



Support de cours

Cytogénétique

Destiné aux étudiants de Master 1

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Physio-Pathologie (PCPP)

Docteur *REZGOUN Mohamed Larbi*
Maître de conférences (A)

Année universitaire
2020 - 2021

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Préambule

Chapitre I : Généralités, bases fondamentales et définitions	Page 01
1- Définitions	01
1-1- Cytogénétique	01
1-2- Division cellulaire	01
2- Technique d'obtention du caryotype	02
2-1- Blocage des cellules en métaphase	03
2-2- Choc hypotonique	04
2-3- Fixations, étalement et vieillissement	04
2-4- Coloration	04
2-5- Dénaturation / Coloration	05
2-6- Observation microscopique et acquisition des métaphases	06
2-7- Interprétation des caryotypes	06
Chapitre II : Organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine	12
1- Découverte de la chromatine	13
2- Composition de la chromatine	13
2-1- Protéines histones	13
2-2- Variants histones	15
2-3- Protéines non histones	16
3- Structure de la chromatine	17
3-1- Nucléosome et la fibre F10	17
3-2- Fibre F30	19
3-3- Boucles chromatiniennes	20
3-4- Quatrième niveau de condensation	21
4- Différentes étapes de condensation de la chromatine	22
4-1- Assemblage du nucléosome et formation de la F10	22
4-2- Formation des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine	23
5- Territoires chromatiniens	26
Chapitre III : Structures chromosomiques spécialisées	28
1- Télomères des eucaryotes supérieurs	28
1-1- Historique et définition	28
1-2- Structure des télomères	29
1-3- Réplication des extrémités télomériques et télomérase	30
1-4- Fonctions des télomères	32

2- Centromères	34
2-1- Historique et définition	34
2-2- Structure des régions centromériques	35
2-3- Le paradoxe du centromère	38
Chapitre IV : Compartimentation fonctionnelle du génome	39
1- Historique et définitions	40
2-1- Notion de génome	40
1-2- Redéfinition de la notion de gène	40
3- Description de la structure physique du génome	41
2-1- Structure répétitive du génome	41
2-2- Structure de la chromatine, bandes chromosomiques et organisation du noyau	45
2-3- Isochores	47
4- Corrélations fonctionnelles et structurales	48
Chapitre V : Cultures cellulaires	50
1- Les cultures cellulaires	50
2- Statuts physiologiques des cellules <i>in vitro</i>	52
2-1- Cellules normales	52
2-2- Cellules transformées	52
2-3- Cellules non transformées	53
3- Notion de lignées cellulaires	53
4-1- Lignées finies	53
4-2- Lignées indéfinies	53
4-3- Lignées clonales	53
Chapitre VI : Anomalies chromosomiques de nombre	54
1- Définition du concept d'anomalie chromosomique	54
1-1- Anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises	54
1-2- Anomalies chromosomiques homogènes ou en mosaïques	54
1-3- Anomalies chromosomiques de nombre ou de structure	55
2- Classification des anomalies chromosomiques de nombre	55
2-1- Homogènes par non disjonction méiotique	56
2-2- Homogènes par anomalie de la fécondation	57
2-3- Anomalies chromosomiques de nombre en mosaïques	58
Chapitre VII : Anomalies chromosomiques de structure	59
1- Notion d'anomalies chromosomiques de structure	59
2- Classification des anomalies chromosomiques de structure	60
2-1- Translocations réciproques	60
2-2- Translocations Robertsoniennes	61
2-3- Délétions	63
2-4- Microdélétions	63
2-5- Chromosome en anneau	64

2-6-	Inversion.....	65
2-7-	Isochromosome	66
2-8-	Insertion	67
2-9-	Duplication	68
2-10-	Dicentrique	69
2-11-	Remaniements complexes	69
2-12-	Marqueur	69
2-13-	Fragments double minute	70
Chapitre VIII : Nomenclature internationale pour la cytogénétique humaine ISCN		71
1-	Règles générales	71
2-	Descriptions des remaniements	71
3-	Polymorphisme chromosomique	73
4-	Mosaïques	73
5-	Désignations et symboles particulier	75
5-1-	Segment chromosomique d'origine inconnue	75
5-2-	Multiples copies	75
5-3-	Incertitude	75
Références bibliographiques		77

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ALT : Alternative Lengthening of Telomeres
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ASF1 : Anti-Silencing Function 1
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BrdU : Bromodéoxyuridine
CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1
DAPI : Di Amino-Phényle-Indole
ISCN : International System for Human Cytogenetic
kDa : kilo-Daltons
LINE : Long Interspersed Nuclear Element
LTR : Long Terminal Repeat
Mb : Méga bases
NAP1 : Nucleosome Assembly Protein 1
NOR : Nucleolar Organizer Region
pb : paires de bases
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PHA : Phytohémagglutinine
PM : Poids Moléculaire
POT1 : Protection Of Telomere 1
RAP1 : Repressor Activator Protein 1
RC : Région Centromérique
SAR : Scaffold Attachment Region
SINE : Short Interspersed Nuclear Element
SMC : Structural Maintenance of Chromosome
TIN2 : TRF1 Interacting factor 2
TPP1 : TriPeptidyl Peptidase 1
TRF : Telomeric Repeat Binding Factor 1
VNTR : Variable Number Tandem Repeat

Liste des figures

Figure 01 :	Caryotype humain normale en coloration homogène	07
02 :	Caryotype humain normal de sexe féminin en bandes G	08
03 :	Caryotype humain normal de sexe féminin en bandes R	08
04 :	Idéogramme des différents profils de colorations en bandes utilisés	09
05 :	Idéogramme du chromosome 3 en bandes G en résolution standard	11
06 :	Représentation schématique de la structure des histones majeurs	14
07 :	Cliché en microscopie électronique du nucléo-filament	17
08 :	Structure de l'histone cœur du nucléosome	18
09 :	Structure du nucléosome et de la fibre F10	19
10 :	Passage de la F10 à la F30	20
11 :	Modèles de structure de la F30	20
12 :	Représentation schématique de la structure des boucles chromosomiques	21
13 :	Cliché en microscopie électronique de chromosomes métaphasiques	22
14 :	Cliché en microscopie électronique d'un chromosome sans histones	24
15 :	Représentation schématique de structure des condensines	25
16 :	Représentation schématique d'un noyau interphasique coloré au Feulgen	27
17 :	Représentation schématique de la structure des télomères	29
18 :	Modèle actuel du mécanisme de réplication des télomères	31
19 :	Classification des chromosomes en fonction de l'indice centromérique	34
20 :	Organisation des RCs entre les espèces	36
21 :	Modèle de structure secondaire de la chromatine centromérique	37
22 :	Compartimentation fonctionnelle du génome humain	40
23 :	Structure typique du génome d'un rétrovirus	43
24 :	Caractéristiques fonctionnelles des bandes chromosomiques	49

25 :	Mécanismes de survenue des non disjonctions méiotiques	57
26 :	Mécanismes de survenue des anomalies de la fécondation	58
27 :	Mécanisme de survenue d'une translocation réciproque	60
28 :	La translocation t(9;22)(q34;q11) spécifique de la LMC	61
29 :	Mécanisme de survenue d'une translocation Robertsonienne	62
30 :	Mécanismes de survenue des délétions	63
31 :	Mécanismes de formation d'un chromosome en anneau	64
32 :	Mécanismes de survenue des inversions chromosomiques	65
33 :	Mécanismes de survenue des insertions chromosomiques	67
34 :	Mécanismes de survenue des duplications chromosomiques	68
35 :	Récapitulatif des anomalies chromosomiques de structure	70

Liste des tableaux

Tableau I :	Techniques de colorations homogènes employées en cytogénétiques	04
II :	Caractéristiques biochimiques des histones	14
III :	Caractéristiques fonctionnelles des bandes chromosomiques	49
IV :	Liste des principales abréviations utilisées en cytogénétique	75

Préambule

Ce support pédagogique est destiné aux étudiants de la première année Master de la spécialité Physiologie Cellulaire et Physio-Pathologie (PCPP). Il peut servir également comme appui pour tout biologiste désireux d'apprendre les concepts de la cytogénétique. Dans ce document, les notions de base et les principes de cette vaste discipline sont illustrés. Appréhender la cytogénétique nécessite des connaissances de bases acquises en deux disciplines fondamentales : la biologie moléculaire et la physiologie cellulaire ; enseignements prodigués de manière exhaustive en Licence de la spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC).

Même si *Mendel* a mis en évidence, en 1865, l'hérédité des caractères transmis, il aura fallu attendre 1956 pour que *Tjio* et *Levan* parviennent à connaître le nombre exact des chromosomes humains. Parallèlement aux découvertes touchant la cytogénétique, les recherches concernant l'ADN ont avancé rapidement, et en 1953, *Crick* et *Watson* décrivent la structure en double hélice de l'ADN. Après cela, les progrès de la génétique seront fulgurants pendant toute la seconde moitié du XX^{ème} siècle, avec le passage d'une médecine clinique descriptive au diagnostic cytogénétique et génétique des pathologies. Le caryotype classique est depuis 1959, date du diagnostic de la trisomie 21, l'analyse de référence en cytogénétique. Cette technique a été la première réalisant une étude pangénomique, permettant une analyse globale de l'ensemble du génome. En colorant les chromosomes de façon homogène et en les classant selon leur taille et la position des centromères, il a été possible de décrire les anomalies cytogénétiques de nombre des chromosomes et les remaniements de grande taille. En 1970, la cytogénétique va connaître un nouvel essor grâce aux techniques de marquage chromosomique, qui permettront d'analyser la structure des chromosomes sous la forme de séquences de bandes par une dénaturation par la trypsine (bandes G) ou par la chaleur (bandes R). Ceci a permis la mise en évidence d'un éventail de pathologies chromosomiques de structures. Les définitions de base ainsi que les principes de la cytogénétique classique et en bande seront développés dans le premier chapitre.

Les chromosomes, objets d'étude de la cytogénétique, sont composés de chromatine et ne représente qu'un état éphémère durant lequel la substance nucléaire adopte cette configuration. Le niveau d'organisation du noyau ne se limite pas à l'agencement non aléatoire de la chromatine. Le noyau contient en effet de nombreux sous-compartiments réalisant des fonctions nucléaires précises, dont certains correspondent à des micro-environnements actifs en termes de transcription, et d'autres à des micro-environnements plus répressifs. Pour comprendre cette dynamique, nous avons consacré le deuxième chapitre à la description de l'organisation structurelle et fonctionnelle de la chromatine. En complément à ce chapitre, nous avons décrit après, dans le chapitre 3, les structures chromosomiques spécialisées (centromères et télomères) indispensables au fonctionnement du chromosome comme support de l'information héréditaire.

Le génome eucaryote est compacté en une structure appelée chromatine, formant de larges structures qui occupent des domaines distincts dans le noyau. Cette organisation est intimement liée à son fonctionnement puisque celle-ci varie au cours du cycle cellulaire, à différents stades du développement, et dans différents états métaboliques. En outre, des défauts dans les éléments architecturaux du noyau sont la cause de certaines maladies humaines. Cependant, la relation causale entre organisation spatiale et fonctionnement du génome reste encore à élucider. Si l'accent a été placé sur les liens entre transcription et organisation nucléaire, la réplication se déroule également dans ce contexte de noyau organisé. Façonne-t-elle également le noyau ? Certains aspects de l'organisation nucléaire sont-ils reliés au déroulement de la réplication ? Nous répondrons à ces questions dans le chapitre suivant intitulé : compartimentation fonctionnelle du génome.

Les chapitres suivants seront axés sur un aspect plus pratique de la cytogénétique. Tout d'abord, nous allons exposer dans le chapitre V les techniques utilisées pour la réalisation de cultures cellulaires ; étape indispensable à la visualisation des chromosomes sous formes d'entités appréciables et individualisées. Nous exposerons ensuite dans les chapitres VI et VII, avec une approche argumentée, les principales anomalies chromosomiques de nombres et de structures incriminées en pathologie humaine.

La dernière partie de ce cours sera consacrée à l'éclaircissement des difficultés liées à la terminologie employée en cytogénétique. Nous allons présenter, pour clôturer ce photocopié de cours, les règles de la nomenclature internationale pour la cytogénétique humaine (ISCN) actuellement en vigueur ; outil indispensable à tous cytogénéticien.

Chapitre I

Généralités, bases fondamentales et définitions

1- Définitions

1-1- Cytogénétique

La cytogénétique est une discipline médicale et biologique qui étudie le matériel génétique organisé sous forme de chromosomes structurés, visibles et individualisés. Cette branche de la génétique a un intérêt double : fondamental pour comprendre l'organisation de la chromatine et la ségrégation du matériel génétique, et un intérêt pratique pour la caractérisation, par la réalisation du caryotype, des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, associées à certaines maladies génétiques comme des malformations congénitales, retard mental, troubles de la reproduction et cancers. Il faut préciser que les chromosomes, objet d'étude de la cytogénétique, ne sont visibles qu'à un stade particulier du cycle cellulaire, à savoir la phase M et plus particulièrement la métaphase. Pour le reste de la vie d'une cellule (G_0 ou quiescence, G_1 , S et G_2), les chromosomes se trouvent sous la forme de chromatine : filaments enchevêtrés sans organisation apparente, sa condensation débute en prophase et atteint le niveau maximum en métaphase. Cette condensation a pour but de faciliter la ségrégation du matériel génétique préalablement dupliqué durant la phase S entre les deux cellules filles. Une fois un cycle cellulaire achevé, les chromosomes retournent à l'état décondensé de chromatine et ce jusqu'à la prochaine division. Ce phénomène de changement de forme dans le temps illustre le caractère dynamique de cette structure.

1-2- Division cellulaire

Mitose : processus conservateur de l'information génétique qui génère à partir d'une cellule mère deux cellules filles identiques entre elles et identiques par rapport à la cellule mère préexistante. Ce processus se produit au niveau des cellules somatiques ; cellules diploïdes à $2n$ chromosomes.

Méiose : processus diversifiant de l'information génétique qui génère à partir d'une cellule mère quatre cellules filles différentes entre elles et différentes par rapport à la cellule mère préexistante. Ce processus se produit exclusivement au niveau des cellules germinales ou gamètes mâles et femelles ; cellules haploïdes à $1n$ chromosomes. Cette diversité est rendue possible par le processus du crossing-over permettant le brassage (mélange) de l'information génétique.

Caryotype : ensemble complet diploïde des chromosomes d'une espèce, d'une cellule, classés par paires et par ordre décroissant de taille. Dans la majorité des cas, le caryotype standard est établi sur des cellules somatiques à partir de chromosomes métaphasiques. Le caryotype humain normal comporte 46 chromosomes : 22 paires d'autosomes, notés de 1 à 22 en fonction de leur taille décroissante et 1 paire de gonosomes (ou chromosomes sexuels) : XX chez le sujet féminin, XY chez le sujet masculin. Un caryotype normal en nombre est dit euploïde. Un caryotype anormal avec un chromosome en plus (trisomie) ou un chromosome en moins (monosomie) est dit aneuploïde.

2- Technique d'obtention du caryotype

Les chromosomes ne sont visibles que pendant une courte période du cycle cellulaire, lors de la division cellulaire (mitose ou méiose). Toutes les techniques cytogénétiques visent donc à obtenir un maximum de cellules bloquées à ce stade. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des cellules en phase de multiplication active, soit spontanément (cas des villosités chorales ou de certaines cellules tumorales), soit par une culture préalable le plus souvent (fibroblastes, tout type cellulaire capable de se diviser) parfois associée à une stimulation (lymphocytes sanguins). L'étude conventionnelle des chromosomes nécessite donc des divisions cellulaires et commence par conséquent par une mise en culture des cellules avec ou sans un mitogène pour la stimulation des divisions selon que les cellules étudiées se divisent spontanément ou non. L'agent mitogène utilisé est souvent la Phytohémagglutinine (PHA) qu'on ajoute essentiellement pour les cellules sanguines lymphocytaires incapables de se diviser. Les autres types de cellules fœtales, cutanées ou tumorales se divisent habituellement spontanément. Selon le type de cellules prélevées pour être étudiées, on distingue :

- **caryotype constitutionnel** qui étudie la constitution chromosomique de l'individu. Il peut être pratiqué sur lymphocytes sanguins avec stimulation à la PHA après prélèvement de sang veineux sur tube à héparine de Lithium) ou bien aussi sur les fibroblastes de la peau (biopsie cutanée).
- **caryotype prénatal** qui étudie la constitution chromosomique du fœtus. Il peut être pratiqué sur 3 types de prélèvements et donc de cellules selon l'âge du fœtus : cellules trophoblastiques du placenta prélevées par choriocentèse vers 8 à 12 semaines d'aménorrhée, les cellules amniotiques prélevées par amniocentèse écho-guidée du liquide amniotique vers 16 à 21 semaines d'aménorrhée, les cellules sanguines prélevées par cordocentèse écho-guidée à partir des vaisseaux du cordon ombilical à partir de la 22 semaines d'aménorrhée.

- **caryotype somatique médullaire** qui étudie la constitution chromosomique des cellules de la moelle osseuse en cas de suspicion d'une hémopathie maligne (ponction sternale ou de la crête iliaque).
- **caryotype somatique tumoral** qui étudie la constitution chromosomique des cellules d'une tumeur maligne (biopsie ou pièce opératoire fraîches sans fixation dans le formol).

La culture cellulaire des cellules prélevées se fait en présence d'un milieu de culture adapté (exemple : le RPMI) dans un incubateur stérile (risque important d'infection) à une température de 37°C en présence de CO₂ (non indispensable pour les cellules sanguines). La durée de cette culture est variable en fonction du type cellulaire considéré et de la quantité de matériel biologique disponible au départ :

- **lymphocytes sanguins** : c'est les cellules les plus utilisées. Le sang total recueilli stérilement sur un tube hépariné est incubé 48 à 72 heures dans un milieu de culture contenant une lectine à fort pouvoir mitogène (la PHA), ainsi que des antibiotiques pour éviter la pullulation microbienne.
- **fibroblastes** : obtenues après biopsie cutanée le plus souvent nécessitant une culture cellulaire d'une à trois semaines.
- **cellules de la moelle osseuse** : une culture de 24 à 48 heures en fonction de la pathologie étudiée.
- **cellules fœtales** : cellules amniotiques (culture de 10 à 15 jours), cellule du trophoblaste, cellules fœtales en circulation, villosités chorales (ne nécessitant pas de culture).

Après l'obtention de cellules en multiplication active, la technique cytogénétique proprement dite consiste aux étapes suivantes ;

2-1- Blocage des cellules en métaphase

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division. Classiquement c'est la Colchicine qui est utilisée ou son équivalent synthétique la Colcémide, ce qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des tubulines dans les microtubules.

2-2- Choc hypotonique

Les cellules sont plongées dans une solution hypotonique de chlorure de potassium (KCl) ce qui entraîne leur gonflement suivi de l'éclatement de membrane nucléaire et la dispersion des chromosomes. Cette étape est indispensable à l'obtention d'un étalement correct des chromosomes.

2-3- Fixations, étalement et vieillissement

Enfin, la dernière étape consiste en une fixation par un mélange d'alcool et d'acide acétique (carnoy acétique). Cette acidification du milieu permet l'arrêt du choc cellulaire. La répétition des fixations élimine les débris cellulaires avec un bon lavage des lymphocytes. La dernière fixation se fait dans un petit volume de carnoy acétique proportionnel au volume du culot chromosomique. Le culot chromosomique obtenu après cette dernière fixation sert pour l'étalement des métaphases sur lames de verre, dans des conditions de température et d'humidité bien précises (chambre humide ou thermothron).

La préparation est alors étalée en laissant tomber quelques gouttes (1 à 4) de la suspension cellulaire sur une lame propre par une pipette pasteur à une distance de 30 cm et avec un angle de 45°. Certains types cellulaires comme les fibroblastes adhèrent au support lors de la culture. On peut obtenir des métaphases à partir de ces cellules sans les détacher de leur support, toutes les étapes précédentes étant réalisées directement sur la surface de culture. Les lames étalées sont ensuite séchées à l'air libre puis remises à l'étuve à 37°C pour parfaire la fixation et permettre une meilleure dénaturation : c'est ce qu'on appelle le vieillissement

2-4- Coloration

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

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

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

2-5- Dénaturation / Coloration

Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur longueur. On ne peut donc les distinguer les uns des autres que par leur taille et leur forme. Cependant, ces critères sont insuffisants pour assurer la reconnaissance et l'interprétation correcte des anomalies chromosomiques. Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration inhomogène des chromosomes par le Giemsa et l'apparition de bandes. C'est la succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez tous les individus pour un chromosome donné, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un « code à barres ». La coloration des chromosomes en bande ou « banding », font apparaître le long des chromosomes une alternance de bandes transversales sombres et claires spécifique à chaque paire de chromosome homologue normaux. Il existe différentes techniques de banding :

- **les bandes Q (Q pour quinacrine)** : la quinacrine est un dérivé fluorescent de la quinine qui est un agent intercalant avec une grande affinité pour les paires A-T. Cette technique a été mise au point par *Caspersson*, elle utilise la quinacrine qui permet, en lumière Ultra-Violette (UV), de distinguer sur chaque chromosome des régions qui se subdivisent en bandes caractéristiques d'un chromosome donné.
- **les bandes G (G pour Giemsa)** : obtenues par digestion trypsinique modérée des chromosomes. La technique a été mise au point par *Seabright* et *Summer*, les chromosomes sont soumis à l'action de la trypsine ; une enzyme protéolytique non spécifique, puis colorés avec le Giemsa. Après digestion, certaines parties absorbent fortement le colorant, d'autre l'absorbent beaucoup moins : c'est ce qu'on appelle l'affinité tinctoriale. Le profil de bande obtenu est identique à celui des bandes Q : on dit que les bandes G et Q sont superposables.
- **les bandes R (R pour Reverse)** : obtenues par dénaturation thermique ménagée. La technique a été mise au point par *Dutrillaux* et *Lejeune*, les bandes R sont obtenues par dénaturation thermique à 85°C suivie d'une coloration au Giemsa. Cette technique marque les télomères en sombre à l'inverse des bandes Q et G, avec lesquelles les télomères sont pâles. Le profil de bande obtenu est l'inverse de celui obtenu par les bandes G : on dit que les bandes R sont complémentaires aux bandes G/Q.

D'autres techniques de marquage complémentaires existent qui permettent d'analyser certaines régions particulières du génome :

- **bandes C (C pour Centromérique) :** cette coloration par le Sulfate de Baryum permet de mettre en évidence l'hétérochromatine constitutive, qui correspond à des régions non codantes du génome comme les centromères de tous les chromosomes, les régions juxta-centromériques des chromosomes 1, 9 et 16 ainsi que la moitié distale du bras long du chromosome Y.
- **NOR (Nucleolar Organizer Region) :** cette technique consiste en un dépôt de nitrate d'argent qui met en évidence les organisateurs nucléolaires. Ces structures correspondent aux régions du génome contenant les gènes codants pour les ribosomes.
- **bandes T :** une dénaturation thermique poussée ne laisse persister le marquage qu'au niveau des télomères. En effet, ces régions sont très riches en GC et sont donc résistantes à l'action de la chaleur.

2-6- Observation microscopique et acquisition des métaphases

Les lames sont ensuite analysées au microscope spécifique à contraste de phase, afin d'estimer le nombre et la qualité des chromosomes. Les métaphases sont photographiées et acquises par la caméra et l'ordinateur annexés au microscope. Les chromosomes sont classés automatiquement grâce à un logiciel particulier de caryotypage.

2-7- Interprétation des caryotypes

Pour établir une étude cytogénétique, on saisit 15 à 20 métaphases dont 3 uniquement sont classées en caryotype. Chaque chromosome comporte une région centrale appelée centromère (constriction primaire) et qui contient le kinétochore, centre d'organisation des microtubules responsables de la fixation des chromosomes au fuseau mitotique (achromatique) lors de la division cellulaire. Chaque bras se termine par un télomère, séquence d'Acide Désoxyribo-Nucléique (ADN) répétitive hautement conservée qui protège le chromosome contre les attaques par les exonucléases de restriction, empêche les fusions avec d'autres chromosomes ou la re-circularisation de ce dernier, joue un rôle dans l'attachement des télomères à l'enveloppe nucléaire (en particulier lors de la méiose). Le raccourcissement des télomères est un phénomène connu, et qui paraît associé au vieillissement cellulaire (sénescence).

De part et d'autre du centromère, un chromatide présente 2 bras : le bras court ou bras p, placé en haut sur un caryotype, et le bras long (bras q) placé en dessous du centromère. Si le bras court est presque aussi long que le bras long, le chromosome est dit métacentrique (ou médio-centrique) ; s'il est nettement plus court, le chromosome est dit sub-métacentrique. Quand il est encore plus court, le chromosome est appelé acrocentrique. Dans un caryotype, on peut distinguer les différents chromosomes selon deux critères : la taille du chromosome (très grande différence entre les chromosomes 1 et 22) et l'indice centromérique : le rapport entre la longueur du bras court et la longueur totale du chromosome : $p/p+q$. Ces critères de classification permettent de distinguer 7 groupes chromosomes :

Groupe A (chromosomes 1, 2 et 3), Groupe B (chromosomes 4 et 5), Groupe C (chromosomes 6 à 12 + le ou les chromosome(s) X dont la taille est voisine de celle d'un chromosome 6), Groupe D (chromosomes 13, 14 et 15 ou chromosomes acrocentriques), Groupe E (chromosomes 16, 17 et 18), Groupe F (chromosomes 19 et 20), Groupe G (chromosomes 21 et 22 ; les plus petits du caryotype, auxquels on adjoint le chromosome Y). Chez l'individu normal la formule chromosomique s'écrira 46, XX ou 46, XY (**figure 01**).

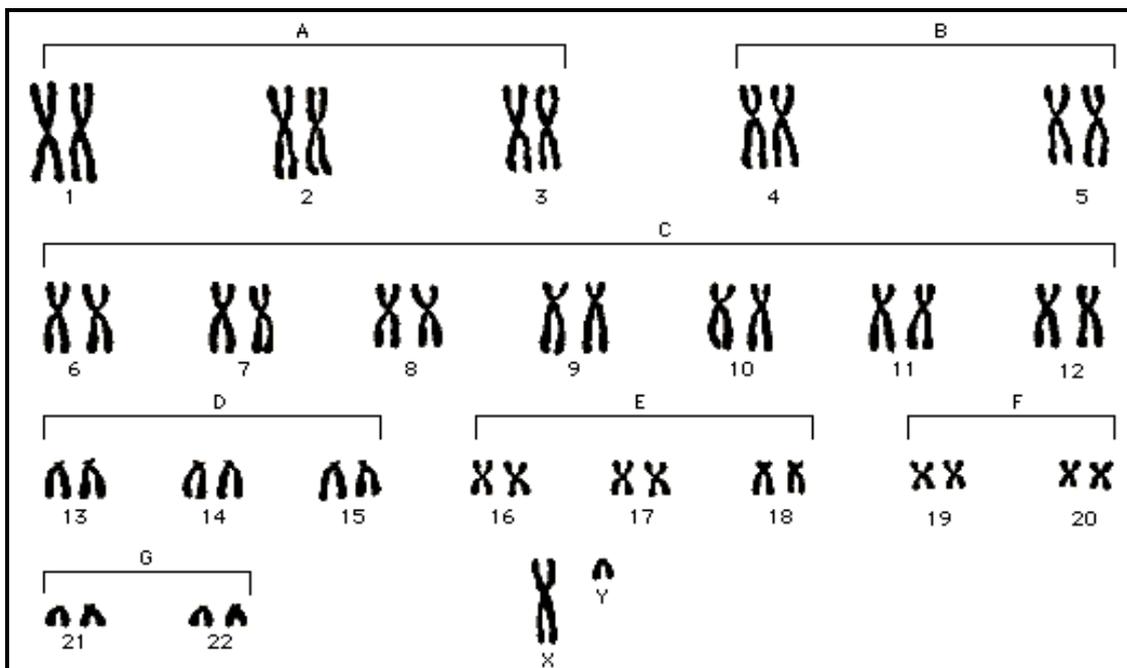


Figure 01 : Caryotype humaine normale (technique de coloration homogène)
(Hamerton, 2013).

En plus de définir spécifiquement chaque chromosome, la coloration en bandes permet de mettre en évidence les anomalies de structure. Les plus utilisées sont les bandes chromosomiques G (G pour Giemsa) et R (R pour Reverse) (**figure 02 et 03**).

