

Chapitre III

METHODES D'ETUDE DES CHROMOSOMES

3.1. En mitose

3.1.1. Le caryotype

Ensemble complet diploïde des chromosomes d'une espèce, d'une cellule, classés par paires et par ordre décroissant de taille. Dans la majorité des cas, le caryotype standard est établi sur des cellules somatiques à partir de chromosomes métaphasiques. Le caryotype humain normal comporte 46 chromosomes : 22 paires d'autosomes, notés de 1 à 22 en fonction de leur taille décroissante et 1 paire de gonosomes (ou chromosomes sexuels):XX chez le sujet féminin, XY chez le sujet masculin. Un caryotype normal en nombre est dit euploïde. Un caryotype anormal avec un chromosome en plus (trisomie) ou un chromosome en moins (monosomie) est dit aneuploïde.



Fig.1. caryotype humain

3.1.1.1. Technique d'obtention du caryotype

Les chromosomes ne sont visibles que pendant une courte période du cycle cellulaire, lors de la division cellulaire (mitose ou méiose). Toutes les techniques cytogénétiques visent donc à obtenir un maximum de cellules bloquées à ce stade. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des cellules en phase de multiplication active, soit spontanément (cas des villosités chorales ou de certaines cellules tumorales), soit par une culture préalable le plus souvent (fibroblastes, tout type cellulaire capable de se diviser) parfois associée à une stimulation (lymphocytes sanguins).

A/La culture cellulaire

L'étude conventionnelle des chromosomes nécessite donc des divisions cellulaires et commence par conséquent par une mise en culture des cellules avec ou sans un mitogène pour la stimulation des divisions selon que les cellules étudiées se divisent spontanément ou non. L'agent mitogène utilisé est souvent la Phytohémagglutinine (PHA) qu'on ajoute essentiellement pour les cellules sanguines lymphocytaires incapables de se diviser. Les autres

types de cellules fœtales, cutanées ou tumorales se divisent habituellement spontanément. Selon le type des cellules prélevées pour être étudiées, on distingue :

-Caryotype constitutionnel : qui étudie la constitution chromosomique de l'individu. Il peut être pratiqué sur lymphocytes sanguins avec stimulation à la PHA après prélèvement de sang veineux sur tube à héparine de Lithium) ou bien aussi sur les fibroblastes de la peau (biopsie cutanée).

-Caryotype prénatal : qui étudie la constitution chromosomique du fœtus. Il peut être pratiqué sur 3 types de prélèvements et donc de cellules selon l'âge du fœtus: cellules trophoblastiques du placenta prélevées par choriocentèse vers 8 à 12 semaines d'aménorrhée, les cellules amniotiques prélevées par amniocentèse écho-guidée du liquide amniotique vers 16 à 21 semaines d'aménorrhée, les cellules sanguines prélevées par cordocentèse écho-guidée à partir des vaisseaux du cordon ombilical à partir des 22 semaines d'aménorrhée.

-Caryotype somatique médullaire : qui étudie la constitution chromosomique des cellules de la moelle osseuse en cas de suspicion d'une hémopathie maligne (ponction sternale ou de la crête iliaque).

-Caryotype somatique tumoral : qui étudie la constitution chromosomique des cellules d'une tumeur maligne (biopsie ou pièce opératoire fraîches sans fixation dans le formol).

La culture cellulaire des cellules prélevées se fait en présence d'un milieu de culture adapté (exemple : le RPMI) dans un incubateur stérile (risque important d'infection) à une température de 37°C en présence de CO₂ (non indispensable pour les cellules sanguines). La durée de cette culture est variable en fonction du type cellulaire considéré et de la quantité de matériel biologique disponible au départ :

-Lymphocytes sanguins : c'est les cellules les plus utilisées. Le sang total recueilli stérilement sur un tube hépariné est incubé 48 à 72 heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (la PHA), ainsi que des antibiotiques pour éviter la pullulation microbienne.

-Fibroblastes : obtenues après biopsie cutanée le plus souvent nécessitant une culture cellulaire d'une à trois semaines.

-Cellules de la moelle osseuse: une culture de 24 à 48 heures en fonction de la pathologie étudiée.

-Cellules fœtales: cellules amniotiques (culture de 10 à 15 jours), cellule du trophoblaste, cellules fœtales en circulation, villosités chorales (ne nécessitant pas de culture).

