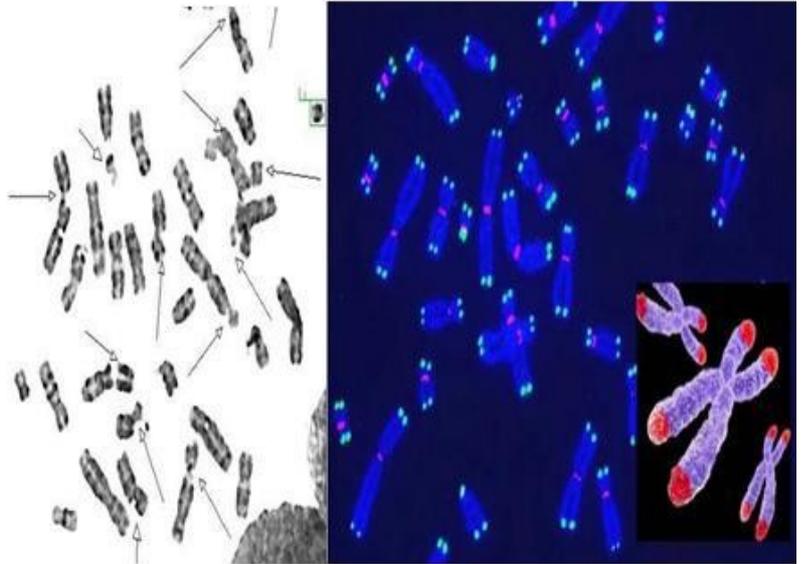
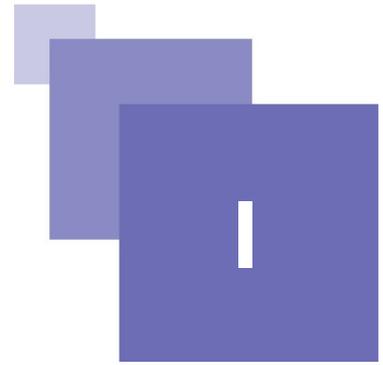


Chapitre III : Les techniques de marquage des chromosomes



MENAKH MOUNA
DÉPARTEMENT DES SCIENCES NATURELLES
ET DE LA VIE
CENTRE UNIVERSITAIRE DE MILA
EMAIL : M.MENAKH@CENTRE-UNIV-MILA.DZ

Les techniques de marquage des chromosomes



A. Définition du caryotype

Définition

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.

- 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**.

Exemple

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.

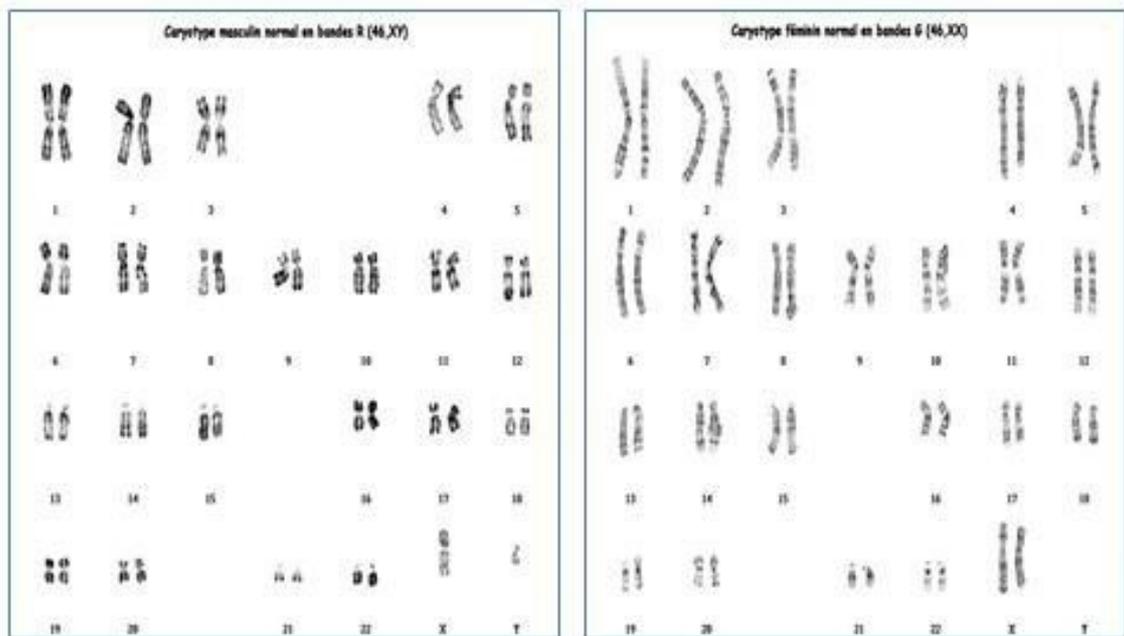


Figure 01 : caryotype humain normal (féminin à droit , masculin à gauche).