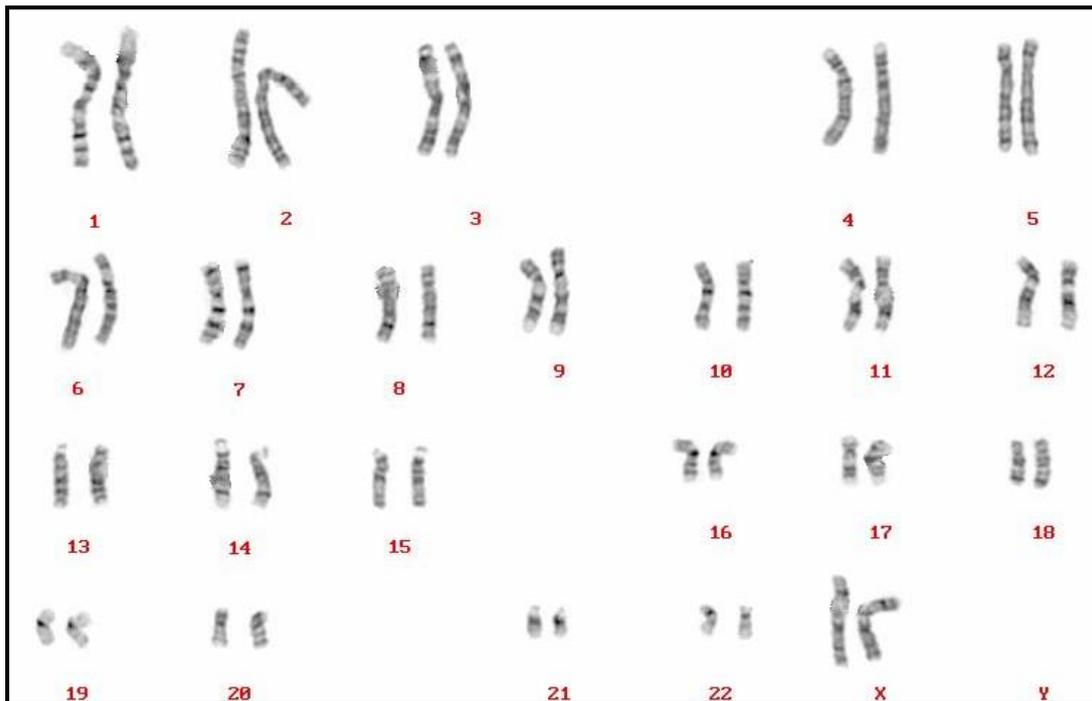


Figure 02 : Caryotype humain normal de sexe féminin en bandes G (Hamerton, 2013).

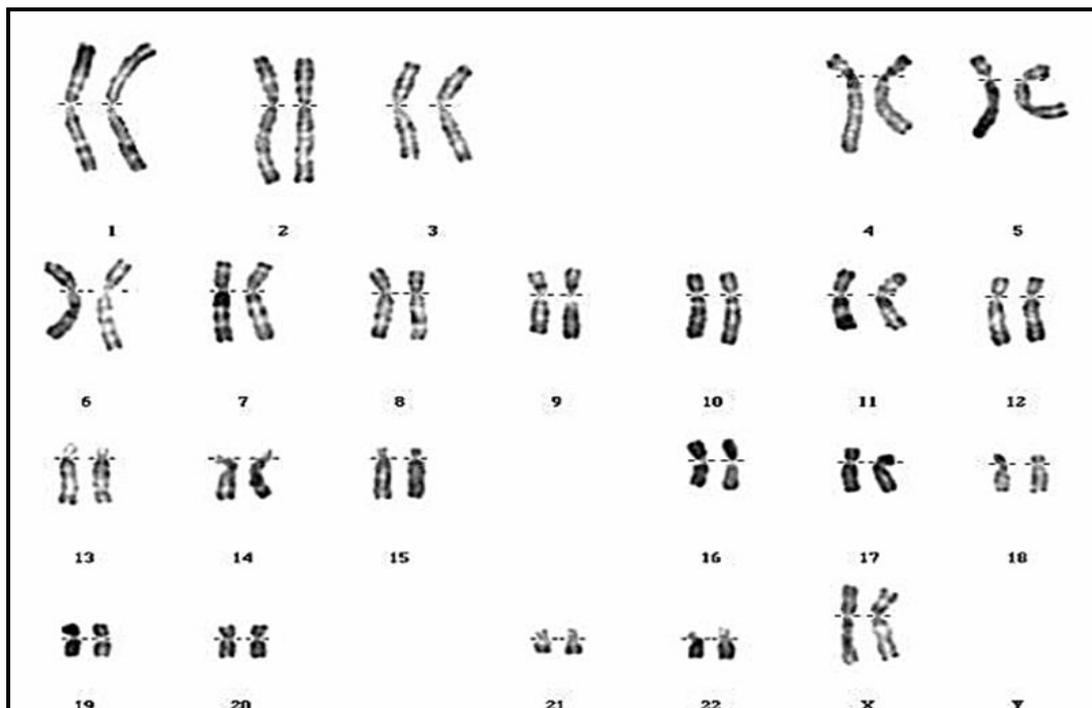


Figure 03 : Caryotype humain normal de sexe féminin en bandes R (Hamerton, 2013).

Le caryotype est la représentation obtenue par microphotographie de l'aspect morphologique de l'ensemble des chromosomes d'une cellule en métaphase obtenu par une des techniques de coloration homogènes ou en bandes chromosomiques utilisées. L'interprétation se fait par une analyse du nombre et de la structure de chaque paire chromosomique en les comparant aux idéogrammes (figure 04).

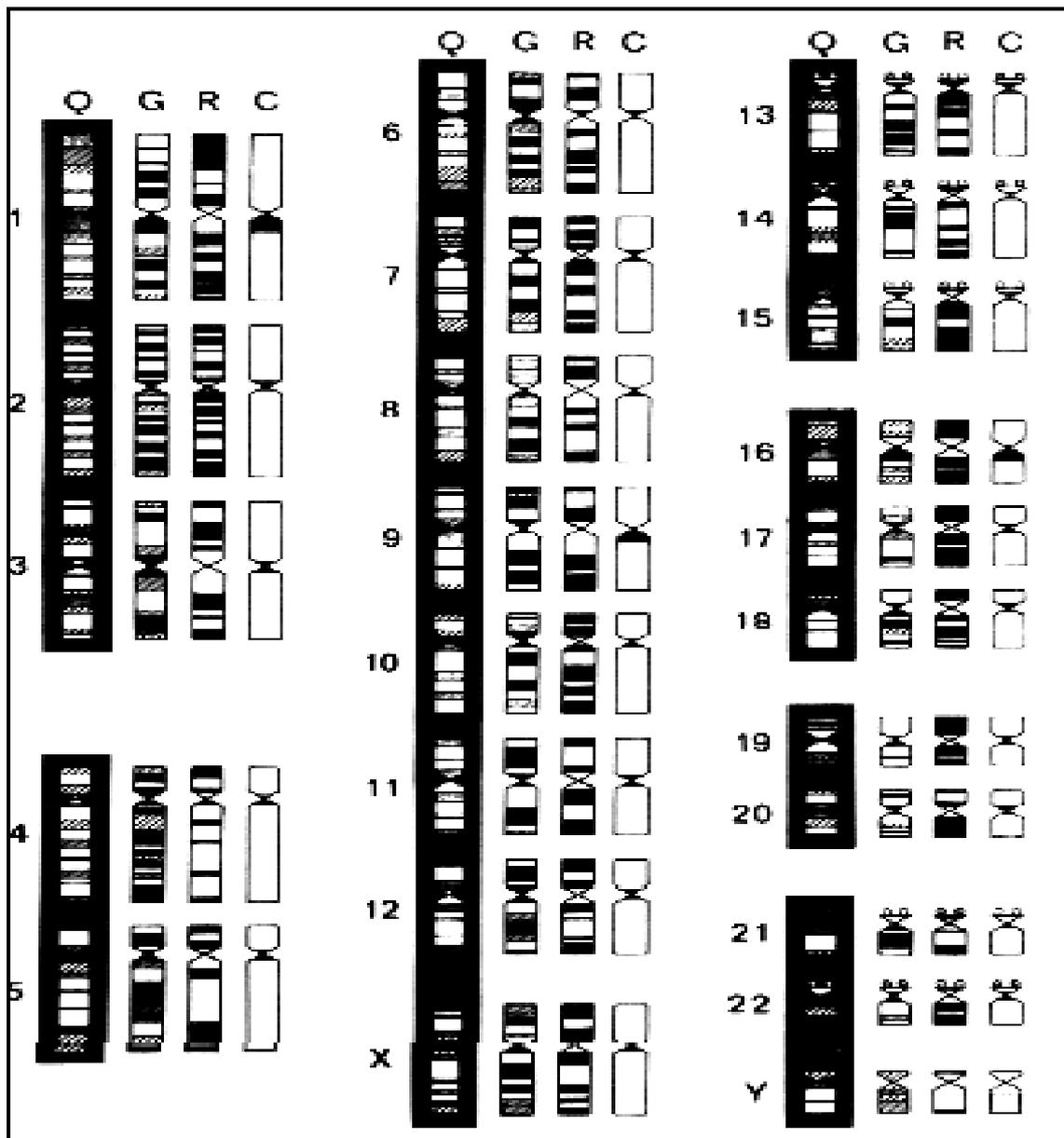


Figure 04 : Idiogramme des différents profils de colorations en bandes utilisés (Shaffer *et al.*, 2013).

Étant l'examen clef de la cytogénétique, c'est aussi le seul examen d'analyse globale du génome permettant la détection des anomalies du nombre et de la structure des chromosomes. Cependant, du fait de sa résolution, cette technique ne détecte pas les déséquilibres génomiques inférieurs à 5 mégabases. En effet, en métaphase, on peut distinguer 400 à 850 bandes (résolution standard) correspondant en moyenne à 5 Mb, suivant le degré de condensation des chromosomes. En prométaphase, lorsque les chromosomes sont encore moins condensés, on peut observer jusqu'à 2000 bandes (haute résolution) correspondant en moyenne à 1,5 Méga bases (Mb). Cependant, la cytogénétique moléculaire permet de dépasser cette limite.

La multiplicité des techniques de banding, la coloration variable en fonction de la technique utilisée ont conduit à la mise en place d'une nomenclature afin de préciser un endroit précis du chromosome sur une bande donnée et ce quel que soit la méthode utilisée. La nomenclature se réfère aux idéogrammes chromosomiques qui sont la représentation schématique du banding chromosomique.

Chaque chromosome est considéré comme étant constitué d'une série continue de bandes et d'interbandes. Par définition une bande est un segment de chromosome différenciable avec précision des segments adjacents par sa coloration plus pâle ou plus sombre après application des techniques de marquage. Une borne (ou « Landmark ») est un trait morphologique permanent et distinct qui est d'une aide importante dans l'identification du chromosome. Les bornes sont : les centromères, les télomères, et certaines bandes caractéristiques. Une région est un segment de chromosome situé entre deux bornes consécutives. Par définition, une bande utilisée comme borne appartient à la région la plus distale et est la première bande de cette région. Les bandes et les régions sont numérotées du centromère vers le télomère. Les bandes peuvent être subdivisées en sous-bandes qui peuvent être subdivisées en sous-sous-bandes. Pour désigner une bande sur un chromosome il faut écrire le numéro du chromosome, le symbole du bras (p ou q), le numéro de la région, le numéro de la bande dans cette région, et éventuellement, le numéro de la sous-bande et celui de la sous-sous-bande. Dans ce cas le numéro de la bande et celui de la sous-bande sont séparés par un point. Par principe, toute numérotation se fait toujours de façon croissante en partant du centromère vers les extrémités télomériques. Le nombre de régions sur chaque chromosome a été fixé au décours de plusieurs conférences internationales de l'International System for Human Cytogenetic (ISCN). Cette nomenclature est régulièrement mise à jour.

Exemple : l'idéogramme du chromosome 3 en bandes G présente : 2 régions sur le bras court numérotées 1 et 2 depuis le centromère jusqu'au télomère et 3 régions sur le bras long numérotées 1, 2 et 3 depuis le centromère jusqu'au télomère. Au niveau de la région 1 du bras long, 3 bandes numérotées de 1 à 3, la bande n° 1 étant la plus proximale par rapport au centromère, la bande n° 3 étant la plus distale par rapport au centromère. Au niveau de la bandes 3 de la première région 3 sous bandes sont numérotées 1, 2 et 3 à partir du centromère vers le télomère (**figure 05**).

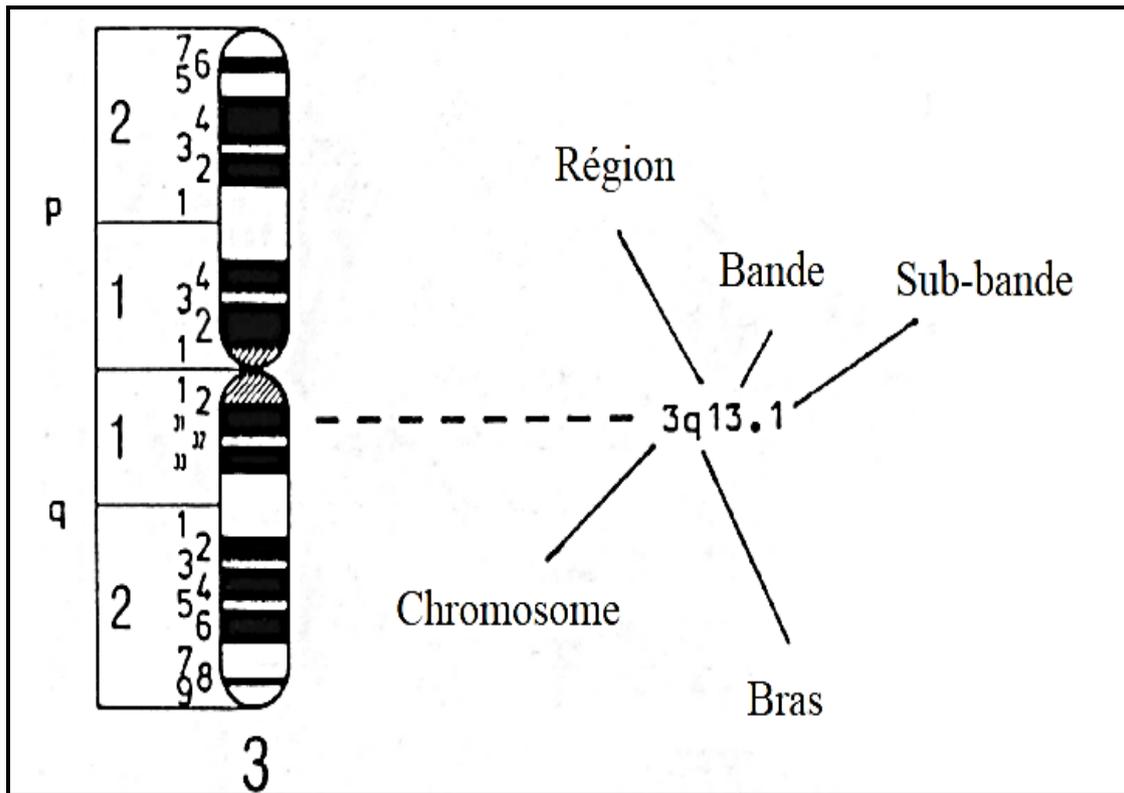


Figure 05 : Idéogramme du chromosome 3 en bandes G en résolution standard (Shaffer *et al.*, 2013).

Pour définir la technique de banding utilisé, nous avons recours à une nomenclature en code avec 3 lettres :

- **1^{ère} lettre** désigne le type de bandes : R, G, C, T ou Q,
- **2^{ème} lettre** désigne le type de dénaturation utilisée : H (Heat) ou T (Trypsine),
- **3^{ème} lettre** indique le colorant utilisé G (Giemsa) ou Q (Quinacrine).

Les plus utilisées :

- **RHG** : Bandes R obtenues par dénaturation thermique et colorées au Giemsa,
- **GTG** : Bandes G obtenues par dénaturation trypsinique et colorées au Giemsa,
- **QFQ** : Bandes Q obtenues par fluorescence et colorées par la Quinacrine.

Chapitre II

Organisation structurelle et
fonctionnelle de la chromatine

La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau. C'est la substance de base des chromosomes eucaryotes. Elle correspond à l'association de l'ADN et de protéines structurales et fonctionnelles spécifiques.

À titre d'exemple, l'ADN contenu dans un noyau d'une cellule humaine est composé d'environ 50 000 gènes, repartis au sein de 23 paires de chromosomes pour un total de 6,4 milliards de paires de bases (pb). L'ADN est une macromolécule de taille conséquente, d'environ 2 mètres de long mis bout à bout, pour 2,50 nm de large, et tout le génie d'une cellule réside dans sa capacité à maintenir une si grande quantité d'ADN au sein de l'espace si restreint d'un noyau cellulaire. Une image couramment utilisée pour se représenter une échelle de taille est que si l'on compare le noyau d'une cellule à une orange, l'ADN replié à l'intérieur peut être assimilé à une pelote d'un long fil de pêche d'environ 20 kilomètres. La cellule doit donc structurer son ADN sans s'emmêler, tout en restant capable d'accéder à n'importe quel moment à l'information codée par un gène précis. Ceci réclame une étroite collaboration entre l'ADN et les protéines structurantes de la chromatine, afin de permettre l'accès en temps voulu à la machinerie cellulaire pour diverses activités telles que la réplication, la transcription, la réparation, etc... On peut donc attribuer deux fonctions à la chromatine :

- **une fonction de compaction de l'ADN** : la chromatine permet en effet la compaction d'un polymère d'ADN d'environ deux mètres, dans un espace nucléaire dont les dimensions ne dépassent pas quelques micromètres dans le cas de l'homme. La chromatine est très organisée dans le noyau, et cette organisation résulte de différents niveaux hiérarchiques de compaction. Deux questions auxquelles on va essayer de répondre dans ce chapitre : comment arriver à ce niveau de compaction ? et comment garder quand même une grande activité en ce qui concerne la réplication, la transcription et la réparation ?
- **une fonction dynamique qui permet la régulation de l'expression des gènes** : des marques apposées sur les histones modifient l'état de compactage de la molécule d'ADN, favorisant ou au contraire limitant l'accessibilité aux gènes.

Quelle est la structure de la chromatine et comment est-elle modulable afin d'apporter une information supplémentaire à celle de l'ADN ?

1- Découverte de la chromatine

La substance nucléaire ou chromatine, a été décrite pour la première fois par *Miescher* en 1869 est nommée ainsi par *Fleming* en 1882. L'étymologie du mot chromatine est « corps colorés ». Elle est disposée dans le noyau de la cellule sous forme de réseaux de filaments enchevêtrés sans organisation apparente. Il semble que ce soit *Sutton* en 1903 et *Boveri* en 1904 qui proposèrent pour la première fois d'associer les gènes aux chromosomes qui deviendraient ainsi supports de l'hérédité. Ces deux chercheurs étaient intrigués par le comportement des chromosomes lors de la mitose décrit par *Flemming* en 1879. Au début de 20^{ème} siècle se développèrent les observations cytologiques par l'utilisation de techniques de colorations spécifiques de la chromatine, dont la première était le Feulgen : immersion dans du HCl suivit d'une coloration par la fuschine, la technique de coloration la plus répandue de la chromatine utilise le Giemsa qui est un mélange de deux colorants : le bleu de méthylène à caractère basique et l'éosine à caractère acide. La chromatine présente également une très grande affinité pour l'hématoxyline qui la colore en noir, le bleu de méthylène en bleu, le bleu de toluidine et pyronine qui lui donne une teinte bleu-violacée.

2- Composition de la chromatine

La chromatine est composée d'acides nucléiques (ADN et ARN) et de protéines. Les protéines sont de deux types : essentiellement les histones à caractère basique, et les protéines non histones dites « acides ». L'ARN est représenté essentiellement par des chaînes d'ARNm naissantes qui sont en transit vers le cytoplasme où ils seront traduits.

2-1- Protéines histones

Petites protéines nucléaires d'environ 120 résidus, à caractère basique riches en acides aminés arginine (R) et en lysine (K) qui représentent plus de 25% de leurs compositions, ils possèdent ainsi de nombreuses chaînes latérales chargées positivement qui se lient aux groupements phosphates de l'ADN chargés négativement ; l'ADN est un polyanion possédant une charge négative globale due à la fonction acide libre de l'acide phosphorique. Leurs poids moléculaires (PM) varient de 11 à 23 kilodaltons (kDa). Cinq classes d'histones ont été caractérisées en fonction de leurs proportions relatives en acides aminés basiques : H1, H2A, H2B, H3 et H4 : H3 et H4 riches en Arginine, H2A et H2B légèrement riches en Lysine et la H1 très riche en Lysine. Récemment, on a pu isoler H5 des érythrocytes aviaires, H6 dans les cellules germinales de poissons, ainsi que de nombreux variantes histones.

Les histones sont les protéines liées à l'ADN les plus abondantes dans les cellules eucaryotes et parmi les protéines connues les plus conservées au cours de l'évolution. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 présentes sont appelées histones majeures, histones cœur, ou réplication dépendante. Cependant, l'histone H1, appelée histone inter-nucléosomale ou histone de liaison, présente des caractéristiques fondamentalement différentes des autres classes d'histones (**tableau II**).

Tableau II : Caractéristiques biochimiques des histones (**Ridgway, 2006**).

Histones	Acides aminés basiques		Acides aminés Acides	Rapport basiques / acides	PM (Da)
	Lysine	Arginine			
H1	29 %	1 %	5 %	5,4	23000
H2A	11 %	9 %	15 %	1,4	13960
H2B	16 %	6 %	13 %	1,7	13774
H3	10 %	13 %	13 %	1,8	15342
H4	11 %	14 %	10 %	2,5	11282

Les histones majeures possèdent un domaine central hydrophobe de repliement caractéristique des histones appelé « motif histone-fold » formé de 70 acides aminés environ. Ce domaine est composé de trois hélices α reliées entre elles par deux boucles L1 et L2, ainsi que de deux queues flexibles aux extrémités N-terminales (N-ter) et C-terminales (C-ter) linéaires dépourvues de structure secondaire. Ce domaine commun à toutes les histones assure leur dimérisation selon une configuration dite en poignée de main (**figure 06**).

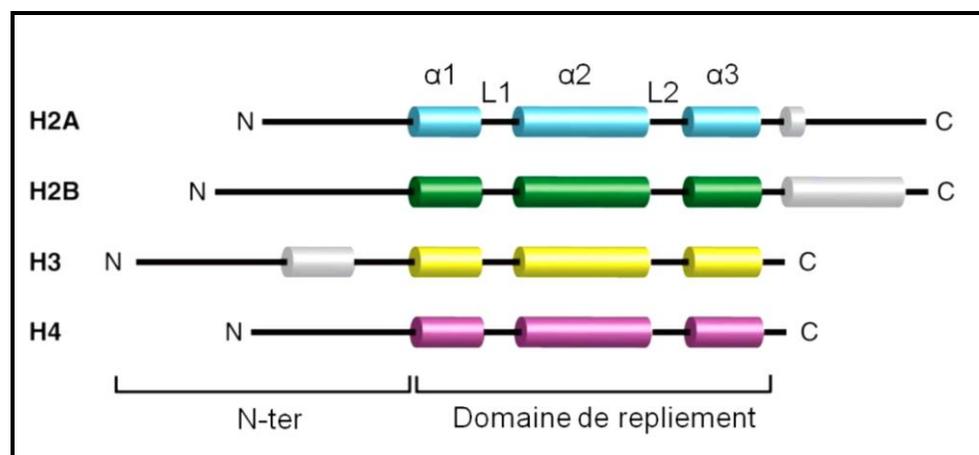


Figure 06 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des histones majeures (**Young, 2014**).

Les histones H3 et H4 sont les protéines les plus conservées au cours de l'évolution chez toutes les espèces eucaryotes. La région la plus conservée de ces histones est leur domaine central. Par contre, les extrémités N-ter et C-ter, sont plus variables et sont dépourvues de structure secondaire. Ces extrémités sont particulièrement riches en résidus lysine et arginine et sujettes à de nombreuses modifications post-traductionnelles. Les H2A et H2B, de structures similaires à H3 et H3, présentent néanmoins des variations interspécifiques non négligeable.

L'histone de liaison H1 présente quant à elle une structure radicalement différente des autres classes d'histones. Elle possède le PM le plus élevé, très riche en lysine ; c'est la plus basique de toute. Elle possède un domaine globulaire hydrophobe GH1 très conservé, aussi appelé « wing hélice », composé de trois hélices α et d'un feuillet β responsable de la liaison à l'ADN. Les extrémités N-ter et C-ter, très peu conservées, sont impliquées dans de nombreuses interactions protéine-protéine. Cette histone, au niveau de ces extrémités, présente des variations importantes entre tissu et espèces. La H1 ne présentent pas d'homologie structurale avec les autres histones et doit son nom du fait qu'elle est associée *in vivo* avec les nucléosomes dans un rapport de 1/1.

Les gènes des histones sont transcrits en phase S du cycle cellulaire de manière synchrone avec la réplication de l'ADN, elle est toujours étroitement couplée avec celle de l'ADN, cette synthèse est rapide puisqu'on ne trouve jamais de segments d'ADN nu au niveau des fourches de réplication : l'inhibition de la synthèse des histones diminue le taux de production de l'ADN et réciproquement.

Les gènes des histones se situent au niveau des chromosomes : 1, 6 et 12, très répétés, de 10 à 1000 copies suivant les espèces, ce qui reflète leurs importances pour la survie de l'organisme. Ces gènes sont regroupés en tandems mais transcrits séparément. La plupart des gènes des histones sont sans introns et leurs ARNm ne portent pas de queue de poly A.

2-2- Variants histones

Les histones font partie des protéines les mieux conservées au cours de l'évolution. Étant codées par de multiples allèles, les histones possèdent de nombreux variants définis comme étant des isoformes non-alléliques d'une histone canonique (dite aussi typique) qui diffèrent par leurs séquences. Il existe plusieurs variants différents pour chaque sous-type d'histone, excepté pour l'histone H4. Actuellement, ce ne sont pas moins de 55 variants uniques d'histones qui ont été décrits chez l'Homme.

Les histones sont ainsi classées en deux groupes majeurs : les histones canoniques et les variants d'histones, encore appelés histones de remplacement. Au-delà de leur séquence en acide aminés, la distinction entre ces deux groupes se fait selon que leur incorporation au sein de la chromatine est dépendante ou non de la réplication de l'ADN. Les histones canoniques sont exclusivement exprimées au cours de la phase S du cycle cellulaire et incorporées dans la chromatine pour répondre à un besoin important en histones lors de la réplication de l'ADN. Les variants d'histones peuvent, quant à eux, être synthétisés tout au long du cycle cellulaire et sont, la plupart du temps, incorporés dans la chromatine indépendamment de la synthèse d'ADN. Par ailleurs, les pré-ARNm des variants d'histones sont polyadénylés et contiennent des introns et des exons. De plus, il est important de noter qu'il existe des isoformes canoniques d'histones H2A, H2B, H3 et H1 qui ne diffèrent parfois que d'un seul acide aminé.

L'incorporation des différents variants d'histones a une répercussion directe sur les interactions entre histones au sein des nucléosomes. Ce phénomène peut influencer la stabilité des nucléosomes et avoir des conséquences sur la conformation de la chromatine, et sur sa perméabilité à la transcription. Certains variants jouent même directement un rôle dans divers processus cellulaires (mitose, réparation de l'ADN, etc.). Par conséquent, le remplacement des histones canoniques par des variants d'histones représente à lui seul un niveau d'information épigénétique. Des variants d'histones ont été découverts chez plusieurs espèces eucaryotes, différant de façon plus ou moins importantes des protéines histones conventionnelles au niveau de leurs séquences mais également dans leur assemblage au sein des nucléosomes. Ces différences ont une répercussion au niveau de la fonction de ces variants, et présentent des rôles spécifiques dans de nombreux processus biologiques, tels que l'organisation centromérique (H3 CenpA), la réparation de l'ADN, l'inactivation du chromosome X (macro-H2A) ou encore la transcription.

2-3- Protéines non histones

Sous l'appellation générique de protéines non histones, dite aussi protéines « acides » on regroupe toutes les protéines nucléaires à l'exception des histones. Il en existe plusieurs et jouent de nombreux rôles :

- protéines de structure contribuant à la formation du squelette chromosomique.
- protéines intervenant dans la réplication de l'ADN, sa transcription et sa réparation.
- protéines qui forment les facteurs d'assemblage et de remodelage de la chromatine à l'instar des protéines chaperonnes.

