



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ | TIMIȘOARA

CRISTINA GUG

MARIA PUIU

IULIA JURCA-SIMINA



GÉNÉTIQUE MÉDICALE

*Travaux pratiques pour les étudiants en
Médecine Générale*

Editura Victor Babeș
Timișoara, 2020

Editura Victor Babeș

Piața Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timișoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

www.umft.ro/editura

Director general: Prof. univ. emerit dr. Dan V. Poenaru

Colecția: GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecție: Conf. univ. dr. Adrian Vlad

Referent științific: Conf. univ. dr. Ovidiu Sîrbu

Indicativ CNCSIS: 324

© 2020 Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate.

Reproducerea parțială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă și se va sancționa conform legilor în vigoare.

ISBN 978-606-786-212-6

Table des matières

Travaux pratiques nr. 1	Dr. Iulia Jurca-Simina
GLOSSAIRE	5
Travaux pratiques nr. 2	Prof. Dr. Maria Puiu
LES TECHNIQUES DE GENETIQUE MOLECULAIRE 1	18
Travaux pratiques nr. 3	Dr. Cristina Gug
LES TECHNIQUES DE GENETIQUE MOLECULAIRE 2	30
Travaux pratiques nr. 4	Prof. Dr. Maria Puiu
ARBRE GÉNÉALOGIQUE	38
Travaux pratiques nr. 5	Dr. Cristina Gug, Dr. Iulia Jurca-Simina
LE GROUPE SANGUIN	52
Travaux pratiques nr. 6	Dr. Cristina Gug
CYTOGENETIQUE	62
Travaux pratiques nr. 7	Dr. Cristina Gug
CARYOTYPAGE	74
Travaux pratiques nr. 8.	Dr. Iulia Jurca-Simina
L'HYBRIDATION FLUORESCENTE (FISH)	84
Travaux pratiques nr. 9	Dr. Cristina Gug
LES MALADIES METABOLIQUES	88
Travaux pratiques nr.10	Dr. Cristina Gug, Dr. Iulia Jurca-Simina
LA DIVISION CELLULAIRE	98
Travaux pratiques nr. 11	Dr. Cristina Gug
ASPECTS CYTOGÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DU CANCER	114
Travaux pratiques nr. 12	Dr. Cristina Gug
DIAGNOSTIC PRÉNATAL DES MALADIES GÉNÉTIQUES	123
Travaux pratiques nr. 13.	Prof. Dr. Maria Puiu, Dr. Iulia Jurca-Simina
CONSULTATION GÉNÉTIQUE	141
Travaux pratiques nr. 14.	Dr. Iulia Jurca-Simina
LES TESTS BIOCHIMIQUES	149
BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE	155

Au lieu de la préface

Rapport sur l'ouvrage GÉNÉTIQUE MÉDICALE :

Travaux pratiques pour les étudiants en Médecine Générale

Le livre «Génétique Médicale: Travaux pratiques pour les étudiants en Médecine Générale (section française)» s'adresse aux étudiants en Médecine de deuxième année, section française de l'Université de Médecine et Pharmacie «Victor Babes» de Timisoara.

Structuré en 14 chapitres, l'ouvrage vise à mettre en pratique les connaissances théoriques enseignées dans le cours de Génétique Médicale. En ce sens, le livre présente et explique des notions essentielles de génétique clinique (avec les investigations génétiques correspondantes), auxquelles il associe une riche imagerie des syndromes chromosomiques et monogéniques, qui permettent aux étudiants d'identifier les principales caractéristiques cliniques de diverses maladies génétiques. La présentation des modèles de transmission héréditaire est suivie d'exercices (de complexité progressive) d'analyse et d'interprétation des arbres généalogiques des familles touchées par des maladies génétiques, qui permettront aux étudiants de savoir identifier les principales catégories de risque génétique.

Un point fort de cet ouvrage est la description des principales méthodes utilisées en cytogénétique clinique et moléculaire dans le cadre de la présentation des caryotypes et des tests ADN issus de l'étude de cas des auteurs de ce cours.

Des chapitres distincts sont réservés aux anomalies génétiques associées à la pathologie oncologique et le diagnostic prénatal (invasif et non invasif), avec des exemples intéressants, cliniques bien choisis, présentés dans une manière appropriée au niveau des étudiants de deuxième année.

Dans l'ensemble, ce travail est une entreprise utile et bien structurée, écrite dans un style clair et concis, qui permet une très bonne introduction des étudiants de deuxième année dans le domaine complexe de la génétique clinique et moléculaire.

Ioan-Ovidiu Sirbu, Md, PhD

Associate Professor
"Victor Babes" University of Medicine and Pharmacy Timisoara
Faculty of Medicine
Biochemistry and Pharmacology Department
Biochemistry Unit

Travaux pratiques nr. 1.

GLOSSAIRE

Génétique (du grec genno γεννώ, «donner naissance») est la science qui étudie l'hérédité et les gènes, les mécanismes qui assurent la préservation et la transmission des caractères héréditaires des parents aux enfants, d'une cellule à une autre.

L'invention du terme « génétique » revient au biologiste anglais William Bateson (1861-1926), qui l'utilise pour la première fois en 1905. La génétique moderne est souvent datée de la mise en évidence de la structure en double hélice de l'ADN effectuée par James Watson et Francis Crick en 1953.

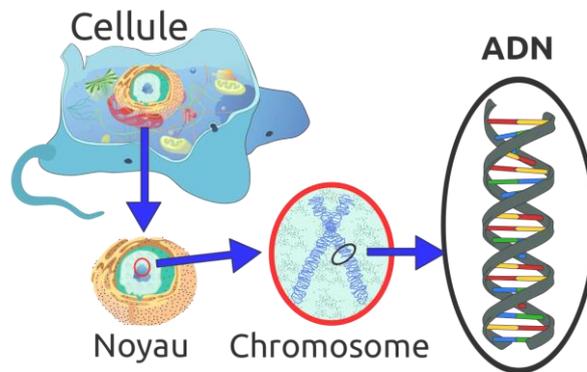


Fig. 1.1. Le lien entre les chromosomes et l'ADN

Acides nucléiques

Grandes molécules formées par des unités de base: les nucléotides. Chaque nucléotide comprend:

- un glucide,
- une base azotée et
- un groupe phosphate.

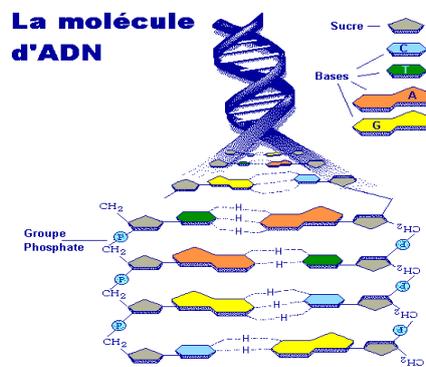


Fig. 1.2. Molécule d'ADN

Il existe deux types d'acides nucléiques:

- l'acide désoxyribonucléique, ou l'ADN, et
- l'acide ribonucléique, ou l'ARN

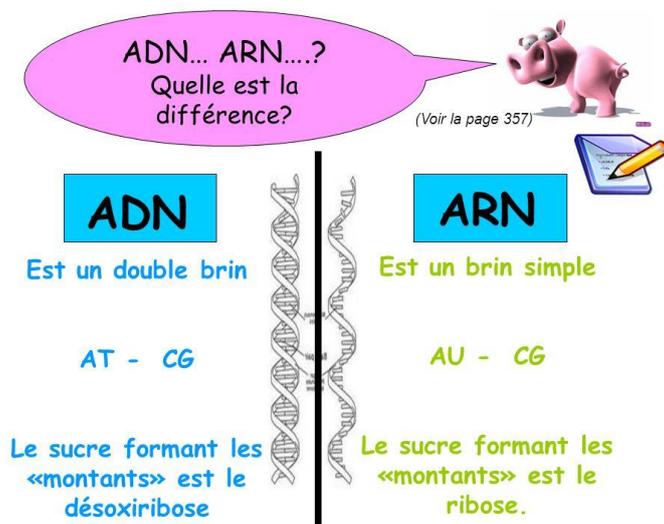


Fig. 1.3. Comparaison entre les deux types d'acides nucléiques

ADN acide désoxyribonucléique

Chez les organismes eucaryotes, il est emballé dans le noyau cellulaire.

Développé, il prend la forme d'un filament très long, constitué d'une chaîne ou séquence de caractères spécifique, dans un alphabet de **4 lettres chimiques: bases azotées A (Adénine), T (Thymine), G (Guanine) et C (Cytosine)**. Cette séquence représente le message génétique, l'ensemble des instructions qui permettent à la cellule de fonctionner après un programme caractéristique à l'espèce.

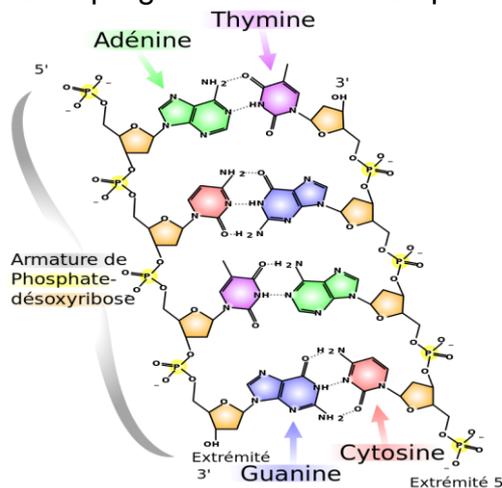


Fig. 1.4. Le lien entre les 2 brins d'ADN

Allèle: Gène qui occupe le même locus sur le chromosome homologue. Les deux allèles peuvent être

- identiques (homozygotes) ou
- différents (hétérozygotes).

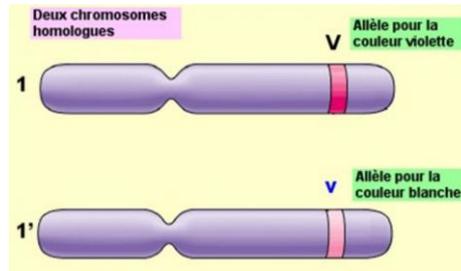


Fig. 1.5. Allèles

Allèles: Pour un certain locus sur un chromosome, un même gène peut exister sous différentes formes appelées allèles.

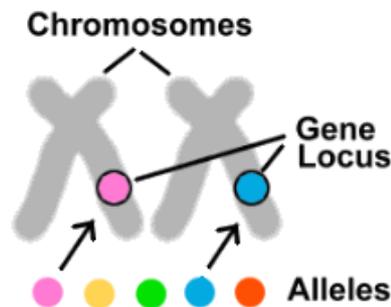


Fig. 1.6. Les gènes allèles représentent 2 du nombre total d'allèles dans la population

Dominant / récessif (allèle)

Un allèle est dominant si elle est capable d'exprimer un caractère (se manifester) à l'état homozygote et hétérozygote; un allèle est récessif s'il est nécessaire de deux allèles identiques, présentent sur les deux chromosomes homologues (homozygotie) pour exprimer un caractère. Un allèle dominant masque la présence d'un allèle récessif.

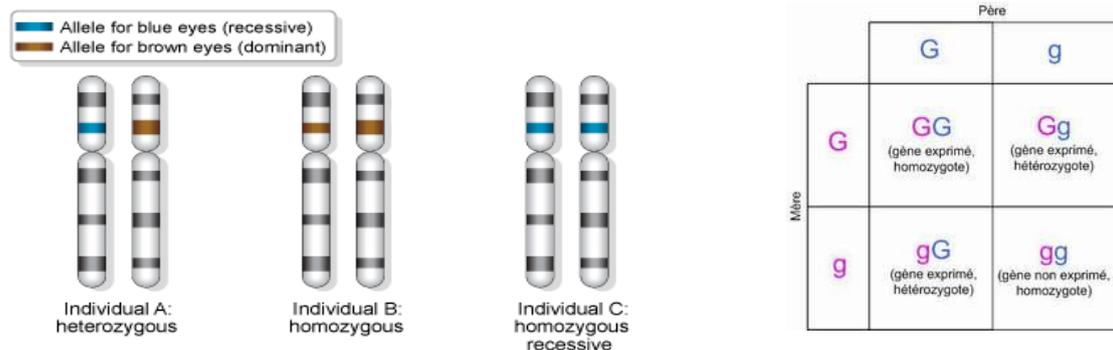


Fig. 1.7. Exemple d'allèles dominants et récessifs

ARN, ou acide ribonucléique

Molécule utilisée pour transférer l'information génétique de l'ADN du noyau vers le cytoplasme, où l'information est utilisée pour la synthèse des protéines.

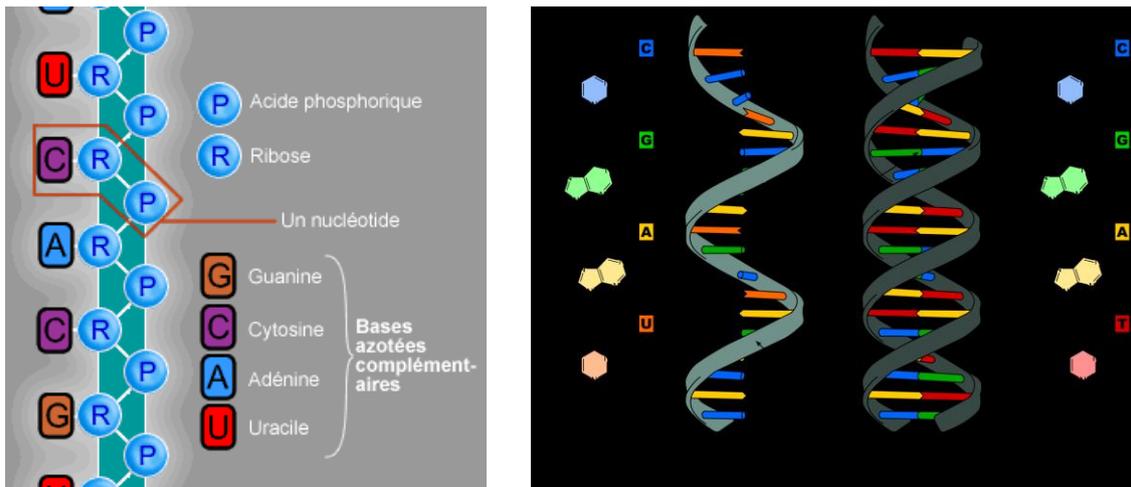


Fig. 1.8. Molécule d'ARN

Autosome/ Gonosome

Autosome - un chromosome des 22 paires homologues, chromosome non sexuel.

Gonosome - les chromosomes qui déterminent le sexe. Chez les humains, il s'agit des chromosomes X et Y.

Bases azotées

Lettres de l'alphabet chimique utilisées pour écrire le message génétique. Il y a 2 catégories: pyrimidines (T, C, U) et purines (A,G)

L'information contenue dans l'ADN est écrit par 4 lettres (bases azotées): A = adénine, T = thymine, G =guanine, et C = cytosine).

L'information génétique est inscrite dans l'ARN par les mêmes 3 lettres rencontrées dans l'ADN (bases azotées: A = adénine, G =guanine, et C = cytosine), mais thymine T est remplacée par un U = uracile.



Fig. 1.9. Dans la molécule d'ARN thymine (T) d'ADN est remplacée par un U = uracile.

Chromosomes = Formations qui se produisent dans le noyau d'une cellule lors de la division, sous la forme de tiges, souffrant des processus complexes de fractionnement et de séparation. Les chromosomes sont le support matériel des gènes.

Cytogénétique= Une partie de la génétique qui traite de l'étude des chromosomes.

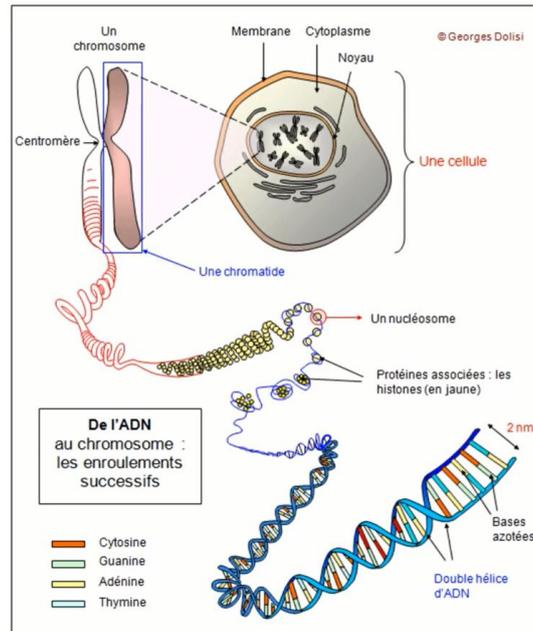


Fig. 1.10. Le lien entre les chromosomes et l'ADN

Caryotype

Disposition standard des chromosomes dans une cellule, développée dans le but de détecter des aberrations chromosomiques, numériques ou de la structure, homogènes ou en mosaïque, de transmission autosomique ou gonosomique.

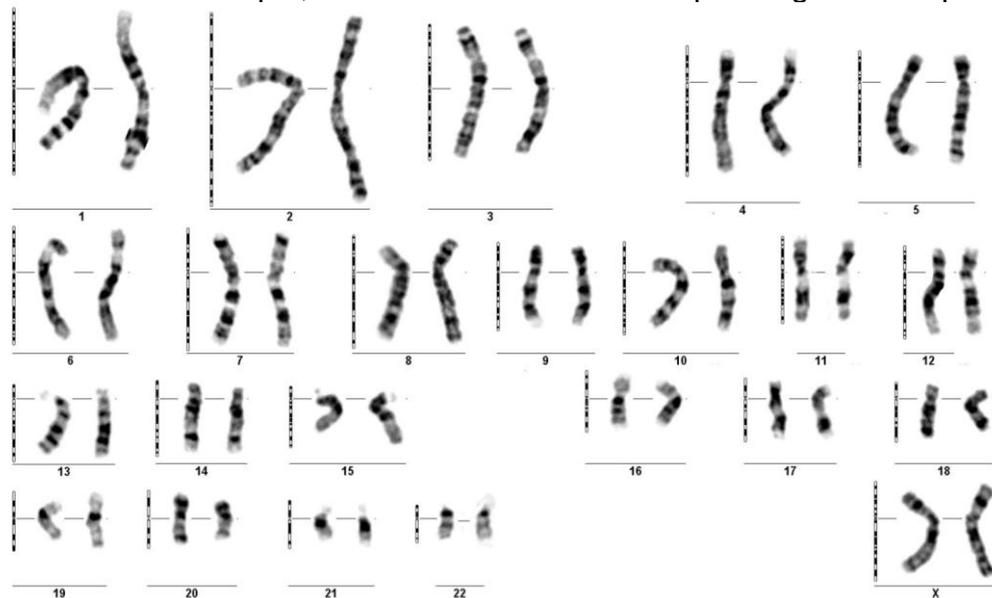


Fig. 1.11. Caryotype humain féminin (Collection du Dr Cristina Gug)

Cartes génétiques

Un atlas du génome d'une espèce, où sont positionnés de nombreux repères pour faciliter la localisation des gènes (détermination de la position d'un locus).

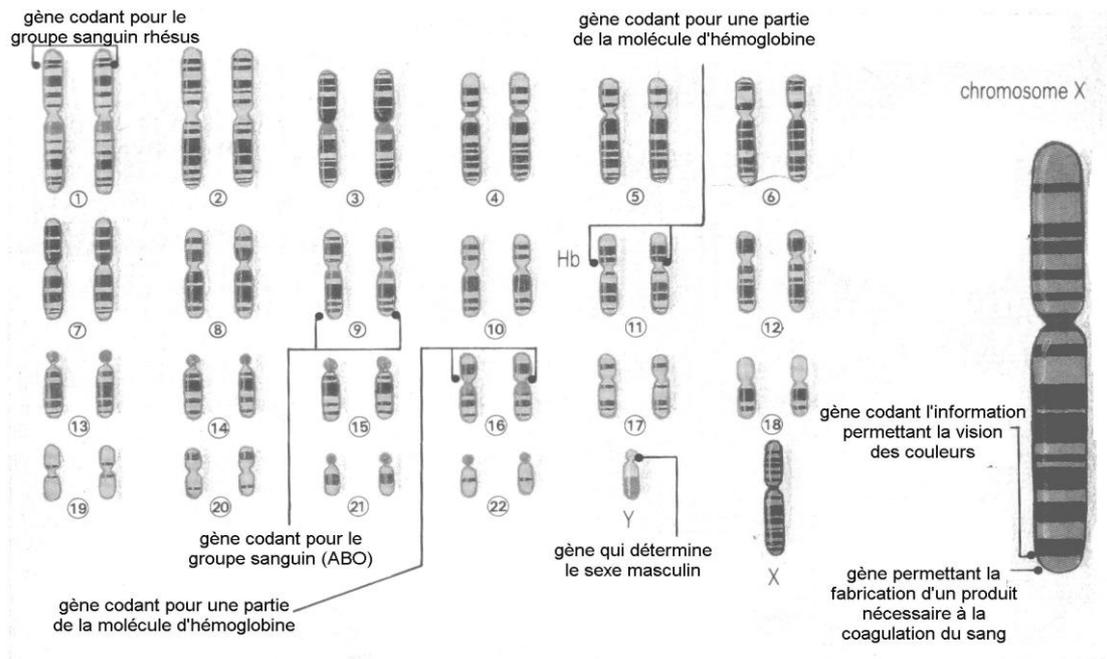


Fig. 1.12. Exemples de locus chromosomiques de plusieurs gènes

Distance génétique = Distance entre deux gènes sur un chromosome (unité de distance- centimorgan cM).

Clone cellulaire

Toutes les cellules génétiquement identiques provenant d'une cellule initiale, par mitoses successives. Chaque division produit une nouvelle génération de cellules.

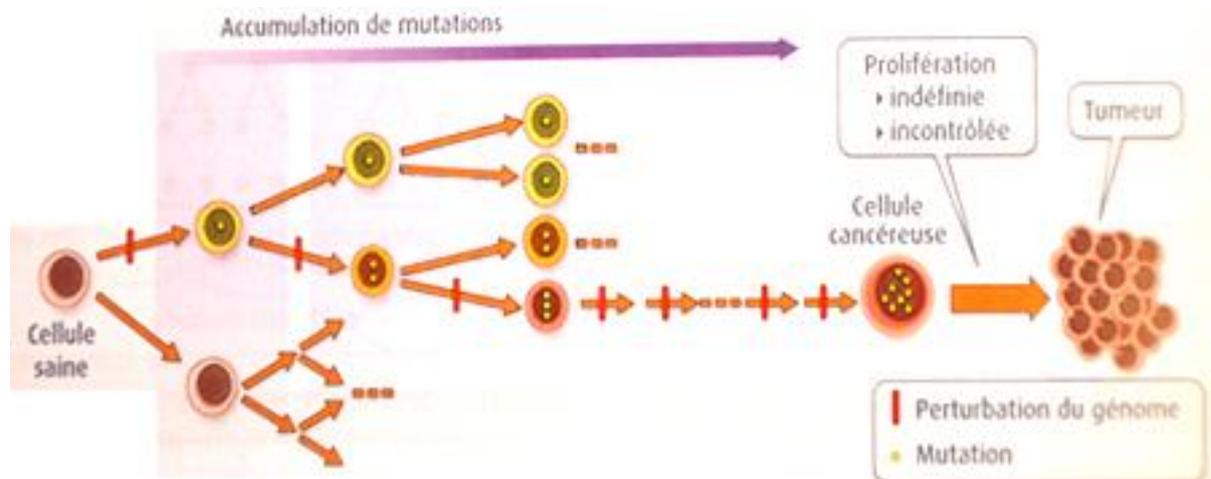


Fig. 1.13. Clone cellulaire

Code génétique

Chaque gène contient l'information nécessaire à la synthèse des protéines.

L'information est contenue dans la séquence de quatre bases azotées (**A, T, C, G**) qui sont alignées sur le fragment d'ADN.

Une protéine consiste en une séquence linéaire d'acides aminés. Le séquençage des acides aminés dans la protéine est déterminé par le séquençage du gène codant pour cette protéine.

Il y a une corrélation entre les bases azotées de l'ADN (gène) et les acides aminés. Cette correspondance constitue le code génétique : trois bases azotées adjacentes sur l'ADN forment un triplé appelée codon qui spécifie un acide aminé particulier.

2 ^e lettre 1 ^e lettre	U		C		A		G		3 ^e lettre
U	UUU	Phénylalanine Phe	UCU	Sérine Ser	UAU	Tyrosine Tyr	UGU	Cystéine Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leucine Leu	UCA		UAA	non-sens STOP	UGA	non-sens STOP	A
	UUG		UCG		UAG		UGG		Tryptophane Trp
C	CUU	Leucine Leu	CCU	Proline Pro	CAU	Histidine His	CGU	Arginine Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	CGA	A		
	CUG		CCG		CAG	CGG	G		
A	AUU	Isoleucine Ileu	ACU	Thréonine Thr	AAU	Asparagine Asn	AGU	Sérine Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	AGA	A		
	AUG		Méthionine Met		ACG	AAG	Arginine Arg	G	
G	GUU	Valine Val	GCU	Alanine Ala	GAU	Acide aspartique Asp	GGU	Glycine Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GCC		C
	GUA		GCA		GAA	GGA	A		
	GUG		GCG		GAG	GGG	G		

Fig. 1.14. Le code génétique

Gène

Unité d'information héréditaire située sur un chromosome donné qui consiste en un fragment d'ADN. Chaque gène dirige (code) la synthèse d'une ou plusieurs protéines et assure la transmission et l'expression d'un caractère donné.

Le génome humain contient environ 25.000 gènes distribués sur les 23 paires de chromosomes.

Gène candidat= Gène qui est soupçonné d'être la cause d'une maladie.

Locus génétique= Position d'un gène sur un chromosome.

Gène de prédisposition à une maladie

Gène qui tend à favoriser le développement d'une maladie en combinaison avec d'autres gènes et / ou des facteurs environnementaux.

On sait, par exemple, de nombreux gènes de prédisposition au cancer.

Génie génétique

Tous les outils d'isoler, de purifier et d'obtenir une quantité suffisante d'un gène, dans le but d'étudier sa structure, sa fonction et sa régulation. Ces outils ont révolutionné la biologie et ont fourni des méthodologies pour la recherche en génétique moléculaire.

Ces nouvelles technologies d'ingénierie génomique, avec la génomique synthétique (conception de génomes artificiels), figurent actuellement parmi les technologies les plus prometteuses en termes de recherche biologique appliquée et d'innovation industrielle.

Génome

Tout le matériel génétique contenu dans une cellule. Il est présenté comme une longue molécule d'ADN (1,50 m) enveloppée du noyau de chaque cellule dans le corps.

Le programme «Le Génome Humain» (1989-2001) a eu le but de déterminer avec précision la position et la fonction de chacun des 20 000-25 000 gènes du patrimoine génétique.

Maintenant en première mondiale, voici illustré le code identique à chaque individu de la planète qui se retrouve dans vos 50 milliards de cellules.

Au début des années 1990, la communauté scientifique internationale a jeté les bases d'un projet qu'on a parfois qualifié, en raison de son ampleur, de « projet Apollo de la biologie ». L'objectif était d'obtenir, pour le début du troisième millénaire, la séquence complète du génome humain - 3,2 milliards de nucléotides, soit, en caractères, le contenu de 2000 livres de 500 pages. Une seule de ces cellules de ce code mesure est un mètre de long et 2 nanomètres d'épais (20 atomes).

Projet Génome Humain

Claude Duquette

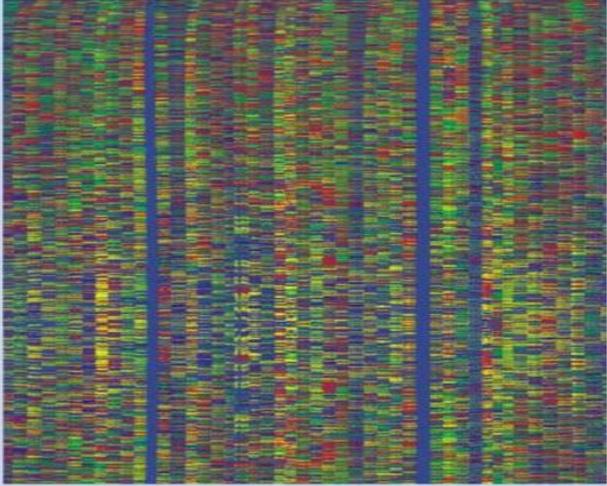


Fig. 1.15. «Le Génome Humain»

Génotype / phénotype

Phénotype: Toutes les caractéristiques héréditaires d'un individu.

La combinaison de deux gènes situés face-à-face sur les deux chromosomes homologues est appelée **génotype**. Par exemple, le génotype d'un individu qui a du sang de type B est soit BB ou BO.

Le **phénotype** correspond à l'expression que l'environnement donne au patrimoine génétique.

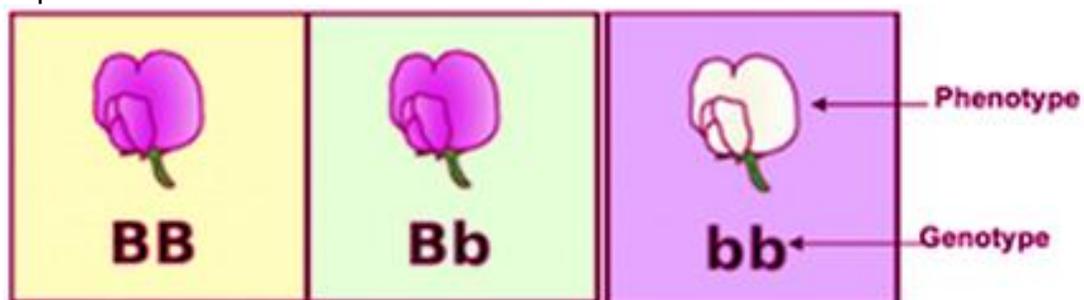


Fig. 1.16. Génotype-phénotype

Homozygote / hétérozygote

Chaque gène existe en deux exemplaires, l'un d'origine paternelle, l'autre d'origine maternelle. Chaque gène peut avoir des formes différentes appelées allèles.

Si les deux allèles sont identiques, le génotype est homozygote pour ce gène. Si les deux allèles sont différents, le génotype est appelé hétérozygote.

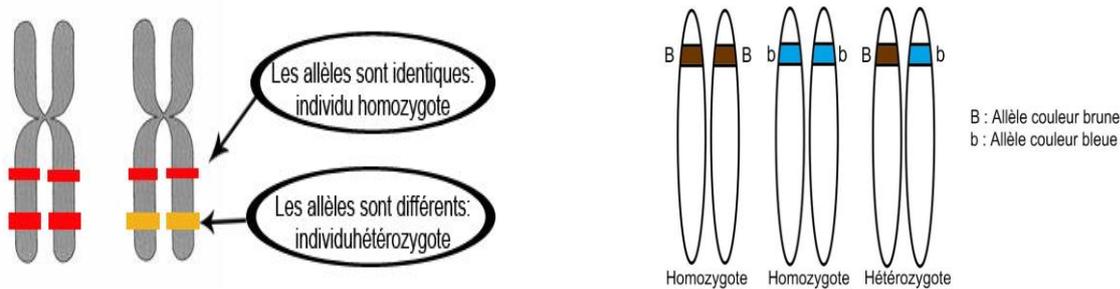


Fig. 1.17. Homozygote / hétérozygote

Haploïde/ Diploïde

Haploïde- se réfère à noyau de la cellule sexuelle (ovule ou spermatozoïde) qui a seulement la moitié du nombre de chromosomes caractéristique de l'espèce; ensemble haploïde= 23 chromosomes ($n = 23$).

Diploïde- se réfère au noyau de la cellule somatique contenant 46 chromosomes, l'ensemble diploïde étant caractéristique pour toutes les cellules humaines, à l'exception des cellules sexuelles.

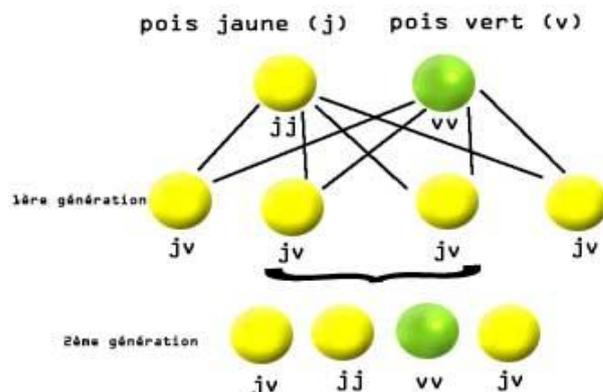


Fig.1.18. Illustration de Lois de Mendel utilisant des pois

Maladie génétique

Maladie causée par une anomalie génétique ou d'un défaut / mutation d'un ou plusieurs gènes. Quand la maladie survient d'une mutation d'un seul gène on parle d'une "**maladie monogénique.**"

Cependant, la majorité des maladies telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, neuropsychiatrique etc. résulte de l'"altérations de **multiples gènes** ou associe un défaut génétique et les facteurs environnementaux et / ou liés au mode de vie. Dans ce cas, on parle de maladies partielles génétiques ou maladies communes.

