

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji Laghouat
Faculté des Science et Science de l'Ingénieur
Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -
كلية العلوم والهندسة
قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en biologie
Option : Génie-biologie*

Thème

Contribution à l'analyse cytogénétique de quelques pathologies liées aux anomalies du caryotype humain

Présenté par : CHIKH SALAH Mahfoud

Le : 20 septembre 2012

M. BECHEUR Mourad	Président	U. Amar Telidji, Laghouat
M ^{ell} . ZAKHROUF Zouhra	Examinatrice	U. Amar Telidji, Laghouat
M ^m . SEREDI Nabila	M.C Promotrice	FSB-USTHB
M. BOUKEROUIS Djoudi,	M.A co-promoteur	U. Amar Telidji, Laghouat

PROMOTION 2011/2012

REMERCIEMENTS

Au premier lieu, je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant qui n'a cessé de me manifester sa bonté et son aide et qui nous a donné courage, volonté et force pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement M^{me}. SEREDI Nabila notre promotrice, pour l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour, et avoir donné la chance de travailler au laboratoire de génétique afin de finaliser mes études.

Je remercie également Mr. BOUKEROUIS Djoudi, co-promoteur, pour être toujours disponible pour nous avoir guidé et aidé lors de notre pratique.

Je remercie M. BECHEUR Mourad qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury de ce mémoire.

Je remercie le membre du jury : M^{elle} ZAKHROUF Zouhra, d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie profondément M^{me} SOAI Nora, M^{lle} YALA Fala, M^{lle} SALHI Nawel et M. OTSMAN Slimane pour leur disponibilité, leur conseils et leur gentillesse infinie, durant le stage au niveau du laboratoire de Biopathologie et Génétique à L'IPA.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents pour leurs
aide et encouragements tout au long de mes
études, Que Dieu me les garde.*

À mes frères et sœur

À ma chère épouse

À tous les membres de ma famille.

*À tout le personnel du laboratoire IBN ROCHD pour leur aide
précieuse et leurs encouragements.*

À tous mes amis et camarades : Mohamed, Aoumar...

Et tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.

Je leur dédie ce travail.

Mahfoud CHIKH SALAH

Sommaire

Liste d'abréviation	I
Listes des figures	III
Liste des tableaux	VI
Introduction	1

I : partie théorique

I. 1. ADN et chromosome	2
I.1.1. L'ADN comme support du patrimoine génétique des êtres vivants	2
I.1.2. De l'ADN double brin au chromosome	3
I.1.3. Organisation des chromosomes le long du cycle cellulaire	4
I.1.4. Morphologie des chromosomes métaphasiques	5
I.1.5. Classifications des chromosomes	5
I.2. Les anomalies chromosomiques	7
I.2.1. Les anomalies de nombre	8
I.2.1.1. Les polyploïdies	8
I.2.1.2. Les aneuploïdies	8
I.2.2. Les anomalies de structure	11
I.2.2.1. Remaniements déséquilibrés	11
I.2.2.2. Remaniements équilibrés	13
I.2.3. Anomalies chromosomiques acquises.....	16
I.2.3.1. Hémopathies maligns	16
I.2.3.2. Tumeurs solides	17
I.2.4. Fréquence globale des pathologies génétiques	17
I.3. Cytogénétique et pronostic des anomalies de caryotype	18
I.3.1. Génétique médicale : diagnostic des pathologies chromosomiques	18
I.3.1.1. Cytogénétique conventionnelle	18
I.3.1.2. Limites de la technique conventionnelle.....	20
I.3.2. les techniques de cytogénétique moléculaire	21
I.3.2.1. La technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH)	21
I.3.2.2. L'hybridation génomique comparative : CGH classique et CGH array	22
I.4. Tissus utilisées pour un examen cytogénétique	23
I.5. Indication du caryotype	24
I.5.1. Indication cytogénétique d'anomalies chromosomiques constitutionnelles.....	25
I.5.1.1. Indications du caryotype prénatal	25

I.5.1.2. Indications du caryotype postnatal	25
I.5.2. Indication cytogénétique à la recherche d'anomalie chromosomique acquise ...	26

II : partie pratique

II.1. Matériel et méthode	27
II.1.1. Matériel.....	27
II.1.1.1. Matériel biologique	27
II.1.1.2. Les solutions utilisées	27
II.1.2. Méthodes.....	28
II.1.2.1. Mise en culture des cellules lymphatiques.....	28
II.1.2.2. Mise en culture des cellules du sarcome synovial	28
II.1.2.3. Choc hypotonique	29
II.1.2.4. Fixation	29
II.1.2.5. Etalement	30
II.1.2.6. Coloration au Giémsa	30
II.1.2.7. Montage des lames	31
II.1.2.8. Lecture des lames	31
II.1.2.9. Mise en évidence de bandes chromosomiques	31
II.2. Résultats et discussion	35
II.2.1. Analyse des anomalies d'aneuploïdies	35
II.2.1.1. Interprétation du caryotype portant la trisomie 21.....	35
II.2.1.2. Interprétation du caryotype portant le syndrome de Turner mosaïque ...	37
II.2.1.3. Interprétation du caryotype portant le syndrome de Klinefelter	38
II.2.2. Analyse des anomalies de structure (anomalies acquises).....	40
II.2.2.1. Interprétation des cas de lymphomes de Burkitt	40
II.2.2.2. Interprétation du cas de leucémie aigue lymphoblastique T (LAL T) ...	45
II.2.2.3. Interprétation du cas de sarcome synoviale	46
Conclusion	47
Références Bibliographiques	48

Annexe

Liste des abréviations

A : Adénine.

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique.

ARN : Acide ribo-Nucléique.

AT : Paire de bases Adénine-Thymine.

ATB : Antibiotique.

BAC : Chromosome artificiel bactérien.

PAC : Chromosomes artificiels de Phage.

Bandes C : Centromérique, coloration de l'hétérochromatine constitutive.

Bandes Q : Quinacrine fluorochrome se fixant préférentiellement sur les régions riches en AT.

Bandes R : Reverse.

Bandes T : Télomériques, coloration de l'euchromatine télomériques.

C : Cytosine.

°C : Degré Celsius.

EBSS : Earle's Balanced Salt Solution.

FISH : Hybridation in situ fluorescence.

G : Guanine.

GC : paire de bases Guanine-Cytosine.

GTG : bande G, par action de la trypsine, colorée au Giemsa.

HGC : hybridation génomique comparative.

HGCm : hybridation génomique comparative sur micro puce à ADN.

KCl : Chlorure de potassium.

Kb : kilo base.

LMC : leucémie myéloïde chronique.

LMNH : lymphomes malins non hodgkiniens.

Mb : Méga base.

ml : Millilitre.

mM : milli-molaire.

MP : Méga pixels.

NOR : Nucleolar Organizing Region.

p : Bras court d'un chromosome.

Pb : Paire de bases.

PBS : Tampon phosphate salin.

pH : Potentiel hydrogène.

PHA : Phytohémagglutinine.

q : bras long d'un chromosome.

RHG : bandes R, par dénaturation thermique (heat), colorée au Giemsa.

βHCG : Bêta hormone chorionique gonadotrope est sécrétée par l'embryon.

SVF : Sérum de veau fœtal.

T : Thymine.

UI : Unité Internationale.

X : Chromosome sexuel.

Y : Chromosome sexuel masculin.

μl : Microlitre.

Liste des figures

Figure 01 : structure double brin de l'ADN	2
Figure 02 : modèle général de l'association des histones à l'ADN dans les nucléosomes, illustrant la manière selon laquelle la fibre de chromatine peut être enroulée en une structure plus condensée pour constituer un chromosome mitotique	4
Figure 03 : les phases du cycle cellulaire	5
Figure 04 : Position du centromère	6
Figure 05 : représentation des mosaïsmes et chimérismes	8
Figure 06 : non-disjonction des chromosomes durant la première ou la seconde division mitotique	9
Figure 07 : schéma illustrant A : délétion interstitielle, B : délétion terminale	12
Figure 08 : schéma illustrant A : formation d'un chromosome en anneau, B : duplication ...	12
Figure 09 : schéma illustrant A : division normale de chromosome, B : formation d'un isochromosome	13
Figure 10 : schéma illustrant A : translocations réciproques B : translocation robertsoniennes	14
Figure 11 : schéma illustrant A : inversions péricentriques, B : inversions paracentriques ..	14
Figure 12 : schéma illustrant d'insertion	15
Figure 13 : Synoptique comparatif des principales étapes entre la CGH sur chromosomes à gauche et la CGH microarray à droite	23
Figure 14 : schéma récapitulatif des étapes entreprises pour la mise au point des caryotypes.	33
Figure 15 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 01 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 47, XY+21	36
Figure 16 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 02 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 45, XO. (Mosaïque: 46, XX /45, XO).	37

Figure 17 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 02 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XX. (Mosaïque: 46, XX/45, XO).	38
Figure 18 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 08 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY. (mosaïque: 46,XY/47,XXY).	39
Figure 19 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 08 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 47, XXY. (mosaïque: 46, XY/47, XXY).	39
Figure 20 : Translocations du lymphome de Burkitt.....	40
Figure 21 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 04 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY. (mosaïque: 46,XY/47,XXY).	41
Figure 22 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 05 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	41
Figure 23 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 06 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	42
Figure 24 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 09 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	42
Figure 25 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 10 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	43
Figure 26 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 11 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	43
Figure 27 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 03 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	44
Figure 28 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 03 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	44
Figure 29 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 07 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY	46

Figure 30 : présentation de la translocation réciproque t(X;18) (p11 ;q11) associé au sarcome synovial..... 46

Figures de l'annexe

Figure A : caryotype illustrant les trois bandes fréquemment utilisé dans l'établissement d'un caryotype humain i

Figure B : Caryotypes représentatifs translocation dérivée der(17;18) Bandes R ii

Figure C : Caryotypes représentatifs syndrome de Turner (45,XO), Bandes G ii

Figure D : Schéma représente les erreurs au cour de la méiose par une non disjonction des chromosomes aboutissant à une Trisomie 21 iii

Figure E : Principe de la Fish. Les différentes étapes sur préparation chromosomique..... iv

Liste des tableaux

Tableau I : classification et caractéristique des chromosomes humains	6
Tableau II : anomalies chromosomiques identifiées en France, en 2005	18
Tableau III : Propriétés des bandes chromosomiques (adapté de Bickmore et Sumner, 1989).	20
Tableau IV : Résultat des caryotypes obtenus	34

Introduction

Introduction

La génétique médicale est une discipline mixte qui vise à en faire le diagnostic clinique et biologique. Elle s'est développée d'une façon considérable depuis une trentaine d'années en raison des avancées majeures des connaissances sur le génome.

Ces progrès ont conduit à la reconnaissance en 1995 de la génétique comme spécialité médicale. Il s'agit d'une discipline clinico-biologique avec trois composantes : clinique, chromosomique et moléculaire (Bonneau, 2011).

Son rôle est triple : faire le diagnostic des maladies génétiques, participer à la prise en charge des malades, donner un conseil génétique, c'est-à-dire évaluer pour les membres d'une famille le risque de survenue ou de récurrence de la maladie et proposer aux couples à risque des mesures de prévention. Les maladies génétiques traitées dans ce domaine sont les maladies monogéniques, les maladies à hérédité mitochondriale, les maladies multifactorielles et les maladies chromosomiques (Bonneau, 2011).

Pour le diagnostic des maladies chromosomiques, sujet de notre mémoire, la génétique médicale dispose de deux grands types d'approche d'exploration : la cytogénétique conventionnelle et une autre moléculaire. Techniques de cytogénétique ont permis de déterminer une origine chromosomique pour un certain nombre de pathologies par la détection de différentes anomalies telles que les aneuploïdies ou les anomalies structurales et d'établir une relation avec un phénotype anormal.

L'objectif de ce travail consiste en la mise au point des caryotypes humains à partir d'une culture cellulaire, en appliquant la technique de cytogénétique classique associée au marquage des bandes, et ce, dans le but de faire un diagnostiques des quelque pathologies constitutionnelle ou acquise

Les échantillons de cellules qui ont été retenues dans ce mémoire, pour les analyses cytogénétiques, sont les cellules lymphatiques du sang de et les cellules du sarcome synovial à cellules fusiformes au niveau du coude. Pour avoir des résultats assez fiables et reproductibles, deux cultures cellulaires ont été réalisées pour chaque échantillon.

La détermination de ces anomalies de petites tailles est actuellement identifiée par les techniques de cytogénétique moléculaire, en particulier l'hybridation *in situ* en fluorescence (Fish) et l'hybridation génomique comparative (CGH) dotée d'une plus grande sensibilité (Bastard, 2001).

I: Partie théorique

I. partie théorique

I.1. ADN et chromosome

I.1.1. L'ADN comme support du patrimoine génétique des êtres vivants

L'acide désoxyribonucléique ou ADN est une molécule bicaténaire ayant une structure spatiale en double hélice et formée de deux chaînes polynucléotidiques antiparallèles unies par des liaisons faibles de type hydrogène (figure 01).

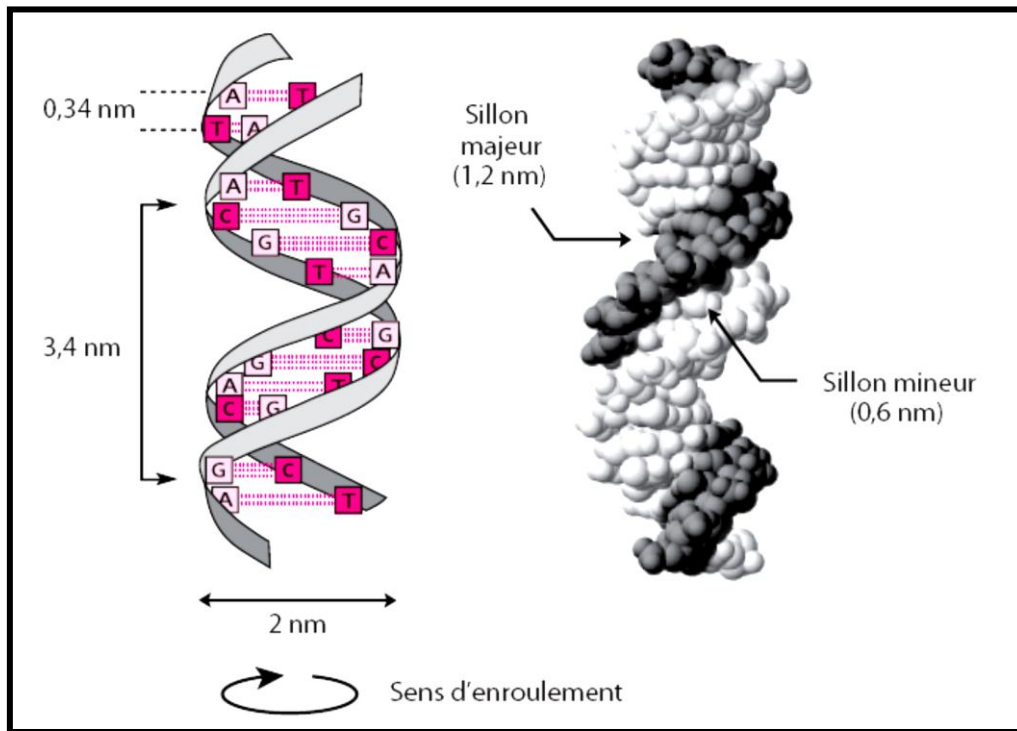


Figure 01 : structure double brin de l'ADN (Hayes, 2000).

Les unités de base ou monomères sont des **désoxyribonucléotides**. Un désoxyribonucléotide comporte une base azotée parmi l'Adénine, la Cytosine, la Guanine et la Thymine, un sucre à 5 carbones ou pentose, le désoxyribose et un groupement phosphate. Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phospho-diester entre le groupement phosphate de l'un et le désoxyribose de l'autre.

Dans la molécule bicaténaire d'ADN, les règles de Chargaff impliquent que $A = T$ (unies par deux liaisons hydrogène) et $C = G$ (unies par trois liaisons hydrogène).

L'ADN est le support de l'information génétique, on considère que seuls 3 à 4 % de l'ADN chromosomique humain correspondent à des séquences transcrites. Il a été montré que chez les eucaryotes, les gènes sont insérés dans un arrangement complexe de séquences répétées en tandem ou dispersées et de séquences non répétées dont la plupart n'a pas de fonction.

L'ADN eucaryote peut donc se classer en plusieurs sous-ensembles : les gènes uniques, les familles de gènes et les pseudogènes, les séquences répétées fonctionnelles non codantes, les séquences répétées de fonction inconnue et les séquences non répétées non codantes. Certaines de ces séquences sont associées à des structures particulières du chromosome ou localisées dans certaines régions (Hayes, 2000). Le nombre des gènes de structure que possède l'être humain a été estimé entre 30000 et 40000 (ce sont les gènes codant pour l'ARN ou les protéines) (Jorde *et al*, 2004).

I.1.2. De l'ADN double brin au chromosome

Chez l'Homme la molécule d'ADN comporte 6×10^9 pb par génome diploïde, soit 23 paires de chromosomes, avec une longueur totale d'environ 2 m. La compaction est en conséquence indispensable.

Le génome humain est condensé environ 10^4 fois pour permettre son affectation dans le noyau de chaque cellule qui est de 5-8 μm de diamètre. L'ADN est compacté selon plusieurs niveaux. Chaque molécule d'ADN est associée à des protéines basiques et à des protéines enzymatiques non-histones.

Le premier niveau consiste en l'enroulement d'environ 140 à 150 paires de bases d'ADN autour de chaque noyau heptamérique d'histones (2H2b, 2H2A, 2H3 et 2H4) pour former un nucléosome. Chaque deux nucléosomes successifs sont espacés par l'ADN de liaison constitué de 20 à 60 bases. Les nucléosomes forment à leur tour un solénoïde hélicoïdal dont chaque tour solénoïde comprend environ six nucléosomes. Les solénoïdes sont eux-mêmes organisés en boucles de chromatine fixées sur un squelette protéique. Chacune de ces boucles contient approximativement 100000 pb (figure 02), (Vandermeers *et al*, 2008).

L'état de condensation de la chromatine définit deux types :

- Euchromatine : chromatine peu compactée, dans laquelle les gènes peuvent être actifs (par opposition à l'hétérochromatine).
- Hétérochromatine : chromatine très condensée, dans laquelle les gènes sont inactifs. Elle se rencontre principalement au niveau des centromères (Donnai, 2009).

Le résultat final de ce processus d'enroulement et de la formation des boucles est que l'ADN, se retrouve plus ou moins resserré selon le stade du cycle cellulaire (Tamayo, 2002; Jorde *et al.*, 2004).

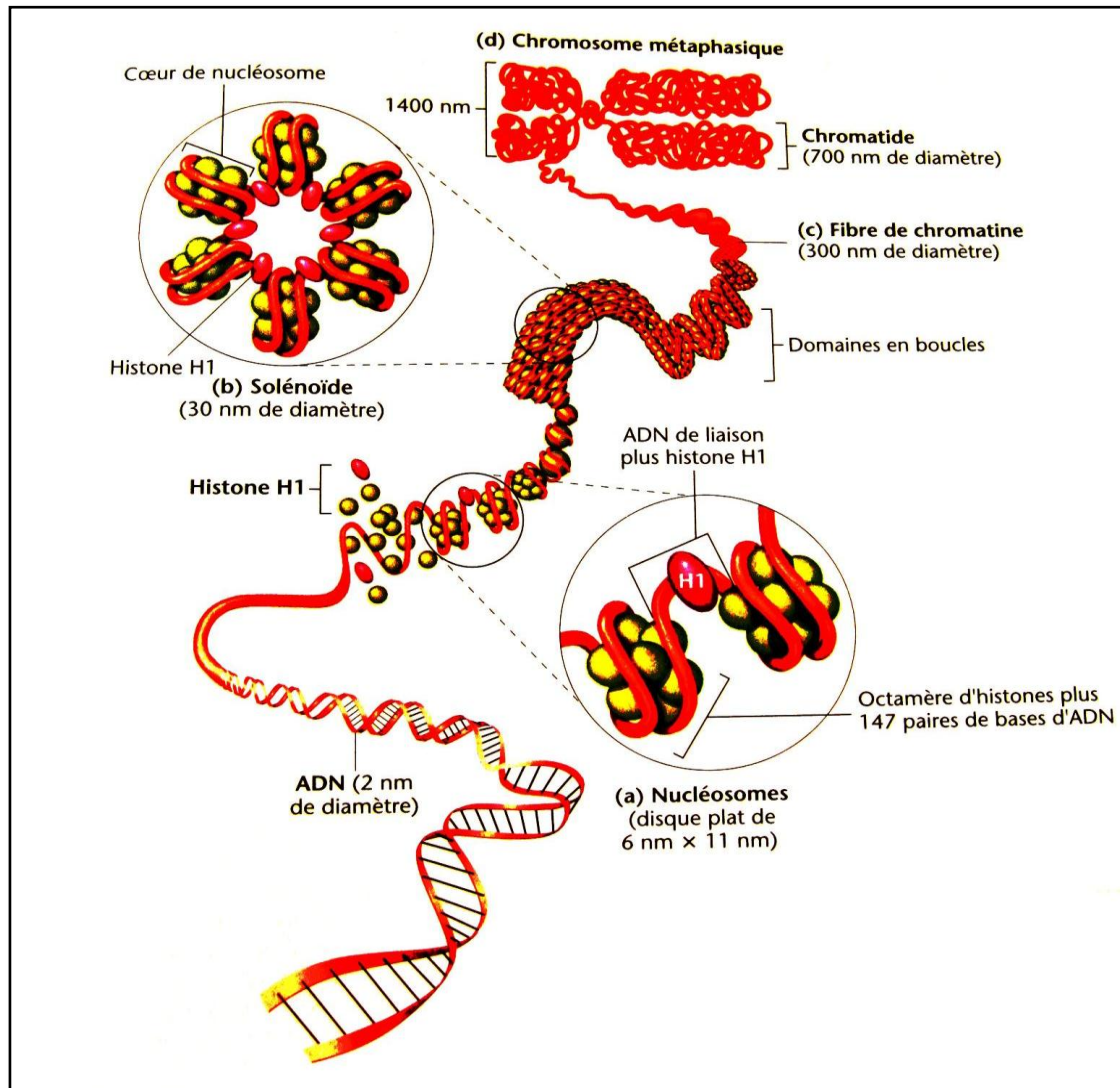


Figure 02 : modèle général de l'association des histones à l'ADN dans les nucléosomes, illustrant la manière selon laquelle la fibre de chromatine peut être enroulée en une structure plus condensée pour constituer un chromosome mitotique (Klug *et al.*, 2006).

I.1.3. Organisation des chromosomes le long du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire commence à la naissance de chaque cellule et se poursuit au cours de la croissance cellulaire (ou interphase) et se termine par une nouvelle mitose donnant naissance à une cellule fille ou par une élimination de la cellule.

L'interphase est la phase la plus longue du cycle cellulaire, elle comprend une phase G1, une phase S et une phase G2 (figure 03). Au cours de la phase G1, le chromosome conserve sa structure primaire linéaire. Lors de la phase S, au cours de laquelle la synthèse de l'ADN a lieu, le chromosome se réplique. Il possède donc deux molécules d'ADN identiques, les deux chromatides sœurs. La phase G2, caractérisée par une activité de synthèse protéique

de la cellule, précède la mitose. A ce stade, le chromosome devient visible au microscope sous la forme d'un fin filament.

