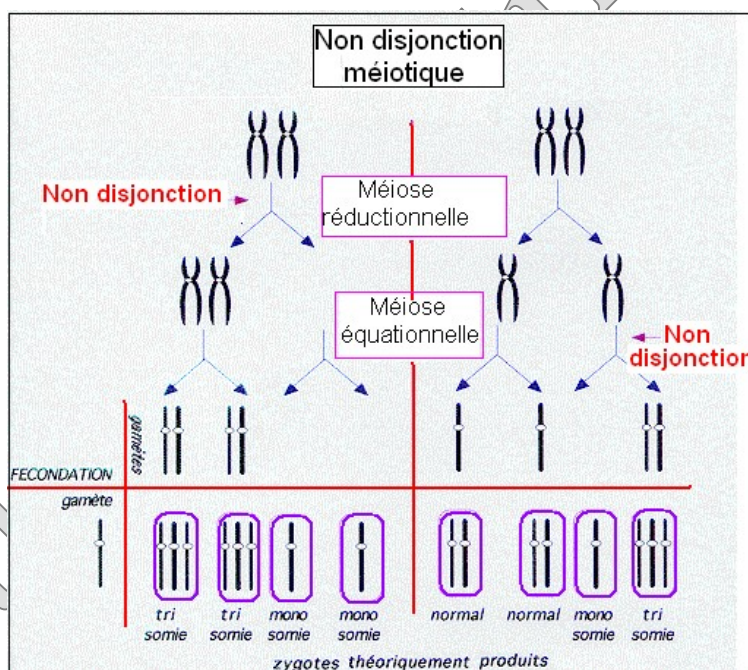
Monosomie :

Nombre total des chromosomes = $2n-1 = 45$ chromosomes.

Elle est due à la présence d'un gamète ayant un chromosome en moins.

Toutes les monosomies autosomiques sont létales.

Autres anomalies possibles mais létales :



La tétrasomie : $2n+2 = 48$ chr, un chromosome en 4 copies.

La double-trisomie = $2n + 1 + 1 = 48$ chr

La nullosomie : $2n-2 = 44$ chr, absence d'un paire de chromosome :

Anomalies par non disjonction du gonosome X

Triplo X ou Trisomie X ou Syndrome de « Superfemelle »:

Caryotype **47, XXX**

Due la présence d'un ovule avec 2X.

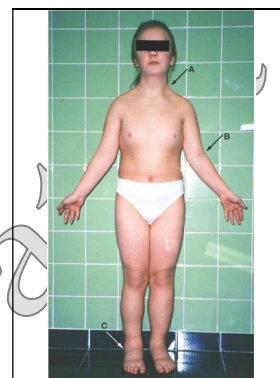
Favorisée par l'âge avancé de la mère.

Manifestations habituellement très discrètes et peuvent passer inaperçues à cause de l'inactivation du X surnuméraire.

Syndrome de Turner

Le caryotype est :

- dans $\approx 50\%$ des cas : **une monosomie de l'X ; caryotype 45, X0**
- dans ce qui reste :
 - soit une **mosaïque** : cellules 45, X0 et cellules normales 46, XX ou 46, XY
 - soit une **anomalie structurale de l'X** (délétion du bras q ou p, isochromosome ou chromosome dicentrique, chromosome en anneau), (voir plus loin).



Fillette avec retard de la croissance et de la puberté

Le phénotype est très variable mais **les deux signes les plus constants sont : un retard de croissance et des anomalies gonadiques (ovariennes).**

En sachant que l'un des deux chromosomes X est toujours inactivé (lyonisation), on pourrait penser que l'absence d'un X n'aurait pas de conséquence. **L'explication de la survenue de ce syndrome est la suivante :**

- Le phénomène de lyonisation n'est pas total, certains gènes du chromosome X y échappent ; ils sont appelés « gènes anti-Turner ».
- Donc l'absence d'un chromosome X ou son anomalie structurale entraîne l'absence des allèles de ces gènes qui ont besoin d'être en deux copies pour fonctionner.

