

Caryotype humain : Technique - Indications

Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale

Dr Cédric Le Caignec

Service de génétique médicale, CHU Nantes, France

Date de création du document 2010-2011

Table des matières

I	Techniques conventionnelles du caryotype constitutionnel.....	3
I.1	Etape de culture des cellules.....	3
I.2	Obtenir des métaphases nombreuses et de bonne qualité.....	3
I.3	Identifier les chromosomes.....	4
I.3.1	Les techniques classiques, utilisées en routine.....	4
I.3.2	Les techniques spécifiques.....	4
I.3.3	Les techniques de haute résolution.....	4
II	Description du caryotype humain.....	5
II.1	Le chromosome métaphasique.....	5
II.2	La classification des chromosomes.....	5
III	Indications du caryotype constitutionnel.....	6
III.1	En période anténatale.....	6
III.2	En période postnatale.....	6
III.2.1	Patient présentant	6
III.2.2	Couple présentant un trouble de la fertilité ou des avortements spontanés à répétition.....	8
III.2.3	Devant un remaniement de structure familial connu.....	8

I TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL

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

I.1 ETAPE DE CULTURE DES CELLULES

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

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

I.2 OBTENIR DES MÉTAPHASES NOMBREUSES ET DE BONNE QUALITÉ

Après la phase de multiplication des cellules, celles-ci sont bloquées au stade de métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour se faire, on ajoute de la colchicine, produit dérivé du colchique. Cette substance empêche la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique. La mitose est bloquée au stade de métaphase.

On procède ensuite au choc hypotonique. Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées. Les constituants cellulaires sont ensuite fixés grâce à un fixateur, par exemple un mélange acide acétique méthanol. Les

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

I.3 IDENTIFIER LES CHROMOSOMES

I.3.1 Les techniques classiques, utilisées en routine

Une simple coloration au Giemsa permet de compter et de classer les chromosomes en fonction de leur taille et de leur indice centromérique.

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

I.3.2 Les techniques spécifiques

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

I.3.3 Les techniques de haute résolution

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

sur un chromosome ou une région chromosomique donnée. Cette technique de haute résolution est de plus en plus remplacée par l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA).

II DESCRIPTION DU CARYOTYPE HUMAIN

II.1 LE CHROMOSOME MÉTAPHASIQUE

Il est constitué de deux chromatides sœurs réunies par un centromère dont la position définit les bras courts ou p et les bras longs ou q. L'indice centromérique ($p/p+q$) permet de distinguer les chromosomes métacentriques, submétacentriques et acrocentriques. Les chromosomes métacentriques ont un bras court et un bras long dont la taille est assez proche à la différence des chromosomes submétacentriques pour lesquels la taille du bras court est nettement inférieure à celle du bras long. Les chromosomes acrocentriques (chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22) ont un centromère très distal, les bras courts sont très réduits, surmontés de tiges (organiseurs nucléolaires) porteuses de satellites. Les chromosomes acrocentriques sont impliqués dans les translocations Robertsoniennes. Les télomères sont les extrémités distales des chromosomes.

Le nombre et la morphologie générale des chromosomes sont les mêmes pour tous les individus. Cependant, les régions d'hétérochromatine peuvent être le site de variations inter-individuelles, sans conséquences phénotypiques. Ces polymorphismes chromosomiques portent souvent sur la longueur de l'hétérochromatine des bras longs de l'Y, des régions centromériques des chromosomes 1, 9 et 16 et sur les bras courts des acrocentriques.

II.2 LA CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES

Le caryotype humain comporte 46 chromosomes, soit 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes: en général, deux chromosomes X dans le sexe féminin ; un X et un Y dans le sexe masculin. Le caryotype normal s'écrit : 46,XX ou 46,XY. Attention, il existe des situations particulières. Un phénotype féminin peut être observé en association avec un caryotype 46,XY, par exemple en cas de mutation du gène *SRY*.

Les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante et leur indice centromérique. Les techniques de marquage en bandes aident à identifier chaque paire chromosomique par le motif des bandes claires et sombres. Les bandes sont répertoriées dans une nomenclature internationale. Chaque bras chromosomique est divisé, selon sa taille, en une à quatre régions; chaque région en bandes numérotées du centromère au télomère. Par exemple, la dénomination 6p12 désigne la deuxième bande de la région 1 des bras courts du chromosome 6.

III INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL

Il convient de distinguer les indications du caryotype en période anténatale et en période postnatale.

III.1 EN PÉRIODE ANTÉNATALE

Le caryotype est l'examen de référence lorsqu'une anomalie chromosomique est suspectée en période anténatale. Les indications sont variées :

- risque combiné du premier trimestre ou risque séquentiel intégré du deuxième trimestre supérieur ou égal à 1/250 (risque qui prend en compte l'âge maternel, les marqueurs sériques maternels du premier ou deuxième trimestre et la clarté nucale mesurée à l'échographie de 12 SA),
- signe(s) d'appel échographique,
- antécédent familial de déséquilibre chromosomique et /ou parent porteur d'un remaniement chromosomique équilibré (translocation réciproque, translocation Robertsonienne, inversion...).
- diagnostic de sexe.