La mitose, qui comprend cinq phases : prophase, pro-métaphase, métaphase, anaphase et télophase aboutit à une répartition de l'ADN de la cellule mère dans les deux cellules filles. Au cours de la mitose, le chromosome se condense progressivement, la fibre chromosomique linéaire se replie sur elle-même pour former une structure plus compacte (figure.02). Ainsi, c'est au moment de la métaphase que le chromosome est au maximum de sa condensation et qu'il est facilement observable (Dehaese *et al.*, 2000).

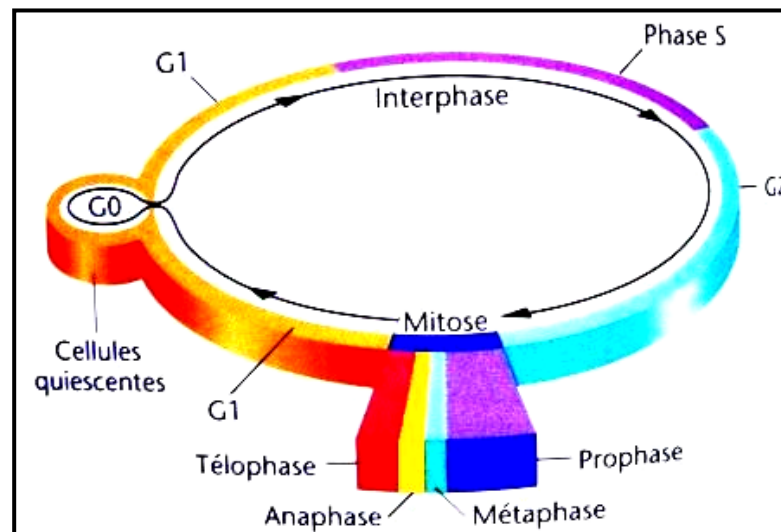


Figure 03 : les phases du cycle cellulaire (Klug *et al.*, 2006).

I.1.4. Morphologie des chromosomes métaphasiques

Les chromosomes métaphasiques sont constitués de deux **chromatides-soeurs** identiques, étroitement accolées sur toute leur longueur, mais distinctes. Leur seul point d'attache est le centromère, qui est donc une zone non encore dupliquée à ce stade (constriction primaire). On parle de chromosomes «fissurés, ou clivés» en deux chromatides, le centromère délimite deux bras chromosomiques, dont les extrémités sont les télomères. À la fin de la métaphase, marquée par la division du centromère, chaque chromatide acquiert son individualité et devient à son tour un chromosome (Callen et Perasso, 2005).

I.1.5. Classifications des chromosomes

La classification des chromosomes a été basée initialement sur le rapport des longueurs des bras chromosomiques (p/q), les bras courts ou p et les bras longs ou q. Par convention l'autosome le plus long est le chromosome 1, celui de taille immédiatement

inférieure est le chromosome 2, et ainsi de suite. Les chromosomes autosomiques sont alors classés de la 1^{ère} paire à la 22^{ème} paire dans l'ordre décroissant de leur taille.

D'autre par, la localisation du centromère sur le chromosome permet de différencier des catégories morphologiques simples en déduisant l'indice centromérique ($p/p+q$) qui permet de distinguer les chromosomes métacentriques, submétacentriques et acrocentriques (figure 04). Ces paramètres d'identification permettent de déterminer 7 groupes chromosomiques (de A à G) (tableau I). (Pasternak, 2003; Callen et Perasso, 2005).

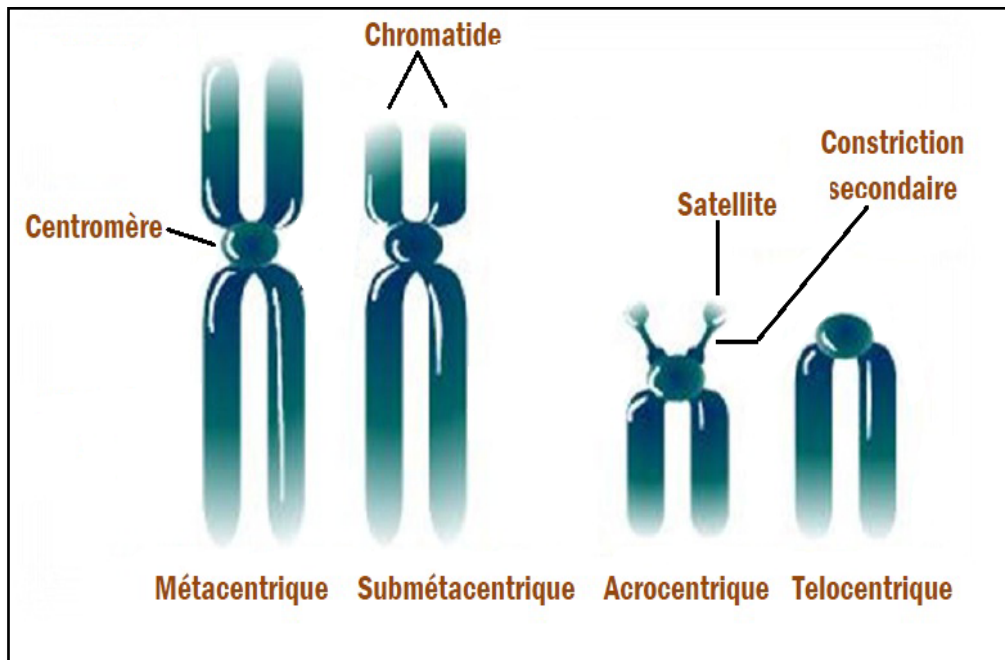


Figure 04 : Position du centromère (Beri-Dexheimer, 2005).

Tableau I: Classification et caractéristique des chromosomes humains.

Groupe	N° des chromosomes	Caractéristiques
A	1 à 3	Grand métacentrique
B	4 et 5	Grand submétacentrique
C	6 à 12 et X	Médium métacentrique à submétacentrique
D	13 à 15	Médium acrocentrique
E	16 à 18	Médium submétacentrique mais plus petit que le groupe C
F	19 et 20	Petit métacentrique
G	21 , 22 , Y	Petit acrocentrique

(Bado, 1984)

I.2. Les anomalies chromosomiques

La plupart des espèces diploïdes contiennent normalement deux jeux de chromosomes haploïdes, cependant de nombreuses variations correspondant à des anomalies chromosomiques peuvent survenir à différents niveaux. Ces anomalies peuvent être des anomalies de nombre ou de structure qui se manifestent de façon constitutionnelle ou acquises, homogène ou mosaïque (Ghanassia et Procureur, 1999).

Les anomalies constitutionnelles existaient déjà chez l'embryon; elles se sont produites avant la fécondation, dans l'un des gamètes lors de la gamétogénèse, ou au moment de la fécondation, aboutissant alors à une aberration homogène touchant toutes les cellules de l'organisme (Rives, 2006).

Les anomalies acquises sont observées dans un seul organe, les autres organes sont normaux. L'accident chromosomique se produit au cours de la vie de l'individu; il est acquis par rapport au caryotype constitutionnel. Généralement ces anomalies sont témoins de processus néoplasiques, synonyme d'une tumeur.

La ségrégation anormale des chromosomes peut survenir également durant la mitose lors de développement embryonnaire (non-disjonction mitotique dans une cellule de l'embryon au cours de la segmentation ou de la gastrulation) donnant ainsi une mosaïque chromosomique, c'est-à-dire la présence chez le même individu de deux ou plusieurs populations cellulaires qui ont la même origine zygotique. Ces anomalies se manifestent par un caractère en mosaïque, c'est à-dire présente dans une partie seulement des cellules de l'individu. Le mécanisme de survenue d'une mosaïque est une non disjonction mitotique post-zygotique (figure 05) (Beri-Dexheimer, 2009).

Des études moléculaires ont montré que la plupart des cas de mosaïsme impliquent les anomalies de nombres concernant les chromosomes 13, 18, et 21 et le chromosome X (Delozier-Blanchet et Vekemans, 1997).

Les mosaïques sont à différencier des chimères, en effet le chimérisme est le résultat de la fusion de deux cellules-œuf en un seul embryon à un stade précoce. Tout se passe comme si deux faux jumeaux avaient fusionné en un seul individu. Cet individu est alors constitué de deux lignées cellulaires qui diffèrent pour de nombreux gènes et chromosomes (figure 05). Exemple: chi 46, XX/46, XY: chimère produite par une double fécondation, ou une fusion entre deux zygotes (Dehaese *et al.*, 2000).

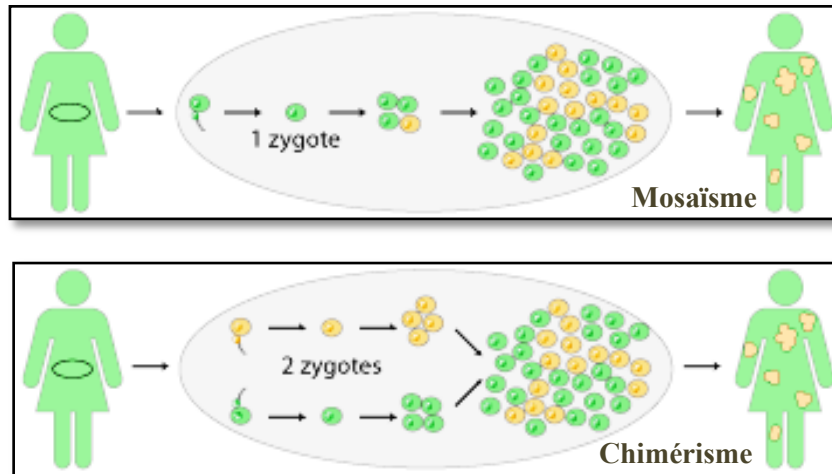


Figure 05 : Représentation des mosaïsmes et chimérismes

(<http://www.orpha.net/orphaschool/elearn1.htm>)

I.2.1. Les anomalies de nombre

Les anomalies numériques sont définies par le gain ou la perte des chromosomes aussi bien gonosomiques que autosomiques. Dans la plupart des cas, une anomalie numérique est constitutionnelle, néanmoins des anomalies en mosaïques sont rencontrées (Bourrouillou, 1992).

I.2.1.1. Les polyplœidies

Les polyplœidies sont définies par l'existence au caryotype d'un nombre de chromosomes égal à un multiple du complément haploïde supérieur à 2. Les cellules normales sont diploïdes ($2n = 46$ chromosomes). Si deux spermatozoïdes fécondent un ovocyte, le zygote produit sera triploïde ($3n$ soit 69 Chromosomes). Une triploïdie peut aussi survenir en cas d'échec de la méiose, conduisant ainsi à la fécondation d'un ovocyte diploïde par un spermatozoïde haploïde. Ces anomalies constitutionnelles sont très rarement viables. Les embryons ou fœtus triploïdes n'arrivent pratiquement jamais à terme, et leur survie est très limitée (Griffiths *et al*, 2002). Les tétraploïdies et les polyplœidies de degré supérieur (polyplœidie) peuvent s'observer dans quelque cellule cancéreuse à un stade avancé de la tumorigenèse (Donnai, 2009).

I.2.1.2. Les aneuploïdies

Les aneuploïdies se traduisent par une modification du nombre total de chromosomes. Les plus fréquentes sont les trisomies et les monosomies qui résultent d'un problème de disjonction lors de la division méiotique (gamète avec un chromosome surnuméraire et gamète avec un chromosome manquant) (figure 06).

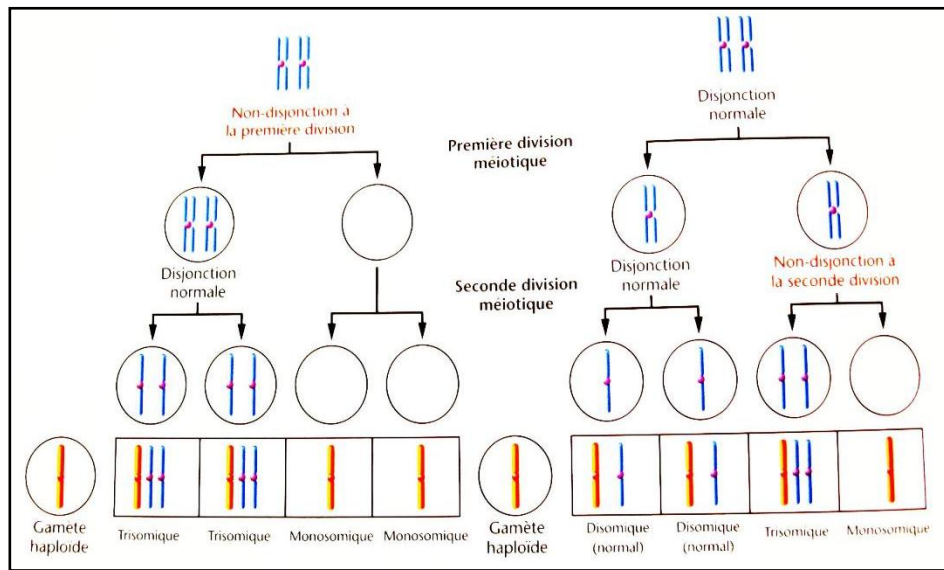


Figure 06 : Non-disjonction des chromosomes durant la première ou la seconde division mitotique (Klug *et al.*, 2006).

A. Les trisomies

Les trisomies sont les anomalies chromosomiques les plus communes dans l'espèce humaine (4% des grossesses reconnues). Elles sont définies par la présence d'un chromosome surnuméraire, le caryotype comporte alors 47 chromosomes. Tous les chromosomes peuvent être touchés et la plupart des trisomies occasionnent des avortements précoces (Dehaese *et al.* 2000). Néanmoins, les trisomies les plus fréquemment observées à la naissance concernent les chromosomes 13, 18, 21 et les chromosomes sexuels. Ces trisomies sont observées chez 0.3 % des nouveau-nés. La trisomie 16 est fréquemment observée dans les produits de fausse-couche (Vaubourdolle, 2007).

A.1. Les anomalies de nombre autosomique

➤ **La trisomie 21 (syndrome de Down) :** la trisomie 21 représente la principale cause d'anomalies chromosomiques à la naissance (49 % des aneuploïdies). Elle se traduit par la présence d'un chromosome 21 surnuméraires (trois chromosomes 21 au lieu de deux). Le lien âge trisomie 21 s'expliquerait pour certains par l'augmentation de la non-disjonction méiotique d'origine maternelle avec l'âge (Bouizegarène *et al.*, 2007). Les risques d'avoir un enfant trisomique 21 à la naissance sont de 0.07%, 0.1%, 0.3%, 01%, 4.5% pour une femme âgée respectivement de 25 ans, 30 ans, 35 ans, 40 ans et 45 ans. généralement 1sur 700 nouveau-nés (Vaubourdolle, 2007).

➤ **La trisomie 18 (syndrome d'Edward) :** la trisomie 18 est le deuxième autosomique le plus fréquent après la trisomie 21. Il s'agit d'un syndrome malformatif très grave entraînant une mort précoce. La naissance estimée prévalence est de 1 sur 7000 et 90% des cas à partir d'une maternelle non-disjonction méiotique, en particulier la méiose II (Chen et Chien, 2007).

➤ **La trisomie 13 (syndrome de Patau) :** La trisomie 13 conséquence de la non-disjonction des chromosomes homologues lors de la formation des gamètes, est souvent associée à des malformations congénitales généralement létales. (Traore *et al.*, 1997). la trisomie 13 est estimé à environ 1 sur 10000 (Jorde *et al.*, 2004).

A.2. Les anomalies de nombre gonosomique

➤ **Syndrome de Klinefelter :** Le syndrome de Klinefelter touche environ 1 homme sur 500, c'est l'anomalie la plus fréquente puisqu'elle représente plus de 60 % des anomalies de nombre touchant les gonosomes (May-Panloup *et al.*, 2001). Le caryotype met en évidence une formule à 47, XXY ont une fertilité réduite, certains patients porteurs d'autres types d'anomalies (XXXY et XXXXY) sont fertilité mais peuvent montrer un retard mental, parfois en mosaïque (généralement 46, XY ; 47, XXY) (Stevens et Lowe, 1997).

➤ **Syndrome triplo X (Supère femme) :** Le syndrome triplo X correspond à la présence chez des personnes de sexe féminin. Cette particularité génétique est retrouvée environ (1 sur 1000). Les femmes ont trois chromosomes X au lieu de deux, un chromosome X supplémentaire. En raison des connotations négatives parfois attachées au terme de trisomie X ou du risque de confusion avec la trisomie 21, on préfère utiliser le terme de formule 47, XXX ou triplo X (Plomin *et al.*, 1999).

➤ **Le syndrome XYY :** La prévalence de syndrome 47, XXY est estimé à environ (1 sur 1000) chez les hommes. La taille adulte est généralement augmentée et la fertilité sont généralement normaux. La majorité des cas de syndrome XYY sont dues à une non-disjonction paternelle lors de la méiose II, la suite d'une méiose normale. Dans certains cas, sous forme de mosaïque 46, XY/47, XYY (Lenroot, 2010).

B. Les monosomies

Les monosomies sont caractérisées par l'absence d'un chromosome au caryotype. Elles entraînent un nombre important d'avortements précoces et les sujets atteints de monosomies ne sont jamais viables à l'exception de la monosomie X (syndrome de Turner 45, XO) (Dehaese *et al.* 2000).

➤ **Syndrome de Turner** : le syndrome de Turner est dû à l'existence, chez un individu de phénotype féminin, d'une population plus ou moins importante de cellules ayant perdu la totalité ou une partie du deuxième chromosome X. Sa prévalence est estimée à 1/5000 (soit 1/2500 naissances chez la fille) (Cabrol, 2007). Les formules chromosomiques varient du caryotype (45, XO) apparemment homogène à des formules en mosaïque plus ou moins complexe ou à des caryotypes dans lequel un des chromosomes X présente une anomalie de structure aboutissant à une délétion partielle (Ravel et Siffroi, 2009).

I.2.2. Les anomalies de structure

Les anomalies structurales sont définies par la modification de la structure d'un ou de plusieurs chromosomes. Elles sont-elles –mêmes divisées en deux grands groupes suivant qu'elles :

- entraînent une perte ou un gain de matériel chromosomique. Elles sont alors dites (déséquilibrées) et entraînent un phénotype anormal.
- n'entraînent pas de perte ou de gain de matériel chromosomique. Elles sont alors dites équilibrées et n'ont alors aucune action sur le phénotype. Mais la ségrégation méiotique des sujets qui en sont porteurs est perturbée et il peut y avoir formation de gamètes chromosomiquement déséquilibrés. Si ces derniers sont féconds, il y a formation de zygotes porteurs d'une aberration chromosomique. L'évolution se fera soit vers une fausse couche spontanée précoce, éventuellement heureusement la plus fréquente, soit vers un enfant porteur d'une anomalie chromosomique qui entraînera chez lui un handicap le plus souvent lourd. On distingue plusieurs grands types d'anomalies structurales équilibrées (Bourrouillou, 1992).

I.2.2.1. Remaniements déséquilibrés

➤ **Les délétions (del)** : C'est la perte d'une partie d'un chromosome, soit terminale, soit interstitielle (deux points de cassure et re-soudure) (figure 07). La perte de matériel est très variable, pouvant aller de quelques dizaines à plusieurs millions de paires de bases. Selon leur taille, elles sont visibles au caryotype pour les plus grandes (Beri-Dexheimer, 2009).

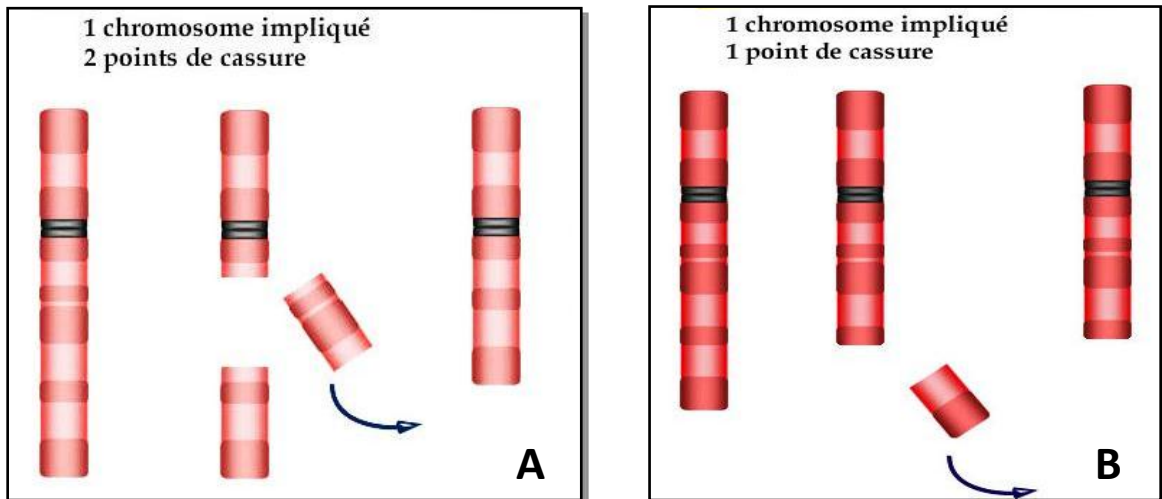


Figure 07 : schéma illustrant **A** : délétion interstitielle, **B** : délétion terminale
(<http://forum.magicmaman.com>)

➤ **Les anneaux (r)** : Ce sont des délétions plus ou moins étendues (souvent peu importantes) aux deux extrémités d'un chromosome, suivies du recollement du segment intermédiaire (par absence de télomères), ce qui aboutit à une structure annulaire (figure 08) (il existe également des anneaux acentrique, mais ceux-ci sont rapidement perdus, comme tout fragment ne possédant pas de centromère) (Beri-Dexheimer, 2009).

➤ **Les duplications (dup)** : Il s'agit de la répétition d'un fragment chromosomique de taille variable avec un gain de matériel génétique (figure 08).

Exemple: dup(9q): duplication au niveau du bras long du chromosome 9 (Dehaese *et al.*2000).