Métaphase

Étape de la division cellulaire, optimale pour étudier les chromosomes humains.



Fig. 1.19. Métaphase (Collection du Dr Cristina Gug)

Mitose=Processus dynamique par lequel une cellule somatique se divise en deux nouvelles cellules, avec un contenu génétiquement identique ($2n$ chromosomes).
Méiose=Processus de division cellulaire pour la maturation des gamètes (ovules et spermatozoïdes) avec réduction de moitié du nombre de chromosomes (n chromosomes).

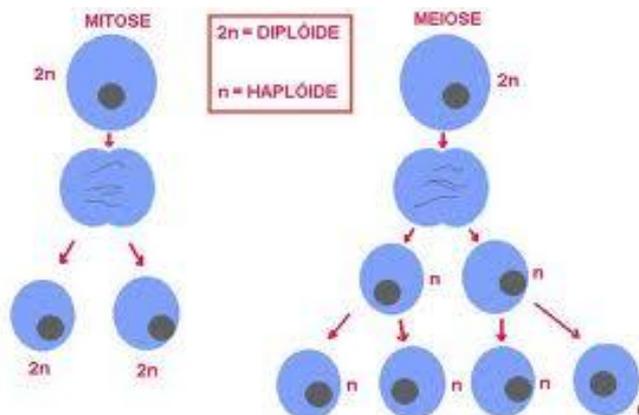


Fig. 1.20. Mitose et méiose

Zygote

Cellule résultant de l'union de deux gamètes; cellule-œuf.

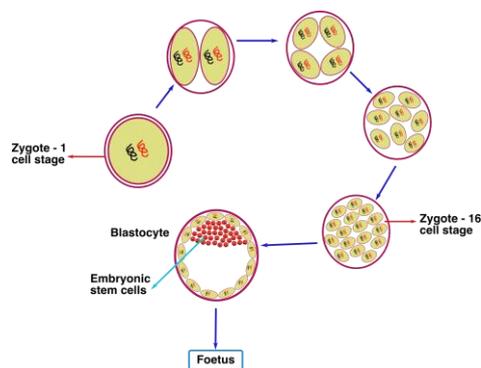


Fig. 1.21. Zygote résultant de l'union de deux gamètes

Ovogenèse= Formation des ovocytes dans l'ovaire, pour la maturation de l'ovule, dans le processus de gamétogenèse.

Ovule= Les gamètes femelles produits par les ovaires.

Ovulation= Élimination ovocytaire mensuelle, régulière, de l'ovaire dans les trompes utérines, de la puberté jusqu'à la ménopause.

Spermatogenèse

Formation du sperme, les gamètes mâles.

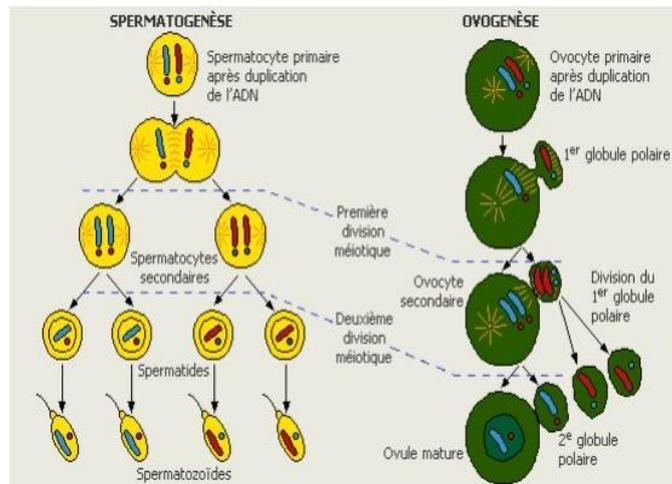


Fig. 1.22. Spermatogenèse et Ovogenèse

Mutation

Changement au niveau du matériel héréditaire, à la suite d'une erreur d'écriture dans le message

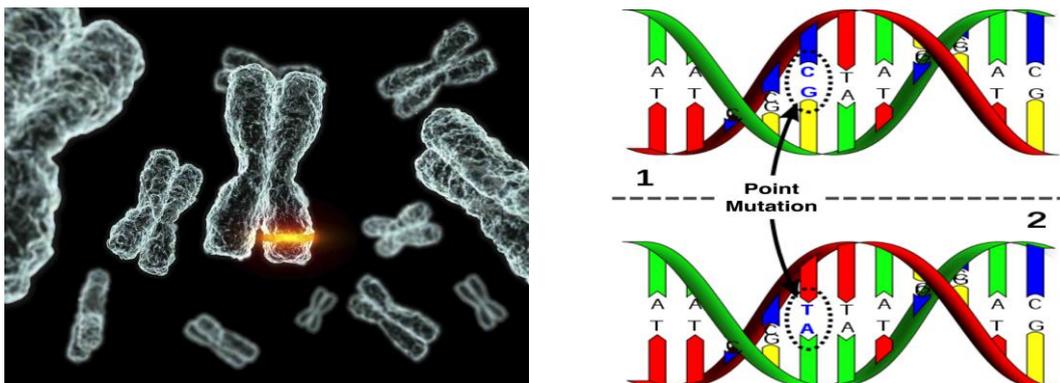


Fig. 1.23. Mutation

Oncogène

Gène, à la suite d'une mutation produite à son niveau, qui code pour une protéine qui stimule la division cellulaire excessive. Cela conduit à une prolifération cellulaire anarchique, un processus qui sous-tend le cancer.

Les gènes du cancer

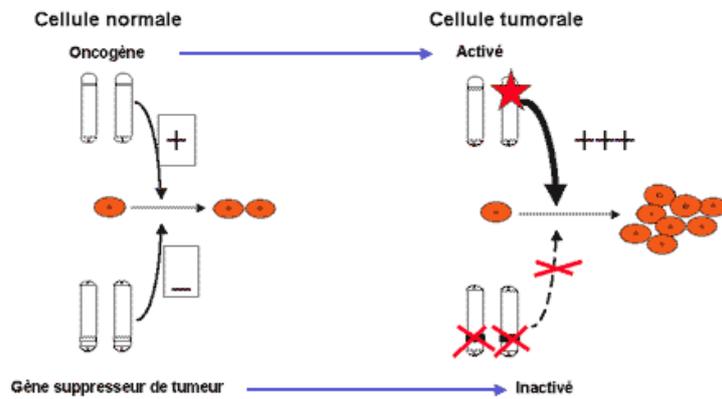


Fig. 1.24. Les oncogènes provoquent des divisions cellulaires incontrôlées

Térogène

Agent de l'environnement qui provoque des malformations.



Fig. 1.25. Exemple de facteurs térogènes

Malformation

Vice de la conformation d'un organe, d'un segment, de cause mésologique (par des facteurs environnementaux) agissant lors de la formation du fœtus; est habituellement congénitale (présente à la naissance).



Fig. 1.26. Fente labiale et palatine

Thérapie génique

Nouvelle forme de traitement, encore au stade expérimental, consistant à **introduire un gène normal** dans l'organisme porteur d'un défaut génétique dans le but de corriger ce défaut.

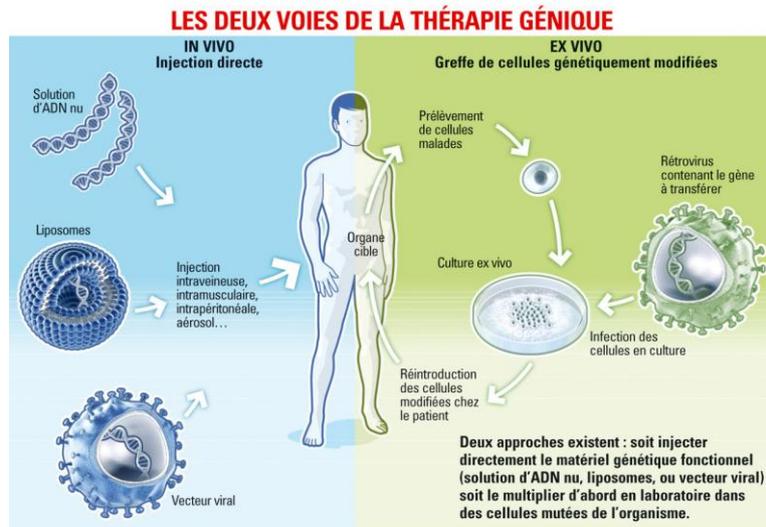


Fig.1. 27. Thérapie génique

Vecteur (thérapie génique)

Véhicule pour le transport du gène et son introduction dans les cellules malades, dans le but de réparer le défaut génétique présent.

Ces vecteurs sont généralement

- des virus rendus inoffensifs, les **adénovirus** ou **rétrovirus**,
- **des plasmides** ou
- des **liposomes** (des constructions artificielles, impliquant les lipides).

Travaux pratiques nr. 2

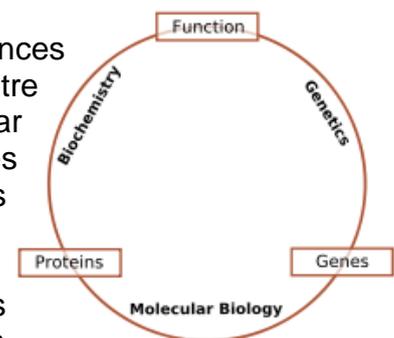
LES TECHNIQUES DE GENETIQUE MOLECULAIRE 1

Histoire

- La génétique/biologie moléculaire est une discipline scientifique au croisement de la génétique, de la biochimie et de la physique, dont l'objet est la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule au niveau moléculaire.
- Le terme «**biologie moléculaire**», utilisé la première fois en 1938, désigne également l'ensemble des techniques de manipulation d'acides nucléiques (ADN, ARN), appelées aussi techniques de génie génétique.
- La biologie moléculaire est apparue dans le XX^{ème} siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support chimique de l'information génétique.
- Après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins et Rosalind Franklin, la biologie moléculaire a connu d'importants développements pour devenir un outil incontournable de la biologie moderne à partir des années 1970.
- La biologie moléculaire est apparue dans les années 1930, le terme n'ayant cependant été inventé qu'en 1938 par Warren Weaver. Warren Weaver était à l'époque directeur des Sciences Naturelles pour la Fondation Rockefeller et pensait que la biologie était sur le point de vivre une période de changements significatifs étant données les avancées récentes dans les domaines tels que la diffractométrie de rayons X. <https://www.youtube.com/watch?v=9-4OniB-CpE> (génie génétique)

Relation avec les autres sciences biologiques «à l'échelle moléculaire»

- Les chercheurs en biologie moléculaire utilisent des techniques spécifiques pour la biologie moléculaire (voir plus loin *Techniques de biologie moléculaire*), mais les combinent de plus en plus avec les techniques et les idées provenant de la génétique et de la biochimie.
- Il n'y a pas de frontière bien définie entre ces disciplines, bien qu'il y en ait eu à une certaine époque.
- La figure ci-contre illustre une vue possible de la relation entre les domaines:
 1. La **biochimie** est l'étude des substances chimiques et des processus vitaux qui se produisent dans les organismes vivants.
 2. La **génétique** est l'étude des effets des différences génétiques entre les organismes. Souvent cela peut être déduit par l'absence d'un composant normal (par exemple un gène), l'étude des «mutants» — organismes dont il manque un ou plusieurs composants fonctionnels par rapport au soi-disant «type naturel» ou au phénotype normal. Les interactions génétiques telles que les épistasies mettent souvent en défaut les interprétations simples de ces études par «élimination».



3. La **biologie moléculaire** est l'étude des processus de réplication, de transcription et de traduction du matériel génétique. Le dogme central de la biologie moléculaire où le matériel génétique est transcrit en ARN, puis traduit en protéines, bien qu'il soit une image très simpliste et sans fondement de la biologie moléculaire, fournit encore un bon point de départ pour comprendre ce domaine.

À réviser à la lumière des nouveaux rôles qu'on découvre au niveau de l'ARN.

- L'essentiel du travail en biologie moléculaire est quantitatif, et récemment beaucoup de travaux ont été faits à l'intersection de la **biologie moléculaire** et de l'**informatique**, dans la **bio-informatique** et dans la biologie calculatoire.

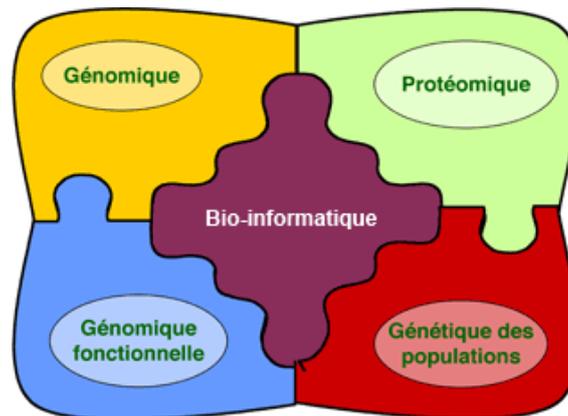


Fig. 2.1. Bio-informatique

- Depuis les années 2000, l'étude de la structure et de la fonction des gènes, la **génétique moléculaire**, fait partie des sous-domaines de la biologie moléculaire.
- De plus en plus, de nombreux autres domaines de la biologie se concentrent sur les molécules,
 - soit *directement*, en étudiant leurs interactions propres comme en **biologie cellulaire** et en **biologie du développement**,
 - soit *indirectement*, quand les techniques de la biologie moléculaire sont utilisées pour déduire les attributs historiques des **populations** ou des **espèces**, comme dans les domaines de la biologie de l'**évolution** telles que la **génétique des populations** et la **phylogénie**.
- Il y a également une longue tradition de l'étude des **biomolécules** «à partir du bas» en **biophysique**.

Techniques de biologie moléculaire

Depuis la fin des années 1950 et le début des années 1960, les biologistes moléculaires ont appris à caractériser, isoler et manipuler les **composants moléculaires** des cellules et des organismes.

Ces composants incluent:

1. **l'ADN**, support de l'information génétique,
2. **l'ARN**, proche de l'ADN dont les fonctions vont de la copie provisoire d'ADN jusqu'aux réelles fonctions structurales et enzymatiques et qui est une partie fonctionnelle et structurale de l'appareil traductionnel, et
3. **les protéines**, molécules structurales et enzymatiques les plus importantes des cellules.

Clonage d'expressions

Une des techniques les plus élémentaires en biologie moléculaire pour étudier le rôle des protéines est le **clonage d'expressions**. Dans cette technique, l'ADN codant la protéine qui nous intéresse est cloné en utilisant

- la réaction en chaîne par polymérase (PCR en anglais pour *Polymerase Chain Reaction*) et/ou
- des enzymes de restriction dans un plasmide (qu'on appelle vecteur d'expression);

Plasmide = une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique, capable de réplication autonome et non essentielle à la survie de la cellule; le terme *plasmide* fut introduit en 1952).

Ce plasmide peut avoir des éléments de séquences promotrices spéciales pour diriger la production de la protéine en question et peut aussi avoir des marqueurs de résistance antibiotique pour aider à suivre le plasmide.

Ce plasmide peut être inséré dans des cellules, soit de bactérie, soit d'animal.

Introduire de l'ADN dans des cellules bactériennes est appelé **transformation**, et cela peut être complété de plusieurs manières:

- électroporation,
- micro-injection,
- consommation passive et
- conjugaison.

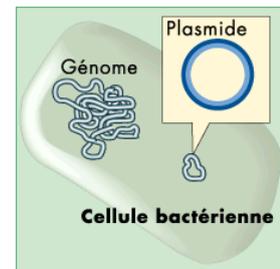
Introduire de l'**ADN** dans des cellules d'eucaryotes, telles que des cellules animales, est appelé **transfection**.

Plusieurs techniques différentes de **transfection** sont disponibles:

- transfection calcium phosphate,
- transfection de liposomes ou lipofection,
- électroporation ou encore par réactifs de transfection propriétaires tels que le Eugene ou le Genecellin.

Clonage d'expressions: Biotechnologie

Le gène d'intérêt est isolé à partir du génome humain(1) puis inséré dans le plasmide d'une bactérie (2). Le plasmide modifié est alors transféré dans la bactérie (3), qui se multiplie rapidement en colonie, laquelle produit la protéine humaine d'intérêt en grandes quantités (4).



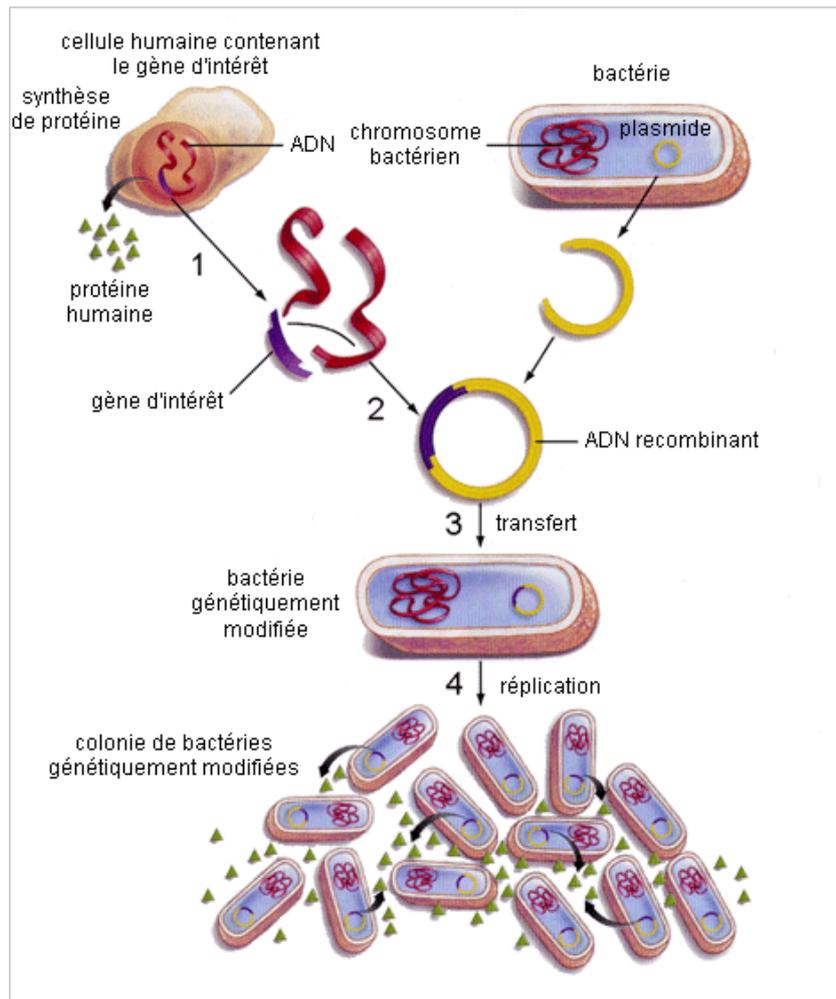


Fig. 2.2. Clonage d'une gene

Par des techniques semblables, les biologistes ont fabriqué:

- l'hormone de **croissance**; sa déficience conduit au nanisme
- l'**insuline**, nécessaire dans le traitement du diabète,
- le médicament **leukine**, utilisé dans le traitement du cancer et des infections virales,
- le vaccin de l'hépatite B et bien d'autres médicaments.

L'ADN peut alors être introduit dans les cellules en utilisant

- des virus ou
- des bactéries pathogènes comme transporteurs.

Dans de tels cas, la technique est appelée **transduction virale/bactérienne**, et les cellules sont dites transduites.

En génétique, la **transduction** est un processus qui consiste en un transfert de matériel génétique (ADN bactérien), d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse, par l'intermédiaire d'un vecteur viral (un bactériophage).

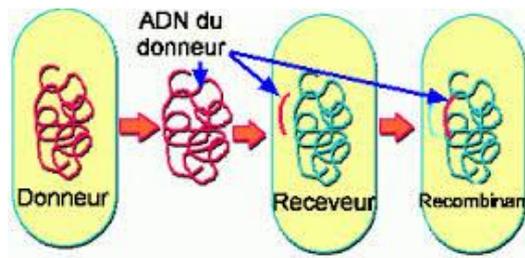


Fig. 2.3. La technique transduction virale/bactérienne

De grandes quantités de protéines peuvent alors être extraites de la cellule bactérienne ou eucaryote. La protéine peut être testée pour connaître son activité enzymatique dans une variété de situations, elle peut être cristallisée pour qu'on puisse étudier sa structure tertiaire, ou, dans l'industrie pharmaceutique, on peut étudier l'activité de nouveaux médicaments sur la protéine en question.

Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La réaction en chaîne par polymérase (PCR en anglais, pour *Polymerase Chain Reaction*) est une technique extrêmement flexible de copie d'ADN.

La PCR permet à une simple séquence d'ADN d'être copiée des millions de fois, ou d'être altérée par des moyens prédéterminés.

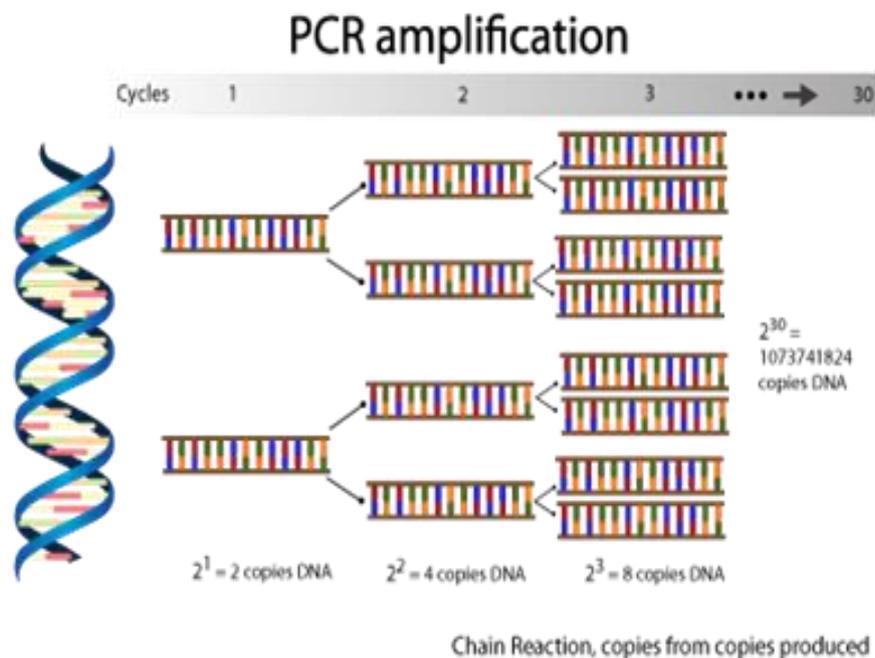


Fig. 2.4. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR peut aussi être utilisée pour déterminer si un fragment particulier d'ADN se trouve dans une bibliothèque d'ADN complémentaires.



Fig. 2.5. Bases azotées complémentaires

La PCR à **transcription inversée** (RT-PCR en anglais pour *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) pour l'amplification de l'ARN.

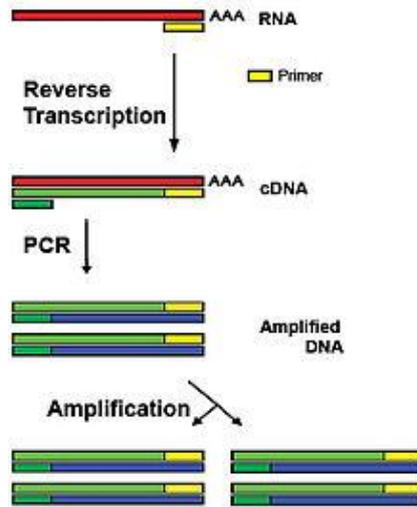


Fig. 2.6. PCR avec transcription inversée

Récemment, la **PCR temps réel** (qPCR) qui permet des mesures quantitatives de molécules d'ADN et d'ARN.

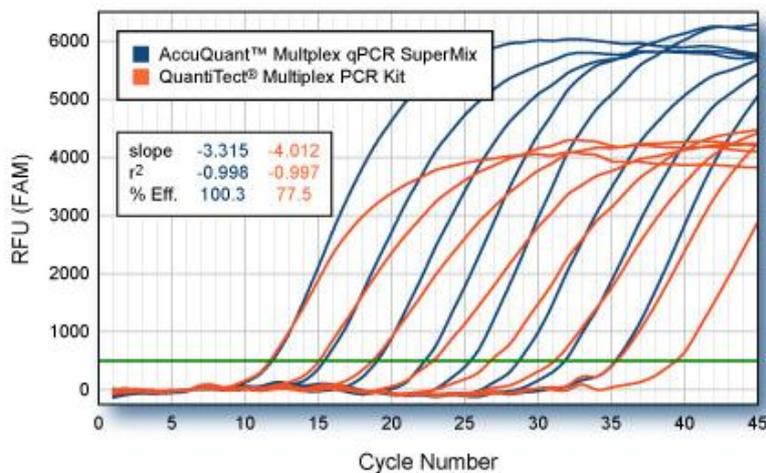


Fig. 2.7. La PCR en temps réel

Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation (MLPA)

Une variante de la PCR multiplexe qui utilise une sonde divisée en deux, nécessitant la ligation des deux parties pour que l'amplification ait lieu. Cette méthode est utilisée pour dénombrer les copies d'une même séquence dans un ADN.

Deux oligonucléotides sont utilisés:

1. Le premier contient à la suite une région correspondant à une première amorce de PCR et la première moitié de la sonde complémentaire de la région à détecter,
2. Le second contient la deuxième moitié de la sonde suivie d'une région correspondant à la deuxième amorce de PCR.

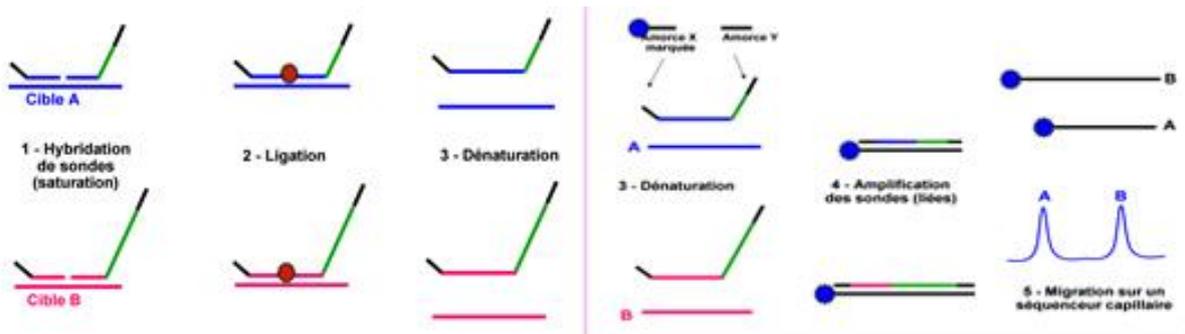


Fig. 2.8. Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation (MLPA)

DELETION DES EXONS 51, 52 ET 53 CHEZ UN PATIENT DMD

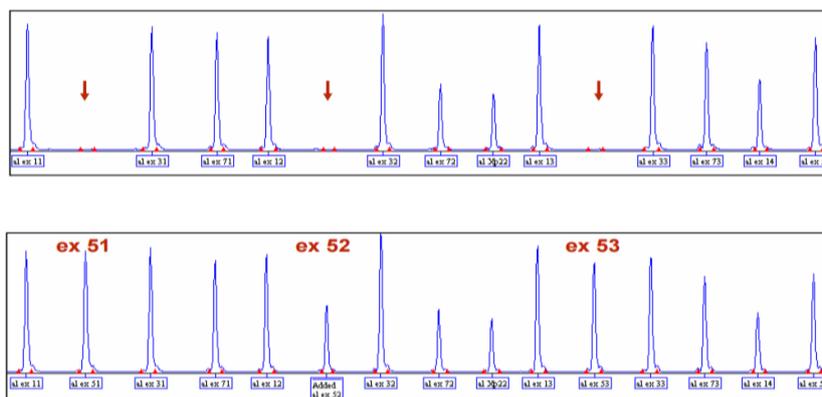


Fig. 2.9. La technologie MLPA: L'image illustre la suppression des exons 51,52,53 chez un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne

Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

- L'électrophorèse est un des principaux outils de biologie moléculaire. Le principe de base est que l'ADN, l'ARN et les protéines peuvent être séparés par des champs électriques.
- Dans l'électrophorèse en gel d'agarose, l'ADN, l'ARN et les protéines peuvent être séparés en fonction de leur taille en faisant circuler l'ADN à travers un gel d'agarose.
- Les protéines peuvent aussi être séparées par leur charge électrique, en utilisant ce qu'on appelle un gel isoélectrique.
- L'électrophorèse sur gel d'agarose (ou de polyacrylamide) est une des plus communément utilisées car elle permet de séparer des molécules en fonction de leur taille, préalable indispensable dans de multiples applications, notamment pour
 - identifier des fragments d'ADN découpés par des enzymes,
 - identifier un gène
 - établir des empreintes génétiques par Southern Blot

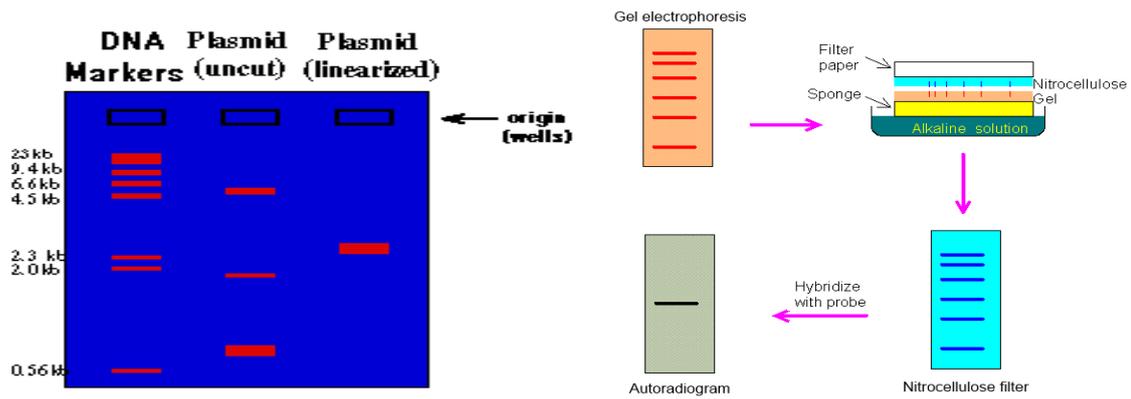


Fig. 2.10. Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

La séparation des molécules, dans un milieu donné, se fait donc premièrement en fonction de leurs **charges**, puis si celles-ci sont identiques, en fonction de leur taille.

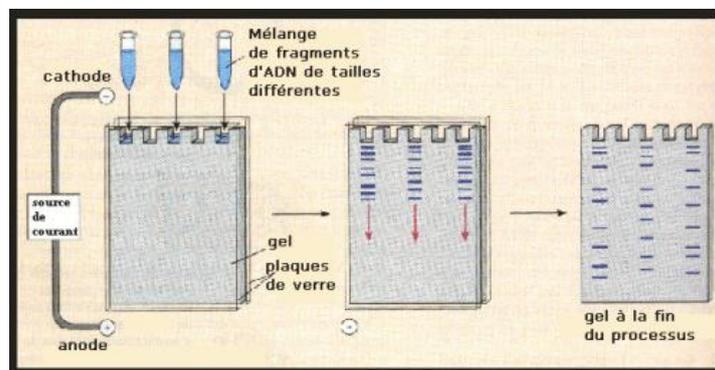


Fig. 2.11. La séparation des molécules en fonction de leur taille.

Il existe 3 types d'électrophorèse:

1. Southern Blot: Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose
2. Northern blot: Électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose
3. Western blot: Électrophorèse des protéines sur gel de acrylamide.