Après l'obtention de cellules en multiplication active, la technique cytogénétique proprement

dite consiste aux étapes suivantes ;

B/Blocage des cellules en métaphase

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division. Classiquement c'est la Colchicine qui est utilisée ou son équivalent synthétique la Colcémide, ce qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des tubulines dans les microtubules.

C/Choc hypotonique

Les cellules sont plongées dans une solution hypotonique de chlorure de potassium (KCl) ce qui entraîne leur gonflement suivi de l'éclatement de membrane nucléaire et la dispersion des chromosomes. Cette étape est indispensable à l'obtention d'un étalement correct des chromosomes.

D/Fixations, étalement et vieillissement

Enfin, la dernière étape consiste en une fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique (carnoyacétique). Cette acidification du milieu permet l'arrêt du choc cellulaire. La répétition des fixations élimine les débris cellulaires avec un bon lavage des lymphocytes. La dernière fixation se fait dans un petit volume de carnoy acétique proportionnel au volume du culot chromosomique. Le culot chromosomique obtenu après cette dernière fixation sert pour l'étalement des métaphases sur lames de verre, dans des conditions de température et d'humidité bien précise (chambre humide ou thermothron).

La préparation est alors étalée en laissant tomber quelques gouttes (1 à 4) de la suspension cellulaire sur une lame propre par une pipette Pasteur à une distance de 30cm et avec un angle de 45°. Certains types cellulaires comme les fibroblastes adhèrent au support lors de la culture. On peut obtenir des métaphases à partir de ces cellules sans les détacher de leur support, toutes les étapes précédentes étant réalisées directement sur la surface de culture. Les lames étalées sont ensuite séchées à l'air libre puis remises à l'étuve à 37°C pour parfaire la fixation et permettre une meilleure dénaturation : c'est ce qu'on appelle le vieillissement.

E/Coloration

Plusieurs techniques de coloration sont utilisées pour l'obtention de cette coloration homogène des chromosomes.

Tableau I: Techniques de coloration homogène en cytogénétiques.

Colorant	Traitement préalable	Coloration obtenue
Giemsa	/	Bleu
Bleu de méthylène	/	Bleu-violacé
Bleu de toluidine	/	Bleu-violacé
Pyronine	/	Bleu-violacé
Quinacrine	/	Vert (fluorescent)
Iodure de propidium	/	Rouge (fluorescent)
DiAmino-Phényle-Indole (DAPI)	/	Bleu (fluorescent)

f)- Observation microscopique et acquisition des métaphases

Les lames sont ensuite analysées au microscope spécifique à contraste de phase, afin d'estimer le nombre et la qualité des chromosomes. Les métaphases sont photographiées et acquises par la caméra et l'ordinateur annexés au microscope. Les chromosomes sont classés automatiquement grâce à un logiciel particulier de caryotypage.

3.1.1.2. Classement des chromosomes métaphasiques

Dans un caryotype, on peut distinguer les différents chromosomes selon deux critères :

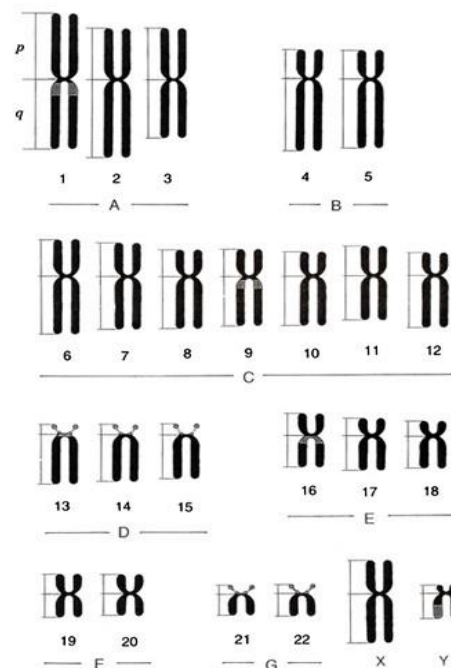
***La taille :** par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit.

***L'indice centromérique (IC) :** De part et d'autre du centromère, un chromatide présente 2 bras : le bras court ou bras p, placé en haut sur un caryotype, et le bras long (bras q) placé en dessous du centromère. L'indice centromérique c'est le rapport entre la longueur du bras court et la longueur totale du chromosome : $p/p+q$.