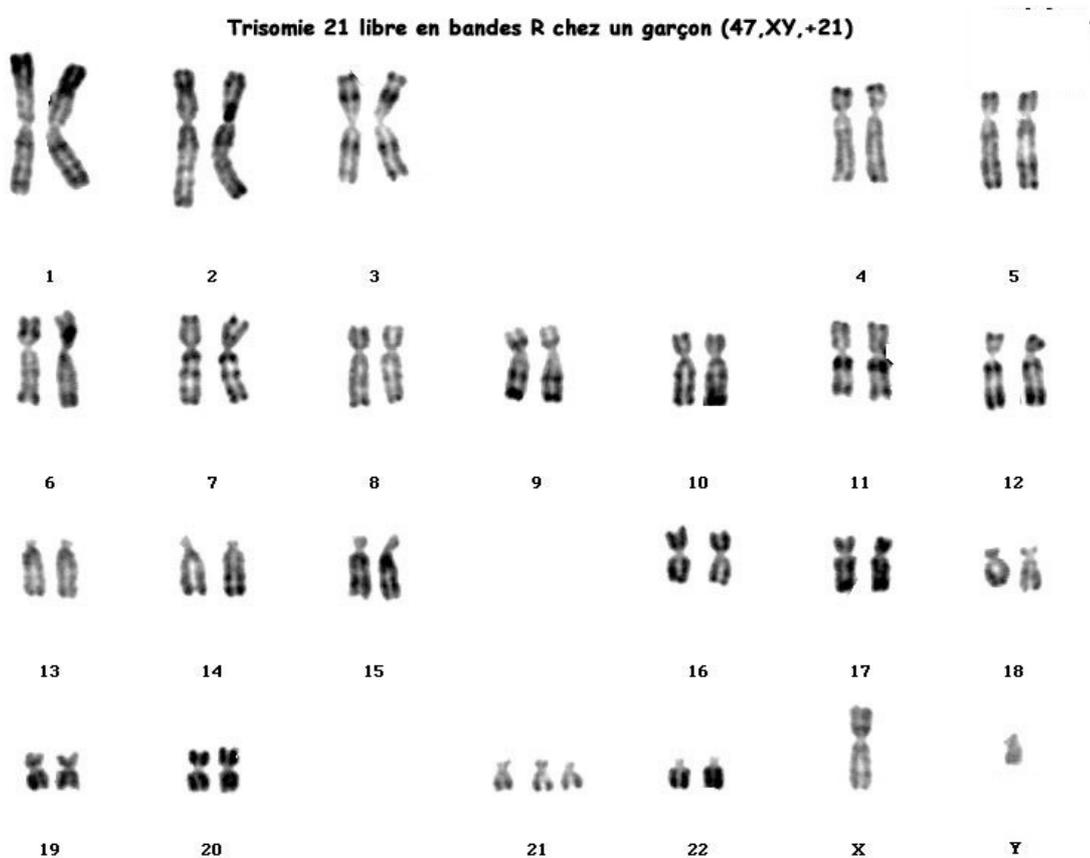


Figure 02 : Caryotype anormal avec un chromosome en plus (trisomie 21)

B. Technique d'obtention des caryotypes

1. Introduction

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.

Selon le type des cellules prélevées pour être étudiées, on distingue :

1. **Caryotype constitutionnel** qui étudie la constitution chromosomique de l'individu. Il peut être pratiqué sur lymphocytes sanguins avec stimulation à la PHA (Phytohémagglutinine) après prélèvement de sang veineux sur tube à héparine de Lithium) ou bien aussi sur les fibroblastes de la peau (biopsie cutanée).
2. **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.
3. **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).
4. **Caryotype somatique tumoral** qui étudie la constitution chromosomique des cellules d'une tumeur maligne (biopsie ou pièce opératoire fraîches sans fixation dans le formol).

Méthode : Technique d'obtention du caryotype

1. Culture cellulaire :

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 :

- Les lymphocytes sanguins (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 (PHA) ainsi que des antibiotiques pour éviter la pullulation microbienne.
- Les fibroblastes : obtenus après biopsie cutanée le plus souvent nécessitant une culture cellulaire de une à trois semaines.
- Les cellules de la moelle osseuse : une culture de 24 à 48 heures en fonction de la pathologie étudiée.
- Cellules fœtales :(cellules amniotiques) une culture de 10 à 15 jours.

2. 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.

3. 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.

4. Fixations/ Etallement

Enfin, la dernière étape consiste en une fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique (carnoy acétique). 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 précises (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 30 cm 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 .

5. Coloration

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

Tableau I : Techniques de colorations homogènes en cytogénétiques (Abdelmoula et al., 2000).

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

Complément : 6 . Dénaturation / Coloration

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 normaux. Il existe différentes techniques de banding :

-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 trypsinique 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'autres 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.

Cf. "Techniques Caryotypes (web)"
Techniques Caryotypes

Complément : 7 . 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**.

