

LE CARYOTYPE

O DEHAESE* ; E LEVADOUX ; F BERTHOMIER** ;
V SAUTOU-MIRANDA*** et J CHOPINEAU******

*Interne en pharmacie, **Pharmacien assistant, ***Pharmacien des hopitaux

**** Pharmacien des hopitaux, Chef de service.

Pharmacie centrale, C.H.U. Clermont-Ferrand, 30 place Henri Dunant, 63003
Clermont-Ferrand cedex.

Article reçu le 16-04-1998 ; accepté le 10 janvier 2000.

Tirés à part: J CHOPINEAU Pharmacie centrale, C.H.U. Clermont-Ferrand,
30 place Henri Dunant, 63003 Clermont-Ferrand cedex

Tel. 04.73.62.57.02

Fax. 04.73.62.56.94

Mots clés: Caryotype, chromosomes, techniques, formule chromosomique
anomalies du caryotype, indications

LE CARYOTYPE

INTRODUCTION

A. ETABLISSEMENT DU CARYOTYPE

I. VISUALISATION DES CHROMOSOMES

1. Localisation des chromosomes
2. Constitution des chromosomes
3. Organisation et structure des chromosomes

II. LES TECHNIQUES D'ETABLISSEMENT DU CARYOTYPE

1. Les prélèvements
2. Les étapes de la réalisation du caryotype
 - La culture cellulaire
 - Identification des chromosomes par coloration
 - Classification des chromosomes: Etablissement du caryotype
3. L'hybridation in situ fluorescente

B LES ANOMALIES RENCONTREES AU NIVEAU DU CARYOTYPE

I. LES ANOMALIES DE NOMBRE DES CHROMOSOMES

1. Les aneuploidies
 - Les trisomies
 - Les monosomies
2. Les polyploïdies
3. Le mosaïcisme
4. Le chimérisme

II. LES ANOMALIES DE STRUCTURE DES CHROMOSOMES

1. Les translocations
 - Les translocations réciproques
 - Les translocations robertsoniennes
 - Les insertions
2. Les délétions
3. Les inversions
4. Les duplications
5. Les isochromosomes
6. Les chromosomes en anneau
7. Les chromosomes dicentriques

III. LES SITES FRAGILES

C. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE

I. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE EN PERIODE PRENATALE

1. Principe du diagnostic prénatal
2. Les indications majeures du caryotype en période prénatale

II. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE EN PERIODE POST-NATALE

1. A la naissance
2. Durant l'enfance et la puberté
3. Chez l'adulte

III. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE EN CANCEROLOGIE

1. La génétique du cancer
2. Les indications du caryotype en cancérologie
3. Exemples
 - Les hémopathies malignes
 - Les tumeurs solides

CONCLUSION

REFERENCES

QCM

REPONSES QCM

INTRODUCTION

Ces trente dernières années, le génome humain a fait l'objet d'études très importantes qui ont entraîné un véritable progrès scientifique et médical. Cependant, la place de la génétique en médecine n'a pas toujours été aussi évidente. En effet, à la fin du siècle dernier MENDEL définissait les lois de l'hérédité. Ce n'est que dans les années 1950 que le support de l'hérédité a été peu à peu dévoilé [17] : L'information génétique est portée par des petites organelles en forme de bâtonnets nommés les chromosomes (chroma couleur ; soma : corpuscule). Ils sont constitués d'acide désoxyribonucléique (ADN) associé à des protéines, l'ADN contenant les unités d'information génétique appelées les gènes [15]. En 1956, TJIO et LEVAN après avoir mis au point des techniques permettant de visualiser les chromosomes, ont établi le nombre normal des chromosomes humains à 46. Ainsi, la cytogénétique est née, permettant l'étude des chromosomes, de leur structure et leur transmission. L'analyse numérique et structurale des chromosomes est définie par le CARYOTYPE. L'établissement du caryotype permet de définir la formule chromosomique d'un individu et de détecter d'éventuelles anomalies.

A l'heure actuelle, l'essor de la biologie moléculaire via l'étude et l'isolement de nombreux gènes apporte de plus en plus d'éléments de compréhension de la physiopathologie de certaines maladies génétiques. Par conséquent nous pouvons nous demander quelle est aujourd'hui la place et l'intérêt du caryotype?

A. ETABLISSEMENT DU CARYOTYPE

I. VISUALISATION DES CHROMOSOMES

1. Localisation des chromosomes [2,4,15]

Il faut dans un premier temps distinguer les cellules Eucaryotes des cellules Procaryotes.

La cellule Procaryote représentée notamment par les bactéries est constituée d'une membrane cytoplasmique (associée à une paroi) délimitant le cytoplasme et d'un chromosome circulaire unique directement en contact avec celui-ci.

La cellule Eucaryote possède un noyau pourvu de chromatine et séparé du cytoplasme par une enveloppe nucléaire .

Deux types de chromatine (l'hétérochromatine condensée et l'euchromatine dispersée) forment les chromosomes.

Dans cet exposé, nous allons étudier uniquement les chromosomes des cellules humaines qui sont des cellules Eucaryotes.

2. Constitution des chromosomes [2,4,15]

Les chromosomes sont constitués d'acide désoxyribonucléique (ADN) associé à des protéines histones. L'ADN, porteur de l'information génétique est un polynucléotide (entité d'un grand nombre de nucléotides) et chaque nucléotide contient trois composants : une base hétérocyclique azotée (bases puriques : Adénine, Guanine ; bases pyrimidiques : Cytosine, thymine) , un pentose et une molécule d'acide phosphorique.

La molécule d'ADN s'organise en double hélice stabilisée grâce à la complémentarité entre les bases Guanine (G) Cytosine (C) et les bases Adénine (A) Thymine (T). Les gènes sont des segments définis de la molécule d'ADN et correspondent à des séquences polynucléotidiques particulières.

Il faut également mentionner que l'ADN de l'euchromatine est accessible à la transcription tandis que l'ADN de l'hétérochromatine n'est pas " actif ".

3. Organisation et structure des chromosomes [4,15]

Les protéines histones se rassemblent pour former des nucléosomes (ensemble de huit histones). L'ADN s'enroule autour des nucléosomes aboutissant à un nucléofilament en " collier de perles ". Un degré de compaction supplémentaire définit un filament de chromatine de 30nm (ou solénoïde), c'est à dire la structure primaire du chromosome (figure 1).