3- Structure de la chromatine

L'ADN contenu dans le noyau est fortement compacté. Cette compaction de l'ADN résulte de plusieurs niveaux d'organisation. Le premier niveau de repliement est fourni par la double hélice d'ADN elle-même. Puis, l'enroulement de l'ADN autour d'un cœur protéique va constituer ce que l'on appelle un nucléosome. La répétition de cette structure tout au long de l'ADN donnera à la chromatine l'aspect d'un « collier de perles » d'une épaisseur de 11 nm. Dans un second temps, cette fibre de 11 nm se replie pour adopter une structure en hélice de 30 nm de diamètre. Enfin, elle est à son tour repliée en une fibre de 300 nm pour constituer des domaines en boucles de 15 000 à 100 000 pb. Au cours de la mitose et de la méiose, il existe transitoirement un niveau extrême de compaction, les chromosomes. Ils sont tellement condensés qu'on peut étudier leur morphologie au microscope optique.

3-1- Nucléosome et la fibre F10

La chromatine est constituée de particules régulièrement espacées appelées nucléosomes. L'existence de cette unité fondamentale a été décelée dans les années 1970, suite à la digestion de l'ADN par des nucléases et l'obtention de fragments résiduels d'environ 200 pb et leurs multiples et ne sont pas obtenus lorsque la même expérience est effectuée sur de l'ADN purifié. Ceci a permis de proposer qu'il existe, au sein du noyau, une unité structurale de base. Cette interprétation a été largement confortée par des observations de microscopie électronique. Une digestion plus fine permet d'isoler un complexe de 200 kDa, composé d'ADN et de protéines. Peu de temps après, l'enchaînement des nucléosomes en dont l'aspect rappelle celui d'un chapelet a pu être visualisé grâce au progrès de la microscopie électronique en 1974. La même année, *Kornberg* proposera l'existence d'une unité de base au sein du noyau, de deux cents paires de base d'ADN complexées avec 4 paires d'histones, ce que *Chambon* appellera en 1975 le nucléosome (**figure 07**).

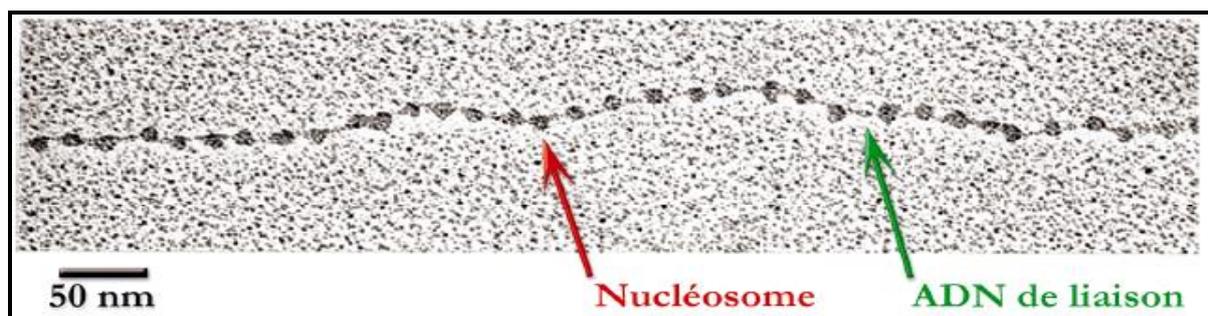


Figure 07 : Cliché en microscopie électronique du nucléo-filament (*Adkins, 2004*).

Un nucléosome est composé d'une particule cœur et une région de liaison appelée région inter-nucléosomale ou ADN linker qui relie les particules cœurs adjacentes. La particule cœur dont la structure est très conservée parmi les espèces, est composée de 146 pb d'ADN enroulés selon environ 2 tours (1,7 plus exactement) autour d'un octamère protéique formant deux disques arrangés en parallèles comprenant chacun des histones H3, H4, H2A et H2B ; la molécule d'histone H1 est placée à l'extérieur et joue le rôle de socle. La longueur de région inter-nucléosomale varie de 8 à 116 pb selon les espèces ; elle est de 60 pour l'humain.

Le nucléosome ainsi formé est maintenu par un jeu d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogènes entre les groupements phosphate de l'ADN et les histones, et par des contacts non polaires avec le sucre désoxyribose de l'ADN et les histones. Comme aucun contact direct n'existe entre les bases azotées et les histones, le nucléosome ne présente aucune spécificité à la séquence d'ADN.

Cette structure a un diamètre de l'ordre de 11 nm, c'est le premier niveau d'organisation de la chromatine à l'intérieur du noyau et qu'on appelle : Fibre de 10 nm ou F10. Cette organisation qui provoque une compaction de l'ADN selon un facteur 7 : une structure condensée ainsi va se retrouver à 7 fois moins sa longueur initiale (**figures 08 et 09**).

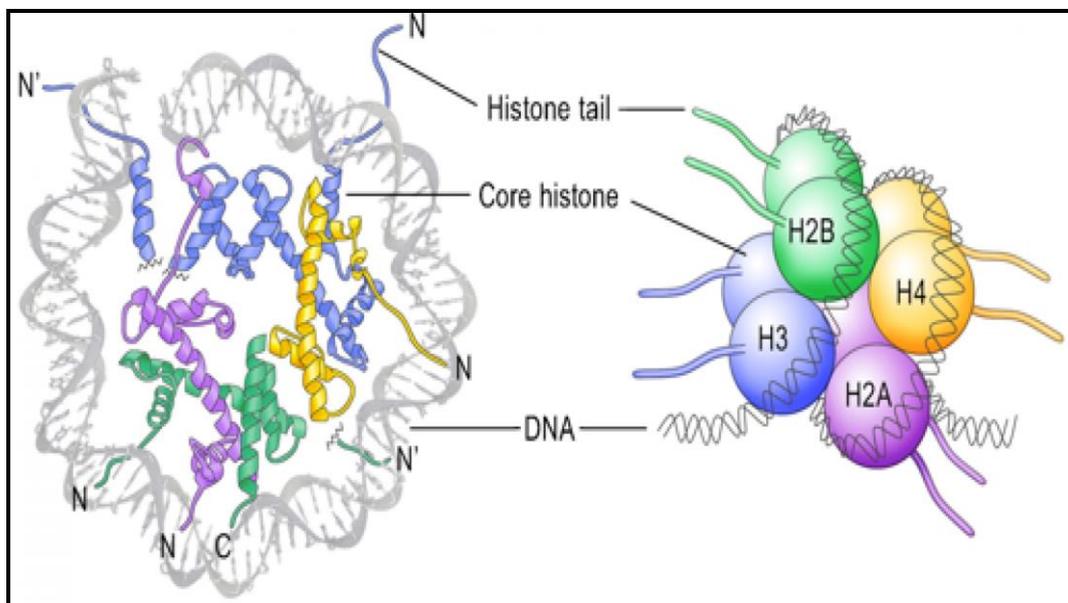


Figure 08 : Structure de l'histone cœur du nucléosome (Ridgway, 2006).

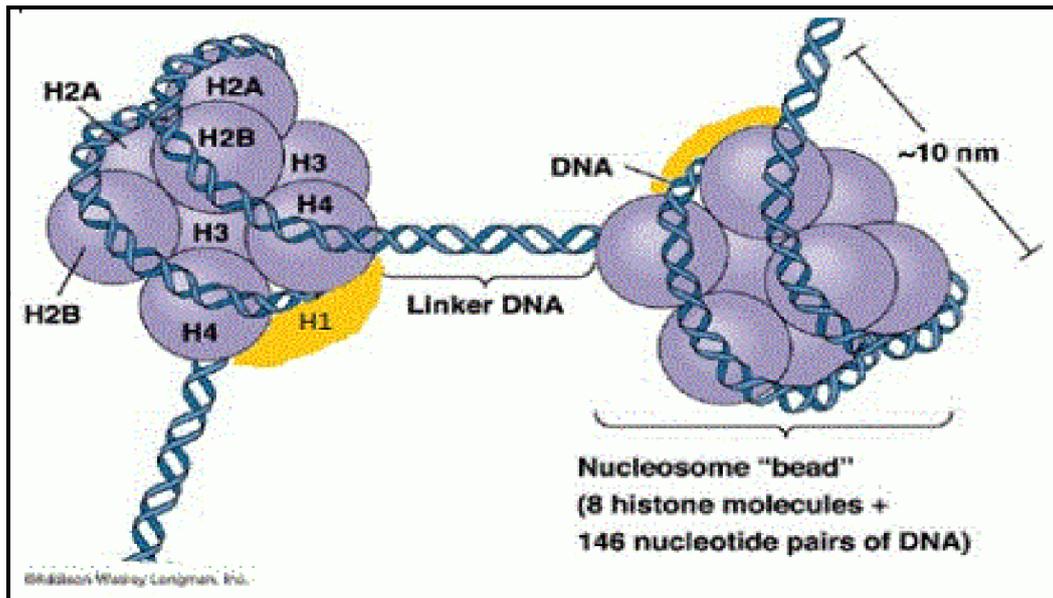


Figure 09 : Structure du nucléosome et de la fibre F10 (Young, 2014).

Il est important de signaler que l'histone de liaison H1 n'intervient pas dans la formation de la sous-unité fondamentale de la chromatine. Cependant, avec des protéines non histones, elles peuvent interagir avec les nucléosomes pour former des structures de plus haut degré d'enroulement.

3-2- Fibre F30

Les niveaux supérieurs d'organisation des fibres de chromatine ont été visualisés dans différentes conditions salines. À une force saline basse, la chromatine se structure en collier de perles. À une force saline plus élevée (100 mM NaCl), elle forme un cylindre irrégulier d'environ 30 nm de large, communément appelé fibre de 30 nm ou F30.

La F10 présente une structure secondaire enroulée. Chaque tour comprend environ 6 nucléosomes ce qui correspond à un facteur de condensation d'environ 40 : chaque μm le long de l'axe de la fibre contient 40 μm d'ADN. Dans cette fibre, les nucléosomes s'enroulent de façon hélicoïdale en une structure appelée solénoïde ; c'est le deuxième niveau de compaction de la chromatine. Pour cette fibre, deux modèles sont actuellement discutés : le premier dit en solénoïde, décrit précédemment, et qui le plus largement accepté. Le deuxième modèle dit en Zig-Zag (**figure 10 et 11**).

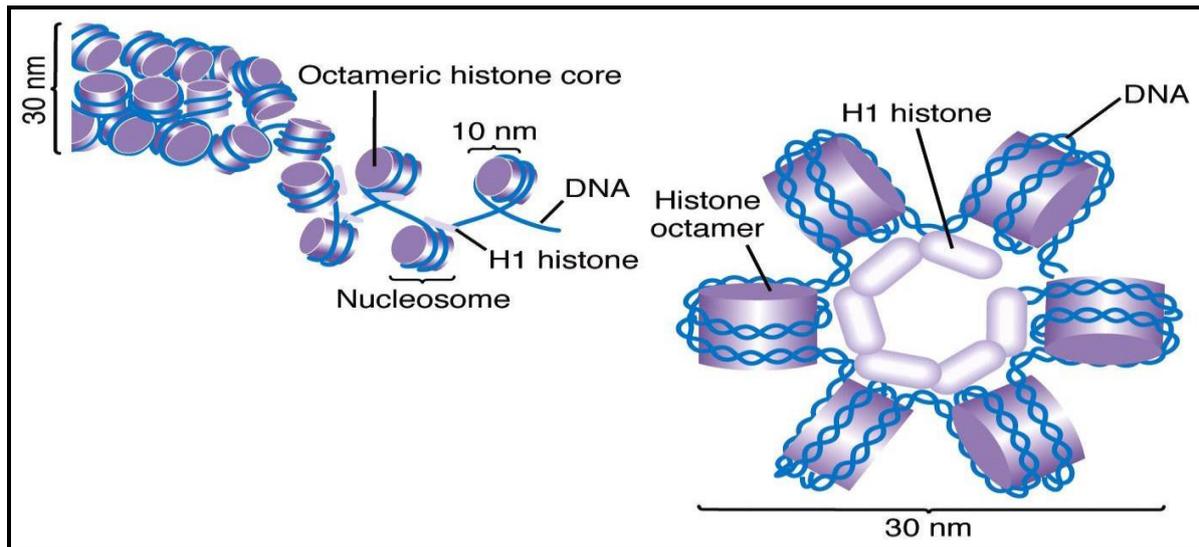


Figure 10 : Passage de la F10 à la F30 (Ridgway, 2006).

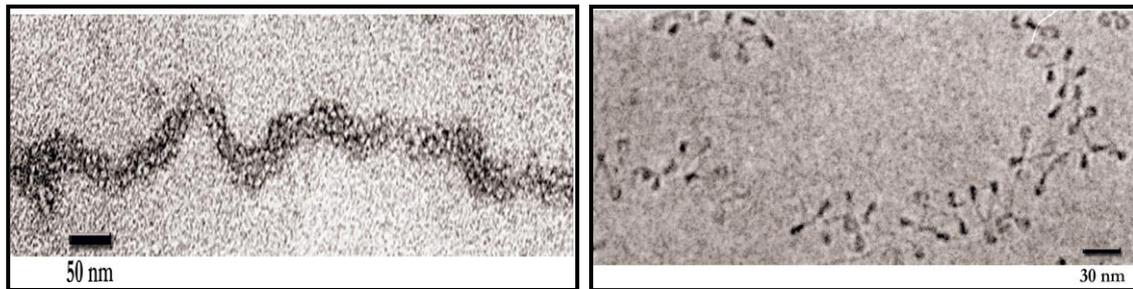


Figure 11 : Modèles de structure de la F30 (Adkins, 2004).

À gauche, un cliché en microscopie électronique de la fibre de 30 nm à salinité physiologique (solénoïde). À droite, un cliché en cryo-microscopie électronique à 5 mM d'ion monovalent.

Dans leur modèle dit de solénoïde, les nucléosomes consécutifs se localisent les uns à proximité des autres dans la fibre, formant une hélice simple. Depuis, cette fibre de 30 nm a été observée par microscopie électronique par de nombreux groupes, mais sa structure intrinsèque est encore débattue. Dans ce second modèle, les nucléosomes sont arrangés en Zig-Zag entre eux, de sorte à former une hélice double brin dont chaque nucléosome se retrouve à proximité du nucléosome.

3-3- Boucles chromatiniennes

La F30 peut également se replier et former des structures dont la topologie est encore moins bien décrite. Ces repliements d'ordre supérieur forment ce que l'on appelle l'organisation à grande échelle de la chromatine, qui repose sur la formation de boucles géantes de chromatine.

Le troisième niveau de compaction est assuré par le repliement de la fibre de 30 nm en boucles, ou domaines topologiques fermés, d'un diamètre de 250 à 300 nm environ, et contenant de l'ordre de 40 à 100 kb d'ADN, ces supers-tours apparaissent sous microscope électronique ancrés autour d'une partie centrale appelée armature ou matrice nucléaire, formée de protéines non histones. De cette armature protéique partent des boucles d'ADN, les fibres formants ces boucles sont les solénoïdes. La compaction atteint un facteur 1 000. Chaque boucle d'ADN commence et finit au niveau de l'armature, cette dernière est constituée en grande partie de protéines non-histones. Les boucles sont fixées à l'armature au niveau de régions spéciales le long de l'ADN appelées : région de liaison à l'armature ; SAR (Scaffold Attachment Region). Ces régions sont riches en AT et correspondent fréquemment à des fragments d'ADN courbés sujets à des ouvertures locales de la double hélice (comme les origines de réplication) (**figure 12**).

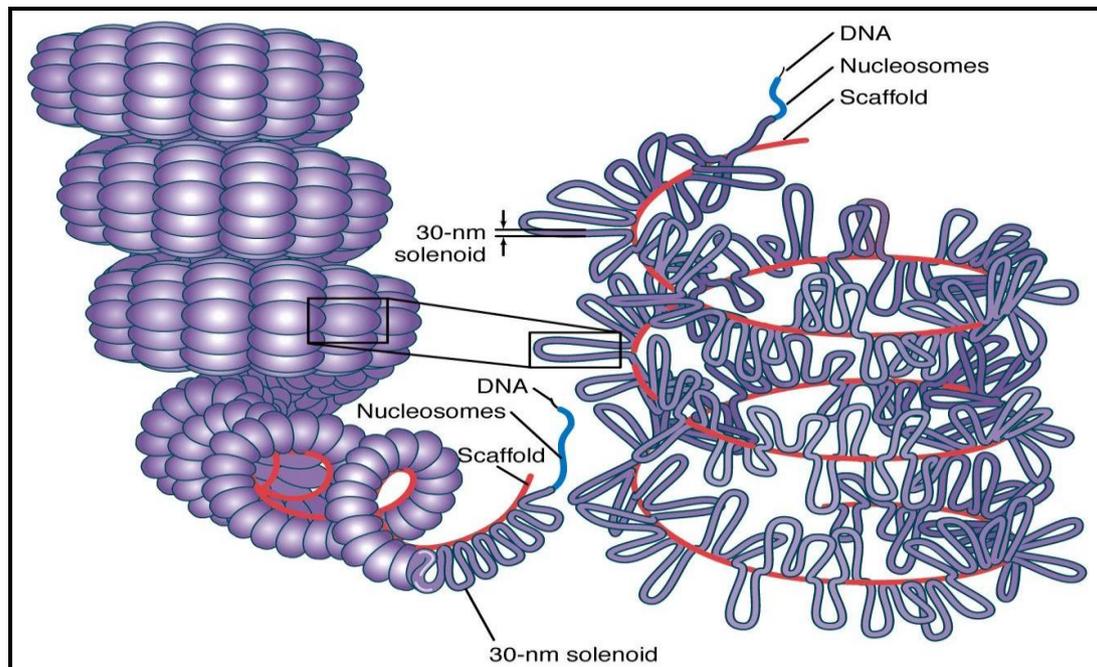


Figure 12 : Représentation schématique de la structure en boucles (**Ridgway, 2006**).

3-4- Quatrième niveau de condensation

Enfin, un quatrième niveau de compaction correspond à l'enroulement des boucles en une hélice de l'ordre de 700 à 850 nm de diamètre qui constitue un chromatide. Le degré de compaction total de l'ADN atteint ainsi plus de 10 000 dans la chromatine condensée. Le chromosome métaphasique observé en mitose représente le niveau de compaction maximal et est capable d'être à la fois résistant, maniable et compact pour assurer une bonne ségrégation du matériel génétique (**figure 13**).

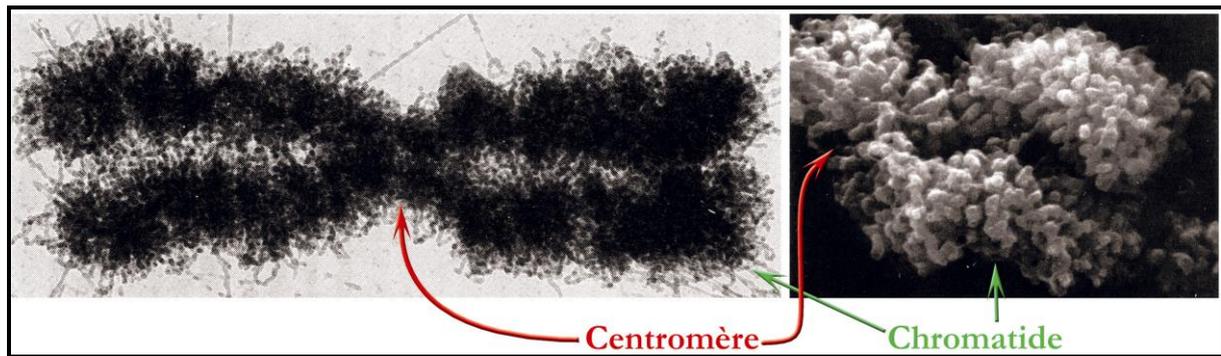


Figure 13 : Cliché microscopie électronique d'un chromosome métaphasique (Adkins, 2004).

4- Différentes étapes de condensation de la chromatine

Le facteur de condensation général du matériel génétique suggère d'emblée que l'ADN ne peut être condensé directement dans la structure finale de la chromatine. Une hiérarchie au sein de l'organisation doit exister. L'assemblage de l'ADN en chromatine comprend plusieurs étapes successives initiées dès la réplication et qui commencent par la formation de la sous-unité fondamentale, le nucléosome, pour aboutir à des niveaux de compaction supérieurs organisés en domaines spécifiques dans le noyau.

La formation de la chromatine peut se découper en deux étapes principales : l'assemblage du nucléosome et la formation de la F10 et la F30, processus qui ne nécessitent pas l'hydrolyse de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) (ATP-indépendant), puis l'organisation en structures de plus en plus compacte (supertours et boucles) par des processus qui mettent en jeu l'hydrolyse de l'ATP (ATP-dépendant), il s'agit du remodelage de la chromatine.

4-1- Assemblage du nucléosome et formation de la F10

L'assemblage du nucléosome s'effectue grâce à des facteurs d'assemblage de la chromatine qui fonctionnent en coordination avec des protéines chaperonnes qui accompagnent les histones jusqu'à leur dépôt sur l'ADN. Selon le modèle généralement admis, l'assemblage du nucléosome se déroule en deux étapes : un tétramère d'histones H3 et H4 est d'abord déposé sur l'ADN nouvellement répliqué, puis c'est le tour des deux dimères de type H2A-H2B. Ces deux étapes sont sous le contrôle du même facteur d'assemblage de la chromatine CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1). Le couplage avec la réplication se ferait par le recrutement de CAF1 au niveau de la fourche de réplication par le facteur PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) : complexe protéique joue le rôle d'une pince glissant le long de l'ADN et de facteur de progressivité de l'ADN polymérase.

La première étape est assistée par une chaperonne d'histone ASF1 (Anti-Silencing Function 1) quant au dépôt des histones H2A et H2B est assisté par le facteur NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1). Enfin, l'assemblage du nucléosome se termine par l'addition d'une histone H1 aux brins entrants et sortants de l'ADN entourant l'octamère. Le nucléosome est alors formé. La F30 est formé par l'enroulement spontanée de la F10 sous l'effet du fort caractère basique de la H1. Cette F30 peut subir des compactions supplémentaires pour atteindre le repliement des chromosomes mitotiques. La structure précise de ces formes compactes de la chromatine n'est pas connue. Néanmoins, des facteurs de remodelage ATP-dépendant sont impliqués.

4-2- Formation des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine

L'utilisation de la microscopie électronique a permis d'obtenir les premières informations sur l'architecture interne du chromosome métaphasique. Après extraction des histones par une solution de forte force ionique très riche en polyanions, on observe un halo de boucles d'ADN organisées en F30, super-enroulées en périphérie d'un résidu protéique appelé « matrice nucléaire » ou « squelette chromosomique » central ayant grossièrement la forme du chromosome métaphasique. Ces boucles représentent environ 100 kb d'ADN et correspondent aux rosettes de la fibre de 30 nm, insérées par leur base dans la structure protéique centrale au niveau des SAR. En faisant varier les conditions ioniques du milieu, on observe des variations morphologiques du squelette protéique, qui s'étire ou se contracte de façon réversible (**figure 14**).

Deux principales protéines constituent le squelette interne du chromosome : la topoisomérase II et les condensines I et II.

La Topoisomérase est une protéine qui présente une dualité fonctionnelle : de structure, elle fait partie des composants du squelette chromosomique, enzymatique car elle permet de supprimer les supertours positifs créés par l'ouverture localisée de la double hélice. Cette fonctionnalité est essentielle pour permettre une séparation correcte des deux chromatides sœurs pendant l'étape de condensation des chromatides en prophase. L'invalidation du gène de la Topoisomérase II se traduit alors par un défaut de condensation de la chromatine, qui survient de façon imparfaite et incomplète. Cette suppression a pour conséquence une séparation incomplète des deux lots chromosomiques en anaphase et la persistance de masse de chromatine au niveau du plan de division cellulaire. Cette protéine n'est cependant pas un composant fixe de l'axe protéique, elle en constitue au contraire un élément dynamique en renouvellement permanent.

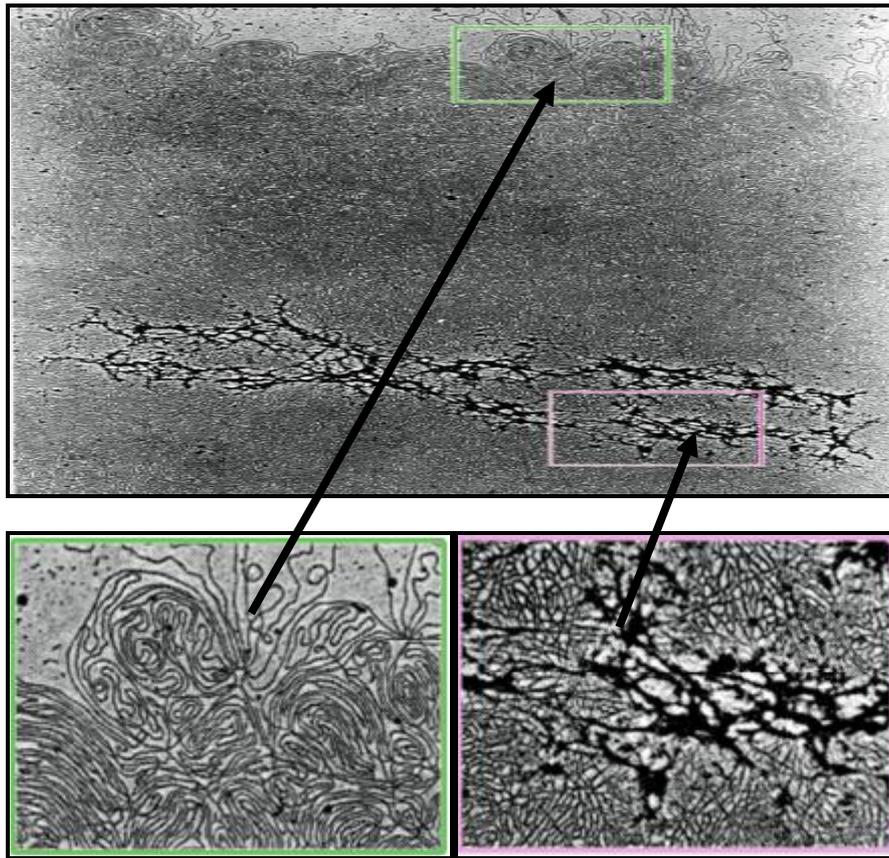


Figure 14 : Modèle d'organisation du chromosome (Adkins, 2004).

Cliché en microscopie électronique d'un chromosome mitotique dont les histones ont été enlevées. Les zones, encadrées en bas de la figure, correspondent à des agrandissements des zones de la même figure. Des boucles d'ADN d'environ 50 à 100 kb (à gauche) sont reliées à une structure d'apparence squelettique (à droite) formée de protéines non-histones.

Le deuxième constituant essentiel de l'axe chromosomique est la condensine, dont il existe deux sous types : I et II. Ces protéines sont en fait des complexes multiprotéiques associant 2 sous unités SMC (SMC2 et SMC 4 pour Structural Maintenance of Chromosome) et 3 sous unités non SMC (CAP H/H2, CAP D2/D3, CAP G/G2). Les deux sous unités SMC s'associent pour former un V porteur d'un site de fixation pour l'ATP à l'extrémité de chacune des deux branches. Les sous-unités non SMC permettent de contrôler l'ouverture de la pince constituée par les deux protéines SMC. Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, les condensines ont la capacité de se lier à l'ADN et de générer des supertours et des boucles, ce qui entraîne une condensation de la chromatine (**figure 15**).

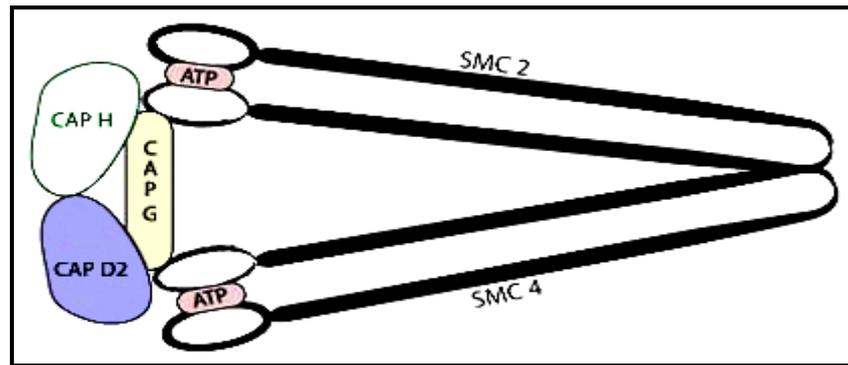


Figure 15 : Représentation schématique de structure des condensines (Becker, 2002).

Le rôle exact des deux sous-types condensine I et II n'est pas clairement identifié, mais il semble que la condensine II intervienne en premier dans les étapes précoces de la condensation, alors que la condensine I interviendrait plus tard pour stabiliser la chromatine dans cet état compacté. De manière surprenante au regard du rôle présumé des condensines, leur inactivation n'entraîne pas une abolition de la compaction, qui survient malgré tout mais de façon retardée et incomplète. Cette compaction imparfaite entraîne cependant une morphologie anormale des chromosomes en raison d'une désorganisation de l'axe protéique des chromatides, ainsi qu'une ségrégation anormale en raison de masses chromatiniennes persistantes au niveau de la plaque équatoriale en fin d'anaphase.