Ces critères de classification permettent de distinguer

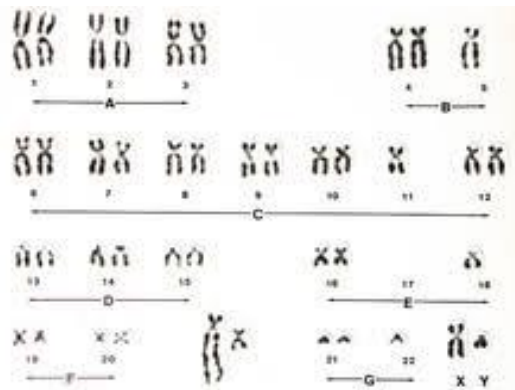
7 groupes de chromosomes :

- **Le groupe A :** Les grands médians et submédians 1, 2, 3.
- **Le groupe B :** Les grands distaux 4, 5.
- **Le groupe C :** Les médians et submédians moyens 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et X.
- **Le groupe D :** Les grands acrocentriques 13, 14 et 15.
- **Le groupe E :** Les petits submédians 16, 17 et 18.
- **Le groupe F :** Les petits médians 19, 20.
- **Le groupe G :** Les petits acrocentriques 21, 22 et Y.



*Le caryogramme

Également appelé : idiogramme. Un diagramme ou une photographie prise au microscope des différents d'une cellule, disposés en paires homologues et dans une séquence numérotée.



3.2. Le comportement méiotique

La méiose qui permet la reproduction sexuée. Concerne les cellules germinales qui donneront les gamètes. C'est une division réductionnelle puisque les cellules qui en découlent ont leur nombre de chromosomes réduits. Elle se déroule en plusieurs étapes formant un ensemble de deux divisions cellulaires, successives et inséparables.

La **méiose permet la production de gamètes haploïdes.**

La méiose est la **succession de deux divisions cellulaires précédées d'une réplication.**

Dans son schéma général, elle produit **quatre cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde.**

La première division de la méiose est une phase réductionnelle, où le stock de chromosomes et la quantité d'ADN sont divisés par deux.

La deuxième division de la méiose est une phase équationnelle.

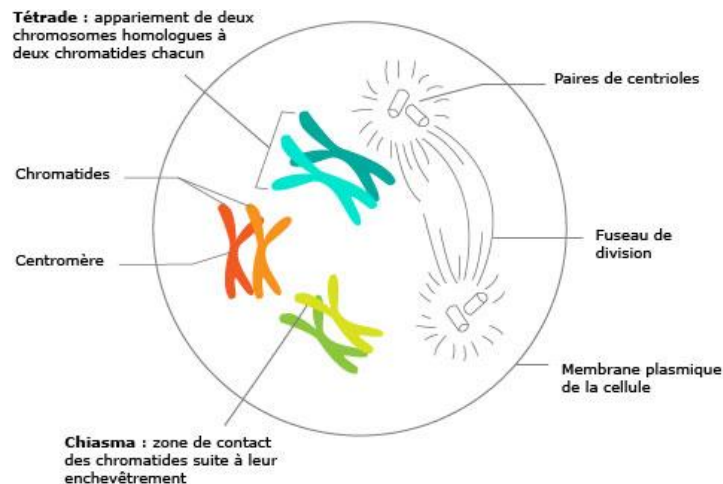
Elle a toutes les caractéristiques de la mitose, mais n'est pas précédée d'une inter-phase. Elle produit à partir de chaque cellule de la première division à $2n$ chromosomes doubles, deux cellules à n chromosomes simples.

A. La première division de la méiose

La première division de la méiose est une **phase réductionnelle**, où le stock de chromosomes et la quantité d'ADN **sont divisés par deux**. Elle assure ainsi le **passage de la diploïdie à l'haploïdie**.