Cette structure déployée et linéaire peut se modifier au cours de la vie de la cellule qui est réglée par le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire commence à la naissance de chaque cellule (issue de la division ou mitose de la cellule mère), 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. Au cours de la phase G1, le chromosome conserve sa structure primaire linéaire. Lors de la phase S, au cours de laquelle la synthèse d'ADN a lieu, le chromosome se réplique. Il possède donc deux molécules d'ADN identiques, les deux chromatides soeurs. 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 comprend cinq phases : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. Elle aboutit à une répartition de l'ADN de la cellule mère en 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 (figure1).

Ainsi, c'est au moment de la métaphase que le chromosome est au maximum de sa condensation et qu'il est le plus facilement observable. Il est bien différencié, constitué de deux chromatides reliés entre elles au niveau du centromère. Le centromère ou constriction primaire est un point de repère cytologique, permettant de diviser les chromosomes en deux bras, un bras court (symbolisé p) et un bras long (symbolisé q) (figure 2).

A partir de l'observation microscopique des chromosomes métaphasiques le caryotype est réalisé.

II. LES TECHNIQUES D'ETABLISSEMENT DU CARYOTYPE

Il existe plusieurs techniques selon la nature des cellules prélevées. Globalement, elles sont basées sur la culture cellulaire suivie d'une coloration des chromosomes métaphasiques.

1. Les prélèvements [3,17]

Le type de prélèvement dépend de l'indication du caryotype:

Dans le cadre du diagnostic prénatal (voir chapitre “les indications du caryotype ”), les prélèvements diffèrent en fonction du stade de la grossesse. Le prélèvement des cellules amniotiques foetales, issues du liquide amniotique, est réalisé par amniocentèse entre la quinzième et la dix septième semaine d'aménorrhée. Les cellules trophoblastiques (choriocentèse) peuvent être prélevées entre la huitième et la dixième semaine et les cellules du sang foetal (cordocentèse) vers la vingtième semaine.

Pour la détermination du caryotype en période post-natale, les lymphocytes T sont prélevés par ponction veineuse périphérique.

Les biopsies cutanées permettent d'obtenir des fibroblastes, cellules capables de maintenir une croissance continue pendant plusieurs générations.

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).

2. Les étapes de la réalisation du caryotype [10,14,17]

- La culture cellulaire

Les cellules prélevées dans les meilleures conditions possibles, sont mises en culture. Quelques règles essentielles sont à respecter pour obtenir une culture optimale [14] :

L'asepsie est indispensable à considérer car certains micro-organismes peuvent altérer la culture cellulaire. Il faut aussi tenir compte du milieu de culture, de la nature des substrats, de la température, du pH, de la pression osmotique et de la durée de culture.

Il existe plusieurs types de cultures possibles et nous pouvons ainsi distinguer : Les cultures à court terme et à long terme, les cultures par préparation directe ou par greffes sur animaux et les cultures de cellules en prophase. Dans la pratique, ce sont les cultures à court terme (par exemple, soixante douze heures pour les lymphocytes T) et les cultures à long terme (fibroblastes, cellules de la moelle osseuse, cellules amniotiques) qui sont le plus couramment réalisées .

La stimulation de la mitose cellulaire nécessite l'ajout d'un agent mitogène (la phytohémagglutinine). Le blocage de la mitose en métaphase (stade d'observation optimale des chromosomes) est obtenu grâce à l'emploi d'une solution diluée de colchicine qui inhibe la formation du fuseau mitotique.

Une solution hypo-osmolaire via la création d'un choc hypotonique provoque un gonflement et une lyse de la cellule bloquée en métaphase induisant la libération des chromosomes. Après fixation et étalement sur lame, les chromosomes sont identifiés par coloration.

-Identification des chromosomes par coloration

Des techniques introduites dès le début des années 1970, ont permis de déterminer sur les chromosomes une alternance de bandes claires et de bandes sombres transversales caractéristiques; chaque chromosome est divisé en régions comprenant elles même des bandes qui sont divisées en sous bandes. Ainsi, chaque paire de chromosome peut être parfaitement identifiée .

Plusieurs techniques de coloration chromosomique ou bande sont utilisées: La technique de bande G est la plus fréquemment employée. Elle définit

la coloration des chromosomes au moyen du colorant GIEMSA, après avoir dénaturé les protéines chromosomiques à l'aide de la Trypsine (figure 2). La technique de bande R fait intervenir un prétraitement par la chaleur avant la coloration au GIEMSA et montre une distribution de bandes inverse à celle des bandes G (figure 2). Elle est utilisée comme méthode de routine dans beaucoup de laboratoires Européens.

Des techniques de coloration basées sur celles des bandes G et R permettent de colorer les chromosomes à partir de stades précoces de la mitose (prophase et prométaphase). Ces techniques de bandes haute résolution sont indiquées dans les études de lésions chromosomiques de très petite taille.

Il existe d'autres techniques de bandes moins fréquemment employées. Ainsi, il faut mentionner la technique de bande Q qui nécessite une coloration par la moutarde de Quinacrine (ou de ses dérivés) et un examen au microscope en fluorescence mais aussi la technique de bande C colorant spécifiquement certaines régions chromosomiques (notamment le centromère) (figure 2).

-Classification des chromosomes: Etablissement du caryotype

Après coloration, les chromosomes sont classés et analysés. La procédure habituelle est de découper les chromosomes à partir d'une microphotographie (figure 3) et de les classer par paires (figure 4). Cependant, à l'heure actuelle, les chercheurs ont mis au point des systèmes d'analyse informatique rapide et bien adaptés (microscope relié à un micro ordinateur). L'établissement du caryotype correspond à une classification standard des chromosomes humains [5,10] (figure 4).

Les chromosomes sont donc classés par paire, en fonction de leur taille et de la position du centromère [10]. L'indice centromérique défini par le rapport entre bras court et bras long permet de décrire trois types de chromosomes: les chromosomes métacentriques pour lesquels le centromère est placé de façon plus ou moins centrale, les chromosomes submétacentriques (position non centrale du centromère), et les chromosomes acrocentriques avec un centromère situé près de l'extrémité du chromosome.

Les chromosomes acrocentriques humains ont des petites masses de chromatine appelées satellites reliés à leur bras court par un pédoncule droit (constriction secondaire). Ces paramètres d'identification permettent de déterminer des groupes chromosomiques (de A à G) [10]

Exemple: Groupe 1-3 (A): grands chromosomes métacentriques

Les cellules somatiques humaines ont un complément chromosomique diploïde (diplos:double), c'est à dire $2n$ chromosomes ou 46 chromosomes tandis que les gamètes ont un complément chromosomique haploïde (haplos:simple), c'est à dire n chromosomes ou 23 chromosomes.