Un dernier type de protéine ne faisant pas partie du squelette protéique, joue néanmoins un rôle fondamental dans la structure et la physiologie du chromosome métaphasique : il s'agit des cohésines. Ces protéines appartiennent à la même famille que les condensines et ont une structure semblable, constituées de 4 sous-unités spécifiques (2 sous unités SMC1 et 3, et deux sous unités non SMC), RAD21 (REC8 pour les Cohésines méiotiques) et SA1. Les cohésines sont associées à la chromatine pendant la phase S, au moment de la réplication de l'ADN et servent à maintenir ensemble les deux chromatides sœurs jusqu'à leur séparation.

La topoisomérase II et condensine II sont présentes pendant l'interphase dans le noyau. En revanche, la condensine I a une localisation cytoplasmique et ne peut s'associer aux chromosomes qu'après la disparition de l'enveloppe nucléaire. En début de prophase, on observe une phosphorylation de la topoisomérase II et de la condensine II entraînant leur association avec la périphérie de la chromatine en cours de compaction. Cette association permet un premier niveau de compaction de la fibre de 30 nm pour aboutir à une fibre de 200 à 250 nm de diamètre. Puis, un deuxième niveau de compaction apparaît en fin de prophase suite à la réorganisation des protéines de structures qui deviennent axiales et assurent la stabilisation de l'enroulement de la fibre de 250 nm en une fibre de 700 nm.

La condensine I semble jouer un rôle prépondérant dans la stabilisation finale de la structure du chromosome. Un point essentiel de cette architecture chromosomique est son caractère dynamique, caractérisée par un flux permanent de protéines qui s'associent et se dissocient.

5- Territoires chromatiniens

Exception faite de la mitose où elle existe sous forme de chromosomes individuels compactés, la chromatine est diffuse dans le noyau. Elle apparaît sous forme de régions plus ou moins condensées et cet arrangement en compartiments distincts influence les activités fonctionnelles du noyau. Ainsi, la chromatine n'est pas organisée de manière chaotique au sein du noyau, bien au contraire, cette structure est hautement régulée.

En 1928, basé sur des observations exclusivement histologiques, *Heitz* remarqua « l'existence de deux régions contiguës dans le noyau interphasique, mais non délimitées, présentant des affinités tinctoriales distinctes ». En effet, cette différence de coloration est due au fait que certaines zones du noyau cellulaire qui sont plus condensées que d'autres. Il a introduit le terme d'euchromatine (dite active), représentant la chromatine lâche, et d'hétérochromatine (dite inerte), représentant les zones plus denses et compactes : ces deux types de chromatine dans les cellules eucaryotes présentant des critères structuraux et fonctionnels différents. Par la suite, l'euchromatine a été décrite comme associée à une transcription active des gènes, alors que la transcription est majoritairement réprimée au sein de l'hétérochromatine. Il a été communément admis depuis un certain nombre d'années que l'euchromatine, contiendrait des gènes particulièrement actifs, contrairement à l'hétérochromatine qui serait de la chromatine transcriptionnellement inactive. En fait, cette idée est une simplification de la réalité.

Le degré de condensation de la chromatine varie au cours du cycle cellulaire. Pendant l'interphase, l'euchromatine est assez bien décondensée et dispersée dans tout le volume du noyau. Durant cette phase du cycle cellulaire, les gènes sont transcrits et l'ADN se réplique. Une partie de la chromatine interphasique conserve un état très condensé, c'est l'hétérochromatine. Elle échappe à la transcription et contient des séquences d'ADN non codantes, hautement répétitives comme celles que l'on trouve au niveau des centromères et des télomères.

Dans les cellules somatiques, on peut distinguer également, au cours de l'interphase, les zones de réplication précoce correspondant à l'euchromatine, et celles de la réplication tardive qui concernent l'hétérochromatine : c'est ce qu'on appelle le profil répliatif.

On distingue deux sous-catégories d'hétérochromatine, en fonction de leur stabilité : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative.

- Toutes les cellules d'une même espèce vont regrouper des régions similaires de l'ADN sous la forme d'une hétérochromatine constitutive. Par exemple, pour l'Homme, les chromosomes 1, 9, 16 et Y contiennent de larges régions d'hétérochromatine constitutive, majoritairement réprimées. Cette hétérochromatine constitutive est généralement constituée de séquences répétées, et semble jouer un rôle préférentiel de structuration de régions telles que les centromères et télomères. Elle peut également avoir un impact direct sur l'expression des gènes à proximité, en les réprimant plus ou moins en fonction de la propagation de l'hétérochromatine.
- L'hétérochromatine facultative quant à elle n'est pas répétée, et peut structurer des régions d'ADN différentes au sein de cellules d'une même espèce. Bien qu'elle partage la même structure compactée que l'hétérochromatine constitutive, elle peut se décondenser sous certaines conditions et permettre ainsi la transcription de gènes normalement réprimés. La formation de l'hétérochromatine est un moyen de réprimer spécifiquement certaines régions du génome, et participe ainsi à l'élaboration d'un programme génétique propre à chaque cellule. Cette organisation de la chromatine est donc extrêmement régulée et fait appel à de nombreux acteurs épigénétiques. Le meilleur exemple est le chromosome X inactif chez la femelle des mammifères, on peut l'observer sous forme d'un point dense dans le noyau interphasique appelé : corps de Barr (**figure 16**).

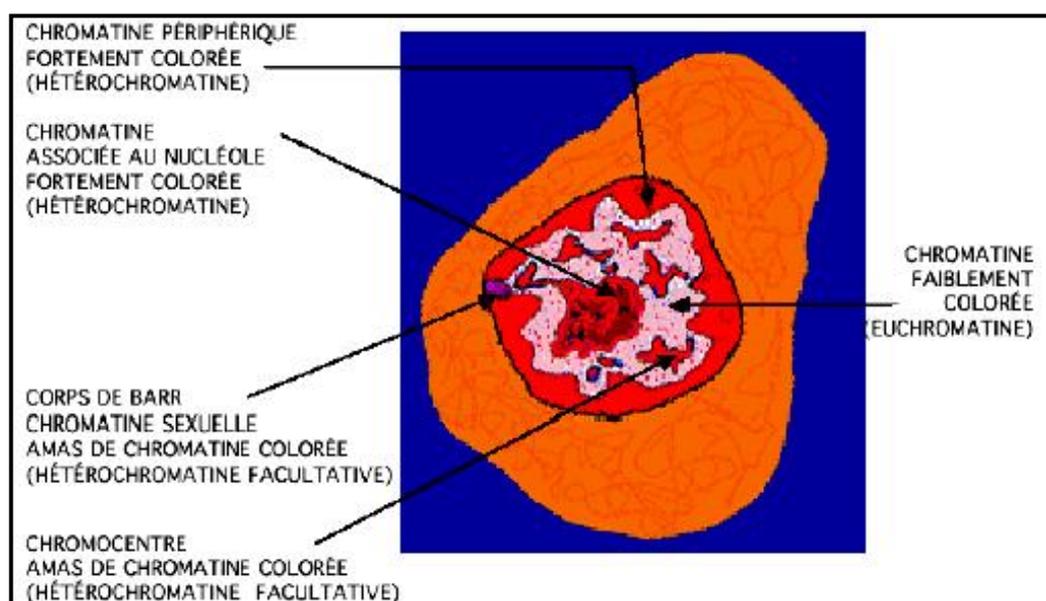


Figure 16 : Représentation schématique du noyau coloré au Feulgen (Baxter, 2002).

Chapitre III

Structures chromosomiques spécialisées

Le noyau des cellules est une structure très organisée, dont l'agencement joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. La compréhension des mécanismes à l'origine de cette organisation est donc essentielle à la compréhension du fonctionnement des génomes. Malgré les progrès réalisés par les techniques d'imagerie et d'analyse biochimique, la structure du chromosome métaphasique reste dans une large mesure inconnue. Une partie de la difficulté qu'il y a à comprendre son architecture est liée au fait qu'il s'agit d'une structure dynamique, transitoire, qui nécessite donc d'être bloquée à un moment précis pour être analysée. Mais dans le même temps où l'on fige un chromosome par une technique d'analyse, on prend le risque d'en modifier la structure. De ce point de vue, le chromosome au sens microscopique n'est donc pas un élément stable de la cellule mais une structure dynamique et transitoire.

1- Télomères des eucaryotes supérieurs

1-1- Historique et définition

Le terme de télomère, du grec *telos* (fin) et *meros* (partie), a été introduit par *Muller* en 1938. Il désigne actuellement des structures nucléoprotéiques spécialisées localisées aux extrémités des chromosomes linéaires eucaryotes, nécessaires à leur stabilité et à leur réplication. La notion de télomère est apparue à la fin des années 1930s à partir de travaux menés sur la drosophile par *Muller* et le maïs par *McClintock*, 1941 qui ont remarqué que les extrémités des chromosomes ayant subi des cassures, induites par les UV, fusionnaient entre elles, aboutissant ainsi à la fusion de deux chromosomes ou la re-circularisation du chromosome, alors que les extrémités chromosomiques naturelles ne fusionnaient pas.

Ensuite, il a été observé par *Watson* en 1972 que, du fait du mode semi-conservatif de la réplication de l'ADN, une molécule d'ADN linéaire est incomplètement répliquée et se raccourcit à chaque cycle de réplication. Ce problème de réplication des extrémités a été mis en avant pour expliquer le nombre limité de divisions des cellules en culture par *Hayflick* en 1965. Les liens entre raccourcissement télomérique et sénescence (vieillesse cellulaire) ont été étudiés (et prouvés) plus tard.

La séquence des télomères chez l'homme a été identifiée en 1988. Les différents composants fonctionnels du télomère ont ensuite été caractérisés comme la télomérase et les protéines associées aux télomères TRF1 (1995) et TRF2 (1997). Les publications sur le sujet n'ont cessé d'augmenter et ces recherches ont été couronnées en 2009 par l'attribution du Prix Nobel de Médecine et Physiologie à *Blackburn*, *Greider* et *Szostak*.

1-2- Structure des télomères

a- Séquence nucléotidique

La structure des télomères est relativement bien conservée chez les eucaryotes et est composée, hormis quelques exceptions, de courtes répétitions doubles brin en tandem de 6 à 8 nucléotides, riches en G, se terminant par une extrémité 3' sortante simple brin. Chez les mammifères, et notamment chez l'homme, la séquence télomérique est composée de répétitions (TTAGGG)_n. Le nombre de répétitions est variable en fonction des espèces. La taille des télomères est de 10 à 15 kilo-bases (kb) chez l'homme et de 20 à 50 kb chez la souris. Ce nombre peut également varier selon le type cellulaire et d'un chromosome à l'autre dans le même organisme. Le brin riche en G (et dépourvu de C), encore appelé brin G, forme une extrémité simple brin 3' sortante dont la longueur est estimée de 130 à 210 bases chez l'homme. Cette extrémité peut envahir la partie double brin pour former une structure en lasso appelée boucle-t (t-loop). L'extrémité 3' sortante est alors appariée avec le brin C et déplace le brin G en une boucle de déplacement (D-loop). Cette configuration particulière pourrait participer à la protection des extrémités chromosomiques en masquant la terminaison du télomère (**figure 17**).

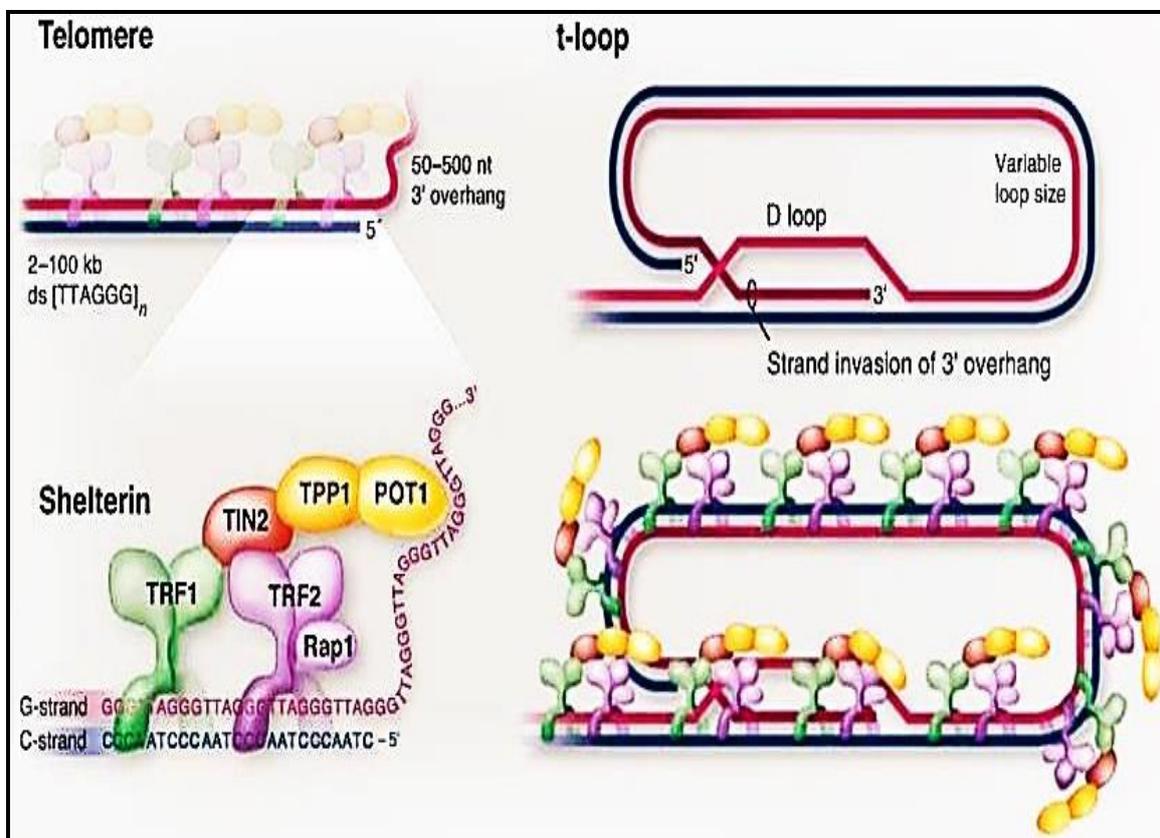


Figure 17 : Représentation schématique de la structure des télomères (Palm et Lange, 2008).

À l'extrémité proche du centromère existe des séquences dites subtélomères et qui sont définies comme les régions de transition (dont la fonction est inconnue à ce jour) entre les séquences chromosomiques spécifiques et les répétitions télomériques terminales (TTAGGG)_n. Donner une définition plus précise est difficile car ces régions sont extrêmement dynamiques et variables. Elles sont composées de séquences s'étendant sur une distance de 8 kb à 300 kb environ et sont particulièrement riches en duplications (segments d'ADN génomique répétés d'au moins 1 kb de long et de plus de 90 % de similarité de séquence).

b- Complexe télosome (Shelterin)

Le complexe protéique spécialisé associé au télomère chez les mammifères s'appelle télosome. Il est formé de six protéines: TRF1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1), TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 2), POT1 (Protection Of Telomere 1), TIN2 (TRF1 Interacting factor 2), TPP1 (TriPeptidyl Peptidase 1) et RAP1 (Repressor Activator Protein 1). Ces protéines peuvent se lier à l'ADN télomérique double brin ou à l'extrémité 3' sortante simple brin. La région double brin est reconnue spécifiquement par TRF1 et TRF2, deux protéines de la même famille qui se distinguent par leur domaine amino-terminal (acide pour TRF1, basique pour TRF2). L'ADN simple brin est reconnu par TPP1 et POT1. Les éléments du télosome peuvent former des complexes en absence d'ADN télomérique et des sous-complexes ont également été identifiés dans des extraits cellulaires (**figure 17**). Le télosome intervient dans la régulation de la longueur des télomères par la télomérase et dans la protection des extrémités télomériques contre les systèmes de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN.

1-3- Réplication des extrémités télomériques et télomérase

Du fait de l'incapacité de l'ADN polymérase classique à répliquer complètement l'ADN linéaire, l'extrémité des chromosomes eucaryotes est confrontée à une perte de matériel génétique à chaque cycle de réplication. En effet, lors de la réplication semi-conservative de l'ADN, le brin retardé (brin suiveur) est synthétisé de façon discontinue par l'intermédiaire de fragments d'Okazaki. Chaque fragment d'Okazaki est initié par une amorce ARN qui est ensuite détruite, remplacée par de l'ADN et liguée. En revanche, l'amorce la plus distale ne peut pas être remplacée sur un ADN linéaire, ce qui a pour conséquence une délétion de quelques bases de matériel génétique terminal à chaque cycle réplcatif (**figure 18**).

Toutefois chez l'homme, la perte télomérique à chaque cycle réplcatif est d'environ 100 à 200 pb, c'est-à-dire beaucoup plus importante que la taille d'une amorce ARN. Par ailleurs, la réplication du brin avancé (meneur) est complète mais génère un double brin à bout franc. Or, il a été observé la présence d'un brin 3' sortant à toutes les extrémités télomériques. Ces deux observations nous ont fait émettre l'hypothèse d'un mécanisme post-réplcatif, faisant intervenir une activité nucléase 5' qui génère une nouvelle extrémité 3' sortante par résection du brin C. Ce mécanisme est régulé par les protéines du télosome, qui contrôlent la détermination stricte du nucléotide terminal, et expliquerait ainsi l'attrition (érosion) plus rapide des télomères (**figure 18**).

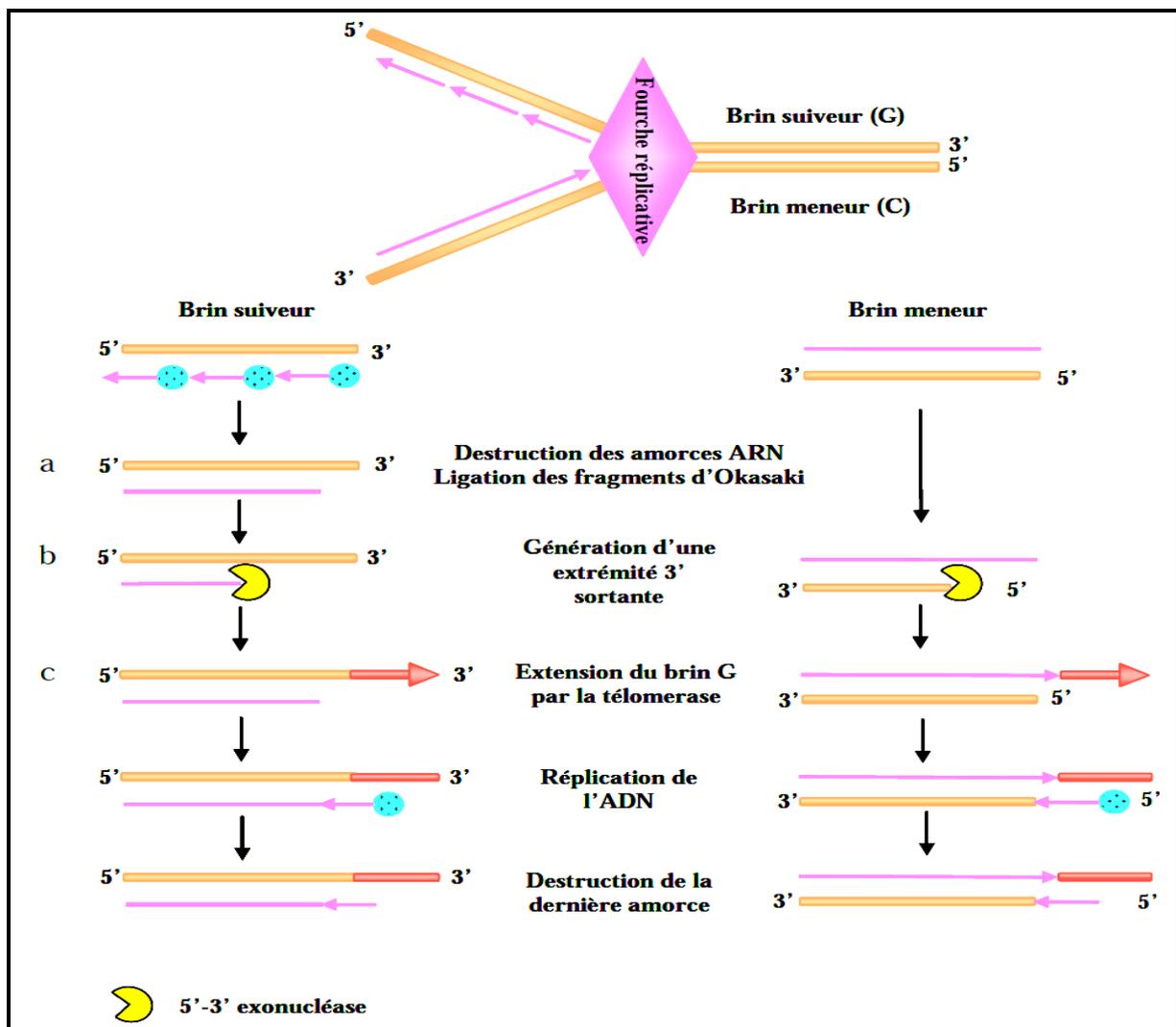


Figure 18 : Modèle actuel du mécanisme de réplication des télomères (Palm et Lange, 2008).

- (a) La réplication incomplète du brin suiveur est associée à la perte cyclique de nucléotides,
 (b) L'extrémité 3' sortante est générée par l'action d'une exonucléase 5'-3',
 (c) Dans certaines cellules, cette perte est comblée par l'action de la télomérase.

Face au problème de réplication des extrémités, la plupart des eucaryotes ont développé un mécanisme, conservé au cours de l'évolution, pour lutter contre l'attrition télomérique : l'enzyme télomérase. La télomérase est un complexe ribo-nucléoprotéique composé d'une sous-unité catalytique transcriptase inverse « télomérase » (hTERT), d'un ARN (hTR) associé à des protéines accessoires qui facilitent l'assemblage et la stabilité du complexe catalytique. La télomérase utilise la molécule d'ARN hTR comme matrice (AAUCCCAAUC), la complémentarité entre l'ARN hTR et l'ADN télomérique permettant un alignement correct. La télomérase peut ainsi catalyser plusieurs cycles d'alignement extension permettant d'ajouter des centaines de nucléotides à la même extrémité par transcription inverse.

La régulation de la télomérase s'effectue au niveau transcriptionnel. Son expression est faible ou absente dans la plupart des cellules somatiques mais présente dans les cellules souches et germinales. La plupart des tumeurs expriment le gène de télomérase ; c'est ce qu'on désigne par la dérégulation du gène de la télomérase.

1-4- Fonctions des télomères

a- Échappement aux systèmes de réparation de l'ADN

D'un point de vue mécanique, les extrémités chromosomiques correspondent à des cassures d'ADN double brin. Les dommages de l'ADN induisent habituellement une série de réponses cellulaires qui activent les points de contrôle d'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN. En cas de dysfonction télomérique, l'activation de ces mécanismes de réparations à l'extrémité des chromosomes peut avoir des conséquences délétères : fusions télomériques, réarrangements chromosomiques et instabilité génomique globale. Les télomères possèdent donc des propriétés de protection spécifiques qui permettent d'échapper non seulement à la réponse aux dommages à l'ADN mais aussi aux mécanismes de réparation.

b- Dysfonctionnement des télomères

Des dysfonctions des télomères et de la télomérase ont été décrites dans de nombreuses pathologies tant constitutionnelles qu'acquises.

D'une part, l'activation anormale de la télomérase peut être à l'origine de pathologies tumorales (cancéreuses ou pathologies acquises). Du fait de l'absence de télomérase dans les cellules somatiques, les télomères raccourcissent à chaque cycle cellulaire, jusqu'à atteindre une taille critique. Les cellules entrent alors en sénescence, une forme d'arrêt permanent du cycle cellulaire. Ce mécanisme se comporte comme une barrière anti-cancer en limitant la prolifération des cellules somatiques ayant potentiellement acquis des anomalies génomiques. Ce point d'entrée en sénescence correspond à la « limite de *Hayflick* », qui définit le nombre maximal de divisions d'une cellule somatique primaire en culture.

Dans 85 à 90 % des cas, la télomérase est réactivée (dérépression du gène de la télomérase). Mais dans 10 % des cas, un mécanisme alternatif appelé ALT (Alternative Lengthening of Telomeres).

D'autre part, des mutations constitutives entraînant une perte de fonction de la télomérase sont à l'origine de pathologies constitutionnelles, regroupées sous le nom de syndromes de raccourcissement télomérique. Les conséquences se manifestent tout d'abord dans les tissus au renouvellement rapide, où les capacités répliquatives des cellules souches sont affectées. Les principaux signes caractéristiques sont un vieillissement prématuré (cheveux gris, dysplasie unguéale), une fibrose pulmonaire et/ou hépatique, des dysfonctions immunitaires et hématologiques, une augmentation du risque de cancer, une sensibilité accrue à la chimiothérapie et à la radiothérapie. La pathologie la plus anciennement connue est la dyskératose congénitale secondaire à des mutations des sous-unités de la télomérase ou des protéines associées. Plus récemment, le syndrome de *Hoyeraal-Hreidarsson* et des pathologies débutant chez l'adulte comme la fibrose pulmonaire idiopathique ou l'anémie aplasique ont été rattachées à des anomalies de la télomérase en 2009.

2- Centromères

2-1- Historique et définition

Trois éléments sont indispensables pour que les chromosomes puissent se répliquer et ségréger normalement : les origines de réplication, les télomères et les centromères. Les origines de réplication existent en grand nombre chez les mammifères et sont partiellement caractérisées et existent en grande partie au niveau des SAR. Il en va de même pour les télomères. Les centromères sont, quant à eux, encore loin d'avoir livré leurs secrets malgré le nombre considérable d'études qui leur ont été consacrées ces dernières années. Ils jouent pourtant un rôle essentiel dans la ségrégation correcte du matériel génétique au cours de générations et leur dysfonctionnement peut conduire à des anomalies chromosomiques importantes, dont la trisomie 21 est l'exemple le plus connu.

La position des centromères sur les chromosomes est exploitée en cytogénétique pour leurs classifications. Dans un caryotype, on peut distinguer les différents chromosomes selon deux critères : la taille et l'indice centromérique permettant ainsi de faire la distinction entre chromosomes métacentrique, sub-métacentriques et acrocentriques (**figure 19**).

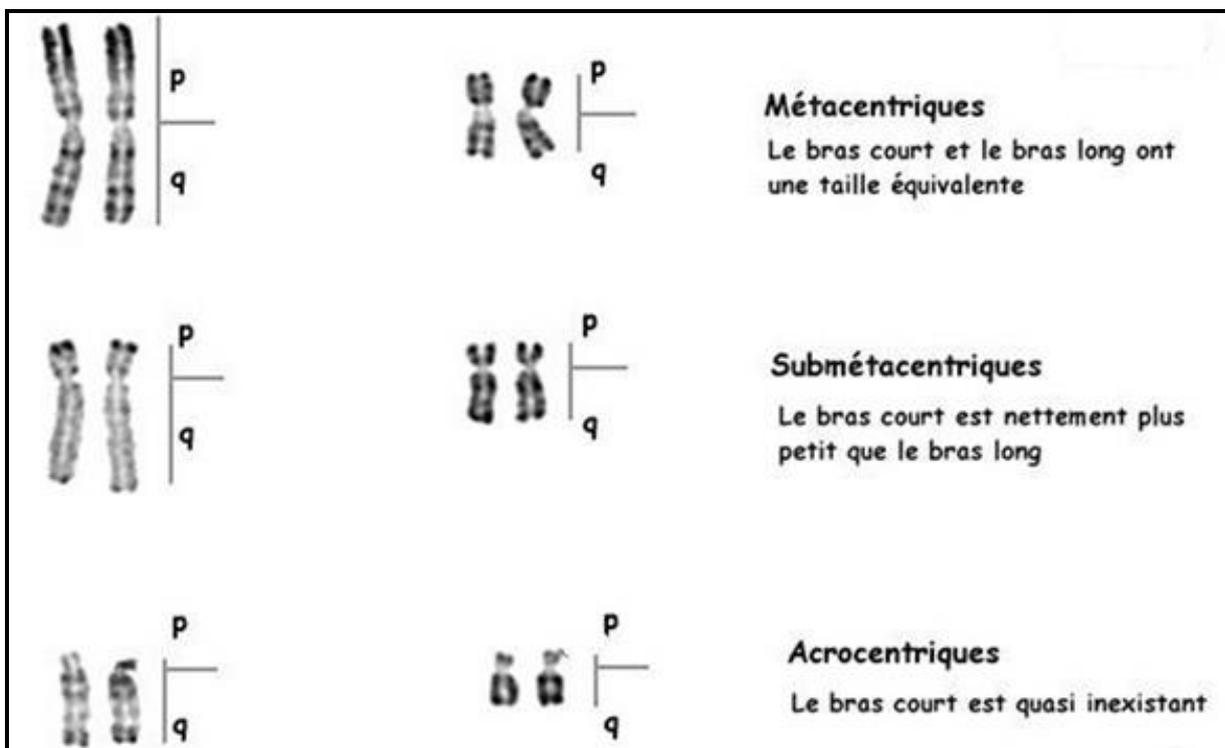


Figure 19 : Classification des chromosomes en fonction de l'indice centromérique (Shaffer *et al.*, 2013).