Cette étape est précédée d'une **phase de réplication d'ADN**. Les étapes sont les suivantes :

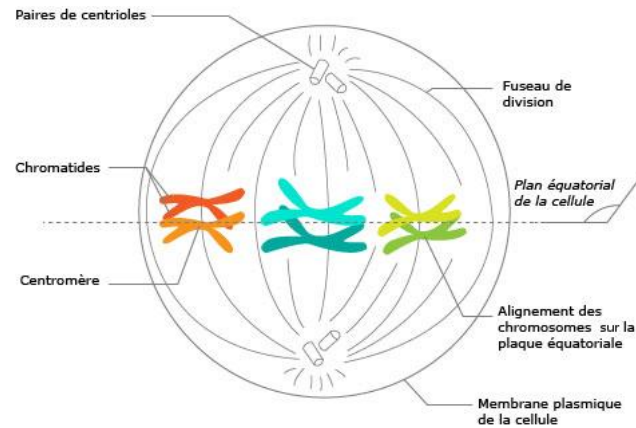
- **La prophase I** : les chromosomes doubles s'individualisent et se condensent. Les chromosomes homologues s'apparient sur toute leur longueur, s'enchevêtrent et forment des bivalents (ou tétrades) : ceux-ci sont fixés au niveau des chiasmata. On distingue alors n bivalents. C'est au cours de cette prophase de première division de méiose que se réaliseront les brassages intrachromosomiques ou « crossing-over ».



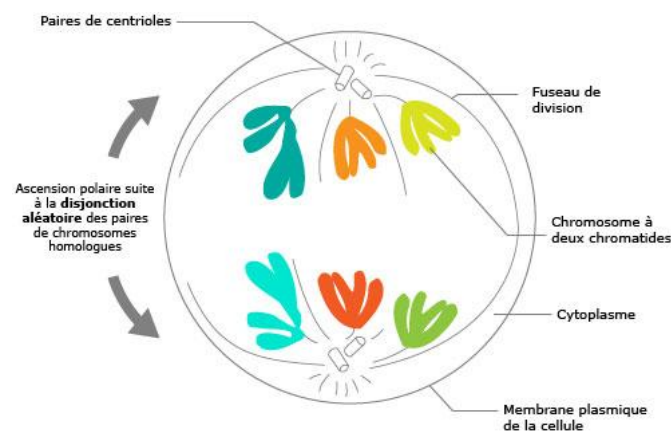
La prophase I est la première étape de la méiose I. Elle est précédée d'une phase de réplication, c'est à dire qu'avant de commencer on va doubler la quantité d'ADN ($2c$ à $4c$) : chaque chromosome a donc une paire identique lui correspondant. Le but de cette phase est de condenser la chromatine en chromosome. Cette prophase est longue, et on peut la diviser en 5 sous étapes :

- **Leptotène** : c'est le début de la condensation de la chromatine, l'apparition des chromosomes. On dit qu'il y a une individualisation car on passe de chromatine mélangée et emmêlée à des groupes séparés de matériel génétique, les chromosomes.
- **Zygotène** : les chromosomes sont reliés entre eux avec leur paire, par une structure appelée le complexe synaptonémal. La zone de contact s'appelle le *synapsis*.
- **Pachytène** : les chromosomes paires sont accolés, on obtient ce qu'on appelle des bivalents (car 2 chromosomes) ou des tétrades (car 4 chromatides). Des échanges de matériel génétique vont pouvoir se faire entre les deux chromosomes à leurs points de contact, grâce au complexe synaptonémal : on appelle ça des *crossing-overs*, et on obtient ce qu'on appelle des chromosomes remaniés. C'est durant ce stade aussi que se forme lors de la spermatogenèse la vésicule sexuelle, qui est le résultat du pseudo-appariement entre les deux gonosomes leur permettant de se condenser temporairement durant la méiose.
- **Diplotène** : On a un début de séparation des chromosomes. Les points de contacts s'appellent alors des chiasmas, où continuent toujours les *crossing-overs*. C'est durant ce stade dans l'ovogenèse que la méiose se bloque sous l'influence de l'Oocyte Meiotic Inhibitor (OMI).
- **Diacinèse** : dernière phase de la prophase 1 : la condensation des chromosomes n'est pas encore tout à fait maximale.