Les 46 chromosomes sont répartis en 23 paires: 22 paires de chromosomes sont identiques chez l'homme et la femme et sont nommés autosomes, la paire restante est représentée par les chromosomes sexuels nommés gonosomes. Ces gonosomes sont les chromosomes XX chez la femme et XY chez l'homme.

Le classement des paires de chromosomes aboutit ainsi au caryotype de l'individu dont il est possible de déduire la formule chromosomique selon une nomenclature définie [10]. Il est indiqué successivement, le nombre total de chromosomes suivi d'une virgule, les chromosomes sexuels, et l'anomalie de structure chromosomique quand elle existe.

- Exemples: - caryotype féminin normal: 46,XX
- caryotype masculin normal: 46,XY

3. **L'hybridation *in situ* fluorescente** [11]

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*) permet une caractérisation rapide des anomalies chromosomiques. Cette technique est réalisée sur les métaphases ainsi que sur les noyaux interphasiques. Le principe est basé sur l'hybridation efficace et spécifique de sondes d'ADN marquées aux fluorochromes avec des séquences nucléotidiques complémentaires dans l'ADN des chromosomes à étudier.

Les principales étapes de réalisation de la FISH:

- Préparation chromosomique (Cf techniques du caryotype classique)
- Dénaturation de la sonde et de l'ADN chromosomique
- Hybridation
- Détection des hybrides par une analyse microscopique

B. LES ANOMALIES RENCONTREES AU NIVEAU DU CARYOTYPE

Plusieurs types d'anomalies peuvent être rencontrés au niveau du caryotype: les anomalies numériques et les anomalies structurales des chromosomes.

I. **LES ANOMALIES DE NOMBRE DES CHROMOSOMES** [1,5,6,10,12,17]

Ces anomalies peuvent toucher aussi bien les chromosomes sexuels que les autosomes.

1. 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).

- 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. Néanmoins, les sujets porteurs d'aneuploïdies gonosomiques (47,XXX ; 47,XXY ; 47,XYY) ou de trisomie 21 sont viables à long terme.

- Exemple: Trisomie 21 chez une fille: caryotype: 47,XX,+21.

- 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) [12].

- Exemple: Syndrome de TURNER: caryotype: 45,X.

2 Les polyploïdies

Les polyploïdies sont définies par l'existence au caryotype d'un nombre de chromosomes égal à un multiple du complément haploïde supérieur à 2. La triploïdie ($3n$ soit 69 Chromosomes) et la tétraploïdie ($4n$ soit 92 chromosomes) sont les polyploïdies observées dans l'espèce humaine. Ces anomalies constitutionnelles sont très rarement viables, et il est possible de les détecter dans certaines cellules cancéreuses à un stade avancé de la tumorigenèse [1].

Exemple: 69,XXY triploïdie

3. Le mosaïcisme

Les cellules somatiques d'un individu (dérivant du même zygote) peuvent posséder des formules chromosomiques différentes formant ainsi un caryotype en mosaïque. Le mécanisme correspond à une non disjonction mitotique post-zygotique aboutissant à au moins 2 types de cellules avec des caryotypes différents. En général, le tableau clinique est atténué. Du point de vue nomenclature, Les différentes populations cellulaires sont indiquées les unes après les autres et séparées par une barre diagonale (/):

Exemples: 45,X/46,XX/47,XXX 46,XX/47,XX,+21

4. Le chimérisme

Certains sujets sont issus de la fusion de deux ou plusieurs zygotes, ils possèdent donc des cellules ayant des génotypes différents et sont appelés chimères.

Exemple: chi 46,XX/46,XY:chimère produite par une double fécondation, ou une fusion entre deux zygotes.

II. LES ANOMALIES DE STRUCTURE DES CHROMOSOMES [1,5,8,10,14,17]

Les aberrations chromosomiques structurales sont moins fréquentes que les anomalies de nombre. Elles sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies d'un ou plusieurs remaniements anormaux lesquels pouvant survenir spontanément ou être induits par des agents clastogènes (cassant les chromosomes) tels les radiations, certains virus et divers produits chimiques.

Ces aberrations peuvent affecter un chromosome, deux chromosomes homologues ou non, et parfois davantage. Elles peuvent être équilibrées (pas de déséquilibre du matériel chromosomique) n'entraînant généralement pas d'effets phénotypiques (ou de modifications de caractères) ou déséquilibrées. Néanmoins, il faut noter que les anomalies apparemment équilibrées peuvent aboutir lors de la méiose à la formation de gamètes déséquilibrés pouvant donner des zygotes anormaux. Quant aux anomalies non équilibrées, elles peuvent survenir de novo ou être la conséquence d'un remaniement parental équilibré.

Les anomalies de structure sont nombreuses et diverses, mais les translocations et les délétions sont les principales rencontrées en pathologie humaine.

Remarque: Du point de vue nomenclature, il est important de savoir identifier le point chromosomique atteint [10].

Exemple: 3q24,1 (3: numéro de la paire chromosomique, q: bras chromosomique concerné (bras long dans ce cas); 2: deuxième région chromosomique; 4: quatrième bande; 1: première sous bande).

1. Les translocations

- Les translocations réciproques

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. Il existe une grande variété de translocations réciproques pouvant toucher tous les chromosomes. 90% des translocations réciproques sont équilibrées et dans 10% des cas, elles peuvent s'accompagner de microdélétions donc interrompre la séquence d'un gène occasionnant ainsi une expression phénotypique anormale, des malformations, ou un retard mental. Cette dernière situation est rare mais elle est importante car sa détection constitue une première étape dans l'isolement d'un gène dont l'altération pourrait être responsable de la pathologie observée.

-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).

- Les translocations robertsoniennes (figure 5)

Les translocations robertsoniennes se produisent entre chromosomes homologues ou non homologues acrocentriques, soit par fusion centromérique, soit par cassure dans les régions juxtacentromériques. Le caryotype résultant comporte alors 45 chromosomes. Les translocations robertsoniennes équilibrées peuvent entraîner la formation de gamètes déséquilibrés et sont donc à risque de trisomie pour la descendance (trisomie 13 et trisomie 21).

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

- Les insertions (figure 5)

Il s'agit de translocations non réciproques très rares, qui correspondent à la perte d'un segment chromosomique qui est ensuite inséré dans un autre chromosome (dans son orientation habituelle ou inversée).

2. Les délétions (figure 5)

Les délétions se définissent par la perte d'un segment chromosomique.

Elles peuvent être terminales (portant sur l'extrémité du chromosome), ou interstitielles (intervenant sur des segments plus proximaux des bras chromosomiques).