Le centromère est un domaine chromosomique spécialisé sur lequel s'assemble le kinétochore, complexe protéique couplant le fuseau mitotique au chromosome au cours de la mitose. Le centromère joue donc un rôle crucial dans la ségrégation des chromatides sœurs. Sur le chromosome mitotique, le centromère correspond à la constriction primaire du chromosome. Les régions flanquant du centromère, nommées régions péri-centromériques, sont impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs. On désigne par Région Centromérique (RC) le domaine constitué du centromère et des régions péri-centromériques.

2-2- Structure des régions centromériques

a- ADN centromérique

Les séquences des RCs sont très divergentes entre les espèces. Le centromère le plus simple est trouvé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, constitué d'un domaine de 125 pb, suffisant pour faciliter l'assemblage du kinétochore. Contrairement à ce centromère dit « ponctuel », la plupart des eucaryotes possèdent des centromères dit « régionaux ». Ces régions sont composées d'ADN répété en tandem ; la séquence et la taille de l'unité de répétition ainsi que le nombre de répétitions sont variables entre les espèces.

On observe des tailles de centromères allant de 35 à 110 Kb chez *Saccharomyces pombe* jusqu'à 0,3 à 5 Mb chez l'homme. On trouve plusieurs familles de séquences d'ADN satellites (séquences d'ADN répétées groupées en tandem) au niveau des RCs humaines. La situation se complique déjà chez *S. pombe* puisque ses trois chromosomes portent des séquences d'ADN centromériques plus complexes et différentes d'un chromosome à l'autre, bien que formées d'éléments d'ADN répétés, de même type mais arrangés de façon variable. Leur simplicité, d'une part, et une approche génétique de la fonction centromérique, d'autre part, ont permis la caractérisation des séquences d'ADN centromérique chez *S. cerevisiae*. Elles sont constituées par deux courtes régions d'ADN conservées (8 pb pour CDE I et 25 pb pour CDE III) séparées par CDE II (78 à 86 pb > 90 % A+ T). L'analyse de nombreuses délétions et insertions dans CDE II a montré que seule la richesse en A+T de cet élément était nécessaire au bon fonctionnement du centromère de levure, sans que la séquence elle-même ait besoin d'être particulièrement stricte. Une délétion complète de CDE I et/ou III n'a qu'un effet réduit sur la fidélité de la ségrégation chromosomique. Par digestion à la nucléase, on a pu montrer que l'ADN centromérique de *S. cerevisiae* était engagé dans un complexe nucléoprotéique de 200 à 250 pb.

À la différence de la levure, les séquences d'ADN qui assurent la fonction centromérique chez les autres espèces eucaryotes ne sont pas caractérisées. Cependant, chez tous ces organismes, les régions centromériques contiennent des quantités importantes de séquences répétées en tandem : les ADN satellites. Leur propriété principale est ce caractère répété en tandem. D'une espèce à l'autre, ils sont extrêmement variables en quantité, nombre, séquence et taille d'unité de répétition (**figure 20**).

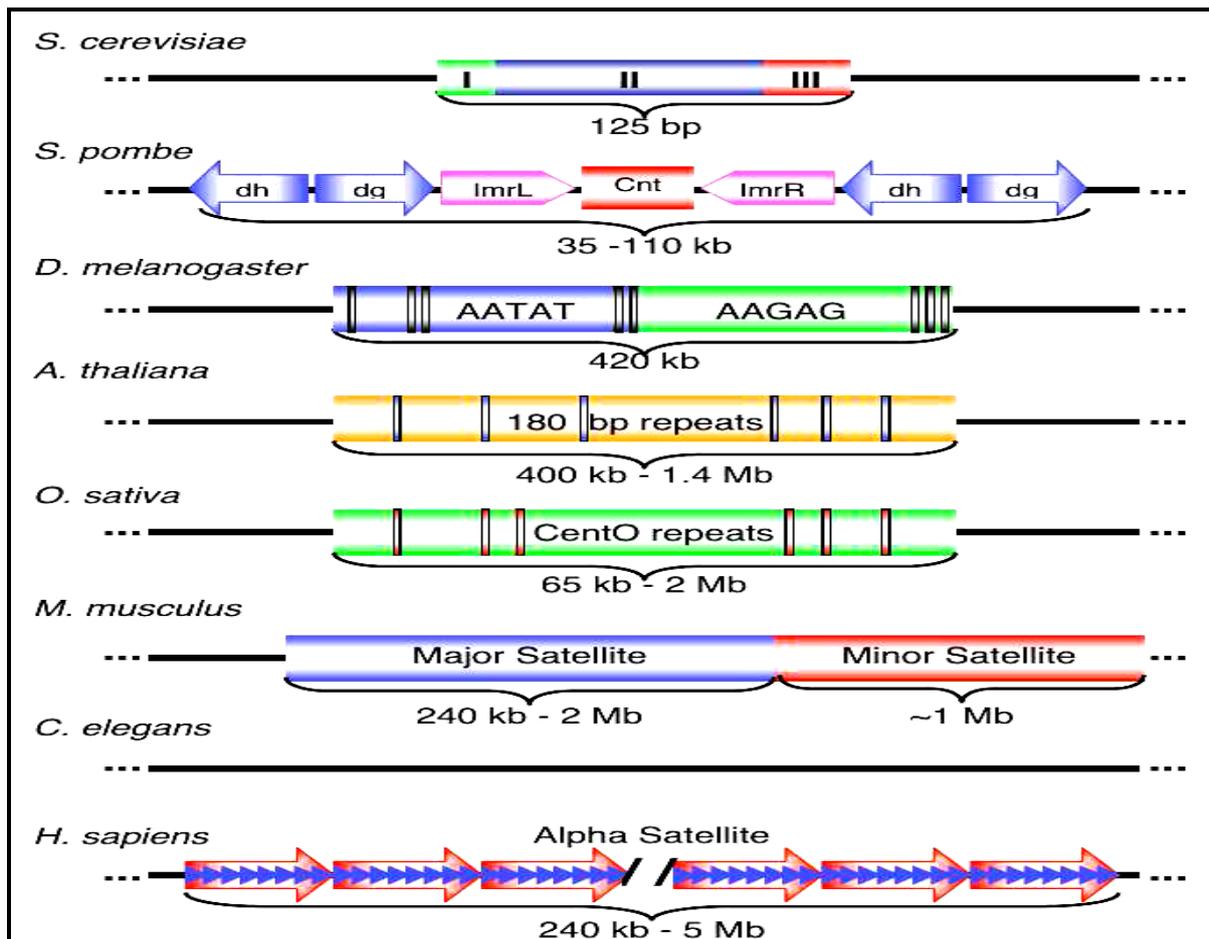


Figure 20 : Organisation des RCs entre les espèces (Rudd, 2005).

Chez les mammifères, l'ADN satellite le plus abondant et le plus étudié est l'ADN dit « alpha satellite » qui représente une portion importante du génome humain. Il est constitué de répétitions de 171 pb, organisées en tandem, et il est présent sur tous les chromosomes dans les régions centromériques. Chaque chromosome est équipé d'une sous-famille spécifique du même ADN alpha satellite qui se distingue des autres. Cette homologie réduite de séquence peut être exploitée en cytogénétique par hybridation *in situ* dans diverses situations.

b- Chromatine centromérique

Les RCs constituent, avec les télomères, l'hétérochromatine constitutive caractérisée par des marques d'histones répressives telles que H3K9me3, H3K27me3 et H4K20me3, et par un fort taux de méthylation de l'ADN ainsi que par leur réplication tardive. Les centromères de toutes les espèces sont caractérisés par la présence du variant de l'histone H3 CenP A (parfois nommé CenH3), très conservé et qui se trouve exclusivement au niveau de ces centromères. Cette dernière caractéristique est nécessaire et suffisante à la formation du centromère ; c'est pourquoi elle est considérée comme définissant le centromère, à défaut d'un consensus de séquences d'ADN (**figure 21**).

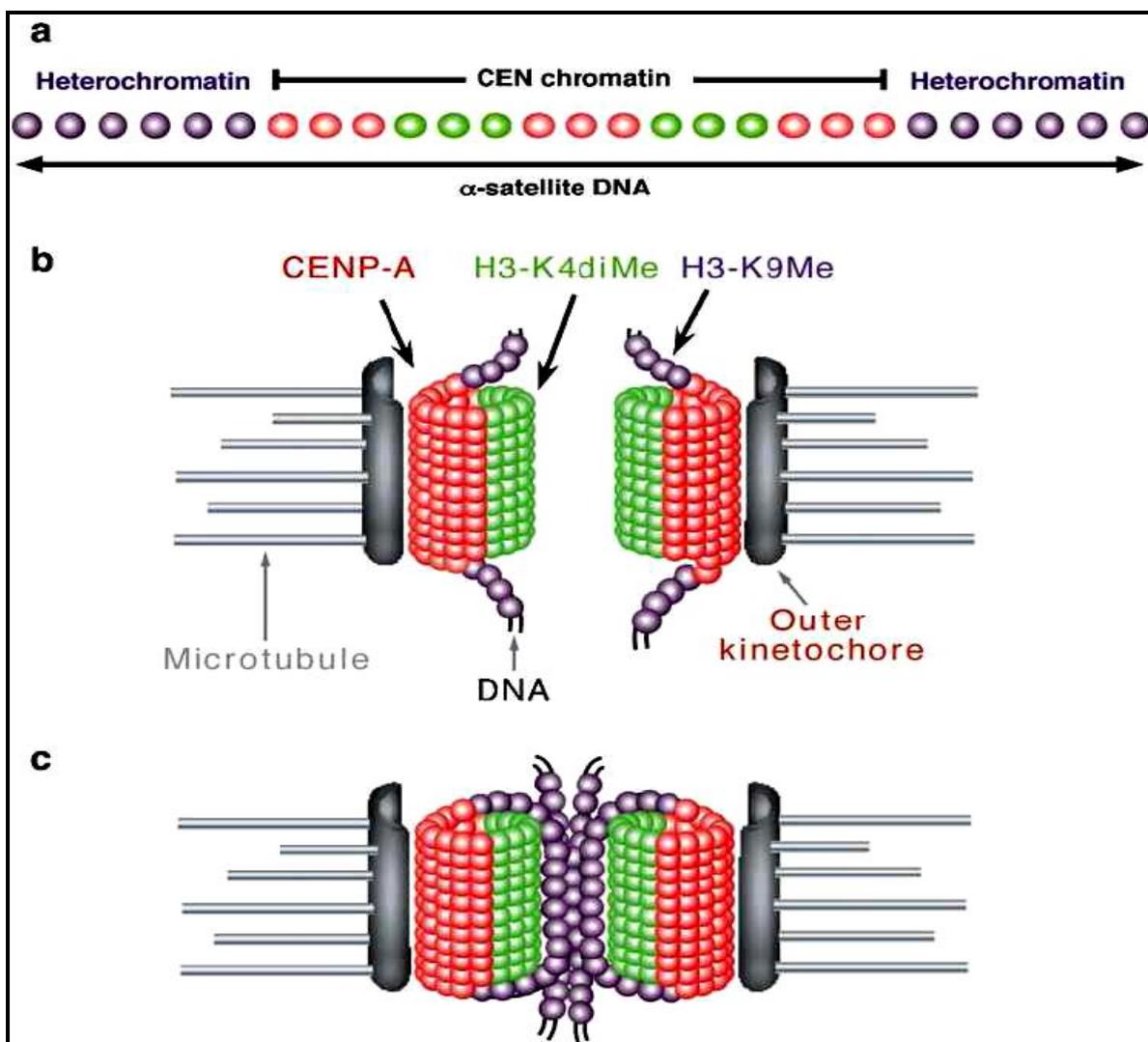


Figure 21 : Modèle de structure secondaire de la chromatine centromérique (Rudd, 2005).

2-3- Paradoxe du centromère

Le rôle joué par le centromère dans l'assemblage du kinétochore et la division cellulaire est très conservé au cours de l'évolution, alors que la séquence d'ADN est très divergente entre les espèces. Cela semble paradoxal car en général, la conservation de la fonction d'un locus au cours de l'évolution est corrélée avec la conservation de sa séquence. Cette singularité est connue sous le nom de paradoxe du centromère. En revanche deux caractéristiques sont conservées au cours de l'évolution : d'une part, on trouve un variant spécifique de l'histone H3 (CenpA chez l'homme) au niveau de tous les centromères. D'autre part, le caractère répété et riche en A/T des séquences est présent chez quasiment tous les eucaryotes.

La conservation du caractère répété des séquences au cours de l'évolution pose la question de son rôle dans le fonctionnement du centromère. Des études portant sur des chromosomes humains anormaux, caractérisés par une relocalisation du centromère, montrent que de nouveaux centromères peuvent se former sur des régions dépourvues de séquences répétées, mais présentant néanmoins une séquence riche en A/T ; ces structures sont appelées néo-centromères. Ces observations montrent que le centromère peut être fonctionnel sans la présence d'ADN répété ; cette caractéristique n'est donc, apparemment, pas nécessaire.

Chapitre IV

Compartimentation fonctionnelle du génome

Le génome a pour fonction première de contenir l'information génétique nécessaire au développement, à la survie et à la reproduction de l'organisme. Nous nous attendons donc à ce que la taille du génome soit proportionnelle à la complexité de l'organisme. Or, nous savons aujourd'hui que la taille des génomes n'est pas en relation directe avec la complexité d'un organisme, ni avec le nombre de ses gènes. À titre d'exemple, chez les organismes eucaryotes les plus simples, la taille des génomes varie de 9 Mb chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* à 700 000 Mb chez l'amibe *Amoeba dubia*, soit un rapport de presque 80 000. Sachant que la taille du génome humain qui est de 3 400 Mb est égale à celui du riz !. En résumé, des organismes de degré de complexité similaires possèdent des génomes dont les tailles sont extrêmement différentes. Cette absence de corrélation entre taille des génomes et complexité des organismes est connue sous le terme de paradoxe de la valeur C.

Contrairement à la taille des génomes, le nombre de gènes codant pour des protéines semble être (grossièrement) corrélé avec le degré de complexité de l'organisme. Parmi les eucaryotes, le nombre de gènes protéiques varie de 7 000 chez la levure, 7 500 chez l'amibe, à 100 000 au maximum chez les mammifères (65 000 pour l'humain). Cette variation du nombre de gènes protéiques est nettement insuffisante pour expliquer la variation constatée dans la taille des génomes de ces organismes. En conclusion : l'essentiel des variations dans la taille des génomes est dû à de l'ADN dont on ne connaît pas la fonction. En d'autres termes, une portion substantielle (65 à 99%) du génome eucaryote appelée ADN non codant ne contient pas d'information génétique au sens classique du terme.

On a émis plusieurs hypothèses pour expliquer l'existence de cet ADN non codant dont on ne connaît pas la fonction (hormis quelques exceptions) :

- **L'ADN non-codant à une fonction « nucléotypique »** : une fonction structurale, sans rapport avec le rôle de support d'information génétique. Cet ADN est fonctionnel, mais sa séquence en nucléotides peut changer aléatoirement sans altérer sa fonction.
- **L'ADN non-codant est inutile «junk DNA »** : considéré comme une structure sélectivement neutre, il s'est accumulé passivement au cours de l'évolution et n'est ni avantageux ni désavantageux pour l'organisme. Une interrogation peut alors être posée : pour qu'elle raison une cellule dépense énormément de ressources énergétiques pour répliquer fidèlement cet ADN non codant à chaque cycle cellulaire.
- **L'ADN non-codant est parasite, ou égoïste «selfish DNA »** : cet ADN n'a tout simplement pas de fonction, il s'est accumulé au cours de l'évolution dans les chromosomes parce qu'il est parfaitement adapté à l'envahissement des génomes.

1- Historique et définitions

1-1- Notion de génome

Le terme « génome » a été introduit en 1920 par *Winkler* pour désigner l'ensemble complet des gènes d'un organisme. La nature du gène était alors inconnue. Ce n'est qu'à partir des années 1950s, que l'on a pu déterminer que le matériel génétique est constitué d'ADN, et que l'on a découvert comment la succession des bases (séquence) permet de coder une protéine. Nous sommes ainsi passés d'une définition théorique du génome : ensemble des gènes, à une définition physique : le génome est constitué de molécules d'ADN. Chez les procaryotes, ces deux définitions concordent : le génome d'*Escherichia coli*, est formé d'une molécule d'ADN circulaire dans laquelle les gènes sont pratiquement accolés les uns aux autres. Par contre, chez de nombreux eucaryotes et en particulier chez les vertébrés, le génome ne se limite pas à l'ensemble des gènes. Bien au contraire, les gènes ne constituent qu'une faible portion du génome.

1-2- Redéfinition de la notion de gène

Notre compréhension du génome a évolué depuis la définition mendélienne du gène, définit comme étant : « une unité mutable et transmissible, responsable de l'expression d'un caractère héréditaire ». On tend actuellement à employer une définition moléculaire : « un fragment d'ADN ayant une fonction connue » ; cette notion englobe :

- **les gènes protéiques** : transcrits et traduits (codant pour des protéines).
- **les gènes spécifiant des ARN fonctionnels** : transcrits, non traduits (ARNr, ARNt, etc.).
- **les séquences d'ADN fonctionnels** : ni transcrites, ni traduites (centromères, télomères).

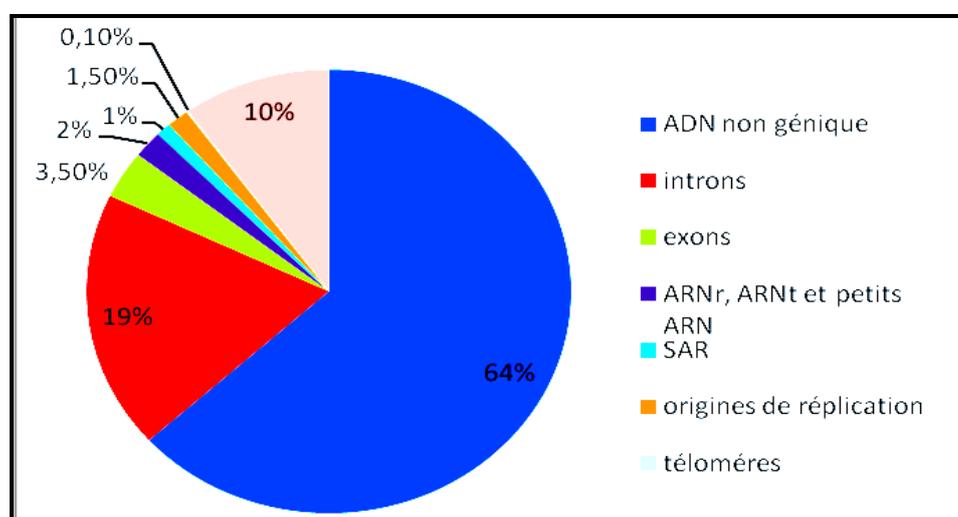


Figure 22 : Compartimentation fonctionnelle du génome humain (*Dunham et al., 2012*).

2- Description de la structure physique du génome

La structure physique du génome peut être décrite sous différents aspects :

- organisation en **classes de séquences uniques et répétées**.
- organisation en **bandes chromosomiques, liée à la structure de la chromatine**.
- organisation en **domaines de composition nucléotidique homogène (isochores)**.

Il existe des relations entre ces différents niveaux d'organisation, ainsi qu'entre **compartimentation physique** dite **structurale** (la chromatine décrite précédemment) et **compartimentation fonctionnelle** du génome.

2-1- Structure répétitive du génome

Les cinétiques de renaturation des molécules d'ADN montrent que le génome des eucaryotes est constitué de plusieurs classes d'ADN caractérisées par leur niveau de répétition. On définit généralement trois classes, qui existent dans des proportions variables chez toutes les espèces :

- les séquences **uniques ou très peu répétées** : 20 % à 90 % du génome.
- les séquences **moyennement répétées** (10^2 à 10^5 copies) : 10 % à 60 % du génome.
- les séquences **hautement répétées** (plus de 10^5 copies) : 5 % à 20 % du génome.

Environ 25 % de l'ADN humain est fait de séquences dites modérément répétitives, ce qui inclut les copies multiples de certains gènes comme ceux codants pour les ARN ribosomiaux et des séquences non fonctionnelles. Les séquences hautement répétées, non fonctionnelles, peuvent être classées en deux familles, suivant leurs profils de dispersions dans le génome :

- **les séquences répétées « groupées »** ; dites ainsi car elles sont localisées ou en tandem et forment ce qu'on appelle l'ADN satellite,
- **les séquences répétées « dispersées »** ; dites ainsi car elles sont éparpillées un peu partout dans le génome sans aucun profil particulier. C'est ce qu'on nomme les transposons.

Quantitativement parlant, on constate que le nombre de séquences répétées groupées dépasse celui des séquences répétées dispersées.

a- ADN satellite

Dans le génome des mammifères, les séquences hautement répétées les plus fréquentes correspondent à l'ADN satellite ; des séquences d'ADN regroupées en tandem. Il en existe trois classes qui peuvent être distinguées selon deux critères : la taille du motif de répétition ainsi que la taille totale que constitue l'ensemble des répétitions.

- **ADN satellite** : il s'agit de motifs de 200 à 2000 pb, répétés en tandem. Un bloc d'ADN satellite peut faire jusqu'à une dizaine de mégabases sans interruption. Chez les mammifères, cet ADN représente environ 10 % du génome et est localisé essentiellement au niveau des centromères et est probablement impliqué dans la fonction centromérique. On trouve également de grands blocs d'ADN satellite (de 13 à 52 Mb) sur le bras long du chromosome Y humain ainsi que les régions juxta-centromériques des chromosomes 1, 9 et 16. Les répétitions d'ADN satellites sont très variables d'une espèce à l'autre, ce qui suggère que leurs séquences ne sont pas sujettes à la sélection naturelle. Par contre, ces répétitions montrent une très forte homogénéité intra-spécifique. L'ADN satellite est localisé essentiellement au niveau des régions hétérochromatiques.
- **ADN minisatellite** : outre les grands blocs d'ADN satellite, on trouve, dispersés dans le génome, des petits blocs de motifs répétés en série. Les minisatellites font environ 100 à 2000 pb et sont formés de motifs de 2 à quelques dizaines de nucléotides. Ces répétitions montrent une certaine hétérogénéité intra-spécifique (nombre de répétitions variable entre individus pour le même minisatellite). L'ADN minisatellite est localisé aussi bien au niveau de l'euchromatine que l'hétérochromatine.
- **ADN microsatellite** : les microsatellites correspondent à des blocs encore plus courts dont la taille est toujours inférieure à 100 pb. Il s'agit de la répétition de motifs de 1 à 6 nucléotides. Nous avons observé que les microsatellites sont localisés essentiellement au niveau de l'euchromatine, à proximité des gènes, et constituent environ 1 % des introns dans le génome humain. Le nombre de répétitions microsatellitaires présentent un fort polymorphisme (hétérogénéité intra-spécifique). De ce fait, ces structures sont utilisées comme marqueurs pour établir des cartes génétiques et l'identification des personnes en criminologie par la technique des VNTR (Variable Number Tandem Repeat).

L'augmentation ou la diminution du nombre de répétitions au cours de l'évolution a été sujette à de nombreuses explications. Trois phénomènes ont été mis en avance pour expliquer cette hétérogénéité interspécifique :

- les crossing-over inégaux lors de la méiose,
- la réinsertion de fragments amplifiés par le processus de réplication en cercle roulant,
- le glissement (ou décalage) de l'ADN polymérase au cours de la réplication.

b- Les transposons

Les transposons, découverts par McClintock entre 1940 et 1950 qui les a appelés « gènes sauteurs », sont des éléments génétiques supposées dérivées de séquences virales, qui ont la faculté de se déplacer dans le génome. Ce déplacement peut impliquer directement une molécule d'ADN ou passer par l'intermédiaire d'une molécule d'ARN. Ce dernier mécanisme, le plus répandu, est appelé rétroposition, et les éléments transposables correspondants des rétroéléments. Chez les vertébrés, la plupart des éléments transposables connus sont des rétroéléments. Ces rétroéléments sont dispersés parmi les séquences uniques, on en trouve dans les introns et à proximité des gènes. On peut distinguer quatre types de rétroéléments selon les éléments qu'ils contiennent (**figure 23**).

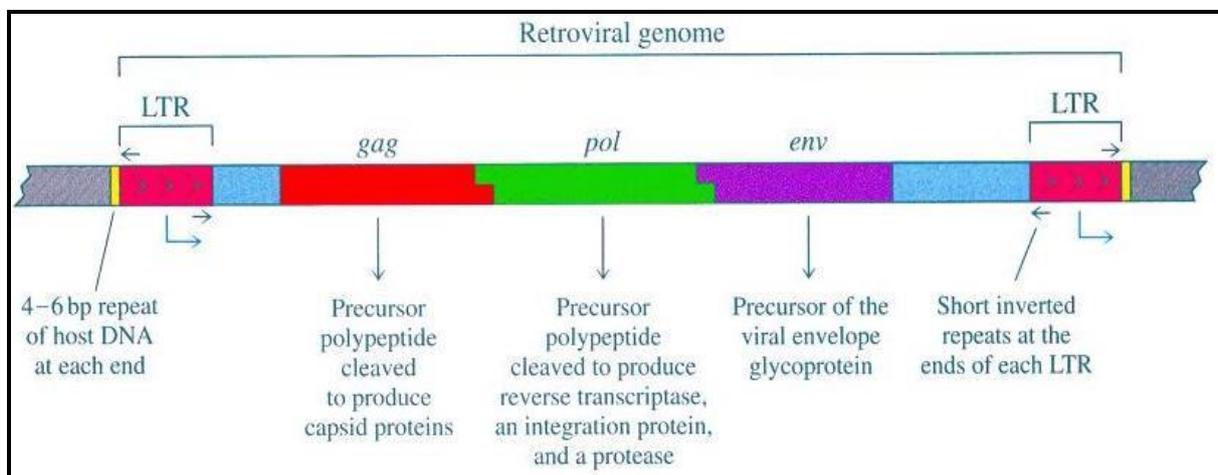


Figure 23 : Structure typique du génome d'un rétrovirus (**Padeken et al, 2015**).

- **Rétrovirus** : qui sont caractérisés par la capacité à former des particules virales.
- **Rétrotransposons** : qui, à la différence des rétrovirus, ne possèdent pas le gène *env* nécessaire à l'élaboration de la capsid virale.
- **Rétroposons** : qui ne possèdent ni le gène *env*, ni les longues répétitions terminales (LTR) des rétrovirus.
- **Rétrotranscrits ou rétroséquences** : à la différence des autres rétroéléments, les rétroséquences ne possèdent pas le gène de la transcriptase inverse (*pol*). Leur rétroposition est donc un évènement opportuniste, qui requiert qu'un autre rétroélément (un rétrovirus par exemple) produise des molécules de transcriptases inverses dans la cellule. La matrice dont dérive une rétroséquence correspond généralement à l'ARN transcrit d'un gène structural.

Tous ces différents types de rétroéléments existent dans le génome des vertébrés. Certains sont représentés par quelques exemplaires, tandis que d'autres appartiennent aux classes de séquences moyennement ou hautement répétées. À l'origine, ces rétroéléments ont été classés en fonction de leur longueur.

- Une partie de ces séquences forment des **LINE** (Long INterspersed Element), mesurant en moyenne 7 000 pb, il y en a environ 25 à 50 000 chez l'homme, certains contiennent des séquences codantes. Le plus important est l'élément L1 mesurant 5 000 pb qui ne possèdent pas de LTR mais contiennent deux phases de lecture ouverte dont l'une code pour une transcriptase inverse.
- D'autres, forment des séquences dites **SINE** (Short INterspersed Element), et représentent environ 10 % du génome humain qui en contient des milliers. La plus connue est l'élément Alu (300 pb), qui existe en 300 000 à 500 000 copies et représente à lui seul environ 5 % du génome humain.