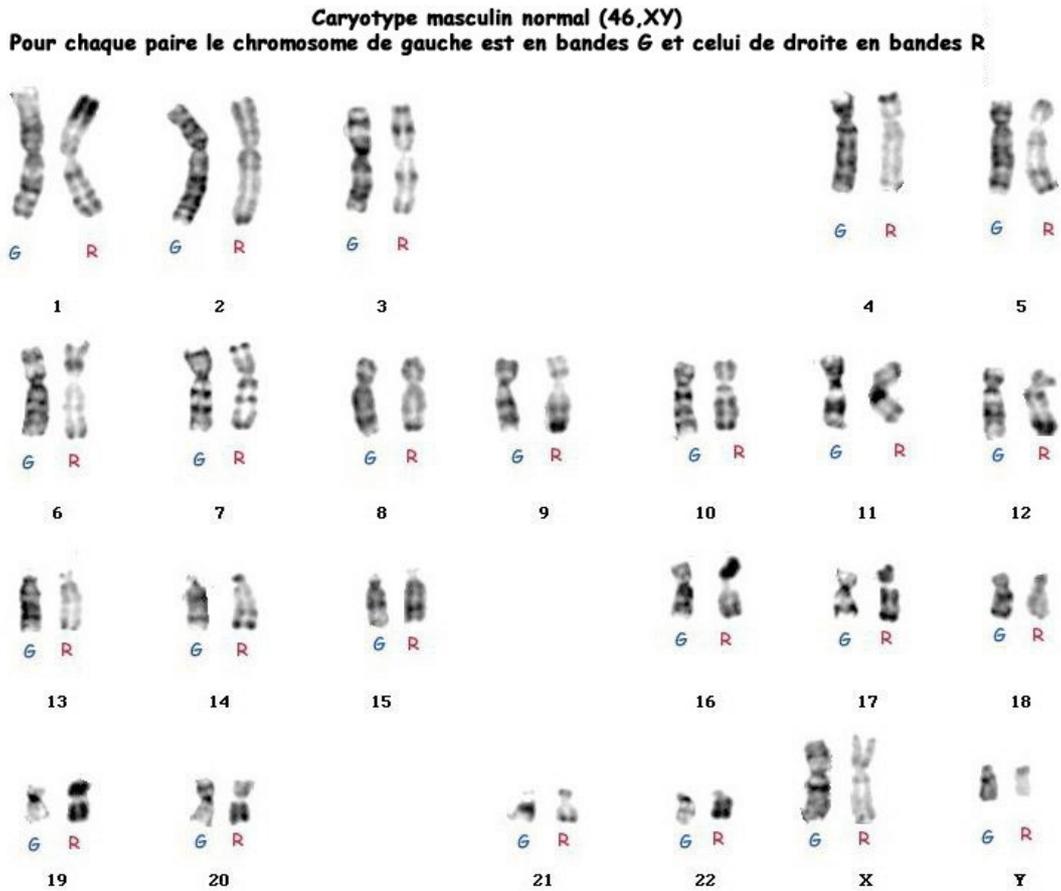


Figure 03 : Caryotype humain normal de sexe masculin en bandes R et G



Métaphase en bandes C

Figure 04 :Caryotype humain normal en bandes C

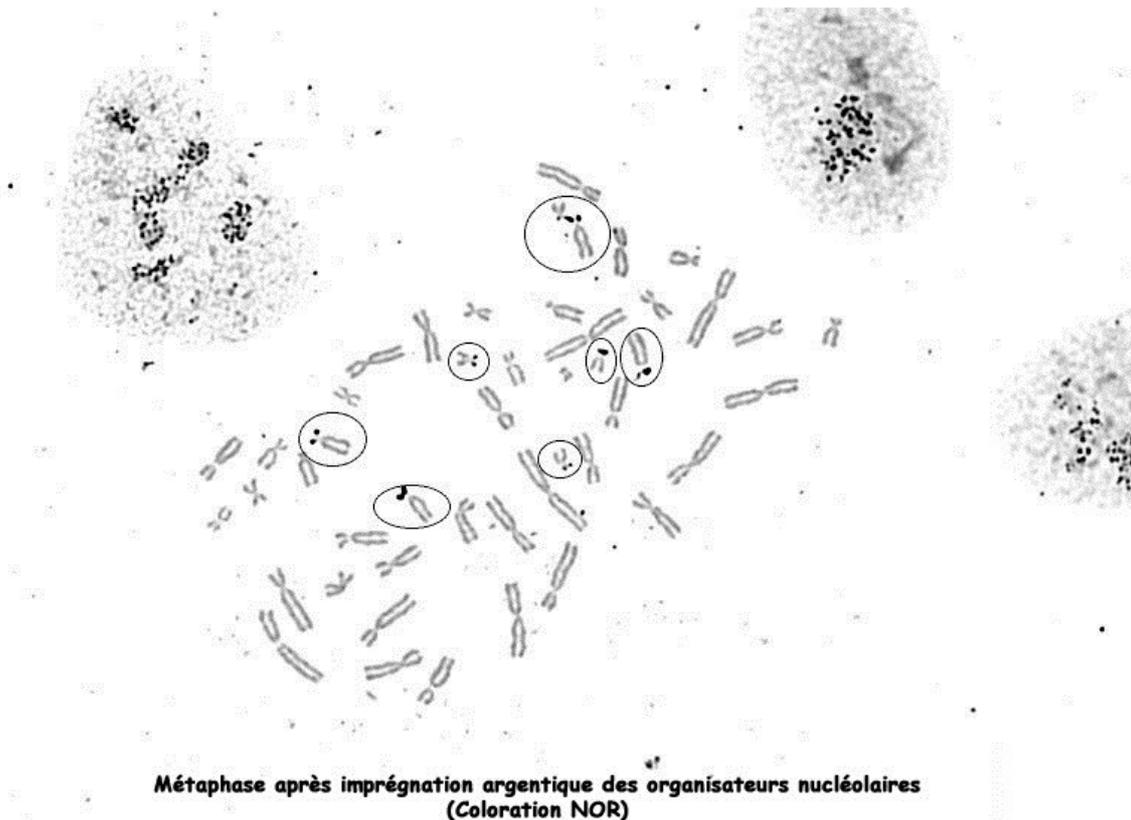


Figure 05 : Caryotype humain normal en coloration NOR.