Quelque soit le mécanisme de leur formation, ces anomalies interviennent le plus souvent *de novo*. Elles sont non équilibrées et l'expression phénotypique est fonction de la taille et du contenu du génome délété.

-Exemples: 46,XX,del (1)(q21) : Délétion terminale du chromosome 1 avec un point de rupture situé au niveau de la première bande de la deuxième région du bras long.

46,XX,del (1) (q21 q31): Délétion interstitielle du chromosome 1 (les 2 points de rupture se trouvant en q21 et q31).

-Remarque: Les techniques de cytogénétique classiques permettent de mettre en évidence des délétions touchant plus d'un million de paire de base. Les délétions de petite taille sont détectables grâce aux techniques plus fines d'hybridation *in situ* fluorescente et de biologie moléculaire.

3. **Les inversions**

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 paracentriques si les cassures se sont produites dans le même bras. Ce sont des anomalies chromosomiques équilibrées mais la plupart peuvent entraîner lors de la méiose la formation de gamètes porteurs de monosomies et de trisomies partielles.

-Exemple: inv(3) (q26q29) : Inversion de segments du bras long du chromosome 3.

4. **Les duplications**

Il s'agit de remaniements rares, mais pouvant aboutir à une trisomie partielle dont l'expression phénotypique est dépendante du segment dupliqué. Les duplications peuvent résulter d'une recombinaison inégale lors de la méiose.

Exemple: dup(9q) : Duplication au niveau du bras long du chromosome 9

5. **Les isochromosomes** (figure 5)

Les isochromosomes sont des chromosomes formés de deux bras identiques (longs ou courts) avec perte de l'autre bras. Le plus fréquemment rencontré chez l'homme est l'isochromosome du bras long du chromosome X (i(Xq)) qui constitue une variante caryotypique du syndrome de TURNER.

6. **Les chromosomes en anneau** (figure 5)

Les chromosomes en anneau se forment lors d'une cassure des extrémités d'un chromosome suivie d'une fusion des extrémités restantes, entraînant ainsi une monosomie partielle.

7. **Les chromosomes dicentriques**

Il s'agit de chromosomes possédant un dédoublement du centromère

III. **LES SITES FRAGILES**

Des zones de fragilité constitutionnelles sont observables sur les autosomes et les chromosomes sexuels. Les autosomes les plus souvent touchés sont les chromosomes 2,10,11 et 16 sans conséquences phénotypiques apparentes. Néanmoins, la cassure de l'extrémité distale des bras longs du chromosome X (site fragile de l'X) s'accompagne du syndrome de l'X fragile.

Il existe donc un grand nombre d'anomalies chromosomiques (tableau I) dont les conséquences et la gravité sont très variables (tableau II).

C. **LES INDICATIONS DU CARYOTYPE**

Les anomalies chromosomiques sont responsables d'un certain nombre de maladies génétiques constitutionnelles et jouent un rôle important dans l'apparition et l'évolution de différents cancers. Par conséquent, les indications du

caryotype restent encore nombreuses que ce soit pendant la période prénatale, à la naissance, durant l'enfance, à la puberté et chez les adultes.

I. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE EN PERIODE PRENATALE [3,7,8,13,17]

1. Principe du diagnostic prénatal [3,7]

Le caryotype en période prénatale s'inscrit dans le cadre du conseil génétique en permettant le diagnostic *in utero* de maladies entraînant un handicap sévère et irréversible. Le diagnostic prénatal pouvant mener selon le désir des parents à une éventuelle interruption médicale de grossesse, n'est pas un acte banal mais un acte volontaire (accord du couple), juridiquement encadré (loi de bioéthique) et qui doit être réalisé dans des structures pluridisciplinaires et spécialisées. Malgré l'ensemble des méthodes analytiques disponibles (dosages biologiques, détermination d'activité enzymatiques, analyses histologiques et étude de l'ADN par biologie moléculaire), le caryotype garde une place prépondérante dans le diagnostic prénatal.

2. Les indications majeures du caryotype en diagnostic prénatal

La mise en place du caryotype est dépendante d'un certain nombre de marqueurs de risque[7]:

- L'âge maternel (38 ans et plus) pour le diagnostic de la trisomie 21.
- Les signes "d'appel", échographiques (malformations) et biologiques (hCG).
- Les antécédents pour des maladies chromosomiques et héréditaires.

Le choix de la méthode à utiliser devra tenir compte de quelques facteurs importants:

- L'âge de la grossesse (choix du mode de prélèvement).
- Le risque d'interruption spontanée de la grossesse (risque lié au mode de prélèvement: de 0.5 à 1% (amniocentèse) à 3 à 5% (cordocentèse).
- La complexité de l'analyse (détermination du délai du diagnostic en fonction de la durée de culture cellulaire).

Dans la pratique, la trisomie 21 représente près de 80% des demandes. Il s'agit en effet, de l'anomalie chromosomique la plus fréquente (1.5 à 1.8 pour 1000 naissances vivantes) se caractérisant globalement par un retard mental et des malformations diverses.

Le caryotype peut révéler plusieurs formes de trisomies 21 comme la trisomie 21 libre et homogène (la plus souvent rencontrée), la trisomie par translocation, en mosaïque (rare), partielle(exceptionnelle)ou bien associée à une autre aneuploidie.

Le syndrome de TURNER (0.4 pour 1000 naissances de filles), évoqué devant un retard de croissance utérin et des signes d'appel échographiques peut être confirmé grâce à l'établissement du caryotype. Il montre alors une formule chromosomique 45,X homogène dans 55% des cas, des variantes caryotypiques pouvant être observées telles l'isochromosome X, des délétions, des mosaïques, des chromosomes en anneau de l'X, et même la présence d'un chromosome Y.

La recherche du site fragile du chromosome X est parfois indiquée, ce dernier représentant la cause la plus fréquente du retard mental héréditaire.

Enfin, la trisomie 13 et la trisomie 18 (aneuploïdies moins fréquentes) sont également amenées à être détectées en période prénatale.

II. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE EN PERIODE POST-NATALE [8,12,13,17]

1. A la naissance

A la naissance, le caryotype est établi dans plusieurs circonstances:

- Devant des tableaux cliniques évocateurs d'anomalies chromosomiques connues (exemple: malformations et trisomie 21).
- En face de syndrômes polymalformatifs difficiles à diagnostiquer
- Lors d'une ambiguïté sexuelle

2. Durant l'enfance et la puberté

A cette période de la vie, des maladies génétiques sont révélées dans des situations particulières:

- Le syndrome de TURNER chez une fillette de petite taille.
- Le syndrome de l'X FRAGILE en présence de problèmes mentaux et de troubles du comportement
- Des anomalies de différenciation sexuelle (gynécomastie chez le jeune homme et aménorrhée primaire chez la jeune fille).
- Le syndrome de KLINEFELTER est évoqué lors d'anomalies des organes génitaux. Ce syndrome (fréquence: 1 pour 1000 naissances masculines) est défini par la présence d'un chromosome X surnuméraire, le caryotype est donc 47,XXY dans 80% des cas (les variantes sont des mosaïques gonosomiques).

