

## Caryotype Normal

### **Objectifs spécifiques :**

- Définir la cytogénétique
- Définir un caryotype
- Préciser l'intérêt de l'établissement d'une formule chromosomique
- Lister les indications du caryotype et les différents types de prélèvements utilisées
- Décrire la technique de réalisation d'un caryotype et les différents techniques de dénaturations.
- Etablir une formule chromosomique d'une personne
- Lire un caryotype

### **1. La cytogénétique :**

La cytogénétique peut être définie comme étant la partie de la génétique qui étudie les chromosomes de l'individu (fœtus, enfant, ou encore adulte). C'est grâce à cette branche de la génétique qu'il est possible d'étudier les anomalies possibles, ainsi que les maladies qui peuvent en résulter.

### **2. Définition du caryotype :**

Le caryotype est une technique qui permet l'étude des chromosomes d'un individu. Cette technique permet d'obtenir une image, en microscopie optique, des chromosomes d'une cellule au cours de la métaphase ou de la prométaphase de la mitose. En génétique médicale, le caryotype contribue à la mise en évidence de remaniements chromosomiques équilibrés ou déséquilibrés. La résolution d'un caryotype standard est celle d'une bande chromosomique, soit environ 5 à 10 millions de paires de bases (mégabases).

### **3. Formule chromosomique :**

La formule chromosomique est en quelque sorte la "forme écrite" du caryotype (ensemble des chromosomes d'une cellule) d'un individu. Elle indique le nombre de chromosomes totaux d'un individu, puis, après une virgule, la nature des chromosomes sexuels. Chez un être humain, il y a normalement 22 paires de chromosomes somatiques (chromosomes non sexuels) et deux chromosomes sexuels (XY chez l'homme, XX chez la femme), soit un total

de 46 chromosomes. Le caryotype normal d'un homme se traduit ainsi par la formule chromosomique 46, XY. Le caryotype normal d'une femme est 46, XX. À noter : l'examen du caryotype du fœtus permet de déterminer son sexe et d'éventuelles anomalies génétiques. Pour citer l'exemple connu de la trisomie 21 (trois chromosomes 21 au lieu de deux), la formule chromosomique serait, pour un garçon : 47, XY, +21. Le "47" indique la présence d'un chromosome supplémentaire et le "+21" la nature du chromosome supplémentaire.

#### **4. La technique de réalisation d'un caryotype et les différentes techniques de dénaturation :**

##### **a. Etape de culture des cellules :**

Tout prélèvement dont les cellules sont en division *in vitro* permet l'établissement d'un caryotype. Un prélèvement de sang veineux périphérique recueilli stérilement sur tube héparinate de lithium est le plus souvent utilisé pour réaliser un caryotype constitutionnel en période postnatale. Le sang total est incubé 48 à 72 heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (phytohémagglutinine ou PHA) permettant une stimulation de la croissance des lymphocytes T. Les fibroblastes de la peau sont également couramment utilisés en période postnatale mais demandent une culture cellulaire de une à trois semaines. Le fragment tissulaire est recueilli dans un milieu de culture stérile additionné d'antibiotiques.

En période anténatale, les amniocytes du liquide amniotique, les cellules trophoblastiques des villosités chorales ou les lymphocytes du sang fœtal sont utilisés. Le temps de culture est variable selon le type de cellule analysé. L'établissement d'un caryotype à partir de liquide amniotique nécessite, en moyenne, un temps de culture de 6 à 10 jours. Le temps de culture peut être plus long, parfois de plusieurs semaines, en raison de la faible quantité de cellules initiales en cas d'amniocentèse très précoce ou en raison des nombreuses cellules en apoptose et des débris cellulaires en cas d'amniocentèse tardive.

##### **b. Obtenir des métaphases nombreuses et de bonne qualité**

Après la phase de multiplication des cellules, celles-ci sont bloquées au stade de métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour se faire, on ajoute de la colchicine, produit dérivé du colchique. Cette substance empêche la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique. La mitose est bloquée au stade de métaphase. On procède ensuite au choc hypotonique. Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées. Les constituants cellulaires sont ensuite fixés grâce à un fixateur, par exemple un mélange acide acétique méthanol. Les

cellules sont alors prêtes à être étalées. On laisse tomber quelques gouttes de cette préparation sur une lame de verre. Le fait de faire tomber la suspension cellulaire fait éclater les membranes fragilisées, libérant ainsi les chromosomes qui restent toutefois groupés. Les lames sont ensuite observées en microscopie optique

## **5. Identifier les chromosomes**

### **a. Les techniques classiques :**

Une simple coloration au Giemsa permet de compter et de classer les chromosomes en fonction de leur taille et de leur indice centromérique. Les méthodes de marquage ou *banding* révèlent le long des chromosomes une alternance de bandes transversales, faiblement ou fortement colorées, dont la disposition topographique est spécifique de chaque paire chromosomique. Les bandes G (GTG) obtenues par dénaturation enzymatique et les bandes R (RHG) par dénaturation thermique ont chacune un contenu spécifique en ADN. Ces deux marquages, en contretypage, sont complémentaires. Lorsque l'on a une bande sombre avec l'une des techniques, avec l'autre on obtient une bande claire. Le marquage révèle l'euchromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement transcrit et l'hétérochromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement inactif. Un marquage en bandes G ou R permet de visualiser 300 à 600 bandes par lot haploïde de chromosomes.