2-2- Structure de la chromatine, bandes chromosomiques et organisation du noyau

La coloration des chromosomes en métaphase, fait apparaître le long des chromosomes de mammifères une alternance de bandes transversales de colorations distinctes. Des techniques très diverses révèlent un même profil de bandes. Le colorant Giemsa appliqué après dénaturation partielle des protéines révèle les bandes G. Les fluorochromes spécifiques des paires A-T, tels que la Quinacrine ou la daunomycine, font apparaître des bandes appelées bandes Q, qui se superposent parfaitement aux bandes G. Le R-banding révèle un profil inverse du précédent : les bandes R sont complémentaires aux bandes G/Q. Les bandes R et G correspondent respectivement à l'euchromatine et à l'hétérochromatine facultative. Une autre technique révèle les bandes C, qui correspondent à l'hétérochromatine constitutive. Les bandes C sont localisées au niveau des centromères et des constriction secondaires des chromosomes acrocentriques et sont formées d'ADN satellite. Enfin, les bandes T correspondent à des régions particulièrement riches en G+C, résistantes à la chaleur et localisées principalement aux télomères. Les bandes T constituent un sous ensemble des bandes R.

La coloration Giemsa pourrait révéler une différence de composition en protéines chromatinienne. Certaines données suggèrent que les bandes G correspondent à des zones plus condensées dans les chromosomes. D'autres auteurs pensent que les bandes correspondent à des variations à grande échelle de la composition en paires de bases. En effet, les bandes G/Q sont environ 3,2 % plus riches en A-T que les bandes R. Un autre modèle a été proposé, basé sur l'hypothèse que les régions très riches en A + T (supérieur à 65 %) correspondent essentiellement à des SAR. En utilisant un colorant spécifique des régions très riches en A + T (la daunomycine), et des techniques optiques permettant de reconstituer une image tridimensionnelle des chromosomes. La succession des SAR forme une ligne riche en A-T (queue AT) qui marque le centre de la fibre chromatidienne. La visualisation de cette queue AT montre que la fibre chromatidienne est étroitement repliée dans les bandes G/Q, tandis qu'elle apparaît dépliée dans les bandes R. Il ressort de cette observation que les boucles chromosomiques sont probablement beaucoup plus courtes en moyenne dans les bandes G/Q que dans les bandes R. Selon les auteurs, les boucles G/Q et R pourraient représenter en moyenne respectivement 100 kb et 160 kb.

Ainsi, selon ce modèle, la différenciation des bandes ne serait pas dû à une différence de composition en base mais à une différence de repliement de la fibre chromatidienne : les bandes R correspondent à des zones peu condensées où le squelette chromosomique est étiré longitudinalement au centre du chromatide et entouré par de grandes boucles périphériques. Dans les bandes Q, des boucles plus petites sont ancrées sur le squelette fortement replié.

Les chromosomes métaphasiques ne représentent qu'un stade particulier du cycle cellulaire, pendant lequel la chromatine est très condensée et non transcrite. Pour comprendre le fonctionnement du génome, il est donc essentiel d'étudier l'organisation de la chromatine dans le noyau en interphase. Pendant longtemps, le noyau a été considéré comme un milieu liquide dans lequel les facteurs protéiques diffusent librement et les fibres de chromatine s'entremêlent au hasard. Différents travaux suggèrent au contraire que le noyau est fortement structuré pour assurer la réplication, la transcription des gènes, la maturation et le transport des ARN ainsi que la réparation de l'ADN.

Grâce aux progrès des techniques de fluorescence et d'imagerie, il est possible d'étudier plus finement la structure tridimensionnelle du noyau, de déterminer la localisation de chromosomes ou même de courts fragments d'ADN dans le noyau. Ainsi, il a été démontré que les chromosomes occupent des territoires définis dans le noyau.

Le noyau doit donc être considéré comme un système organisé complexe, dont la structure est liée directement à l'expression des gènes.

2-3- Isochores

a- Mise en évidence et définition

Lorsque l'ADN génomique est soumis à une centrifugation dans un gradient de densité de chlorure de césium celui-ci se répartit en fonction de sa densité. Cette technique de centrifugation en gradient de densité à l'équilibre permet de fractionner de l'ADN en fonction de sa teneur en G+C en fragments de composition homogène qu'on appelle isochores. Cela est rendu possible grâce à la différence de la densité de flottabilité qui fait que les paires de bases GC sédimentent plus rapidement que les paires de bases AT et sont considérés ainsi comme étant « plus lourds ». Cinq classes d'isochores existent et sont caractérisées par des taux de G+C différents (de 30 à 60 % chez l'homme).

Classiquement on distingue 2 classes « légères » L1 (avec un taux G+C de 38,8 %) et L2 (avec un taux G+C de 40,8 %) et 3 classes lourdes" H1 (avec un taux G+C de 44,9 %), H2 (avec un taux G+C de 49 %) et H3 (avec un taux G+C de 53 %). Le génome des vertébrés peut donc être décrit comme une mosaïque d'isochores : L1 et L2 représente 62 %, H1 et H2 32 % et H3 6 % du génome humain.

b- Localisation des gènes dans les isochores

L'hybridation de sondes spécifiques sur des échantillons d'ADN fractionnés en fonction de leur taux de G+C permet de déterminer dans quelle isochoire est localisé un gène. Ces expériences ont montré que les gènes sont généralement intégrés dans des isochores de taux de G+C semblable à celui du gène lui-même.

c- Isochores et bandes chromosomiques

Des expériences d'hybridation *in situ* sur des chromosomes humains en métaphase ont montré qu'il existe une relation entre l'organisation en isochores et les bandes chromosomiques. Les bandes G sont composées essentiellement d'isochores légères (L1 + L2) ; les bandes R' (c'est à dire les bandes R à l'exclusion des bandes T) sont constituées d'isochores légères et d'isochores lourdes (principalement H1) en quantités comparables ; les bandes T sont formées principalement d'isochores lourdes (principalement H2) et très lourdes (H3). Ces résultats sont confirmés par l'analyse du taux de G+C des gènes dont on connaît la localisation sur une bande chromosomique : 60 % des gènes pauvres en G+C sont localisés dans les bandes G ; 70 % des gènes riches en G+C sont dans les bandes T.

3- Corrélations fonctionnelles et structurales

La compartimentation des chromosomes en bandes et en isochores est corrélée avec différents aspects du fonctionnement du génome. Certaines caractéristiques des bandes découlent directement des propriétés des isochores qui les composent : densité de gènes, d'îlots CpG, taux de recombinaison, distribution des séquences répétées SINE et LINE (**tableau III**). Cependant, la propriété la plus remarquable qui fait le lien entre les 3 niveaux d'organisation structurale du génome est ce qu'on appelle le profil répliatif.

Les phases précoces et tardives de réplication de l'ADN peuvent être suivies par incorporation de Bromodéoxyuridine (BrdU, analogue de la thymidine). Cette procédure révèle un profil répliatif directement corrélé avec le profil de bandes R et G : globalement, l'ADN localisé dans les bandes R se réplique précocement, alors que l'ADN des bandes G se réplique tardivement. Des expériences dans ce sens ont également montré que les gènes à expression constitutive (ou gènes « housekeeping ») sont toujours répliqués précocement, alors que les gènes tissu-spécifiques sont répliqués précocement dans les tissus où ils sont exprimés, tandis qu'ils sont répliqués précocement ou tardivement dans les autres tissus. Ceci a conduit des chercheurs à suggérer que les gènes housekeeping soient localisés dans les bandes R, tandis que les gènes tissu-spécifiques seraient dans les bandes G.

Une expérience réalisée illustre parfaitement ces caractéristiques. Nous avons procédé à l'analyse de 97 gènes dont on connaît à la fois la séquence, la localisation chromosomique et la fonction (à la résolution 400 bandes) a permis d'éclaircir la situation.

- Globalement, 80 % de ces gènes sont dans des bandes R, 20 % dans des bandes G. Parmi les 71 gènes tissu-spécifiques, 75 % sont dans des bandes R, 25 % dans des bandes G. Parmi les 26 gènes housekeeping, 96 % (25) sont dans des bandes R, 4 % (1) dans des bandes G. Ainsi, les bandes R sont riches en gènes, à la fois housekeeping et tissu-spécifique, tandis que les bandes G contiennent peu de gènes, essentiellement de type tissu-spécifique.
- La richesse en gènes des bandes R, et plus encore des bandes T dans les isochores qui constituent ces bandes a été démontrée et illustre parfaitement la notion de densité en gènes : 34 % des gènes sont localisés dans les isochores L1 + L2 (qui constituent 62 % du génome), 38 % dans les isochores H1 + H2 (31 % du génome) et 28 % dans H3 (3 à 5 % du génome). La densité de gènes dans H3 est donc environ 4 à 8 fois supérieure à H1 + H2 et 10 à 20 fois supérieure à L1 + L2.

- La distribution non uniforme des gènes dans les isochores permet d'expliquer directement certaines propriétés des isochores et des bandes : la sensibilité à la DNase 1 et l'acétylation des histones sont liées à l'activation des gènes. Aussi, les îlots CpG sont associés à tous les gènes housekeeping et à 40 % des gènes tissu-spécifiques.
- Les transposons s'intègrent préférentiellement dans des isochores de composition semblable à la leur. Dans certains cas, cette intégration préférentielle est visible à l'échelle des bandes : les séquences Alu (56 % G+C) sont plus fréquentes dans les bandes R, les séquences L1 (42 % G+C) dans les bandes G. L'interprétation de ce profil d'intégration n'est pas claire, cette distribution peut s'expliquer parce que l'insertion est ciblée vers des isochores de composition semblable à celle des éléments mobiles et/ou du fait que leur insertion est plus stable dans un tel environnement.

Tableau III : Caractéristiques fonctionnelles des bandes chromosomiques (Padeken *et al.*, 2015).

Bandes G	Bandes R	
	Bandes R'	Bandes T
Faible densité en gènes	Forte densité en gènes	Très forte densité en gènes
Réplication tardive	Réplication précoce	Réplication très précoce
Pauvre en G+C (principalement L1 et L2)	Riche en G+C (principalement H1)	Très riche en G+C (principalement H2 et H3)
Pauvres en îlots CpG	Riches en îlots CpG	Très riche en îlots CpG
Faible niveau d'acétylation des histones.	Fort niveau d'acétylation des histones	Fort niveau d'acétylation des histones
Forme phosphorylée de l'histone H1	Forme non phosphorylée de l'histone H1	Forme non phosphorylée de l'histone H1
Peu sensibles à la DNase	Sensibles à la DNase	Très sensibles à la DNase
Riches en LINEs	Riches en SINEs	Très riches en SINEs
Faibles densités en chiasmata méiotiques.	Forte densité en chiasmata méiotiques.	Très forte densité en chiasmata méiotiques
Gènes tissu-spécifiques	Gènes tissu-spécifiques et housekeeping.	Gènes housekeeping

Chapitre V

Cultures cellulaires

Actuellement, le diagnostic et le suivi de patients affectés d'un cancer se font principalement en recueillant des données cliniques : taille de la tumeur, présence de ganglions lymphatiques et de métastases, et biologiques : dosage de certains marqueurs tumoraux. L'inconvénient majeur de ces méthodes est qu'elles s'appuient sur l'analyse d'échantillons fixés ou d'extraits moléculaires obtenus à partir d'une population cellulaire hétérogène. Une approche alternative est d'analyser le comportement de cellules cancéreuses vivantes.

Les cellules en culture ont été, et sont encore aujourd'hui, le modèle le plus utilisé pour étudier le cancer. Les connaissances sur les processus qui surviennent dans les cellules normales et cancéreuses proviennent de l'utilisation de plusieurs de ces lignées cellulaires permettent d'avoir une source de cellules cancéreuses illimitée à faible coût et d'évaluer l'effet de l'environnement ou d'un traitement sur la croissance ou l'expression de protéines.

1- Cultures cellulaires

Les cultures cellulaires constituent un ensemble de procédés techniques qui permettent de maintenir les cellules en survie, pendant un minimum de 24 heures, avec une activité raisonnable et un aspect relativement normal, en les plaçant dans un milieu de culture naturel, synthétique ou artificiel se rapprochant le plus possible du milieu où on les trouve naturellement. Cette définition met en valeur la démarche qui a été celle de tous les cytoculteurs : essayer de reconstituer *in vitro* les conditions environnementales et nutritionnelles fournies à la cellule *in vivo*. Elle exclut cependant des cultures de cellules, les méthodes qui permettent de maintenir en survie pendant quelques heures des tissus isolés, organes ou fragments d'organes : cœur, lambeau de vaisseau, fragment d'intestin ou de foie destinés à la réalisation de greffes. En culture cellulaire, il faut distinguer plusieurs notions fondamentales :

- **culture primaire** : mise en culture d'un prélèvement provenant directement d'un organisme vivant,
- **culture secondaire** : mise en culture d'un prélèvement provenant d'une culture préexistante. On parle alors de subculture. Le procédé de prendre un prélèvement de cellules d'une culture et de le remettre dans une autre culture est appelé explantation. On parle également de repiquage mais ce terme est réservé plutôt à un usage en microbiologie,
- **vie** : terme employé pour désigner les cellules *in vivo*,

- **survie** : terme employé pour désigner les cellules *in vitro* du fait qu'elles vont se retrouver dans un environnement différent auquel elles doivent s'adapter.

Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, une cellule a 4 possibilités d'évolution :

- **maintenance** : activité minimale compatible avec une vie normale, ce terme décrit des cellules *in vitro*. L'équivalent fonctionnel de cet état *in vivo* s'appelle quiescence ou G₀,
- **croissance** : désigne la multiplication des cellules *in vitro*. La croissance cellulaire présente deux aspects ; l'aspect trophique ou augmentation de la masse et du volume cellulaire, ainsi que l'aspect plasique ou augmentation du nombre des cellules,
- **différenciation** : aussi appelée spécialisation, est l'expression de fonctions spécifiques d'un tissu donné. La différenciation cellulaire a une base moléculaire ; les cellules diffèrent non pas du fait qu'elles contiennent des gènes différents mais du fait qu'elles activent ou répriment l'expression de gènes différents,
- **apoptose** : mort ou « suicide » cellulaire, génétiquement programmée, conséquence, par exemple, d'une altération non réparée au niveau du génome qui diffère fondamentalement de la nécrose qui est une mort cellulaire accidentelle.

Selon la nature des cellules mises en cultures. On distingue 3 types cellulaires sur la base de deux critères ; la technique de prélèvement et les modalités de mise en culture :

- **cellules en suspension** : il s'agit de cellules naturellement en suspension dans un liquide physiologique comme les cellules du tissu sanguin (granulocytes, monocytes et lymphocytes) en suspension dans le plasma. Le prélèvement se fait par ponction à l'aiguille de quelques millilitres, la culture se fait dans des flacons en utilisant un milieu de culture liquide,
- **cellules matricielles** : dites ainsi car organisées en tissus à consistances « solides » composés de cellules et de matrice extracellulaire. Le prélèvement se fait par biopsie de quelques millimètres cubes. Du fait que ces cellules doivent adhérer à un support solide pour se multiplier, la culture se fait dans des boîtes. L'essentiel des cellules de l'organisme sont des cellules matricielles qui sont organisées en tissus. Les tissus diffèrent par la nature des cellules, la nature de la matrice extracellulaire ainsi que leurs proportions relatives.
- **cellules du liquide amniotique** : il s'agit d'un cas très particulier ; cellules qui sont à l'origine en suspension mais qui se cultivent comme des cellules matricielles. Il s'agit de cellules épithéliales (matricielles) qui proviennent de la desquamation de l'épiderme fœtal. On les utilise pour la réalisation du diagnostic prénatal : c'est une stratégie non invasive, comportant très peu de risques, utilisée pour l'obtention de cellules fœtales.

2- Statuts physiologiques des cellules *in vitro*

2-1- Cellules normales

En culture cellulaire, on appelle cellules normales, des cellules qui ne diffèrent en aucune façon de celles trouvées dans un organisme sain et intact. Par définition, des cellules normales présentent les caractéristiques suivantes :

- **elles ont un caryotype euploïde**, normal, ne comportant aucune anomalie chromosomique de nombre ou de structure visualisable par cytogénétique,
- **elles subissent la sénescence** ou vieillissement cellulaire après un nombre fini de divisions ; un nombre plus ou moins important, qui diffère d'un type cellulaire à un autre.

2-2- Cellules transformées

En culture cellulaire, on appelle cellules transformées des cellules qui possèdent les propriétés des cellules cancéreuses *in vivo*. Elles s'opposent en tous points aux cellules normales. On peut considérer comme cellules transformées des cellules capables de :

- **provoquer l'apparition de tumeurs malignes** quand elles sont greffées à des hôtes appropriés,
- **avoir une multiplication indépendante de l'ancrage** : très souvent les cellules transformées peuvent se multiplier sans être obligées d'adhérer à un support solide. Elles peuvent former des colonies quand on les cultive en suspension dans de l'agarose nutritive semi-molle,
- **perdre la propriété de l'inhibition de contact** : les cellules transformées cultivées en monocouche continuent à se multiplier quand elles ont atteint la confluence, état dans laquelle la totalité de la surface de culture est remplie ; les cellules normales ne le peuvent pas et cessent de se diviser dans ces conditions.

Cependant, il est important de signaler l'existence d'exceptions à ces règles :

- il existe des cas de cellules transformées qui ne peuvent pas former de tumeurs chez l'hôte approprié. À titre d'exemple, on a les cellules lymphoblastoïdes humaines dérivées du lymphome de Burkitt,
- il existe des cas de cellules normales qui ne croissent qu'en suspension comme les lymphocytes. Les chondrocytes normaux (cellules du tissu cartilagineux) présentent une multiplication facultative vis-à-vis de l'ancrage : elles peuvent adhérer à un support solide, sans toutefois y être obligées.

2-3- Cellules non transformées

On donne le nom de « cellule non transformée » à celles qui n'ont aucune des propriétés des cellules manifestement malignes. Il n'est pas facile de tracer la frontière entre le monde des cellules transformées et celui des cellules non transformées. En effet, ces dernières présentent des propriétés intermédiaires entre cellules normales et cellules transformées. Cela suggère que la transformation cancéreuse est un processus multi-étapes dans lequel le statu « non transformée » est une étape intermédiaire avant la transformation. Ce terme s'applique aux cellules aneuploïdes et immortelles qui se multiplient indéfiniment en culture : caractéristiques des cellules transformées, mais elles ont une multiplication dépendante de l'ancrage et présentent le phénomène d'inhibition de contact : caractéristiques des cellules normales. Ces cellules acquièrent plus facilement des propriétés de cellules transformées après exposition à des cancérogènes. Elles ne provoquent pas de tumeurs même lorsqu'on les greffe à des souris « nude » avec une déficience congénitale du thymus.

3- Notion de lignées

Il s'agit d'une population cellulaire qui résulte de plus d'un passage en culture, non compris la primo-explantation et qui possède un certain potentiel à être sub-cultivée.

3-1- Lignées finies (souches cellulaires)

Une lignée finie est une lignée qui possède un potentiel important mais limité à être sub-cultivée. Les lignées finies sont constituées de cellules normales.

3-2- Lignées indéfinies (lignées établies ou lignées permanentes)

Une lignée indéfinie est une lignée qui possède un potentiel illimité à être sub-cultivée. On lui donne aussi le nom de lignée établie, ou de lignée permanente. On préférera le terme de lignée indéfinie qui indique bien le caractère illimité du potentiel de prolifération. Il s'applique aussi bien à des cellules transformées que non transformées.

3-3- Lignées clonales

Une lignée clonale est une lignée définie ou indéfinie constituée de la descendance d'une cellule unique. L'exemple le mieux connu est celui des lignées utilisées pour la fabrication d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps reconnaissent le même épitope car ils sont issus d'une seule lignée de plasmocytes, provenant d'une seule cellule.

Chapitre VI

Anomalies chromosomiques de nombre

1- Définition du concept d'anomalie chromosomique

On appelle anomalie chromosomique tout remaniement du nombre ou de la structure des chromosomes ; tout changement par rapport au caryotype normal. Ces anomalies chromosomiques peuvent être constitutionnelles ou acquises, homogènes ou en mosaïque, de nombre ou de structure, équilibrées ou déséquilibrées (non équilibrées). Un caryotype ne comportant aucune anomalie chromosomique est noté (46,XX ou 46,XY).

1-1- Anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises

a- Constitutionnelle

L'ensemble des cellules de l'individu ont la même anomalie. L'accident chromosomique existait déjà chez l'embryon ; il s'est produit avant la fécondation, dans l'un des gamètes, ou peu après, dans une des cellules du zygote. Le sujet porteur, si l'anomalie est non équilibrée (déséquilibrée) a souvent une dysmorphie et/ou des malformations viscérales, et/ou un retard du développement psychomoteur ; triade révélatrice sur le plan clinique de la présence d'anomalies chromosomiques.

b- Acquise

Un seul organe (ou tissu) est touché, les autres organes (tissus) sont normaux. L'accident chromosomique s'est produit au cours de la vie de l'individu ; il est acquis par rapport au caryotype constitutionnel. Le sujet est porteur d'un processus cancéreux dans la localisation impliquée.

1-2- Anomalies chromosomiques homogènes ou en mosaïques

a- Homogène

L'anomalie chromosomique est dite homogène si toutes les cellules du tissu examiné portent la même anomalie.

- **Exemple 1** : une anomalie constitutionnelle survenue dans un gamète parental (spermatozoïde par exemple) (ex : +21) se retrouvera chez toutes les cellules de l'enfant descendant (une trisomie 21 homogène = 47,XY, +21).
- **Exemple 2** : une anomalie acquise survenue lors d'une leucémie peut être présente sur toutes les cellules sanguines étudiées chez cet individu (si les cellules sanguines normales sont suffisamment inhibées pour que l'on n'en retrouve aucune en mitose (ex : t(9;22)(q34 ;q11) dans la leucémie myéloïde chronique).

b- En mosaïque

L'anomalie chromosomique est dite en mosaïque si certaines cellules du tissu examiné portent l'anomalie alors que d'autres sont normales (notion de clone).

- **Exemple 1** : une anomalie constitutionnelle survenue dans le zygote après plusieurs divisions cellulaires (ex : +21) ne touchera qu'une partie des cellules de l'embryon puis de l'enfant (ex : 46,XY/47,XY, +21).
- **Exemple 2** : une anomalie acquise, dans une leucémie, peut n'être présente que sur une partie des mitoses si des cellules normales entrent en division ; un clone supplémentaire peut porter des anomalies additionnelles (ex : 46,XY/46,XY, t(4;11)/46,XY, t(4;11) i(7) dans une leucémie aigu lymphoblastique).

1-3- Anomalies chromosomiques de nombre ou de structure**a- De nombre**

On parle d'anomalies chromosomiques de nombre si un (des) chromosome(s) est (sont) surnuméraire(s) (trisomie) (ex : +21) ou manquant(s) (monosomie) ex : XO par perte d'un gonosome ou -5q. Le caryotype est toujours déséquilibré lors d'une anomalie de nombre.

b- De structure

On parle d'anomalies chromosomiques de nombre s'il y a cassures chromosomiques et/ou recollements erronés. L'anomalie de structure est dite :

- **équilibrée** : s'il n'y a ni perte ni gain de matériel génétique,
- **déséquilibrée** : s'il en résulte une délétion et/ou une duplication d'un fragment.

2- Classification des anomalies chromosomiques de nombre

Il en existe deux types :

- **aneuploïdie** : une cellule aneuploïde possède un nombre anormal de chromosomes par perte d'un chromosome entier ou présence d'un ou plusieurs chromosomes surnuméraires. Elles résultent d'une mauvaise ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire, les deux chromosomes d'une même paire migrant tous les deux vers la même cellule fille. On obtient une cellule fille avec trois copies du même chromosome (47) et une deuxième cellule fille avec une seule copie (45). Ces mal-ségrégations peuvent s'observer aussi bien au cours de la mitose que de l'une des deux divisions de méiose.

- **polyploïdie** : une cellule polyploïde renferme un multiple de lots haploïdes. C'est accident survenant en général lors de la fécondation plus rarement lors de la gamétogénèse.

2-1- Homogènes par non disjonction méiotique

Un chromosome ne se sépare pas pendant l'anaphase. Une cellule fille recevra les deux chromosomes homologues et l'autre n'en recevra aucun. Une des cellules filles aura alors une trisomie et l'autre une monosomie, qui sont des cas d'aneuploïdie. Une non disjonction en première division produit 4 gamètes déséquilibrés. Le même incident en deuxième division produit 2 gamètes déséquilibrés et 2 normaux.

- Les gamètes possédant un autosome en excès produisent un zygote trisomique : de nombreuses trisomies ne sont pas viables et involuent très précocement, ou sous forme de Fausses Couches Spontanées (FCS) (dont la plus fréquence est la trisomie 16). D'autres sont plus ou moins viables : trisomies 21 (syndrome de Down), 13 (syndrome de Patau), 18 (syndrome d'Edwards), 8 (syndrome de Warkany) ; classés selon un ordre décroissant d'incidence, de l'anomalie la plus fréquente à l'anomalie la plus rare.
- Les gamètes nullosomiques produisent des monosomies. La monosomie 21 serait, si elle s'avère exister, la seule monosomie d'autosome viable. Les monosomies, bien que produites en nombre théoriquement égal aux trisomies, subissent une élimination précoce encore plus stricte.

Les non disjonctions peuvent concerner chaque paire de chromosomes et peuvent être multiples au cours d'une méiose (les non disjonction multiples impliquent souvent un gonosome). Il ne s'agit pas d'un événement rare, mais d'un phénomène très fréquent, compensé le plus souvent par l'élimination précoce du conceptus déséquilibré.

Concernant les anomalies chromosomiques de nombre des autosomes par non-disjonction méiotique : chez l'homme les 4 types de gamètes représentés figurent effectivement dans le sperme. Chez la femme un seul participera à la fécondation, les trois autres étant des globules polaires, éliminés.

Pour les gonosomes, la viabilité des conceptus déséquilibrés est plus grande, et le phénomène de non disjonction apparaît alors, dans la grande variété de ses conséquences : OO, XO, YO, YY, XXY, XYY ... etc. Les anomalies de nombre viables des gonosomes sont représentées par 3 trisomies et 1 monosomie : le syndrome de Klinefelter (47,XXY), le syndrome dit « triple X » (47,XXX), le syndrome dit des « supers-males » (47,XYY). Le syndrome de Turner (45,XO) représente la seule monosomie viable des gonosomes.

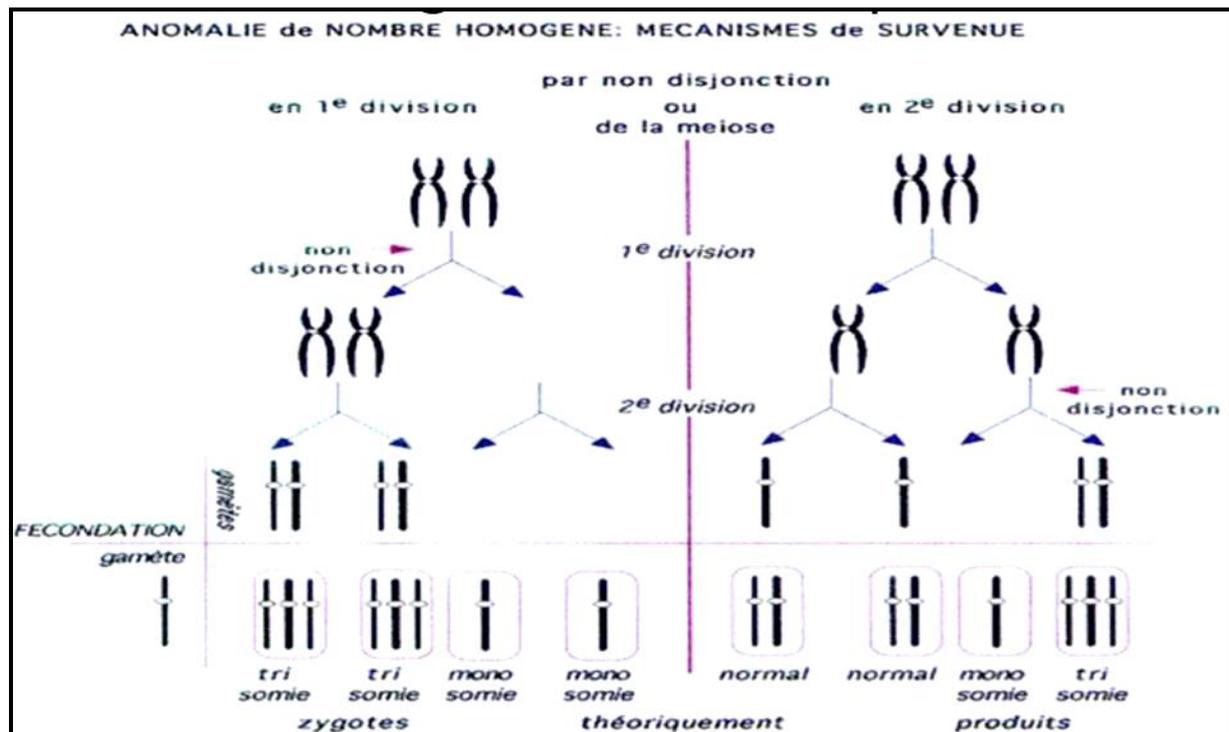


Figure 25 : Mécanismes de survenue des non disjonctions méiotiques (Huret *et al.*, 2012).

