**CHAPITRE 2 : Méthodes d’étude des chromosomes et établissement du caryotype**

 **Méthodes d’étude des chromosomes**

**I - En mitoses**

**Introduction**

Les techniques présentées ont pour objectif la réalisation de préparations chromosomiques qui permettent de :

- dénombrer les chromosomes

- et/ou étudier leur morphologie pour l'établissement de caryotypes ou pour la mise en évidence de modifications chromosomiques (délétions, réarrangements...).

Le matériel d'étude est constitué de semences germées, de plantes ou de tissus en culture *in vitro* placés dans des conditions permettant une croissance active. Le prélèvement des tissus a lieu au moment où le pourcentage de cellules en division (index mitotique) est élevé ; par exemple pour la préparation des protoplastes on utilise des colonies tissulaires en phase exponentielle de croissance.

A partir du prélèvement, 7 phases principales sont distinguées dans la réalisation des préparations.

1. ***Le prétraitement***

Il se fait par trempage des tissus en division dans un agent mitoclasique qui a pour effets principaux de :

- bloquer les divisions mitotiques au stade métaphase

- contracter les chromosomes

Les agents utilisés sont : la colchicine, l'a-bromonaphtalène, la 8-hydroxyquinoléine et l'eau froide (0 - 2 °C). L'α-bromonaphtalène est le plus utilisé en raison de sa facilité d'emploi et de son coût.

1. ***La fixation***

Le fixateur détruit toute vie cellulaire. Il doit avoir une action rapide pour bloquer toute évolution des divisions cellulaires et permettre de conserver l'intégrité structurale des chromosomes.

Les fixateurs utilisables sont très nombreux. Ceux qui sont utilisés dans les techniques sont : l'acide acétique et les « Fluids » I et II proposés par Carnoy (1886).

I = Ethanol acétique (3:1)

II = Ethanol - Chloroforme - Acide acétique (6:3:1)

1. ***Le stockage***

Il est possible de différer les autres phases. Le matériel peut être conservé pendant plusieurs mois dans l'éthanol, le plus souvent éthanol 70 % . Certains fixateurs comme le Carnoy I peuvent également servir de solution de stockage pour une période qui ne dépasse pas les 15 jours

1. ***L'hydrolyse***

Cette étape est généralement nécessaire pour obtenir ultérieurement un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle. L'agent le plus fréquemment employé pour le ramollissement des tissus est l'acide chlorhydrique. Son action peut être associée à celle d'enzymes. L'hydrolyse dissout les sels pectiques de la lamelle moyenne et permet l'éclaircissage du cytoplasme. En outre, l'acide chlorhydrique libère les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose.

1. ***La coloration***

Le réactif de Schiff préparé à partir de la fuchsine basique est le colorant le plus utilisé. Il se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes. Fréquemment, cette technique de coloration est appelée technique « Feulgen » car elle a été décrite pour la première fois par Feulgen (1926).

1. ***Le montage***

La majorité des techniques présentées concernent les mitoses dans les méristèmes racinaires. Dans ce cas, la zone méristématique hydrolysée et colorée est isolée, déposée sur une lame dans une goutte d'eau acétique ou de carmin acétique et écrasée entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules. Cette dissociation est plus difficile si les tissus ont été préalablement stockés dans l'alcool pendant une longue durée et si la quantité de tissu déposé est importante. Il faut éviter un écrasement trop violant car il y’a risque d’éclatement des cellules et donc d’observation de cellule incomplètes. Puis, afin d’assure un bon étalement des chromosomes, un léger chauffage de la lampe est conseillé avant d’exercer une pression homogène sur la lamelle.

1. ***L’observation***

Les chromosomes végétaux ont une longueur moyenne d’environ 6µm. Les cellules en division sont repérées rapidement au microscope photonique à l’aide d’un objectif de faible grossissement (G=10 généralement).L’observation des chromosomes est faite à un grossissement supérieur. Le plus souvent les combinaisons (oculaire X objectif) utilisées donnent des grossissements compris entre 1000 et 1500.

L’observation peut être différée de quelques jours par la réalisation d’un montage temporaire. Celui-ci, obtenu en lutant la lamelle avec de la dissolution de caoutchouc évite un desséchement rapide de la préparation. La conservation des préparations pendant plusieurs années peut être souhaitée pour de nombreuses raisons (lampe de démonstration, possibilité d’étudier ultérieurement le matériel dans un autre objectif…). Il est alors nécessaire de réaliser des montages permanents.