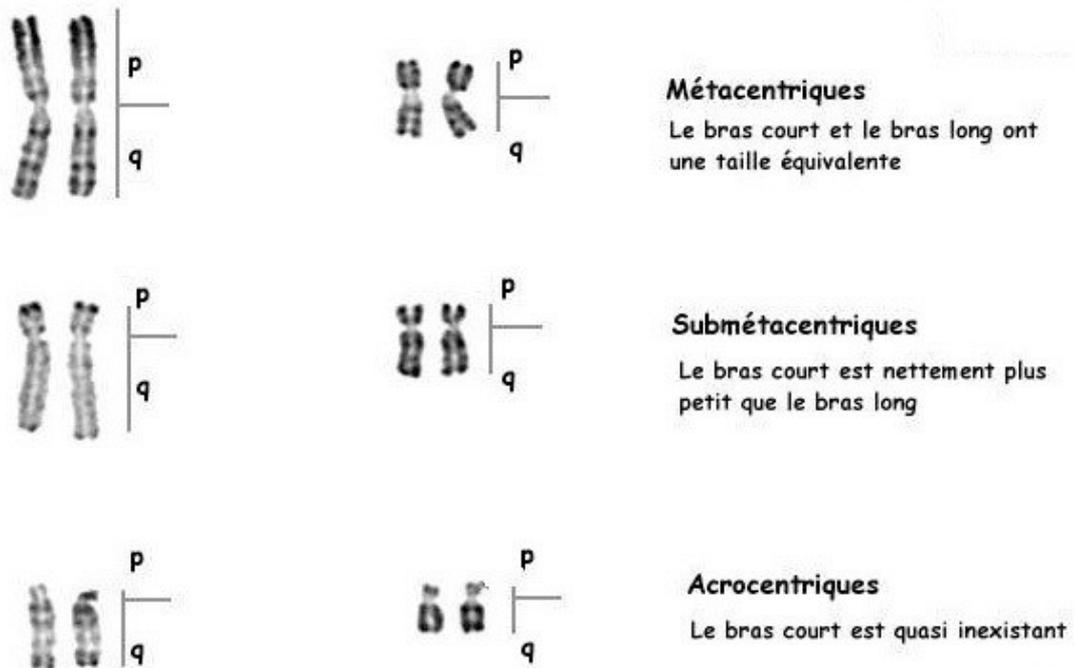
2. Classement des chromosomes métaphasiques

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

- 1. La taille** : par convention, les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit
- 2. 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 : $p/p+q$.

Cet indice permet de reconnaître trois familles de chromosomes :

- 1. les chromosomes métacentriques** dont les deux bras ont une taille à peu près équivalente
- 2. les chromosomes sub-métacentriques** qui ont un bras franchement plus petit que le bras long
- 3. les chromosomes acrocentriques** dont le bras court est quasi inexistant



Aspects morphologiques des chromosomes en fonction de l'indice centromérique

Figure 06 : Aspects morphologiques des chromosomes en fonction de l'indice centromérique

Complément

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.

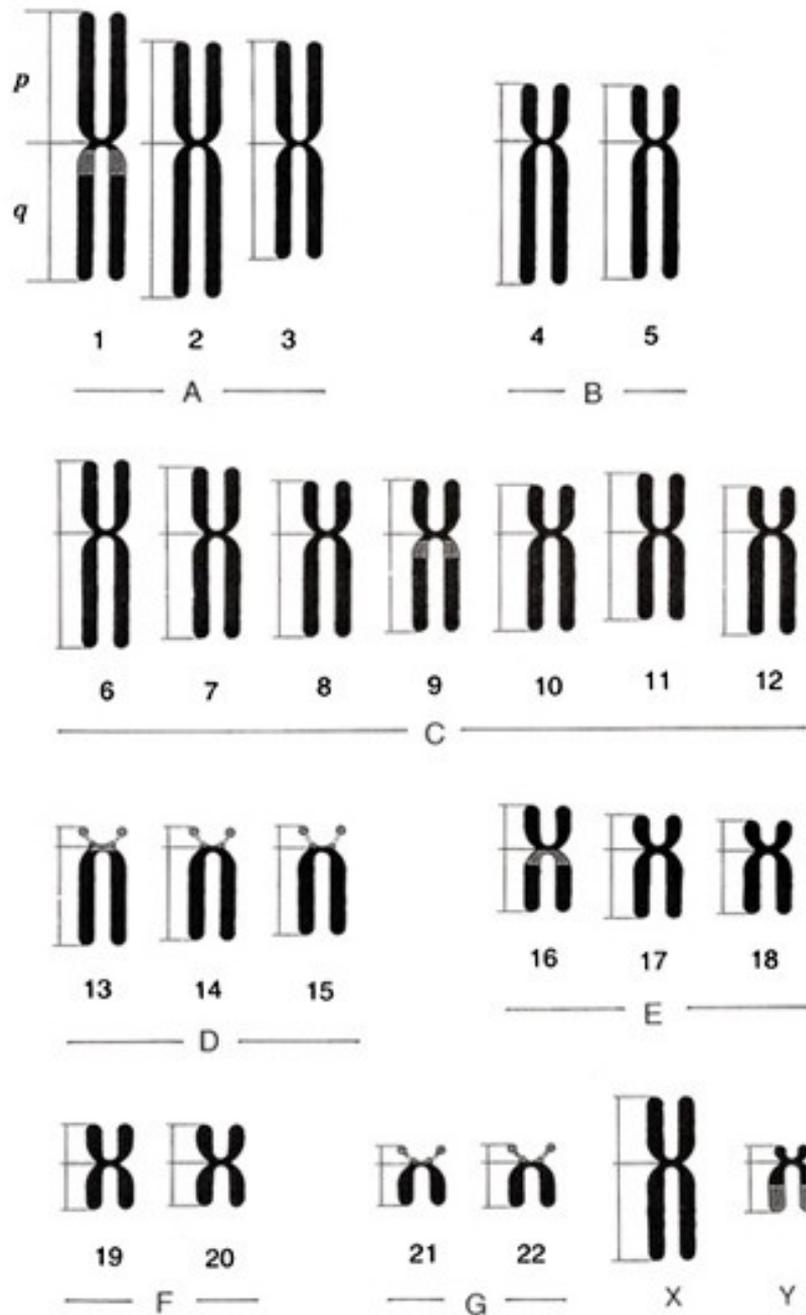


Figure 07 : les groupes des chromosomes en fonction de la taille et l'indice centromérique .

Remarque

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.