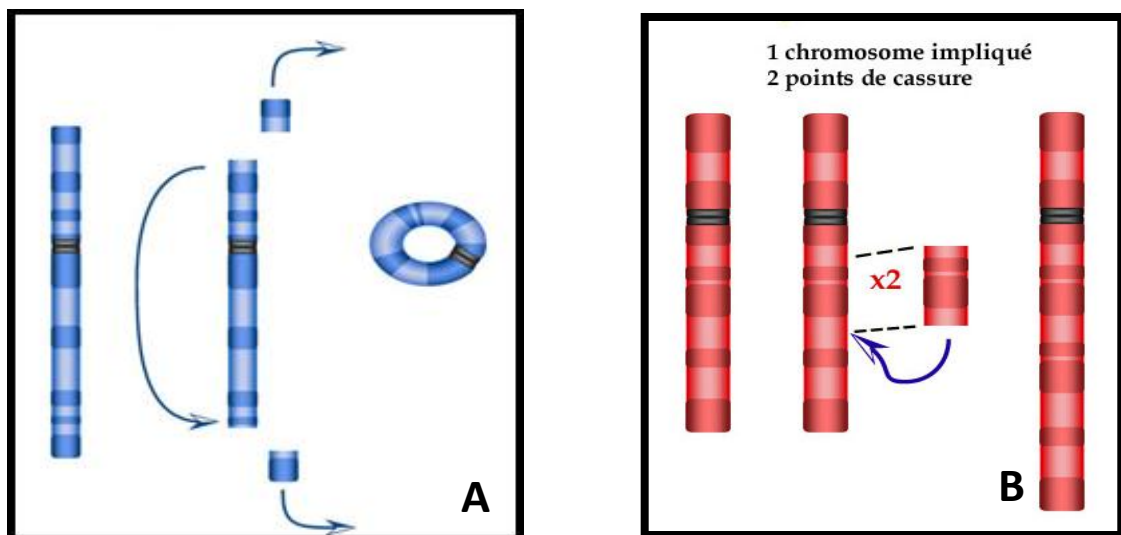


Figure 08 : schéma illustrant **A** : formation d'un chromosome en anneau, **B** : duplication.
(<http://forum.magicmaman.com>)

➤ **Les isochromosomes (i) :** Ils résultent d'une anomalie de division du centromère au cours de la mitose, conduisant à un chromosome médiocentrique portant deux fois les mêmes gènes (figure 09). Un individu porteur d'un isochromosome est donc trisomique pour l'un des bras du chromosome et monosomique pour l'autre bras (Beri-Dexheimer, 2009).

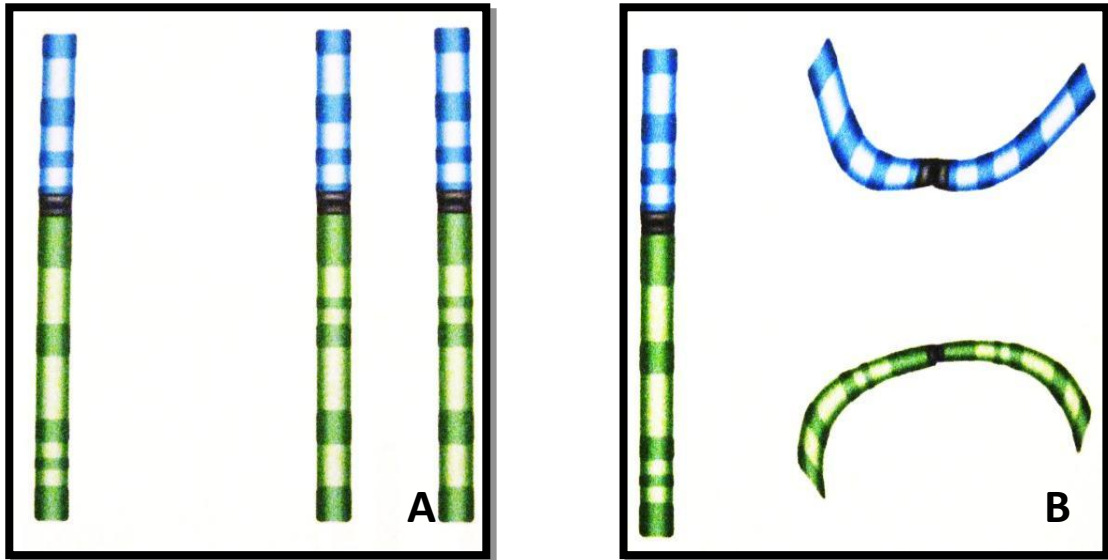


Figure 09 : Schéma illustrant A : division normale de chromosome,
B : formation d'un isochromosome. (<http://forum.magicmaman.com>)

I.2.2.2. Remaniements équilibrés

➤ **Les translocations (t) :** Elles se caractérisent par deux cassures sur deux chromosomes différents, le plus souvent non homologues, et recollement après échange des segments distaux. On distingue :

- Les translocations réciproques: résultent de cassures qui surviennent classiquement au niveau des chromatides de deux chromosomes non homologues (point de cassure en dehors de la région juxta-centromérique) suivies d'un échange segmentaire réciproque entre ces deux chromosomes donnant naissance à deux dérivés (figure 10). Les translocations réciproques sont retrouvées avec une fréquence 8 à 10 fois supérieure chez les hommes infertiles (Siffroi *et al.*, 2003).

Exemple : 46, XY, t (9;22) (q34;q11) : translocation entre les segments chromosomiques des bras longs des chromosomes 9 et 22 (retrouvée notamment dans les leucémies myéloïdes chroniques) (Dehaese *et al.* 2000).

- Translocation robertsoniennes : se produisent entre deux chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) par fusion centrique ou par cassure dans les régions juxta-centromériques, (figure 10).

Exemple : 45, XX, t (13q 14q) : translocation robertsonienne entre deux segments des bras longs des chromosomes 13 et 14 (translocation fréquente) (Beri-Dexheimer, 2009).

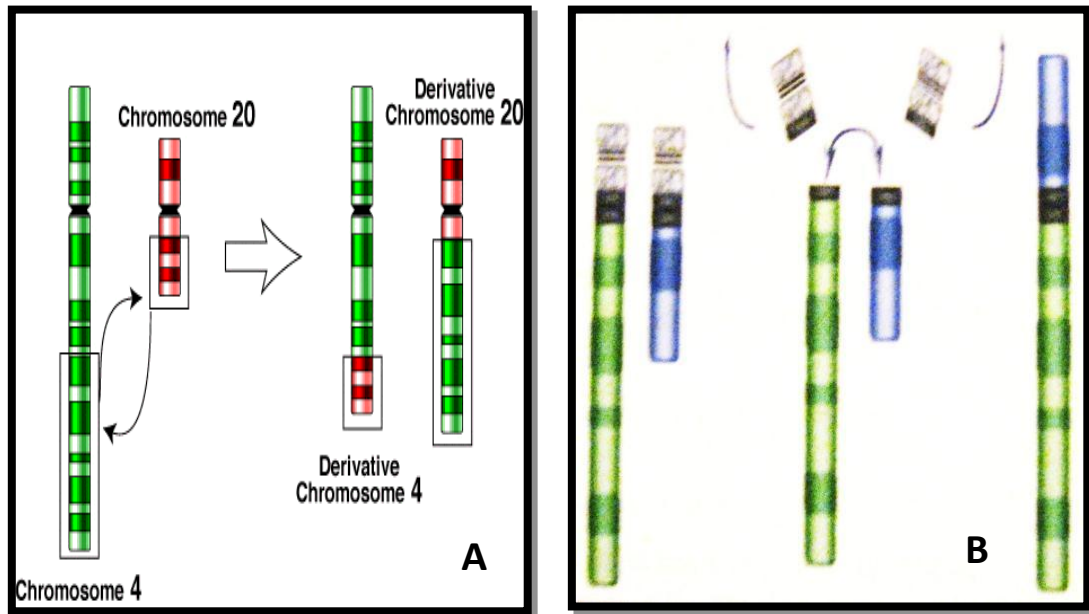


Figure 10 : Schéma illustrant A : translocations réciproques
B : translocation robertsoniennes (<http://forum.magicmaman.com>).

➤ **Les inversions (inv)** : les inversions sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après retournement de 180° du segment intermédiaire. Elles sont dites péricentriques si le centromère est inclus dans le segment intermédiaire, et paracentrique si les cassures se sont produites dans le même bras (figure 11).

Exemple : inv (3) (q26q29) : inversion de segments du bras long du chromosome 3 (Dehaese *et al.* 2000).

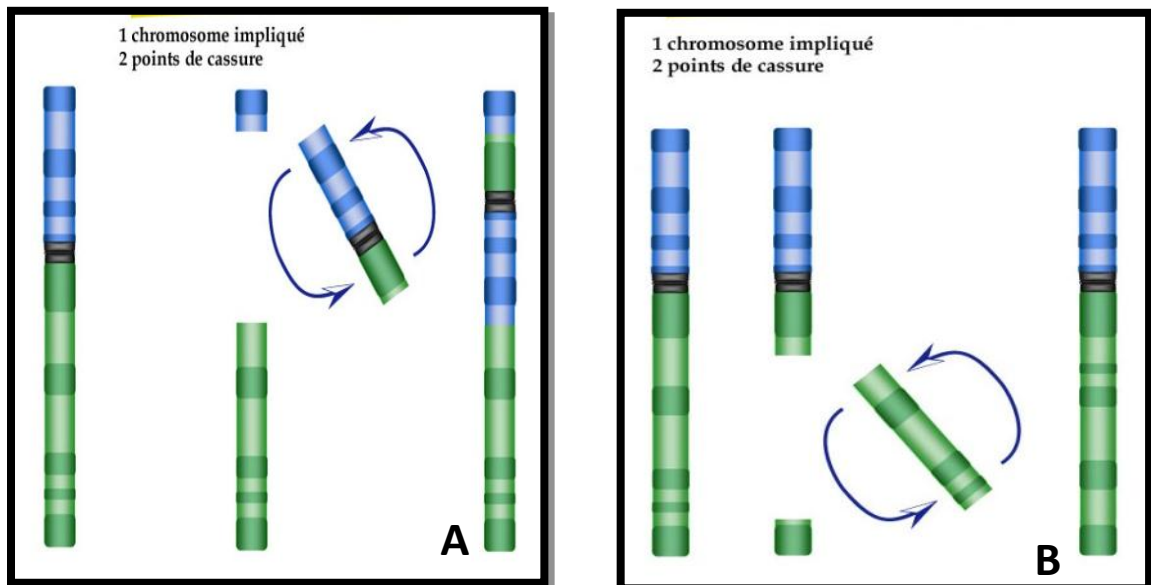


Figure 11 : Schéma illustrant A : inversions péricentriques,
B : inversions paracentriques (<http://forum.magicmaman.com>).

➤ **Les insertions (ins) :**

Un fragment de chromosome se casse, les régions flanquant ce fragment se recollent (comme dans une délétion), et le fragment se réinsère à un autre endroit, soit sur le même chromosome, soit sur un autre chromosome (figure 12). Une insertion peut être directe si le fragment garde son orientation par rapport au centromère (la bande la plus proximale restant la plus proche du centromère). Une insertion peut être inversée (inv ins) si la bande la plus proximale du fragment se retrouve la plus éloignée du centromère (Beri-Dexheimer, 2009).

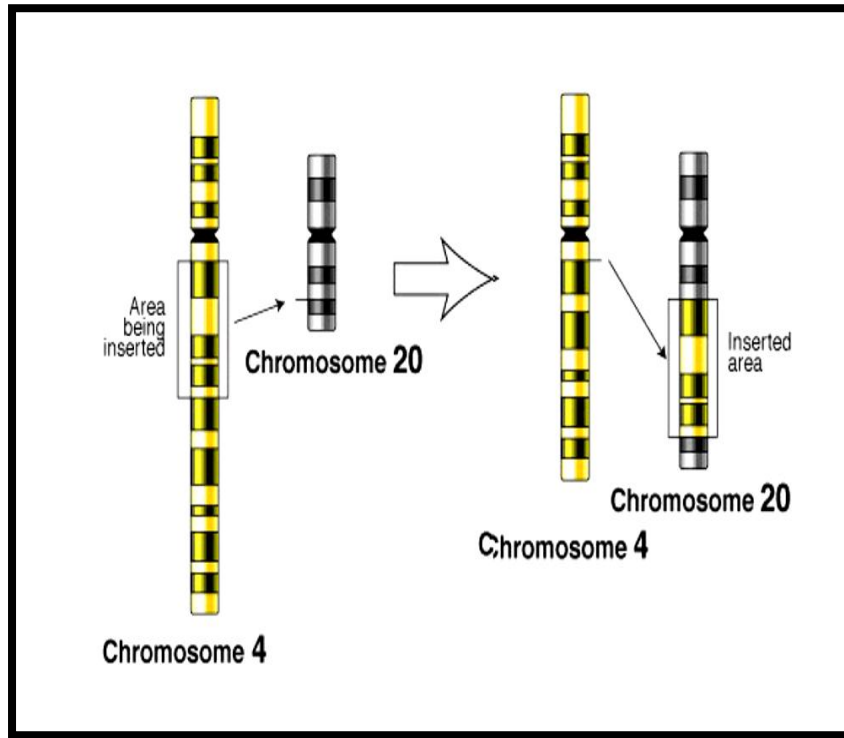


Figure 12 : Schéma illustrant d'insertion
(http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Insertion_chromosomique)

➤ **Le syndrome de l'X fragile :** le syndrome de l'X fragile, la cause la plus fréquente de déficience mentale (1 sur 2000 naissance) est aussi due à une expansion de la répétition des nucléotides au niveau du site fragile du chromosome X. cette anomalie est mise en évidence dans le caryotype sous la forme d'une discontinuité de la coloration à l'extrémité du bras long du chromosome X (Stevens et Lowe, 1997).

➤ **Syndrome cri du chat :** la majorité des délétions du bras court du chromosome 5 ont pour conséquence une maladie du cri-du-chat. La région critique pour la maladie du cri-du-chat est située en 5p15.2, elle est de taille moyenne de délétion de 5 à 40 Mb. Il existe cependant des délétions qui n'incluent pas la région critique et qui donnent des tableaux clinique différents, de gravité variable. Elles sont globalement de meilleur diagnostic.

L'incidence dans la population générale est de 1 sur 20000 à 1 sur 50000, ce qui est en fait une des délétions chromosomique les plus fréquentes (Turleau, 2001).

I.2.3. Anomalies chromosomiques acquises

Cette anomalies est dus à l'émergence de sous-populations cellulaires ayant acquise de nouvelle anomalie génétique qui détériorent d'avantage les mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire et facilitent les métastases. Toute tumeur est donc composée d'un ensemble de cellule différentes (hétérogénéité tumorale) pas les mutations somatique acquise (Stevens et Lowe, 1997). Les anomalies acquises peuvent être primaires (caractérisant la tumeur primitive) ou secondaires (surajoutées à l'anomalie primaire) (Dehaese *et al.*2000).

I.2.3.1. Hémopathies maligns

On entend par hémopathie maligne un groupe de pathologies regroupant les leucémies et les lymphomes.

➤ **Les leucémies** : On distingue les leucémies aiguës et les leucémies chroniques. Les leucémies aiguës sont caractérisées par un blocage de la maturation des cellules médullaires. Cette immaturité traduit une anomalie de la différenciation. De plus, les leucémies aiguës diffèrent des leucémies chroniques par leur rapidité évolutive spontanée (Bousquet, 2008).

- **Leucémie myéloïde chronique** : la leucémie myéloïde chronique (LMC), identifiée depuis le XIX^e siècle, est caractérisée par une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 $t(9;22)(q34;q11)$, le chromosome Philadelphie, dont l'expression conduit à une activité tyrosine kinase constitutionnelle (protéine BCR-ABL) responsable d'une prolifération cellulaire clonale, d'une dérégulation de l'apoptose et d'une modification des propriétés d'adhésion des cellules myéloïdes. Elle représente 15 % des leucémies de l'adulte et environ 600 nouveaux cas par an en France (Labussière *et al.*, 2007).

- **La leucémie lymphoïde chronique** : La leucémie lymphoïde chronique s'accompagne de trisomie 12 dans 50% des cas; la translocation $t(14,18) (q32,q21)$ est souvent notée dans les lymphomes non HODGKINIENS (Dehaese *et al.*, 2000).

L'anomalie cytogénétique est la translocation entre les chromosomes 14 et 18 $t(14;18)$ provoque la production d'une protéine prévenant la mort cellulaire (Stevens et Lowe, 1997).

➤ **Les lymphomes** : Les lymphomes sont des hémopathies lymphoïdes caractérisées par une infiltration ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, par des cellules lymphoïdes malignes et monoclonales issues soit de la lignée B (70% des cas) soit de la lignée T (Bousquet, 2008).

- **Lymphome de Burkitt** : Lymphomes très agressifs, ils font partie chez l'enfant des cancers pour lesquels les plus forts taux de guérison peuvent être obtenus à condition d'utiliser une chimiothérapie extrêmement lourde, Les résultats thérapeutiques restent beaucoup moins bons chez l'adulte. Ces lymphomes sont caractérisés par la présence d'une translocation $t(8;14)(q24;q32)$ ou de l'une de ses variantes $t(2;8)(p12;q24)$ et $t(8;22)(q24;q11)$ (Bastard., 2003).

I.2.3.2. Tumeurs solides

➤ **Sarcome synovial des membres chez l'adulte** : Le sarcome synovial est une tumeur rare et agressive des tissus mous. Il représente 7 à 8% des sarcomes malins, touchant préférentiellement les adultes jeunes L'étiologie demeure inconnue mais des études chromosomiques ont révélé l'existence d'une translocation spécifique entre les chromosomes X et 18 $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ est présente dans plus de 90 % des cas (Girszyn *et al.*, 2006; Rakotovoao *et al.*, 2009).

➤ **Tumeur d'Ewing** : la tumeur d'Ewing est une tumeur essentiellement osseuse correspondant à la forme indifférenciée des tumeurs neurectodermiques primitives périphériques. Avant l'âge de 20 ans, c'est la seconde tumeur osseuse maligne la plus fréquente (30%des cas) derrière l'ostéosarcome (60%des cas). La présence d'une translocation chromosomique équilibrée retrouvée dans 83 % des sarcomes d'Ewing. La translocation $t(11;22)(q24;q12)$ dévient un marqueur cytogénétique spécifique de cette entité tumorale (Taylor *et al.*, 2005).

I. 2.4. Fréquence globale des pathologies génétiques

Au total, c'est au moins 4% des naissances vivantes qui sont concernées soit par une anomalie chromosomique, soit par une malformation congénitale majeure (Jeanpierre *et al.*, 2004). Le tableau ci-dessous montre la prévalence de ces pathologies.

Tableau II : anomalies chromosomiques identifiées en France, en 2005

Anomalie chromosomique	Quantité (%) n=4494
Trisomie 21	41
Trisomie 18	12.6
Trisomie 13	4.7
Syndrome de Turner et associés	6.8
Syndrome de Klinefelter et associés	2.3
Trisomie X	1.5
Autres anomalies déséquilibrées	15.1
Anomalies équilibrées	16

(Bouizegarène *et al*, 2008)

I.3. Cytogénétique et pronostic des anomalies de caryotype

I.3.1. Génétique médicale : diagnostic des pathologies chromosomiques

L'accroissement des connaissances dans tous les domaines de la génétique et en particulier en génétique médicale a été important au cours de la trentaine dernières années. Pour certains, la génétique «vit» une véritable révolution, certains pensent, peut-être à tort, que la médecine deviendra une médecine génétique. En effet, les cartes génétiques et physiques des chromosomes humains sont de plus en plus précises (Bonneau, 2011).

La recherche sur le génome humain continue à produire, une quantité impressionnante de connaissances dans le domaine la génétique humaine et médicale. Grâce à des avancées technologiques spectaculaires et à des investissements financiers massifs, la génétique et la biologie moléculaire ont permis d'élucider la séquence totale du génome humain et de mieux connaître la localisation et la fonction des gènes, en particulier ceux impliqués dans des maladies humaines.

I.3.1.1. Cytogénétique conventionnelle

La cytogénétique étudie les chromosomes. Elle consiste en l'établissement d'un caryotype standard qui permet une étude morphologique fine des chromosomes : anomalie du nombre de chromosomes (trisomies, monosomies...) et/ou de leur structure (translocation) (Callen et Perasso, 2005). Cette technique a connu son véritable essor en 1956 quand Tjio et Levan décrivent les 23 paires de chromosomes de l'espèce humaine. Elle a ensuite rapidement trouvé des applications médicales avec la mise en évidence de la première anomalie chromosomique humaine en 1959 par l'équipe du Pr J. Lejeune (hôpital Necker, Paris) : la trisomie du chromosome 21. Le caryotype a été le premier examen à permettre une analyse de l'ensemble de notre patrimoine génétique et reste encore l'examen génétique le plus prescrit (Keren *et al.*, 2010).

➤ **Principe :** Son principe est basé sur la mise en culture des cellules pour les quelles on veut établir un caryotype. Après une période d'incubation, les cellules en multiplication sont bloquées en métaphase, en présence d'un poison du fuseau mitotique telle que la colchicine qui dépolymérise la tubuline du fuseau.

Les cellules ainsi obtenues subissent successivement un traitement hypotonique, fixation plusieurs fois, et étalement sur des lames. La préparation chromosomique est observée au microscope photonique après coloration au Giemsa.

Avec cette technique, on arrive à établir un caryotype avec des chromosomes de morphologie distincts, néanmoins en l'absence des bandes chromosomiques, les chromosomes au sein de quelques groupes ne peuvent être distingués. Pour cela, on a généralement associé à cette technique des techniques de marquage pour la révélation des bandes, ces traitements font apparaître le long des chromosomes, de façon reproductible d'une métaphase à l'autre, une alternance de bandes claires (peu colorées) et sombres (fortement colorées). La disposition topographique de ces bandes est caractéristique d'un chromosome donné (Echard, 1973).

Les techniques de marquage en bandes des chromosomes utilisées en routine au laboratoire sont:

➤ **Les bandes G** obtenues par dénaturation enzymatique, avec de la trypsine, des chromosomes. La trypsine digère les protéines et permet l'apparition après coloration au Giemsa d'une succession de bandes permettant de classer et d'analyser les chromosomes.

Les bandes G marquent des régions d'ADN riches en liaison A-T et correspondent à des centres de condensation précoces pauvres en gènes actifs et en séquences *Alu* (tableau III).

➤ **Les bandes R** obtenues par dénaturation thermique des chromosomes. Les bandes R marquent des régions d'ADN riches en liaison G-C correspondant à des régions riches en gènes actifs et en séquences *Alu* (tableau III) (Gadji, 2005).

Tableau III : Propriétés des bandes chromosomiques (adapté de Bickmore et Sumner, 1989).

Bandes G (sombres avec la technique GTG)	Bandes R (sombres avec la technique RHG)
Riches en AT	Riches en GC
Pauvres en gènes	Riches en gènes
Pauvres en séquences <i>Alu</i>	Riches en séquences <i>Alu</i>
Riches en séquences <i>Line</i>	Pauvres en séquences <i>Line</i>
Réplication tardive	Réplication précoce
Peu de points de cassures correspondant à des remaniements	Contiennent la plupart des points de cassure correspondant à des remaniements

(Berger, 2007)

D'autres méthodes de banding peuvent être utilisées pour des informations particulières : bandes C pour caractériser l'hétérochromatine constitutive (centromère), NOR pour les régions contenant les organisateurs nucléolaires (Mugneret et Charrin, 2002).

I.3.1.2. Limites de la technique conventionnelle

Le caryotype conventionnel compte néanmoins un certain nombre de limites. En raison du temps requis pour la collecte et la mise en culture des cellules, ainsi que du processus d'analyse exigeant en main-d'œuvre, l'exécution d'un caryotypage complet nécessite environ de 7 à 14 jours (Mugneret et Charrin, 2002).