1. **Le montage permanent**

Deux méthodes différentes sont appliquées suivant les auteurs :

* Avec séparation lampe-lamelle
* Sans séparation lampe-lamelle

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Décollage | Déshydratation | Séchage | Montage |
| Avec séparation lampe-lamelle | Glace carboniqueEau acétique 45 | Ethanol absolu | Soufflerie pendant 30mn à température ambiante pendant plusieurs jours | -Baume du -Canada-Euparal-Depex |
| Sans séparation lampe-lamelle |  | Dans vapeurs d’éthanol pendant 4 à 5jours à température ambiante ou une nuit à 4°C |  | Euparal (sur papier absorbant alcoolisé ou en boite de Pétri |

1. **Sans séparation lampe-lamelle**

Coloration des cellules au carmin additionné de perchlorure de vfer

Décoloration

* Incliné légèrement la lame
* Mettre quelques gouttes d’acide acétique 45 au bord de la lame
* pomper avec un papier absorbant l’excès de colorant entrainé entre lame et lamelle par le passage de l’eau acétique.

Mettre l’ensemble lame et lamelle dans une boite étanche ; sur un (lit) de papier absorbant imbibé d’alcool 100°. Les vfampeurs d’alcool vont se substituer à l’acide acétique entre lampe et lamelle. Laisser 4 – 5 jours.

Dans la même boite, déposer au bord de la lamelle quelques gouttes d’Euparal (soluble dans l’alcool), qui va se glisser entre lame et lamelle, (on incline pour une meilleure pénétration, on peut mettre alternativement des 2 cotés de la lamelle). Laisser la lampe à plat sur le papier absorbant alcoolisé durant une journée.

Sortir l’ensemble lame-lamelle. Laisser sécher à l’aire libre

1. **Avec séparation lampe-lamelle**

***Séparation lame- lamelle***

La face supérieure de la lampe et la position de la lamelle sur la lampe sont repérées par un marquage du verre avec la pointe du diamant.

Cet ensemble ainsi marqué, est retourné dans une boite Laverran immergé dans de l’eau acétique à 45. La lamelle va se décoller de la lampe et tomber au fond de la boite.

***Déshydratation***

La lame et la lamelle sont traitées séparément. Elles sont immergées dans deux bains successifs d’éthanol absolu pendante au moins 5 minutes chacun :

* La lame dans un tube de Borel
* La lamelle dans une boite de Pétri (la lamelle est maintenue dans la même position que dans la boite de Lavferran).

***Séchage :*** On fait sécher séparément la lame et la lamelle à température ambiant pendant au moins 48h.

 ***Montage : On*** dépose une goutte de conservateur (Baume de Canada, Euparal, Dépex), sur la face supérieure de la lampe au milieu des 4 points repères et on y retourne la lamelle : la position initiale est ainsi reconstituée.

Les excès de conservateur sont retirés à l’aide d’un buvard et on laisse sécher le montage à plat, à température ambiante pendant au moins une semaine.

Procéder ensuite à un nettoyage léger de l’ensemble avec un coton imbibé d’alcool ou de xylol.

**I-1 Le caryotype**

**Définition :**

Le caryotype est une représentation photonique des chromosomes d’une espèce donnée réunies par paires et classés en fonction de leurs longueurs totales.

1. **Le caryotype et la notion de symétrie**

 Le concept d’asymétrie des chromosomes dans la description du caryotype a été utilise pour la première fois par **Levitzy 1931** ainsi il prend en considération la proportion des chromosomes a centromère subterminal et la différence de taille entre les chromosomes de la même garniture

* **Le caryotype symétrique**

Il présente des chromosomes de taille voisine ayant des centromères médians ou submedians ce qui lui donne un aspect homogène **(Ias% ≥ 50%)**

* **Le caryotype asymétrique** possède des chromosomes à centromère subterminal ou terminal et une différence importante entre les longueurs relatives des chromosomes de la même garniture **( Ias% ≤ 50%)**
1. **Etablissement du caryogramme**

Par définition un caryogramme est une représentation systématisée des chromosomes d’une cellule associés d’après leurs caractères morphologiques. Pour établir un caryogramme, il faut connaitre pour chaque chromosome : sa morphologie, sa longueur totale, leur type chromosomique pour pouvoir apparier avec son homologue ; puis classer les chromosomes par longueur décroissant (il est diploïde).

Le nombre de chromosomes étant normalement constant au sein d’une espèce et la morphologie de chaque paire chromosomique étant caractéristique, il est impossible d’obtenir par cellule un caryotype, représentation sous forme de dessin ou de photographie de chaque paire chromosomique. L’ensemble de caryotype permet d’établir une carte d’identité chromosomique ou caryogramme ou idiogramme, représentation schématique du génome haploïde.