3. Nomenclature

Fondamental

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

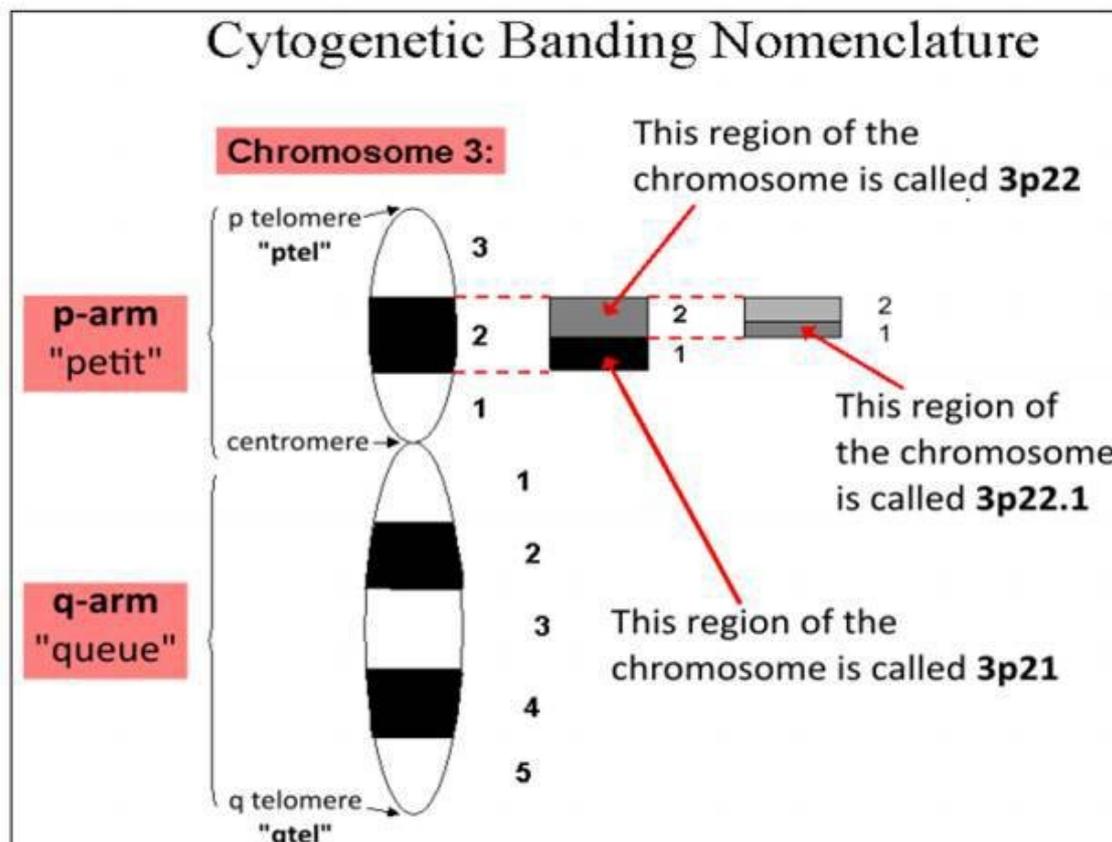


Figure 08 : Nomenclature des bandes

C. Technique d'hybridation fluorescente in situ (FISH: Fluorescence In Situ Hybridization)

1. Définitions

Définition

L'hybridation in situ en fluorescence est une technique de biologie moléculaire consiste à détecter **des séquences spécifiques** en couplant les bases nucléiques (**hybridation**) sur des simples brins complémentaires d'acide nucléique (**ADN ou ARN**). Ici, l'un des brins est un fragment de séquence marqué par **fluorescence (sonde)** qui ne se lie qu'aux parties du génome (**ADN cible**) dont les séquences sont hautement ou totalement complémentaires avec la séquence sonde.

Cette technique est destinée à détecter la présence ou l'absence, l'emplacement, l'intégrité, et la quantité des séquences d'ADN ou d'ARN dans les tissus, les cellules, ou les chromosomes.