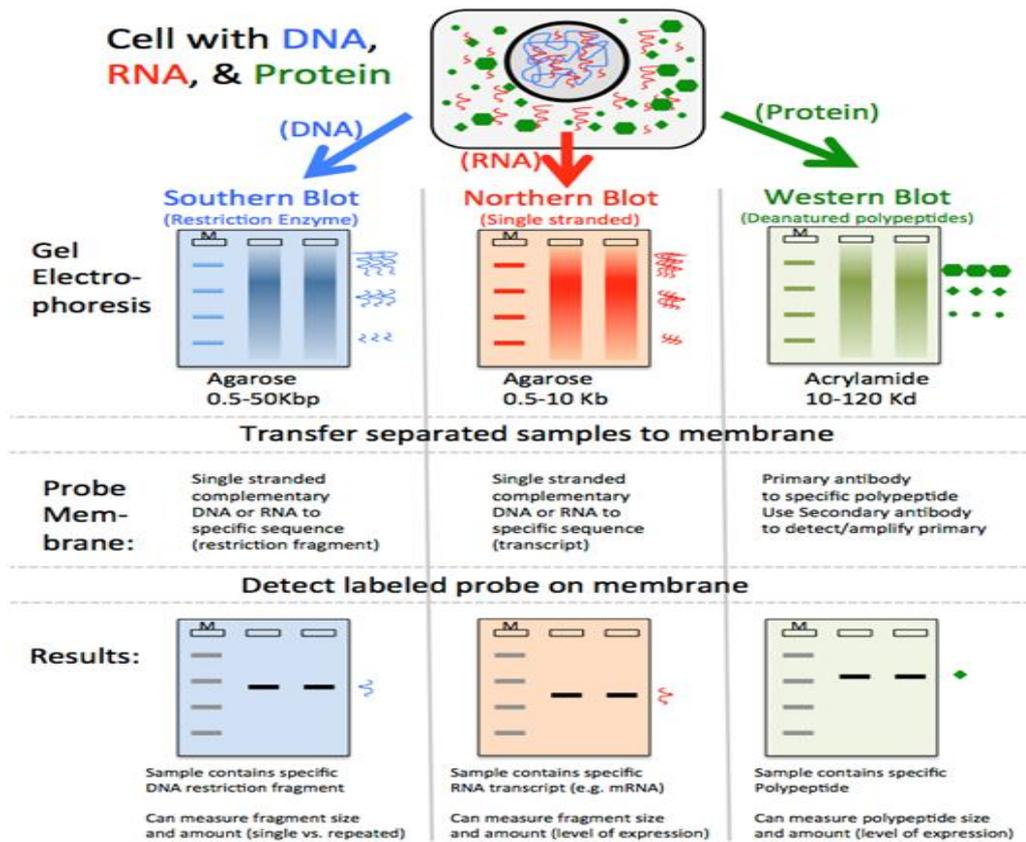


Fig. 2.12. Électrophorèse : Southern Blot, Northern blot, Western blot:

1. **Southern Blot: Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose (Mini gel- Gel coloré par le bleu de Nile)**

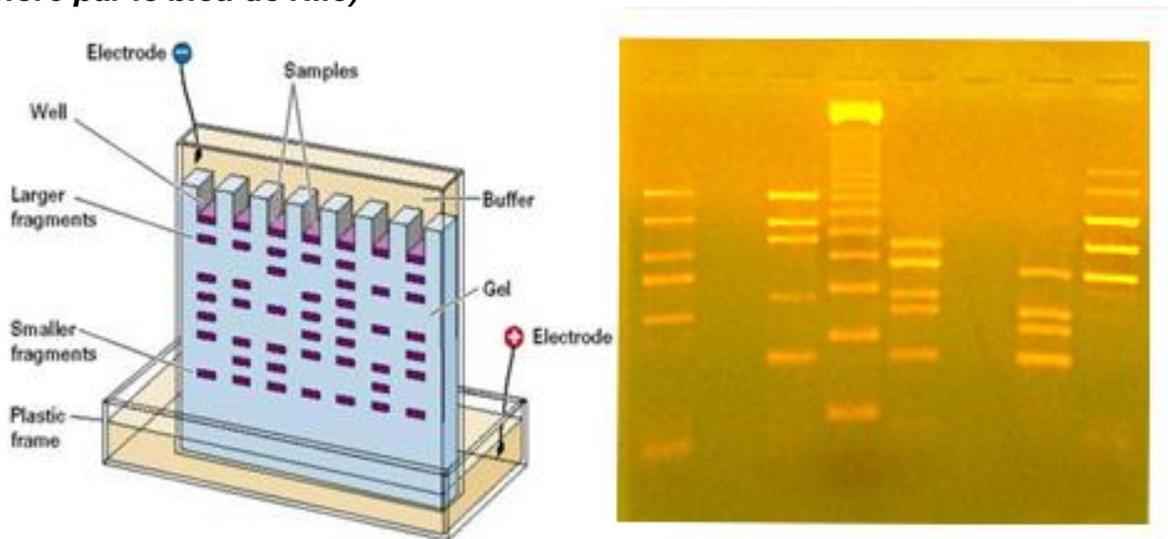


Fig. 2.13. Southern Blot: Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Nommé ainsi d'après le nom de son inventeur, le biologiste Edwin **Southern**, le Southern blot est une méthode pour sonder la présence d'une séquence précise d'ADN à l'intérieur d'un échantillon d'ADN.

Des échantillons d'ADN avant ou après digestion par une enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane par marquage via action capillaire.

La membrane peut alors être testée en utilisant une sonde ADN marquée avec un complément de la séquence en question.

À l'origine, la plupart des protocoles utilisaient des **marqueurs radioactifs**; cependant, maintenant il existe **de marquages non radioactifs**.

2. Northern blot: Électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose

Est utilisé pour étudier les modèles d'expression d'un type spécifique de molécule d'ARN en comparaison relative avec un ensemble de différents échantillons d'ARN. C'est essentiellement une combinaison d'une dénaturation d'électrophorèse d'ARN, et d'un *blot*.

Dans ce processus, l'ARN est séparé en fonction de la taille, puis est transféré sur une membrane qui est alors sondée avec un complément marqué pour la séquence intéressante.

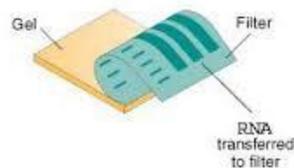


Fig. 2.14. L'ARN est transféré sur une membrane (filtre)

Les résultats peuvent être visualisés d'une variété de façons selon le marquage utilisé; cependant, la plupart conduisent à une révélation de bandes représentant la taille de l'ARN détecté dans l'échantillon.

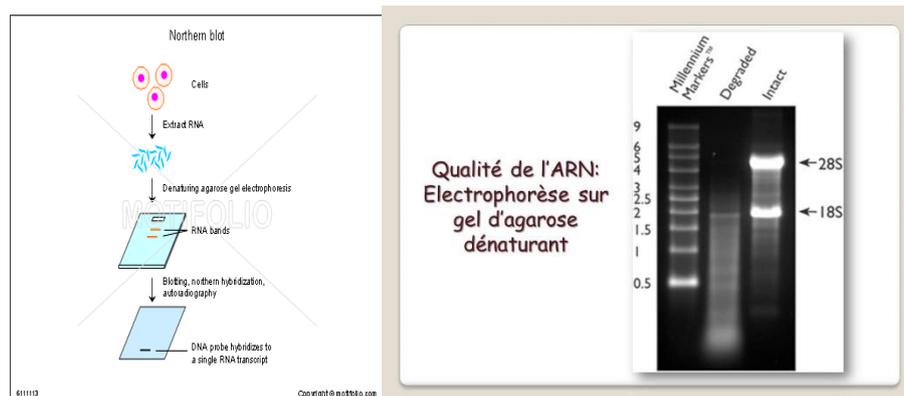


Fig. 2.15. Northern blot- Électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose

L'intensité de ces bandes est liée à la quantité d'ARN ciblé dans les échantillons analysés. Le procédé est utilisé généralement pour étudier quand et combien d'expressions de gènes se produisent en mesurant la quantité de cet ARN présent dans les différents échantillons.

C'est un des outils les plus fondamentaux pour déterminer quand certains gènes s'expriment dans les tissus vivants.

3. Western blot- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide:

Séparation des **protéines** par électrophorèse uniquement en fonction de leur taille (dénature les structures tertiaire et quaternaire des protéines et les charge toutes négativement), puis transfert des protéines séparées sur membrane pour les rendre accessibles à divers marquages immunologiques ou autres.

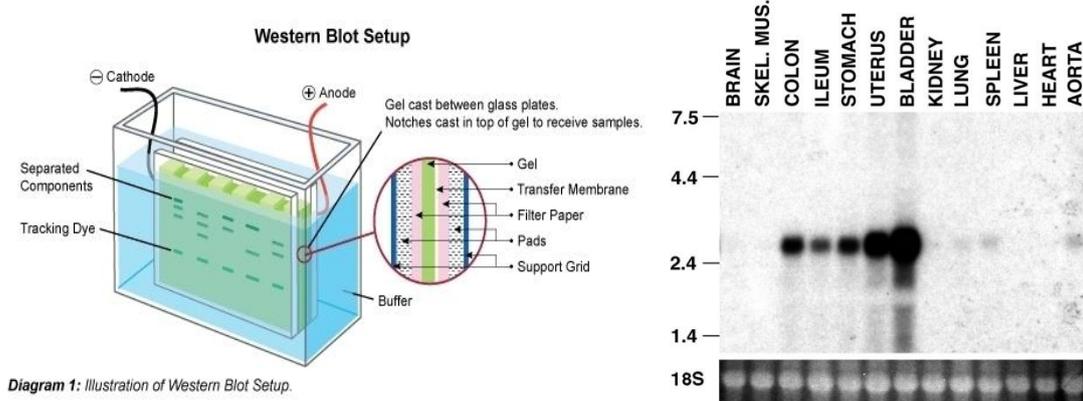


Fig. 2.16. Western blot- Électrophorèse sur gel de acrylamide

Les anticorps pour la plupart des protéines peuvent être créés par injection de petites quantités de protéine cible aux animaux tels que la souris, le lapin, le mouton ou l'âne (anticorps polyclonaux) ou produits dans une culture de cellules (anticorps monoclonaux). Ces anticorps peuvent être utilisés dans une variété de techniques analytiques et préparatives.

Étapes du Western blot

- 1) Séparation de la protéine d'intérêt
- 2) Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose
- 3) Détection de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps.

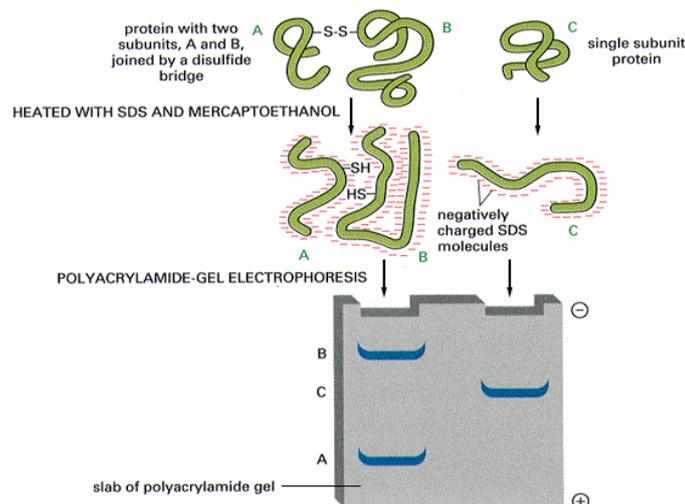


Fig. 2.17. Western blot

Des méthodes analogues de Western blot peuvent aussi être utilisées pour marquer directement des protéines spécifiques dans des cellules et des sections de tissus. Cependant, ces méthodes de marquages immunologiques sont plutôt associées à la biologie cellulaire qu'à la biologie moléculaire.

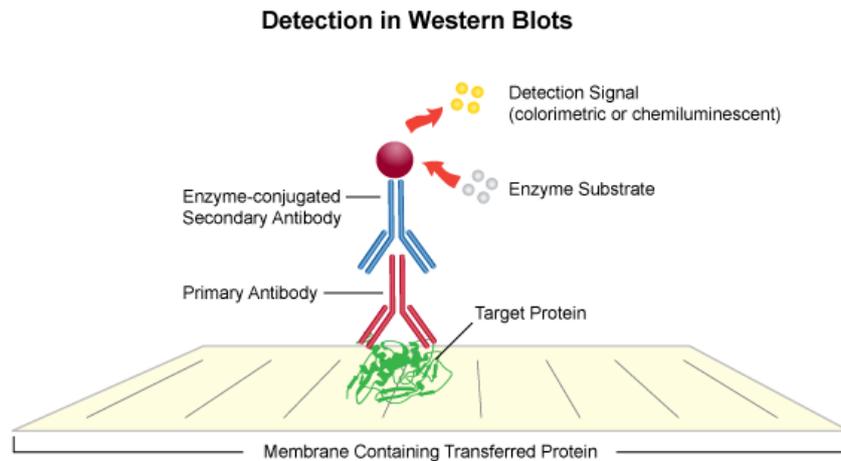


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

Fig. 2.18. Les méthodes de marquages immunologiques

Applications médicales en diagnostic:

- Les tests VIH de confirmation emploient la méthode du transfert de western afin de détecter un anticorps anti-VIH dans un échantillon de sérum. Des protéines de cellules que l'on sait infectées par le VIH sont séparées et transférées sur membrane comme décrit ci-avant. Le sérum à tester est appliqué. L'étape d'incubation dans l'anticorps primaire; les anticorps libres sont éliminés par rinçage de la membrane, et un anticorps dirigé contre les protéines humaines secondaires associé à une enzyme ou un chromophore est ajouté. Les bandes marquées indiquent ensuite les protéines contre lesquelles le sérum du patient contient des anticorps.
- Le transfert de western est également utilisé pour le test de confirmation de l'ESB (dite «maladie de la vache folle»).
- Certaines formes de détection de la maladie de Lyme utilisent le transfert de western.

Les jeux de mots

Les termes *western* et *northern* sont des jeux de mots: les premiers *blots* étaient sur l'ADN, et comme ils ont été faits par Edwin Southern, ils ont pris le nom de *Southern* (*southern* veut dire «du sud» en anglais; tandis que *western* signifie «de l'ouest» et *northern*, «du nord»).

Il est peu probable que Patricia Thomas, inventeur du *blot* ARN, qui est devenu le ***northern blot***, utilise vraiment ce terme.

Pour pousser la plaisanterie plus loin, on peut trouver, dans la *littérature*, des références vers

- des *south-westerns* «du sud-ouest» (interactions PR-ADN)
- des *far-westerns* du «far-ouest» (interactions PR-PR).

Travaux pratiques nr. 3

LES TECHNIQUES DE GENETIQUE MOLECULAIRE 2

Puce à ADN *microarray*

Une puce à ADN, aussi appelée *microarray*, est un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique.

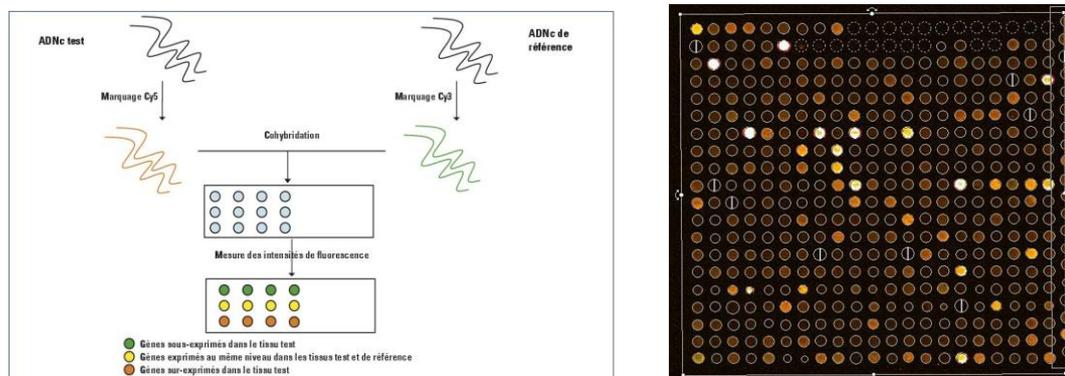


Fig. 3.1. Microarray

Cette biotechnologie récente permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule, un tissu, un organe, un organisme ou encore un mélange complexe, à un moment donné et dans un état donné par rapport à un échantillon de référence.

Est représentée par une collection de milliers de puits microscopiques, chaque puits contient un grand nombre de fragments d'ADN identiques permettant de mesurer **l'expression d'un gène particulier** par complémentarité de séquence avec ARN correspondant.

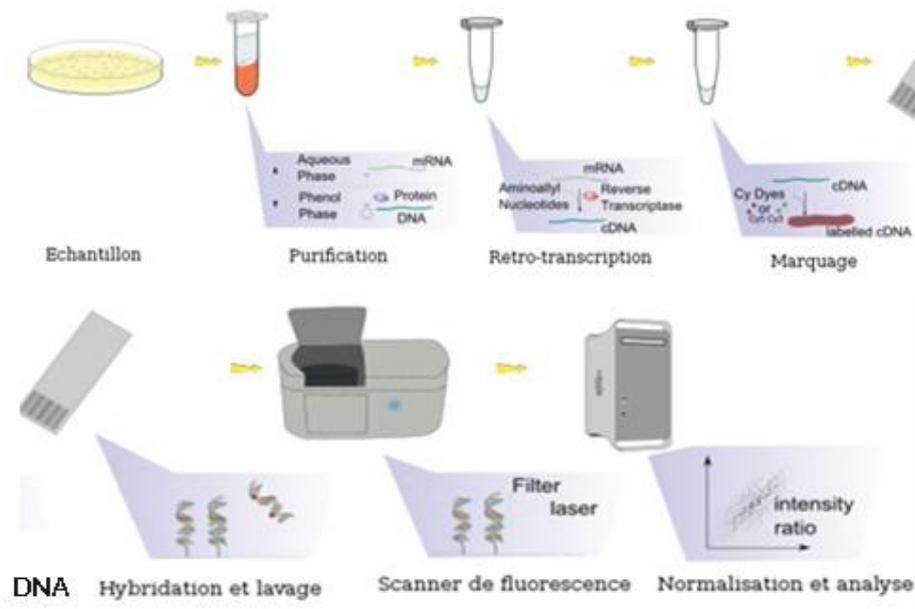


Fig. 3.2. Les étapes d'une expérience de biopuce ADN

Les puces permettent ainsi de connaître le transcriptome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes transcrit à un moment donné dans un groupe de cellules données.

Il y a plusieurs manières différentes de fabriquer des puces à ADN; les plus courantes sont les puces à silicium, lames de microscope dont les taches ont 100 microns de diamètre, les puces qu'on peut adapter à ses besoins, et celles avec des taches plus grosses sur des membranes poreuses (macropuces).

Les puces peuvent aussi être fabriquées pour des molécules autres que l'ADN. Par exemple, une puce à anticorps peut être utilisée pour déterminer quelle protéine ou bactérie est présente dans un échantillon de sang.

Panorama des domaines d'applications des biopuces:

- Biologie médicale de cancérologie
- Microbiologie
- Toxicogénomique
- Génomique environnementale

CGH-array

- Technique d'hybridation comparative génomique sur microréseau (puce à ADN).
- Technique de cytogénétique sur puces
- Technique de quantification relative: mise en évidence de pertes ou de gains de **matériel chromosomique ou régions du génome** par rapport à une référence.
- Les puces permettent la détection des microdélétions ou des amplifications pour des segments d'ADN à partir de 5 à 10 kb (milliers de paires de bases) => « chaînon manquant » entre la cytogénétique et la biologie moléculaire.

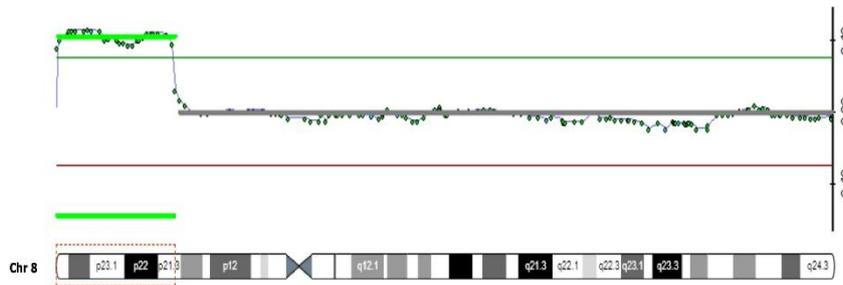


Fig. 3.3. Duplication terminale, un gain de nombre de copies de 22,3 Mo du chromosome dans la région 8p23.3 – p21.3. (Collection du Dr Cristina Gug)

Séquençage de l'ADN

Consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

Apparu dans la deuxième moitié des années 1970.

Méthodes:

1. méthode de Sanger
2. méthode de séquençage haut débit (HTS ou NGS)

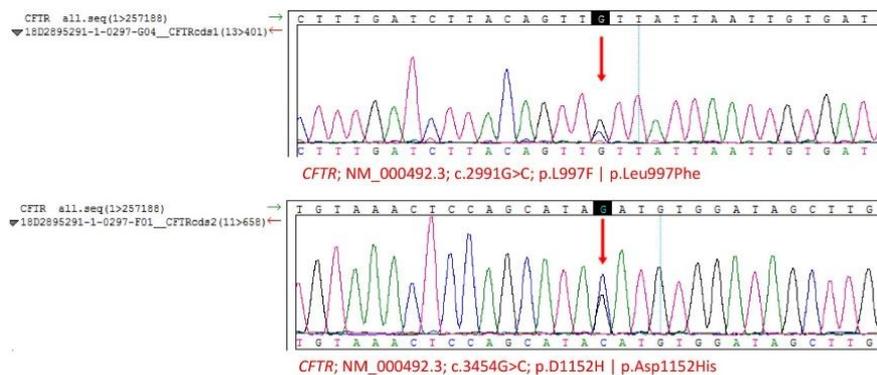


Fig. 3.4. Séquençage de Sanger chez un enfant atteint de fibrose kystique chez qui 2 mutations hétérozygotes du gène CFTR ont été identifiées (Collection du Dr Cristina Gug)

Next generation sequencing/Séquençage haut-débit (NGS/SHD)

En 2005 est apparue une nouvelle génération de séquenceurs dits à haut débit opérant en parallèle sur un très grand nombre de séquences courtes, reposant sur de nouvelles technologies physico-chimiques avec des débits jusqu'à 1000 fois supérieurs.

Les capacités de ces nouveaux séquenceurs sont de plus en plus grandes pour un prix de revient de plus en plus faible: actuellement 400 millions à 1 milliard de paires de bases par jour pour moins d'un euro par million de paires de base.

La commercialisation de ces méthodes permet actuellement de séquencer de façon routinière des génomes entiers ou leurs régions codantes: l'exome soit 1% du génome, de même qu'un panel de gènes choisis. Cette évolution technique permet également de faire des analyses systématiques en transcriptomique (RNA-Seq) et protéomique (ChIP-Seq), en épigénomique ou en métagénomique.

Ces analyses nécessitent la présence de plateformes bio-informatiques rodées à ces nouvelles technologies.

La technique de séquençage haut débit

- L'ADN génomique est d'abord fragmenté en petits morceaux aux extrémités desquelles sont liées des séquences adaptatrices. Les bibliothèques ainsi préparées sont ensuite fixées sur un support solide et chaque fragment est amplifié environ 1000 fois pour former des « clusters » clonaux qui seront séquencés en parallèle. À chaque cycle, l'ajout d'un nucléotide se traduit par un signal fluorescent associé à chacun des quatre nucléotides de l'ADN.
- Un excès de séquençage est effectué pour minimiser la non-uniformité des différents processus techniques (typiquement > 30X pour un génome entier et > 60X pour un exome) ainsi que pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection des variations génétiques.
- De nombreuses applications médicales voient le jour, que ce soit par l'utilisation de panels de gènes choisis, ou le séquençage d'exome.
- Largement exploitée en recherche, cette technologie est aussi utilisée en diagnostic dans des laboratoires du monde entier, car c'est l'outil le plus performant dans le diagnostic de maladies rares avec anomalie du développement.
- En effet, pour les patients atteints de déficience intellectuelle syndromique sans diagnostic clinique, cette technologie permet d'identifier une cause génétique chez 50% d'entre eux.

```

gi|Homo|          FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 165
gi|Macaca|       FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 165
gi|Pattus|       FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 169
gi|Rus|          FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 169
gi|Ramster|      FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 173
gi|Canis|        FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 169
gi|Sus|          FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 167
gi|Bos|          FEELTVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 161
gi|Gallus|       FEELVVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 163
gi|Pana|         FEELVVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 177
gi|Xenopus|      FEELVVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 171
gi|Alligator|    FEELVVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 177
gi|Danio|        FEELVVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 172
gi|Poeciliopsis| FEELVVKTRDGVVEITGKNEEKQDENGVISRCFTRKXYTLPPGVDPTLVSSSLSPGGLTV 172
** * 1**11.11**1*****1*****1** 1* ***** 1: 1 *1**11* *1*

gi|Homo|          EAPMFKLATQSNELIIVTFESPAQLGGFSAKSKIR----- 199
gi|Macaca|       EAPMFKLATQSNELIIVTFESPAQLGGFSAKSKIR----- 205
gi|Pattus|       EAPLPKAVTQSAEIIIVTFEARAQIGGFE---SEQSGAE--- 206
gi|Rus|          EAPLPKAVTQSAEIIIVTFEARAQIGGFEAGKSEQSGAE--- 209
gi|Ramster|      EAPLPKAVTQSAEIIIVTFEARAQIGGFEAGKSEQSGAE--- 213
gi|Canis|        EAPMFKPATQSAEIIIVTFEARAQIGGFEAGKSEQSGAE--- 209
gi|Sus|          EAPLPKPATQSAEIIIVTFEARAQIGGFEAGKSEQSGAE--- 207
gi|Bos|          EAPLPEPATQSAEIIIVTFQARAQLGGFEAGKSEQPETSKDP 204
gi|Gallus|       EAPLPEPATQSAEIIIVTFEA-----KKEEFAKE--- 193
gi|Pana|         EAPLPEPATQSAEIIIVTFQSAEII---AKKPEEFAKE--- 213
gi|Xenopus|      EAPLPEPATQSAEIIIVTFQSAEIIIGTTEAKKGEATKE--- 211
gi|Alligator|    EAPLPEPATQSAEIIIVTFQSAEIIIGTTEAKKGEATKE--- 187
gi|Danio|        EAPLPEPATQSAEIIIVTFQSAEIIIGTTEAKKGEATKE--- 199
gi|Poeciliopsis| EAPLPEPATQSAEIIIVTFQSAEIIIGTTEAKKGEATKE--- 201
*** * 1

```

Fig. 3.5. Interprétation des mutations (faux sens, remplacement d'acides aminés)

LES APPLICATIONS DES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les Applications en médecine légale

Les empreintes génétiques sont utilisées en médecine légale pour identifier ou innocenter des suspects grâce à leur sang, leur salive, leur sperme.

Elles permettent également:

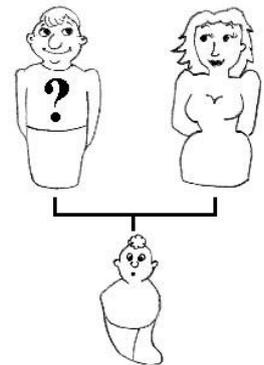
- d'identifier des restes humains,
- de faire des tests de paternité,
- d'organiser le don d'organe,
- d'étudier des populations d'animaux sauvages \
- de faire des recherches paléontologiques.

Recherche de Paternité

L'ADN étant transmis par moitié de chacun des parents à ses enfants, l'empreinte génétique trouve une application remarquable dans la recherche de paternité qui relève aussi bien

- du domaine civil (établissement ou contestation d'une filiation, action à des fins de subsides) que
- du domaine pénal (affaires de viol et d'inceste).

Pour une enquête une quinzaine de régions du génome sont étudiées pour déterminer une empreinte génétique



Locus	Mama		Copil		Tatal prezumtiv		Index
Amelogenin	XX		XY		XY		-
D3S1358	16	16	16	18	16	18	2.7905
TH01	9	9	9	9.3	9.3	9.3	1.5106
D21S11	28	30.2	30	30.2	30	32.2	1.1211
D18S51	13	16	13	15	15	15	2.9762
Penta E	12	13	9	12	9	13	35.7143
D5S818	9	12	9	11	10	11	0.6775
D13S317	8	11	9	11	9	11	5.6274
D7S820	11	12	10	12	10	11	0.8475
D16S539	9	11	11	11	11	11	3.1348
CSF1PO	11	11	11	11	11	12	1.6181
Penta D	13	14	12	13	12	12	2.1277
vWA	17	17	14	17	14	15	1.9084
D8S1179	13	13	13	13	10	13	1.5674
TPOX	8	9	8	8	8	8	1.8939
FGA	23	24	22	23	22	24	1.3298

Fig. 3.6. La recherche de paternité 99.9999%= Analyse de paternité confirmée

Locus	Mama		Copil		Tatal prezumtiv		Index
Amelogenin	XX		XY		XY		-
D3S1358	14	17	14	17	15	16	fara alela comuna
TH01	9.3	9.3	7	9.3	8	8	fara alela comuna
D21S11	31.2	32.2	30.2	31.2	28	29	fara alela comuna
D18S51	14	14	14	16	11	14	fara alela comuna
Penta E	12	18	15	18	8	17	fara alela comuna
D5S818	11	11	11	13	7	11	fara alela comuna
D13S317	11	12	11	12	8	12	
D7S820	7	8	8	10	12	13	fara alela comuna
D16S539	11	14	11	13	9	11	fara alela comuna
CSF1PO	12	12	11	12	10	12	fara alela comuna
Penta D	9	11	9	11	9	12	
vWA	17	19	17	19	17	18	
D8S1179	13	14	13	13	13	15	
TPOX	8	11	8	11	8	11	
FGA	23	24	19	24	20	21	fara alela comuna

Fig. 3.7. La recherche de paternité 0% = Analyse de paternité refusée

Criminologie

L'utilisation la plus connue est celle qui en est faite en criminologie pour confondre un suspect ou identifier une personne décédée.

La justice s'accorde sur les faits suivant lors d'une enquête:

- plus nombreux sont les sites polymorphes qui font apparaître une concordance entre un échantillon recueilli sur le lieu d'une infraction (échantillon probatoire) et un échantillon prélevé sur un suspect, moins il est probable que l'échantillon probatoire provienne d'un individu différent.
- La non-concordance constatée sur un seul site polymorphe conduit à écarter de façon absolue l'individu dont le profil ADN est confronté à celui de l'échantillon probatoire.
- **L'inclusion** s'apprécie en termes de *probabilité*, **l'exclusion** en termes de *certitude*. (Extrait d'un rapport de l'Assemblée Nationale)

Dans le domaine des enquêtes judiciaires, de nombreuses raisons ont conduit les services de police à recourir aux **empreintes génétiques**:

- à l'exception des globules rouges, toutes les cellules du corps humain peuvent théoriquement être identifiées: *sperme, sang (globules blancs), racines de cheveux, salive (cellules épithéliales), peau, moelle osseuse, os*.
- l'ADN étant le même d'une cellule à l'autre, il est possible de procéder à une comparaison entre différentes parties du corps, telles que sang et sperme, cheveux et peau

De très faibles quantités de ces types de substances sont nécessaires pour procéder à une identification. Les techniques permettent d'innocenter certains suspects et, parallèlement, d'en identifier d'autres.

Paléontologie et Archéologie

La récupération de l'ADN fossile pose de nombreux problèmes. La *bonne conservation* de l'ADN dans les restes fossiles dépend des facteurs physico-chimiques environnementaux et souvent l'ADN récupéré est de mauvaise qualité.

Le plus vieux morceau d'ADN récupéré date de 120 à 135 millions d'années.

L'ADN ancien peut être extrait et amplifié à l'aide des méthodes classiques (plus ou moins modifiées) développées sur le vivant. Dans un premier temps, les tissus sont soigneusement nettoyés avant d'être broyés ou mixés et les os sont décalcifiés. Ils sont ensuite traités. Une fois l'ADN extrait il est amplifié par PCR.



Fig. 3.8. Paléontologie

L'ADN peut servir à caractériser un individu par son empreinte génétique en utilisant des séquences nucléotidiques très variables, ou encore à établir des liens de parenté entre individus.

Il est également possible de déterminer le sexe d'un individu grâce à des séquences spécifiques du chromosome Y (caractéristique du sexe mâle) ou des gènes dont la taille varie en fonction du sexe.

En 1995, une équipe de l'université de Jérusalem a étudié le sexe de plusieurs squelettes de nouveau-nés (âgés de moins d'un jour) de la fin de l'époque romaine au début de l'époque byzantine (site d'Ashkelon en Israël) pour essayer de comprendre **l'infanticide** dans les sociétés passées. Contre toute attente, les nouveau-nés étaient majoritairement de sexe masculin.

Certaines analyses peuvent porter sur des espèces animales: ainsi, en 1995, on a pu identifier les différentes espèces dont la peau avait été utilisée pour la fabrication des parchemins de la mer Morte.

Si certaines maladies sont parfois repérables sur les ossements, les agents pathogènes (virus, bactéries etc.) ne peuvent être détectés que grâce à des analyses moléculaires. Le virus VIH, par exemple, a pu être identifié dans les tissus d'un marin de Manchester mort d'une pneumonie en 1959.

Dans une perspective d'évolution moléculaire, les séquences peuvent servir à déterminer les relations de parenté entre espèces actuelles et fossiles. Cela permet une meilleure classification du vivant et la construction d'arbre phylogénétique plus précis.



Fig. 3.9. À partir de fossiles, on peut fabriquer un arbre phylogénétique plus précis.

Travaux pratiques nr. 4

ARBRE GÉNÉALOGIQUE

Au début de ses recherches, on s'intéresse principalement à ses ancêtres directs: c'est la généalogie ascendante.