Elle peut être recherchée :

* pour des raisons d’ordre taxonomique correspondant alors à l’acquisition d’un nouveau critère de classification
* pour l’analyse de lignées d’addition ou de substitution, de mono ou de polysomie
* pour l’étude des remaniements chromosomique.

L’identification des chromosomes en prophase de méiose est possible chez quelques rares espèces (maïs, tomate). Cependant c’est d’une façon générale, lors de la métaphase de mitose, que l’observation est la plus aisée.

Trois critères permettent de distinguer les chromosomes métaphasiques :

* La longueur de chaque chromosome
* La position de la constriction primaire (centromère)
* L’existence et la localisation de constriction secondaire correspondant généralement à des organisateurs nucellaires. Leur position fréquemment distale sur un bras chromosomique détermine l’existence de satellite

Les variations observées d’une cellule à l’autre sont dues à des différences de contraction du stock chromosomique, à la préparation du matériel ou à l’état physiologiques des cellules. Elles se superposent aux imprécisions inventables des mesures. L’établissement d’un caryogramme repose sur l’analyse d’un minimum de 15 à 20 plaques métaphasiques complètes présentant des chromosomes bien étalés et très nets.

Les variations observées ne permettent la description précise des chromosomes que sous forme de rapports. Trois paramètres sont utilisés :

* La longueur relative
* L’indice centromérique
* La présence et la position des constrictions secondaires qui caractérisent une ou plusieurs paires de chromosomes.
1. **Etablissent d’un idiogramme**

L’idiogramme est une représentation schématique des chromosomes d’un caryotype donné à partir de plusieurs caryogrammes d’une même population. Il est le plus souvent haploïde.

1. **La nomenclature des chromosomes selon la position du centromère**

Les différentes mesures effectuées pour chaque chromosome sont les suivantes :

* Longueur du bras long **BL**
* Longueur du bras court **BC**
* Longueur totale du chromosome **LT = BC + BL**
* Longueur totale relative **LTR = (LT/∑ LT) x 100**
* Rapport bras long sur bras court **r = BL/BC**
* Différence entre la longueur du bras long et la longueur du bras court **d= BL-BC**
* Indice centromérique pour chaque paire chromosomique **Ic% = (BC/BT) x100**
* Indice d’asymétrie du caryotype **Ias % = ( ∑BL / ∑LT) x 100**

En fonction de la disposition du centromère sur les chromosomes ils peuvent être classes en différents types :

**Le chromosome métacentrique** : le centromère se localise dans la région médiane

**Le chromosome submetacentrique**: le centromère se localise dans la région submediane.

**Le chromosome subtelocntrique**: le centromère se localise dans la région subterminale.

**Le chromosome acrocentrique** : le centromère se localise dans la région terminale.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Position du centromère** | **d** | **r** | **IC** | **Type de chromosome** |
| **Point médian** | 00.0 | 01.1 | 50 | **Métacentrique (sens stricte) M** |
| **Région médiane** | 00.0-02.5 | 1-1.7 | [37.5-50] | **Métacentrique (sens large) m** |
| **Région submediane** | 2.5-5.0 | 1.7-3 | [25- 37.5] | **Submetacentrique****sm** |
| **Région subterminale** | 5-7.5 | 3-7 | [12.5- 25] | **Subtelocentrique****st** |
| **Région terminale** | 7.5-10 | 7-∞ | [00- 12.5] | **Acrocentrique****t** |
| **Point terminal** | 7.5-10 | ∞ | 00 | **Télocentrique** **T** |

1. **En méiose**

**Introduction**

L’étude des appariements chromosomiques en méiose est faite en prophase I et en métaphase I dans les cellules mères des grains de pollen (C.M.P).

Une fiche se rapporte à la prophase I et décrit une technique qui permet d’analyser en microscope électronique à ce stade, sans avoir recours aux coupes sériées.

Cette technique est basée sur l’éclatement des cellules par choc osmotique après digestion enzymatique de la paroi squelettique. Elle permet un étalement parfait des associations chromosomiques au zygoténe et au pachytène, au moment ou elles forment de longs filaments enchevêtrées ; ceci facilite l’étude de l’appariement et de ses différentes modalités en microscope photonique et électronique.

L’ensemble des autres fiches concerne essentiellement les appariements des chromosomes en métaphase I. l’observation des différentes vfigures méiotiques (univalents, bivalents…), est réalisée en microscopie optique et aboutit à l’établissement d’un comportement méiotique.