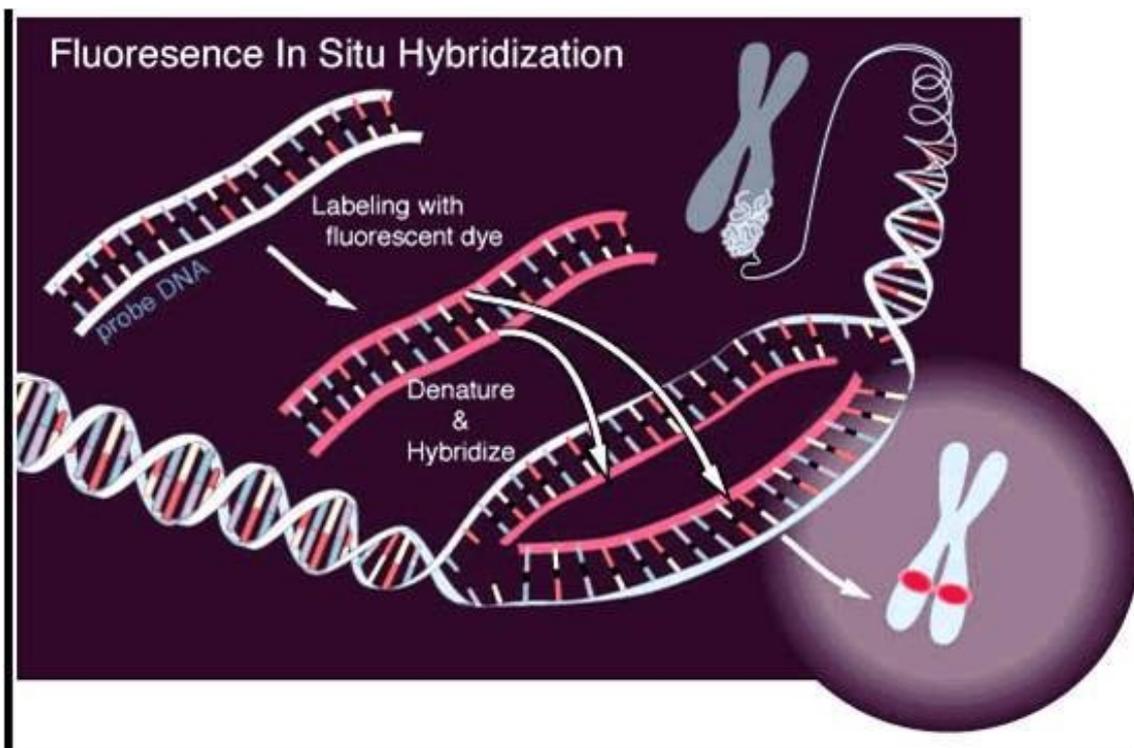


Figure 09 : L'hybridation in situ en fluorescence

Fondamental : Le principe de la technique FISH

Le principe de cette technique repose sur l'hybridation d'une séquence d'ADN marquée chimiquement par des molécules fluorescentes (**sonde**) avec les chromosomes d'une mitose (ou de noyaux interphasiques) qui va se fixer spécifiquement au niveau de sa séquence complémentaire. On peut alors visualiser la sonde au microscope à fluorescence.

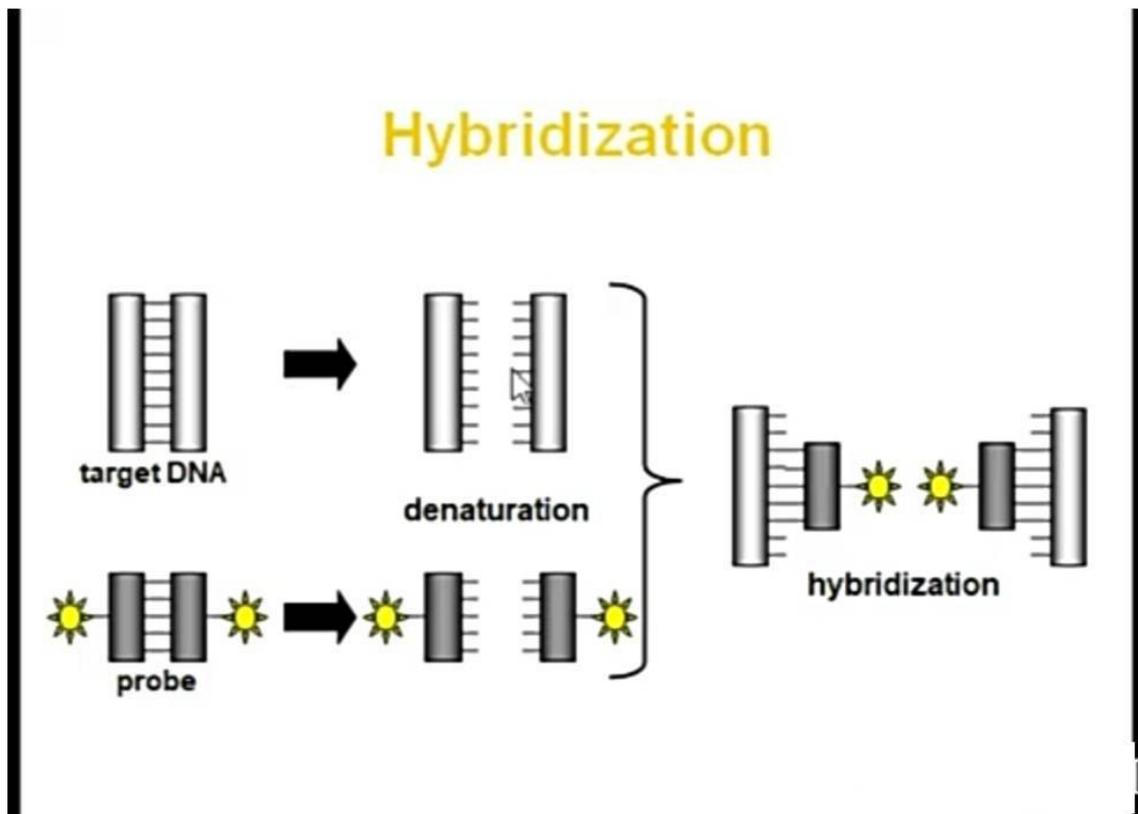


Figure 10 : Le principe de la technique FISH

Définition : Les sondes

Les sondes : une petite séquence d'ADN ou d'ARN (100-200 k pb) dont l'emplacement normal est connu dans le génome et qui est marquée chimiquement de façon à pouvoir être repérée par la suite

Il y a 2 types de marquage de sonde :

1. **Indirect** : Au début des années 80, les sondes d'ADN ont été marquées par incorporation des nucléotides modifiés (**un haptène** = molécule qui peut être reconnue par **un anticorps**) pour compléter les procédures de FISH.
2. **Direct** : Aujourd'hui les **fluorochromes** sont directement fixés sur les nucléotides pour être visible au microscope à fluorescence.

Complément : Les différents types de sondes

Selon l'application recherchée, on utilisera différents types de sondes :

1. **Des sondes composées de séquences spécifiques répétées** :
 - **Sondes centromériques** : elles s'hybrident au niveau des centromères des chromosomes. Ces sondes sont surtout utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase.
 - **Les sondes télomériques** : spécifiques aux télomères chromosomiques, la mesure de la longueur des télomères dans les cellules est actuellement le test de dépistage de référence pour identifier les patients présentant des télomères anormalement courts.
2. **Des sondes composées de séquences uniques (non répétées)** :
 - **Sondes de peinture chromosomique** : elles sont constituées d'un ensemble de sondes de petite taille qui couvrent l'ensemble du chromosome. Après hybridation, on observe un marquage de tout le chromosome. Il existe également des peintures spécifiques d'un bras ou même de quelques bandes chromosomiques. Ces sondes sont très utiles pour interpréter certaines translocations complexes, mettre en évidence des échanges de petite taille, identifier précisément l'origine d'un fragment non identifié.