De plus, le principal problème du caryotype est son niveau de résolution, qui atteint au mieux 5 millions de paires de bases (Mb). Ainsi, les anomalies inférieures à 5 Mb ne sont pas détectées. Une bande chromosomique correspond à environ 10^7 paires de bases soit 5 à 10% d'un chromosome. Les translocations, lorsqu'elles impliquent de très petites portions de chromosomes, ne sont donc pas toujours bien identifiables. Afin de contourner cette difficulté, les techniques dites de cytogénétique moléculaire se sont développées dans les années 1990, au premier rang desquelles la technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) qui, grâce à une sonde (fragment oligonucléotidique spécifique d'une région du

génomique), permet de mettre en évidence des remaniements chromosomiques inférieurs à 5 Mb (Bonneau, 2011).

I.3.2. les techniques de cytogénétique moléculaire

I.3.2.1. La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Principe : l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) consiste en l'hybridation de sondes froides d'ADN sur des lames de préparations cytogénétiques. Le pouvoir de résolution de la FISH (quelques kb) permet une analyse à l'échelle moléculaire, aussi bien sur métaphases que sur noyaux interphasiques (Mugneret et Charrin, 2002).

Les différentes stratégies de la FISH comprennent l'hybridation à l'aide d'un panel de sondes ciblant les principales anomalies. Les sondes de type alpha satellite permettent de dénombrer les chromosomes pour l'identification des monosomies et des trisomies. Les sondes spécifiques de gènes cibles combinées à un contrôle interne pour la détection d'une délétion ou de l'amplification d'un gène. Des couples de sondes spécifiques pour la détection de gènes de fusion et les sondes de fission placées de part et d'autre d'un gène pour identifier ses réarrangements avec des partenaires multiples (sondes break-apart). Des sondes de peinture chromosomique couplées par 2 ou en panel multi-couleurs (M-FISH) permettant la visualisation de tous les chromosomes entiers dans le but d'élucider les remaniements complexes (Sebaaa et Eclache-Saudreaux, 2010).

➤ **Limites de la technique FISH**

La principale limitation de cette technique est une conséquence directe de sa spécificité. En effet, contrairement au caryotype classique qui donne une vue d'ensemble de tous les chromosomes, l'hybridation *in situ* ne permet d'obtenir une information que sur la région chromosomique correspondant à la sonde utilisée. Elle reste un examen ciblé du génome qui nécessite de connaître l'anomalie à rechercher (Dupont, 1998).

Aussi la lecture des lames est délicate: de nombreux artefacts peuvent masquer un signal présent (défaut d'hybridation lie a une altération de l'ADN cible ou a une mauvaise pénétration de la sonde, superposition de signaux) ou au contraire générer un signal parasite (hybridation non spécifique) (Dupont, 1998).

La méthode de FISH est un examen ciblé nécessitant la connaissance préalable du locus étudié et ne permet pas de détecter les microremaniements.

C'est pourquoi des méthodes d'analyse globale du génome, plus résolutive que le caryotype ont été développées depuis quelques années. La plus prometteuse est l'hybridation génomique comparative (CGH) microarray (Sanlaville *et al.*, 2005).

I.3.2.2. L'hybridation génomique comparative : CGH classique et CGH array

La CGH est réalisée à partir de l'ADN génomique d'un patient (ADN test), marqué par un fluorochrome émettant dans le vert et de l'ADN génomique d'un sujet normal (ADN de référence), marqué par un fluorochrome émettant dans le rouge. Ces deux ADN marqués correspondent à des sondes qui vont être hybridées en compétition sur une cible. Dans la CGH classique, la cible est constituée par les chromosomes d'un sujet normal. Une différence dans le nombre de copies d'ADN entre l'ADN étudié (test) et l'ADN de référence, pour un locus donné, modifiera le rapport d'intensité des deux fluorochromes (figure 13). Une des limites de cette technique, outre le manque de reproductibilité, est son niveau de résolution qui dépasse rarement 5 Mb (Sanlaville *et al.*, 2005).

Plusieurs équipes ont montré que la substitution des chromosomes cibles par des fragments d'ADN génomique humain, déposés sur une lame de verre, permettait de surmonter les limites de la CGH sur chromosomes.

En effet, contrairement à la CGH classique, où les deux ADN sont hybridés sur des métaphases, l'hybridation est réalisée sur un support où sont déposés, sous forme de spots, des fragments d'ADN génomique extraits généralement de BAC ou de PAC (chromosomes artificiels de Phage). Ce développement technologique, permettant d'analyser simultanément un grand nombre de séquences d'ADN génomique déposées sur un support appelé « puce » (chip) par analogie aux puces électroniques, a été appelé CGH microarray (ou CGH sur microréseaux). Elle nécessite essentiellement trois composants : un support, en général des lames de verre, des sondes (fixées sur la lame) et des cibles (qui correspondent au matériel à étudier). Contrairement à la CGH sur chromosomes, le rapport de fluorescence n'est plus calculé selon l'axe de chromosomes mais au niveau de chaque dépôt correspondant au fragment d'ADN fixé. L'interprétation est de ce fait beaucoup plus rapide et automatisable. L'informatique joue un rôle central dans l'interprétation. Différents logiciels ont été développés permettant un traitement statistique des données et proposant une représentation graphique automatique des résultats (figure 13) (Sanlaville *et al.*, 2005).

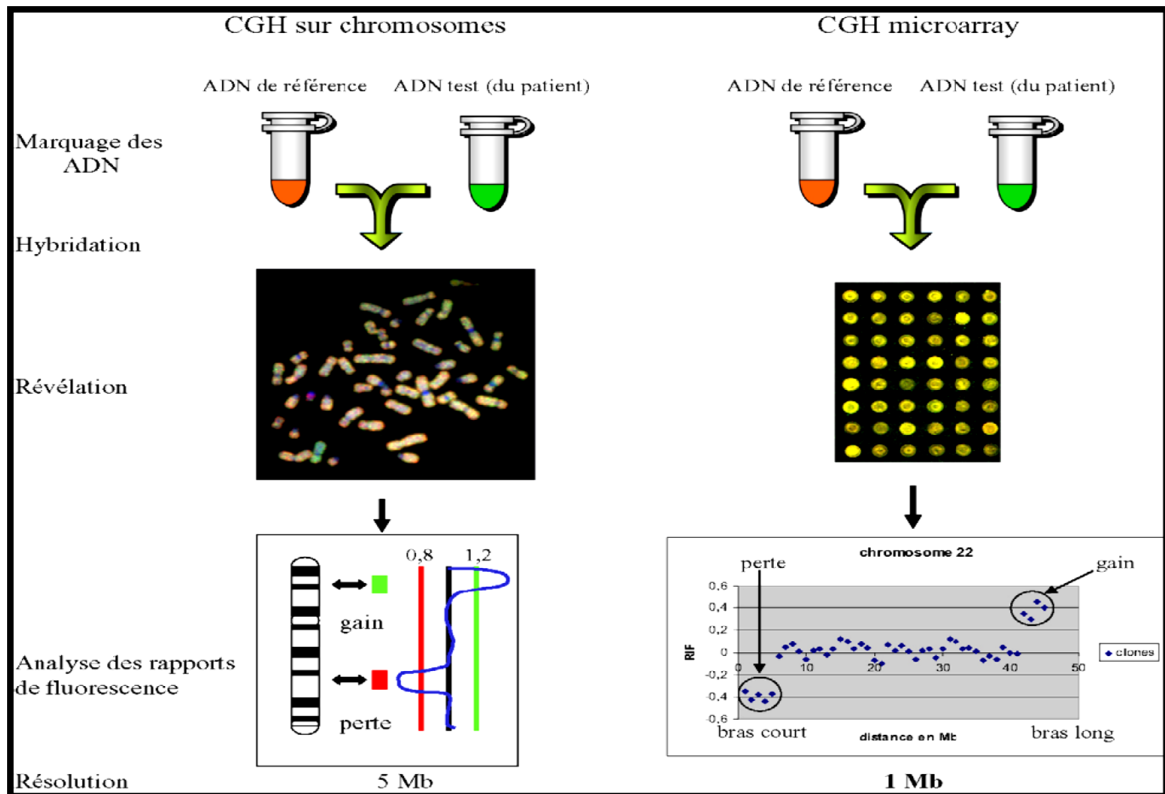


Figure 13: Synoptique comparatif des principales étapes entre la CGH sur chromosomes à gauche et la CGH microarray à droite (Sanlaville *et al.*, 2005).

I.4. Tissus utilisés pour un examen cytogénétique

Le prélèvement est certes avec la culture, l'étape la plus importante, pour l'obtention d'une carte chromosomique. Aussi le respect de certaines règles est-il nécessaire notamment dans des conditions d'aseptiser absolue. Ceci afin d'éviter la multiplication de germes banale lors de la mise en culture (Bado, 1984).

➤ Lymphocytes circulants

Le sang veineux est le tissu utilisé le plus communément. Un échantillon de 2 à 3 ml est prélevé. Les lymphocytes sont activés par l'utilisation d'un mitogène, la phytohémagglutinine (PHA), est incubés pendant 48 à 72 heures à 37 °C (Vaubourdolle, 2007).

➤ Villosités choriales (trophoblaste)

Les biopsies placentaires sont utilisées pour le diagnostic prénatal. le prélèvement est réalisé entre la 10 et la 12 semaine d'aménorrhée. Par voie trans-abdominale ou transcervicale. Le risque de fausse couche lie au prélèvement est de l'ordre de 2%. Les cellules trophoblastiques se multiplient spontanément. Le caryotype peut donc être obtenu très

rapidement. Néanmoins, ce résultat devra être confirmé sur la culture de villosités. Avant la mise en culture, il est très important de bien séparer les villosités fœtales des éventuels fragments de tissu d'origine maternelle (Donnai, 2009).

➤ **Liquide amniotique**

Collecté entre 14 et 20 semaines, le liquide amniotique contient des cellules fœtales desquamées. Ces cellules poussent tellement lentement qu'il faut habituellement 2 semaines de culture pour obtenir suffisamment de cellule en division pour permettre le caryotype (Donnai, 2009).

➤ **Biopsie cutanée**

La culture des fibroblastes de la peau est utilisée pour rechercher des anomalies chromosomiques non détectables dans le sang (dans le cadre d'anomalies en mosaïque) (Donnai, 2009).

➤ **Biopsie testiculaire**

Cet examen est le seul qui permet d'étudier la méiose. Chez la femme, les méiose se déroulent dans les ovaires durant la vie fœtale. Il n'y a donc aucune possibilité d'étude la méiose féminine en clinique (Donnai, 2009).

➤ **Cellule embryonnaire**

Après fécondation *in vitro*, les cellules embryonnaires (blastomères) peuvent être biopsiées sur un embryon au troisième jour de développement. Les blastomères biopsiés sont fixés sur des lames de verre. Pour la recherche d'anomalie chromosomique ou diagnostic de sexe et réimplantation (Vaubourdolle, 2007).

➤ **Les cellules cancéreuses**

Afin de diagnostiquer un cancer et de pronostiquer son évolution, il est possible de prélever des cellules de la moelle osseuse (par ponction médullaire) (dans le cas des hémopathies malignes ou des cellules de tumeurs solides) (Dehaese *et al.*, 2000; Vaubourdolle, 2007).

I.5. Indication du caryotype

En pathologie humaine, les indications du caryotype sont très nombreuses que ce soit pendant la période prénatale, ou postnatale à la naissance, durant l'enfance, à la puberté, chez les adultes en âge de procréer ou dans les processus cancéreux (Stevens et Lowe, 1997).

I.5.1. Indication cytogénétique d'anomalies chromosomiques constitutionnelles

I.5.1.1. Indications du caryotype prénatal

Le dépistage des anomalies chromosomiques représente encore aujourd'hui le motif de plus de 80 % des prélèvements fœtaux.

Des diagnostics prénataux doit être caractérisée en vue de la consultation médicale pour le conseil génétique. Cette consultation permettra d'expliquer aux parents les risques et conséquences de cette anomalie afin de leur permettre de prendre une décision éclairée quant à l'interruption ou à la poursuite de la grossesse.

Les indications du caryotype fœtal sont bien définies :

- Age maternel > 38 ans,
- Antécédent d'anomalie chromosomique (enfant précédent atteint, translocation équilibrée chez l'un des parents),
- Anomalie échographique fœtale quel que soit le terme (Stevens et Lowe, 1997).

Le diagnostic génétique préimplantatoire est maintenant établi comme une fiable et précoce technique de diagnostic prénatal pour le chromosome déséquilibré résultant de translocations équilibrées parentales. Cependant, cette technologie est coûteuse et invasive, et seulement appropriés pour les femmes à risque particulièrement : les cas d'échecs d'implantation et chez des patientes de plus de 38 ans (Ogilvie, 2003; Vialard et Pellestor, 2008).

Les indications du diagnostic préimplantatoire cytogénétique en France correspondent au diagnostic de sexe pour les maladies génétiques liées à X et l'analyse chromosomique des embryons chez les couples dont l'un des parents est porteur d'une translocation (Stevens et Lowe, 1997).

I.5.1.2. Indications du caryotype postnatal

Un caryotype peut être indiqué à différents moments de la vie lors: du bilan d'un retard de croissance, d'un syndrome polymalformatif et/ou d'une dysmorphie chez un enfant;

- D'une ambiguïté sexuelle;
- D'une anomalie du développement pubertaire;

- Du bilan d'un retard mental, de troubles du comportement ou d'un retard des acquisitions;
- D'une étude familiale d'un patient présentant un remaniement chromosomique pour déterminer son caractère hérité ou de novo;
- D'un bilan d'hypofertilité, de fausses-couches à répétition;
- Fausses couches spontanées à répétition.

I.5.2. Indication cytogénétique à la recherche d'anomalie chromosomique acquise

Un caryotype peut être réalisé dans les processus cancéreux (cancers, hémopathie maline) ou après exposition à des agents chimiques ou radiations ionisantes. Les études cytogénétiques ont mis en évidence un ensemble de caractéristiques cytogénétiques et biologie moléculaire, au cours de la progression des tumeurs. Ces recherches se poursuivent et il faut espérer que les anomalies génétiques qui déterminent les anomalies cytogénétiques soient mieux connues et apportent une meilleure compréhension du comportement biologique des tumeurs (Stevens et Lowe, 1997).

II: Partie pratique

*II.1. Matériels
et Méthodes*

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel

II.1.1.1. Matériel biologiques

➤ **Milieux de culture prépare**

Pour l'obtention d'un milieu de survie pour les lymphocytes on a utilisé 8 ml de milieu de culture prépare pure une seule culture, contenant: 6.4 ml de RPMI (**Roswell Park Memorial Institute**) (1640) à pH entre 7.2 et 7.4 avec 20% (1.6 ml) de Sérum de veau fœtal, 32µl d'antibiotique (Pénicilline, Streptomycine) 1 MUI/ml et 16µl de L-Glutamine 200 mM/10 ml.

➤ **Phytohémagglutinine (PHA)**

La PHA est une lectine extraite du haricot à graines rouges. Les effets les plus importants de la PHA sont la stimulation de la division des lymphocytes dans le milieu de culture (Khosrowchahli et Gaèm-M agamie, 1994).

➤ **Sérum veau fœtal**

Le sérum veau fœtal correspond à la partie liquide du sang prélevé sur des fœtus de veaux. Il est utilisé comme complément nutritif pour toutes les cultures de cellules effectuées dans les laboratoires de recherches au sens large. On peut le remplacé par le sérum humain, de groupage AB+, et qui a donné de bons résultats (Fethi, 2008).

➤ **Colchicine**

La colchicine est un alcaloïde végétal extrait du colchique, son intérêt pratique au la laboratoire est sa capacité à bloquer la polymérisation des microtubules. Cet arrêt de l'élongation du microtubule provoque une disparition rapide du fuseau mitotique et l'arrêt du processus de prolifération cellulaire (Niel et Scherrmann, 2006).

➤ **Echantillons**

- Le prélèvement sanguin consiste en une prise de sang veineux dans un tube contenant un Anticoagulant (L'héparine). La quantité de sang minimale nécessaire est de 2,5 ml (prélèvement stérile).

- Le prélèvement tumoral frais d'un patient âgé de 27 ans, au niveau de coude à droite. La taille du prélèvement : taille idéale = 1 cm³.

II.1.1.2. Les solutions utilisées

- **Milieu de dénaturation EBSS (Earle's Balanced Salt Solution)** : avant l'utilisation la solution doit être dilué au 1 / 10 avec l'eau distillée.

- **Solution hypotonique** : solution de KCl 75 mM conserve à 37°C.

- **Solution de fixation (carnoy acétique)** : 01 volume d'acide acétique de 99% à 100% et 03 volumes de méthanol à 99.6% conservé à 4°C.

II.1.2. Méthodes

Les échantillons de cellules qui ont été retenues dans ce mémoire, pour les analyses cytogénétiques, sont les cellules lymphatiques du sang et les cellules du sarcome synovial à cellules fusiformes au niveau du coude. Pour avoir des résultats assez fiables et reproductibles, deux cultures cellulaires ont été réalisées pour chaque échantillon.

II.1.2.1. Mise en culture des cellules lymphatiques

➤ **Préparation de la culture cellulaire**

La culture cellulaire des lymphocytes a été faite en mettant 500µl du sang total de chaque patient (l'échantillon) dans des tubes conique de 15ml contenant : 8ml de milieu de culture préparé, 50µl de PHA (7mg/ml) et 16µl de l'héparine (25000U/l).

À titre d'indication, la mise en culture des cellules a été réalisée dans des conditions de stérilité sous la hotte à flux laminaire en salle de culture afin d'éviter d'éventuelles contaminations.

➤ **Incubation**

Les cultures cellulaires sont incubées pendant 72 heures à la température de 37°C. La durée d'une culture cellulaire est variable en fonction du type cellulaire considéré et de la quantité du matériel biologique de départ. Il est signalé que, les tubes sont agités doucement deux fois par jour le long de la période d'incubation.

➤ **Blocage en métaphase**

Après 70 heures d'incubation, les cellules sont bloquées, en métaphase, en ajoutant 100 µl de la colchicine (10µg/ml) et remises, par la suite, en incubation pendant 2 h, dans les mêmes conditions.

II.1.2.2. Mise en culture des cellules du sarcome synovial

➤ **Préparation de la culture cellulaire**

À l'arrivée du prélèvement au laboratoire, le fragment tumoral est extrait du tube de transport et déposé dans une petite boîte de Petri stérile. Un volume de 01 ml du milieu de culture RPMI (1640) est ajouté pour faciliter le découpage et la dissociation mécanique (ciseau ou scalpel stérile) pour obtenir des fragments les plus petits possibles. Les fragments sont transférées dans un flacon plat de 50 ml contenant 5 ml de milieu de

culture RPMI (1640) additionné par le sérum de veau fœtal à 10% (v/v) et antibiotiques (pénicilline, streptomycine) 1 MUI/ml.

➤ **Incubation**

La culture cellulaire est incubée pendant 18 jours à 37°C tout en changeant le milieu de culture périodiquement, après chaque 48h. Les cellules en suspension vont sédimenter puis adhérer à la surface du flacon. Après quelques heures, elles commencent à se diviser et à proliférer pour former un tapis cellulaire visible à l'œil nu. Ce tapis indique que la croissance cellulaire a atteint la phase exponentielle de croissance avec de nombreuses cellules en mitoses.

➤ **Blocage en métaphase**

Après 18 jours d'incubation, on a ajouté un volume de 100µl de Colchicine (10µg/ml). La colchicine est laissée agir pendant 2 h, toujours dans l'étuve à 37°C.

Les cellules sont débarrassées du milieu surnageant et traitées, par la suite, avec 0,5 ml à 1 ml de la trypsine (0.25%) pendant quelques minutes à 37°C pure décollées les cellules au supporte et les unes des autres. En fin, L'action de la trypsine est stoppée par adjonction de milieu de culture qui est neutralisant la Trypsine. Les suspensions cellulaires sont alors réparties dans des tubes coniques est centrifugée pour entamer l'étape du choc hypotonique.

II.1.2.3. Choc hypotonique

Lors de cette étape, les cellules récoltées précédemment ont été centrifugées à 2000 tr/min pendant 5min. Le culot récupéré est mélangé avec un volume de 1 ml de KCl à (75mM), pour provoquer le choc hypotonique. Le mélange est agité tout doucement jusqu'à dissolution totale. Par la suite, les tubes sont ajustés jusqu'à 5 ml avec le KCl (75mM) puis introduits en position horizontale dans l'étuve réglée à 37 °C pendant 30 min.

II.1.2.4. Fixation

Les échantillons de cellules, que ce soit les cellules lymphatique ou les cellules du sarcome synovial, sont soumis à deux fixations successives afin obtenir un culot clair. Pour ce faire, les suspensions cellulaires sont centrifugées (2000tr/min pendant 5mn). Après élimination du surnageant, le culot subit une 1^{ère} fixation en ajoutant 1ml de la solution de fixation qui est un mélange de méthanol et d'acide acétique, dite (carnoy acétique), avec des proportions de 3 V de méthanol et 1 V d'acide acétique.

Le mélange est agité doucement jusqu'à dissolution totale du culot à l'aide d'un vortex, afin de maintenir la structure de la membrane plasmique intacte. Puis, on complète le volume jusqu'à 4 ml avec le fixateur. Les suspensions cellulaires sont centrifugées, encore une autre fois, à 2000 tours/minute pendant 5 min. Les mêmes étapes sont suivies lors de la 2^{ème} fixation.

À la fin de la 2^{ème} fixation. Le culot est débarrassé du surnageant tout en laissant 0,5 à 1 ml : un volume proportionnel avec la quantité du culot cellulaire.

NB: Si la couleur de la solution n'est pas claire, on doit faire une 3^{ème} fixation en suivant les mêmes étapes précédentes.

II.1.2.5. Etalement

➤ Préparation des lames

Avant de passer à l'étalement, les lames sont introduites dans une solution de l'acide sulfurique 35% pendant 24 heures pour les dégraisser. Ensuite, elles sont rincées successivement à l'eau courante pendant 30 minutes puis avec l'eau distillée (utilise les lames SuperFrost). Après leur séchage, on les a déposés dans le congélateur réglé à -20°C pendant quelques heures.

➤ Etalement proprement dit

A l'aide d'une pipete Pasteur, on a prélevé un petit volume de la suspension cellulaire obtenue après la 2^{ème} fixation et on a déposé, par chute libre d'une hauteur de 30 cm, deux gouttes séparées, sur chaque lame afin d'éviter l'entassement et l'effet adjacent des chromosomes. Les lames sont séchées à l'air libre.

II.1.2.6. Coloration au Giémsa

Les lames sont colorées, en couvrant toutes leurs surfaces, par la solution de Giemsa diluée à 1/10. Après 20 min de contact avec le colorant, les lames sont rincées à l'eau de robinet et séchées à l'air libre.

Le reste de la suspension cellulaire peut être conservée dans le réfrigérateur (+ 04°C) dans la solution de fixation.

Par mesure de sécurité, les échantillons des deux cultures de chaque prélèvement sont analysés sur trois lames au minimum.

II.1.2.7. Montage des lames

Pour le montage des lames, on a déposé deux gouttes d'Eukitt sur la surface de la lame, cette dernière est couverte par une lamelle traitée au préalable par la solution d'exylain à 0,80 M. Par ce procédé, les lames colorées se conservent parfaitement et les couleurs ne sont pas dégradées. Il est indiqué, que la lamelle est déposée de sorte à éviter la formation des bulles d'air entre elle et la lame et si c'est le cas, les bulles sont chassées avec une pince. Les lames sont marquées avec un crayon diamant.