3. Chez l'adulte

Il est nécessaire d'effectuer le caryotype des parents d'enfants porteurs d'anomalies chromosomiques structurales, mais aussi lors d'un bilan de stérilité et chez les couples dont la femme a subi deux avortements précoces. Une analyse cytogénétique peut être aussi réalisée dans le cadre du diagnostic et du pronostic de certains cancers.

III. LES INDICATIONS DU CARYOTYPE EN CANCEROLOGIE [1,14,16,17,18]

Dès le début du siècle, il a été observé une relation entre anomalies chromosomiques et cancers. Dans les années 1970, de nombreuses études ont montré que les cellules tumorales possédaient des formules chromosomiques différentes des cellules normales.

Actuellement, grâce au développement des techniques de biologie moléculaire des chercheurs ont mis en évidence une association entre les aberrations chromosomiques observées et la mutation de certains gènes impliqués dans la régulation du processus tumoral.

1. La génétique du cancer

Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs jouent un rôle très important dans la cancérogenèse en codant pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire (protéines activatrices pour les proto-oncogènes et inhibitrices pour les gènes suppresseurs de tumeur). Lors de l'action d'agents mutagènes (virus, radiations, agents chimiques), ces gènes sont altérés ou mutés et le cycle

cellulaire est dérégulé. Il en résulte une multiplication anarchique des cellules participant ainsi au développement d'une tumeur. Ces mutations génétiques sont associées à diverses anomalies du caryotype. En général, la mutation des gènes suppresseurs de tumeurs est corrélée à des pertes de segments chromosomiques tandis que la mutation des proto-oncogènes entraîne leur activation en oncogènes se traduisant par des gains et des amplifications chromosomiques.

Le but de l'examen cytogénétique est de rechercher la présence de marqueurs chromosomiques dans les cellules leucémiques et tumorales. En pratique, un clone anormal est défini par au moins deux métaphases ayant un chromosome surnuméraire (trisomie ou anomalie de structure en commun) ou au moins trois métaphases ayant perdu le même chromosome (monosomie).

Les anomalies acquises peuvent être primaires (caractérisant la tumeur primitive) ou secondaires (surajoutées à l'anomalie primaire).

2. Les indications du caryotype en cancérologie

L'indication majeure du caryotype est le diagnostic de certaines pathologies cancéreuses, particulièrement les hémopathies malignes dans lesquelles il existe souvent une corrélation entre des anomalies chromosomiques spécifiques et le type de leucémie.

Le caryotype peut également avoir un intérêt pronostique et constitué un marqueur de l'évolution tumorale (selon la nature ou l'importance de l'anomalie révélée)

Dans le cadre du suivi des patients atteints de leucémies, il participe à la détection d'éventuelles rechutes (réapparition du clone initiale, apparition d'anomalies secondaires) et il permet de contrôler l'efficacité de la greffe de moelle (après détermination préalable du caryotype constitutionnel des donneurs et des receveurs).

Dans un but de recherche, l'établissement du caryotype associé à une fine analyse moléculaire permet de mieux appréhender la pathogénicité de certains cancers. Les analyses cytogénétiques ciblent les régions chromosomiques pouvant contenir éventuellement des gènes de prédisposition aux cancers héréditaires. L'isolement et la cartographie de ces gènes induisent une précocité du diagnostic, un traitement plus rapidement instauré avant que la tumeur ait atteint un stade métastatique (exemple: gène BRCA1 dans le cancer du sein).

Cependant, l'indication majeure reste la possibilité de diagnostiquer plus précocement ces pathologies. En effet les analyses cytogénétiques ciblent les régions chromosomiques ou des gènes de prédisposition aux cancers héréditaires peuvent être secondairement isolés grâce aux techniques de biologie moléculaire. La cartographie de ces gènes induit la précocité du diagnostic, le traitement est rapidement instauré avant que la tumeur ait atteint un stade métastatique (exemple : gène BRCA1 dans le cancer du sein).

3. Exemples

-Les hémopathies malignes

La leucémie myéloïde chronique est un exemple intéressant car il illustre la liaison entre la cytogénétique et la génétique moléculaire du cancer. En effet, la translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22 (t(9.22)(q34,q11)) déplace le proto-oncogène (abl) de sa position normale (bras

long du chromosome 9) jusque dans la région du point de cassure (bcr). Le chromosome remanié est nommé chromosome PHILADELPHIE et la juxtaposition de séquences constitue un gène chimérique codant pour une protéine anormale.

Le Lymphome de BURKITT est caractérisé par la translocation entre le chromosome 8 et le chromosome 14 qui entraîne l'activation du proto-oncogène myc.

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.

Dans les hémopathies malignes précédemment citées, le caryotype a un intérêt diagnostique car chaque type de leucémie est plus ou moins associé à une anomalie spécifique du caryotype. Néanmoins, le caryotype peut avoir une indication de pronostic dans d'autres hémopathies malignes: Dans le cas de la leucémie aiguë lymphoïde, la présence d'une polyploïdie est marqueur de bon pronostic ou de pronostic intermédiaire, tandis qu'une aneuploïdie et les translocations t(9,22) et (8,14) sont associés à une réduction de la survie des patients.

-Les tumeurs solides

Contrairement aux hémopathies malignes, il est beaucoup plus difficile d'établir une relation entre une atteinte particulière et une anomalie chromosomique spécifique. Les aberrations du caryotype rencontrées sont très variées et sont fonction du stade de progression de la tumeur. Ainsi, les techniques cytogénétiques sont surtout utilisées à des fins pronostiques: Dans les cancers du sein, le caryotype montre un ensemble complexe d'anomalies chromosomique(translocations, délétions, insertions, inversions, monosomies, amplifications, aneuploïdies). Des chercheurs ont remarqué que plus la tumeur mammaire est à un stade avancé, plus l'instabilité génétique est grande, plus le caryotype est aberrant et plus la survie est menacée.

CONCLUSION

Le caryotype présente ainsi de nombreuses indications de la vie foetale jusqu'à l'âge adulte. En effet, il joue un rôle considérable dans le cadre du diagnostic prénatal, il permet de détecter des maladies héréditaires en période post-natale et il participe au diagnostic précoce et au pronostic de certains cancers.