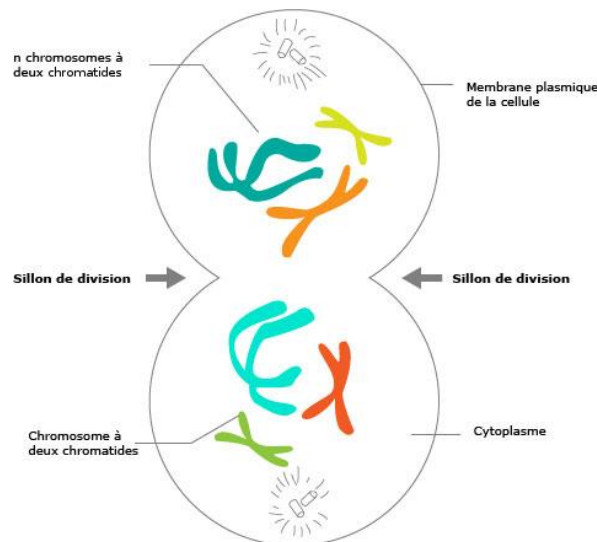
- **La métaphase I** : la condensation des chromosomes est maximale, les bivalents se disposent de façon aléatoire au niveau de la plaque équatoriale de la cellule. Les deux chromosomes de chaque paire se font face, car les centromères sont disposés de part et d'autre de cette plaque.



- **L'anaphase I** : c'est la séparation des chromosomes homologues de chaque paire (on parle de disjonction) et leur migration vers un pôle de la cellule. Il se constitue deux lots de n chromosomes à deux chromatides vers chacun des pôles de la cellule. Il n'y a pas de division des centromères.



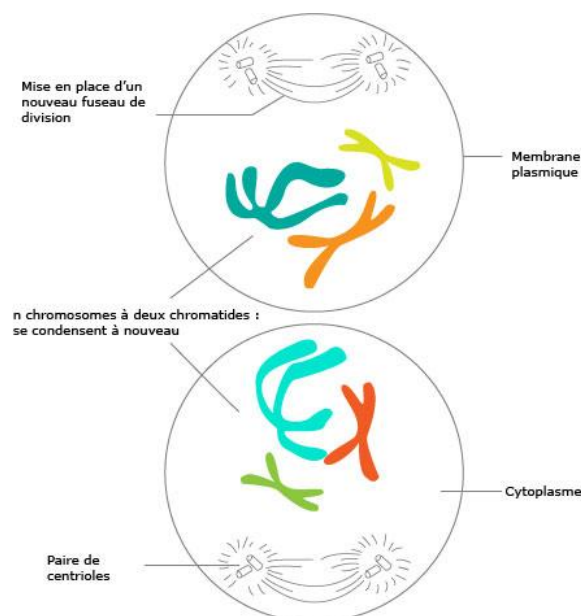
- **La télophase I** : c'est la formation de deux cellules haploïdes à n chromosomes doubles.



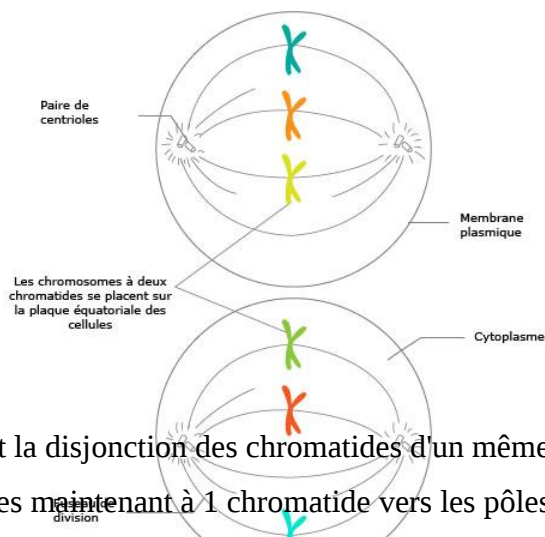
B/ La deuxième division de la méiose

C'est la **division équationnelle** de la méiose. Elle a toutes les caractéristiques de la mitose, mais n'est pas précédée d'une inter-phase. Elle produit à partir de chaque cellule à n chromosomes doubles, **deux cellules à n chromosomes simples**.