Mais petit à petit, la passion venant, vous chercherez à retrouver les frères et sœurs de vos ancêtres et tous leurs descendants : c'est la généalogie descendante

Arbre Généalogique ascendant: Tous les ancêtres d'une personne

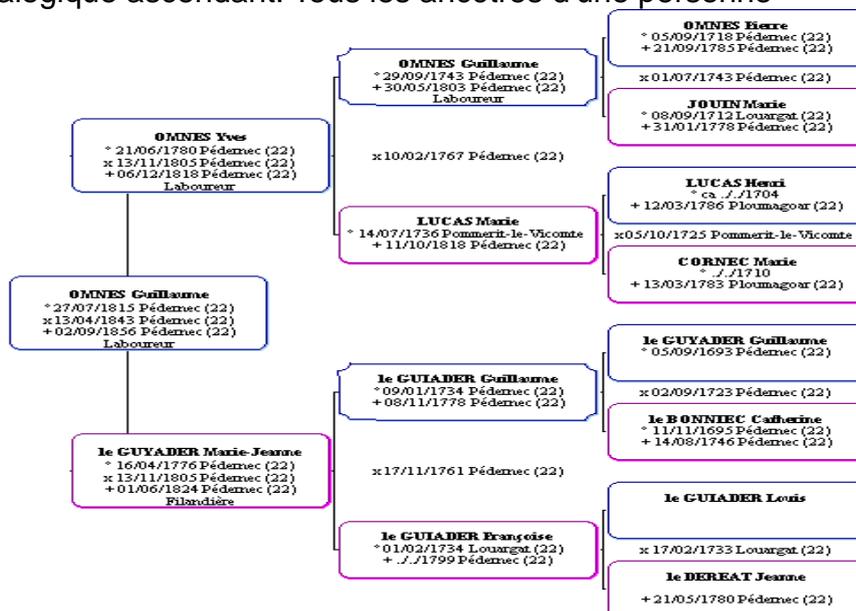


Fig. 4.1. Un **exemple d'arbre généalogique**: Les ancêtres de Guillaume Omnès sur 4 générations. (http://www.guide-genealogie.com/guide/arbre_genealogique.html)

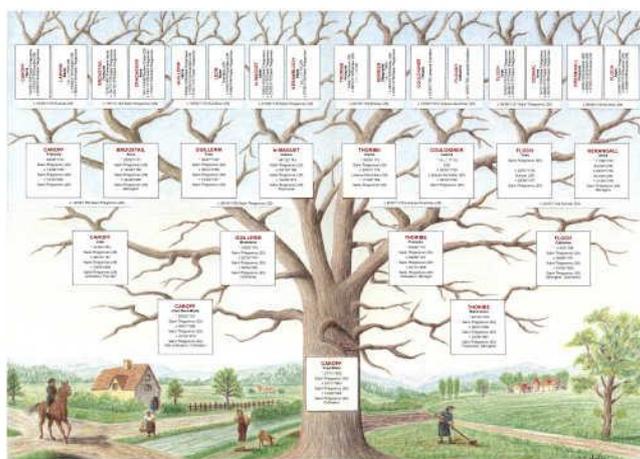


Fig. 4.2. Arbre généalogique artistique ascendant réalisé par Jean-Bernard Laurent (<https://edmeedexhavee.wordpress.com/2012/09/10/tumultueux-lignages/jean-bernard-laurent-arbre-genealogi>)

Arbre Généalogique ascendant agnatique (généalogie ne prenant en compte que les hommes). Voici un exemple de généalogie agnatique avec la généalogie de Guillaume Omnès. A chaque génération vous avez ici les parents sans les ascendants de la mère (grands parents...). L'arbre généalogique se lit de bas en haut.

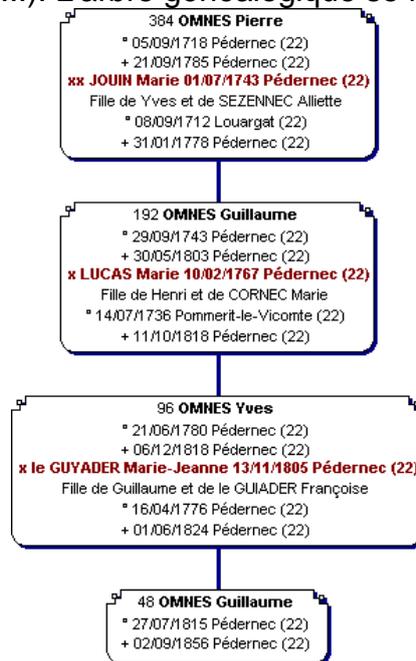


Fig. 4.3. Arbre généalogique descendant: Toute la descendance d'une personne. (http://www.guide-genealogie.com/guide/arbre_genealogique.html)

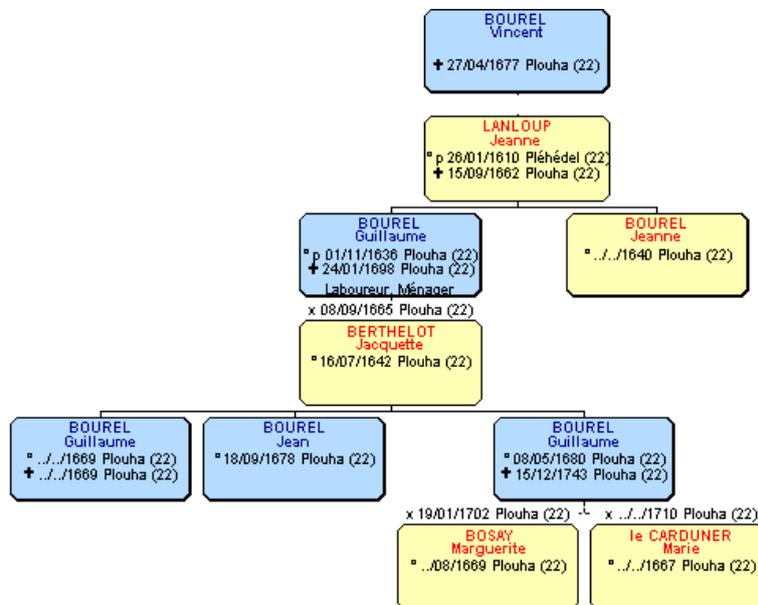


Fig. 4.4. L'arbre généalogique représente la descendance de Vincent Bourel et Jeanne Lanloup. (<https://www.cg540.net/uploaded/mini-guide-genealogie-facile.pdf>)

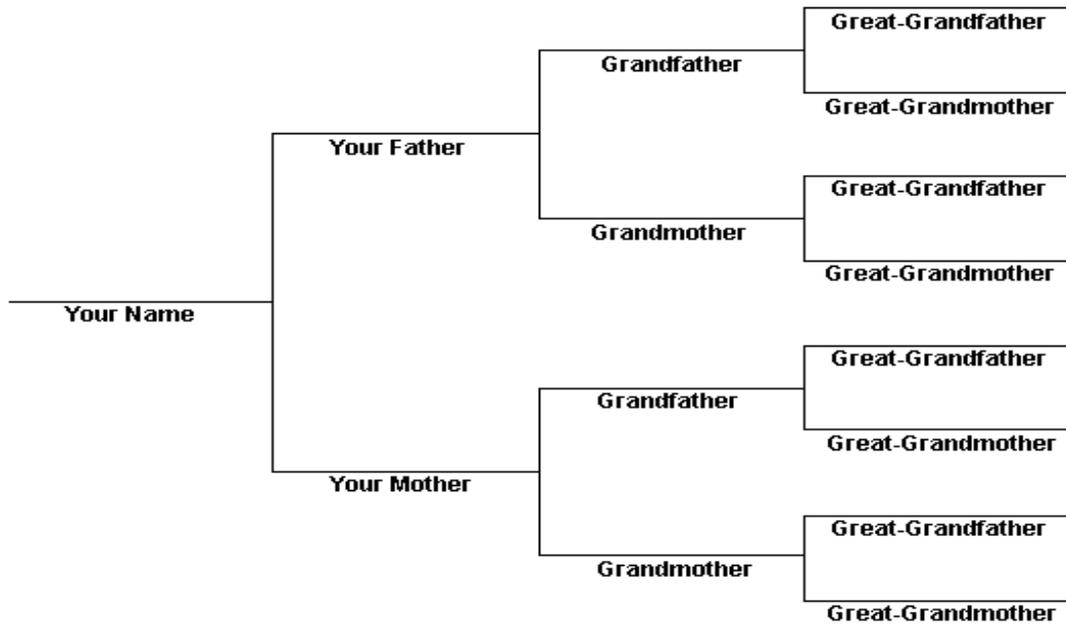


Fig.4.5. Arbre généalogique ascendant (Vous pouvez le compléter avec vos données)

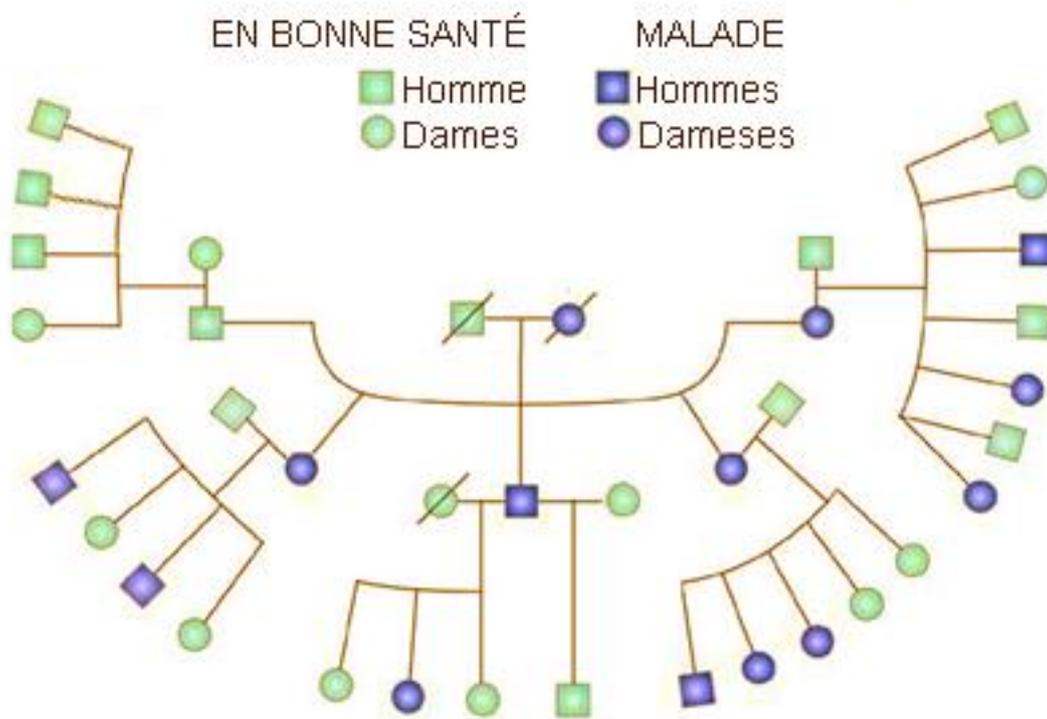


Fig. 4.6. Arbre Généalogique circulaire (avec signes graphiques)

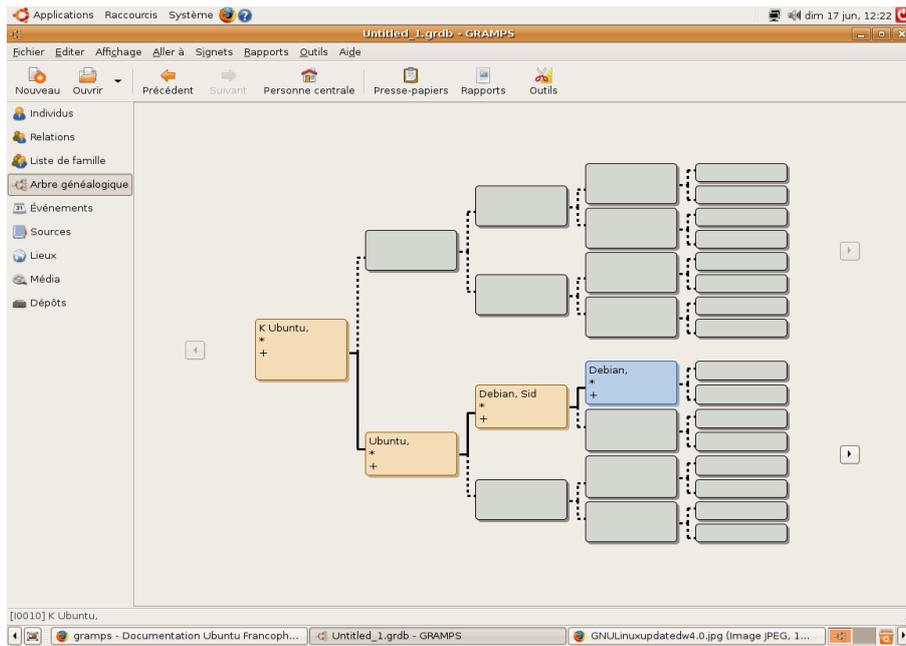


Fig. 4.9. Logiciels gratuits pour faire son arbre généalogique (<http://meilleur-logiciel.com/3-logiciel-gratuit-pour-faire-arbre-genealogique>)

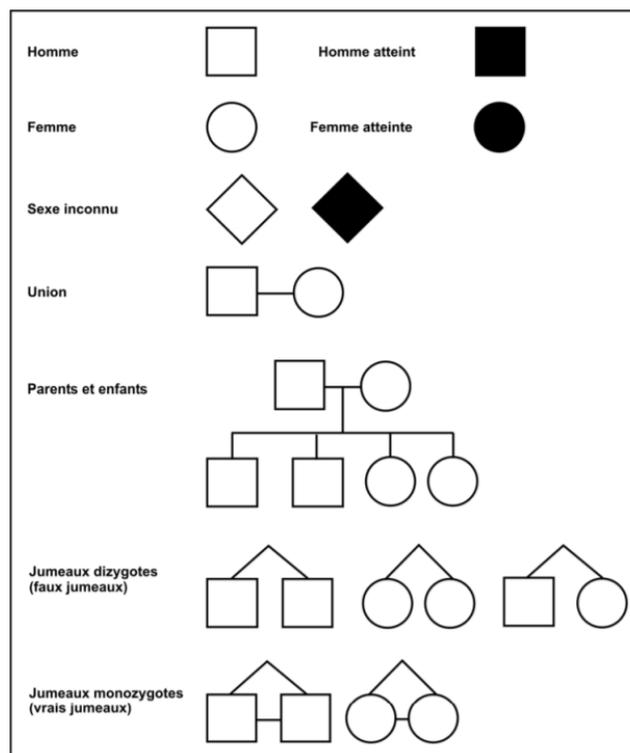


Fig. 4.10. Symboles utilisées dans un arbre généalogique

Les Caractères héréditaires

Certains caractères se transmettent de génération en génération. Ils sont héréditaires. L'observation de plusieurs individus d'une même famille ou l'étude d'un arbre généalogique peut donner une indication sur l'origine de ces caractères.



Fig. 4.11. Une famille de trois générations: grand-mère, mère et nièce.

MODELES DE TRANSMISSION DES CARACTERES HEREDITAIRES

4.1. La transmission autosomique dominante (AD)

Comme ce schéma le montre, le risque pour ce couple d'avoir un enfant porteur de l'allèle morbide est de $1/2$.

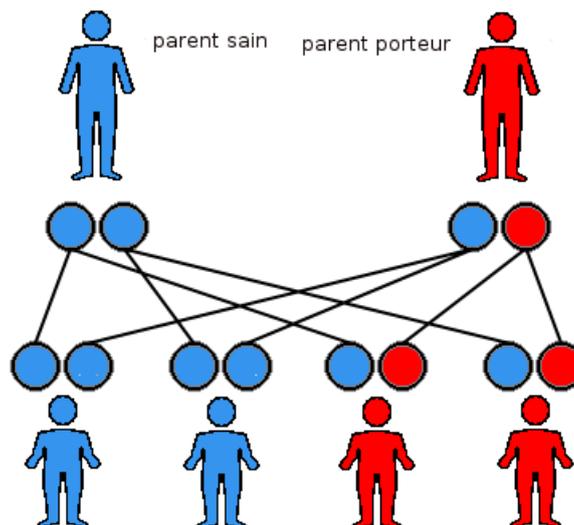


Fig. 4.12. Union d'un en bonne santé et d'un malade (porteur)

Comme le schéma ci-dessous le montre, ce couple a un risque de:

- $3/4$ d'avoir un enfant porteur de l'allèle morbide avec un risque de $1/4$ d'avoir un porteur homozygote et un risque de $1/2$ d'avoir un porteur hétérozygote,
- $1/4$ d'avoir un enfant non porteur.

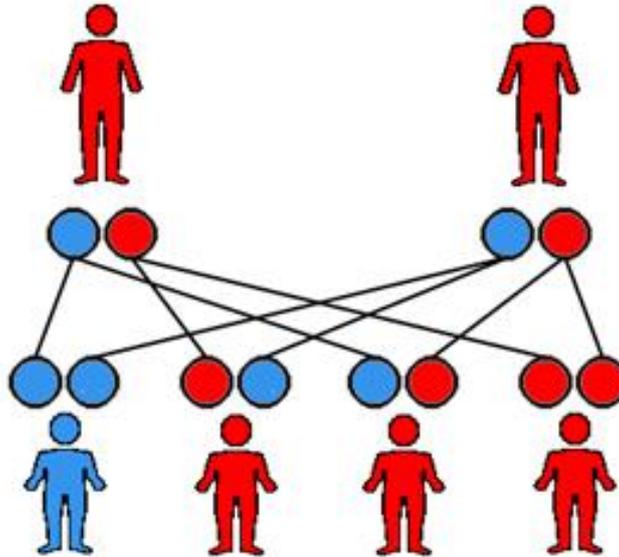


Fig. 4.13. Union de deux porteurs

Quelques caractéristiques sont évidentes:

- le gène dominant (le trait) peut être hérité d'un parent;
- les parents hétérozygotes malades peuvent avoir des enfants en bonne santé en proportion de 1:3, quel que soit le sexe de l'enfant;
- les homozygotes présentent un tableau phénotypique plus exprimé; dans la plupart des maladies autosomiques dominantes, la symptomatologie est plus élevée;
- la fonction **dominante** se trouve généralement dans toutes les générations;
- les caractères **dominants** peuvent être présents dans les familles, sans qu'elles soient consanguines;
- l'incidence des caractères **dominants** n'est pas influencée par le sexe;
- un parent hétérozygote transmet le gène à la moitié de la descendance.
- l'anomalie (le trait) est présente dans chaque génération si la pénétrance du gène est complet (sauf les mutations *de novo*) et le nombre de membres affectés de la famille est d'environ 50%;

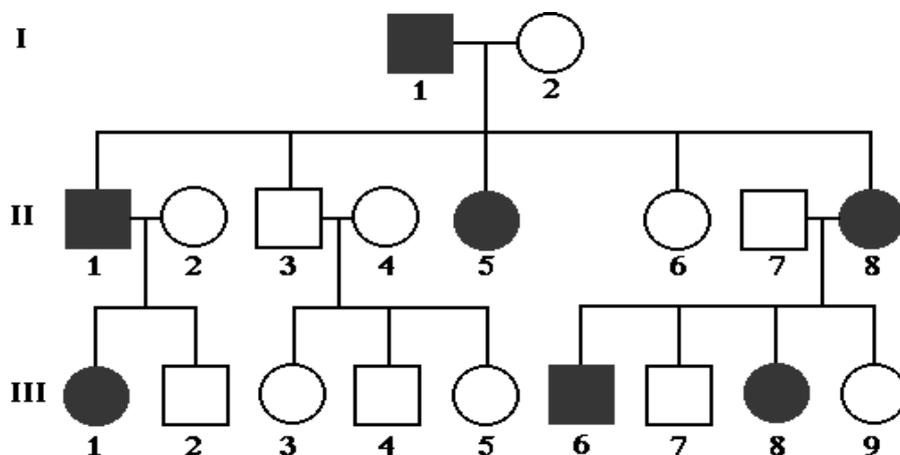


Fig. 4.14. Un arbre généalogique typique pour la transmission autosomique dominante.

La pénétrance

- Certains individus possédant le gène délétère (d'une maladie autosomique dominante, par exemple), ne présentent pas le phénotype attendu: on dit alors que la pénétrance est incomplète.
- **Le nombre** d'individus porteurs de la mutation ne correspond pas au **nombre** d'individus ayant un **phénotype anormal**.
- Il s'agit d'une évaluation quantitative.
- La pénétrance d'une maladie génétique est de 100 % si cette maladie s'exprime dès que les conditions génétiques sont présentes. C'est-à-dire si tous les individus qui ont le même génotype expriment le même phénotype. Par exemple dans l'achondroplasie, la pénétrance est de 100 % chez le fœtus.
- Dans la maladie de Huntington, la pénétrance est de 100 % à 75 ans mais n'est que de 50 % à 50 ans.

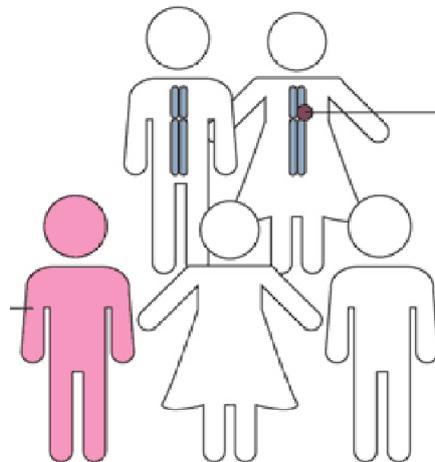


Fig. 4.15. Un cas sporadique dans une famille est apparu par mutation de novo.

4.2. La transmission autosomique récessive (AR)

Dans la transmission autosomique récessive sont évidents plusieurs fonctions:

- la plupart des patients souffrants proviennent des parents apparemment sains, mais hétérozygotes;

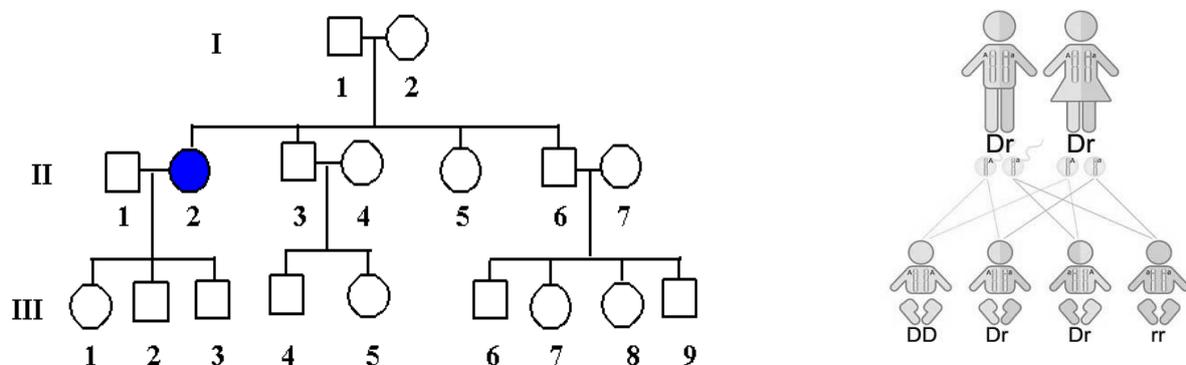


Fig. 4.16. Arbre généalogique dans lequel le seul patient a une maladie autosomique récessive

- une mariage d'une personne en bonne santé (DD) avec une personne malade (rr), tous les enfants seront en bonne santé (Dr);

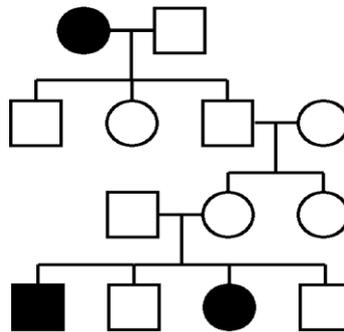


Fig. 4.17. Arbre généalogique dans lequel on observe que la maladie peut sauter d'une génération à l'autre.

- Si une personne malade (rr) se marie avec une personne saine mais hétérozygote (Dr), le risque de donner naissance à des enfants malades (rr) est de 50%;

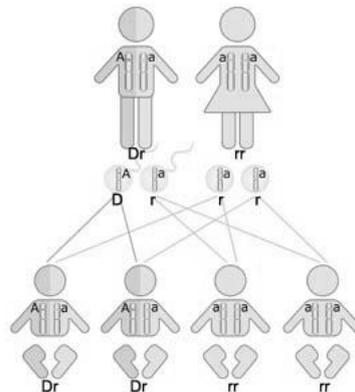


Fig. 4.18. Le risque d'avoir un enfant atteint de maladie AR est de 50% s'il y a un parent homozygote et un autre hétérozygote (pseudodominant).

- La consanguinité est plus fréquente dans l'ascendance des malades
- Le pedigree où *la consanguinité des parents* suggère la transmission AR

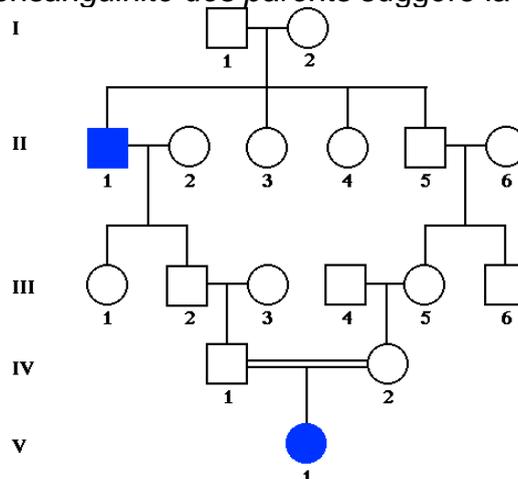


Fig. 4.19. Arbre généalogique dans lequel *la consanguinité des parents* suggère la transmission autosomique récessive.

4.3. La transmission récessive liée à l'X

- L'incidence chez les hommes est plus élevée que chez les femmes;
- Seulement les femmes sont hétérozygotes

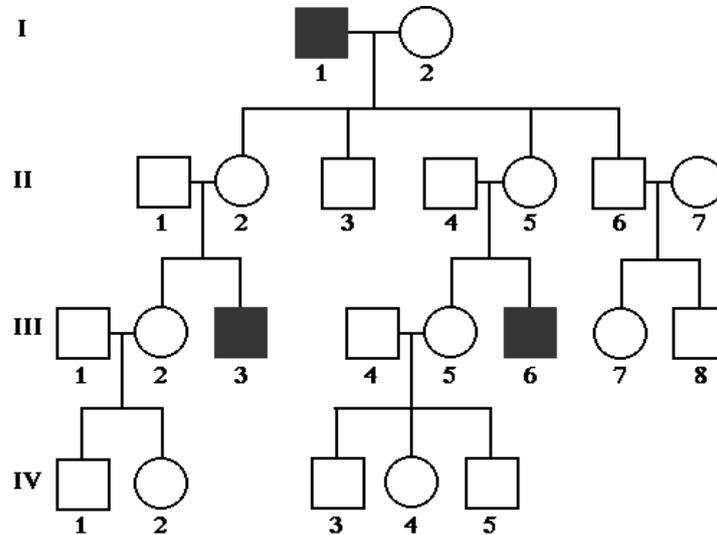


Fig. 4.20. L'arbre généalogique typique pour la transmission récessive liée à l' X (hémophilie A)

- Les femmes hétérozygotes, saines, transmettent la maladie que chez les garçons, jamais aux filles;
- Un homme malade ne transmet pas la maladie chez les garçons;

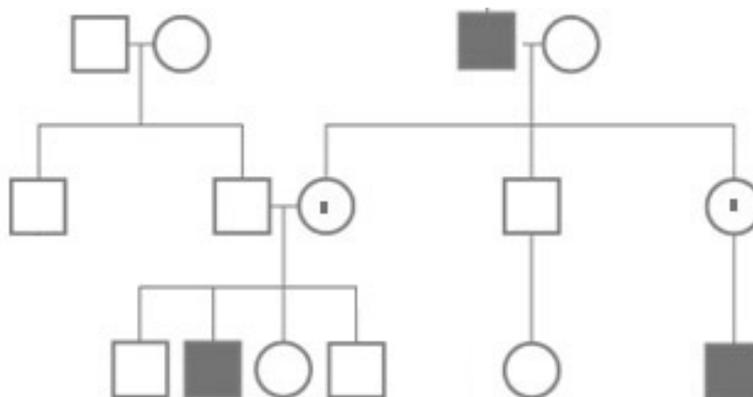


Fig. 4.21. L'arbre généalogique pour la transmission récessive liée à l' X: les malades sont des hommes et leurs mères sont porteuses en bonne santé

4.4. La transmission dominante liée à l'X

- le père malade transmet la maladie à ses filles, jamais aux garçons;

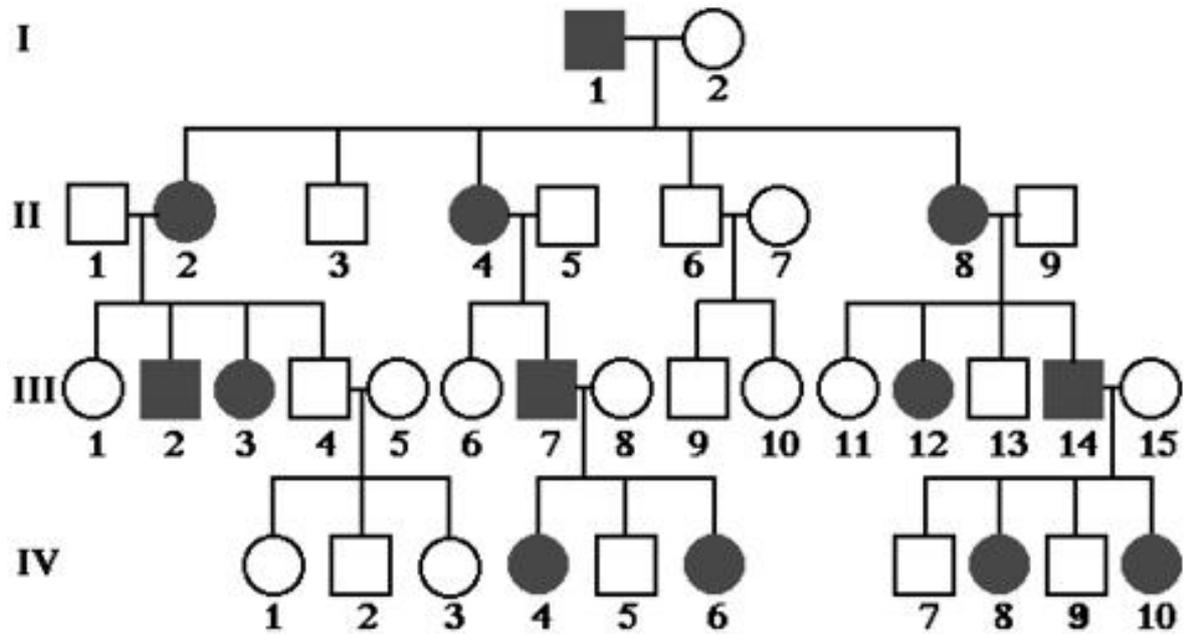


Fig. 4.22. L'arbre généalogique pour la transmission dominant liée à l' X: les patients sont des deux sexes mais les hommes ne transmettent la maladie qu'à leurs filles.

Les femmes **malades** (hétérozygotes) donneront naissance à

- des filles malades en proportion de **25%**,
- filles saines **25%**,
- des garçons en bonne santé en proportion de **25%**
- et **25%** des garçons risquent être sujet d'un avortement spontané.

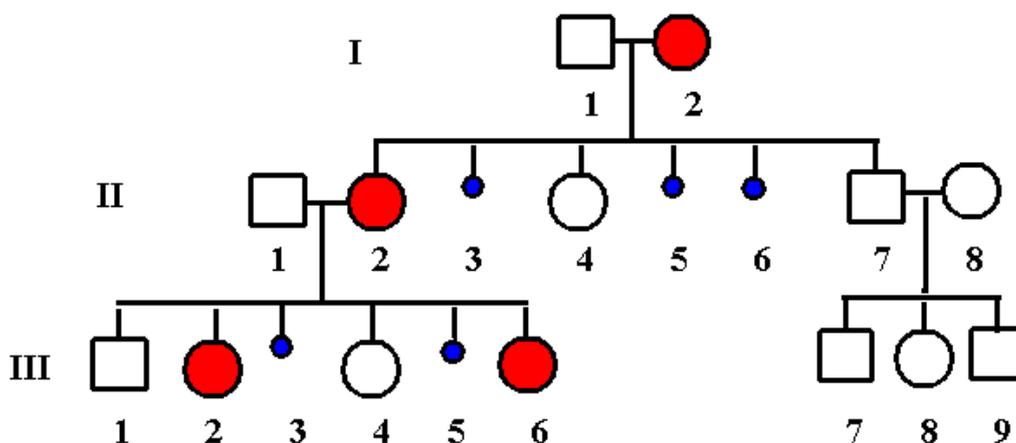


Fig. 4.23. L'arbre généalogique pour la transmission dominant liée à l' X: les filles sont malades, les garçons malades meurent au stade fœtal.

Des deux parents malades, seulement la moitié des garçons sera en bonne santé.