Une disjonction anormale des chromosomes homologues en méiose I, ou une migration vers un même pôle cellulaire des chromatides en méiose II, crée des gamètes avec un nombre anormal de chromosomes : soit un chromosome est surnuméraire, soit il manque. Cette répartition anormale des chromosomes dans les gamètes conduit, après fécondation, à des trisomies ou à des monosomies.

2-2- Homogènes par anomalie de la fécondation

Ces accidents de la fécondation sont donc banals et sont estimés à 2 à 3 % des œufs fécondés et entraînent une polypléidie. Une polypléidie est définie par un nombre de chromosome supérieur à une diploïdie ($> 2N$).

a- Triploïdies

Avec un caryotype de $3N = 69$ chromosomes (69,XXX ou 69,XXY ou 69,XYY). Présentes dans 20 % des fausses couches spontanées, elles peuvent aboutir à la naissance d'enfants vivants, qui meurent cependant très rapidement. Le mécanisme de formation des triploïdies est double :

- **la digynie** : non expulsion du 2^{ème} globule polaire (spermatozoïde $1N$ + ovule $2N$).
- **la diandrie** : fécondation d'un ovocyte normal par 2 spermatozoïdes normaux (spermatozoïde $1N$ + spermatozoïde $1N$ + ovule $1N$). Il est à noter que la diandrie est 4 fois plus fréquente que la digynie.

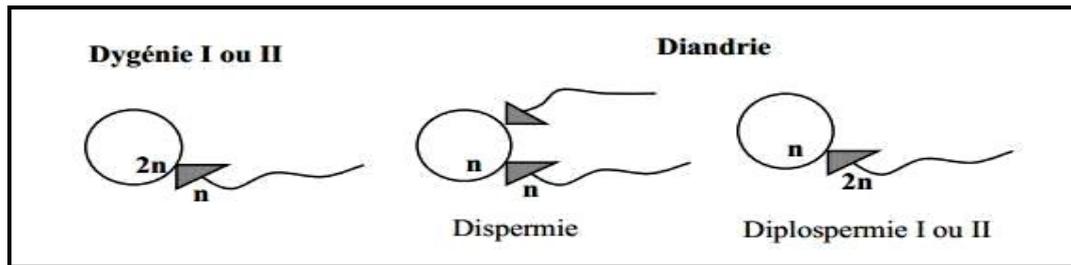


Figure 26 : Mécanismes de survenue des anomalies de la fécondation (Huret *et al.*, 2012).

b- Tétraploïdies

Avec un caryotype de $4N = 92$ chromosomes (très rares naissances vivantes décrites, rapidement fatales). Présentes dans 6 % des fausses couches spontanées.

Lors de la fécondation, il se peut qu'il y'ai la formation de deux embryons différents à $2N$ chacun (conduisant si le processus suit son cours normal à un jumeaux dizygote). Il peut se produire une fusion des deux embryons conduisant à un fœtus à $4N$.

2-3- Anomalies chromosomiques de nombre en mosaïques

Un individu en mosaïque est constitué de deux (ou plus de deux) populations à contenu chromosomique différent, mais provenant du même zygote. Une mosaïque est notée par une barre oblique entre les 2 clones (ex : une trisomie 21 en mosaïque $46,XY / 47,XY, +21$). Elle a pour cause une non-disjonction mitotique : 1 cellule fille emportera 3 chromatides sur les 4, l'autre cellule fille n'emportant qu'un chromatide. Les autres cellules présentes chez ce zygote se divisent normalement. L'intensité du phénotype dépend du dosage respectif de ces deux populations cellulaires et ce en fonction de la composition variable :

- **précocité de la (ou des) non disjonction(s) mitotique(s)** : si l'événement est zygotique (ex : $45,X / 47,XXX$ sans aucune cellule à 46) ou post-zygotique (ex : $45,XO / 46,XX / 47,XXX$). Si l'accident s'est produit au stade 32 ou 64 cellules, une partie ou aucune cellule de l'embryon (ne) sera affecté si l'aberration touchera les cellules qui constituent les annexes embryonnaires.
- **répartition des populations cellulaires au cours de l'embryogénèse** : la proportion des différents clones peut varier d'un organe à l'autre.
- **pression de sélection** : les populations cellulaires peuvent réagir de façon différente avoir *in vivo* une cinétique de croissance variable avec un avantage d'un clone sur un autre (ou une combinaison chromosomique parfois létale).

Chapitre VII

Anomalies chromosomiques de structure

Les aberrations chromosomiques structurales sont moins fréquentes que les anomalies de nombres. Elles sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies d'un ou plusieurs remaniements anormaux.

1- Notion d'anomalies chromosomiques de structure

Les chromosomes peuvent subir des cassures suivies de recollement des extrémités libres. Le chromosome peut se recoller comme il était ou bien de manière erronée. Les anomalies chromosomiques de structure sont le résultat de cassures des chromosomes durant la méiose suivie de recollements anormaux. Ces anomalies sont aléatoires mais il existe des sites préférentiels, conduisant à des anomalies dites « récurrentes ». Les cassures peuvent affecter tous les chromosomes, y compris les bras courts des acrocentriques.

L'apparition de cassures chromosomiques est un phénomène cellulaire banal compensé par l'action de systèmes de réparation. On connaît des pathologies de ces systèmes chez l'homme qui augmentent la probabilité de survenue de ces cassures, d'autres facteurs environnementaux peuvent également être impliqués. En effet, les cassures chromosomiques peuvent survenir spontanément ou être induits par des agents clastogènes (cassant les chromosomes) tels que les radiations ionisantes, certains virus, divers produits chimiques.

Le plus souvent, le site de cassure ne se trouve pas dans une séquence codante. Aucune conséquence phénotypique ne sera alors constatée. En génétique, sur un plan chromosomique, il faudra tenir compte de ces deux notions :

- ce qui compte pour un individu, c'est de posséder une double copie du message de l'espèce, pas plus et pas moins. Ceci est vrai pour l'embryon, où un déséquilibre de dosage génique entraîne un développement anormal, et donc une pathologie constitutionnelle (trisomie 21). Ceci est également valable en oncogénétique.
- un recollement erroné de segment chromosomique peut inactiver un gène important ou donner naissance à un gène hybride qui coderait pour une protéine chimérique de fusion ayant des propriétés particulières (oncogéniques par exemple).

Les anomalies chromosomiques de structure peuvent être équilibrées ou déséquilibrées. Une délétion, une duplication ou la formation d'un isochromosome se traduiront par un phénotype anormal, il s'agit d'anomalies déséquilibrées tandis que l'insertion, l'inversion, ainsi que la translocation peuvent être équilibrées. Ceci signifie que les porteurs de ces anomalies de structures sont phénotypiquement sains, car la totalité du matériel génétique est présente. Ces réarrangements peuvent porter sur un seul ou plusieurs chromosomes et peuvent être transmises (anomalie familiale) ou *de novo*.

2- Classification des anomalies chromosomiques de structure

2-1- Translocation réciproque

Il s'agit d'un échange de matériel entre deux chromosomes non homologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués. Si cet échange s'accompagne d'une perte de matériel génétique, il est déséquilibré sinon la translocation est dite équilibrée (figure 27).

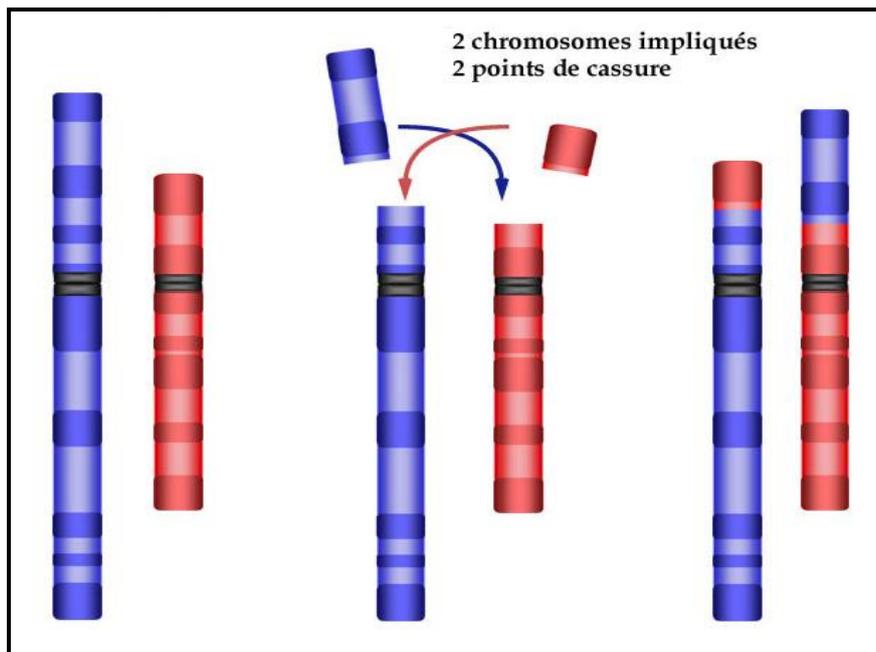


Figure 27 : Mécanisme de survenue d'une translocation réciproque (Turleau *et al.*, 2000).

Les translocations réciproques résultent de cassures qui surviennent classiquement au niveau des chromatides de deux chromosomes non homologues, habituellement le point de cassure est en dehors de la région juxta-centromérique, suivies d'un échange segmentaire réciproque entre ces deux chromosomes donnant naissance à deux dérivés. Tous les chromosomes peuvent être concernés par un tel réarrangement. Environ 90% des translocations réciproques sont équilibrées et dans 10% des cas, elles peuvent s'accompagner de micro-délétions et donc interrompre la séquence d'un gène occasionnant ainsi une expression phénotypique anormale. Le sujet porteur de translocations réciproques équilibrés est de phénotype normal. Cependant, ils exposent à des mal-ségrégations lors de la méiose, surtout s'il existe un acrocentrique dans la translocation, ce qui provoque alors un déséquilibre.

Certaines translocations sont dites complexes ; le même processus peut s'effectuer avec 3 (ou plus) chromosomes, et des transferts de segments en chaîne entre les chromosomes concernés. Ces translocations ne peuvent être mis en évidence correctement par la cytogénétique standard. Les techniques de cytogénétique moléculaire ont montré que ces translocations complexes sont relativement fréquentes.

Les translocations réciproques peuvent intervenir à n'importe quel moment au cours de la vie ; elles s'observent assez fréquemment dans les processus cancéreux, particulièrement en onco-hématologie (leucémies et lymphomes).

Une translocation est notée t, suivi d'une parenthèse indiquant les numéros des 2 chromosomes impliqués, séparés d'un point-virgule ; une deuxième parenthèse indique les points de cassure sur chacun des 2 chromosomes, séparés aussi d'un point-virgule. Exemple : $t(9;22)(q34;q11)$; première anomalie cytogénétique acquise, récurrente et spécifique d'un processus cancéreux, à savoir la leucémie myéloïde chronique (**figure 28**).

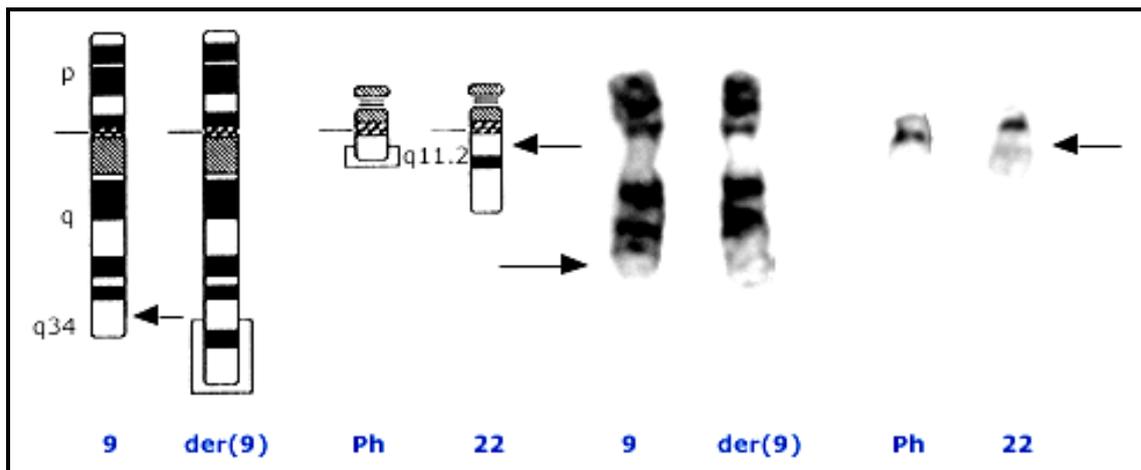


Figure 28 : La translocation $t(9;22)(q34;q11)$ spécifique de la leucémie myéloïde chronique (Huret *et al.*, 2012).

2-2- Translocation Robertsoniennes

Les translocations Robertsoniennes se produisent entre chromosomes acrocentriques ou par fusion centromérique, soit par cassure dans les régions juxta-centromériques. 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).

La fusion de 2 acrocentriques par cassure-recollement à proximité des centromères, plus souvent sur les bras p, engendrant alors un chromosome dicentrique (dic), possédant deux centromères. L'un des deux centromères est généralement inactivé, permettant au chromosome remanié de se comporter comme un monocentrique, sans problème de ségrégation à l'anaphase. Le chromosome remanié comporte dans tous les cas les bras longs des 2 acrocentriques concernés, alors que les bras courts sont généralement perdus. Le caryotype est pourtant dit équilibré, parce que la perte des bras courts de 2 acrocentriques est sans retentissement phénotypique. Le caryotype du porteur à phénotype normal comporte alors 45 chromosomes (**figure 29**).

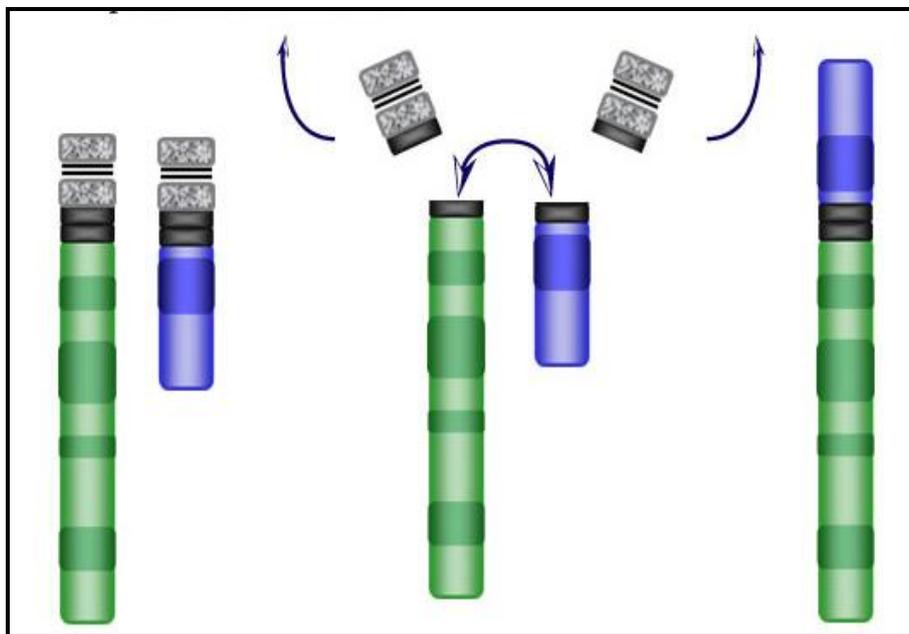


Figure 29 : Mécanisme de survenue d'une translocation Robertsonienne (Turleau *et al.*, 2000).

Cette anomalie est notée t, suivi d'une parenthèse indiquant le numéro de chaque chromosome suivi de la notation q (exemple : t(13q22q)).

Cette translocation représente l'anomalie chromosomique la plus fréquente dans la population humaine. Elles peuvent survenir *de novo*, ou être transmises. Elles exposent à la constitution de gamètes déséquilibrés, graves pour les chromosomes 13 et 21 surtout, car viables en trisomie. Toutes les combinaisons entre acrocentriques ne sont pas aussi fréquentes ; la plus fréquente est la t(14q21q).

2-3- Délétion

Perte d'un segment au sein d'un chromosome ce qui implique notamment la perte des gènes portés par ce segment. Cette anomalie est définie comme étant une « monosomie » partielle. Ce remaniement chromosomique est noté del. Dans le cas d'une délétion interstitielle ce sigle est suivi du numéro du chromosome dans une première parenthèse, suivi dans une deuxième parenthèse des 2 points de cassure indiquant la région délétée (exemple : del(3)(q21q34)). Dans le cas où la délétion semble terminale, un seul point de cassure est noté (exemple : del(19)(q23ter)) (**figure 30**).

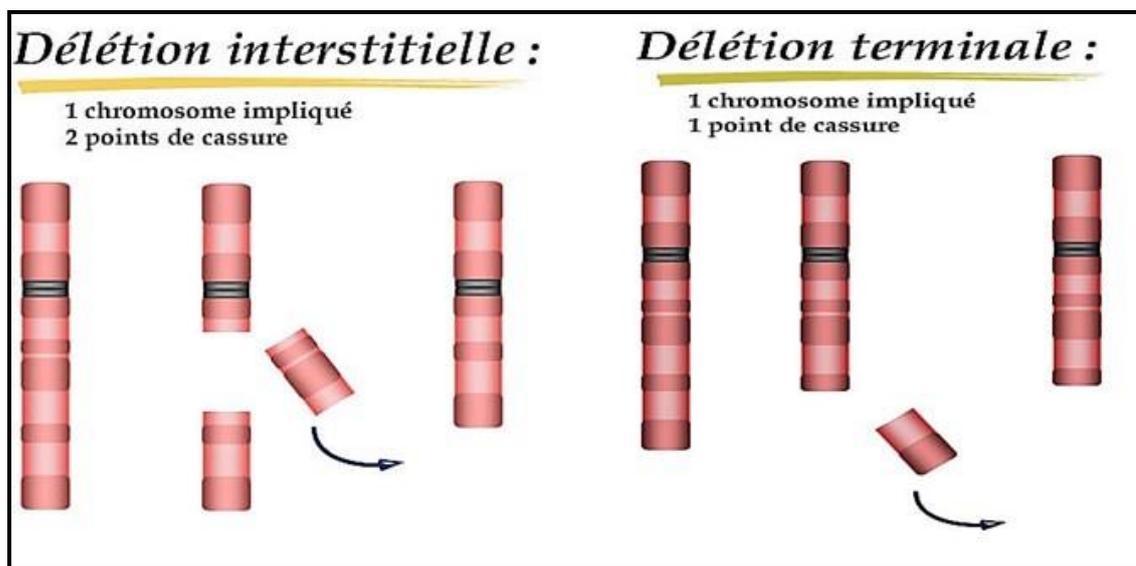


Figure 30 : Mécanismes de survenue des délétions (Turleau *et al.*, 2000).

Il a été constaté qu'un chromosome ne peut être stable que s'il porte à chaque extrémité un télomère, structure particulière qui "ferme" le chromosome. Ainsi, toute délétion serait nécessairement de type interstitiel. Ceci a été récemment démontré par diverses techniques de cytogénétique moléculaire. Ces délétions peuvent être constitutionnelles ou acquises.

2-4- Microdélétions

Il s'agit, comme leur nom le suggère, d'une catégorie particulière de délétions de toute petite taille dont la caractéristique principale est de ne pas être visible sur le caryotype standard. À l'occasion d'un remaniement chromosomique, il peut y avoir perte d'un petit fragment responsable de l'apparition de signes cliniques, malgré l'aspect apparemment équilibré du caryotype standard.

Différents syndromes cliniques sont la conséquence de telles micro-délétions : syndrome de Prader-Willi et syndrome d'Angelman (microdélétion du chromosome 15), syndrome de Di-George (microdélétion du chromosome 22), syndrome de Smith-Magenis et syndrome de Miller-Dieker (microdélétion du chromosome 17), syndrome de Rubinstein Taybi (microdélétion du chromosome 16), syndrome de Wolf Hirschhorn (microdélétion du chromosome 4).

2-5- Chromosome en anneau

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. Il s'agit d'un chromosome de forme circulaire avec toujours une anomalie déséquilibrée. Les délétions plus ou moins étendues, mais qui sont souvent peu importantes, aux deux extrémités d'un chromosome et recollement du segment intermédiaire par absence de télomères, aboutit à une structure annulaire (**figure 31**).

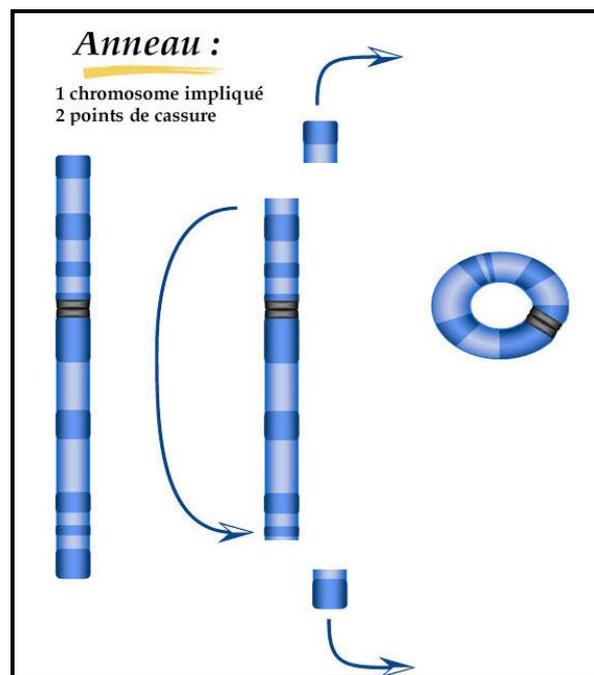


Figure 31 : Mécanismes de formation d'un chromosome en anneau (Turleau *et al.*, 2000).

Noté : r(ring), suivi du numéro du chromosome dans une parenthèse, suivi éventuellement d'une deuxième parenthèse indiquant les points de cassure, si ceux-ci sont localisables (exemple : r(13)(p12q33)). Comme les anneaux se réarrangent sans cesse, les points de cassures varient, et leur notation n'est pas forcément pertinente.

Cette anomalie est très rarement transmise à la descendance car un chromosome en anneau est particulièrement instable), donc le plus souvent *de novo*. Phénotypiquement, le retentissement peut donc être celui d'une délétion, mais aussi d'une duplication. L'anomalie la plus fréquemment rencontrée est l'anneau du chromosome 13.

2-6- Inversion

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 quand le centromère est inclus dans le segment intermédiaire et paracentrique, quand les cassures se sont produites dans le même bras (**figure 32**).

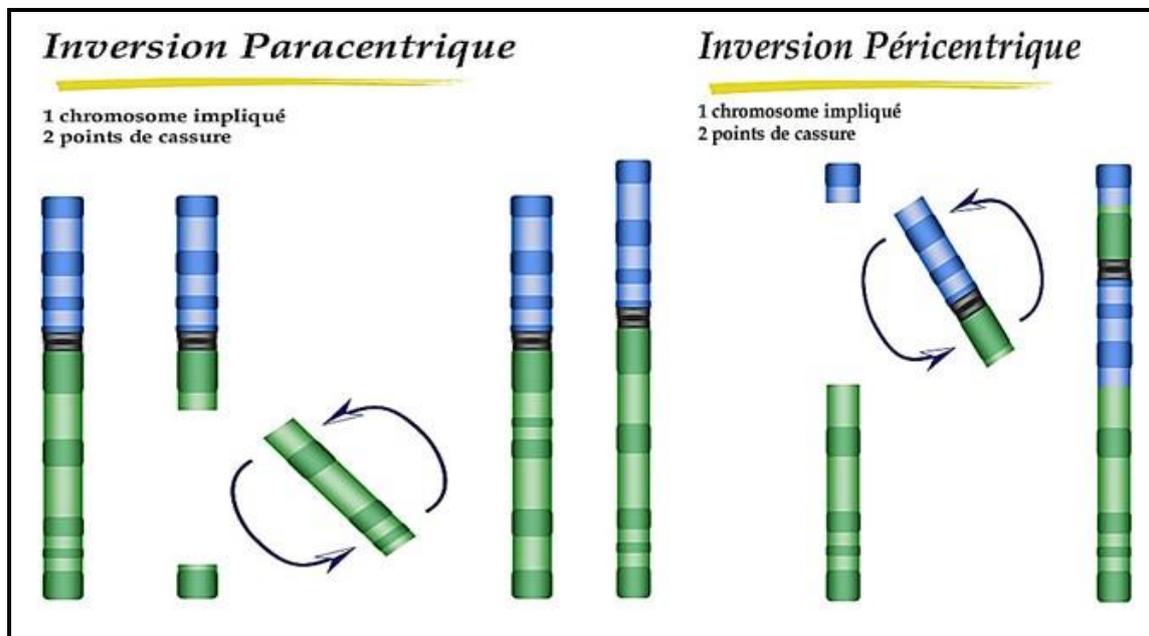


Figure 32 : Mécanismes de survenue des inversions chromosomiques (Turleau *et al.*, 2000).

a- Inversion paracentrique

Dans les inversions paracentriques, les deux cassures sont sur le même bras chromosomique et le recollement se produit après inversion du fragment. L'indice centromérique n'est pas modifié. Cette anomalie ne peut être détectée que par la modification des bandes chromosomiques. Remaniement rare et/ou souvent non détecté, les plus fréquemment rencontrées sont celles des chromosomes 3, 7 ou 14. Les sujets porteurs d'une inversion paracentrique sont souvent fertiles, les hommes autant que les femmes, leur descendance est pratiquement pour moitié de sujets normaux et pour l'autre moitié des sujets porteurs de l'anomalie.

b- Inversion péricentrique

Dans les inversions péricentrique, les deux cassures sont sur le chromosome, une de chaque côté du centromère. Recollement après inversion du fragment centromérique, avec pour conséquence une modification de l'indice centromérique du chromosome. Certaines inversions péricentriques sont très fréquentes et on les inclut dans les variants chromosomiques (polymorphisme) plutôt que dans les anomalies. À titre d'exemple, $inv(9)(p11q13)$, l'inversion péricentrique du chromosome 9 existe chez un sujet pour 400 environ (fréquence hautement variable en fonction de l'origine ethnique) grandes variations géographiques). Sans conséquence phénotypique, sa totale innocuité est encore controversée. La plus fréquente ; $inv(Y)$ existe chez 1 à 2 sujets sur 1000 sujets masculins. Cette inversion péricentrique peut provoquer des fausses couches spontanées, parfois une infertilité chez l'homme, et des anomalies de la recombinaison à la méiose.

2-7- Isochromosome

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. La perte d'un bras entier d'un chromosome « remplacé » par la duplication de l'autre bras. Techniquement parlant, c'est en quelque sorte l'équivalent d'une monosomie pour un bras et d'une trisomie pour l'autre, et donc c'est un remaniement déséquilibré.

Il est noté *i* suivi d'une parenthèse indiquant le numéro du chromosome impliqué et la lettre du bras dupliqué. Par exemple : $i(17q)$ si cela concerne le bras long en entier, ou $i(17)(q10)$: perte du bras p et duplication partiel du bras q. Les mécanismes de formation d'un isochromosome sont variés :

- s'il s'est formé en 1^{ère} division de la méiose, le matériel génétique dupliqué sera hétérozygote ;
- s'il est formé en 2^{ème} division de méiose ou au cours d'une mitose, le matériel génétique dupliqué sera homozygote.

2-8- Insertion

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 et dans son orientation habituelle ou inversée. Autre cas particulier de translocation où un fragment de chromosome est inséré au sein d'un autre. Cette anomalie nécessite trois points de cassure. 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. Il s'agit d'un remaniement chromosomique équilibré (**figure 33**).