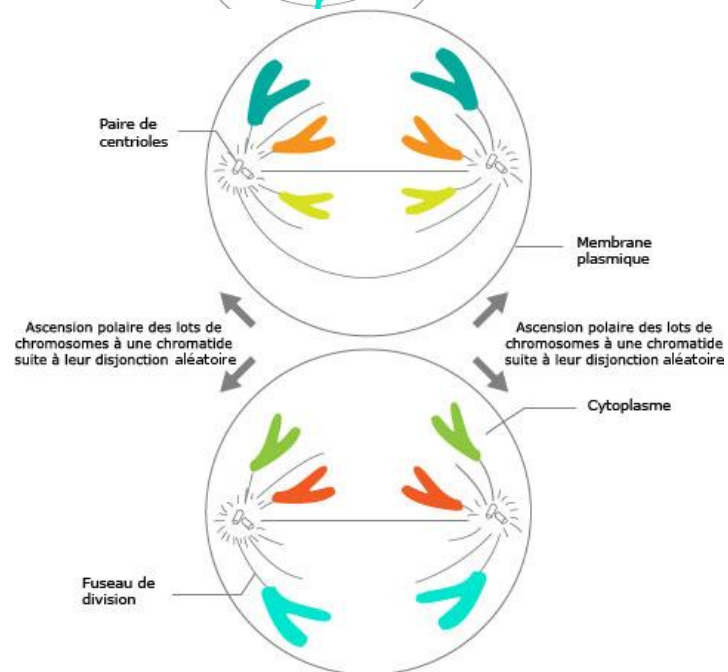
- **Prophase II** : elle est presque identique à la prophase I, mais les chromosomes sont déjà sous forme condensée donc il n'y a pas cette mise en place que l'on avait en prophase I.



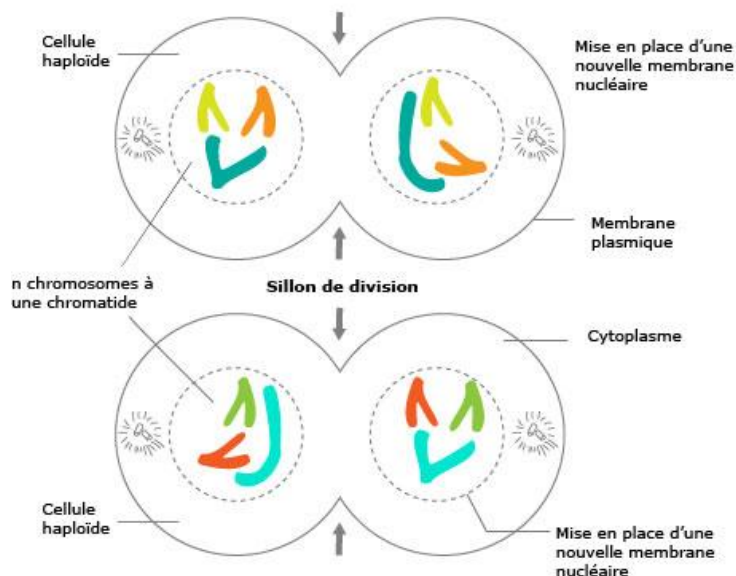
- **Métaphase II** : les chromosomes se placent sur la plaque équatoriale.



- **Anaphase II** : c'est la disjonction des chromatides d'un même chromosome et migration des chromosomes maintenant à 1 chromatide vers les pôles opposés de la cellule.



- **Télophase II** : séparation des cellules en 4 cellules de n chromosomes à 1 chromatide.



3.2.1. La recombinaison méiotique

La formation d'échanges chromosomiques, autrement appelés crossing-overs, est un processus crucial dans la méiose. En effet, la recombinaison méiotique est primordiale en permettant la création de la diversité et contribuent aussi à l'évolution des espèces par le biais brassage des allèles paternels et maternel et en établissant des connexions physiques (les chiasmata) entre les chromosomes homologues afin de maintenir leur attachement jusqu'à leur ségrégation, et ainsi permettre une séparation correcte des bivalents.. Ils sont visualisables en microscopie optique sous forme d'une structure appelée chiasma.

3.3. Banding

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration **inhomogène des chromosomes** par le **Giemsa et l'apparition de bandes**.

C'est la succession de **bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez tous les individus pour un chromosome donné**, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un « code à barres ».

La coloration des chromosomes en bande ou « **banding** », font apparaître le long des chromosomes une alternance de bandes transversales sombres et claires spécifique à chaque paire de chromosome homologue normal. Il existe différentes techniques de banding :

Les bandes chromosomiques sont caractéristiques de chacune des paires.

Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome. Plus les chromosomes sont condensés, moins on peut observer de

bandes et moins l'analyse permet de dépister des anomalies de petite taille.

