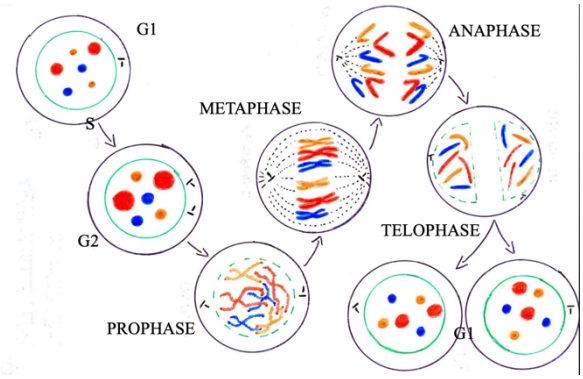
Fiche Génétique – COURS 4

CYTOGÉNÉTIQUE

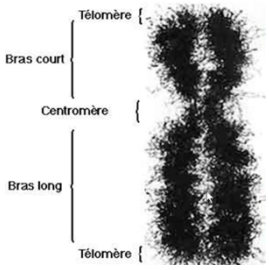
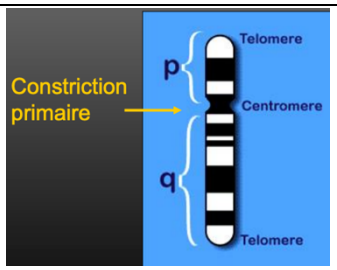
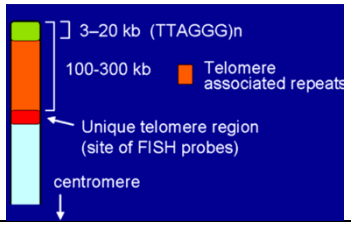
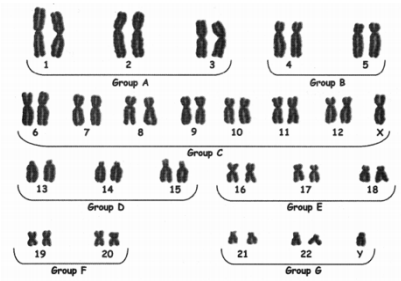
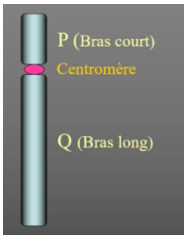
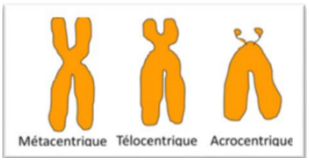
Pr Siffroi

<table>
<tr><th colspan="2">MÉTHODE D'ÉTUDE DES CHROMOSOMES</th></tr>
<tr><td>Définitions</td><td>- <u>Caryotype</u> = ensemble des chromosomes caractéristiques d'une espèce (autosomes + gonosomes)
- La spécialité est la cytogénétique ou génétique chromosomique

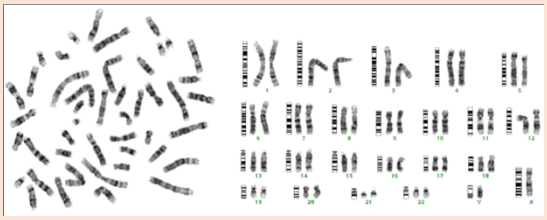
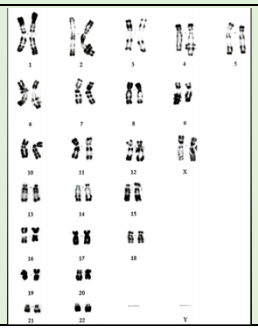
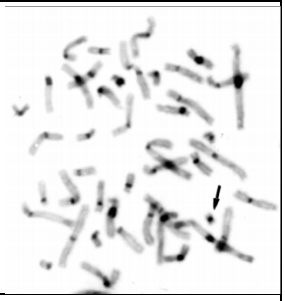
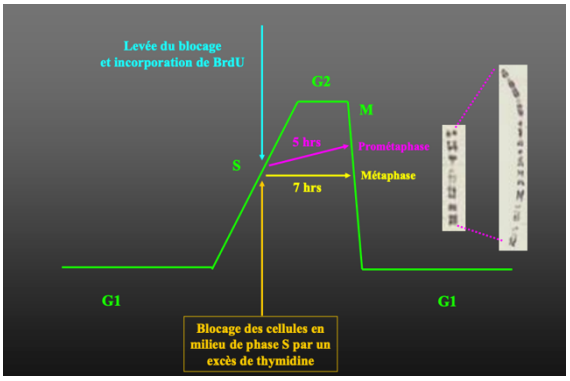
→ On est passé de la cytogénétique classique à de la cytogénétique moléculaire</td></tr>
<tr><th colspan="2">CYTOGÉNÉTIQUE</th></tr>
<tr><td>Cytogénétique conventionnelle</td><td><u>Conventionnelle :</u> cellules en culture les chromosomes vus au cours de la mitose. On parle de chromosomes métaphasiques ou mitotiques qui sont dupliqués et condensés : c'est à ce moment qu'on les voit les mieux et qu'on les étudie.
 