Tétrasomie X ou Tetra X ou 48, XXXX

Pentasomie X ou Penta X ou 49, XXXXX

Ces syndromes sont rares.

Ces sujets sont de **sexe féminin avec des symptômes variables** pouvant ne pas être aperçus. Mais il faut s'avoir que **plus il y a de chromosome X surnuméraires, plus il y a des problèmes associés.**

Anomalies par non disjonction du gonosome Y

Syndrome de Klinefelter

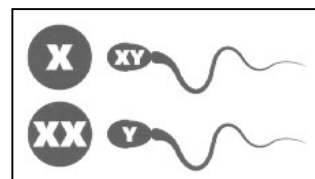
Présence d'un chromosome X supplémentaire chez un sujet de **phénotype masculin.**

Caryotype :

- Le plus souvent **47, XXY**.
- Parfois en **mosaïque** : cellules 47, XXY et cellules normales 46, XY ou 46, XX. Dans ce cas le phénotype est moins sévère.

Cause : non disjonction des gonosomes dans les ovules ou les spermatozoïdes.

Phénotype masculin + signes variables dont le plus constants est l'**atrophie testiculaire.**



Syndrome Double Y (syndrome de Jacob)

Caryotype : 47, XYY

Le sujet est de **phénotype masculin** de grande taille avec peu de signes caractéristiques.**Syndrome Double Y-Double X**

Caryotype : 48, XXYY

Le sujet est de **phénotype masculin** de grande taille avec un **retard mental** et autres signes.**Anomalies de la fécondation**Les anomalies de la fécondation entraînent des **polyploïdies**.**Triploïdies $3n = 69$ chromosomes**

La plus fréquente

Caryotype : 69, XXX ou 69, XXY ou 69, XYY.**Causes** :

- Fécondation d'un ovocyte normal par 2 spermatozoïdes ou par un spermatozoïde à 46 chromosomes.
- Fécondation par un spermatozoïde normal d'un ovocyte avec 46 chromosomes.

Conséquences : Fausses couches ou mort très rapidement après la naissance.

23 X	23X	23 X	46XY
23X		ovocyte normal + SPZ à 46chr	
23 X	23Y	46XX	23Y
23X			
23 X	23X	46XX	23X
23Y			
Ovocyte normal + 2 SPZ		SPZ normal + ovocyte à 46chr	

Tétraploïdies: $4N = 92$ chromosomes**Conséquences** : Fausses couches ou mort très rapidement après la naissance.**Anomalies du développement sexuel (DSD) :**

Il existe des cas particuliers d'anomalies du développement sexuel d'origine génétique (ce ne sont pas tous des anomalies chromosomiques, ils sont donc cités pour avoir toutes les causes. Concentrez-vous sur les anomalies des chromosomes sexuels).

Disorders of sexual development (New DSD nomenclature)					
Sex Chromosome DSD	46,XY DSD		46,XX DSD		
<ul style="list-style-type: none"> • 45,X Turner and Variants • 47,XXY Klinefelter and Variants • 45,X/46XY MGD • 46XX/46XY 	Disorders of Testicular Development	Disorders of Androgen Synthesis/Action	Disorders of Ovarian Development	Fetal Androgen Excess	
				CAH	Non CAH
				<ul style="list-style-type: none"> • 21-OH Deficiency • 11-OH Deficiency 	<ul style="list-style-type: none"> • Aromatase Deficiency • POR Gene Defect • Maternal • Luteoma • Iatrogenic

MGD: mixed gonadal dysgenesis, DSD: disorders of sexual development, AMH: anti-Müllerian hormone, CAH: congenital adrenal hyperplasia