- **Les bandes Q (Q pour quinacrine)** : la quinacrine est un dérivé fluorescent de la quinine qui est un agent intercalant avec une grande affinité pour les paires A-T. Cette technique a été mise au point par Caspersson, elle utilise la quinacrine qui permet, en lumière Ultra-Violette (UV), de distinguer sur chaque chromosome des régions qui se subdivisent en bandes caractéristiques d'un chromosome donné.

- **Les bandes G (G pour Giemsa)** : obtenues par digestion trypsine modérée des chromosomes. La technique a été mise au point par Seabright et Summer, les chromosomes sont soumis à l'action de la trypsine ; une enzyme protéolytique non spécifique, puis colorés avec le Giemsa. Après digestion, certaines parties absorbent fortement le colorant, d'autre l'absorbent beaucoup moins : c'est ce qu'on appelle l'affinité tinctoriale. Le profil de bande obtenu est identique à celui des bandes Q : on dit que les bandes G et Q sont superposables.

- **Les bandes R (R pour Reverse)** : obtenues par dénaturation thermique ménagée. La technique a été mise au point par Dutrillaux et Lejeune, les bandes R sont obtenues par dénaturation thermique à 85°C suivie d'une coloration au Giemsa. Cette technique marque les télomères en sombre à l'inverse des bandes Q et G, avec lesquelles les télomères sont pâles. Le profil de bande obtenu est l'inverse de celui obtenu par les bandes G : on dit que les bandes R sont complémentaires aux bandes G/Q.

D'autres techniques de marquage complémentaires existent qui permettent d'analyser certaines régions particulières du génome :

- **Les bandes C (C pour Centromérique)** : cette coloration par le Sulfate de Baryum permet de mettre en évidence l'hétérochromatine constitutive, qui correspond à des régions non codantes du génome comme les centromères de tous les chromosomes, les régions juxta centromériques des chromosomes 1, 9 et 16 ainsi que la moitié distale du bras long du chromosome Y.

- **NOR (Nucleolar Organizer Region)** : cette technique consiste en un dépôt de nitrate d'argent qui met en évidence les organisateurs nucléolaires. Ces structures correspondent aux régions du génome contenant les gènes codants pour les ribosomes.

- **Bandes T (T pour terminal bands)** : une dénaturation thermique poussée ne laisse persister le marquage qu'au niveau des télomères. En effet, ces régions sont très riches en GC et sont donc résistantes à l'action de la chaleur.

Quatre classes de bandes peuvent être reconnues :

- **Les bandes hétérochromatiques** : sont mises en évidence par des techniques de bandes C, ainsi que par diverses méthodes de coloration au fluorochrome, et correspondent à l'hétérochromatine

constitutive classiquement définie. Les régions hétérochromatiques des chromosomes restent normalement condensées tout au long de l'interphase et se trouvent généralement sous forme de blocs autour des centromères, mais sont parfois terminales ou interstitielles sur les chromosomes.

-**Les bandes euchromatiques** : forment un motif d'alternance de bandes colorées positivement et négativement (ou fluorescentes) sur toute la longueur des chromosomes et sont démontrées par les bandes G, les bandes R, les bandes Q et certains fluorochromes.

-**Les régions organisatrices du nucléole** : sont les segments de chromosomes qui contiennent les gènes de l'ARN ribosomal et qui donnent naissance aux nucléoles d'interphase. Ils peuvent être colorés à l'argent (coloration Ag-NOR).

-**Les kinétochores** : sont les structures centromériques par lesquelles les chromosomes mitotiques et méiotiques sont attachés aux microtubules du fuseau et sont généralement marqués à l'aide de sérums CREST auto-immuns.

3.3.1. Nomenclature

Il existe une nomenclature internationale (ISCN : International System for human Cytogenetic Nomenclature) permettant de définir précisément la constitution chromosomique d'un sujet.

- La formule chromosomique normale de l'homme : 46, XY.

- La formule chromosomique normale de la femme : 46, XX.

- Chaque bras chromosomique est divisé en régions numérotées de 1 à 3, chaque région est divisée en bandes numérotées, et certaines bandes en sous bandes. Donc pour la précision d'une zone sur un chromosome, il faut écrire :

1. le n° du chromosome,
2. le symbole du bras (p ou q),
3. le numéro de la région,
4. le numéro de la bande dans cette région +/- le n° de la sous-bande et de la sous-sous-bande