4.5. La transmission liée à l'Y

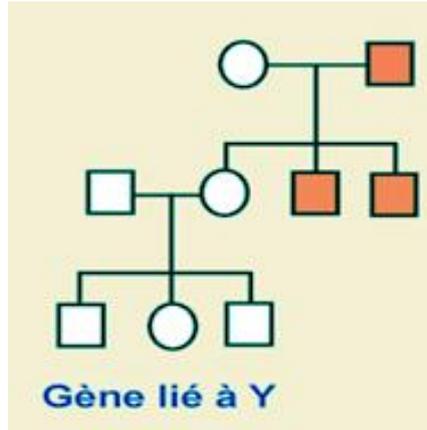


Fig. 4.24. La maladie se transmet de père en fils

4.6. La transmission des maladies dues à un gène mitochondrial

Caractéristiques

- Les maladies d'origine mitochondriale touchent les hommes et les femmes de façon comparable.
- Une personne malade a sa mère malade.
- Les femmes malades transmettent la maladie à tous leurs enfants quel que soit leur sexe.
- Les hommes malades ne transmettent la maladie à aucun de leurs enfants.
- La maladie peut présenter des formes modérées ou graves.

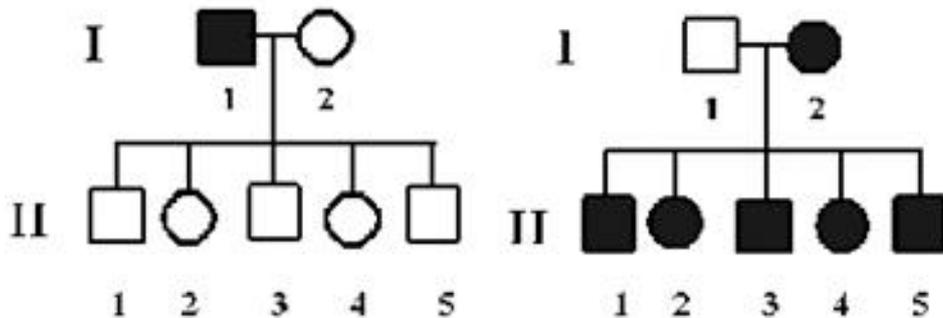


Fig. 4.25. L'arbre généalogique pour la transmission mitochondriale

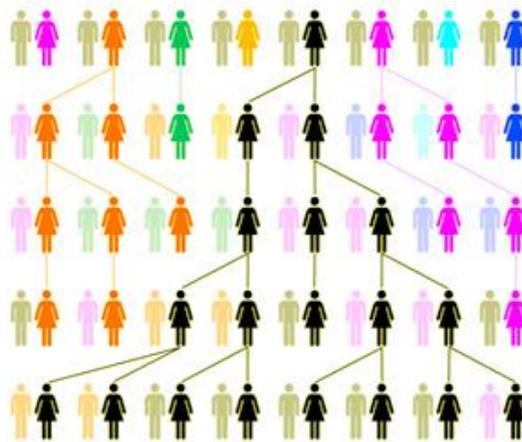


Fig. 4.26. Ascendance féminine et mitochondriale

Thématique pour L'EXAMEN PRATIQUE de génétique

Les arbres généalogiques et les transmissions génétiques des maladies.

1. A reconnaître le type de transmission de la maladie et de noter la conclusion (ex. Transmission autosomique dominante)
2. A noter les personnes malades – sûr et probables (ex I3, II5)
3. A noter les porteurs, dans le cas d'une maladie récessive autosomique ou liée à un chromosome sexuel (ex II6, III9 etc.)
4. A exemplifier si, par exemple, une personne malade de l'ultime génération va se marier et va avoir des enfants avec une personne saine ou porteuse, sont lesquelles les génotypes et les phénotypes des enfants possibles.

EXERCICES

1. Le pedigree suivant représente la transmission d'un gène responsable d'une anomalie génétique. Le gène est-il dominant ou récessif ? Justifiez votre réponse.

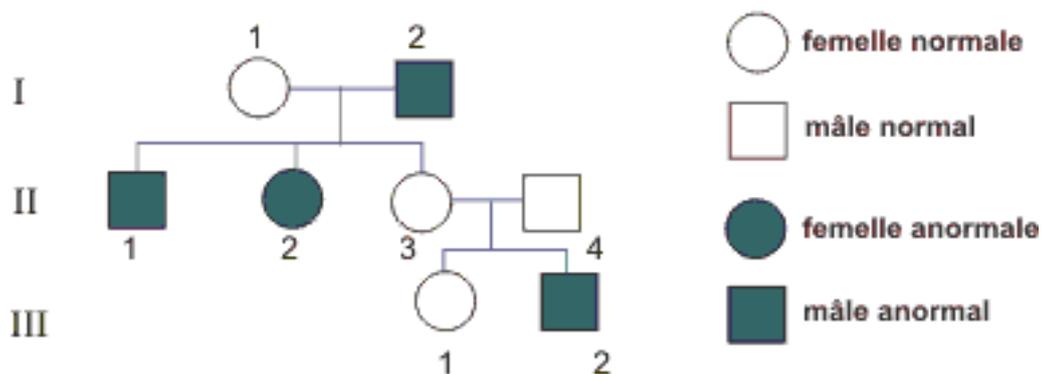


Fig. 4.27. Exercice: Reconnaissez le model de transmission de la maladie

2. Une femme dont les parents et les grands parents sont normaux a un **oncle (le frère de sa mère) atteint de daltonisme** (anomalie due à un gène récessif lié au sexe). Personne d'autre dans sa famille n'a cette anomalie. Cette femme et son conjoint sont normaux. Elle se demande quand même si c'est possible qu'elle ait un enfant daltonien. Que pouvez-vous lui répondre?

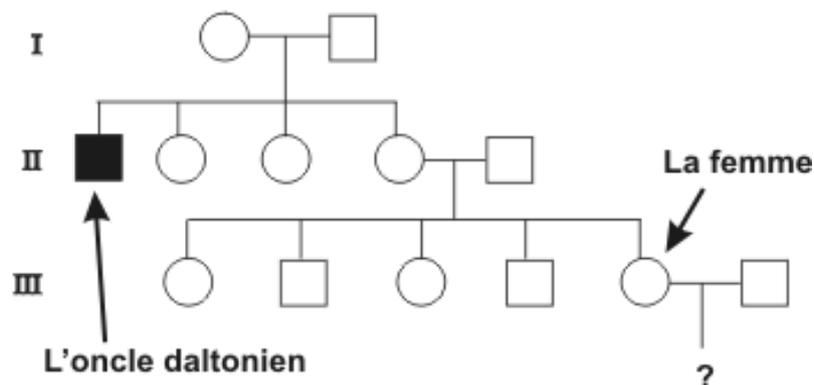


Fig. 4.28. Exercice: Reconnaissez le model de transmission de la maladie

Reconnaissez le model de transmission de la maladie:

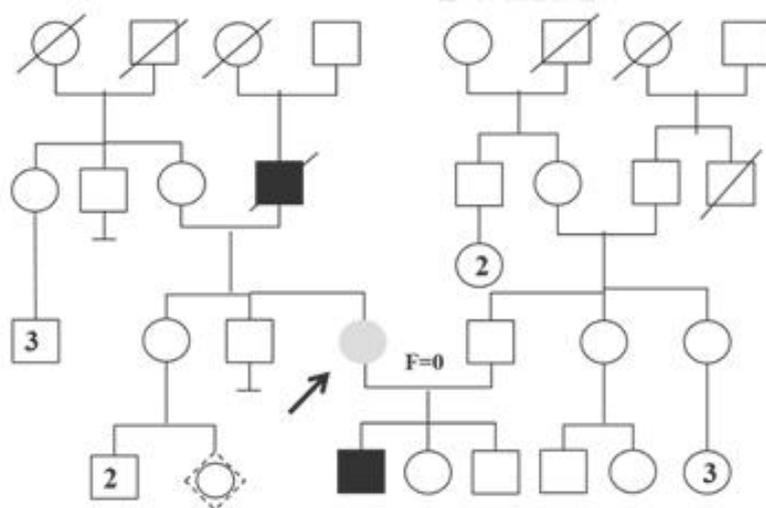


Fig. 4.29. Exercice: Reconnaissez le model de transmission de la maladie

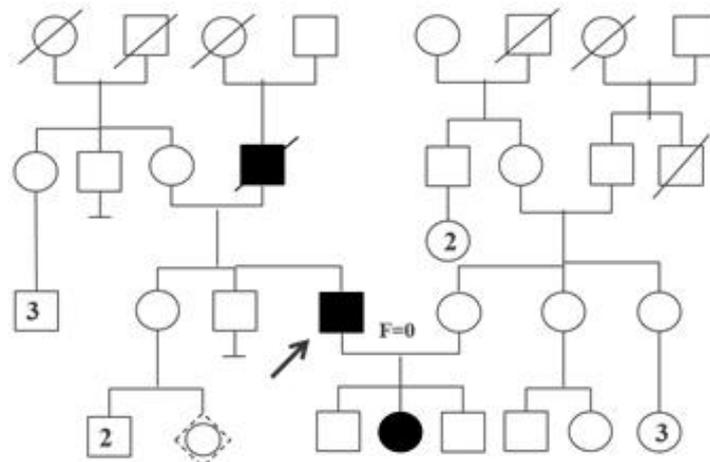


Fig. 4.30. Exercice: Reconnaissez le model de transmission de la maladie

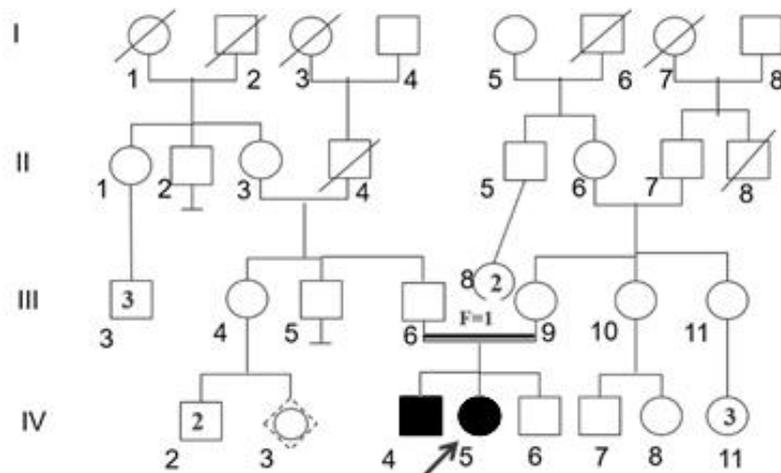


Fig. 4.31. Exercice: Reconnaissez le model de transmission de la maladie

L'histoire des groupes sanguins et de la transfusion sanguine

La transfusion sanguine est l'administration de sang ou de l'un de ses composants à un ou plusieurs sujets appelés «donneurs» à un ou plusieurs sujets malades appelés «receveurs».

De multiples essais de transfusions ont été tentés depuis déjà plusieurs siècles :

- avec du sang d'animaux, amenant les catastrophes.
- et avec du sang humain, avec des succès inégaux.

Ce n'est qu'en 1901, quand l'autrichien Karl Landsteiner a découvert les groupes sanguins, que la transfusion sanguine est devenue plus sûre.

Karl Landsteiner a découvert que l'agglutination des globules rouges est une réaction immunologique qui survient quand le sang d'un receveur contient des anticorps dirigés contre les antigènes à la surface des globules rouges du donneur.

Il en déduisit l'existence des groupes A, B, et O.

Un an plus tard, De Castillo décrit un quatrième groupe: AB.

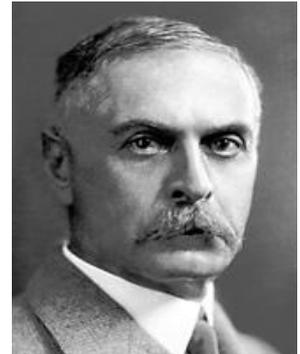


Fig. 5.3. Karl Landsteiner

1. Le système ABO

Le premier, ABO, car il entraîne un accident transfusionnel immédiat en cas de transfusion incompatible, et de ce fait a été le premier découvert.

La détermination du groupe dans ces systèmes en ABO (A, B, AB ou O), en Rhésus (+ ou -), se base, comme pour tous les systèmes, sur les caractéristiques des antigènes présents à la surface des érythrocytes.

Le système ABO permet de classer les différents groupes sanguins selon la présence ou non d'antigènes A ou B à la surface des globules rouges.

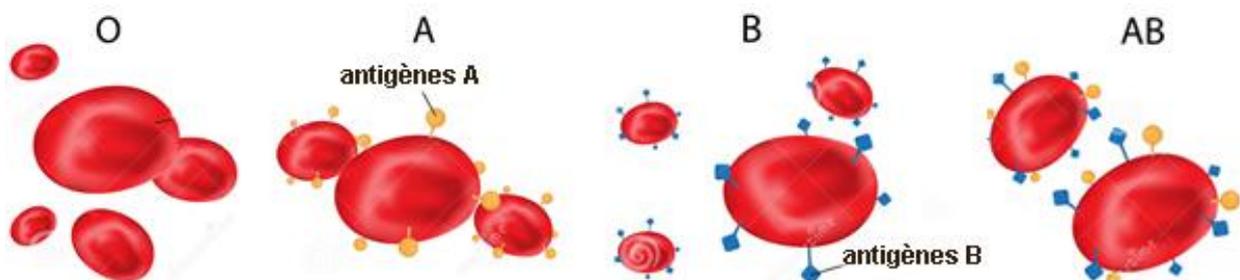


Fig. 5.4. Classification des groupes sanguins: O, A, B, AB

La compatibilité du système ABO

Pour le système ABO,

- les sujets AB + sont considérés comme receveurs universels,
- les O - comme donneurs universels de globules rouges.

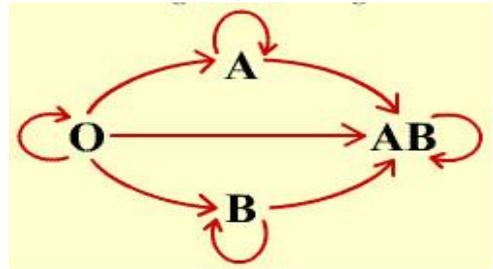


Fig. 5.5. Compatibilité transfusionnelle

La Fréquence des groupes sanguins ABO

Gr. O	45%-50%
Gr. A	41%-25%
Gr. B	10%-20%
Gr. AB	5%

Génétique des systèmes ABO

Le système ABO est caractérisé par un gène *ABO* situé sur le chromosome 9 (9q34.2) dont il existe trois allèles (variantes du gène) A, B, et O.

Tout individu possède donc deux allèles du gène, l'un venant de son père et l'autre de sa mère, à un même locus, c'est-à-dire à un emplacement défini sur le chromosome.

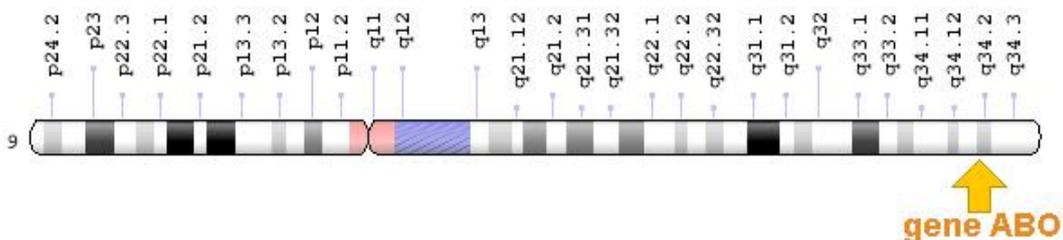


Fig. 5.6. Gène *ABO* est situé chromosome 9 (9q34.2)
(<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABO#location>)

L'allèle codant pour:

- L'antigène A est dominant sur le groupe O
- L'antigène B est dominant sur le groupe O
- Les 2 antigènes A et B présentent simultanément sont co-dominants

Table nr. 5.1. Génotype et Phénotype pour les groupes sanguins ABO

Génotype	Phénotype
AA, AO	A
BB, BO	B
OO	O
AB	AB

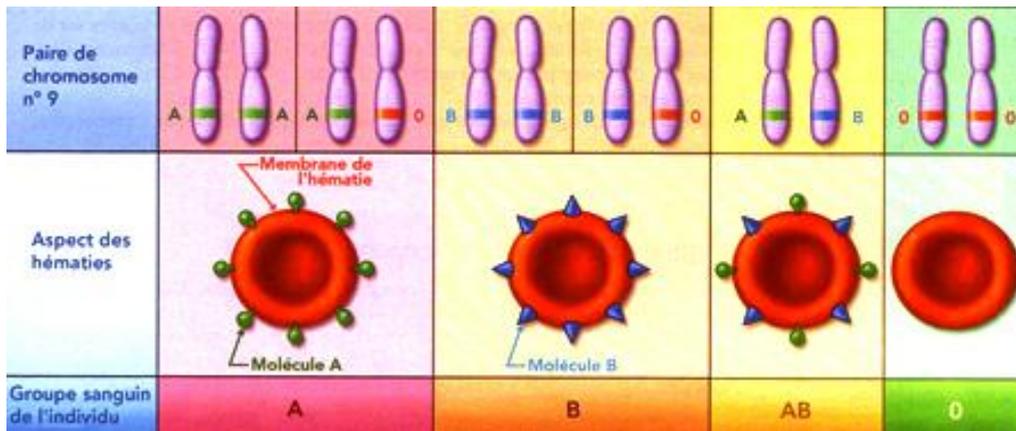


Figure. 5.7. Groupes sanguins selon la combinaison d'allèles portés par l'individu.

Lorsque le sujet possède à la fois l'allèle **A** et le **B**, les deux Ag se trouvent alors sur l'érythrocyte et le sujet est de **groupe AB**. Lorsqu'il possède 2 allèles **O**, il sera de **groupe O**; s'il possède un ou deux **A** et pas l'allèle **B**, il sera **A**; s'il possède un ou deux allèles **B** et pas le **A**, il sera **B**.

Chromosomes						
Allèles	(A,A)	(B,B)	(O,O)	(A,O)	(B,O)	(A,B)
Molécules portées	Molécules A	Molécules B	Pas de Molécules	Molécules A A domine O	Molécules B B domine O	Molécules A et B A et B codominants
Groupe sanguin	[A]	[B]	[O]	[A]	[B]	[AB]

Fig. 5.8. Présentation parallèle des génotypes, allèles et groupes sanguins ABO

Ainsi, un couple de parents, dont la mère est génétiquement **A/O**, donc de **groupe A**, et le père **B/O**, donc de **groupe B** pourra avoir des enfants de quatre groupes différents.

Si chacun des parents transmet son allèle **O**, l'enfant sera génétiquement **O/O**, donc de **groupe O**.

Si le père transmet l'allèle **O** et la mère le **A**, l'enfant sera **A/O**, donc de **groupe A**.

Si le père transmet l'allèle **B** et la mère le **O**, l'enfant sera **B/O**, donc de **groupe B**.

Si le père transmet l'allèle **A** et la mère celui **B**, l'enfant sera alors **A/B**, donc de **groupe AB**. Finalement, cela signifie qu'il y a 3 allèles, 6 génotypes et 4 phénotypes.

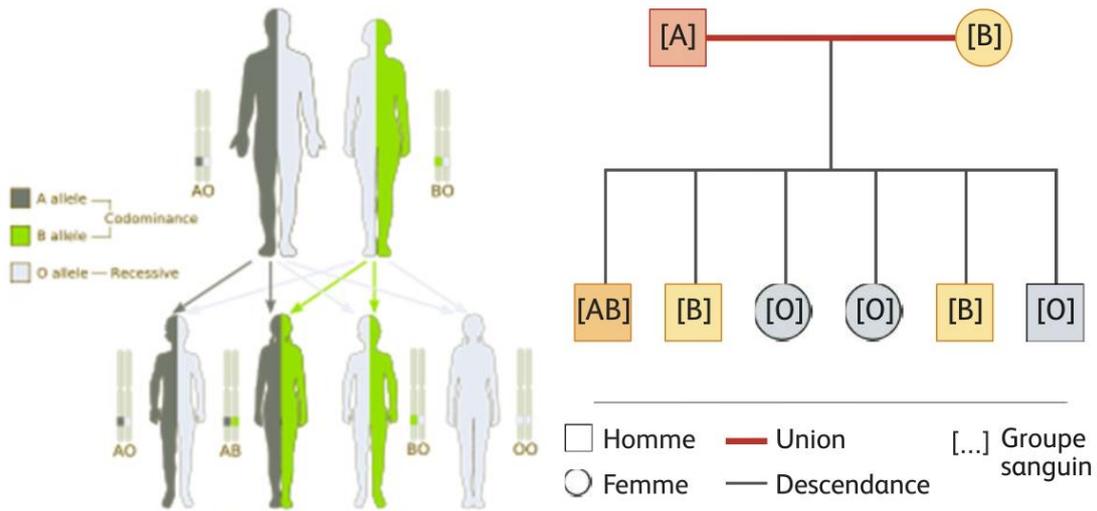
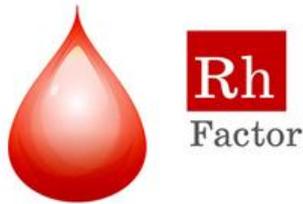


Fig. 5.9. Si le père a group A et le mère group B aura des enfants des groupes AB, B, O et A



Le système Rhésus

Ce système, explique certains problèmes indépendants du système ABO, accidents transfusionnels et la maladie hémolytique du nouveau-né.

La physiopathologie a été suspectée par Levine et Stetson en 1939, fut découvert et nommé en 1940 par Landsteiner et Wiener.

Le Rhésus est important car l'immunogénicité d'antigènes (D - RH) entraîne très fréquemment des immunisations sources d'accidents ultérieurs et d'incompatibilités fœto-maternelles.

Type du receveur	Type de Rhésus recevable	
	Rh+	Rh-
Rh+	oui	-
Rh-	oui	oui

Fig. 5.10. Compatibilité du système Rh

Génétique des systèmes Rhésus

Deux gènes sont situés à des locus très proches l'un de l'autre sur le chromosome no 1 (1p36.11), et sont donc transmis ensemble d'une génération à la suivante.

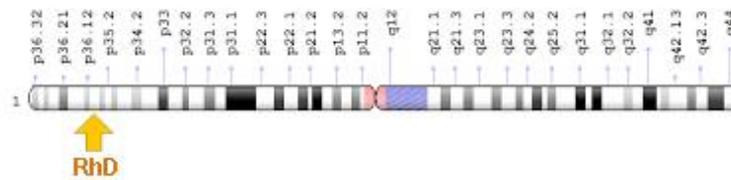


Fig. 5.11. Les gène pour Group Rh sont situé sur chromosome 1 (1p36.11).

Le locus D, se trouve soit l'allèle D, qui synthétise la protéine Rhésus D définie par la présence de l'antigène D ou RH1, soit un emplacement vide dénommé d, qui ne synthétise rien.

Le plus connu est l'antigène D. Lorsqu'il est présent, on dit que l'individu est de rhésus positif (D+).

Table nr 5.2. Génotype et Phénotype pour les groupes sanguins Rh

Génotype	Phénotype
DD, Dd	Rh+
dd	Rh-

Nous sommes 85% dans ce cas. En revanche, être rhésus négatif signifie l'absence de ce même antigène D (D-). 15 % de la population est concernée.

Ainsi deux parents Rhésus positif de génotype **D/d**, donc hétérozygotes au locus D, pourront avoir un enfant rhésus négatif de génotype **d/d**.

Dd + Dd = DD, Dd, dd
DD + dd = Dd
DD + Dd = DD, Dd
Dd + dd = Dd, dd

Femme Rhesus négatif – Fœtus Rhesus positif: Quand maman est négative (Rh-) et bébé positif (Rh+), il faudra prendre des précautions car il est dans ce cas impératif que jamais le sang de la mère ne se mêle au sang foetal.

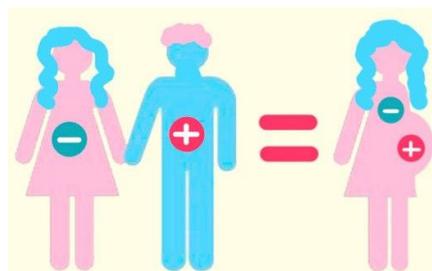


Fig. 5.12. Parents de rhesus opposés: incompatibilité de rhesus entre maman et bébé

L'immunisation deviendra redoutable si la maman de rhésus négatif porte, lors de futures grossesses, des enfants à nouveau de rhésus positifs qui risquent de voir leurs globules rouges détruits par ces anticorps, avec des conséquences parfois lourdes :

- des ictères (jaunisses),
- des anémies
- des lésions cérébrales.

Deux circonstances conduisent à l'allo-immunisation maternelle:

1. *la sensibilisation par grossesse antérieure:*

Lors de la grossesse précédente, il y a sensibilisation de l'organisme maternel contre un antigène fœtal du fait d'un passage même minime de sang fœtal lors:

- de la grossesse normale
- de l'accouchement
- d'une IVG
- d'une intervention en cours de grossesse (manœuvres externes, amniocentèse...)
- d'une grossesse extra-utérine
- de l'occurrence d'un hématome retro placentaire
- d'un placenta prævia.

2. *la transfusion sanguine antérieure:* Le risque d'apparition des anticorps anti-D est d'environ 50 % s'il s'agit de l'antigène Rhésus D.

Traitement prophylactique

Fort heureusement, il existe aujourd'hui des moyens efficaces, notamment préventifs, pour contrer ces liens du sang quand ils sont nuisibles.

Prévenir plutôt que guérir: dans les 3 jours qui suivent l'accouchement d'une maman de Rhésus négatif, si l'on s'aperçoit que son bébé est de Rhésus positif, elle reçoit un vaccin anti-Rhésus. Toute femme Rh négatif non immunisée ayant connu une situation de possible immunisation fœto-maternelle doit subir une injection de gammaglobulines anti-D dans les 72 heures suivant ces situations (ex: accouchement d'un enfant Rh D+).



Fig. 5.13. Gammaglobulines anti-D

Ce qui est disponible est l'anti-gamma globuline administré dans les situations suivantes:

- ponction des villosités choriales,
- amniocentèse,
- cordocentèse,
- placenta praevia,
- métrorragie,
- Avortement,
- mort foétale intra-utérine,
- après la première grossesse de femmes Rh- avec un foetus Rh +.

Un contrôle biologique peut être réalisé: la recherche positive des anticorps passifs anti-D circulants quelques heures après l'injection atteste de la protection prophylactique.

Depuis peu, il existe un nouveau moyen de déterminer le facteur Rhésus du foetus : le génotypage. Par simple prise de sang de la maman, on analyse l'ADN foetal présent dans la circulation maternelle. On peut alors mettre en évidence le gène caractéristique du groupe Rh+ et, dès la dixième semaine de grossesse, rassurer toutes les femmes qui attendent un enfant Rh-. Elles ne risquent rien et on leur évite ainsi une injection d'immunoglobulines inutile!

• Rhésus	Groupe sanguin				Total
	O	A	B	AB	
• Rh+	37 %	39 %	7 %	2 %	85 %
• Rh-	6 %	6 %	2 %	1 %	15 %
• Total :	43 %	45 %	9 %	3 %	100 %

Fig. 5.14. Répartition des groupes sanguins ABO et Rh dans la population française

Groupe sanguin des parents	A+	A-	B+	B-	AB+	AB-	O+	O-
A+	A+, A-, O+, O-	A+, A-, O+, O-	Tous	Tous	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A+, A-, O+, O-	A+, A-, O+, O-
A-		A-, O-	Tous	A-, B-, AB-, O-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A-, B-, AB-	A+, A-, O+, O-	A-, O-
B+			B+, B-, O+, O-	B+, B-, O+, O-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	B+, B-, O+, O-	B+, B-, O+, O-
B-				B-, O-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A-, B-, AB-	B+, B-, O+, O-	B-, O-
AB+					A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A+, A-, B+, B-	A+, A-, B+, B-
AB-						A-, B-, AB-	A+, A-, B+, B-	A-, B-
O+							O+, O-	O+, O-
O-								O-

Fig. 5.15. Possibilité de groupe sanguin des enfants selon celui des parents.

Groupe sanguin des parents	A+	A-	B+	B-	AB+	AB-	O+	O-
A+	B+, B-, AB+, AB-	B+, B-, AB+, AB-	Aucun	Aucun	O+, O-	O+, O-	B+, B-, AB+, AB-	B+, B-, AB+, AB-
A-		A+, B+, B-, AB+, AB-, O+	Aucun	A+, B+, AB+, O+	O+, O-	A+, B+, AB+, O+, O-	B+, B-, AB+, AB-	A+, B+, B-, AB+, AB-, O+
B+			A+, A-, AB+, AB-	A+, A-, AB+, AB-	O+, O-	O+, O-	A+, A-, AB+, AB-	A+, A-, AB+, AB-
B-				A+, A-, B+, AB+, AB-, O+	O+, O-	A+, B+, AB+, O+, O-	A+, A-, AB+, AB-	A+, A-, B+, AB+, AB-, O+
AB+					O+, O-	O+, O-	AB+, AB-, O+, O-	AB+, AB-, O+, O-
AB-						A+, B+, AB+, O+, O-	AB+, AB-, O+, O-	A+, B+, AB+, AB-, O+, O-
O+							A+, A-, B+, B-, AB+, AB-	A+, A-, B+, B-, AB+, AB-
O-								A+, A-, B+, B-, AB+, AB-, O+

Fig. 5.16. Impossibilité de groupe sanguin des enfants selon celui des parents.

EXERCICES

1. Un homme de groupe sanguin A+ épouse une femme de groupe sanguin O+. Ils ont deux enfants: Jao et Pela, de groupes sanguins respectifs A+ et O-.
 - a. Ecrire les génotypes possibles ou probables des parents et des enfants.
 - b. Est-il possible que ce couple peut avoir un enfant de groupe AB-? Justifier votre réponse.
2. Observez cet arbre généalogique. On y a représenté le groupe sanguin de tous les individus d'une famille.
- 3.

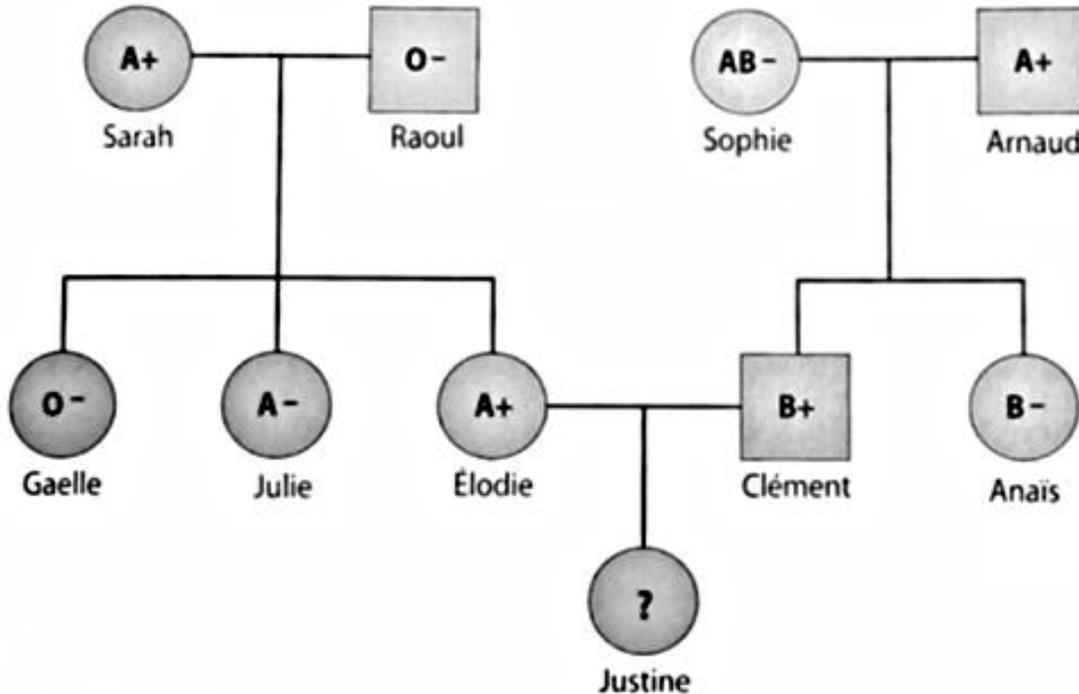


Fig. 5.17. La transmission des groupes sanguins au fil des générations.

- a. Quels sont les allèles d'Élodie pour les deux systèmes de groupes sanguins ? (Pour répondre regardez le groupe sanguin de ses parents et déterminez les allèles qu'ils ont pu lui transmettre).
- b. Même question pour Clément.
- c. Justine vient de naître. Quel pourrait être son groupe sanguin ? Donnez toutes les possibilités.
- d. Quelle est la probabilité que Justine soit de groupe O ?

Travaux pratiques nr. 6

LE NIVEAU CYTOGENETIQUE D'ETUDE DU MATERIEL HEREDITAIRE

La structure et la morphologie des chromosomes humains

La notion de chromosome a été introduite par Waldeyer en 1888 pour définir les corpuscules avec une affinité pour les *colorants basiques*, observés au microscope pendant la division cellulaire.



Fig. 6.1. Waldeyer

Les chromosomes sont des formations microscopiques d'une morphologie caractéristique qui est décrite dans la *métaphase mitotique* en bloquant la division des cellules avec une substance antimitotique (colchicine).

Les chromosomes sont des gardiens de l'information héréditaire, composés d'ADN et de protéines. Ils contiennent des gènes disposés de façon linéaire.