II.1.2.8. Lecture des lames

Pour une observation bien claire, on a utilisé, d'abord, l'objectif ($\times 10$) pour localiser les bonnes mitoses, ensuite on est passé à l'objectif ($\times 100$), cet objectif exige l'utilisation de l'huile à immersion. Pour chaque patient, on a fait la lecture de 30 métaphases, si un cas de mosaïsme est observé, on doit continuer jusqu'à 100 métaphases.

La prise de photos a été faite à l'aide d'un appareil de haute résolution 14MP adapté au microscope photonique.

Les chromosomes sont classés selon la nomenclature internationale de classification en appliquant l'outil informatique : SMART TYPE conçu pour l'établissement et l'analyse du caryotype.

II.1.2.9. Mise en évidence de bandes chromosomiques

Les bandes chromosomiques qui ont été révélées dans ce travail sont de type R-banding et G-banding. Les bandes R sont observées après dénaturation par la chaleur des chromosomes métaphasiques. Alors que les bandes G sont obtenues après traitement des chromosomes par la trypsine. Les deux traitements : (bandes R : RHG) ou (bandes G : GTG) sont suivies d'une coloration au Giemsa.

➤ Mise en évidence des bandes de type R

Pour la révélation des R-banding, on a utilisé des lames avec de bonnes mitoses non colorées. Pour ce faire, les lames hydratées avec l'eau du robinet, sont plongées dans la solution dénaturante EBBS (dilué 1/10) chauffée à 87° C au bain marie pendant 20 à 80 min. Après dénaturation, les lames sont rincées à l'eau courante, puis colorées par le Giemsa 4% (04 ml Giemsa, 04 ml tampon Sorensen, 92 ml l'eau distillée) pendant 8 minutes. Avant de passer à l'observation, les lames sont rincées avec l'eau du robinet et séchées à l'air libre.

➤ **Mise en évidence des bandes de type G**

Pour réaliser le G-banding, les lames de bonnes mitoses et non colorées sont plongées dans une solution de trypsine 0.25% (mélange de 50 ml de solution mère de la trypsine 2.5% avec 50 ml de solution PBS).

Après le traitement enzymatique pendant 10, 20 à 30 seconds à la température ambiante, les lames ont été lavées directement deux fois par le PBS ensuite colorées par le Giemsa 2% (02 ml Giemsa, 02 ml tampon Sorensen, 96 ml l'eau distillées) pendant 7minutes. Avant de passer à la lecture des caryotypes, on rince les lames à l'eau du robinet puis on sèche à l'air libre.

➤ **Lecture**

Pour l'observation et la lecture des résultats on suit les mêmes étapes que la coloration simple avec le Giemsa, en utilisant l'agrandissement ($\times 10$), pour localiser les bonnes mitoses, ensuite l'objectif à immersion ($\times 100$) pour analyser le caryotype en question.

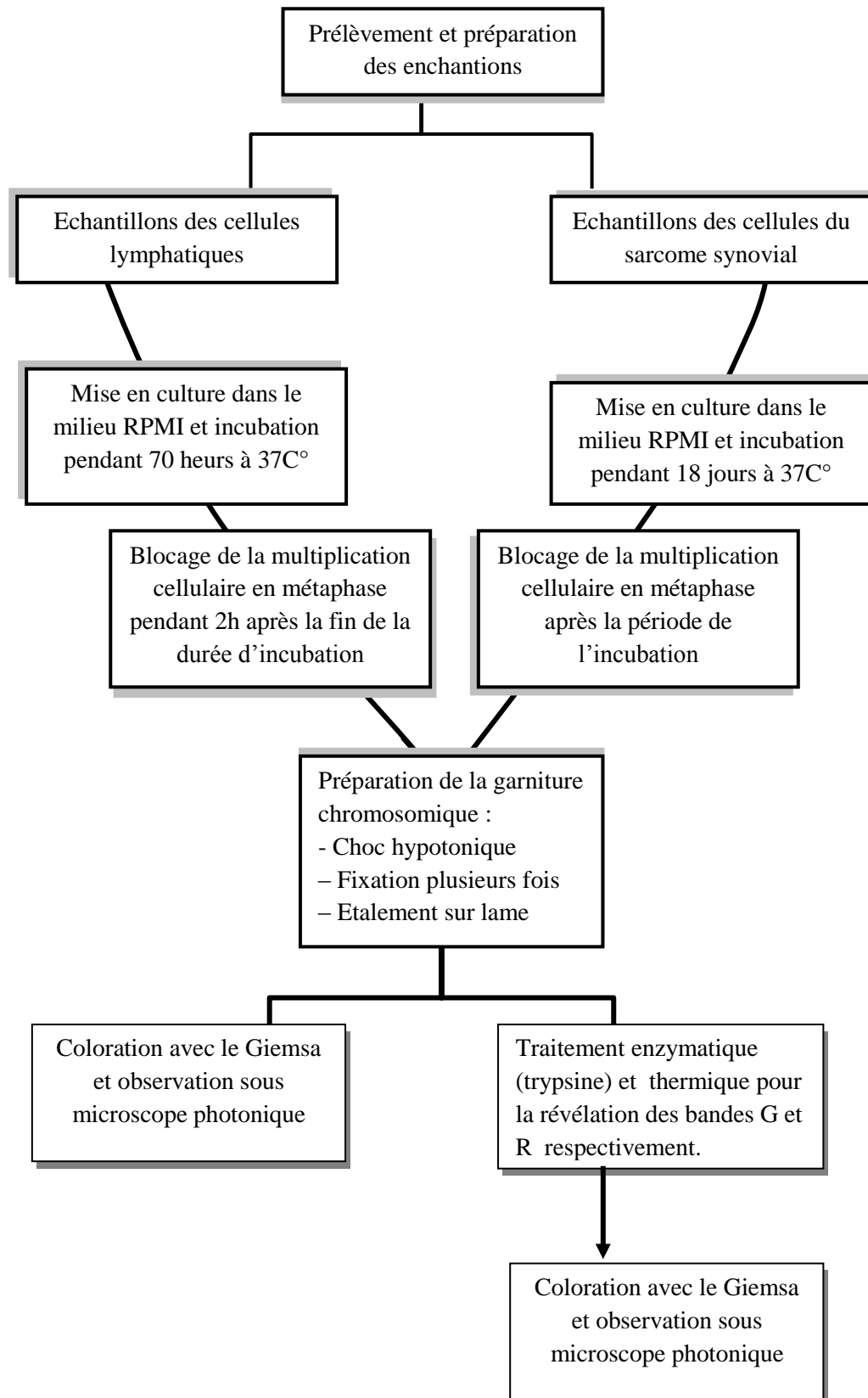


Figure 14 : schéma récapitulatif des étapes entreprises pour la mis au point des caryotypes.

II.2. Résultats et Discussions

II.2. Résultats et discussions

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de bio-pathologie et génétique de l'institut Pasteur d'Alger, du 29 avril au 30 juin de l'année 2012.

L'objectif de cette étude porte sur la mise au point du caryotype par la méthode de cytogénétique classique, afin de diagnostiquer quelques pathologies génétiques liées aux anomalies de nombre, et de structure chromosomique. La méthode standard reste peu affirmative par rapport aux méthodes de production des bandes, néanmoins, ces dernières n'ont pas donné des résultats concluants.

La mise au point de la culture des cellules est réalisée sur 11 prélèvements sanguin et un sarcome synovial. L'ensemble des résultats est représenté sur le tableau ci-dessous:

Tableau IV: résultat des caryotypes obtenus.

Patient	Age (année)	Sexe	Pathologie suspecte	Résultat du caryotype	Observation
N° : 01	03	Masculin	Trisomie 21	47, XY+21	30 mitoses dénombrées ayant toutes 47 chromosomes
N° : 02	08	Féminin	Syndrome de Turner	46, XX/ 45, XO	100 mitoses dénombrées 74% ayant 46 chromosomes 26% ayant 45 chromosomes
N° : 03	04	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY/ 45, XY-22	80 mitoses dénombrées 78% ayant 46 chromosomes 22% ayant 45 chromosomes
N° : 04	07	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY normal	40 mitoses dénombrées ayant toutes 46 chromosomes
N° : 05	06	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY normal	30 mitoses dénombrées ayant toutes 46 chromosomes
N° : 06	13	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY normal	40 mitoses dénombrées ayant toutes 46 chromosomes
N° : 07	15	Masculin	LAL T : Leucémie aigue lymphoblastique T	46, XY normal	35 mitoses dénombrées ayant toutes 46 chromosomes
N° : 08	34	Masculin	Klinefelter	46, XY/ 47, XXY	100 mitoses dénombrées 61% ayant 46 chromosomes 39% ayant 47 chromosomes
N° : 09	11	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY normal	30 mitoses dénombrées ayant toutes 46
N° : 10	07	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY normal	25 mitoses dénombrées ayant toutes 46
N° : 11	17	Masculin	LMNH : lymphome de Burkitt	46, XY normal	30 mitoses dénombrées ayant toutes 46
N° : 12	27	Masculin	Sarcome synoviale	Bonne culture cellulaire	Absence des chromosomes en métaphase

Les résultats rapportés dans le tableau ci-dessus montrent que le patient N° 01 est atteint de la trisomie 21. Toutefois le patient N° 02 et 08 sont porteurs des anomalies de nombres en mosaïque portée sur les chromosomes sexuels, il s'agit du syndrome de Turner (46, XX/ 45, XO) et Klinefelter (46, XY/47, XXY) respectivement.

Pour le reste, à l'exception du patient N° 12 où on a noté l'absence totale de division cellulaire, les patients semblent être atteints des Hémopathies malines résultantes des dérèglements structuraux des chromosomes.

II.2.1. Analyse des anomalies d'aneuploïdies

II.2.1.1. Interprétation du caryotype portant la trisomie 21

La garniture chromosomique de ce patient (N°01) a montré une aneuploïdes par la présence de 47 chromosomes avec un chromosome surnuméraire acrocentrique (chromosome 21), 47, XY+21 (figure 15). Cette analyse indique que la pathologie s'agit de la trisomie 21 constitutionnelle par le fait que le chromosome 21 surnuméraire est présent au niveau de toutes les mitoses observées.

Sans rentrer dans les détails moléculaires et cytogénétiques, une trisomie 21 est le plus souvent la conséquence d'une non-disjonction méiotique essentiellement d'origine maternelle (95 % des cas). On estime qu'environ 10- 30 % des ovocytes fertilisés sont porteurs d'une aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes). 30% des fausses couches seraient aneuploïdes.

Elle peut aussi être en mosaïque dans 2-3 % des cas ou la conséquence d'une translocation équilibrée (tout ou partie du chromosome 21 intégrée dans un autre chromosome chez un des deux parents) (Bouizegarène *et al* 2008).

Le risque de trisomie 21 augmente avec l'âge de la femme, la fréquence observée en fonction de l'âge est la suivante :

- inférieure à 0.1 % au-dessous de 30 ans ;
- entre 0.1 et 1 % entre 30 et 40 ans (0.5 % à 38 ans) ;
- supérieure à 1 % au-dessus de 40 ans (5 % à 46 ans, 15 % à 50 ans) (Bouizegarène *et al.*, 2008).

Le lien âge trisomie 21 s'expliquerait pour certains par l'augmentation de la non-disjonction méiotique d'origine maternelle avec l'âge. Bien qu'encore mal connue, il a été démontré que cette non-disjonction maternelle est associée à des erreurs de recombinaison et probablement à une perte de cohésion chromosomique aboutissant à une anomalie de ségrégation chromosomique au cours de la méiose, ce phénomène dépendant de l'âge. À la fin des années 1970, ces arguments épidémiologiques ont amené à proposer systématiquement une étude du caryotype fœtal chez toute femme de plus de 38 ans en France.

Cette anomalie serait due à une fécondation entre un gamète possédant un chromosome 21 et un gamète possédant deux chromosomes. Dans le cas d'une présence de deux chromosomes 21, on peut expliquer cet accident génétique par une mauvaise réparation des chromosomes homologues (non disjonction) lors de la première division méiotique, ou des chromatides sœurs lors de la deuxième division méiotique (figure 04, Annexe).

Les données cytogénétiques ont ouvert la voie à de nombreuses études visant à identifier les acteurs moléculaires de la ségrégation chromosomique et de sa régulation, en particulier au cours de la méiose. Parmi ces facteurs, des protéines récemment identifiées, et regroupées sous le terme de cohésines, sont responsables de la cohésion entre les chromatides-sœurs. Pendant la transition métaphase/anaphase, ces protéines clivent, entraînant la ségrégation chromosomique.

L'action des cohésines s'exerce au niveau des centromères, mais aussi sur de nombreux sites le long des bras chromosomique. En fonction de leur implication dans la première ou seconde division méiotique, elles subissent des séquences de dégradation différentes, extrêmement précises et orchestrées. Les principales protéines de cohésions se nomment SMC1, SMC3, RAD21 et REC8, mais d'autres protéines peuvent intervenir de manière très ciblée. Ainsi, au cours de la première division méiotique (MI) une protéine nucléaire nommée Sughoshin (Sog1) intervient pour maintenir la cohésion centromérique entre les chromatides-sœurs et ainsi empêcher leur séparation en MI. Puis, cette protéine est dégradée pour permettre la ségrégation des chromatides-sœurs en anaphase de la seconde division méiotique (MII). Une dégradation prématurée ou un défaut partiel de ces protéines pourrait entraîner une séparation prématurée des chromatides-sœurs (SPCS) (Vialard et Pellestor, 2008)

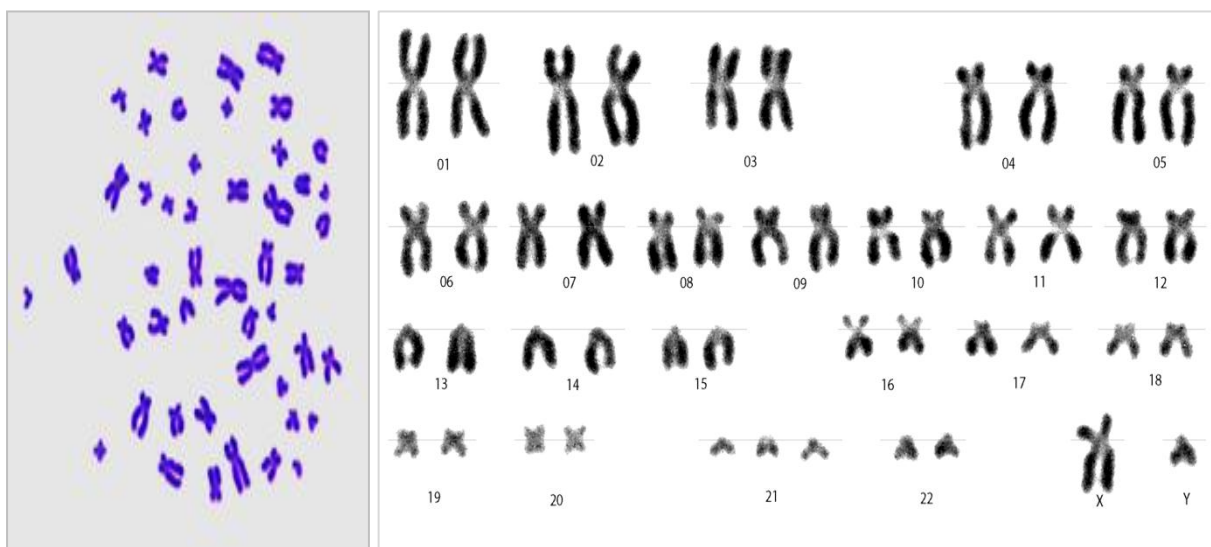


Figure 15 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 01 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 47, XY+21.

II.2.1.2. Interprétation du caryotype portant le syndrome de Turner mosaïque

Le résultat d'analyse cytogénétique du patient N° 02 révèle un caryotype avec le syndrome de Turner en mosaïque. Ce syndrome est lié à une monosomie du chromosome X (45,X) dans 55% des cas, soit à une anomalie du chromosome X (isochromosome, chromosome dicentrique, délétion du bras court ou du bras long, chromosome en anneau) dans 25% des cas, soit à une mosaïque dans les 20% des cas restants, comme le cas de patient 02, qui a montré des cellules anormales co-existent avec des cellules normales (46,XX /45,XO) (figures 16, 17).

les manifestation du syndrome de Turner en général presque toujours stériles, de petite taille, un visage triangulaire, les oreilles basses, cheveux implantés bas, le cou court, le thorax large, des problèmes cardiaques, rénaux et auditifs sont très courants. Les pieds et les mains sont fréquemment gonflés à la naissance. Un traitement est possible par hormones de croissance puis par hormones sexuelles (Trugeon *et al*, 2010).

L'origine de Turner mosaïque est la mauvaise séparation des chromosomes lors de la mitose.

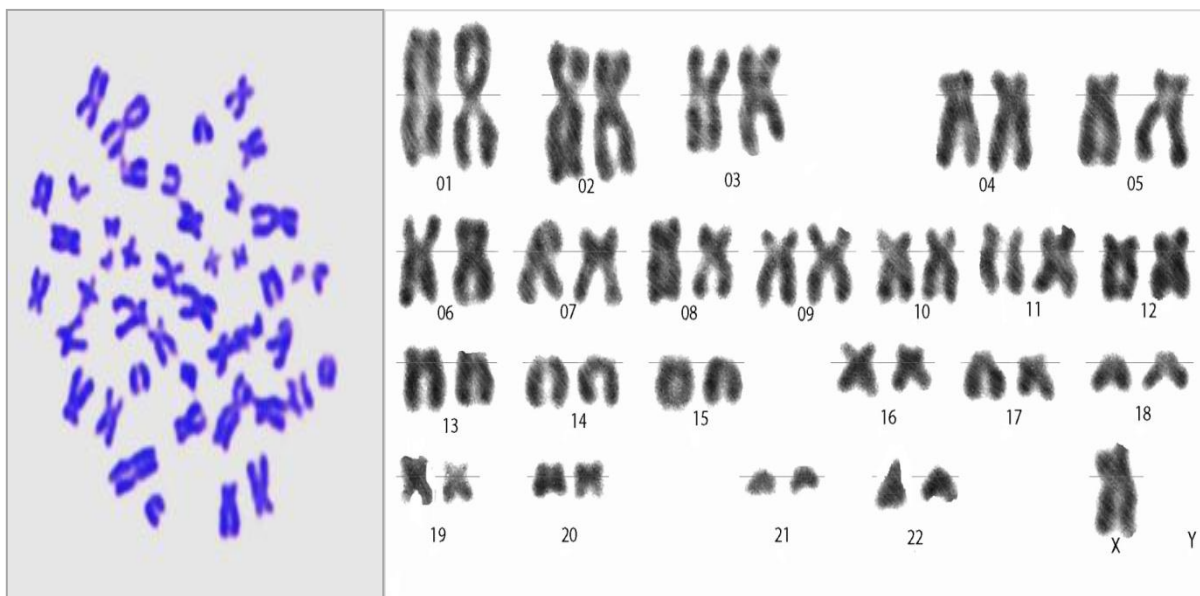


Figure 16 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 02 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique : 45, XO.
(Mosaïque: 46, XX /45, XO).

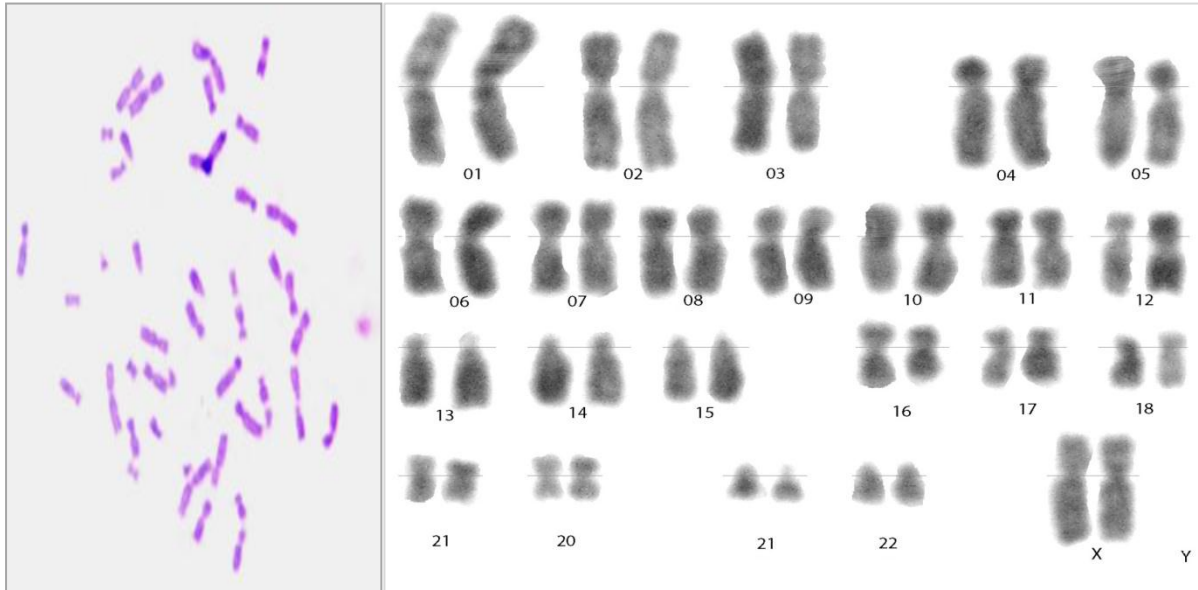


Figure 17 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 02 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XX.
(Mosaïque: 46, XX/45, XO).

II.2.1.3. Interprétation du caryotype portant le syndrome de Klinefelter

La figures 18, 19 montrent le caryotype du patient 08 et mettent en évidence une formule à 47, XXY parfois en mosaïque (46, XY/47, XXY).

Ce syndrome est caractérisé par une altération majeure de la spermatogenèse allant le plus souvent jusqu'à l'azoospermie les individus sont de taille importante, le volume des glandes mammaires augmente et les testicules restent petite (Vialard et Pellestor., 2008).

L'administration d'un traitement hormonal de remplacement (testostérone) dès le début de la puberté permet d'éviter l'apparition de la plupart des manifestations physiques et psychoaffectives du syndrome de Klinefelter. Ce traitement administré régulièrement contribue au développement des caractéristiques masculines secondaires (pilosité, voix grave, développement de la musculature) évite le développement des glandes mammaires (Morichon-Delvallez et Bouvattier., 2006).

L'origine de Klinefelter mosaïque est due à une mauvaise séparation des chromosomes lors de la mitose, lors de la division des cellules de l'œuf déjà fécondé (processus de mitose). Par contre le syndrome de Klinefelter ayant un aspect homogène et constitutionnel est du à une mauvaise ségrégation de chromosome X lors de la formation des spermatozoïdes et les ovocytes.