III.2 EN PÉRIODE POSTNATALE

III.2.1 Patient présentant

- *phénotype évocateur d'un syndrome chromosomique connu*

Le caryotype est proposé en première intention devant une association de signes suggérant fortement un syndrome chromosomique connu (par exemples : trisomie 21, syndrome de Turner, syndrome de Klinefelter...).

Jusqu'à récemment, le caryotype était un élément essentiel du bilan d'un patient présentant une déficience intellectuelle associée ou non à une dysmorphie faciale, à une ou des malformations congénitales, à un trouble envahissant du développement. Il permettait la détection d'un déséquilibre chromosomique, délétion ou duplication. Les développements récents des puces à ADN génomique ont modifié les indications du caryotype dans l'exploration de la déficience intellectuelle. Des déséquilibres de beaucoup plus petite taille peuvent être mis en évidence augmentant considérablement le niveau de résolution comparé à ce qui peut être obtenu grâce à un caryotype standard.

Lorsque le phénotype du patient n'est pas cliniquement reconnaissable, l'ACPA est de plus

en plus proposée en première intention en remplacement du caryotype standard. Le caryotype vient cependant en complément de l'ACPA dans au moins deux situations : (1) Si une délétion ou une duplication chromosomique de novo est identifiée par puce à ADN, il est important de réaliser les caryotypes parentaux. En effet, l'un des parents peut être porteur d'une insertion chromosomique. Dans ce cas, le caryotype parental est équilibré mais, chez l'un d'eux, la région chromosomique délétée ou dupliquée chez l'enfant est insérée ailleurs sur le génome. Le risque de transmettre à nouveau cette délétion ou cette duplication est proche de 50%. Si le déséquilibre est de trop petite taille pour être visible grâce à un caryotype standard, une hybridation in situ en fluorescence sur métaphases est indiquée afin de localiser la région chromosomique sur le génome ; (2) La suspicion chez un patient d'un dérivé de translocation réciproque par puce à ADN génomique nécessite la réalisation du caryotype de l'enfant et de ses parents. Un dérivé de translocation est suspecté sur une puce à ADN lorsque la partie terminale d'un chromosome est délétée et que la partie terminale d'un autre chromosome est dupliquée. Un dérivé de translocation réciproque peut être le résultat d'une translocation réciproque parentale équilibrée. Cette information est importante en conseil génétique en raison du risque de récurrence non négligeable.

- *une hypotonie néonatale avec dysmorphie*
- *un retard de croissance intra-utérin associé à une dysmorphie ou à une anomalie neurologique*
- *une anomalie de la différenciation sexuelle (ADS)*

Une ADS observée à la naissance peut justifier la réalisation d'un caryotype constitutionnel. Il permet de déterminer la formule gonosomique, XY ou XX, et ainsi d'orienter le choix du sexe civil donné à l'enfant

- *un retard de croissance*

A tout âge, un caryotype peut être demandé devant un retard de croissance. Lorsque le retard de croissance est isolé, la recherche d'une délétion de l'ensemble ou d'une partie (i.e. un ou plusieurs exons) du gène SHOX par une technique ciblée de génétique moléculaire, par exemple PCR quantitative, est de plus en plus utilisée en complément ou remplacement du caryotype

- *un retard ou une absence de puberté*
- *une aménorrhée primaire ou secondaire, une ménopause précoce*
- *une association de signes cliniques évocateurs d'un syndrome microdélétionnel ou microduplicationnel*

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) réalisée grâce à une sonde spécifique de la région chromosomique donnée vient en complément du caryotype

- *une suspicion d'un syndrome d'instabilité chromosomique*

III.2.2 Couple présentant un trouble de la fertilité ou des avortements spontanés à répétition

A la différence des puces à ADN, le caryotype permet de visualiser la morphologie des chromosomes et ainsi la mise en évidence des remaniements chromosomiques équilibrés. Le caryotype est par conséquent essentiel au bilan réalisé dans le cadre de troubles de la fertilité (azoospermie ou oligospermie sévère) ou d'avortements spontanés à répétition. Il permet la détection d'une translocation réciproque ou Robertsonienne parentale équilibrée. A ce jour, les puces à ADN ne permettent pas de répondre à cette question.

III.2.3 Devant un remaniement de structure familial connu

Lorsqu'un remaniement de structure est connu au sein d'une famille (translocation réciproque ou Robertsonienne), le caryotype est indiqué chez toute personne à risque d'être porteuse du remaniement chromosomique à l'état équilibré. Si la translocation implique des fragments chromosomiques de grande taille, le caryotype peut suffire au diagnostic. En revanche, si les fragments chromosomiques sont de petite taille, la FISH peut être indiquée en complément du caryotype.

Le caryotype est également un examen essentiel au diagnostic et à la caractérisation de pathologies acquises dont les hémopathies et les tumeurs solides. Nous ne détaillerons pas ces indications qui ne relèvent pas de la cytogénétique constitutionnelle.

Remerciements :

Je remercie tout particulièrement le Dr Philippe Piloquet, le Dr Claire Bénéteau et le Pr Damien Sanlaville pour leur lecture critique. Le guide des bonnes pratiques en cytogénétique édité par l'ACLF a été consulté pour établir les indications du caryotype constitutionnel.