La cytogénétique classique via l'établissement du caryotype conserve donc une place importante dans l'arsenal génétique actuel. Elle est aussi impliquée en recherche dans le but de détecter une région chromosomique pouvant intervenir dans la physiopathologie de maladies génétiques. Cette détection initiale complétée par les techniques d'hybridation in situ fluorescente et précisée par les méthodes de biologie moléculaire peut aboutir à la localisation de gènes de prédisposition.

La thérapie génique pourra s'envisager pour traiter les affections héréditaires et acquises mais aujourd'hui, elle ne constitue pas l'unique approche thérapeutique [9].

REMERCIEMENTS

Pr B Perissel*, Dr A.Tchirkov*, M Giollant*, Pr P Malet*

*Laboratoire de Cytogénétique de la faculté de médecine-pharmacie Clermont-Ferrand

REFERENCES

- 1** Cavenee W, White R. Anomalies génétiques et cancers. *Pour la science* Mai 1995 ; 211:60-68
- 2** Cross, Mercer. *Ultrastructure cellulaire et tissulaire(approche fonctionnelle)*. De Boeck Université, 1993
- 3** Cussenot O, Gilgenkrantz H. Diagnostique prénatal des maladies génétiques: Indications/Méthodes/Aspect juridique et éthique. *Impact internat* Fev 1997: 287-92
- 4** David JC. *Eléments de sécurité en biologie moléculaire*. Flammarion Médecine-Science, 1997.
- 5** De Grouchy J, Turleau C. *Atlas des maladies chromosomiques* (deuxième édition), 1982.
- 6** Dessuant, Karageorgiou. Trisomie 21, épidémiologie, diagnostique, évolution. *impact internat* Fev 1997: 265-69.
- 7** Farriaux JP. Diagnostique prénatal des maladies génétiques: Indications/Méthodes/Aspect juridique et éthique. *La revue du praticien* 1997; 47:2159-64.
- 8** Héron D. Syndrome de l'X fragile: Epidémiologie, génétique, diagnostique. *Impact Internat* Fev 1997: 251-6
- 9** Kahn A. Thérapie génique. Clé pour Médecine Sciences. *Medecine Sciences*, 1993: 3-5
- 10** Mitelman F. ISCN 1995: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* 1995
- 11** Muleris M, Richard F, Apiou F, Dutrillaux B. *Hybridation In Situ en cytogénétique moléculaire , principes et techniques*.1996
- 12** Rodap A. Syndromes de TURNER et KLINEFELTER diagnostique *impact internat*. Fév1997: 257-60
- 13** Romana SP, Gerard B. Diagnostique des maladies génétiques: Indications de l'analyse des chromosomes et de l'ADN. *impact internat* fev 1997: 275-84
- 14** Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics: A practical approach.Malignancy and acquired abnormalities* . Vol 2. 2^{me} édition Serie editors D.Rickwood et B.D.Hames 1992
- 15** Rossignol JL. *Abrégés Génétique 4ème édition*. Masson 1996
- 16** Sidransky D. Le dépistage du cancer. *Pour la science* nov 1996; 229: 76-81
- 17** Thompson MW, McInnés R, Willard HF. *Génétique médicale*.Thompson & Thompson 5ème édition Flammarion Médecine sciences 1995
- 18** Weinberg R. L'apparition des cancers. *Pour la science* nov 1996, 229: 34-42 .

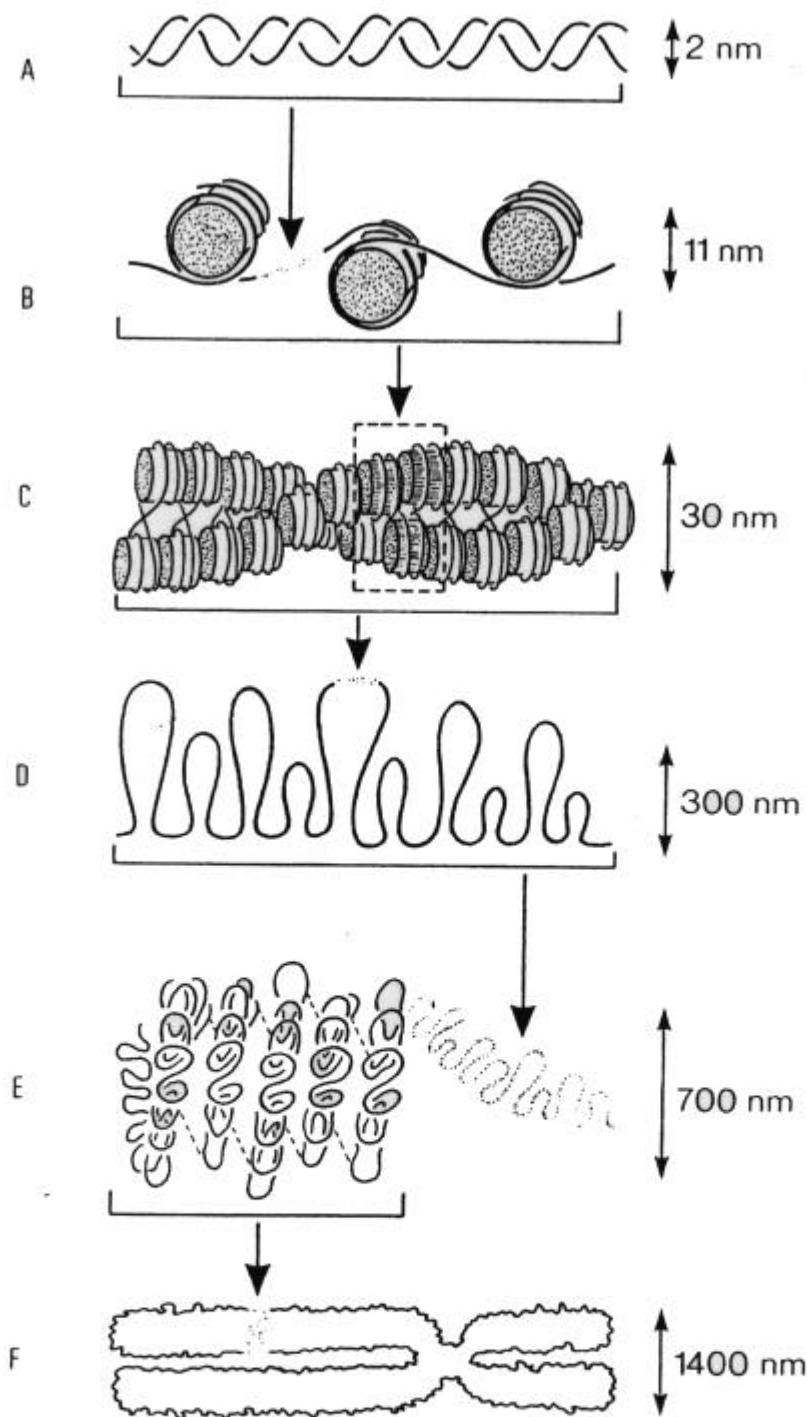


Figure 1: Niveaux d'enroulement de l'ADN dans la chromatine et les chromosomes [15]

- A.-Double-hélice d'ADN. B.-Enroulement par les nucléosomes: forme en « collier de perles ».
- C.- Fibre de chromatine avec les nucléosomes associés entre eux.
- D.- Section de chromosome décondensée. E.- Section de chromosome condensée
- F.- Chromosome métaphasique.