Autres anomalies**1- Le marqueur chromosomique**

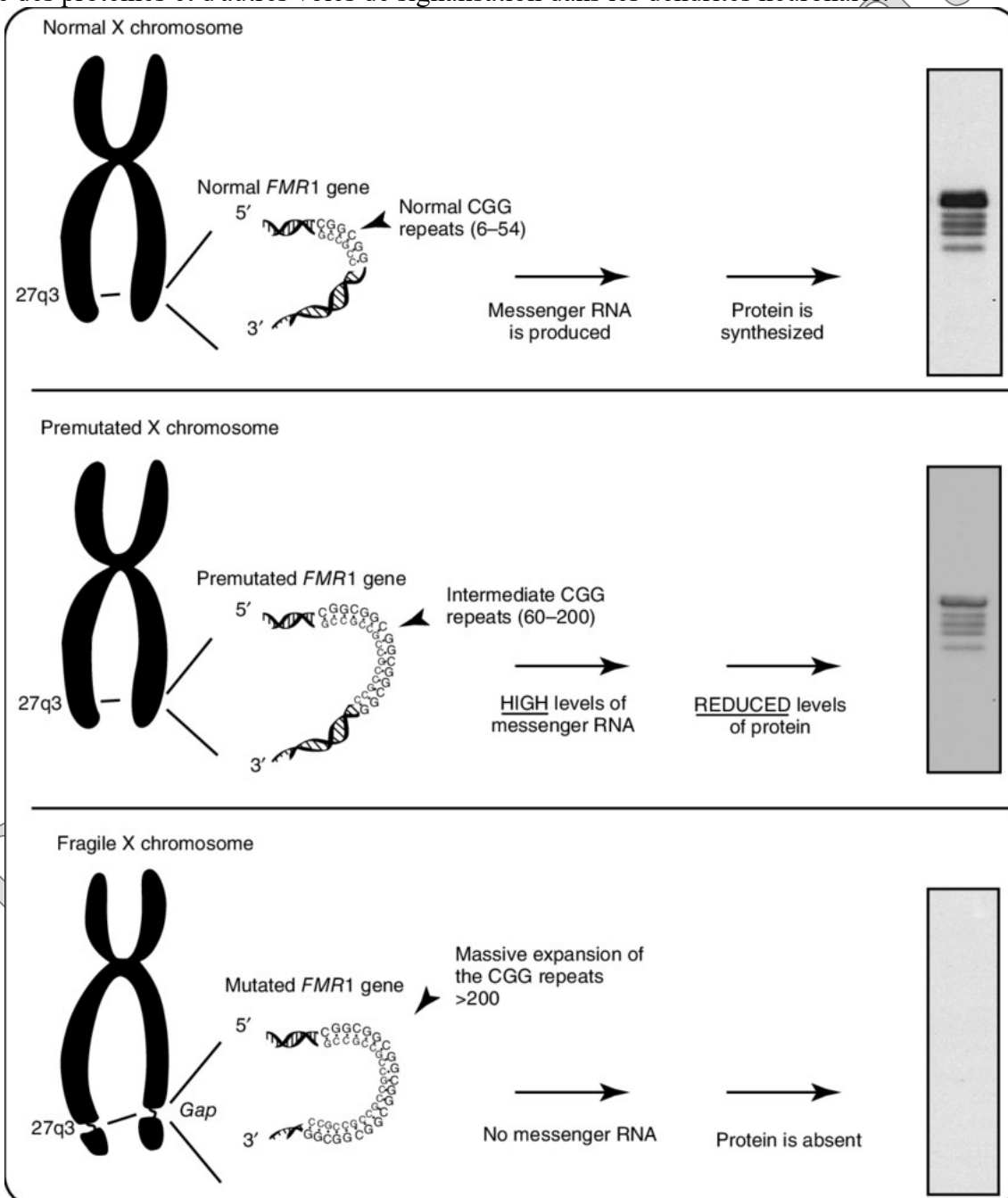
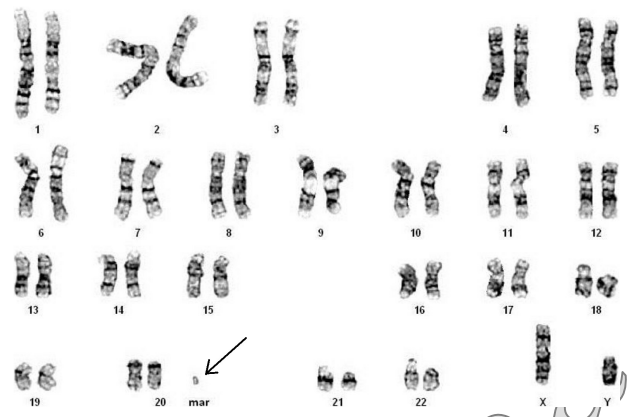
Est un élément chromosomique surnuméraire non reconnaissable. Il dérive souvent des chromosomes acrocentriques. On écrit : 47,XY,+mar

Les sites fragiles

Ce sont des zones de fragilité constitutionnelle localisée sur un chromosome donné et transmises comme un caractère **dominant**.