La métaphase est le meilleur moment pour étudier les chromosomes en termes *cytogénétiques*, parce qu'ils sont condensés et en spirale, ou sont bi-chromatidiques, à cause de la réplication semi-conservative de l'ADN en phase S de l'interphase.

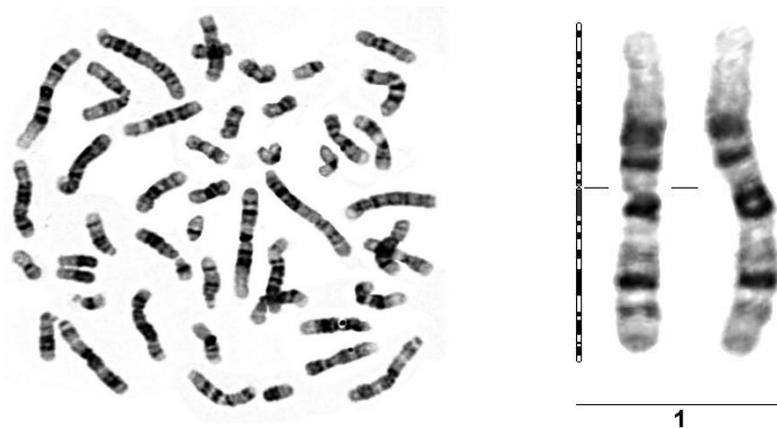


Fig. 6.2. Métaphase (bandes G) et la paire 1 de chromosomes
(Collection du Dr Cristina Gug)

Comme nombre, structure et morphologie, les chromosomes sont caractéristiques de chaque espèce. Chez les humains, les cellules somatiques (diploïdes), les 46 chromosomes sont disposés en 23 paires ($2n = 46$).

Les chromosomes d'une paire sont appelés homologues, ayant la même

- taille,
- structure,
- morphologie,
- position du centromère,
- contenu dans les gènes allèles,
- mais origines différentes: l'un est d'origine maternelle (dérivé par l'ovule) et l'autre est paternel (créée par le sperme).

Dans les cellules somatiques chez les humains, il y a 22 paires de chromosomes autosomes et une paire de chromosomes sexuels (hétérosomes ou gonosomes): la paire XX chez la femme et XY chez les mâles.

Dans les cellules somatiques chez les humains, il y a

- 22 paires de chromosomes autosomes et
- une paire de chromosomes sexuels (hétérosomes ou gonosomes): la paire XX chez la femme et XY chez les mâles.

Caryotype masculin normal: 46,XY (46 chromosomes par cellule, un chromosome X et un chromosome Y, sans anomalies numériques ou structurelles identifiées).

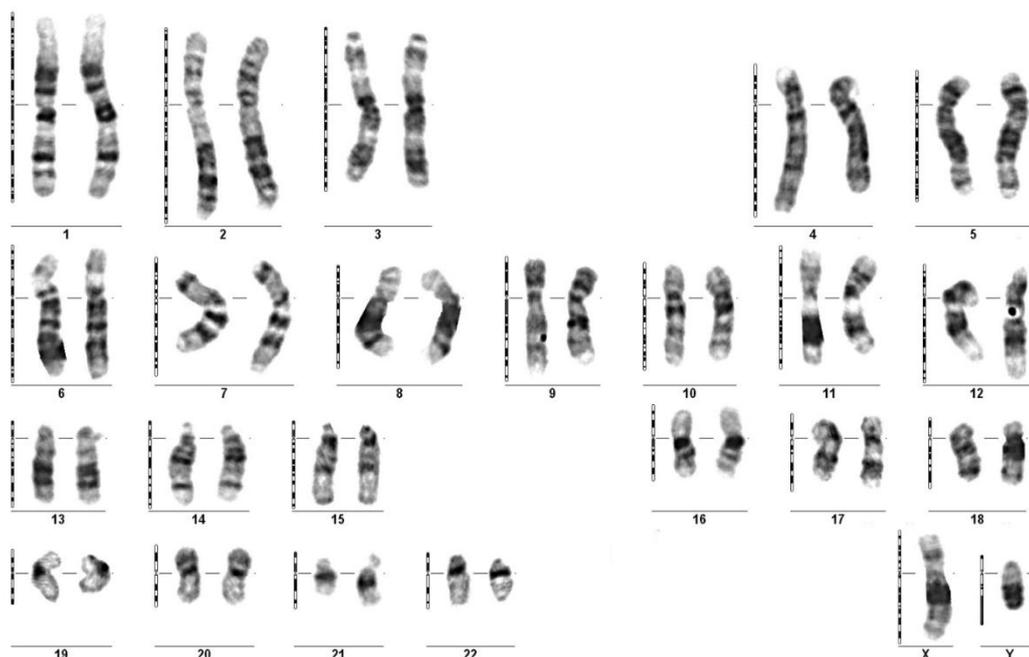


Fig. 6.3. Caryotype avec formule cytogénétique normale pour le homme: 46,XY.
(Collection du Dr. Cristina Gug)

Les chromosomes d'une paire de gonosomes XY ne sont pas de chromosomes homologues, parce que le chromosome Y est beaucoup plus petit et a perdu la majeure partie du matériel génétique dans l'évolution phylogénétique, en gardant les gènes impliqués dans la sexualisation masculine et dans certains gènes somatiques.

Éléments structurels obligatoires

1. **Les chromatides sœurs** : sont deux sous-unités longitudinales génétiquement identiques, chacune représentant une chromatide et contenant une molécule d'ADN résultant de la réplication semi-conservative.

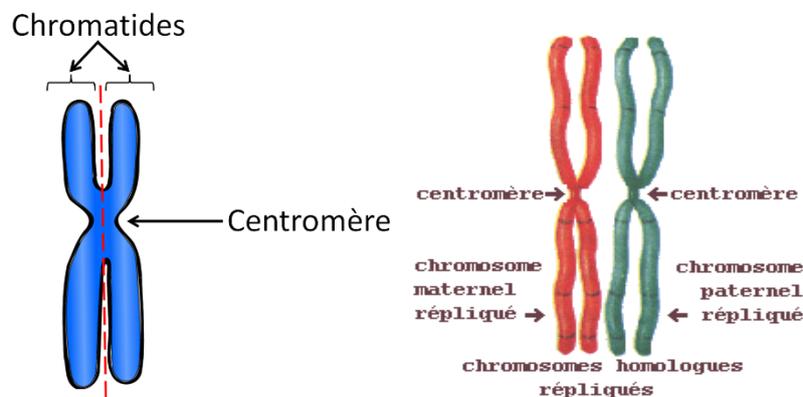


Fig. 6.4. Éléments structurels obligatoires

2. Les télomères

- Les télomères: extrémités arrondies des chromatides contenant de l'ADN hautement répétitif avec un rôle dans le maintien de la structure des chromosomes et de leur individualité.
 - Les télomères préviennent la fusion des extrémités des chromosomes pendant la délétion terminale et l'émergence des chromosomes dicentriques ou polycentriques.
 - La structure de télomères d'un chromosome n'est pas restaurée, les extrémités des chromatides peuvent être fusionnées, résultant en une structure anormale (chromosome en anneau).
 - Les télomères: extrémités arrondies des chromatides contenant de l'ADN hautement répétitif avec un rôle dans le maintien de la structure des chromosomes et de leur individualité.
 - Les télomères préviennent la fusion des extrémités des chromosomes pendant la délétion terminale et l'émergence des chromosomes dicentriques ou polycentriques.
 - La structure de télomères d'un chromosome n'est pas restaurée, les extrémités des chromatides peuvent être fusionnées, résultant en une structure anormale (chromosome en anneau).
3. **Le centromère**: la place de l'union des deux chromatides-sœurs à la constriction primaire (les chromatides sont plus étroites). Aux chromosomes colorés par des techniques conventionnelles, les constriction primaires sont peu colorés ou sans couleur.

En fonction de la position du centromère on a décrit 3 types morphologiques des chromosomes

- **métacentriques**, avec le centromère situé dans la région médiane du chromosome et avec des bras égaux;
- **sous-métacentriques**, avec le centromère situé dans la région sous médiane et les bras inégaux ($p < q$);
- **acrocentriques**, avec le centromère situé dans la région terminale du chromosome et des bras inégaux ($p \ll q$).

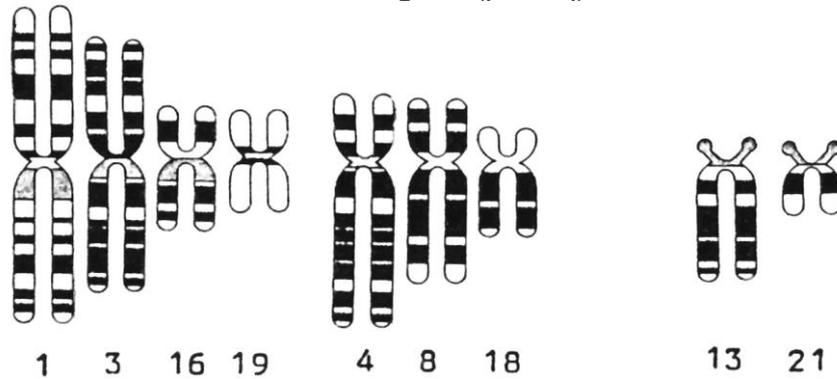


Fig. 6.5. Les trois types morphologiques des chromosomes: métacentriques (la gauche), sous-métacentriques (centre), acrocentriques (droite).

4. **Les kinétochores**: petites structures rondes, ovales, situés dans le centromère (un pour chaque chromatide),
- qui se lient aux fibres du fuseau mitotique et
 - qui est mis en évidence que par l'utilisation des techniques spéciales de fixation et coloration.

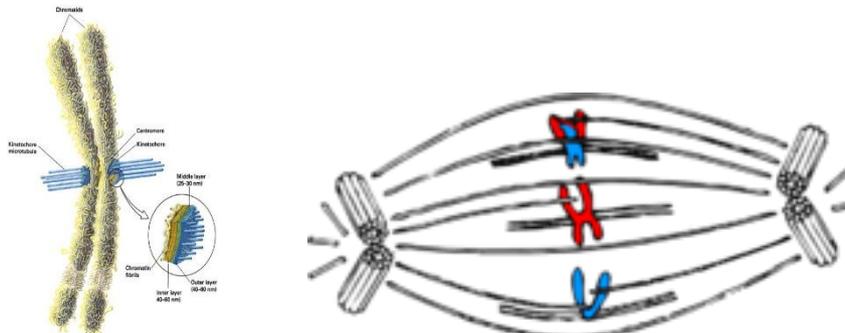


Fig. 6.6. Kinétochores (à gauche) et broche de division (à droite).

Les constriction secondaires

- Les constriction secondaires (rétrécissements secondaires des chromatides) ne sont présentes que dans certains chromosomes humains.
- Pour les chromosomes acrocentriques, les constriction secondaires sont situées à l'extrémité des bras courts, au niveau de la tige porteuse de satellites, un filament de chromatine qui relie le satellite avec le bras court proximale (p).
- Les constriction secondaires proximales se trouvent dans la partie proximale des bras long chromosomiques (le bras «q», plus près du centromère) sur les chromosomes 1, 9, 16.

Les satellites sont situés dans la partie distale du bras court des chromosomes acrocentriques, avec une forme ronde ou ovale et contiennent de l'ADN hautement répétitif.

- Les chromosomes acrocentriques peuvent s'attacher par satellite, ce qui rend une association satellite.
- Cette association est un facteur prédisposant à la non-disjonction des chromosomes dans la gamétogenèse, avec l'avènement de gamètes aneuploïdes, mécanisme impliqué dans les échecs de reproduction.



Fig. 6.7. Association satellite entre les 2 chromosomes de la paire 15.
(Collection du Dr. Cristina Gug)

Méthodes de reconnaissance des chromosomes humains

Le caryotype est un model **standard de chromosomes** d'une cellule et est réalisé de manière à détecter des aberrations chromosomiques numériques ou structurales homogènes ou en mosaïque, de transmission autosomique ou gonosomique.

Les chromosomes sont photographiés et préparés par les critères standards. Cet examen peut être fait en utilisant différents types de cellules:

- les lymphocytes sanguins,
- des cellules tumorales
- cellules de la moelle osseuse),
- les fibroblastes,
- les cellules germinales,
- les cellules amniotiques ou
- le trophoblaste, selon l'indication.

L'établissement de l'indication du caryotype

Cela requiert un examen clinique précis, qui permet souvent de soupçonner une anomalie chromosomique, car la perte ou le gain d'un segment chromosomique se traduit par un tableau clinique souvent stéréotypé avec des caractéristiques dysmorphiques.

Généralement, les anomalies autosomiques ont de graves conséquences, en associant:

- une dysmorphie cranio-faciale,
- le ton anormal,
- un retard mental,
- dermatoglyphes anormales et des malformations viscérales, fréquents mais non spécifiques.

Dans la pratique actuelle, les indications du caryotype sont relativement faibles:

- la plupart des maladies génétiques ne sont généralement pas exploré par le caryotype, et
- une malformation viscérale isolée accompagne rarement une anomalie chromosomique.

Les indications principales du caryotype sont les suivantes

Chez les enfants:

- Phénotype évocateur d'un syndrome chromosomique
- Association: hypotonie néonatale + dysmorphie + malformations
- Ambiguïté sexuelle
- Retard mental / troubles du comportement / dysphorique / malformations
- Troubles du développement sexuel et de la croissance
- Phénotype évocateur d'un syndrome de microdélétion / duplication.

Chez les adultes:

- Parents / famille de l'enfant portant une anomalie chromosomique
- Couples avec de fausses couches répétées
- Antécédents personnels ou familiaux de mort foétale ou malformations récurrentes
- Investigation avant de recourir à la procréation médicalement assistée
- Aménorrhée / ménopause précoce
- Azoospermie ou oligospermie sévère.



Fig. 6.8. Le sang périphérique est prélevé à l'aide de vacutainers à héparine sodique pour réaliser un caryotype

Les principes de la méthode

Les chromosomes humains ne sont visibles que pendant une courte période du cycle cellulaire lors de la division cellulaire (métaphase ou prométaphase).

Les techniques conventionnelles de caryotype visent à obtenir un maximum de cellules bloquées à ce stade.

La résolution de la cytogénétique classique est la microscopie photonique et ne peut excéder 5100 pb.

La technique pour l'étude du caryotype comprend plusieurs phases:

1. Prélèvement de cellules d'un sujet (souvent des **lymphocytes** obtenus par le sang) se fait avec des vacutainers à l'héparine.
2. Cultiver des cellules de culture in vitro avec stimulation de la division (phytohémagglutinine), 24-48 heures à 37°C.
3. La culture est mise en présence de colchicine, ce qui perturbe le fuseau mitotique et bloque les cellules en métaphase de mitose
4. Récolter les cellules et leur incubation dans un milieu hypotonique qui mène à la suspension cellulaire et la dispersion des chromosomes dans le cytoplasme.
5. Fixation des chromosomes.
6. Etalage de la suspension cellulaire fixée sur une lame de verre, en vue de l'observation en microscope.
7. Banding: Cette préparation est ensuite colorée. La coloration la plus classique est la coloration au Giemsa, ce qui entraîne, après l'application d'un traitement approprié, l'apparition de bandes sombres et claires alternées sur les chromosomes: le «bandes G».

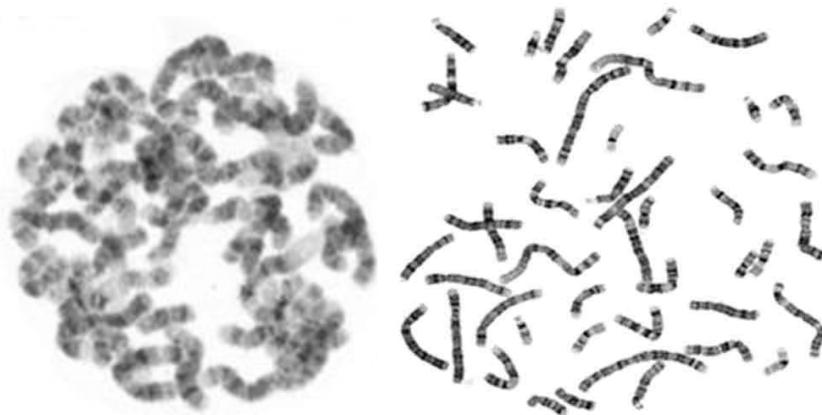


Fig. 6.9. Chromosomes (bandes G) en prométaphase (gauche) et en métaphase (droite) (Collection du Dr Cristina Gug)

Techniques de baguage chromosomique

Par certains procédés techniques (dénaturation thermique et enzymatique) suivis coloration, les chromosomes dans les préparations microscopiques obtenus après fixation peuvent être de couleur inhomogène, avec des rayures alternées, plus intensément colorées et moins coloré, selon un motif caractéristique et constant pour chaque paire.

Le bandage chromosomique permet ainsi

- une reconnaissance précise de paires d'homologues,
- identification des aneuploïdies, mais surtout
- identification changements structuraux chromosomiques.

La première technique de baguage a été introduite en 1958 par Caspersson, qui décrit l'utilisation de la quinacrine pour panser les préparations chromosomique et a inauguré une nouvelle ère de bandes chromosomiques. En 1971, le baguage a été défini comme la méthode par laquelle au niveau d'un chromosome peut distinguer clairement les segments adjacents en raison de leur coloration différente.

Il existe plusieurs techniques qui utilisent différents produits chimiques pour identifier certaines régions chromosomiques en effectuant un modèle typique de bandes chromosomiques. Par exemple des bandes intensément colorées ils sont généralement péricentromères ou télomères.

Les bandes intensément colorées correspondent généralement à l'hétérochromatine dans tandis que les bandes décolorées ou légèrement colorées représentent l'euchromatine.

En fonction du degré de condensation chromosomique (en métaphase ou prométaphase), le nombre de bandes varie et définit la résolution de l'analyse cytogénétique. Un caryotype standard a une résolution d'environ 350-550 bandes haploïdes / ensemble, et un caryotype haute résolution une résolution de 800 ou 1000 bandes par ensemble haploïde (Fig.6.10.).

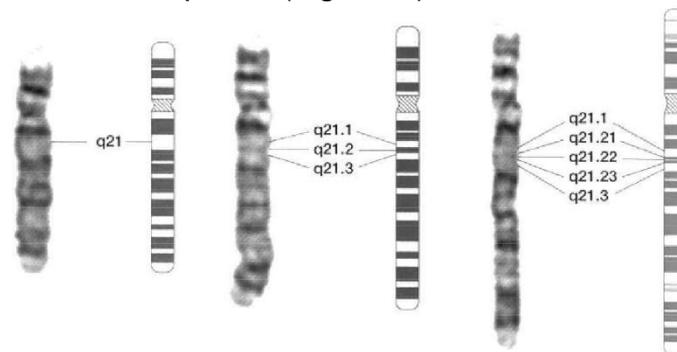


Fig.6.10. Différents niveaux de résolution dans la bande chromosomique

ISCN représente le Système de Nomenclature Internationale Cytogénétique humaine. Selon les normes ISCN, la numérotation des bandes chromosomique commence du centromère aux télomères. Bras p représente le bras supérieur, et le bras q représente le bras sous le centromère.

Spécification de parties de chromosomes, de bandes ou de subdivisions de bandes (pour les chromosomes de prophase haute résolution) est effectuée en utilisant points de repère qui divisent chaque bras en régions. Les régions comprennent plusieurs bandes, numérotées du centromère au télomère, séparées le long de chaque chromatides, en commençant par le chiffre 1.

La numérotation des bandes se fait après noté le numéro de chromosome, le bras du chromosome, le numéro de région et bande et / ou sous-bande. Par exemple, 18q12.3 signifie chromosome 18, bras long, région 1, bande 2, sous-bande 3 (fig. 9).

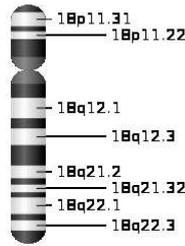


Fig. 6.11. Chromosome 18: régions et bandes sur les deux bras

Il existe quatre méthodes principales de bandes pour identifier les chromosomes:

- Bandes G,
- Bandes Q,
- bandes R,
- bandes C.

Après le *banding*, les métaphases sont ensuite analysées au microscope, suivant des critères standards, disposés en paires homologues afin d'identifier les anomalies numériques ou structurales.

La topographie des bandes est caractéristique d'un chromosome et permet de l'identifier. Les deux chromosomes d'une même paire ont la même topographie de bandes. Il existe également d'autres méthodes de coloration qui font apparaître d'autres types de bandes (Q-Banding, R-Banding etc.).

Bandarea G (G = Giemsa)

Dans cette technique de baguage, les chromosomes sont traités avec trypsine, puis colorée avec une solution de Giemsa, formant un système de bande coloré (foncé) et décoloré (clair). Bandes décolorées correspondent aux régions euchromatiques des chromosomes et aux régions colorées correspondent à des régions hétérochromatiques (Fig. 6.12).

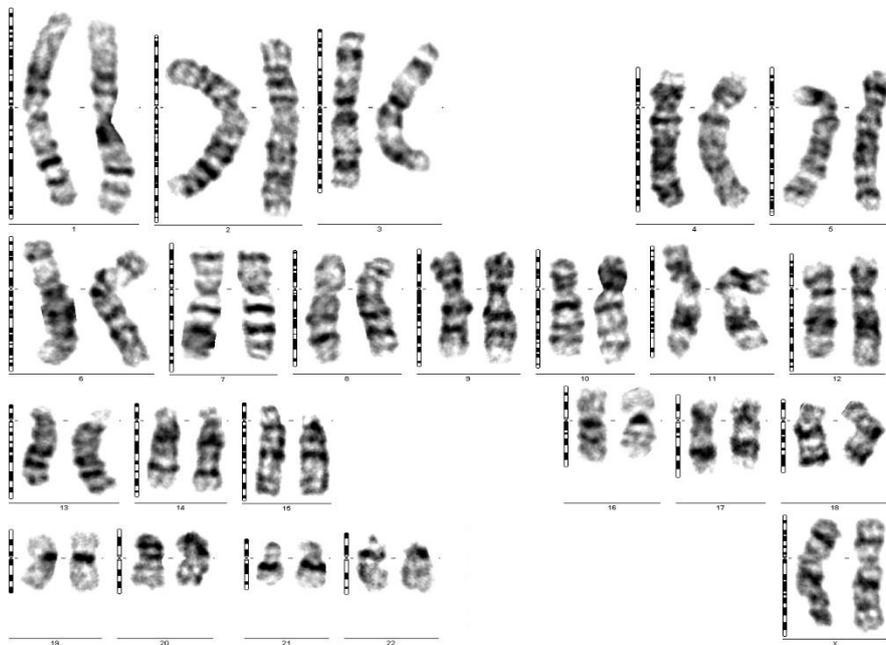


Fig. 6.12. Caryotype dans lequel les chromosomes sont en bande G: 46,XX.
(Collection du Dr. Cristina Gug)

Les bandes G intensément colorées sont équivalentes aux bandes Q fluorescentes.

Technique de baguage

Les préparations microscopiques sont introduites dans une solution de trypsine EDTA- tampon *buffer* 1: 250 pendant 25-30 secondes. Les lames sont alors passés à travers un bain tampon tampon puis coloré avec une solution de Giemsa à 5% pendant environ 5 minutes.

Applications en bande G:

- identification des bandes euchromatiques;
- identification des chromosomes, anomalies chromosomiques, aneuploïdies, réarrangements structuraux;
- visualisation des régions de couleur homogène des cancers.

Désavantages:

- impossibilité de détecter de petites translocations, détection microdélétions;
- inefficace pour caractériser les chromosomes chez certains réarrangements complexes.

Bande C (C = centromère)

Ce type de bandes permet la mise en évidence de l'hétérochromatine constitutive, utilisé pour identifier les centromères et les régions hétérochromatique (Fig. 6.13). La méthode implique des traitements dénaturant et dénaturant des chromosomes et coloration au Giemsa, obtention d'une coloration des régions centromériques.



Fig. 6.13. Métaphase dans laquelle les chromosomes sont bandés C.

Applications de bandes C

- identification des chromosomes;
- identification des bivalents dans la diakinèse;
- tests de paternité et cartographie génétique.

Le bandage Q (Q = quinacrine) a été la première technique utilisée pour bandes chromosomiques. Caspersson et ses collègues, qui ont développé la technique, remarqué que des bandes fluorescentes claires et pâles sont apparues après les chromosomes ont été traités avec des agents fluorescents (quinacrine) et ont pu observé au microscope à fluorescence. Alternance de bandes lumineuses et pâles étaient appelées bandes Q (Fig. 6.14.).

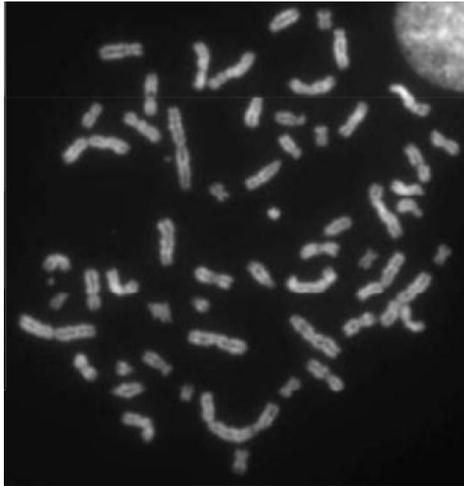


Fig. 6.14. Métaphase dans laquelle les chromosomes sont en bande Q

Avantages de la bande Q:

- utilisé si la bande G n'est pas acceptable;
- identification des chromosomes;
- étude de l'hétéromorphisme du chromosome Y humain.

Désavantages:

- perte de signal fluorescent au fil du temps.

Bande R (R = inversion)

Les bandes R ont été initialement obtenues par dénaturation thermique minutieuse de chromosomes et coloration à l'acridine orange. Par la suite, le marquage a été obtenu en ajoutant des produits chimiques à la culture pendant quelques heures avant d'effectuer des préparations chromosomiques.

En examinant les chromosomes, on observe des bandes qui ont une distribution inverse de Q et G (fig.6.15).

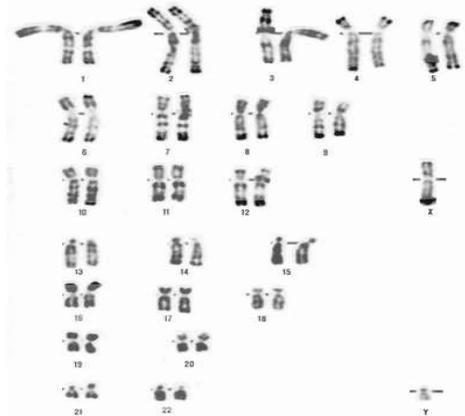


Fig. 6.15. Caryotype dans lequel les chromosomes sont bandés R

Avantages:

- est utile pour analyser la structure des télomères chromosomiques.

Techniques de mise en évidence des sites fragiles

Des conditions de croissance spéciales sont requises. Par exemple, pour détecter le site fragile du chromosome X (Fig. 14), les cellules nécessitent un milieu de culture sans acide folique ou l'ajout de méthotrexate quelques heures avant la recoloration chromosomique.



Fig. 6.16. La flèche indique le site fragile du chromosome X

Travaux pratiques nr. 7

CARYOTYPAGE

Tous les anomalies chromosomiques sont identifiées et incluses dans la formule chromosomique, en utilisant des symboles et des abréviations établies par consensus international (ISCN: *International System for human Cytogenetic Nomenclature*), permettant une définition précise de la constitution chromosomique d'un individu.

La formule chromosomique est une façon d'exprimer le résultat d'un caryotype et comprendra:

- le nombre de chromosomes dans la cellule,
- le nombre et le type de chromosomes sexuels,
- la liste des anomalies identifiées.

Conférences internationales sur standardisation de nomenclature du chromosome humain

1. Conférence de Denver (1960)
2. Conférence de Londres (1963)
3. Conférence de Chicago (1966)
4. Conférence de Paris (1971)
5. Conférence de Stockholm (1978)
6. Conférence de Paris (1980)

Idiogram: Une représentation diagrammatique du caryotype humain en fonction des figures morphologiques des chromosomes

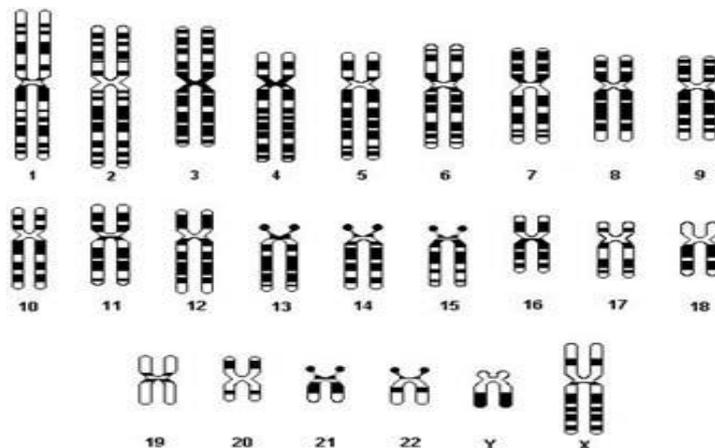


Fig. 7.1. Le model des bandes chromosomiques

Chromosomes bandés de métaphase identifiés par la nomenclature établie par la Conférence de Paris en 1971 (400,550 bande). La technique de bandes haute résolution implique l'obtention de 850 bandes / haploïde

- a. Une microphotographie est effectuée sur le chromosome étalé.
- b. Les chromosomes isolés sont découpés de la microphotographie
- c. Les chromosomes isolés sont alignés selon la classification standard pour voir si le caryotype est normal et anormal.

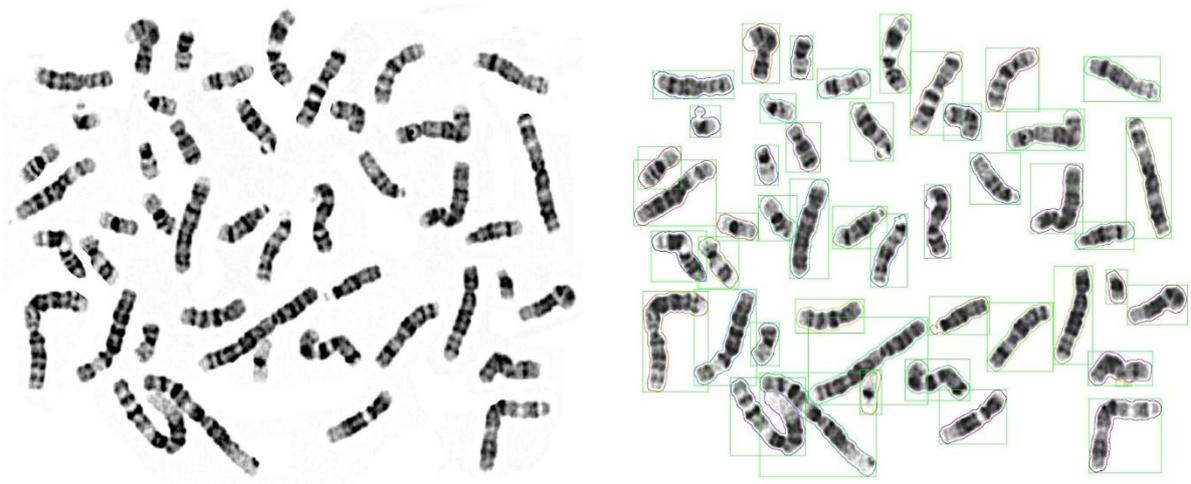


Fig. 7.2. Microphotographie (gauche) et découpés chaque chromosome (droite).
(Collection du Dr. Cristina Gug)

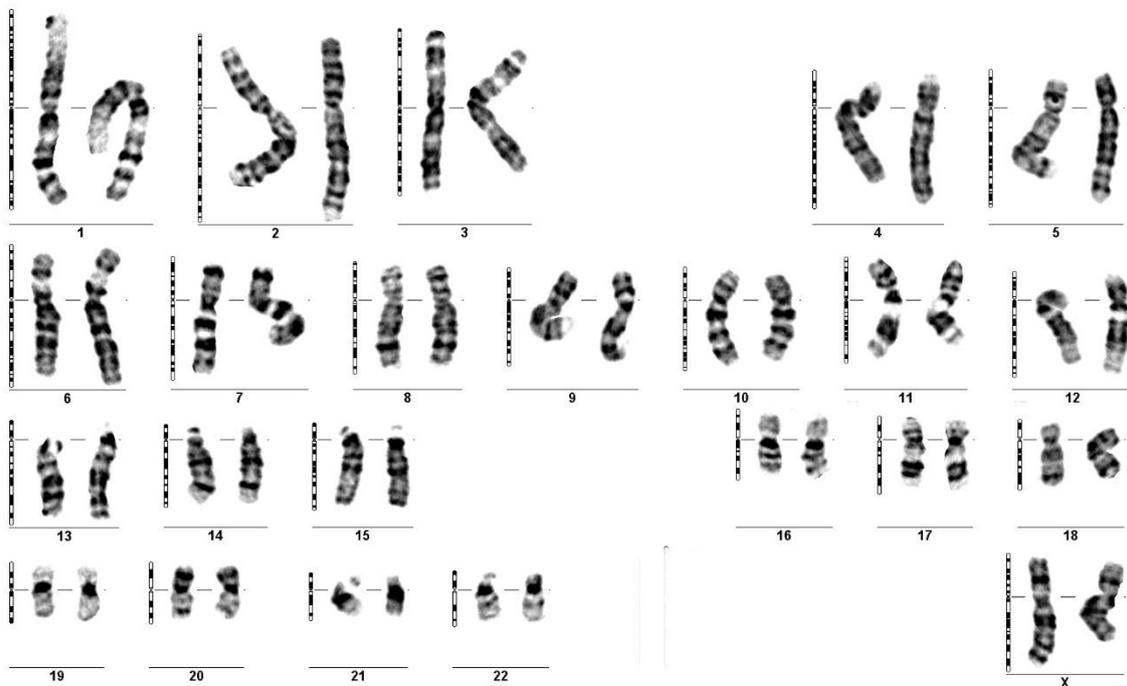


Fig. 7.3. Caryotype féminin normal avec formule cytogénétique: 46,XX.
(Collection du Dr. Cristina Gug)

Avantages et désavantages

La méthode a l'avantage de ne pas être très invasive (ponction veineuse, ponction sternale), pas très cher, par rapport à d'autres méthodes d'investigation génétique. Étant une méthode de dépistage, en général, d'identifier toute anomalie génétique, assez large pour les situations où le résultat n'est pas éclairant, on va proposer et réaliser une méthode d'investigation plus profonde.