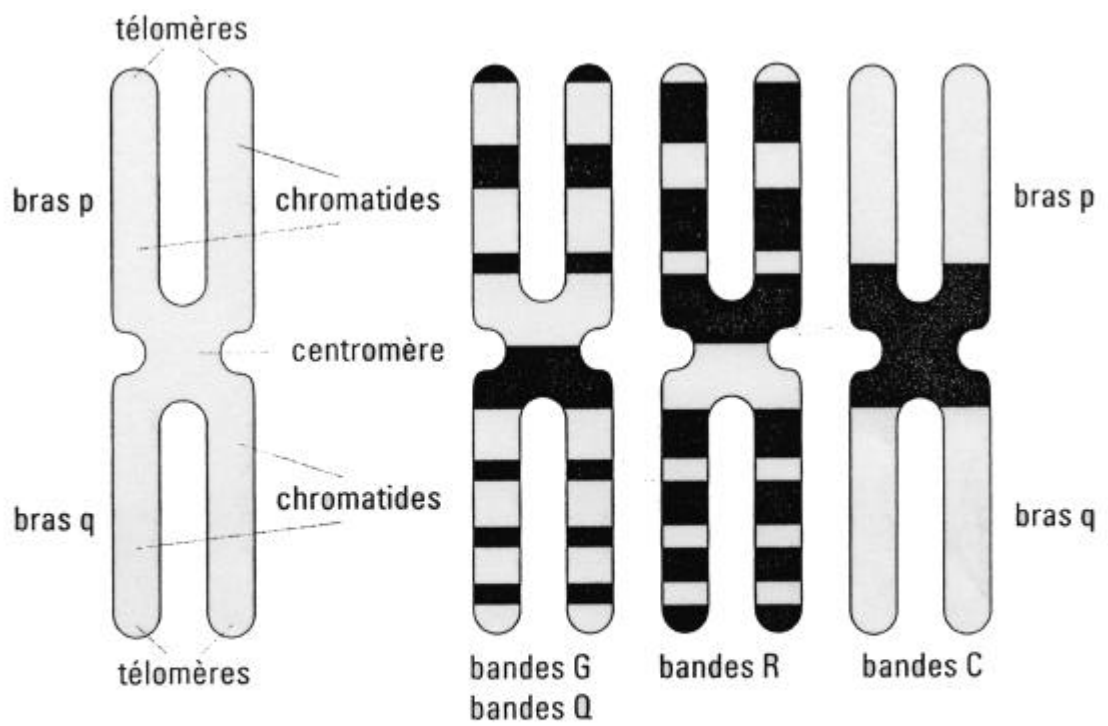


Figure 2: Structures des chromosomes: Bandes [4]



Figure 3: Microphotographie d'une métaphase

[Laboratoire de Cytogénétique de la faculté de Médecine-Pharmacie de Clermont-Ferrand]

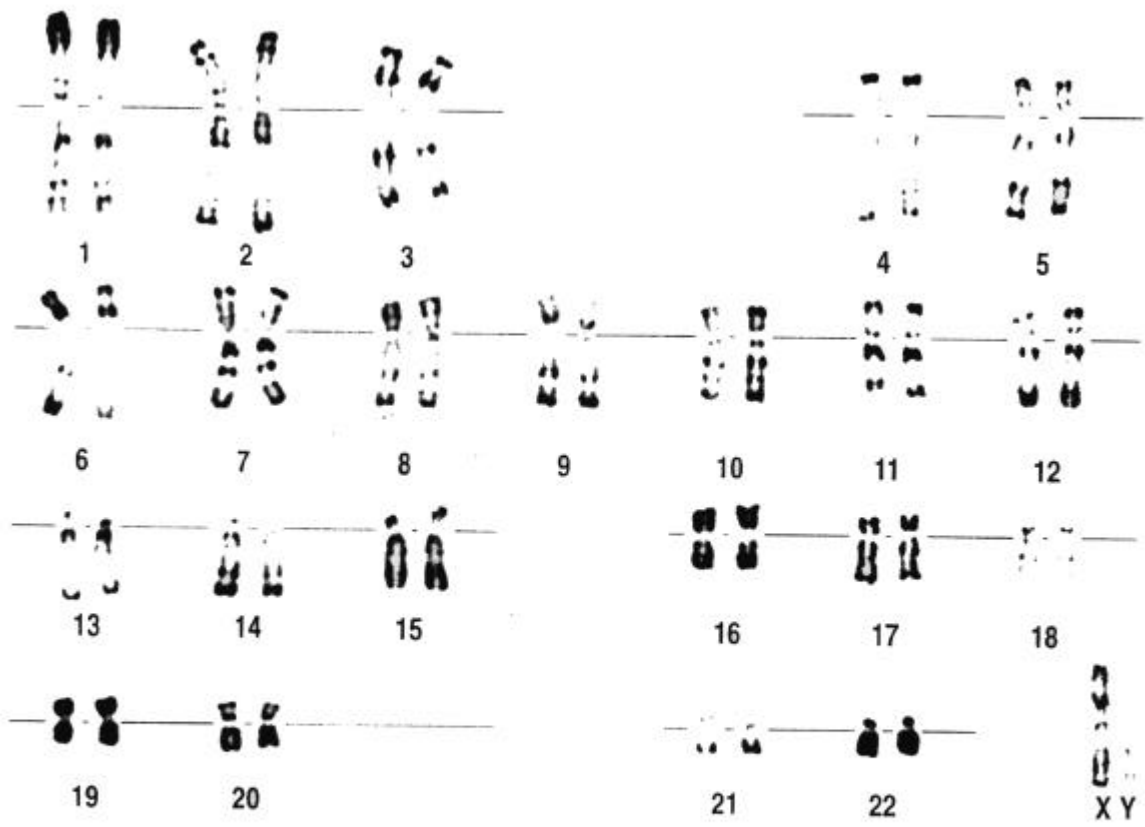


Figure 4: Caryotype masculin établi en Bandes R [10]