La plus connue est la fragilité du site q27.3 sur le chromosome X responsable du **syndrome de l'X fragile**, responsable d'un retard mental chez le garçon car il a une pénétrance réduite chez les femmes.

Il est causé par l'inhibition de la transcription du gène *FMR1*, causée par l'expansion de la répétition de triplets (CGG) dans ce gène. Les mutations complètes proviennent d'allèles instables appelés prémutations (55-200 répétitions CGG) qui vont s'expandre au-delà de 200 répétitions. Ce gène code normalement pour une protéine de liaison à l'ARN qui régule la synthèse des protéines et d'autres voies de signalisation dans les dendrites neuronales.

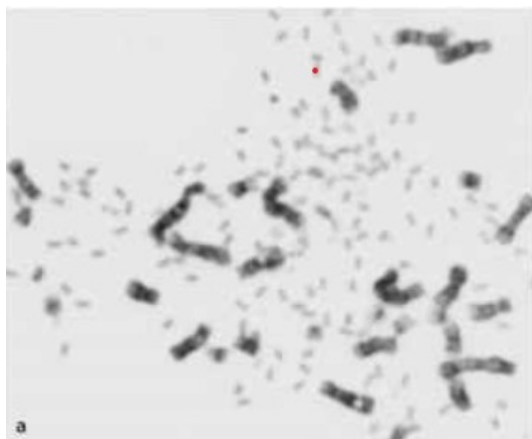


2- Les fragments minus (Dmin) et les HSR

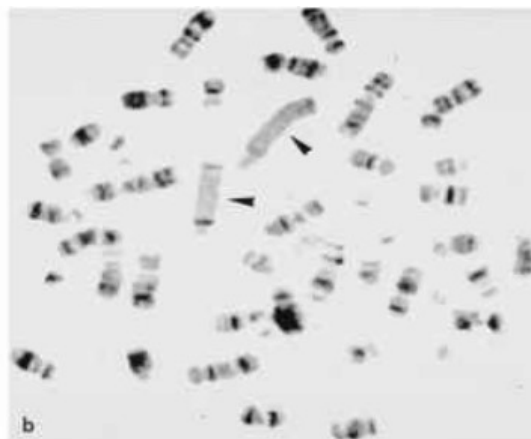
Les fragments minus (notés Dmin: double minute) sont de très petit(s) élément(s) supplémentaire(s) acentriques; généralement très nombreux.

Les HSR: noté ainsi pour "homogeneously staining region": sont des régions de coloration homogène et de taille variable, souvent importantes, présentes au sein d'un ou de plusieurs chromosome(s)..

Les DMin et HSR sont des éléments hautement corrélés à la présence d'une **amplification génique importante**. Se rencontrent lors des processus malins, en particulier en cas de **tumeur solide**