Le caryotype standard permet le ralentissement des remaniements chromosomiques, par exemple translocations

- constitutionnels ou acquis,
- affectant au moins une bande chromosomique, soit environ 103 à 104 KB.

L'analyse cytogénétique n'aborde pas le gène et le caryotype est INUTILE dans la susception de la maladie génique.

Il est utile dans les malformations congénitales, sachant que 10% d'entre eux ont une anomalie chromosomique.

Les polymorphismes chromosomiques

1. la longueur de l'hétérochromatine des bras longs de l'Y

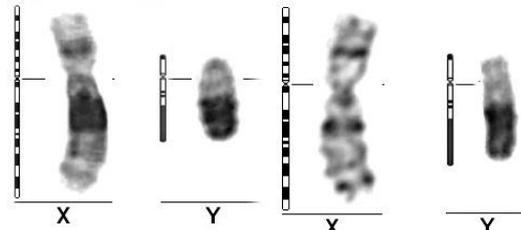


Fig. 7.4. Polymorphisme: l'hétérochromatine des bras longs de l'Y.
(Collection du Dr. Cristina Gug)

2. des régions centromériques des chromosomes 1, 9 et 16

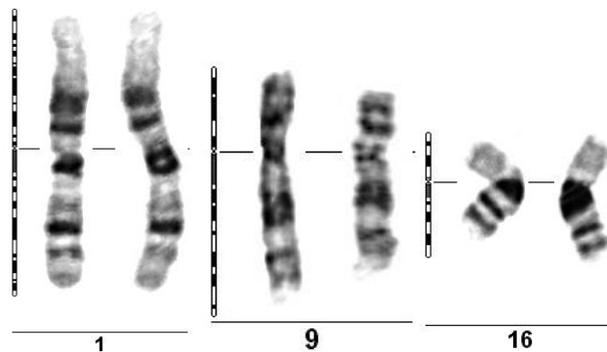


Fig. 7.5. Polymorphisme: chromosomes 1, 9 et 16. (Collection du Dr. Cristina Gug)

3. les bras courts des acrocentriques.

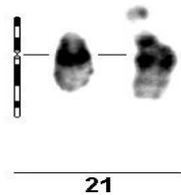


Fig. 7.6. Polymorphisme: satellites. (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe A (Les chromosomes 1,2,3): Les chromosomes sont grand et métacentriques. L'index centromérique (rapport de la taille du bras court sur la taille du bras court + la taille du bras long) est autour de 0,5.

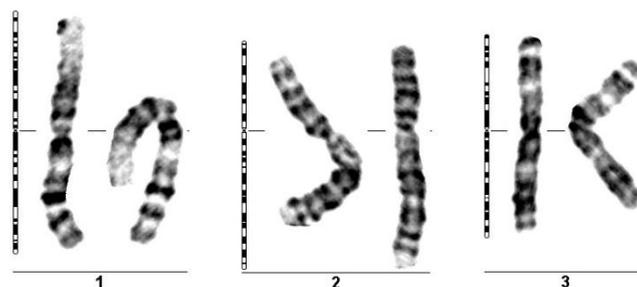


Fig. 7.7. Groupe A (Les chromosomes 1,2,3). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe B (Les chromosomes 4,5). Les chromosomes sont grand sous-métacentriques

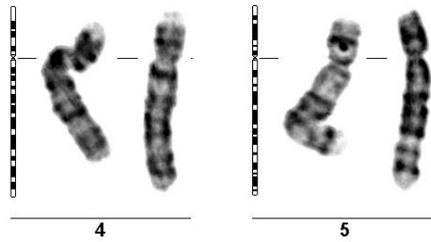


Fig. 7.8. Groupe B (Les chromosomes 4,5). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe C (Les chromosomes 6-12) Les chromosomes sont médium et sous-métacentriques.

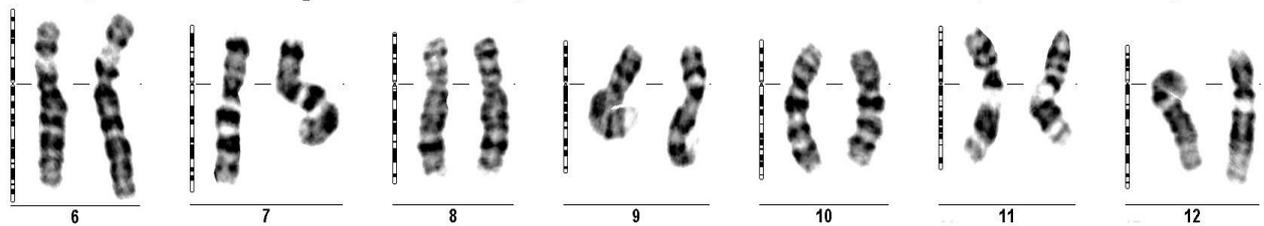


Fig. 7.9. Groupe C (Les chromosomes 6-12). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe D (les chromosomes 13,14,15) Les chromosomes sont medium et acrocentriques.

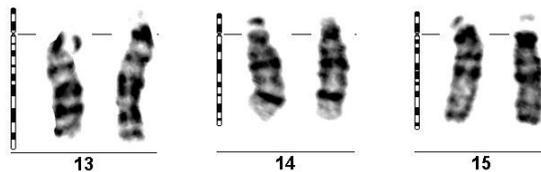


Fig. 7.10. Groupe D (les chromosomes 13,14,15). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe E (les chromosomes 16, 17, 18) Les chromosomes sont medium et métacentriques, (16) sous-métacentriques

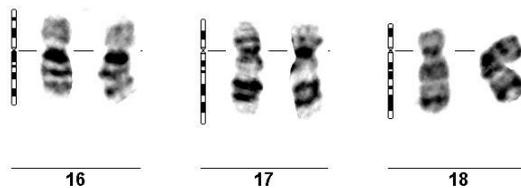


Fig. 7.11. Groupe E (les chromosomes 16,17,18). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe F (les chromosomes 19,20) Les chromosomes sont petit et *métacentriques*.

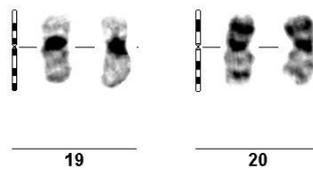


Fig. 7.12. Groupe F (les chromosomes 19,20). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Groupe G (les chromosomes 21,22) Les chromosomes sont petit *acrocentriques*

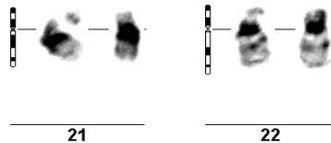


Fig. 7.13. Groupe G (les chromosomes 21,22). (Collection du Dr. Cristina Gug)

Interprétation des résultats

Tous les anomalies chromosomiques sont identifiées et incluses dans la formule chromosomique, en utilisant des symboles et des abréviations établies par consensus international (ISCN: *International System for human Cytogenetic Nomenclature*), permettant une définition précise de la constitution chromosomique d'un individu.

La formule chromosomique est une façon d'exprimer le résultat d'un caryotype et comprendra:

- le nombre de chromosomes dans la cellule,
- le nombre et le type de chromosomes sexuels,
- la liste des anomalies identifiées.

Règles d'écriture de la formule cytogénétique

Un certain nombre de signes et symboles internationaux sont utilisés pour écrire la formule cytognétique correspondant au caryotype humain normal et pathologique.

Les cas qui ne présentent pas d'anomalies numériques ou structurelles sont classé comme normal. Définissez des clones de cellules lorsqu'il y a: deux métaphases ou plus avec des anomalies structurelles identiques; deux métaphases ou plus avec des extrachromosomes identiques; trois métaphases ou plus avec la monosomie du même chromosome.

Pour écrire la formule cytogénétique, vous devez entrer:

- nombre total de chromosomes;
- constitution dans les chromosomes sexuels;
- anomalies détectées.

Pour les **trisomies autosomiques**, le nombre total de chromosomes (47), la paire de gonosomes, le signe «+» placé devant le chiffre indiquant le chromosome surnuméraire.

Pour les **monosomies autosomiques**, le nombre total de chromosomes (45), la paire de gonosomes, le signe «-» placé devant le nombre indiquant le chromosome absent.

Pour les **anomalies numériques gonosomiques**, le nombre total est noté des chromosomes suivis d'une virgule et de l'énumération de tous les chromosomes sexuels existants.

Pour les **anomalies chromosomiques structurelles**, elles sont répertoriées anomalies numériques impliquant un seul chromosome, suivies de translocations, réarrangements déséquilibrés, marqueurs non identifiables, chromosomes en anneau.

Pour les **trisomies partielles / monosomies**, les signes «plus» sont utilisés ou "moins" placé après la lettre "p" ou "q" indiquant une addition ou une réduction des bras chromosomiques, respectivement.

Si plusieurs chromosomes sont impliqués dans une anomalie structurelle, ils seront mis entre parenthèses, par ordre de taille, et seront séparés par des points-virgules (;).

Illustrations:

formule cytogénétique normale:

- femme 46, XX et
- homme 46, XY;

anomalies numériques chromosomiques:

- 47, XY, + 21 = trisomie 21 chez les hommes;
- 45, X = monosomie X;
- 47, XXY = trisomie gonosomale;
- 46, XX / 47, XX, + 18 = mosaïcisme avec deux clones cellulaires;
- anomalies structurelles:
 - translocation Robertsonienne déséquilibrée entre les chromosomes 13 et 21: 46, XX, -13, + trob (13; 21)
 - translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22: t (9; 22) (q34; q11).
 - Translocation Robertsonienne équilibrée (équilibrée) entre les chromosomes 14 et 15: 45, XX, rob (14, 15) (q10; q10).

D'autres exemples de symboles utilisés dans la nomenclature comprennent:

del = suppression;
dup = duplication;
inv = inversion;
ins = insertion;
i = isochromosome;
t = translocation;
trob = translocation
robertsonienne;
der = chromosome dérivé;
r = anneau chromosomique;
s = satellites;
ss = satellites doubles;
h = constriction secondaire.
dic = chromosome dicentrique;
fra = site fragile;

mar = marqueur;
mat = chromosome d'origine
maternelle;
pat = chromosome d'origine
paternelle;
tel = télomère;
cen = centromère;
ace = acentrique;
: = rupture; :: = rupture et
retrouvailles;
pter = fin du bras court;
qter = extrémité du bras long;
/ = la ligne diagonale indique le
mosaïcisme.

Des exercices: Make A Karyotype

Cut out chromosomes here



Paste chromosomes here with their match

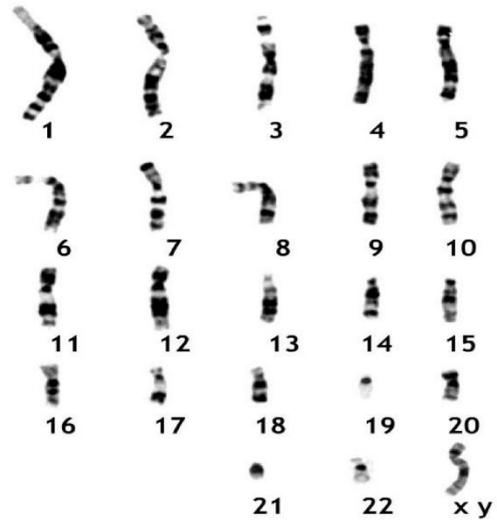


Fig.7.14. <http://learn.genetics.utah.edu/content/chromosomes/karyotype/>

Examen pratique

Écrivez la formule cytogénétique des caryotypes suivants.

Nommé le syndrome (nom propre et nom génétique).

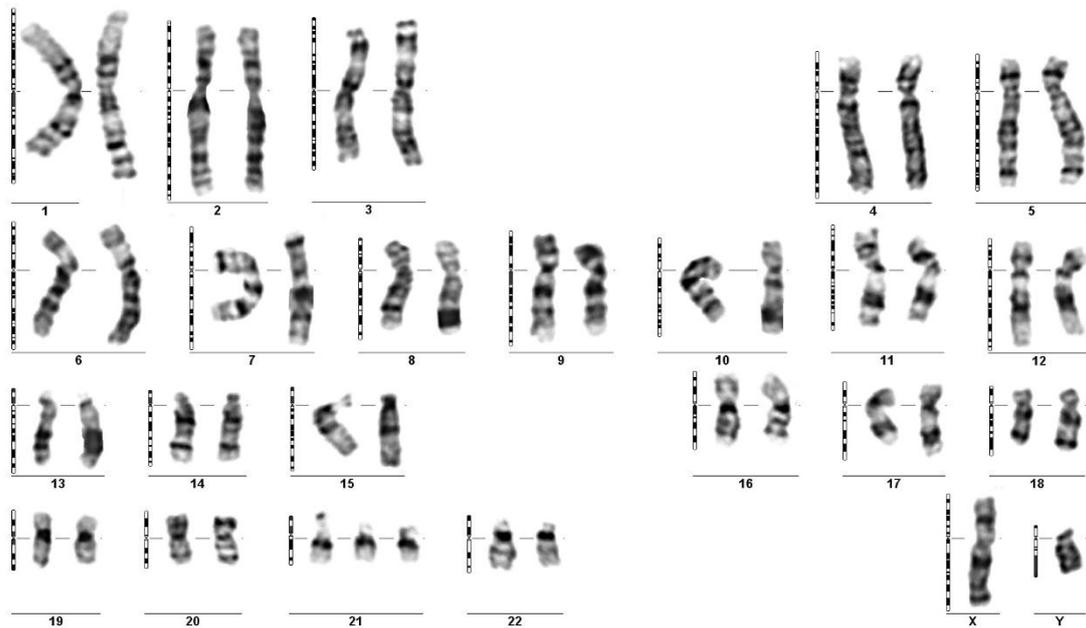


Fig. 7.15. Caryotype avec formule cytogénétique: 47,XY+21 (Syndrome de Down=Trisomie 21) (Collection du Dr Cristina Gug)

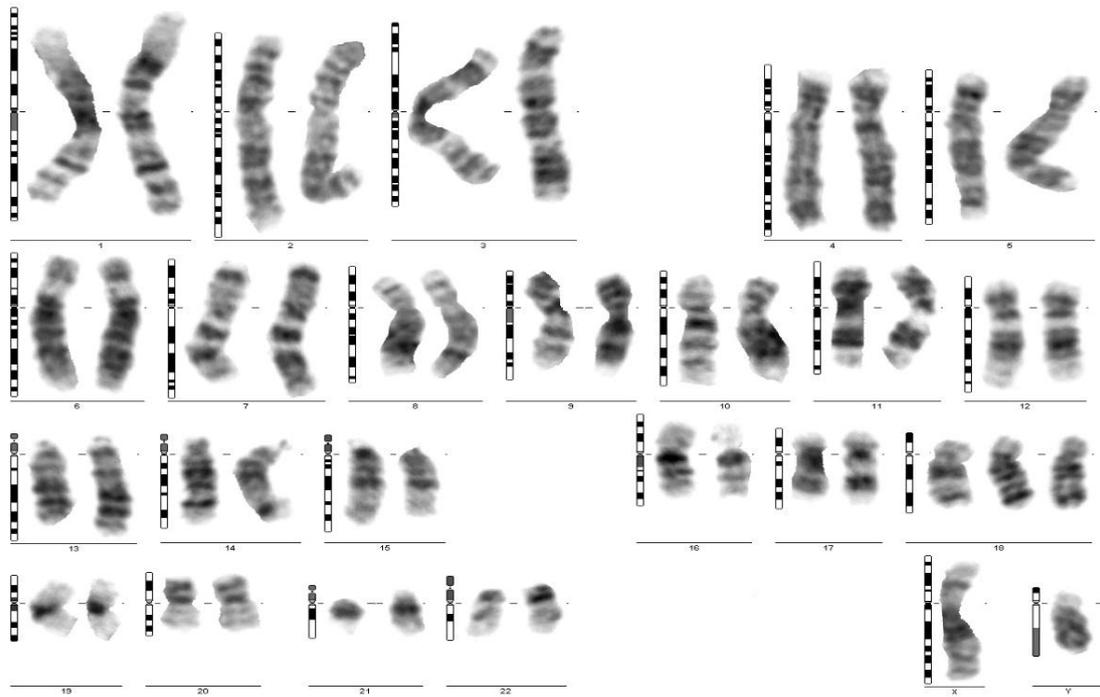


Fig. 7.16. Caryotype avec formule cytogénétique: 47,XY+18 (Syndrome de Edwards=Trisomie 18) (Collection du Dr Cristina Gug)

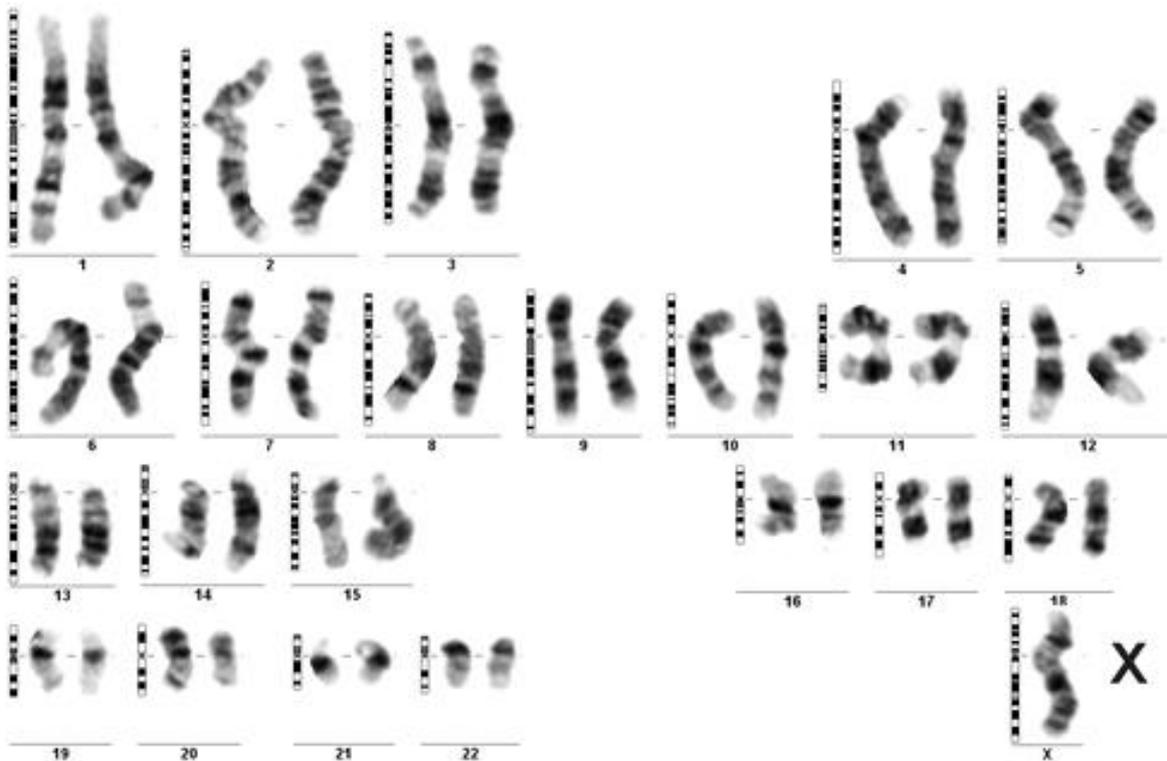


Fig. 7.17. Caryotype avec formule cytogénétique: 45, X (Syndrome de Turner=Monosomie X) (Collection du Dr. Cristina Gug)



Fig. 7.18. Caryotype avec formule cytogénétique: 45, X (Syndrome de Turner=Monosomie X) (Collection du Dr. Cristina Gug)

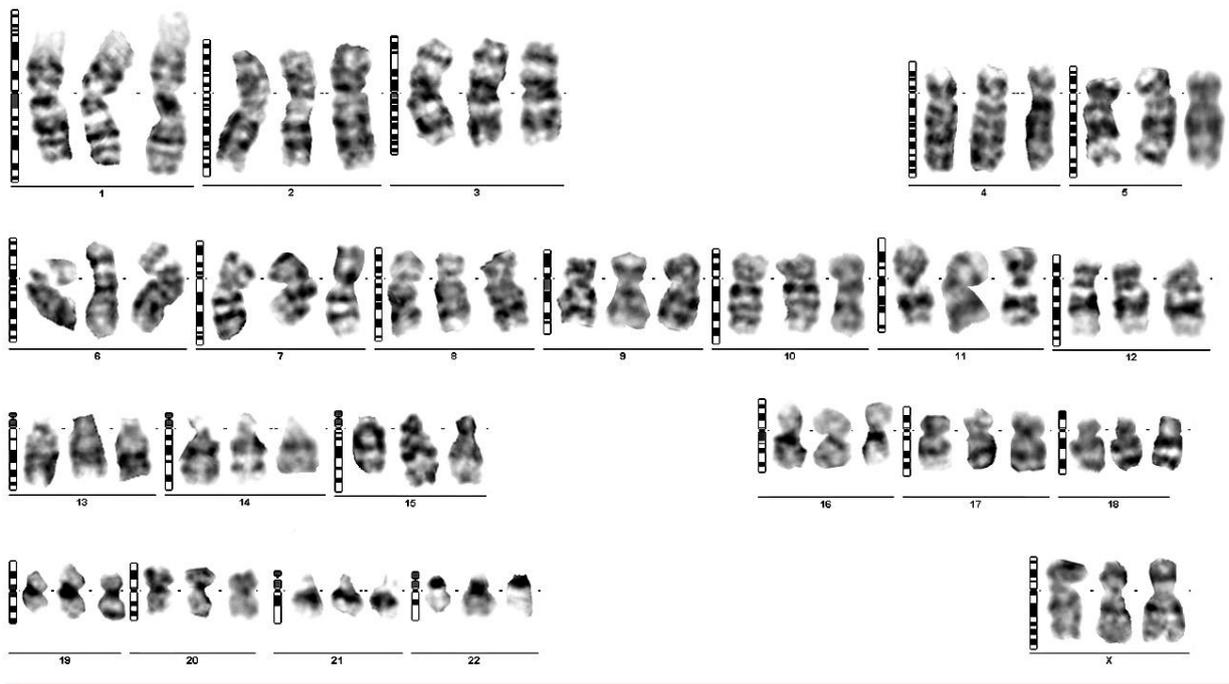


Fig. 7.19. Caryotype avec formule cytogénétique: 69,XXX indique Triploïdie (Collection du Dr. Cristina Gug)

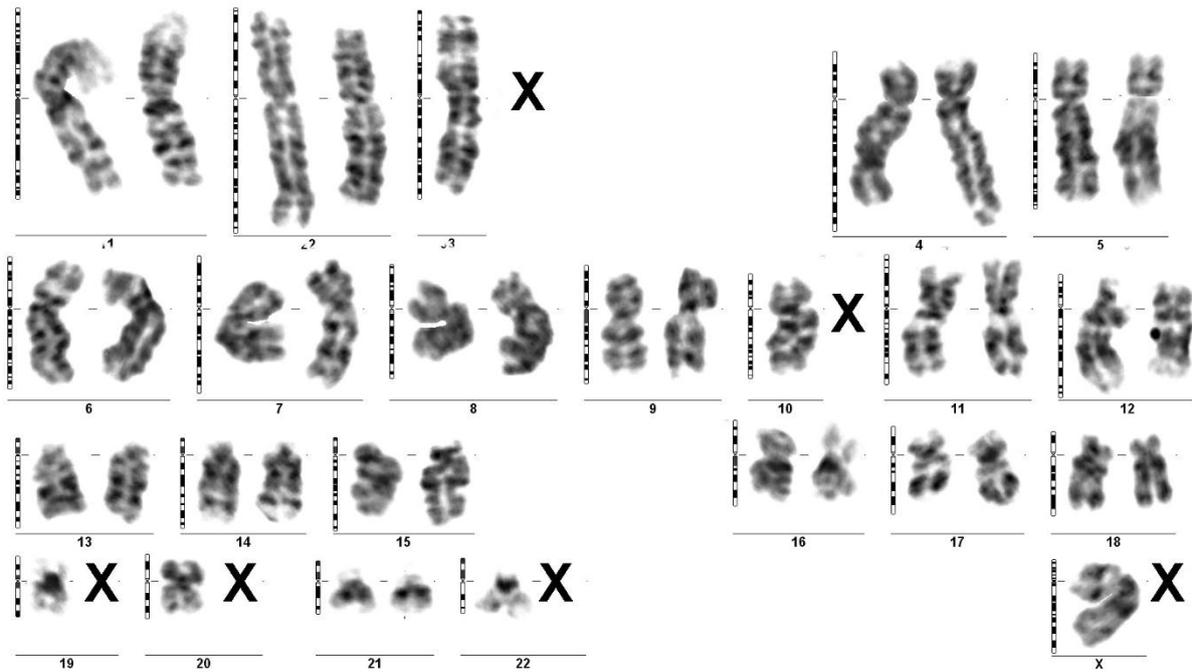


Fig. 7.20. Caryotype avec formule cytogénétique: 40,X, -3, -10, -19, -20, -22 indique une hypoploïdie dans une cellule cancéreuse
(Collection du Dr Cristina Gug)

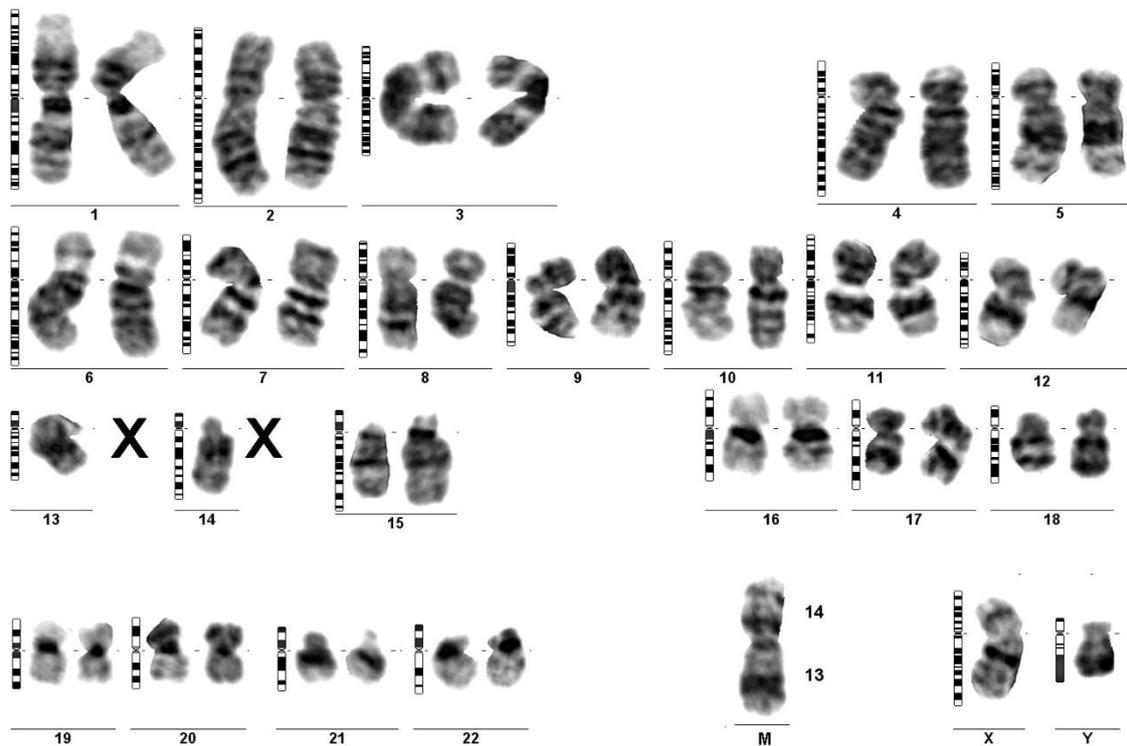


Fig. 7.21. Caryotype avec formule cytogénétique: 44,XY, -13, -14,+der(13;14) indique une translocation équilibré entre deux chromosomes acrocentrique 13 et 14.
(Collection du Dr Cristina Gug)

Travaux pratiques nr. 8

L'HYBRIDATION FLUORESCENTE (FISH)

Généralités

La FISH est une technique d'imagerie moléculaire qui consiste à créer des sondes à ADN qui vont se fixer sur une partie spécifique d'un chromosome ou sur un chromosome entier.

Ses utilisations sont nombreuses : réalisation de caryotypes, mise en évidence de maladies génétiques. Son avantage par rapport aux marqueurs radioactifs habituellement utilisés est qu'il n'y a pas de risque de contamination de l'environnement alentours.

La technique consiste en trois étapes:

1. préparation de la sonde fluorescente,
2. hybridation *in situ*,
3. observation des résultats au microscope à fluorescence.

1. Préparation de la sonde fluorescente

Les sondes sont des fragments d'ADN simple brin, marqués par fluorescence.

Il en existe quatre principaux types:

- Locus spécifique
- Peinture chromosomique
- Télomérique
- Centromérique

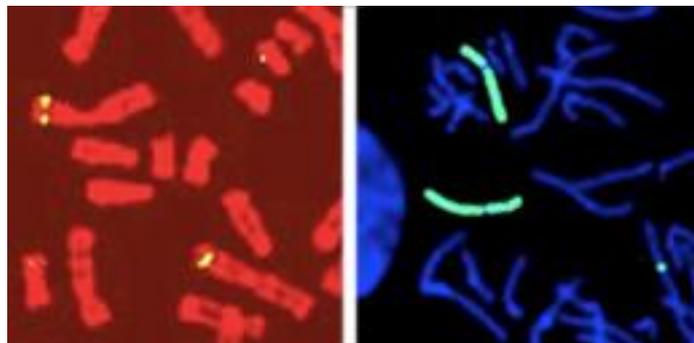


Fig. 8.1. Locus spécifique Peinture chromosomique

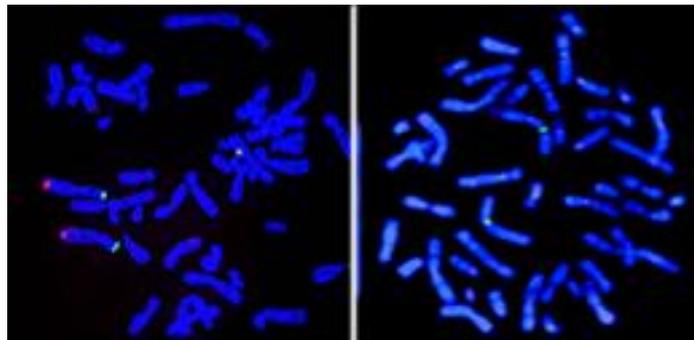


Fig. 8.2. Les sondes FISH : Télomérique (gauche) et centromérique (droite)

Les marquages non radioactifs (c'est donc le cas pour la FISH) ne peuvent se faire que sur un nucléotide: la dUTP (ou désoxyuridine tri-phosphate), nucléotide contenant comme base azotée l'uracile. Ce nucléotide est habituellement spécifique à l'ARNm, dans lequel il remplace la Thymine. Cependant, il peut dans le cas des sondes s'apparier à la place de la Thymine.

Plusieurs techniques sont utilisées pour la création des sondes.

Hybridation in situ

Elle se fait sur deux étapes :

1. Préparation des cellules

Cette étape est cruciale: en effet, il s'agit de bien préparer les cellules pour un résultat optimal. Différents prélèvements sont utilisés: lymphocytes (globules blancs), moelle osseuse, coupes de tissus, cellules isolées (urine, liquide amniotique, frottis buccal)

2. Hybridation des sondes

La température optimale d'hybridation est appelée le T_m (melting temperature en anglais), elle dépend de l'échantillon. C'est aussi la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre est sous forme double brin. Le passage d'une forme à l'autre est très rapide.