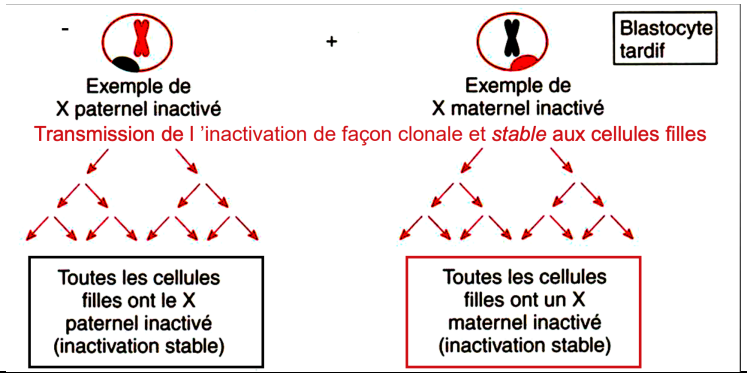
Le chromosome mitotique = 2 chromatides sœurs très condensées et reliées l'une à l'autre au niveau du centromère.</td></tr>
<tr><td>Cytogénétique moléculaire</td><td>- Fish (= hybridation in situ fluorescente). On utilise des sondes qui sont marqués et on les hybride sur les in situ (donc directement sur le matériel biologique). Les sondes reconnaissent les segments dont elles sont la copie, s'hybrident et émettent un signal fluorescent.
- CGH-array</td></tr>
<tr><th colspan="2">CARYOTYPE</th></tr>
<tr><td>Obtention du caryotype</td><td><u>Certaines conditions sont à respecter pour obtenir le caryotype :</u>

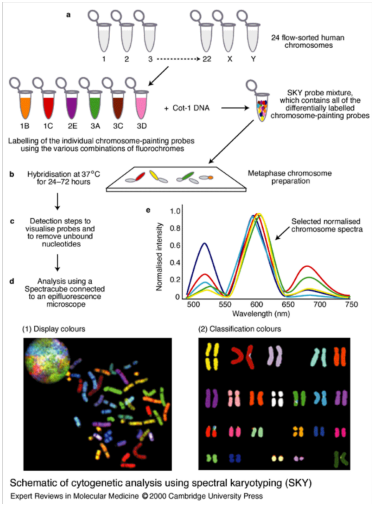
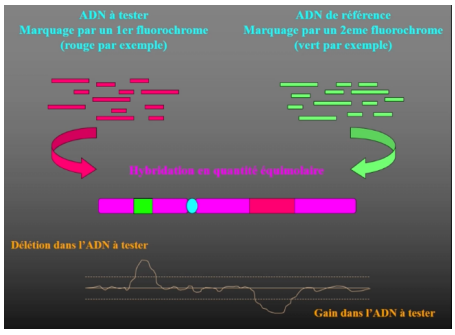
- <u>Cellules dans le cycle :</u> nécessité d'avoir des cellules vivantes
- <u>Cellules en mitose :</u> blocage des mitoses par la colchicine (dépolymérisation des microtubules)
- <u>Choc hypotonique :</u> gonflement des cellules (2n = 46)
- <u>Fixation :</u> conservation des acides nucléiques par un mélange d'alcool-acide acétique 3 :1
- <u>Étalement sur une lame de microscope :</u> dispersion locale des chromosomes</td></tr>
</table>