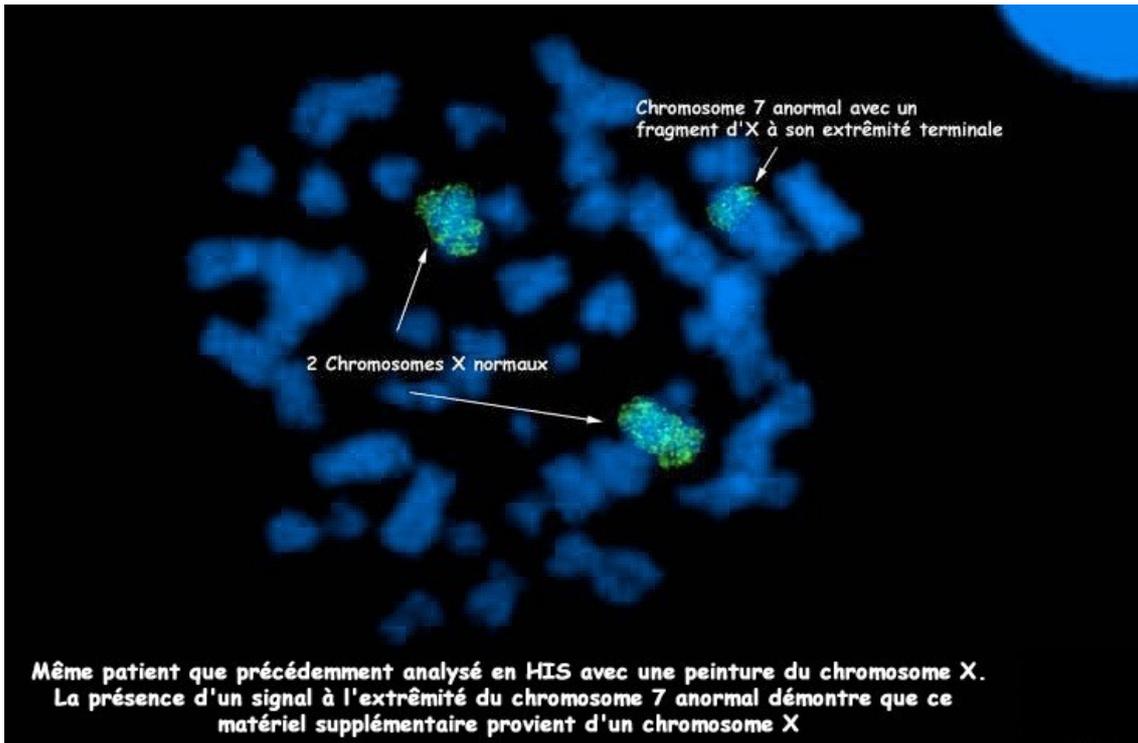


Figure 12 : Analyse en FISH présente un chromosome 7 anormale avec un fragment d'X

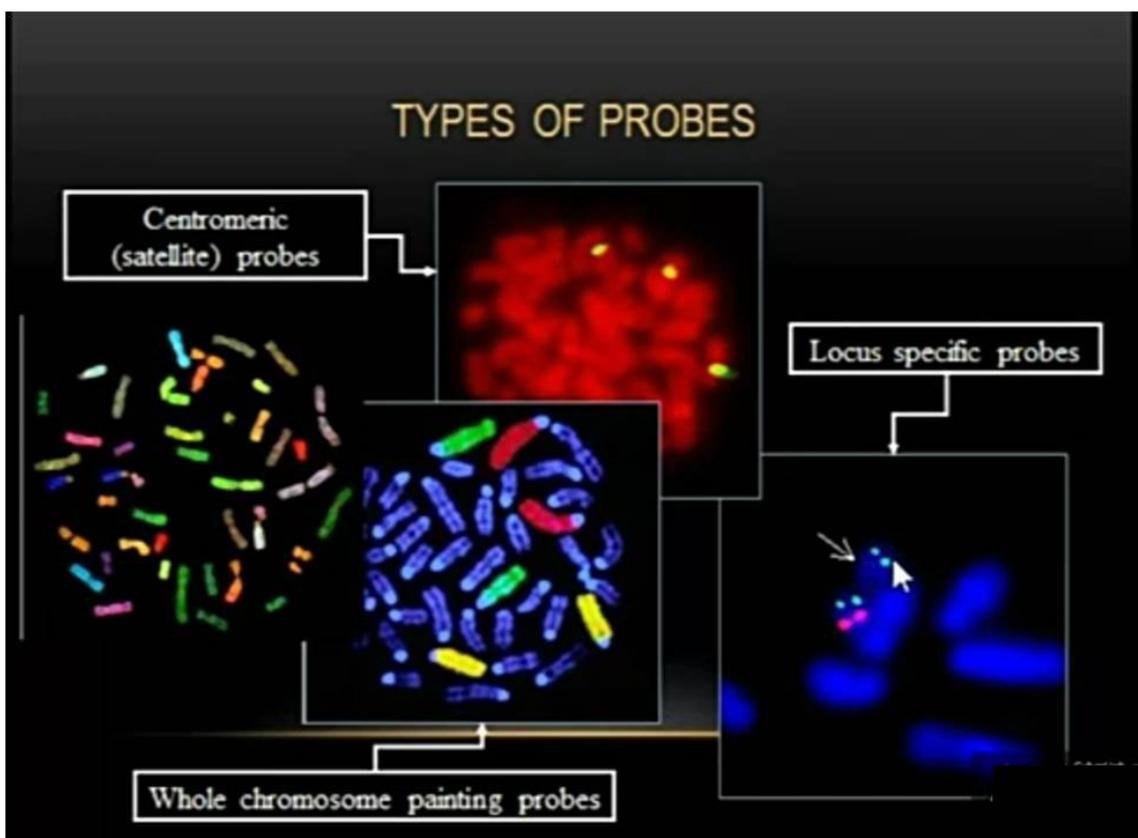


Figure 13 : Types de sondes

2. Les étapes de la technique FISH

Méthode

La technique consiste en 5 étapes:

1. Préparation des sondes d'ADN (marquage des sondes) : Le marquage est en général effectué par des enzymes (Nick translation). Pendant la réaction de marquage des nucléotides modifiés sont incorporés permettant la fixation des fluorochromes.