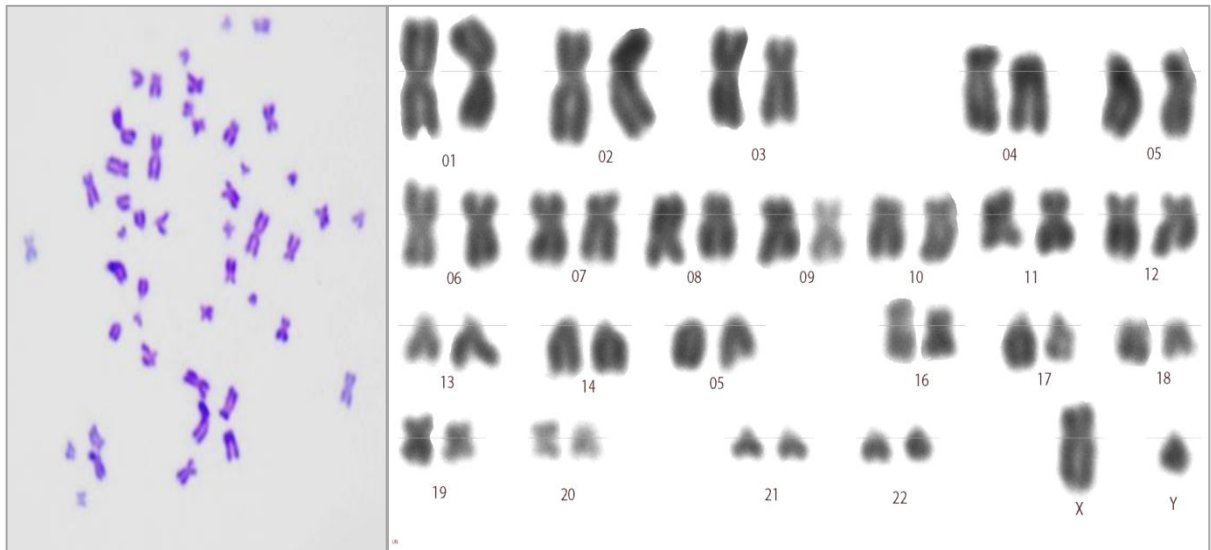


Figure 18 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 08 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.
(mosaïque: 46,XY/47,XXY).

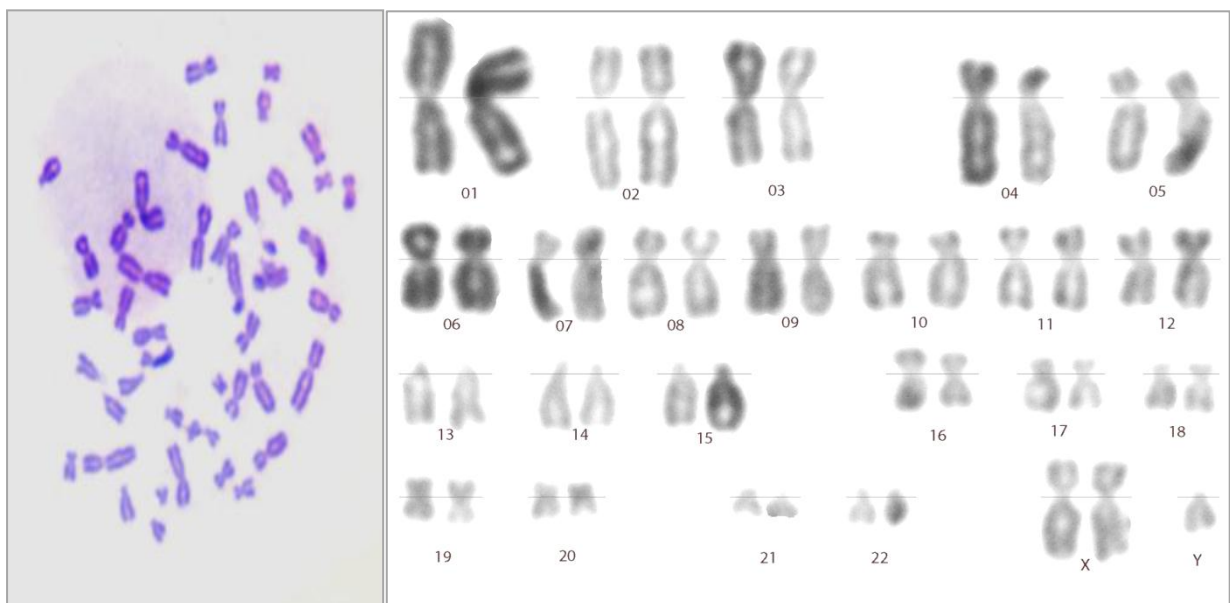


Figure 19 : Photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 08 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 47, XXY.
(mosaïque: 46, XY/47, XXY).

II.2.2. Analyse des anomalies de structure (anomalies acquises)

II.2.2.1. Interprétation des cas de lymphomes de Burkitt

Sur la base des pronostics cliniques, les patients **4, 5, 6, 9, 10 et 11** seraient probablement atteints de lymphome de Burkitt. L'application de la cytogénétique conventionnelle sur ces patients a montré des caryotypes normaux, sans pour autant que l'on dégage aucune signification par rapport à l'origine génétique de cette pathologie (figures : 21, 22, 23, 24, 25 et 26).

Le lymphome de type Burkitt est toujours associé à la présence d'une translocation chromosomique $t(8;14)(q24;q32)$ parfois $t(8;22)(q24;q11)$ et $t(2;8)(p13;q24)$ (figure 20) (Lafage-Pochitaloff et Charrin., 2003). Ces translocations auraient pu être révélées si la technique de marquage des bandes chromosomiques était réussie.

Le banding permet d'établir un caryotype avec une classification des chromosomes nettement plus précise en révélant éventuellement toutes les anomalies de structure telles que les translocations, les délétions, les inversions et les duplications de segments chromosomique.

Dans les lymphomes, les cellules tumorales sont fréquemment retrouvées dans un ou plusieurs ganglions lymphatiques, entraînant une augmentation du volume de ceux-ci : on parle de "lymphome ganglionnaire". Dans le même temps, d'autres organes ou tissus peuvent également être touchés, en particulier la moelle osseuse, la rate, le foie, l'appareil digestif ou les amygdales (Maisonneuve., 2011).

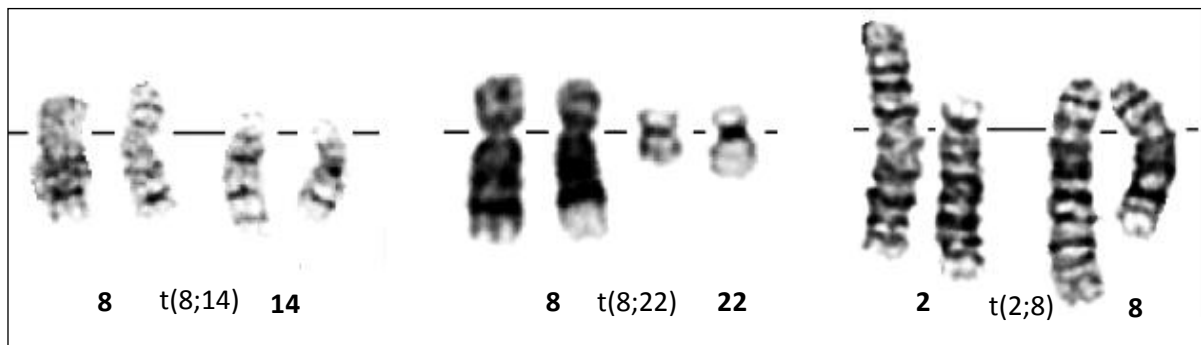


Figure 20 : Translocations du lymphome de Burkitt
(<http://atlasgeneticsoncology.org>)

Pour le diagnostic des lymphomes le prélèvement doit être situé au niveau de la zone présumée de la tumeur, le plus souvent un ganglion ou la moelle osseuse, en cas d'envahissement médullaire important, peut également être informatifs.

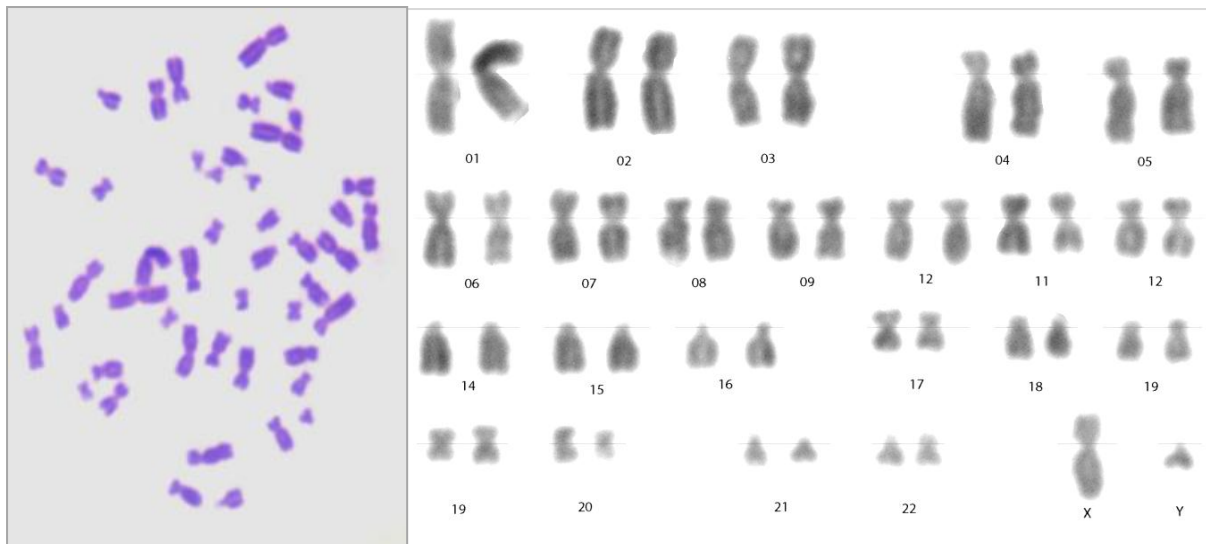


Figure 21 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 04 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

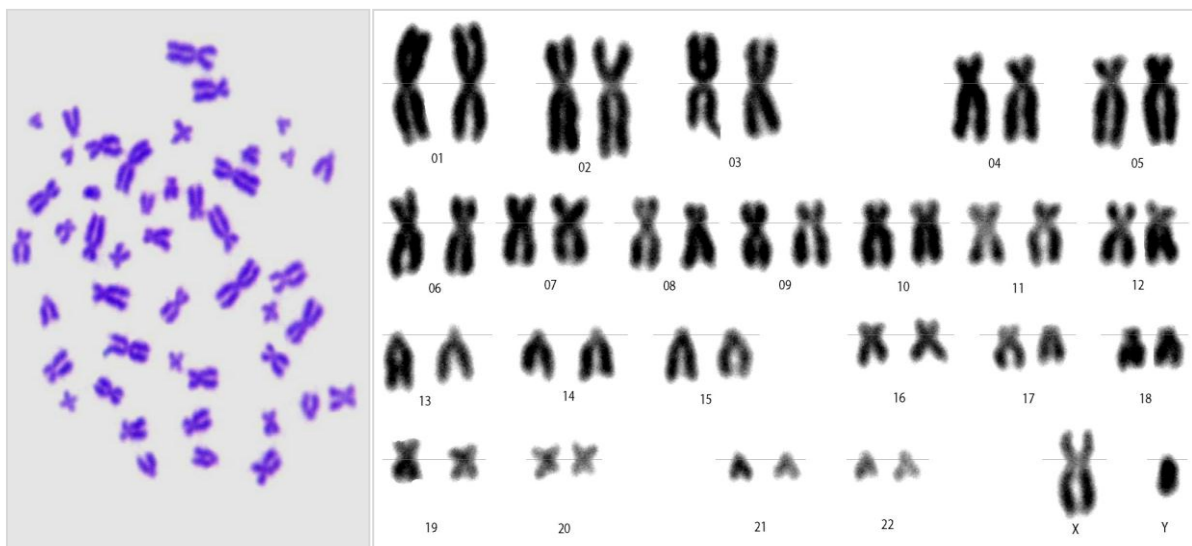


Figure 22 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 05 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

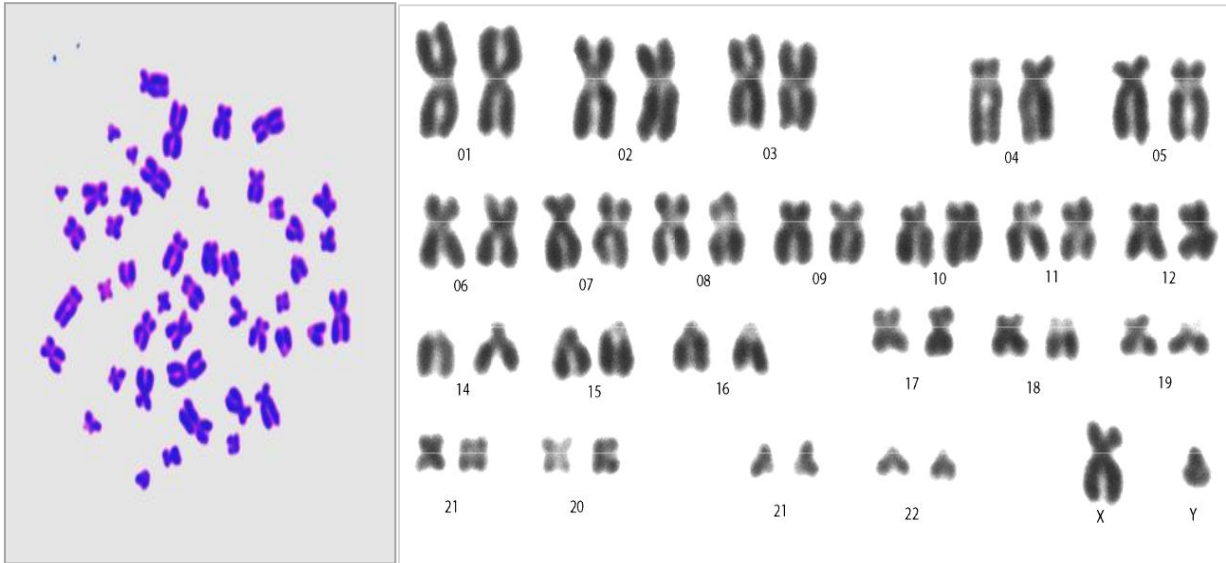


Figure 23 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 06 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

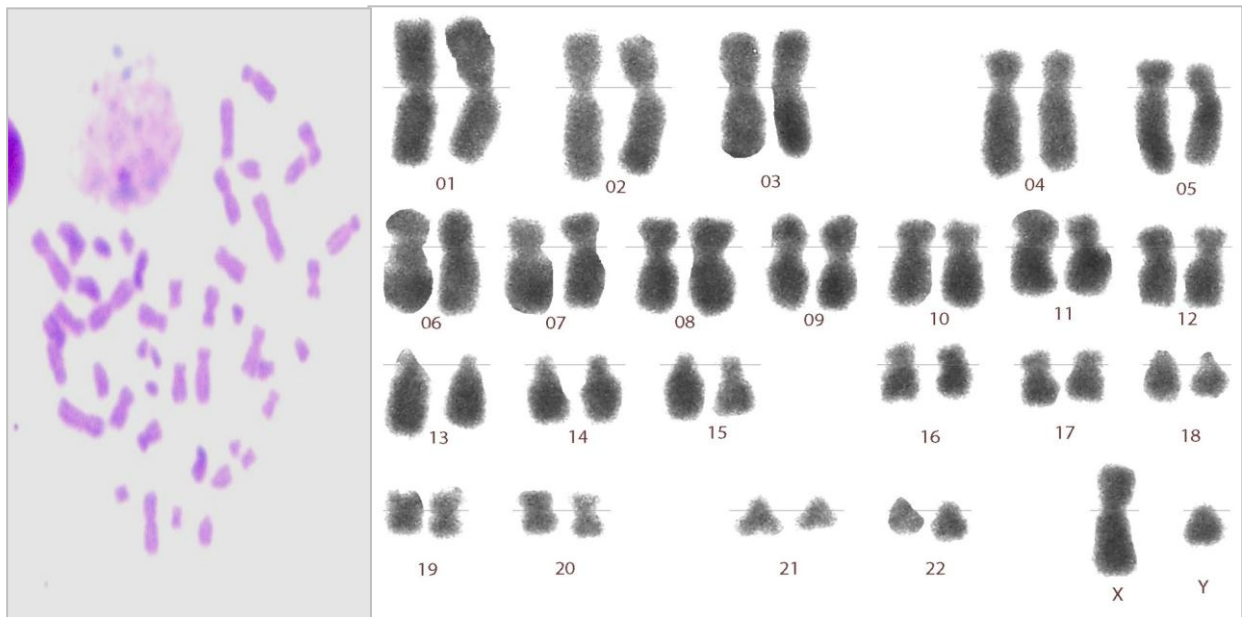


Figure 24 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 09 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

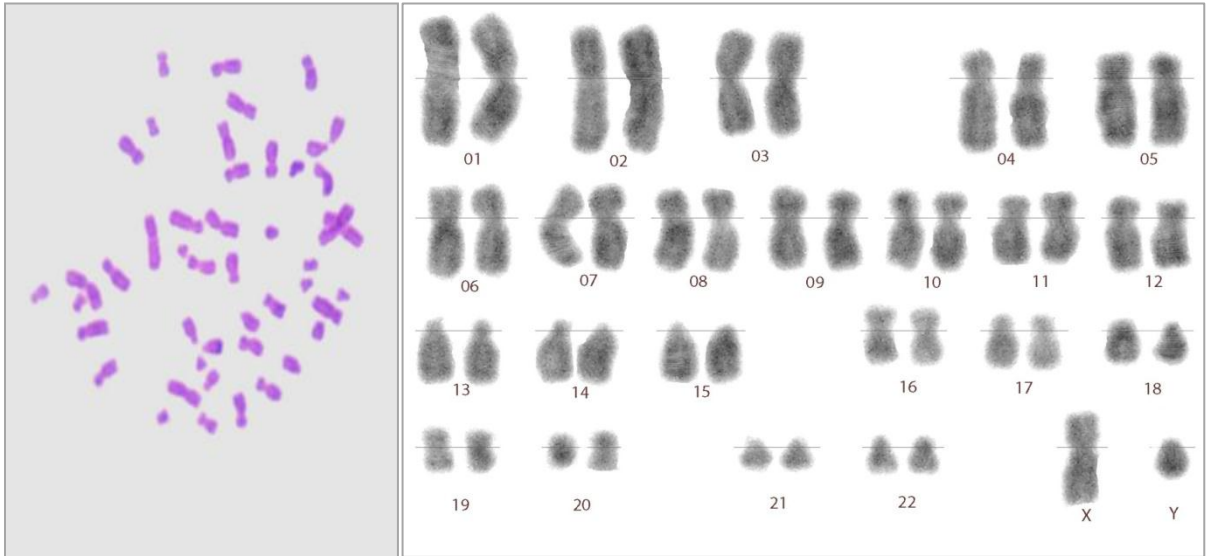


Figure 25 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 10 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

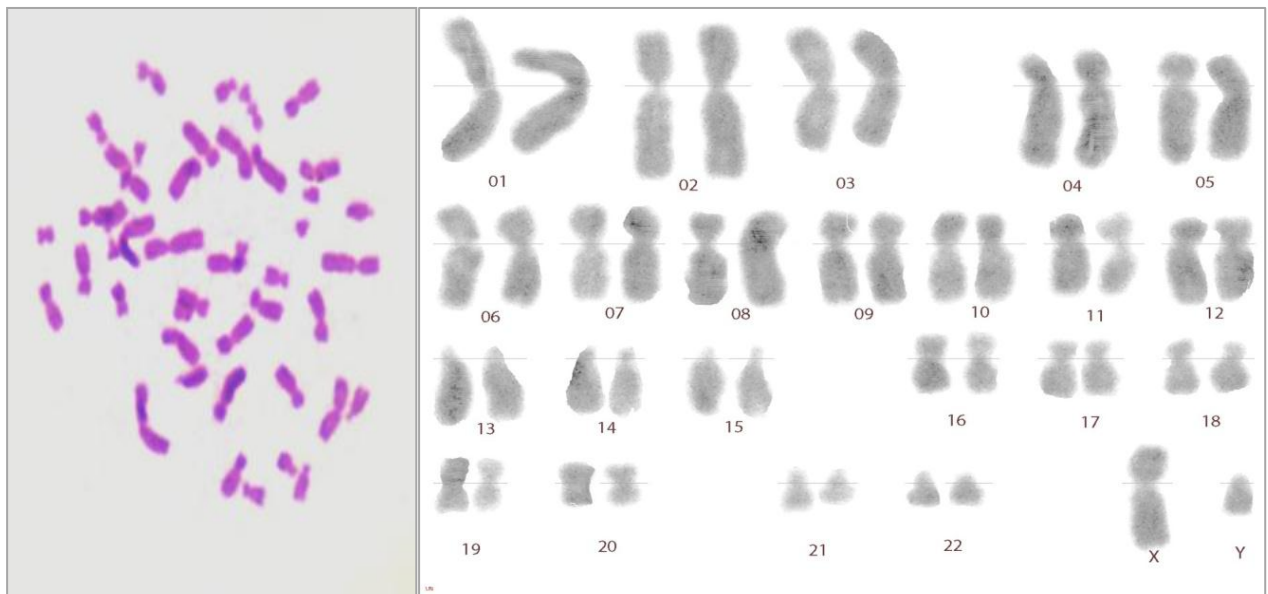


Figure 26 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 11 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

Dans cette échantillon, le patient 03 montre des cellules mosaïque, le caryotype a révélé la présence d'aneuploïdie avec perte de l'un des chromosomes 22 et des cellules normale (80 mitoses dénombrées représentent 78% ayant (46, XY) chromosomes et 22% ayant (45, XY-22) (figure 27 et 28).