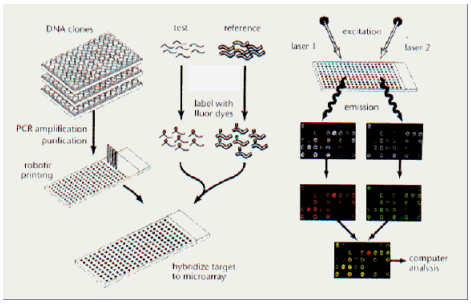
Les chromosomes	- **<u>Euchromatine :</u>** régions actives au point de vue transcriptionnel (porte gènes actifs) - **<u>Hétérochromatine :</u>** inerte (soit car elle ne contient pas de gènes, soit parce que les gènes sont réduits au silence→ comme chromosome X chez la femme). 
Le centromère	- **<u>Séquences ADN répétées, spécifiques :</u>** ADN alpha-satellite - **Hétérochromatine** - **Réplication tardive** - **<u>Rôle dans la division :</u>** ségrégation et migration correcte des chromosomes 
Le télomère	- Marque **l'extrémité des chromosomes** - Maintient l'intégrité structurale du chromosome - Séquences répétées **TTAGGG** - Structures adjacentes riches en **gènes** 
Identification des chromosomes	- **<u>Selon la taille :</u>** Longueur du plus grand (1) au plus petit (22) : **7 groupes de A à G**   - **<u>Selon l'indice centromérique :</u>** **I = P / P+Q** On distingue alors 3 groupes de chromosomes selon la position du centromère : ➢ **<u>Chromosomes métacentriques :</u>** si le centromère est au milieu ➢ **<u>Chromosomes télocentriques :</u>** le centromère est décalé avec un bras clairement plus court ➢ **<u>Chromosomes acrocentriques :</u>** c'est une famille de K particulières. Leurs bras courts sont communs à toutes les paires de K acrocentriques et portent un certain nombre de gènes bien particuliers. 

<table>
<tr><th colspan="2">MARQUAGE DES CHROMOSOMES</th></tr>
<tr><td>Généralités</td><td>- Mise en place de techniques de marquage en bandes des K qui permettent d'identifier les paires chromosomiques et de les distinguer les unes des autres.
- Les bras courts et longs des chromosomes (p et q) sont divisés en régions et en bandes grâce à ce marquage.
- Les bandes sont identifiées par des chiffres en partant du centromère</td></tr>
<tr><td>Marquage en bandes des chromosomes</td><td>- Identification individuelle des chromosomes
- Succession de bandes claires et sombres
- Nombre / lot haploïde : 400-550 ou +
- Variations de la structure

- <u>Les bandes différent :</u> composition, temps de réplication, conformation chromatidienne, densité en gènes et en séquences répétées.</td></tr>
<tr><td>Marquage de l'euchromatine</td><td>
<table>
<tr><th>Bandes G :</th><th>Bandes R :</th></tr>
<tr><td>Coloration giemsa après traitement par la trypsine, identiques aux bandes Q. Permet de colorer de façon homogène les chromosomes et donc de repérer leur morphologie globale.</td><td>(Dénaturation par la chaleur), dénaturation des bandes G et Q, riches en GC, réplication précoce, gènes actifs.</td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Marquage de l'hétérochromatine</td><td>- <u>Bandes C :</u> traitement par l'hydroxyde de baryium, hétérochromatine constitutive (20% du génome)
  </td></tr>
<tr><td>Techniques d'élongation des chromosomes</td><td><u>-Etape 1 :</u> synchronisation des cultures pour que toutes les cellules soient au même stade du cycle grâce à l'excès de thymidine. Puis blocage en phase S.
-<u>Etape 2 :</u> Levée du blocage, incorporation du BrdU
-<u>Etape 3 :</u> technique de cytogénétique. On récup en fait les K qui contiennent dans certaines régions BrdU et dans d'autres non (dépend si réplication précoce ou tardive).
 
</td></tr>
</table>

Inactivation de l'X	- Il faut absolument **inactiver le 2e X**. - L'inactivation a dans l'embryon à un stade très jeune, morula donc à J2-J3. - Tous les X, à l'exception d'un seul, sont inactivés. - <u>Dans 50% des cellules :</u> inactivation paternelle - <u>Dans 50% des cellules :</u> inactivation maternelle 
Bras courts acrocentriques	- **<u>Chez l'Homme :</u>** chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 - Il existe des différences de tailles des bras courts : on parle de polymorphisme (liée au fait que ce sont des zones d'hétérochromatines) - Les seuls gènes qu'on trouve sur ces bras sont ceux qui codent pour **les ARN ribosomiques** - Tous les bras courts acrocentriques portent **les mêmes gènes** (plus ou moins amplifiés)
LES TECHNIQUES DE CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE (FISH)	
Hybridation in situ fluorescente	- **Analyse des K in situ (#** hybridation moléculaire sur ADN migré en gel et transféré sur une membrane) - Détection séquences d'ADN - **<u>Principe :</u>** appariement complémentaire des ADN - On **dénature la sonde** (on crée des ½ sondes monocaténaires), mais aussi tous les K
Les sondes chromosomiques I	- **ADN répétitif** (satellite) - Marquent les centromères, les régions hétérochromatiques - Permet de **diagnostiquer le sexe d'un individu** par exemple (frottis sanguin FISH XY) - Permet le diagnostic de **la trisomie 21** - **Diagnostic prénatal +++** - Permet par ailleurs la recherche **des mosaïques**
Les sondes chromosomiques II	- **Chromosomes entiers (K painting)** → c'est plein de sondes qui reconnaissent des régions spécifiques sur le K. Finalement, on a l'impression que c'est une seule et même sonde. - Utilité de la peinture K dans **l'identification des remaniements de structure**