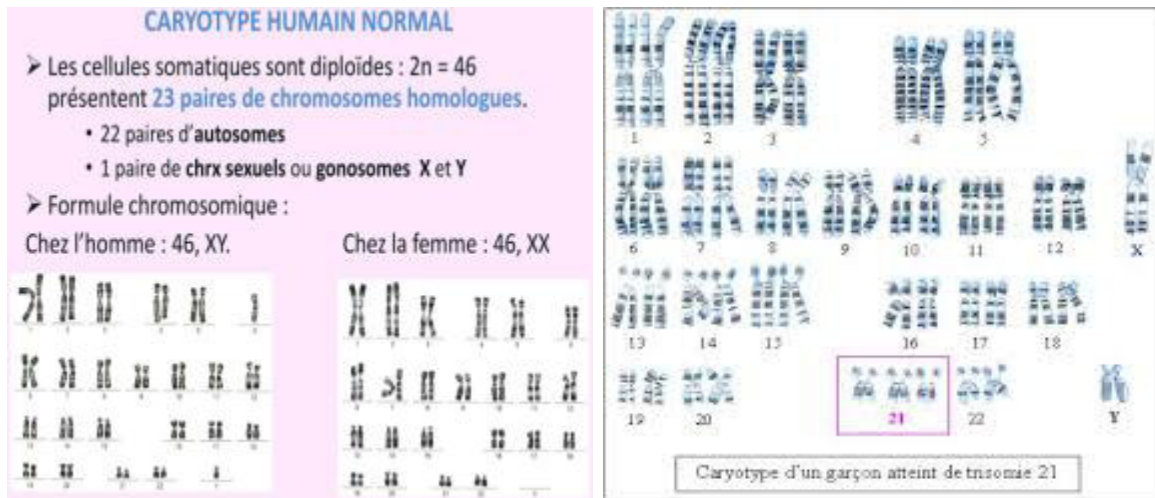
### **b. Les techniques spécifiques :**

Quelques colorations sont spécifiques de segments chromosomiques précis: les bandes C pour l'hétérochromatine constitutive (centromères et constriction secondaires), l'imprégnation argentique pour les organisateurs nucléolaires (régions contenant les gènes des ARN ribosomiques ou NOR). Les bandes Q (QFQ) par coloration à la quinacrine et observation en fluorescence, sont superposables aux bandes G et colorent intensément la partie distale, hétérochromatique, des bras longs de l'Y, certains centromères et certains bras courts des acrocentriques.

### **c. Les techniques de haute résolution**

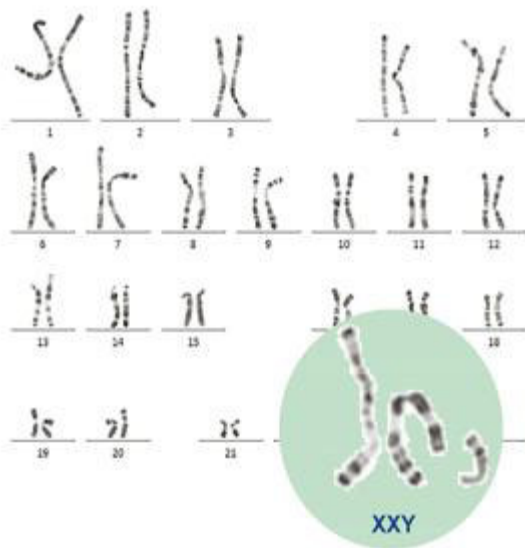
L'étude des cellules en prométaphase (fin de prophase ou début de métaphase) par synchronisation des cultures associée à l'incorporation d'analogues de bases (bromodésoxyuridine ou BrdU) qui modifient les propriétés tinctoriales des bandes chromosomiques, permet d'améliorer la résolution du caryotype et d'observer 600 à 800 bandes par lot haploïde de chromosomes. Des remaniements chromosomiques plus fins peuvent être observés mais l'interprétation est délicate et plus efficace si elle est focalisée sur chromosome ou une région chromosomique donnée.

## 6. Exemple du caryotype :



Caryotype normal de des sexes

caryotype de la trisomie 21



Syndrome de klinefelter