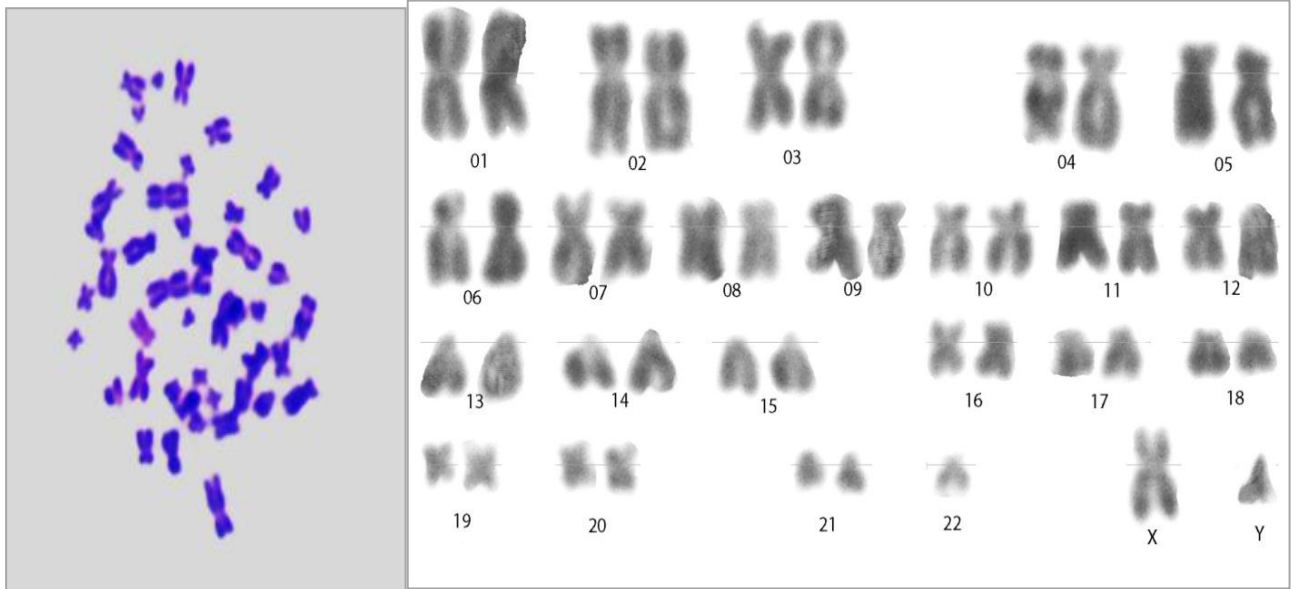


Figure 27 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 03 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

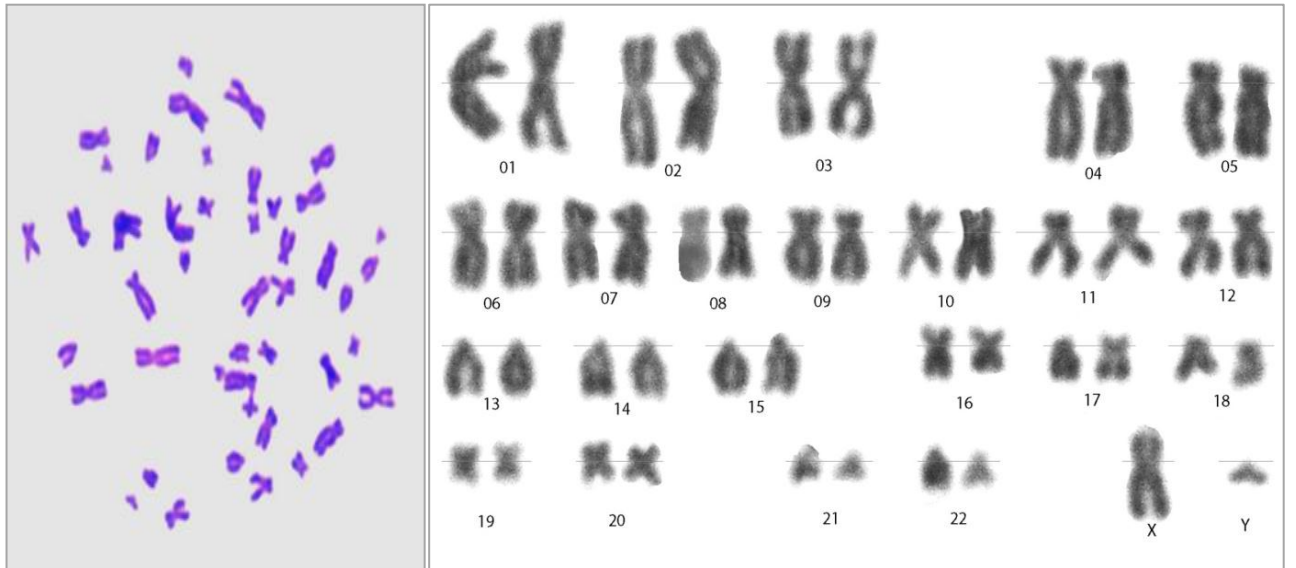


Figure 28 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 03 observés sous microscope photonique au grossissement ($\times 100$) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

Les cellules cancéreuses présentent un taux de mutation élevé, des anomalies chromosomiques peuvent être de nombre aneuploïdies qui impliquent les gènes ou perte d'un chromosome présentent une instabilité génétique. Ceci conduit à l'accumulation de mutation dans des gènes spécifiques qui contrôlent certains aspects de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'adhérence cellulaire (Klug & al., 2006).

II.2.2.2. Interprétation du cas de leucémie aigue lymphoblastique T (LAL T)

Les signes cliniques rencontrés chez le patient N° 07 présentent des manifestations pathologiques de LAL T mais le caryotype (figure 29) ne présente aucun déséquilibre génétique ou anomalie chromosomique. Les lymphomes T constituent un groupe hétérogène dans lequel même l'analyse morphologique reste difficile et subjective. Pour mettre en évidence ces déséquilibres il est recommandé d'appliquer le marquage des bandes chromosomique sinon les techniques de cytogénétique moléculaire telle que la technique FISH.

À l'échelle moléculaire, les gènes des immunoglobulines (Ig) et du récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR) possèdent des éléments de régulation transcriptionnelle puissants et spécifiques de la différenciation lymphoïde, et leur mécanisme de remaniement somatique est directement impliqué dans la genèse de certaines translocations qui sont à l'origine de la leucémie. Néanmoins d'autres gènes peuvent remplir un rôle similaire. Les exemples les plus fréquents sont *CTIP2/BCL11B*, un gène fortement exprimé au cours de la différenciation lymphoïde T, qui est remanié avec la région chromosomique du chromosome 5 comprenant *HOX11L2*, à la suite de la translocation t(5;14)(q35;q32) observée dans environ 20 % des leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) de l'enfant (Nguyen Khac et Bernard, 2003).

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des proliférations clonales développées à partir d'une cellule lymphoïde bloquée à un stade précoce de sa maturation. Il s'agit du cancer le plus fréquent chez l'enfant, représentant environ 30 % de l'ensemble des tumeurs pédiatriques. Environ 400 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. La majorité des enfants (75-80 % environ) peut être aujourd'hui guérie grâce aux polychimiothérapies intensives utilisées dans des réseaux pédiatriques associant centres hautement spécialistes et centres de proximité (Baruchel, 2003).

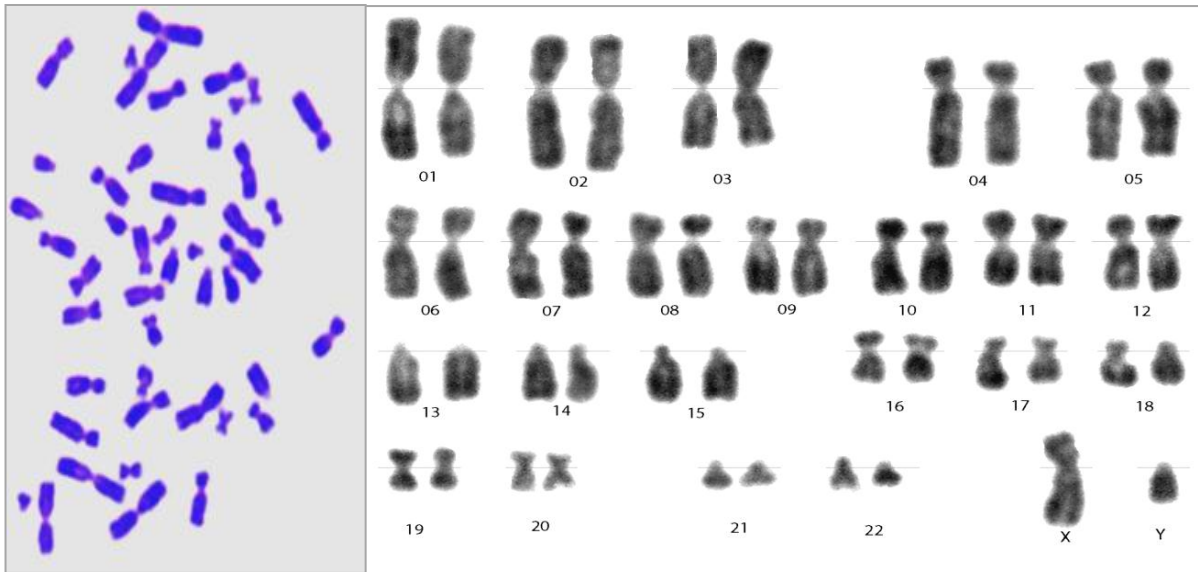


Figure 29 : photo présentant des chromosomes métaphasique de lymphocyte du patient N° 07 observés sous microscope photonique au grossissement (×100) et son caryotype de formule chromosomique: 46, XY.

II.2.2.3. Interprétation du cas de sarcome synoviale

La mise en culture des cellules à partir de l'explant d'un sarcome synovial était réussie : un tapis cellulaire était formé autour de l'explant suivi d'une prolifération des cellules en extension.

Après la trypsination des cellules pour l'établissement d'un caryotype. Nous n'avons pas obtenu des résultats interprétables pour l'établissement d'un caryotype à cause des raisons, soit de manipulation soit de l'état des cellules au moment de la récolte, les mitoses n'ont pu être obtenues et par conséquent le caryotype n'a pu être établi.

Cette étape nécessite donc une optimisation des conditions de réaction qui seront adaptées au type cellulaire. Par ailleurs ceci constitue une perspective de travail qui s'ouvre suite à cette application. Les synoviosarcomes sont caractérisés par la présence d'une translocation entre le bras court d'un chromosome X et le bras long d'un chromosome 18, $t(X ; 18) (p11 ; q11)$ (figure 30) (Pedeutour, 2009).

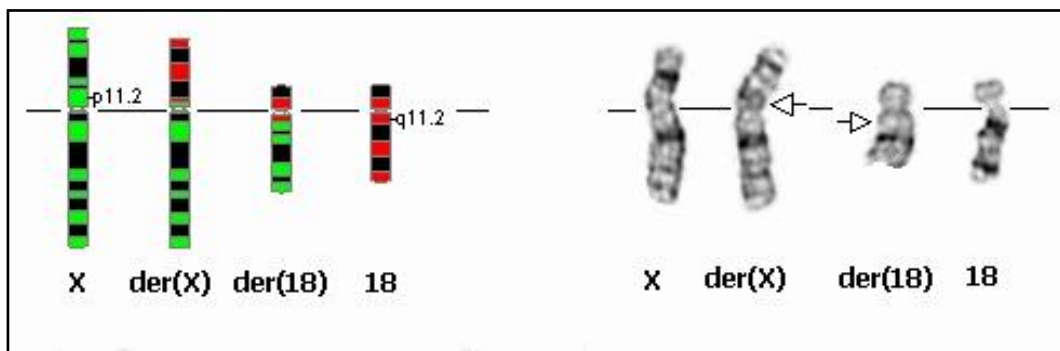


Figure 30 : présentation de la translocation réciproque $t(X;18) (p11 ;q11)$ associé au sarcome synovial (<http://www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cases/sept1996/karyo.dot>).

Conclusion

L'examen des chromosomes, c'est-à-dire l'analyse microscopique du nombre et de la structure des chromosomes, est considérée comme la technique de choix dans le laboratoire de génétique médicale. La diffusion de la méthode, dans les années soixante du siècle dernier, et la description des syndromes chromosomiques ont largement contribué à la reconnaissance dans les faits de la médecine génétique en tant que spécialité

A peine une ou deux décennies plus tard, l'apparition des techniques issues de génétique moléculaire a toutefois fait prédire la fin proche d'une méthode destinée à être rapidement remplacée par la nouvelle approche justement moléculaire. La cytogénétique a ainsi soudain semblé désuète et peu intéressante. De façon surprenante, un bilan effectué en 2005 a cependant brossé un tableau quelque peu différent de la situation. Les examens classiques des chromosomes sont et restent l'une des méthodes d'analyse les plus utilisées en médecine génétique à travers le monde. Ils font toujours office de gold standard dans le diagnostic prénatal pour l'exclusion des aneuploïdies et constituent la base de pratiquement tout bilan cytogénétique de routine moderne.

Au cours de ce travail, nous avons constaté la grande importance de cette technique dans le diagnostic des patients atteints des différentes anomalies chromosomiques de nombre, l'application de cette la méthode dite classique, nous a permis de mettre en évidence, sur les douze patients analysés, des anomalies de nombres, en l'occurrence la trisomie 21, le syndrome de Klinefelter et de Turner.

Une maîtrise de la technique de banding est nécessaire pour pouvoir déceler les anomalies chromosomiques structurales

En plus de cela, nous préconisons d'autres techniques de diagnostic complémentaire en faisant appel à des techniques moléculaires plus approfondies à savoir la technique de FISH permettant ainsi un diagnostic précis et complet qui aide à proposer des traitements adéquats.

*Références
bibliographique*

Bibliographique

- Bado, A.B.,** 1984. Considérations Générales sur la Cytogénétique Médicale Humaine et Vétérinaire. Thèse, *Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR*. p 39, 66-77, 100.
- Bastard, C.,** 2001. Nouvelles techniques d'études cytogénétiques en hématologie. *Elsevier SAS*. 360-361.
- Bastard, C.,** 2003. Cytogénétique des lymphomes malins et du myélome multiple. *scientifiques et médicales Elsevier SAS, Pathologie Biologie*. 51: 375-381.
- Baruchel, A.,** 2003. Impact de la biologie dans la caractérisation, la compréhension et le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. *éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*. 10: 102-113.
- Berger, R.,** 2007. Cytogénétique humaine de 1956 à 2006. *Elsevier Masson SAS. Pathologie Biologie*. 55: 1-12.
- Beri-Dexheimer, M.,** 2005. Hybridation génomique comparative en microréseau : évolutions techniques et place dans la stratégie diagnostique Expérience dans le cadre du retard mental. Thèse. *Université Henri Poincaré - Nancy I*. p 7-12.
- Beri-Dexheimer, M.,** 2009. Recherche de gènes candidats responsables d'anomalies du développement grâce à la caractérisation moléculaire de microremaniements chromosomique. Thèse, *Université Henri Poincaré, Nancy I*. p 5-8.
- Bonneau, D.,** 2011. Consultation de génétique. *La revue du praticien*. 61: 521-541.
- Bouayed Abdelmoula, N.,** 2004. Apport de la cytogénétique moléculaire au diagnostic des anomalies chromosomiques. *Ann Biol Clin*. 63: 263-78.
- Bouayed Abdelmoula, N., Amouri, A.,** 2005. Les chromosomes Y dicentriques. *Ann Biol Clin*. 63: 263-278.
- Bouizegarèn, P., Ameziane, N. Bogardc., Deybach, J-C., Lamoril, J.,** 2008. Détection de la trisomie 21 par l'étude de l'AND. *Elsevier Masson SAS. Immuno-analyse et biologie spécialisée* . 23: 1-10.

- Bouizegarènea, P., Ameziane, N., Bogard, M., Deybach, J.C., Lamoril, J., 2008.** Détection de la trisomie 21 par l'étude de l'ADN. *Elsevier Masson SAS. Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 23: 1-10.
- Bourrouillou, G., Bujan, L., Calvas, P., Colombies, P., Mansat, A., Pontonnier, F., 1992.** Place et apports du caryotype en infertilité masculine. *Progrès en Urologie.* 185-191.
- Bousquet, M., 2008.** Identification et caractérisation de nouvelles translocations chromosomiques observées dans les hémopathies malignes. Thèse, *Université Toulouse III Paul Sabatier.* p 16.
- Cabrol, S., 2007.** Syndrome de Turner. *Encyclopédie orphanet.* 1-13.
- Callen, J.C., Perasso, R., 2005.** Biologie cellulaire des molécules aux organismes. Dunod, 2^{ème} édition, Paris. p 61, 389, 390.
- Chen, C.P., Chien, S.C., 2007.** Prenatal Sonographic Features of Trisomy 18. *Elsevier et CTSUM, Med Ultrasound.*15: 67-76.
- Dehaese, O., Levadoux, E., Berthomier, F., Sautou-Miranda, V., Chopineau, J., 2000.** Le caryotype. *Lyon Pharmaceutique.* 51: 47-68.
- DeLozier-Blanchet, C., Vekemans, M., 1997.** Mosaïque chromosomique et retard de croissance intra-utérin. *Elsevier, Paris, Arch Pddiatr.* 815-817.
- Donnai R., 2009.** génétique médicale de la biologie à la pratique clinique. De Boeck Université. p 29-48.
- Dupont, J-M., 1998.** Apports de l'hybridation in situ interphasique au diagnostic prénatal cytogénétique. *Immunoanal BiolSpéc.Elsevier Parie* 14 : 98-102.
- Echard G., 1973.** Bandes chromosomiques de type G chez le lapin domestique. *Ann. Génét. Sél. anim.* 425-434.
- Fethi L., 2008.** Trisomie 21: Dépistage sérique - Mise au point de la culture cellulaire. *Université de Mentouri Constantine, Département de Biologie animal.* p 41.
- Gadji M., 2005.** Caractérisation de deux anneaux dérivés du chromosome 22 découverts en période prénatale à l'aide de techniques de cytogénétique et de génétique moléculaire. *Faculté des études supérieures de l'Université Laval.* p 30.

- Gersen, S.T., Keagle, M.B.,** 2005. Clinical cytogenetics. *Humana Press*. p 7-153
- Ghanassia, E., procureur, V.,** 1999. Embryologie biologie du développement et de la reproduction. *ESTEM et Médistrophe*. p 104.
- Girszyn, N., Mabro, M., Kahn, J.E., Rouillet-Audy, J.C., Sautet, A., Bletry, O.,** 2006. Synoviosarcome rétropéritonéal révélé par un choc hémorragique. *Presse Med Masson, Paris*. 35: 1185-1187.
- Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin, Gelbart., (2002).** Introduction à l'analyse génétique. De Boeck Université, 3^{ème} édition.
- Hayes, H.,** 2000. Notions de base de génétique. *INRA Productions Animales, hors série Génétique moléculaire*.3-20.
- Hayes, H., Dutrillaux, B.,** 1998. technique de cytogénétique animales. INRA, Paris. p 38-69.
- Jeanpierre, M., Jonveaux, P., Lacombe, D., Leporrier, N., Lyonnet, S., Moraine, C.,** 2004. Génétique médicale formelle chromosomique moléculaire clinique. *Masson, Paris*. p 6.
- Jorde, L.B., Carey, J.C., Bamshad, M.J., White, R.L.,** 2004. Génétique médicale. *Elsevier SAS*. p 07.
- Keren, B., Schluth-Bolard, C., Egea, G., Sanlaville, D.,** 2010. Nouvelles méthodes d'analyse globale du génome humain. *Elsevier Masson SAS, Archives de pédiatrie*. 17: 1605-1608.
- Khosrowchahli, M., Gaem-magamie, S.A.,** 1994. Les effets de la phytohémagglutinine (PHA) dans la culture in vitro végétale. AUPELF-UREF. *John Libbey Eurotext. Paris*. 275-282.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C.,** 2006. Génétique. Pearson Education France 8^{ème} édition. p 194, 301-303, 464.
- Labussière, H., Hayette, S., Tigaud, I., Michallet, M., Nicolini, F.E.,** 2007. Le traitement de la leucémie myéloïde chronique en 2007. *Bull Cancer*. 94 (10) : 863-869.

- Lafage-Pochitaloff, M.,** 2003. Notions de base en cytogénétique conventionnelle et moléculaire: application au diagnostic des hémopathies malignes. *Éditions Scientifiques et médicales Elsevier SAS, Pathologie Biologie.* 51: 307-311.
- Lafage-Pochitaloff, M., Charrin, C.,** 2003. Anomalies cytogénétiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Pathologie Biologie* 51: 329-336.
- Lenroot, R-K.,** 2010. XYY Syndrome. *Society for the study of behavioural phenotypes, SSBP. Charity No:1013849.*
- Maisonneuve, H.,** 2011. Lymphomes non hodgkiniens. *France Lymphome Espoir .SAS DaTeBe éditions.*
- May-Panloup, P., Malinge, M.C., Larget-Piet, L., Chrétien, M.F.,** 2001. Infertilité masculine d'origine génétique et assistance médicale à la procréation. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Gynécol Obstét Fertil.* 29: 583-593.
- Morichon-Delvallez , N., Bouvattier, C.,** 2006. Le syndrome de Klinefelter. *Encyclopédie Orphanet.* 01-06.
- Mugneret, F., Callier, P., Favre-Audry, B.,** 2003. Anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Pathologie Biologie.* 51: 314-328.
- Mugneret, F., Charrin, C.,** 2002. Cytogénétique conventionnelle et moléculaire des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires, Elsevier, Paris.* 344: 31-40.
- Nguyen Khac, F., Bernard, O.A.,** 2003. Conséquences moléculaires et fonctionnelles des anomalies chromosomiques des hémopathies malignes humaines. *Pathologie Biologie.* 51: 382-389.
- Niel, E., Scherrmann, J.M.,** 2006. Actualité de la colchicine. *Elsevier Masson SAS Revue du Rhumatisme.* 73: 1338-1345.
- Ogilvie, C.M.,** 2003. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *scientifiques et médicales Elsevier SAS. Pathologie Biologie* 51 : 156-160.
- Pasternak, J.J.,** 2003. Génétique moléculaire humaine une introduction aux mécanismes des maladies héréditaires. De Boeck Université 1^{ère} édition. p 21-31.

- Pedeutour, F.,** 2009. Apport de la cytogénétique et de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) dans le diagnostic des tumeurs mésoenchymateuses. *Elsevier Masson SAS*. 29-42.
- Plomin., Defries., Clearn. M., Rutter.,** 1999. des gènes au comportement introduction à la génétique comportementale. De Boeck Université. p 158.
- Popescu, P.C.,** 1989. cytogénétique des mammifère d'élevage. INRA Paris.p 13-17.
- Rakotovao, M., Rakotosolofo, A., Ralahy, M.F., Rakotonirina, H., Rakoto-Ratsimba, -H.N.,** 2009. Sarcome synovial des membres chez l'adulte. A propos de deux cas à Madagascar. *Revue Tropicale de Chirurgie*. 42-45.
- Ravel, C., Siffroi, J.P.,** 2009. Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner. *Elsevier Masson SAS, Gynécologie Obstétrique et Fertilité*. 37: 511-518.
- Rives, N.,** 2006. Conséquences des anomalies chromosomiques sur la gamétogenèse. *mt médecine de la reproduction*. 8: 169-178.
- Sebaaa, A., Eclache-Saudreaux, V.,** 2010. Apport de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) pour la détection dans les syndromes myélodysplasiques. *Elsevier Masson SAS*. 433: 65-72.
- Siffroi, J.P., Chantot-Bastaraud, S., Ravel, C.,** 2003. Origines géniques et chromosomiques des anomalies de la spermatogenèse : aspects cliniques et rapports avec les modèles animaux. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*. 31 : 504-515.
- Sanlaville, D., Lapierre, J.M., Coquin, A., Turleau, C., Vermeesch, J., Colleaux, L., Borck, G., Vekemans, M., Aurias, A., Romana, S.P.,**2005. La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle. *Archives de pédiatrie, Elsevier SAS*.12:1515-1520.
- Stevens., Lowe.,** 1997. Anatomie pathologique générale et spéciale. De Boeck Université. p 51, 52, 90 et 91.
- Tamayo, J.,** 2002. Structure of human chromosomes studied by atomic force microscopy. *Elsevier Science (USA), Journal of Structural Biology*. 141: 198-207.