2. Dénaturation des sondes et des brins d'ADN : L'ADN cible est au préalable dénaturé par chauffage (75°C), c'est-à-dire qu'il subit un traitement censé séparer partiellement les deux brins constitutifs de la molécule, découvrant ainsi des portions de simple brin. Les sondes elles-mêmes sont également dénaturées, ce qui a pour résultat dans leur cas, de séparer complètement les monobrins.

3. L'hybridation: l'hybridation est l'étape de mise en présence des sondes avec les molécules d'ADN peignées, les sondes viennent alors spontanément s'apparier avec les séquences complémentaires présentés sur l'ADN peigné (cible).

4. Lavage: élimination des sondes qui ne sont pas fixées de façon spécifique par une dénaturation.

5. L'observation: l'observation des séquences hybridées s'effectue à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence, qui éclaire l'échantillon avec une lumière de longueur d'onde assez spécifique, et récupère la lumière émise par les sites fluorescents, en général de longueur d'onde supérieure, ce qui permet de n'observer que les sites hybridés.

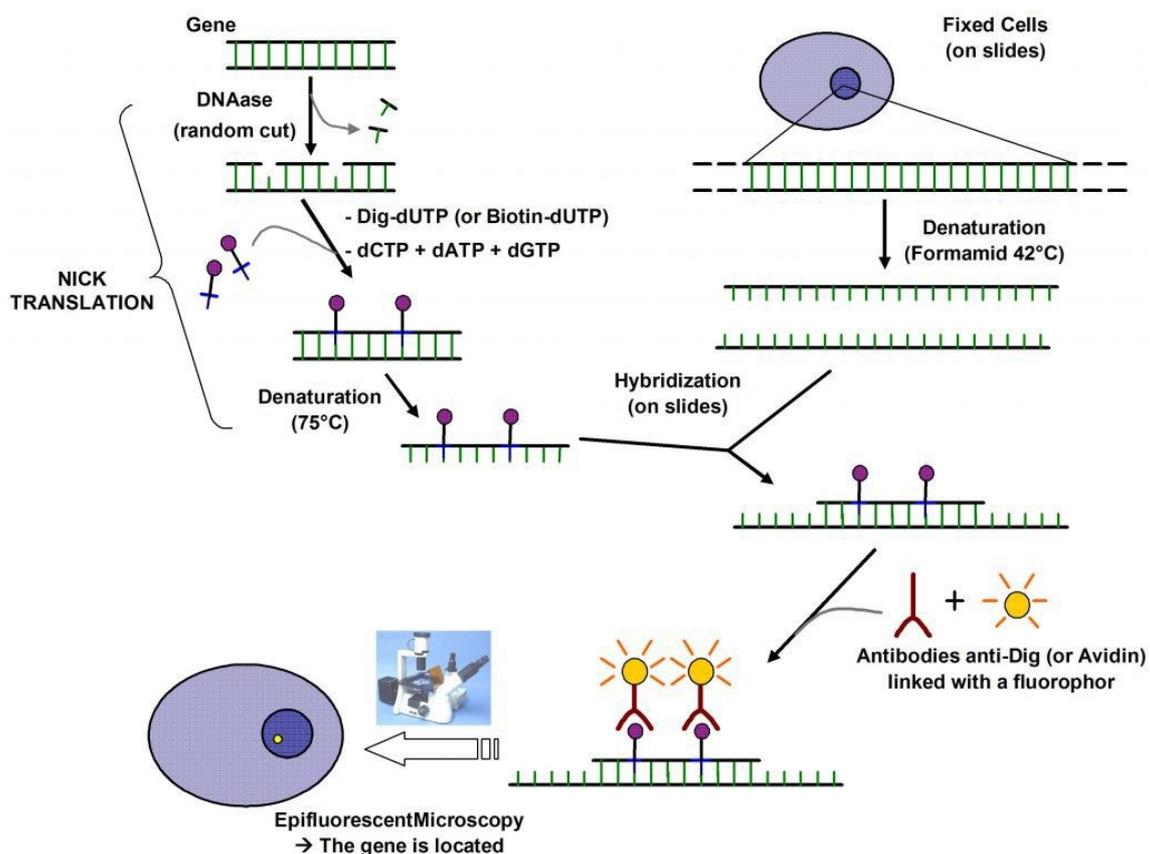


Figure 14 : Les étapes de la technique de FISH

Cf. "Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique (web_02)"
Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique

3. les avantages de la technique FISH

1. Elle peut faire une sonde à partir de quasiment tout type d'ADN.
2. Sa résolution est bien supérieure à celle du marquage des bandes G pour identifier les délétions, les insertions et les points de cassure des translocations.
3. Elle peut utiliser des tissus archivés et des cellules, quel que soit leur stade du cycle cellulaire(cellules inter-phasiques).
4. Elle peut analyser les résultats cellule par cellule.
5. Ses délais plus rapides (24 h), étant donné qu'il n'est pas nécessaire de mettre les cellules en culture pour obtenir des cellules en métaphase.