Dmin



HSR

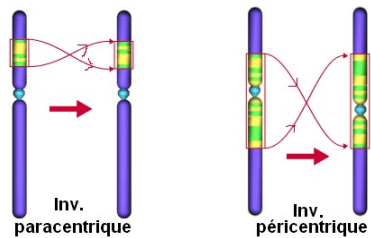
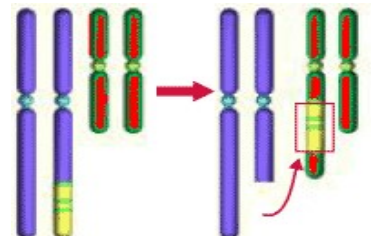
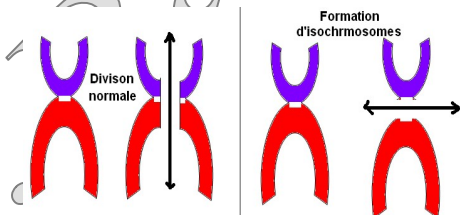
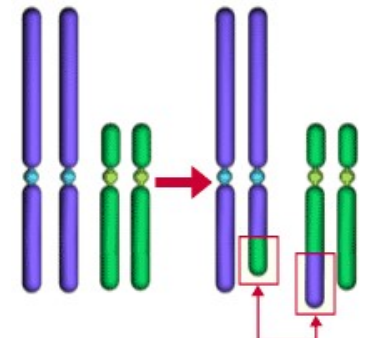
IV- ANOMALIES DE LA STRUCTURE DES CHROMOSOMES

Les anomalies de structure des chromosomes (ou réarrangements chromosomiques) sont dues à des cassures/recollement de ces derniers.

Elles peuvent être

- **Équilibrées** : sans perte ou gain de matériel génétique, dans ce cas le problème ne se pose que
 - lors de la formation des gamètes
 - ou si la coupure survient dans une séquence codante.
- **Non équilibrées** : avec perte ou gain de matériel génétique.

<p style="text-align: center;">Délétion (del)</p> <p>Peut avoir lieu dans n'importe quel chromosome Peut atteindre n'importe quelle grandeur. Ses conséquences dépendent de sa longueur et des gènes qui sont amputés.</p>	
<p style="text-align: center;">Chromosome en anneau (r)</p> <p>Délétion des télomères d'un chromosome suivie d'une fusion de ces deux extrémités formant un anneau.</p>	
<p style="text-align: center;">Duplication (dup)</p> <p>Dédoublage d'un fragment chromosomique</p>	

<p align="center">Inversion (inv para ou inv péri)</p> <p>Cassure d'un fragment de l'ADN puis sa rotation à 180° pour s'insérer sur le même chromosome.</p> <p>Si le fragment concerné inclut le centromère on parle d'inversion péricentrique, si non on parle d'inversion paracentrique.</p>	
<p align="center">Insertion (ins)</p> <p>Le fragment d'un chromosome s'insère dans un autre chromosome différent.</p>	
<p align="center">Isochromosome (i)</p> <p>C'est le résultat d'une division transversale et non pas longitudinale du chromosome lors de l'anaphase.</p> <p>L'isochromosome ainsi constitué a soit 2 bras courts, soit 2 bras longs.</p> <p>Anomalie plus fréquente dans le chromosome X.</p>	
<p align="center">Translocation réciproque (t)</p> <p>Echange de fragments chromosomiques entre 2 chromosomes non homologues.</p> <p>Relativement fréquente.</p> <p>Exp. : une leucémie (cancer du sang) appelée LMC (leucémie myéloïde chronique) est due à une translocation qui ramène une partie d'un gène <i>abl</i> (situé sur le bras long du chr 9) à côté du gène <i>bcr</i> (situé sur le bras long du chr 22), ceci entraîne la formation d'un « oncogène » : un gène qui cause le cancer. On écrit t (9 ; 22) (q34, q11).</p>	
<p align="center">Translocation Robertsonienne (t rob)</p> <p>Elle est aussi appelée fusion centrique de 2 chromosomes acrocentriques.</p> <p>Elle implique 2 chr. acrocentriques (le plus souvent chr 14 et 21 ou 22): Le bras court de ces chromosomes, porteur de séquences satellites est perdu et une fusion centrique de leur bras long s'en suit.</p> <p>Le phénotype des sujets porteurs de cette translocation est normal mais le problème survient lors de la formation des gamètes → risque de descendance ayant une trisomie/monosomie.</p> <p>On écrit : t rob, suivi d'une parenthèse indiquant le numéro de chaque chr. suivi de q (ex: t rob (14q21q)). On appelle le nouveau chr. résultant de la translocation : chr. dérivé et on l'écrit der (14 ; 21)</p>	