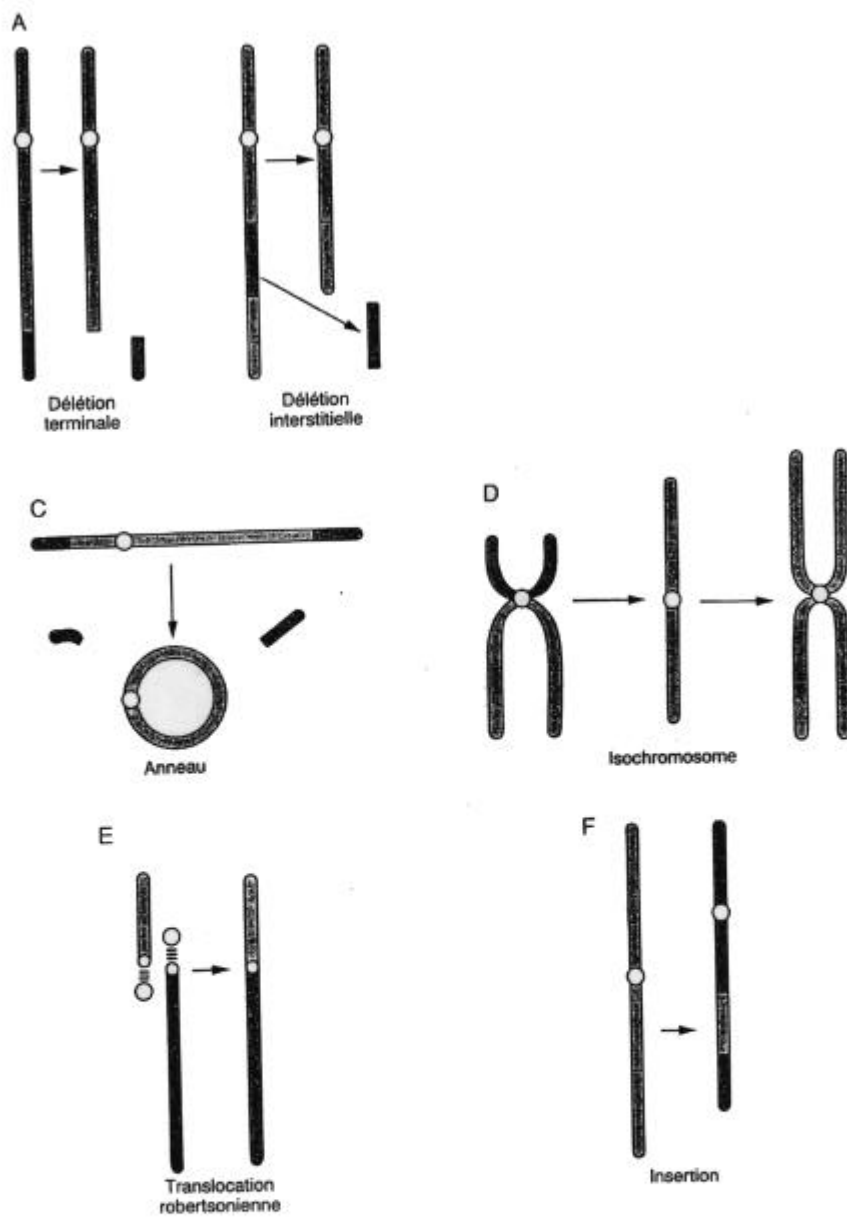


Figure 5: Remaniements de la structure des chromosomes [17]

- A - Délétion terminale et interstitielle, chacune créant un fragment acentrique.
- C - Chromosome en anneau avec deux fragments acentriques.
- D - Production d'un isochromosome pour le bras long d'un chromosome.
- E - Translocation robertsonienne entre les chromosomes acrocentriques.
- F - Insertion d'un segment d'un chromosome dans un chromosome non homologue.

Tableau I: taux des différents types d'anomalies chromosomiques à la naissance [13]

Type d'anomalie chromosomique	Anomalies chromosomiques	Taux *
Anomalies chromosomiques de nombre		
Autosomiques (1.50)	47,+21	1.30
	47,+18	0.12
	47,+13	0.05
	Autres	0.02
Gonosomes (1.75)	47,XXY	0.50 (0.93 chez les hommes)
	47,XYY	0.50 (0.93 chez les hommes)
	Autres chez les hommes	0.20 (0.40 chez les hommes)
	45,X	0.05 (0.10 chez les femmes)
	47,XXX	0.50 (1.00 chez les femmes)
	Autres chez les femmes	0.20 (0.40 chez les femmes)
Anomalies chromosomiques de structure		
Équilibrées (1.95)	Translocations robertsoniennes	0.90
	Inversions	0.14
	Autres	0.90
Non équilibrées (0.60)	Translocations robertsoniennes	0.07
	Délétions	0.09
	Marqueurs surnuméraires	0.30
	Autres	0.14
	Total	5.80 pour mille
* Exprimé pour 1000 naissances vivantes		

Tableau II : Place des anomalies chromosomiques dans la mortalité et la morbidité chez l'homme* [13]

<u>Mortalité et morbidité dues aux anomalies chromosomiques</u>	<u>Pourcentage d'anomalies chromosomiques</u>
<u>Morts embryonnaires très précoces (grossesse non encore identifiée)</u>	<u>33% - 67%</u>
<u>Morts embryonnaires (grossesse identifiée) et foetales</u>	<u>Environ 30% (taux variant de 50% entre 8 et 11 SA à 5 % chez les mort-nés (plus de 28 SA))</u>
<u>Décès postnatal</u>	<u>5 à 7%</u>
<u>Malformations congénitales</u>	<u>4 à 8%</u>
<u>Retard mental (à l'exclusion du syndrome de l'X fragile)</u> <u>QI < 20</u> <u>QI : 20 à 49</u> <u>QI : 50 à 69</u>	<u>3 à 10%</u> <u>12 à 35%</u> <u>3%</u>
<u>Troubles de la fertilité chez l'homme</u>	<u>2% (15% chez les hommes azoospermiques)</u>
<u>Avortements répétés</u>	<u>2 à 5%</u>
<u>Anomalies de la différenciation sexuelle chez les femmes</u>	<u>27%</u>
<u>*(selon Pr.M.Vekemans), SA : semaine d'aménorrhée</u>	