Les différentes techniques décrites pour l’observation de la métaphase I se décomposent en 6 étampes communes :

* le prélèvement
* la recherche du stade
* la fixation
* le stockage
* le montage
* l’observation

***1- le prélèvement***

Les premières inflorescences parvenues au stade de la métaphase I, sont propices à de bons montages en raison :

* Du synchronisme des divisions méiotiques
* De la taille normale des étamines

Les conditions climatiques, dans lesquelles sont placées les plantes, jouent un rôle important dans la réalisation de bons montages. Des prélèvements effectués en début de matinée, dans des conditions de température fraiche et d’humidité élevée, donnent de bons résultats.

figure

***2- la recherche du stade***

Certaines espèces permettent une présélection des étamines au stade recherché. Une étamine est écrasée, entre lampe et lamelle : si les cellules mères des grains de pollen sont à la métaphase I, les étamines restantes de la même fleur sont fixées puis stockées.

D’autres espèces ne permettent pas cette présélection car à l’intérieur d’un même bouton, les différentes étamines ne sont pas au même stade. Dans ce cas, la totalité de l’inflorescence est prélevée puis fixé.

***3- la fixation***

Le fixateur dont pénétrer rapidement dans les tissus cellulaires et assurer un arrêt rapide de la division sans léser ou détruire la structure chromosomique. La fixation à également un rôle aseptisant sur les tissus car pour une bonne conservation du matériel végétal, tout risque de décomposition doit être écarté.

Les fixateurs utilisés sont très nombreux. Les plus employés sont :

* Les fluides proposés par Carnoy (1886)
* F.A.A (éthanol- formol-acide acétique : 14 :6 :11)
* Butanol-acide acétique acide chromique : 9 :3 :2)
* Carmin acétique du Belling
1. ***le stockage***

Cette opération permet de différer les observations qui ne sont pas toujours possibles au moment du prélèvement. Le stockage se fait généralement dans l’éthanol 70% ou 50%.

Chez certaines espèces (Triticées), la durée d’un stockage minimum de quelques semaines dans l’éthanol à 70% est indispensable au montage d’une bonne préparation microscopique ; alors que chez d’autres espèces (Crucifères), une trop longue conservation est néfaste. Dans le premier cas, cela se traduit par une grande fragilité de la paroi des CMP, aboutissant lors du montage, à son éclatement suivi d’une dispersion des chromosomes. Dans le deuxième cas, c’est la rigidité de la paroi cellulaire qui empêche toute dilatation du cytoplasme et donc nuit à un bon étalement de la plaque métaphasique.

Le carmin acétique et l’éthanol acétique peuvent jouer parfois le double rôle de solution de fixation et de solution de stockage.

1. ***Le montage***

Le montage se fait sous loupe binoculaire et peut être comparé à un frottis ; la souplesse des tissus permet une libération et une dispersion des CMP. On peut distinguer trios phases principales dans le montage :

1. **La coloration :** sur une lame, dans une goutte de carmin acétique, l’étalement est dilacérée à l’aide d’une aiguille montée sur un roule-goupille.les CMP sont libérées dans le colorant et les débris de l’anthère sont retirés. La préparation est préalablement enduite d’un léger film d’albumine glycérinée. Cette opération permet une meilleure rétention des cellules entre la lame et la lamelle lors des phases suivantes du montage.

La préparation est chauffée légèrement afin de permettre au cytoplasme de gonfler, aux parois cellulosiques et callosiques de s’ouvrir et d’accentuer la coloration des chromosomes.

1. **La régression :** la régression à l’eau acétique 45% va éclaircir le cytoplasme et permettre de dissocier les configurations chromosomiques. Un légère chauffage à ce stade accentue encore la régression.
2. **L’étalement :** lorsqu’un bon contraste entre le cytoplasme est la coloration des chromosomes est obtenue, on procède à l’étalement proprement dit en exerçant une pression plus ou moins forte, avec le pouce, sur la lamelle.

Parfois la régression est excessive et les chromosomes sont plutôt décolorés. L’utilisation de la fuschine carbolique permet alors une recoloration de la chromatine. Le principe de dispersion de ce colorant sous la lamelle est le même que celui appliqué dans le cas de la régression par l’eau acétique.

La coloration par la fuschine carbolique permet d’effectuer les observations dans des conditions plus confortables et d’obtenir de très bons résultats dans les prises de vues. Ces deux critères conduisent à son utilisation systématique par certains laboratoires.

1. **L’observation**

Elle se réalise dans les mêmes conditions que celles décrites à la division mitotique.