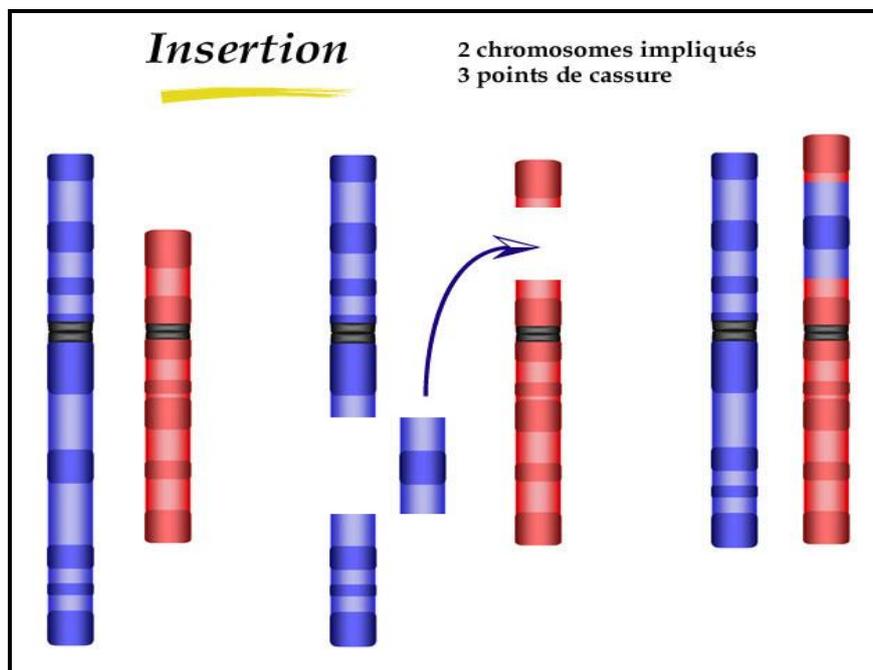


Figure 33 : Mécanismes de survenue des insertions chromosomiques (Turleau *et al.*, 2000).

Il est noté *ins*, suivi d'une parenthèse indiquant le numéro du chromosome qui reçoit l'insertion, suivie éventuellement d'un point-virgule indiquant le numéro du chromosome donneur du segment (si ce chromosome n'est pas le même que celui qui reçoit), suivi d'une deuxième parenthèse indiquant le point d'insertion suivi d'un point-virgule seulement si le chromosome donneur est différent, suivi des points de cassure du fragment.

À titre d'exemple :

- ***ins*(2)(p13q31q34)** : le fragment q31q34 d'un chromosome 2 est inséré respectivement en p13 du même chromosome 2.
- ***ins*(5;2)(p12;q31q34)** : dans ce cas, le fragment q31q34 d'un chromosome 2 est inséré sur un chromosome 5 en p12.

Une insertion peut être :

- **directe (dir ins)** : si le fragment garde son orientation par rapport au centromère (la bande la plus proximale restant la plus proche du centromère).
- **inversée (inv ins)** : si la bande la plus proximale du fragment se retrouve la plus éloignée du centromère. À titre d'exemple si les deux insertions précédentes été des insertions inversées la formule chromosomique serait : $\text{ins}(2)(p13q34q31)$ et $\text{ins}(5;2)(p12;q34q31)$.

L'insertion chromosomique est une aberration peut rester équilibrée et stable dans les cellules somatiques au cours des générations cellulaires. Mais elle est très instable en méiose et conduit à la survenue d'autres anomalies chromosomiques de nombre ou de structure.

2-9- Duplication

Lors de ce remaniement, un fragment d'ADN sera répété n fois. Ces répétitions peuvent être en tandem : un segment de chromosome se duplique *in situ* (1 ou plusieurs fois) sur ce chromosome, le fragment dupliqué gardant la même orientation que le fragment original ou sera en miroir ; le fragment dupliqué prend une orientation inverse du fragment original. Le fragment dupliqué pourra également être inséré dans un autre chromosome. Ce remaniement est toujours déséquilibré (**figure 34**).

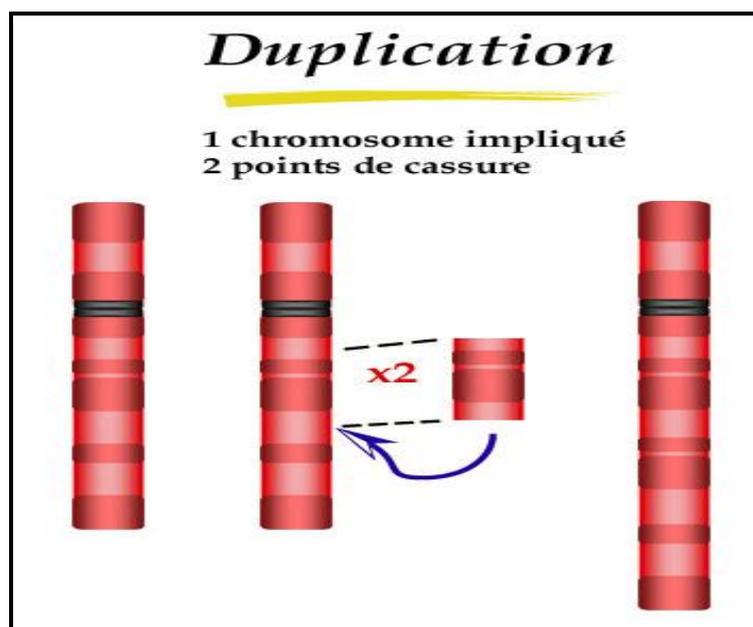


Figure 34 : Mécanismes de survenue des duplications chromosomiques (Turleau *et al.*, 2000).

Ce réarrangement est noté dup, suivi du numéro du chromosome dans une première parenthèse, suivi dans une deuxième parenthèse des 2 points de cassure indiquant la région dupliquée. À titre d'exemple : dup(2)(p14p23) et dup(8)(p23p21).

Il s'agit de remaniements pouvant aboutir à une trisomie partielle dont l'expression phénotypique est dépendante du segment dupliqué.

2-10- Dicentrique

Il s'agit d'un chromosome possédant deux centromères issus de mécanismes variés. C'est un remaniement déséquilibré noté dic, ou psu dic (pseudo dicentrique), quand l'un des deux centromères s'inactive. Fréquent en cas de translocation Robertsoniennes, ce remaniement est exceptionnel en cas de translocation n'impliquant pas au moins un bras court d'acrocentrique. Rare en tant qu'anomalie acquise.

Du fait que la distance inter-centromérique soit très faible, un dicentrique (autre qu'un chromosome dicentrique résultant d'une translocation Robertsonienne) est hautement instable à moins que l'un des centromères ne s'inactive. Les seules preuves de la présence de deux centromères actifs sont : la visualisation de ponts anaphasiques, la constatation de non disjonctions, la présence d'isochromosomes de chacun des deux chromosomes concernés. La preuve de l'inactivation d'un centromère est facilement apportée lorsque les deux chromatides, au niveau de ce centromère, sont largement écartées en lieu de la constriction.

2-11- Remaniements complexes

Impliquant plus de 2 chromosomes et/ou plus de 3 points de cassures. Fréquents chez des enfants malformés. Fréquent également dans beaucoup de tumeurs solides et de lymphomes.

2-12- Marqueur

Élément chromosomique non reconnaissable, noté Mar ; soit un petit élément supplémentaire au caryotype constitutionnel, avec ou sans retentissement phénotypique, soit un élément de taille variable, souvent importante, présent dans un processus cancéreux. Les techniques de cytogénétique moléculaire ont montré que ce sont des chromosomes hautement remaniés, comportant des segments de chromosomes variés.

2-13- Fragments double minute

Appelé également HSR pour Homogeneously Staining Region, il s'agit d'un très petit(s) élément(s) supplémentaire(s), souvent par 2, acentriques ; généralement très nombreux. Notés HSR pour : région de coloration homogène et de taille variable, souvent importante, présente au sein d'un ou de plusieurs chromosome(s). Expérimentalement, les HSR peuvent se rencontrer après une exposition chronique à certains toxiques. Ce sont des éléments hautement corrélés à la présence d'une amplification génique importante. Se rencontrent lors des processus malins, en particulier en cas de tumeur solide.

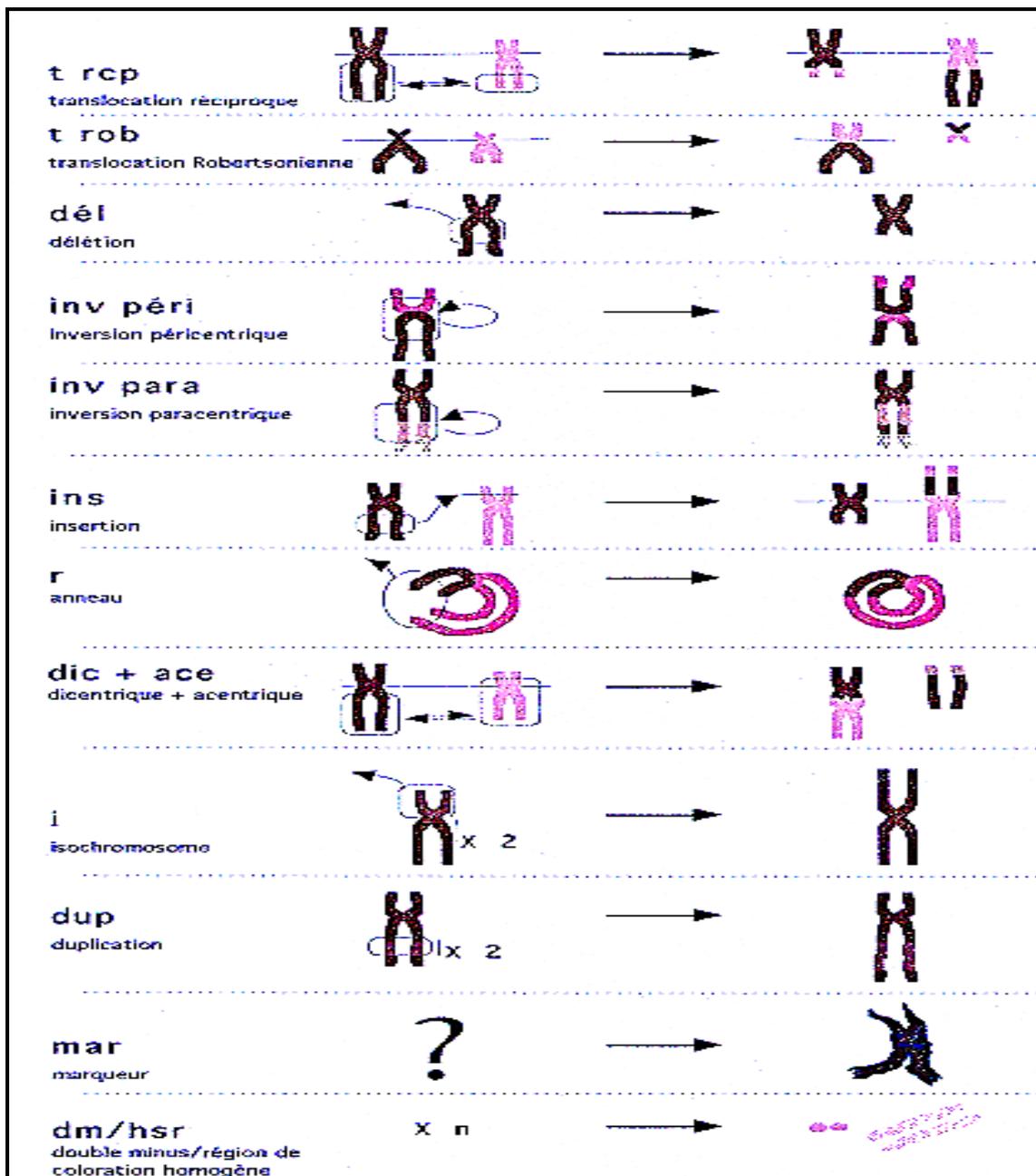


Figure 35 : Récapitulatif des anomalies chromosomiques de structure (Huret *et al.*, 2012).

Chapitre VIII

Systeme de Nomenclature
Internationale en Cytogénétique
(ISCN)

Le système international de nomenclature cytogénétique humaine (ISCN : International System of Cytogenetic Nomenclature) a servi de référence centrale et consensus pour décrire le complément chromosomique humain depuis 1960. Des itérations multiples de ce système ont évolué. La dernière version d'ISCN, ISCN 2013, a été publiée en Novembre 2012. La communauté cytogénétique mondiale s'efforce dans la description et l'interprétation des rapports des caryotypes normaux et anormaux, indépendamment de la méthode d'évaluation technique qui a été utilisée. Comme le domaine de la cytogénétique continue à s'élargir pour inclure plusieurs technologies moléculaires, des révisions de la nomenclature cytogénétique sont essentielles pour des descriptions précises des anomalies. De plus, comme l'utilisation de la cytogénétique dans l'oncologie continue d'augmenter, l'utilisation de la nomenclature cytogénétique des néoplasmes continue à devenir plus bien définie. L'utilisation de la nomenclature ISCN la plus récente est fortement recommandée ou parfois nécessaire pour les rapports de diagnostic cytogénétiques et les publications cytogénétiques.

1- Règles générales

La formule chromosomique comporte toujours en premier le nombre total de chromosome (chromosomes sexuels compris) suivi d'une virgule puis, sans espace, de l'énumération des chromosomes sexuels normaux. Ainsi le caryotype normal est désigné de la façon suivante :

- **46,XX** caryotype féminin sans anomalie détectée,
- **46,XY** caryotype masculin sans anomalie détectée.

En onco-hématologie le nombre de mitoses étudiées doit être indiqué entre crochet, sans espace après la formule chromosomique : exemple : 46,XX[15] caryotype féminin sans anomalie détectée dans les 15 mitoses étudiées.

2- Descriptions des remaniements

Pour la description des remaniements, les anomalies des chromosomes sexuels sont toujours présentées en premier, celles concernant le chromosome X puis celles concernant le chromosome Y (par exemple 48,XXY,+21), suivies des anomalies des autosomes qui sont répertoriées dans l'ordre croissant des numéros chromosomiques, indépendamment du type de l'aberration.

Par exemple : 48,XXY,+21,t(10;16)(p14;q12),t(15;21)(q31;q11).

- La formule chromosomique est écrite d'un seul tenant, sans espace, ponctuée par des virgules,
- Des symboles ou des abréviations sont utilisés pour désigner les anomalies,
- Le chromosome impliqué est mis entre parenthèses (ex.: inv(2), del(4)...) si plusieurs chromosomes sont impliqués, ils sont séparés par un ; (ex.: t(10;16)(p12;q12)),
- Pour chaque chromosome, les anomalies de nombre sont présentées avant les anomalies de structure, les anomalies de structure sont écrites par ordre alphabétique de leur abréviation. Viennent ensuite les dérivés dont le centromère n'est pas identifié, puis les anneaux non identifiés, les marqueurs non identifiés et enfin les doubles minutes.
- Les changements de nombre des chromosomes sexuels ne sont pas précédés par un signe, sauf pour les anomalies acquises. À titre d'exemple : 45,X : monosomie X (syndrome de Turner), 45,X,-Y : perte du chromosome Y, anomalie acquise chez un homme constitutionnellement 46,XY, 47,XXY : syndrome de Klinefelter, 47,XXX : trisomie X, 47,XX,+X : trisomie X acquise chez une femme constitutionnellement 46,XX.
- Délétion du bras court du chromosome 1 avec le point de cassure dans la bande p36.3 pour un sexe masculin : 46,XY,del(1)(p36.3)
- Anneaux : 46,XY,r(2)(p21q31)
- Duplications : 46,XX,dup(2)(p14p23)
- Isochromosomes : 46,XX,i(17)(q10)
- Inversions : 46,XY,inv(2)(p12q31)
- Insertions intra-chromosomiques : 46,XX,ins(2)(p13q21q31)
- Pour l'insertion, on écrit d'abord le point de cassure receveur puis les points de cassure du segment inséré : ins(2)(q13p13p23) = insertion (direct) en 2q13 du segment 2p13->p23.
- 46,XY,ins(2)(p13q31q21) insertion inversée : le segment inséré est le même que ci-dessus, mais cette fois la bande 2q31 est plus proche du centromère que la bande 2q21.
- Recombinants : 46,XX,rec(2)dup(2p)inv(2)(p21q31)mat. Ces chromosomes ont pour origine un crossing-over survenu lors de la méiose chez les sujets porteurs d'une inversion ou d'une insertion intra-chromosomique. Si le remaniement parental n'est pas connu, préférer le terme de dérivé.
- Sites fragiles : 46,XX, fra(X)(q27.3)
- Translocations Robertsoniennes : der ou rob (uniquement constitutionnelles). ex.: 45,XX,rob(14;21)(q10;q10), ex.: 45,XX,der(14;21)(q10;q10)
- Réciproques : t ex.: 46,XY,t(10;16)(p13;p13.3)
- Translocations complexes : ex.:46,XX,t(2;5;7) (p21;q22;q23)

3- Polymorphisme chromosomique

Le nombre et la morphologie générale des chromosomes sont les mêmes pour tous les individus. Les régions d'hétérochromatine peuvent être le site de variations interindividuelles, sans conséquences phénotypiques. Ces polymorphismes chromosomiques portent souvent sur la longueur de l'hétérochromatine des bras longs de l'Y, des chromosomes 1, 9 et 16 et sur les bras courts des acrocentriques. Ils sont décrits par le numéro du chromosome puis par le bras chromosomique et éventuellement la bande chromosomique puis h pour hétérochromatine, stk pour les tiges des satellites, s pour les satellites.

4- Mosaïques

La description finale du caryotype répertorie seulement les caryotypes des clones confirmés ou des sous-clones. Un clone (ou lignée cellulaire) est défini comme :

- 1 cellule normale,
- 2 cellules ayant le même chromosome surnuméraire ou le même réarrangement,
- 3 cellules ayant perdu le même chromosome.

Si plusieurs clones existent, les caryotypes sont présentés dans l'ordre décroissant du nombre de cellules de chacun des clones mais le clone normal est toujours écrit en dernier. Si les clones anormaux sont de même taille, d'abord les clones avec une anomalie numérique, par ordre ceux qui ont une anomalie gonosomique, puis par ordre croissant de chromosomes s'ils sont plusieurs, puis les clones avec anomalies de structure. Les différents clones sont séparés par une barre inclinée (/) et le nombre de cellules de chaque clone indiqué entre crochets [] juste après la formule sans espace. Pour les mosaïques constitutionnelles le symbole mos suivi d'un espace peut être mis devant la formule.

À titre d'exemples :

- mos 45,X[15]/47,XXX[10]/46,XX[23] ou 45,X[15]/47,XXX[10]/46,XX[23]
- mos 45,X[25]/46,X,i(X)(q10)[25] ou 45,X[25]/46,X,i(X)(q10)[25]

5- Désignations et symboles particulier

5-1- Segment chromosomique d'origine inconnue

Le terme add est utilisé pour indiquer qu'un chromosome a reçu un segment chromosomique non identifié. Ce chromosome est délété pour le segment distal au point de cassure. En fonction du point de cassure et de la longueur du segment inconnu ajouté, le bras du chromosome sera plus long ou plus court. La désignation « p+ » ou « p- » peut être utilisée dans le texte mais pas dans la formule. À titre d'exemple : 46,XY,add(12)(q13) présence d'un segment chromosomique d'origine inconnue sur le bras long d'un chromosome 12 à partir de la bande 12q13.

5-2- Multiples copies

Le signe multiplié (x) est utilisé pour indiquer qu'un chromosome anormal existe en plusieurs exemplaires. Il ne peut pas être utilisé pour des chromosomes normaux. À titre d'exemple :

- 46,XX,del(6)(q13q23)x2 indique que la même délétion intercalaire est observée sur les deux chromosomes 6.
- une tétrasomie du chromosome 8 est indiquée : 48,XX,+8,+8 et non 48,XX,+8x2

5-3- Incertitude

Un point d'interrogation (?) indique que l'identification du chromosome ou du remaniement n'est pas sûre. Il est placé avant le terme incertain. Il peut aussi remplacer le numéro du chromosome, la région ou la bande.

- un signe approximatif (~) est utilisé pour indiquer l'intervalle d'incertitude.
- le terme or indique une interprétation alternative.
- le terme inc est utilisé pour signifier que l'analyse du caryotype est incomplète et qu'il existe probablement d'autres anomalies non spécifiées.

À titre d'exemple :

- 47,XX,+?8 : le chromosome surnuméraire est probablement un chromosome 8.
- 46,XY,del(1)(q2?) : le point de cassure est dans la région 1q2 mais il n'est pas possible de déterminer dans quelle bande.

- 46,XY,?del(1)(q43) : la délétion du chromosome 1 avec un point de cassure en 1q43 est incertaine.
- 46,XX,del(1)(q21~24) : le point de cassure de la délétion terminale est dans le segment 1q21→1q24 mais on ne peut préciser dans quelle bande.
- 43~47,XX,... : le nombre de chromosomes est entre 43 et 47.
- 46,XY,add(19)(p13 or q13) : le chromosome 19 porte un segment surajouté soit sur son bras court soit sur son bras long.
- 46,XX,der(1)t(1;10)(q44;q22) or dup(1)(q32q44) : le remaniement du chromosome 1 est, soit le dérivé d'une translocation d'une partie du bras long du chromosome 10 au niveau de la bande 1q44, soit une duplication du segment 1q32→1q44.
- 46,XY,del(1)(q21),inc : la présence d'une délétion et probablement d'autres anomalies chromosomiques non identifiées.

Tableau IV : Liste des principales abréviations utilisées en cytogénétique (Shaffer *et al.*, 2013).

Abréviation	Signification
Ad	Présence de matériel chromosomique d'origine inconnue sur un chromosome.
C	Anomalie constitutionnelle. Utilisé pour la distinguer des anomalies acquises au sein d'un caryotype tumoral chez un patient dont le caryotype constitutionnel est anormal.
Chi	Chimère. Permet de préciser si l'anomalie observée résulte d'une constitution chimérique (fusion de deux œufs distincts de caryotype différents).
Der	Chromosome dérivé ; désigne le chromosome réarrangé par un remaniement chromosomique déséquilibré. Le type de réarrangement est généralement précisé à la suite. Cas particulier : utilisé également pour désigner une translocation Robertsonienne, bien que ce réarrangement soit équilibré.
Dic	Chromosome dicentrique, c'est-à-dire possédant deux centromères.
Dir	Direct ; optionnel, permet de préciser le sens d'une duplication : les séquences dupliquées ont gardé la même orientation sur le chromosome
Dmin	Double minute = fragment chromosomique de toute petite taille sans centromère
Dup	Duplication d'un fragment chromosomique
Fra	Site fragile

Hsr	Région chromosomique présentant un marquage homogène. Ces régions représentent des zones d'amplification génique.
I	Isochromosome ; ces chromosomes présentent deux bras courts identiques et pas de bras long (ou l'inverse).
Idic	Iso dicentrique, c'est-à-dire un isochromosome avec deux centromères
Mar	Fragment chromosomique avec ou sans centromère d'origine inconnue.
Mat	Utilisé comme suffixe, précise que l'anomalie observée est d'origine maternelle.
Min	Fragment chromosomique de toute petite taille sans centromère
Mos	Mosaïque ; permet de préciser si l'anomalie observée résulte d'une mosaïque (constitution chromosomique différente de certaines lignées cellulaires d'un même œuf).
Pat	Utilisé comme suffixe, précise que l'anomalie observée est d'origine paternelle.
Rcp	Réciproque. Parfois utilisé en association avec "t" pour préciser qu'une translocation est réciproque.
Rec	Recombinant. Réarrangement chromosomique déséquilibré consécutif à un enjambement (crossing-over) pendant la méiose.
Rob	Robertsonienne. Parfois utilisé en association avec "t" pour préciser qu'une translocation est de type Robertsonienne.
(-)	Perte du chromosome indiqué juste après.
(x)	Indique la présence de copies multiples d'un chromosome réarrangé.
(+)	Gain du chromosome indiqué juste après.
Souligné	Utilisé pour distinguer les deux homologues quand ils sont tous les deux réarrangés
Tr	Triradial ; chromosome avec trois bras au lieu de deux.
Trc	Tricentrique ; chromosome avec trois centromères.
Upd	Disomie uniparentale ; les deux chromosomes d'une même paire sont hérités du même parent.

Références bibliographiques

- **ABDELMOULA N, PORTNOÏ M, VIALARD F et al.** 2000. Les techniques de cytogénétique moléculaire: principes et progrès. *Médecine/Sciences*. 16:1405-11.
- **ADKINS NL, WATTS M, GEORGEL, PT et al.** 2004. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochimica Biophysica Acta*. 1677:12-23.
- **ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J et al.** 2002. Molecular Biology of the Cell. 4^{ème} édition. *Garland Science, New York*. ISBN:0-8153-3218-1.
- **ASSOCIATION DES CYTOGÉNÉTICIENS DE LANGUE FRANÇAISE.** 2011. Guide de bonnes pratiques en cytogénétique. *En ligne*. Téléchargé le 13 juin 2019.
- **BANNISTER et KOUZARIDES.** 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 21:381-395.
- **BAXTER J, MERKENSCHLAGER M et FISHER AG.** 2002. Nuclear organization and gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*. 14:372-376.
- **BECKER PB et HORZ, W.** 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annual Review of Biochemistry*. 71:247-273.
- **BEDNAR J, HOROWITZ RA, GRIGORYEV SA et al.** 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences-USA*. 95:14173-14178.
- **CALLEN J C et PERASSO P.** 2005. Biologie cellulaire : des molécules aux organismes. 2^{ème} édition. *Dunod, Paris*. ISBN:2-1004-9236-5.
- **CREMER T et CREMER C.** 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics*. 2:292-301.
- **DANIEL L. HARTI, ELISABETH W. JONES.** 2003. Génétique : Les grands principes. 3^{ème} édition Paris, Dunod. Pagination multiple. ISBN: 978-2-10-006735-0.
- **DONNAI R.** 2009. Génétique médicale : De la biologie à la pratique clinique. Édition Bruxelles, de Boeck. Pagination multiple. ISBN: 2-8041-5892-6.
- **DUNHAM I, KUNDAJE A, ALDRED S et al.** 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 489(7414):57-74.
- **EBERHARTER A et BECKER PB.** 2004. ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *Journal of Cell Science*. 117:3707-3711.
- **GRIFFITHS A, CARROLL S, WESSLER S et al.** 2013. Introduction à l'analyse génétique. 6^{ème} édition. *Éditions De Boeck Supérieur*. Pagination multiple. ISBN:2-8041-6013-0.

- **HAMERTON JL.** 2013. Human Cytogenetics: Clinical Cytogenetics (Vol. 2). *Academic Press*. 545 pages.
- **HANDYSIDE AH.** 2010. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reproductive biomedicine online*. 21(3):280-282.
- **HUDSON QJ, KULINSKI TM, HUETTER SP et al.** 2010. Genomic imprinting mechanisms in embryonic and extraembryonic mouse tissues. *Heredity* 105:45-56.
- **HURET JL, AHMAD M, ARSABAN M et al.** 2012. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic acids research*. 41(D1):D920-D924.
- **LANFRANCO F, KAMISCHKE A, ZITZMANN M et al.** 2004. Klinefelter's syndrome. *Lancet*. 364:273-283.
- **LEE JT et BARTOLOMEI MS.** 2013. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell*. 152:1308-1323.
- **LINDEN MG, BENDER BG, ROBINSON.** 2002. A Genetic counselling for sex chromosome abnormalities. *Am J Med Genet*. 110:3-10.
- **PADEKEN J, ZELLER P, GASSER S et al.** 2015. Repeat DNA in genome organization and stability. *Current opinion in genetics & development*. 31:12-19.
- **PALM W et DE LANGE T.** 2008. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics*. 42:301-334.
- **RIDGWAY P, MAISON C ET ALMOUZNI G.** 2006. Functional organization of the genome: chromatin. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 6(3).
- **RUDD M.** 2005. Organization, evolution and function of alpha satellite DNA at human centromeres.
- **SERRE JL.** 2006. Génétique Rappels de cours, exercices et problèmes corrigés. Dunod, Paris. Pagination multiple. ISBN : 2-1005-0524-6.
- **SHAFFER L, MCGOWAN-JORDAN J, SCHMID M et al.** 2013. ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature (2013). *Karger Medical and Scientific Publishers*.
- **THOMPSON MW, MCINNES R, WILLARD F.** 2008. Génétique médicale. 5^{ème} édition. Médecine-Science, Flammarion. Pagination multiple. ISBN: 2-2571-5034-1.
- **TURNER P.C, MCLENNAN A.G.** 2000. L'essentiel en biologie moléculaire. Port Royal Livre. *BERTI Edition*. Pagination multiple. ISBN: 9-7822-5720-433-2.
- **YOUNG ZK.** 2014. Altered Histone Modifications in Gliomas. *Brain Tumor Res Treat*. 2(1):7-21.