Les sondes chromosomiques III	- **Sondes locus spécifiques** (régions précises sur le K) - De très petite taille - Permet de voir les anomalies de structures (qu'on ne voit pas sur le caryotype) → translocation, microdélétion… <u>Limites de la FISH :</u> ne peut détecter que ce que la sonde peut détecter (si on cherche anomalie de William, on utilise une sonde spécifique pour cette anomalie…). Il s'agit donc d'une approche ciblée. 2 techniques permettent de détecter une anomalie sans avoir une approche ciblée : **l'hybridation <u>génomique comparative ou CGH</u> et <u>la cytogénétique spectrale ou la multi- FISH.</u>**
CYTOGÉNÉTIQUE SPECTRALE	
Quelques notions	- Il s'agit d'un **painting général** de tous les K, sauf qu'on utilise pour chaque K **un mélange de fluorochromes** dans des proportions bien précises. - On observe **des couleurs artificiels sur chaque K** en fct de la fluorescence de chaque paire chromosomique. - C'est BG mais on s'en balek (pas trop d'utilité)  Schematic of cytogenetic analysis using spectral karyotyping (SKY) Expert Reviews in Molecular Medicine ©2000 Cambridge University Press
HYBRIDATION GÉNOMIQUE COMPARATIVE OU CGH	
Définition	- On utilise **des génomes entiers** comme sonde et on compare 2 génomes entre eux. - On travaille direct sur l'ADN
Principe	- On marque l'ADN à tester par un **1er fluorochrome** (par ex en rouge) - En marquant l'ADN, ce dernier se désintègre, donc on crée **pleins de petits fragments.** - On fait la même chose sur un ADN de référence (c'est l'ADN « normal »). On le marque par **un autre fluorochrome (**en vert par ex) - On mélange les **2 ADN en quantité égale** (en équimolaire) - On hybride ensuite ces 2 ADN sur une lame chromosomique qui sert de révélateur - Il y a **équiprobabilité** pour qu'on ait soit la sonde rouge soit la sonde verte qui vient sur la lame. Une fois que le locus est occupé l'autre ne peut pas venir. - Sur la lame de K, s'il n'y a pas d'anomalies on a **équidistribution des 2 ADN.** 

	- Par contre si y'a anomalie, l'ADN qui est ok a bcp plus de chances de venir se fixer sur le K, donc on aura **une déviation de la fluorescence** (vers l'une des 2 couleurs) - On utilise **un analyseur d'image** qui mesure la fluorescence - Donc quel que soit l'anomalie, on peut la trouver
La cytogénétique au XXIe siècle : CGH microArrays	- Utilisation d'une **puce ADN** - On coupe le K en tranches et on pose chaque tranche sur une lame - On obtient **des images de points** : chaque point correspond à un marqueur - Il existe **2 types de puces** : renseignements quantitatifs (vert, rouge…) + SNIP (mutation neutre, polymorphe). - On génotype ainsi le patient ➢ **<u>Nécessite de :</u>** - **Contrôler l'anomalie ou la suspicion d'anomalie** (technique FISH, qPCR ou MLPA) - **Contrôler le caractère de novo de l'anomalie** (technique FISH obligatoire car possibilité de remaniement équilibré chez un des parents) - **Comparer les données de CGH-Array à celles de cytogénétique conventionnelle** (indications ++ sur la topographie de l'anomalie) 
L'avenir	- **Séquençage de nouvelle génération NGS** (next generation sequencing) - **Séquençage d'un génome entier en quelques jours** : qualitatif (variations nucléotidiques) / quantitatif : CNV / topographique - **Mais erreur de séquençage** …