- Taylor, M., Guillon, M., Champion, V., Marcu, M., Arnoux, J.B., Hartmann, O.,** 2005. Mise au point La tumeur d'Ewing. *Elsevier SAS, Archives de pédiatrie*. 12: 1383-1391.
- Traore, M., Toure, A., Keita, M.M., Traore, M.S.,** 1997. Etude cytogénétique chez 13 enfants présentant une polymalformation a Bamako. *Médecine d'Afrique Noire*. 44: 514-516.
- Traore, M., Toure, A., Maiga, B., Mohamed-A, A.G.,** 1997. Trisomie 13 et 8 en mosaïque chez un enfant polymalformé. *Médecine d'Afrique Noire*. 44 : 8-9.
- Trugeon, B., Charvillat, A., Dubois-Murat, P., Plaza, M.,** 2010. Syndrome de Turner, capacités de compréhension verbale. *Glossa*.108: 101-120.
- Turleau, C.,** 2001. Le syndrome du cri-du-chat. *Encyclopédie orphanet*.1-3.
- Vandermeers, V., Kettmann, R., Willems, V.,** 2008. Implication des modifications épigénétiques dans les cancers : développement de nouvelles approches thérapeutiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 12 : 211-218.
- Vaubourdolle, M.,** 2007. Biochimie hématologie. Wolters Kluwer SA, 3^{ème} édition. p 10-30.
- Vialard, F., Pellestor, F.,** 2008. Intérêt de la cytogénétique des gamètes humains : résultats et perspectives. *Elsevier Masson SAS, Pathologie Biologie*. 56: 388-399.

Adresses électroniques

<http://www.orpha.net/orphaschool/learn1.htm>

<http://www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cases/sept1996/karyo.dot>

<http://atlasgeneticsoncology.org>

http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Insertion_chromosomique.

<http://forum.magicmaman.com>

Annexe

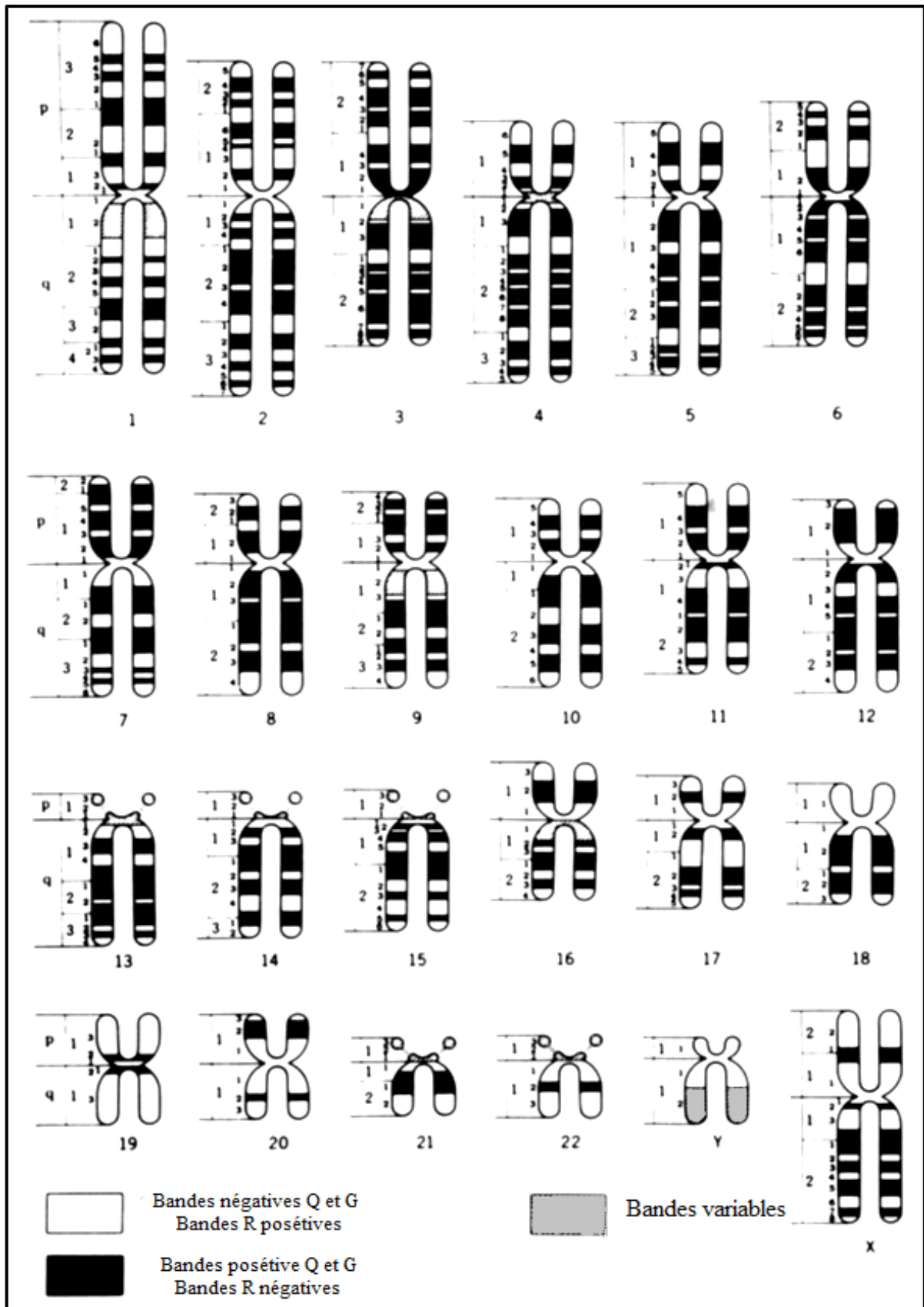
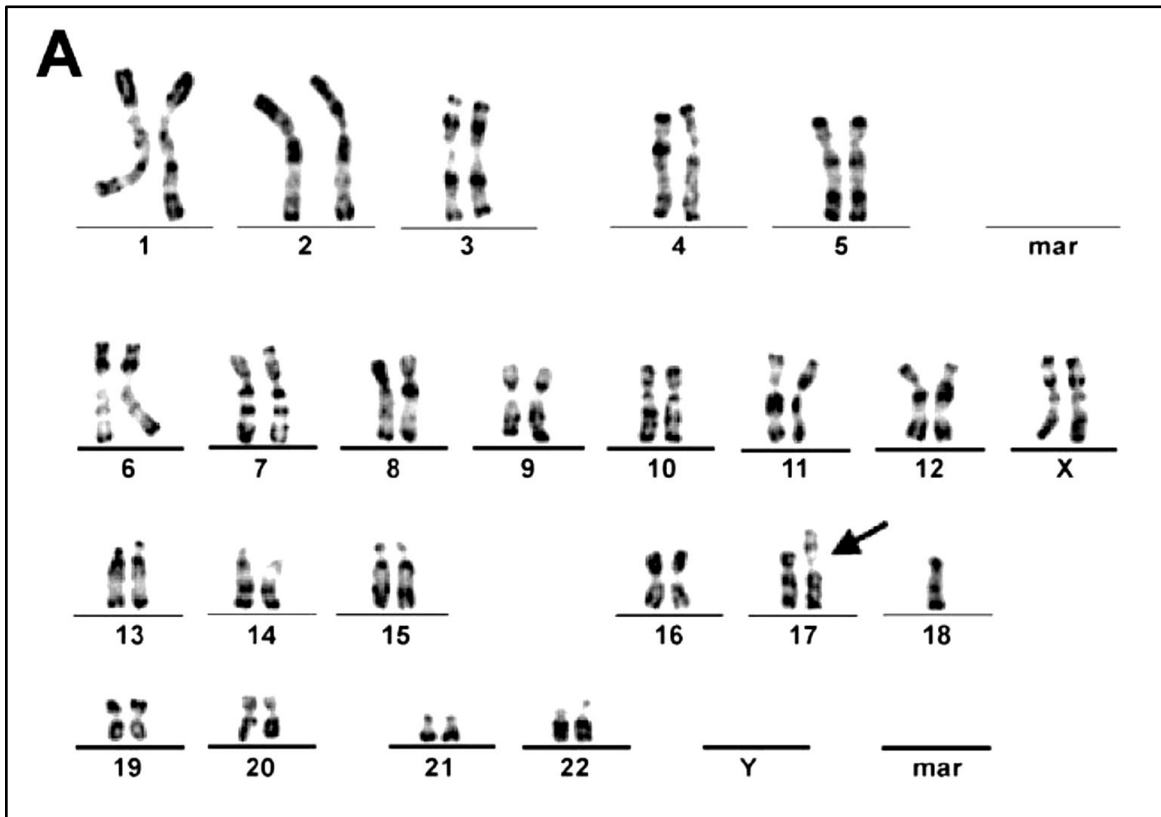
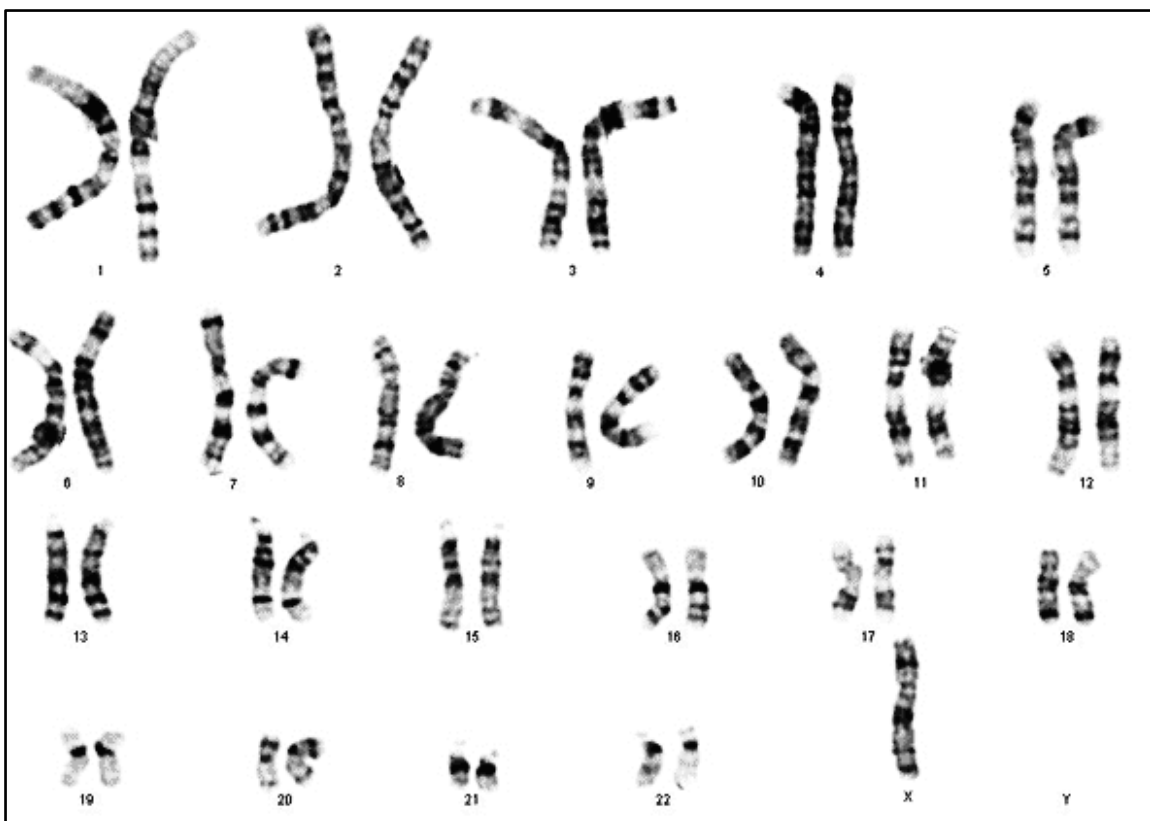


Figure A : caryotype illustrant les trois bandes fréquemment utilisé dans l'établissement d'un caryotype humain (Beri-Dexheimer., 2005).



Figures B : Caryotypes représentatifs translocation dérivée der(17;18) Bandes R. (Leroux, 2003).



Figures C : Caryotypes représentatifs syndrome de Turner (45,XO), Bandes G

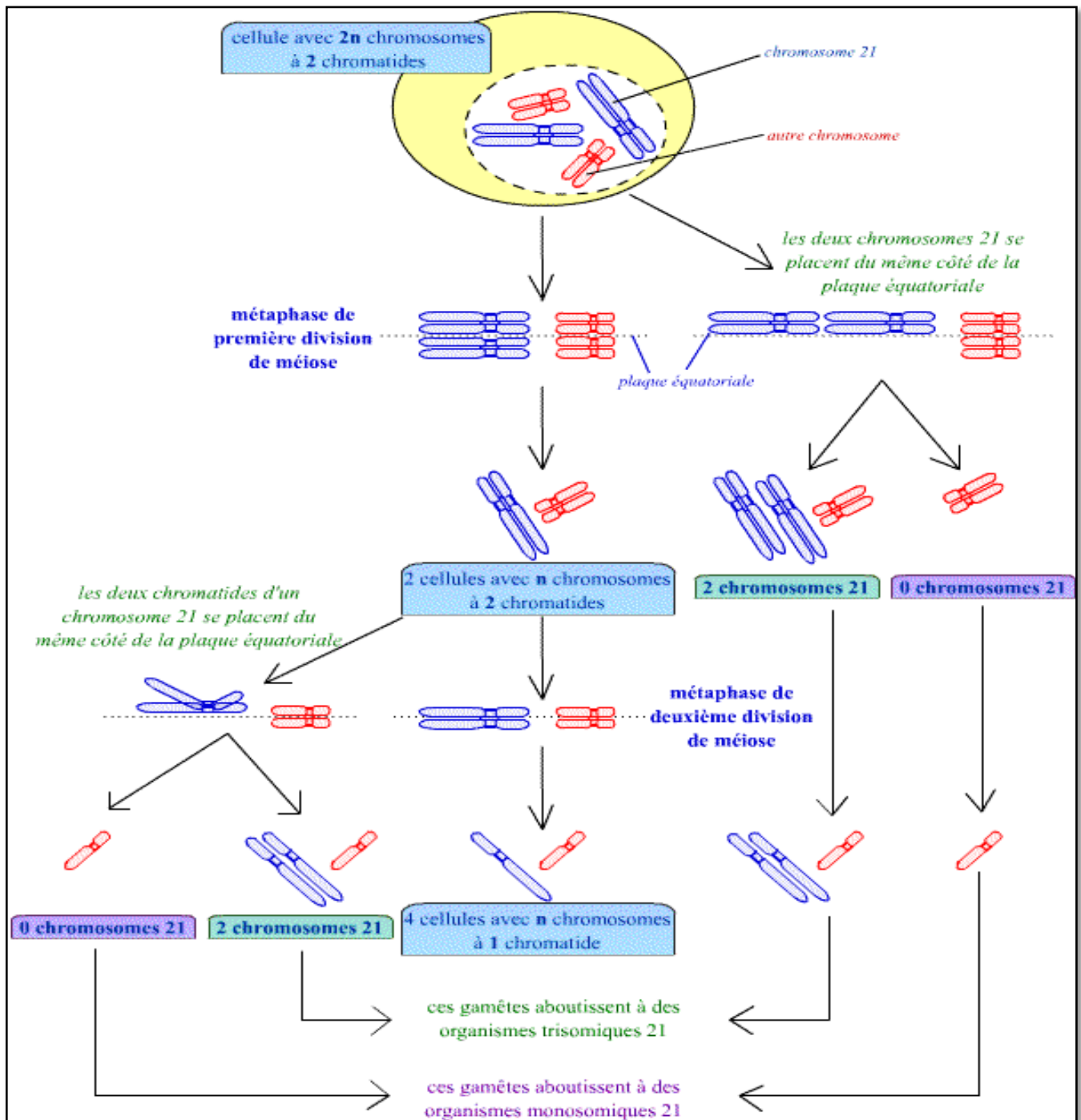


Figure D: Schéma représente les erreurs au cours de la méiose par une non disjonction des chromosomes aboutissant à une Trisomie 21.

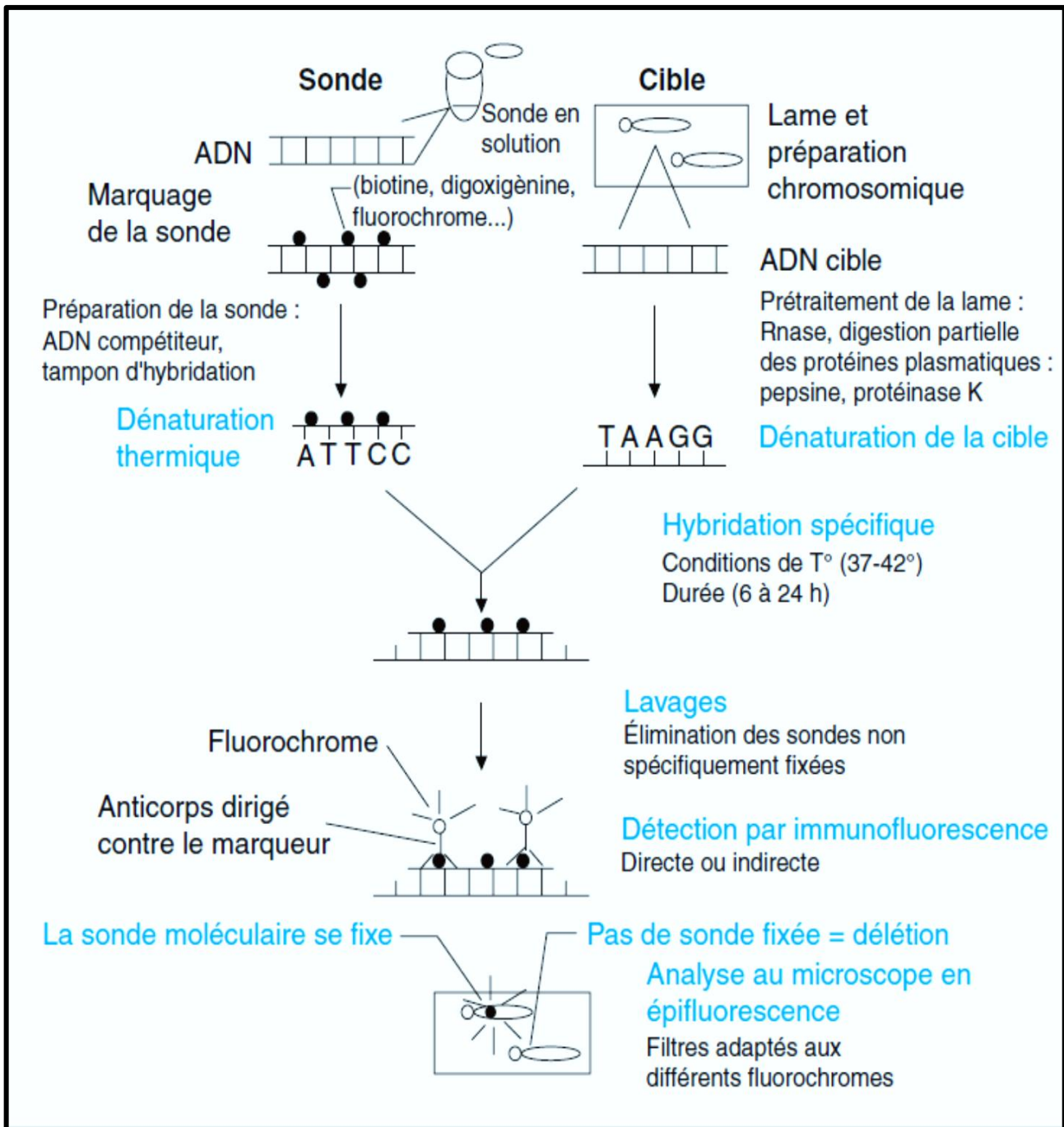


Figure E : Principe de la Fish. Les différentes étapes sur préparation chromosomique (Bouayed Abdelmoula, 2004).

ملخص

عرف علم الوراثة الخلوية تطورا كبيرا في العديد من مجالات الطب لدراسة حالات الشذوذ الصبغي حيث أن النمط النووي هو التحليل العددي و الهيكلي للكروموزومات البشرية.

يهدف هذا العمل إلى دراسة النمط النووي للإنسان (الوراثة خلوي التقليدية). كان العمل على اثنا عشر عينة مأخوذة من خلايا الدم اللعابية وخلايا سرطانية مجتته من ورم على مستوى المرفق. إن تحليل الكروموزومات يتطلب، إعداد صفائح زجاجية غنية بالكروموزومات بعد زراعة الخلايا.

سمح لنا تحليل كروموزومات للمرضى بوجود شذوذ كروموزومي عددي عند بعضهم مثل: تثلث الصبغي 21 (47, XY+21)، و كلاينفلتر 47, (XXY)، وأحاد الصبغي X (45, XO) وأحاد الصبغي 22 (45, XY-22).

من خلال هذا العمل يتبين أن هذه التقنية ذي أهمية كبيرة في تشخيص المرضى الذين يعانون من مختلف شذوذ الكروموزومات العددية. لتحليل تشوهات الهيكلية في الكروموزومات و حتى المكتسبة، نحن في حاجة إلى تقنيات أخرى مكاملة مثل تقنيات التشخيص الجزيئي (CGH, FISH) فهي أدق وأعمق.

كلمات البحث : علم الوراثة الخلوية، النمط النووي، كروموسوم، الشذوذ كروموزومي، الوراثة المكتسبة.

Résumé

La cytogénétique est développée dans nombreux domaines de la médecine pour l'étude des anomalies chromosomiques, et le caryotype permet l'analyse numérique et structurale des chromosomes humains.

Ce travail a pour objectif l'étude la mise au point d'un caryotype humain classique (cytogénétique conventionnelles). Les douze prélèvements retenues dans ce mémoire, sont les cellules lymphatiques du sang et les cellules du sarcome synovial. L'analyse chromosomique nécessite, à la préparation des lames riches en étalements chromosomiques analysables après la culture cellulaire.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence, sur les patients analysés, des anomalies de nombres, en l'occurrence la trisomie 21, le syndrome de Klinefelter, syndrome de Turner et monosomie 22.

Au cours de ce travail, nous avons constaté la grande importance de cette technique dans le diagnostic des patients atteints des différentes anomalies chromosomique de nombre.

Pour l'analyse des anomalies constitutionnelles de structure et même acquises, vu leur complexité moléculaire, nous préconisons d'autres techniques de diagnostic complémentaire en faisant appel à des techniques moléculaires plus approfondies.

Mots clés : cytogénétique, caryotype, chromosome, anomalie chromosomique, constitutionnelles et acquises.

Abstract

Cytogenetics has developed in many areas of medicine for the study of chromosome abnormalities and karyotype allows numerical analysis and structural human chromosomes.

This work aims to study the development of a standard human karyotype (cytogenetic conventional). The twelve samples used in this paper are the cells of the blood and lymphatic cells of synovial sarcoma. Chromosomal analysis requires, in the preparation of chromosome spreads rich blades analyzed after cell culture.

This study allowed us to highlight on the twelve patients analyzed, abnormal numbers, namely trisomy 21, Klinefelter syndrome, Turner syndrome and monosomy 22.

Throng ont this work, we found the great importance of this technique in the diagnosis of patients with different chromosomal abnormalities enumerate. For the analysis of constitutional abnormalities of structure and even acquired, considering their molecular complexity, we recommend other complementary diagnostic techniques using molecular techniques deeper.

Keywords: cytogenetics, karyotype, chromosome, chromosome abnormality, constitutional and acquired.