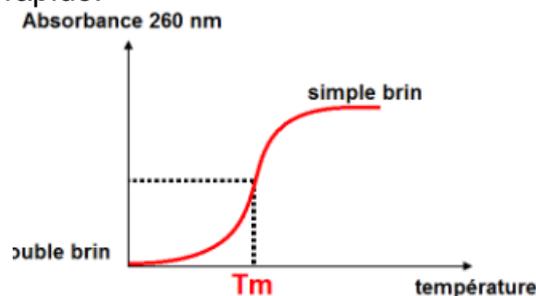


Fig. 8.3. La température optimale d'hybridation appelée: le T_m

On introduit les sondes sur la lame contenant les cellules (elles vont s'introduire dans les cellules grâce à la perméabilisation de la membrane), puis la lame dans une solution tampon d'hybridation, quelques degrés sous la T_m , avec une concentration en double brin Na^+ de $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$. Plus les sondes sont longues, plus l'hybridation est longue; on attend en général une douzaine d'heures.

On procède ensuite au lavage: certaines substances sont utilisées pour enlever les sondes non hybridées ou mal hybridées. Il convient ensuite d'effectuer une contre-coloration: on utilise principalement le DAPI, fluorochrome qui possède la propriété de se lier fortement aux bases A et T. Cependant, on utilise parfois l'IP (iodure de propidium), colorant rouge qui va s'intercaler dans la double hélice. Cette étape permet ainsi de visualiser les chromosomes dans leur ensemble, le signal étant suffisamment faible pour ne pas inhiber la fluorescence des sondes.

Observation des résultats

La technique couramment utilisée pour l'observation des cellules traitées par FISH est la microscopie à fluorescence.

Ce type de microscope, nous permet de visualiser la fluorescence émise par les marqueurs fluorescents introduits dans l'échantillon que l'on souhaite étudier. Le microscope est ainsi équipé d'un jeu de filtres et de miroirs dichroïques.

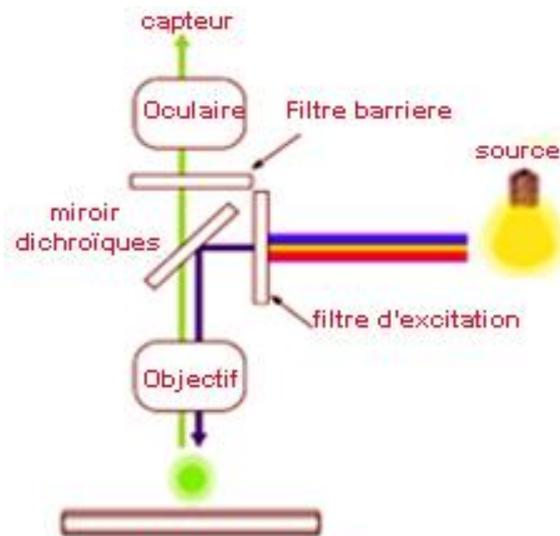


Fig. 8.4. Microscope à fluorescence

- La première fois qu'un faisceau de lumière blanche est envoyé à travers un filtre qui sélectionnera les longueurs d'onde d'absorption des marqueurs.
- La lumière filtrée est dirigée vers un miroir dichroïque vers les cellules (préalablement placées sur une lame). Les marqueurs, en présence de la lumière qu'ils absorbent, émettent une lumière qui est à nouveau "filtrée" à travers un deuxième filtre, ne conservant que les principales longueurs d'onde d'émission.
- Nous pouvons enfin observer, grâce au passage de la lumière dans l'oculaire, les cellules issues de la FISH.
- On observe le résultat, que l'on peut traiter par ordinateur pour une meilleure clarté: ci-dessous l'exemple d'une métaphase colorée par FISH. On peut maintenant conclure quant au diagnostic.

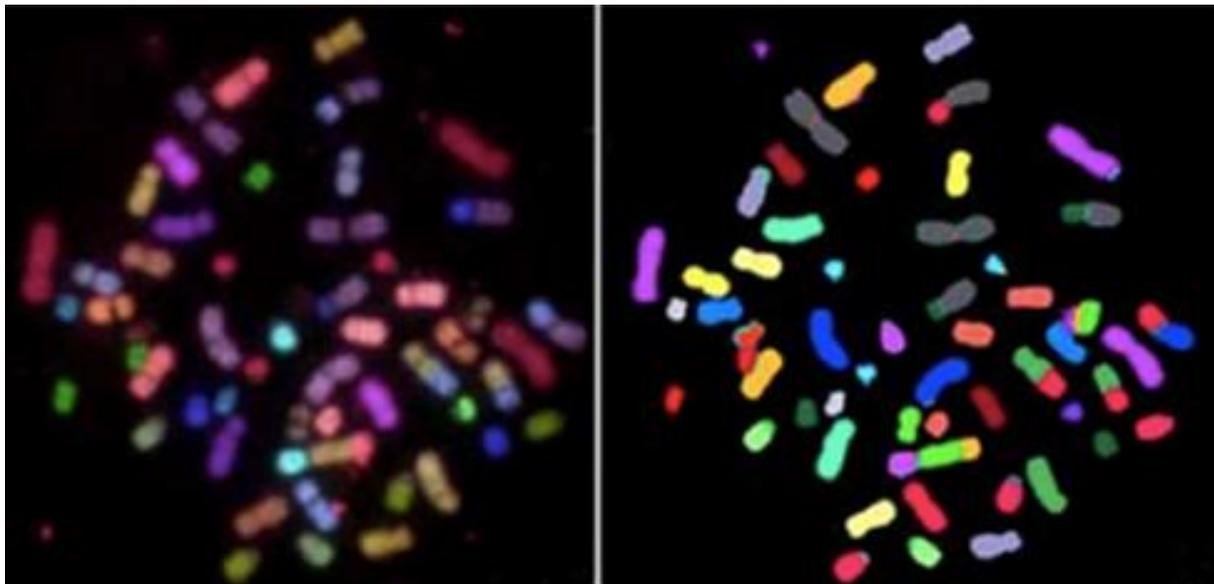


Fig. 8.5. Une métaphase colorée par FISH avant traitement (gauche) et après traitement (droite)

Selon les sondes utilisées, l'image ci-dessous peut suggérer une trisomie 21 (3 sondes rouges) ou peut représenter une duplication d'un locus spécifique.

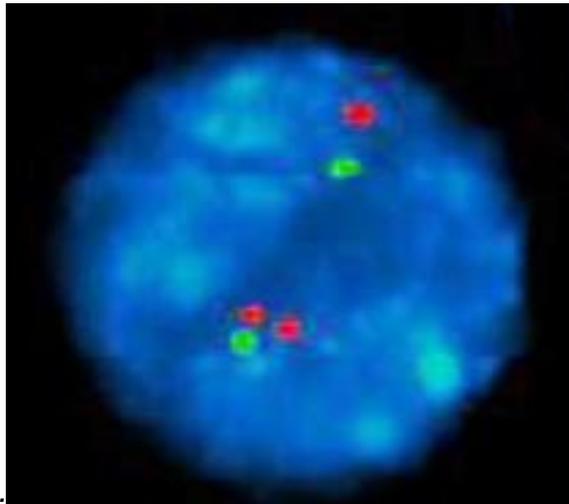


Fig. 8.6. Interphasic FISH suggérant un surplus de matériel génétique: trisomie totale ou partielle.

Travaux pratiques nr. 9.

LES MALADIES METABOLIQUES

Conditions de prélèvement sanguin pour les tests ADN.

Sang veineux prélevé sur EDTA

- 5 ml pour adulte;
- 2 ml pour les enfants ou les nourrissons



Fig.9.1. Vacutainer avec EDTA

1. Phénylcétonurie

La maladie est causée par une mutation du gène PAH (12q22-q24.2) qui code pour l'enzyme phénylalanine hydroxylase; la chaîne métabolique de la phénylalanine (Phe) est perturbée, accumulant des intermédiaires métaboliques tels que:

- acide phénylacétique
- acide phénylpyruvique,

Ils ont une action toxique sur le tissu nerveux et s'installent progressivement oligophrénie phénylpyruvique.

Il faut donc supprimer de l'alimentation presque toutes sources des protéines animales et végétales.

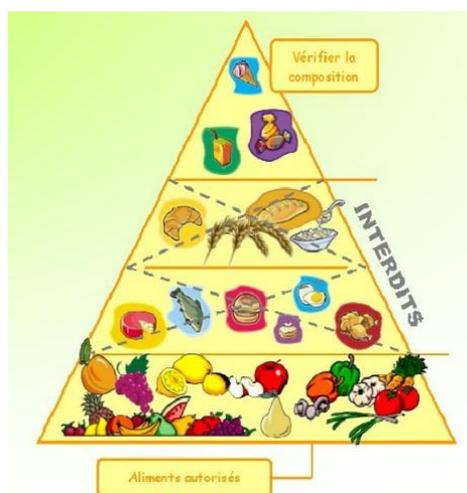


Fig. 9.2. Pyramide alimentaire en phénylcétonurie avec aliments autorisés et interdits

Possibilités de traitement, de soins et de suivi:

- Un régime pauvre en protéines doit être suivi de manière constante tout au long de la vie.
- Au fur et à mesure que l'enfant grandit, le régime est individualisé et ajusté en fonction des besoins spécifiques.
- Une surveillance régulière des taux de phénylalanine est très importante.
- Jusqu'à l'âge de 12 ans, les tests doivent être effectués deux fois par mois et tous les mois après l'âge de 12 ans.
- Les niveaux élevés de phénylalanine chez les adolescents et les adultes affectent négativement le QI (indice d'intelligence) et la fonction cognitive.

2. Intolérance héréditaire au lactose

Le gène LCT (MCM6) est situé sur le chromosome 2q21.3-2q22.1. L'existence d'un polymorphisme C / T en position 13910 du gène de la lactase conditionne la quantité de lactase dans l'intestin. Génotypes possibles: 13910 CC, 13910CT, 13910TT.

Table 9.1. Génotypes et phénotypes dans l'intolérance héréditaire au lactose

Génotypes	Phénotype
13910TT	tolérant
13910CT	tolérance intermédiaire
13910 CC	Intolérant

POSITIF avec le génotype HOMOZIGOTE (13910 CC) détermine une nette prédisposition génétique à l'intolérance au lactose primaire.

Le régime lactose provoque l'apparition d'une fermentation bactérienne des molécules de lactose dans le côlon et l'apparition de symptômes tels que:

- sensation de plénitude dans l'estomac,
- flatulences,
- douleurs abdominales coliques.

Chez les enfants, le principal symptôme est la diarrhée due à l'effet osmotique des disaccharides.

Les symptômes du «syndrome du côlon irritable» apparaissent à l'âge adulte.



Fig. 9.3. Un régime lacté régulier est interdit mais du lait sans lactose peut être administré.

Le traitement consiste à éviter les produits laitiers non fermentés et à administrer l'enzyme lactase à chaque repas contenant des produits laitiers à des doses adaptées à l'âge et par kg de corps.



Fig. 9.4. Le traitement in Intolérance héréditaire au lactose

3. La maladie de Gaucher

Le gène GBA est situé en 1q21.2 et code pour l'enzyme glucocérébrosidase. La mutation 1226A>G est plus fréquente chez les juifs ashkénazes, espagnols et portugais.

La MG de type 1 (90% des cas) est chronique, non neurologique, associée à une hématosplénomégalie, des lésions osseuses et des cytopénies.

Présentation du cas

L'apparition était soudaine, avec une douleur intense causée par une arthrite réactive dans le genou gauche.

Ensuite, une évaluation clinique complète a été réalisée et on a trouvé: hépato-splénomégalie, thrombocytémie et anémie hypochrome hypochrome.

Mutation Information for Validation						
Genes	RefSeq	Nucleic Acid Alteration	Amino Acid Alteration	Mutation Location	Zygosity *	Chr_Location
GBA	NM_001005741.2	c.1226A>G	p.N409S p.Asn409Ser	EX10	Het	chr1:155205634
GBA	NM_001005741.2	c.999G>A	p.(=) (alt: p.V333V)	EX8	Het	chr1:155207132

Fig. 9.5. Le résultat du test NGS montrant la présence de deux mutations dans le gène GBA. (Collection Dr Cristina Gug)

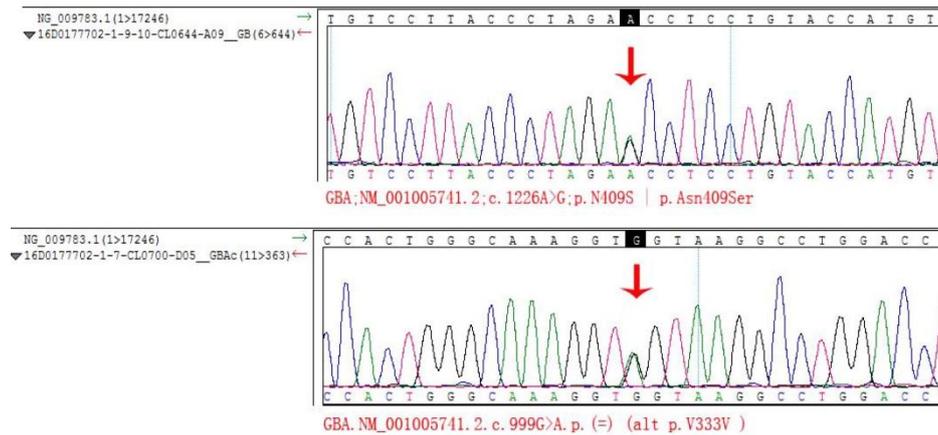


Fig. 9.6. Vérification des mutations par la méthode Sanger, identifiées par NGS.
 (Collection Dr Cristina Gug)

La suspicion clinique a été confirmée: maladie de Gaucher. Le test génétique révèle 2 mutations dans le gène GBA, c'est-à-dire une hétérozygotie composée.

Il existe un traitement enzymatique substitutif par glucocérébrosidase intraveineuse recombinante = IMIGLUCERASE (Cerezyme).

La maladie de Gaucher est héréditaire selon un schéma autosomique récessif. Les parents de l'enfant sont chacun porteurs d'une des 2 mutations identifiées chez l'enfant. Le risque d'avoir un autre enfant atteint de la maladie de Gaucher est de 25% = 1/4. Un diagnostic prénatal pour le test GBA est recommandé pour chaque future grossesse.

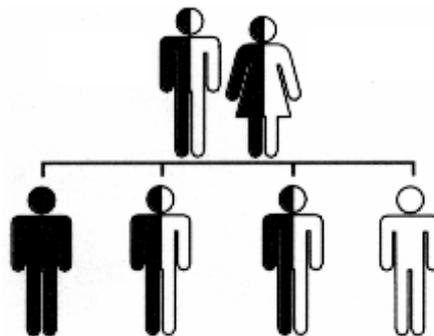


Fig. 9.7. Transmission autosomique récessive

4. L'hypercholestérolémie familiale

Le gène LDLR est situé sur le chromosome 19p13.2.

Maladie se manifeste par une augmentation significative du cholestérol plasmatique en cas de formation de plaque d'athérome dans l'endothélium artériel. Une hypertension consécutive apparaît, une circulation coronarienne et cérébrale réduite, un risque majeur de crise cardiaque, de crise vasculaire et cérébrale.

Présentation du cas

Le patient est jeune (32 ans), en surpoids et est connu pour avoir une hypercholestérolémie depuis l'âge de 24 ans.

Le profil lipidique montre:

- Taux de cholestérol total élevé (310),
- LDL élevé (241), HDL normal,
- Triglycérides élevés (270),
- Augmentation des lipides (1054).

Il existe une cytolyse hépatique (ALAT = 57)

Le grand-père maternel est décédé d'un infarctus du myocarde à l'âge de 56 ans.

Le test génétique a montré la présence d'un variant de PATOGENE a été identifié dans l'hétérozygotie dans le gène LDLR associé à une hypercholestérolémie familiale autosomique dominante dans l'hétérozygotie.

GENE	VARIANT	ZYGOSITY	VARIANT CLASSIFICATION
LDLR	c.514G>A (p.Asp172Asn)	heterozygous	PATHOGENIC

Fig. 9.8. Le résultat du test NGS montrant la présence de deux mutations dans le gène LDLR. (Collection du Dr. Cristina Gug)

Conclusions: La suspicion clinique d'hypercholestérolémie familiale est confirmée. Ceci est un résultat important d'un point de vue médical. Le gène LDLR qui a une transmission autosomique dominante se manifeste chez le patient et est transmis à sa fille (la probabilité était de 50%) ; sa sœur est également porteuse. Sa sœur et sa fille ont un profil lipidique modifié.

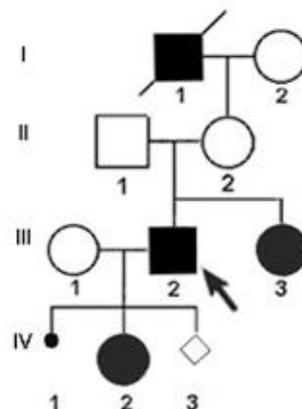


Fig. 9.9. Arbre généalogique de la famille présentant une hypercholestérolémie familiale (Collection Dr Cristina Gug)

6. La fibrose kystique (Mucoviscidose)

Le gène CFTR situé sur le chromosome 7q a une transmission autosomique récessive.

Les principales manifestations cliniques sont:

- dysfonctionnement des glandes mucipares exocrines
- augmentation de la concentration de chlorure dans la sueur et les sécrétions des glandes salivaires.
- insuffisance pancréatique avec troubles digestifs
- fibrose pulmonaire

Présentation du cas

Nous vous présentons le cas d'un nouveau-né qui a subi un dépistage néonatal de maladies métaboliques dans lequel une valeur légèrement accrue du trypsinogène immunoréactif a été enregistrée.

TEST RESULTS								
Gene	RefSeq	Nucleic Acid Alteration	Amino Acid Alteration	Mutation location	Hom/Het/Hemi*	Chromosome location	Reference	Mutation Type*
CFTR	NM_000492.3	c.2991G>C	p.L997F p.Leu997Phe	EX19	Het	chr7:117250575	[1-3]	Pathogenic
CFTR	NM_000492.3	c.3454G>C	p.D1152H p.Asp1152His	EX21	Het	chr7:117254753	[4-6]	Pathogenic

Fig. 9.12. Le résultat du test NGS montrant la présence de deux mutations pathogènes dans le gène CFTR chez un nouveau-né suspecté de fibrose kystique (Collection Dr Cristina Gug)

Suite à ces tests, nous pouvons conclure que l'enfant a 2 mutations dans le gène CFTR, toutes deux de type missens: exon 19 (spre 2991G>C) et exonul 21 (c.3454G>C).

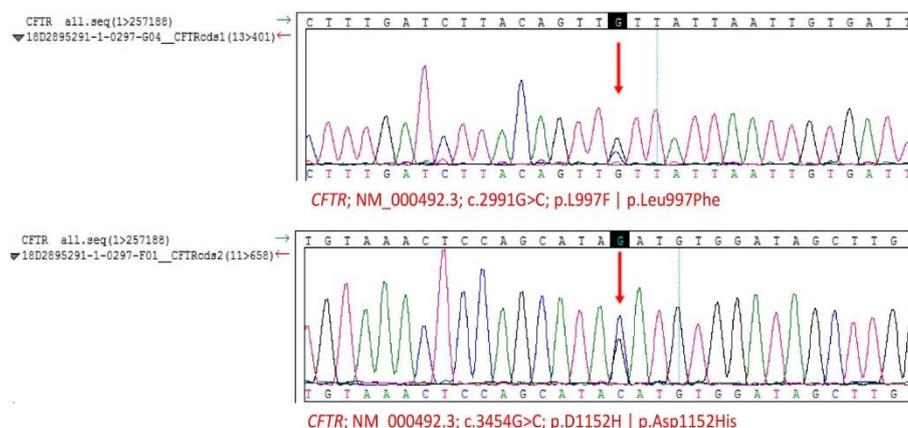


Fig. 9.13. Vérification des mutations par la méthode Sanger, identifiées par NGS. (Collection Dr Cristina Gug)

Deux mutations pathogènes hétérozygotes du gène CFTR ont été identifiées, confirmant le diagnostic de fibrose kystique. Ces allèles sont la cause génétique qui explique le résultat anormal du trypsinogène immunoréactif dans le dépistage néonatal. Les parents sont chacun porteurs sains de l'un des allèles.

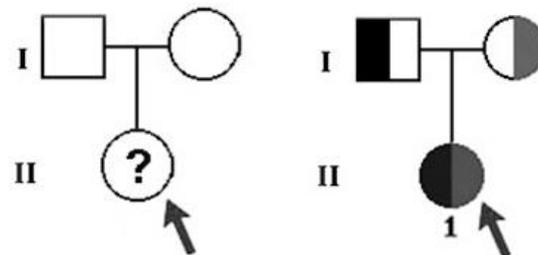


Fig. 9.14. Arbre généalogique avant et après les tests génétiques.
(Collection Dr Cristina Gug)

7. La dystrophie musculaire de Duchenne

Le gène DMD, est situé sur le chromosome X (Xp21.2).

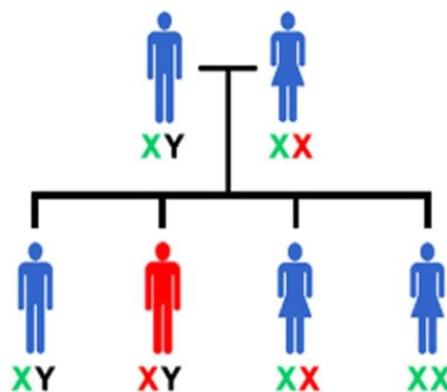


Fig. 9.15. La transmission est récessive liée à l'X

La maladie se manifeste par une faiblesse progressive des muscles squelettiques chez les enfants de sexe masculin et une cardiomyopathie isolée affectant les femmes porteuses.

Les mutations dans le gène DMD sont principalement des délétions ou duplications, mais il existe également des mutations ponctuelles qui provoquent un décalage du cadre de lecture du gène.

Présentation du cas

L'enfant est venu pour une consultation génétique à l'âge de cinq ans. Hépatocytolyse cliniquement présente à 7 mois et la créatinine kinase a augmenté de 17728 U / L (24-149).

La technique génétique MLPA a identifié des mutations majeures dans le gène de la dystrophine. Le profil MLPA du gène de la dystrophine montre la délétion de l'exon 52.

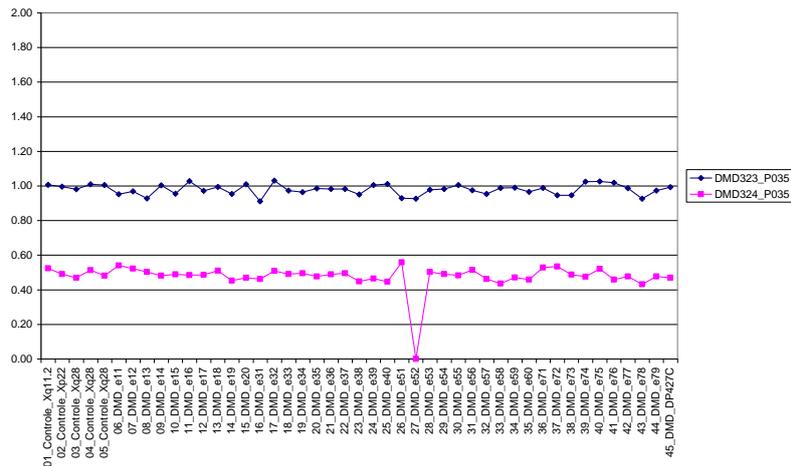


Fig. 9.16. Le résultat génétique par la technique MLPA pour l'enfant malade indique la délétion de l'exon 52 du gène DMD. (Collection Dr Cristina Gug)

8. L'ostéogénèse imparfaite «maladie des os de verre»

Maladie de Lobstein

Mutations pathogènes sont possible dans l'un des gènes suivants: COL1A1 (17q21.33), COL1A2, CRTAP, P3H1. La transmission est dominant autosomique.

Il a été établi 4 critères cliniques majeurs pour le diagnostic de l'ostéogénèse imparfaite:

- ostéoporose avec fragilité anormale du squelette,
- sclérotique bleue,
- dentinogénèse imparfaite,
- otosclérose prématurée

Présentation du cas

Le patient de 37 ans a été cliniquement diagnostiquée à la naissance avec une Ostéogénèse imparfaite, montrant une fracture de la clavicule droite. Dès sa naissance, il a subi de nombreuses fractures et interventions chirurgicales. Jusqu'à l'âge de 30 ans, il a enregistré 60 fractures, notamment au niveau des membres inférieurs, il a donc nanisme (138 cm). Le patient a des sclérotique bleue, mais aucune dentinogénèse imparfaite et aucun degré de surdité.

L'analyse directe du séquençage de l'ADN du gène COL1A1 a révélé une mutation d'épissage (c.1155+1G>C) à l'état hétérozygote. La mutation est ponctuelle, dans l'intron 17 à la jonction avec l'exon 17 et provoque un traitement anormal de l'ARNm et une délétion transcriptionnelle de l'exon 17.

TEST RESULTS								
Genes	RefSeq	Nucleic Acid Alteration	Amino Acid Alteration	Mutation location	Hom/Het/Hemi*	Chromosome location	Reference	Mutation Type*
COL1A1	NM_000088.3	c.1155+1G>C	-	IVS17	Het	chr17:4827292 7	[1]	Pathogenic

Fig. 9.17. Le résultat du test NGS montrant la présence d'une mutation pathogène dans le gène COL1A1 chez un patient diagnostiqué cliniquement avec Ostéogénèse imparfaite. (Collection Dr Cristina Gug)

En conclusion, une mutation pathogène a été identifiée qui est la cause de la maladie. La mutation est de novo, les parents étant normaux. La maladie étant à dominant autosomique en hétérozygotie, la mutation / maladie peut être transmise à les descendants avec une probabilité / risque de 50%. Est recommandé un diagnostic prénatal lors de la chaque grossesse de partenaire.

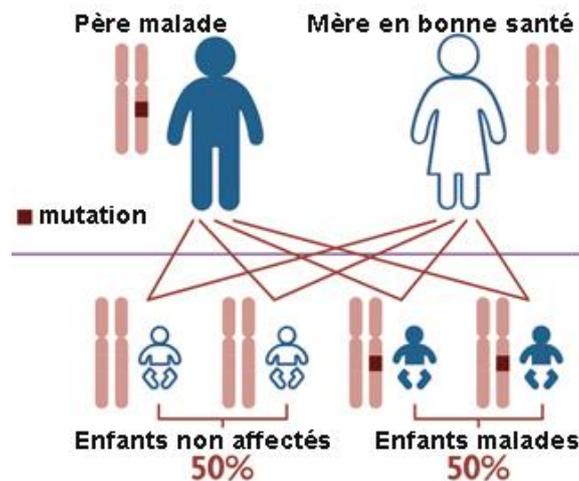


Fig. 9.18. Transmission du gène autosomique dominant dans la situation où le père a la maladie (en hétérozygotie) et la mère est en bonne santé

Travaux pratiques nr. 10.

LA DIVISION CELLULAIRE

Les cellules peuvent parcourir deux formes de division: la mitose ou la méiose.

1. La division mitotique

Génétiquement, la mitose représente la copie en double exemplaire du message génétique dans l'interphase et sa distribution, dans une copie, à chaque cellule fille.

La mitose (division équationnelle) distribue aux cellules nouvellement formées le message héréditaire de manière uniforme, à cause du mécanisme semi-conservatif de duplication de l'ADN qui se produit avant la division mitotique et après la séparation des chromatides (Fig. 10.1.).

Lors de la division mitotique deux événements se produisent:

1. la reproduction, qui double le matériel chromosomique;
2. la distribution, ce qui assure une répartition équitable des chromosomes.

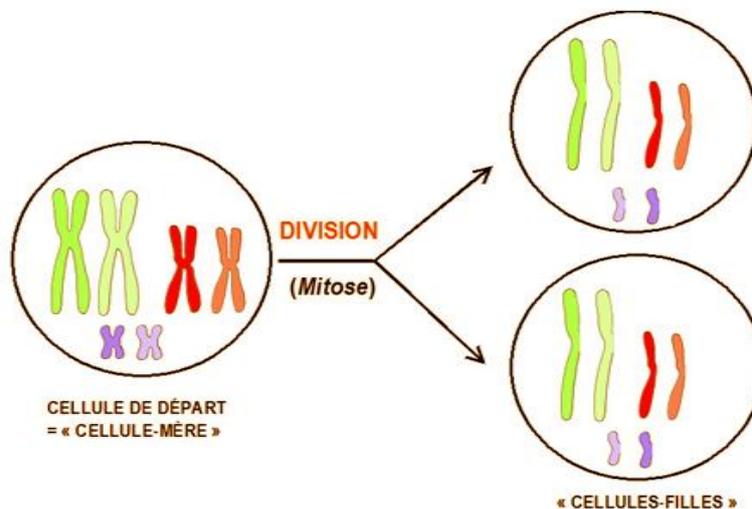


Fig. 10.1. Schéma: mitose d'une cellule (on suit 3 paires de chromosomes)

Avant la division cellulaire mitotique, chaque chromosome réplique son ADN et devient bi-chromatidique. Au cours de la phase de réplication de l'ADN, les chromosomes sont extrêmement longs, déployés dans le noyau et ne peuvent pas être reconnus au microscope optique. A ce stade, appelé interphase, le matériel génétique est organisé comme un réseau de chromatine (Fig. 10.2.).

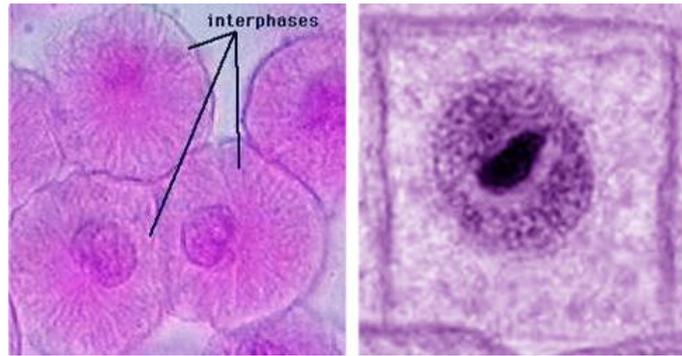


Fig. 10.2. L'interphase

Après le début de la mitose, les chromosomes commencent à se condenser, en spirale, marquant le début de la prophase. Chaque chromosome est constitué de deux sous-unités parallèles (chromatides) qui sont reliées à une région étroite, commune aux deux chromatides, appelée centromère.

Au cours de la prophase, les chromosomes se condensent et continueront à devenir de plus en plus épais, mais seulement dans la prométaphase on peut distinguer les deux chromatides (Fig. 10.3. La).

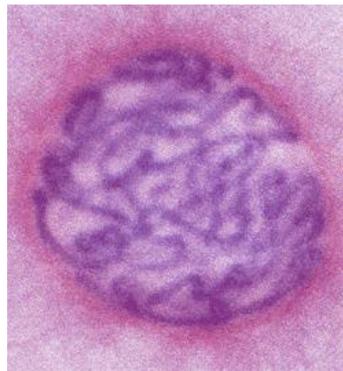


Fig. 10.3. La prométaphase.

Au cours de la *métaphase*, les chromosomes s'alignent dans le centre de la cellule, en formant la plaque équatoriale ; la structure bi-chromatidique est clairement visible (Fig 10.4.). Chaque chromosome se trouve sur une des microtubules du fuseau de division. La métaphase est le meilleur moment pour étudier les chromosomes.



Fig. 10.4. La métaphase

En outre, chaque centromère s'attache longitudinalement, marquant le début de l'*anaphase*, le clivage étant suivi de la migration des chromatides aux pôles opposés de la cellule (Fig. 10.5.).



Fig. 10.5. L'anaphase

Enfin, pendant la *télophase*, les chromosomes se décondensent, la membrane nucléaire se reconstitue et se produit la division du cytoplasme (Fig 10.6.).

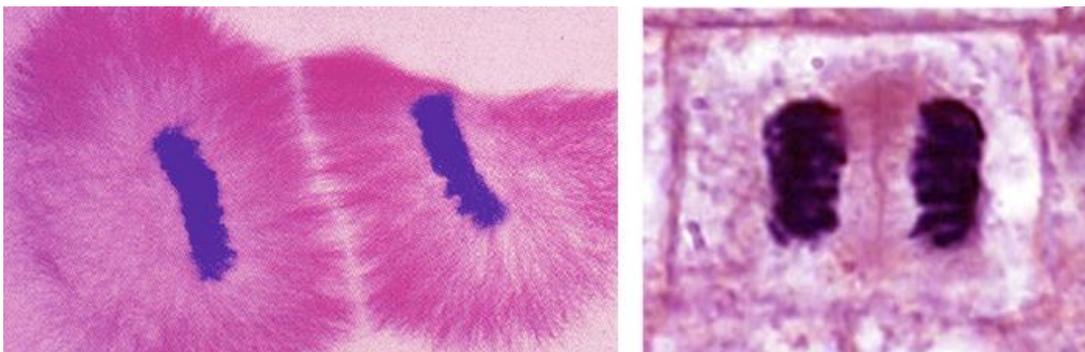


Fig. 10.6. La télophase

Chaque cellule fille reçoit la moitié du tout matériel chromosomique doublé et donc se maintient le même nombre de chromosomes comme la cellule mère.

Suite à la division mitotique, d'une cellule mère résulte deux cellules filles, chacune avec un nombre diploïde de chromosomes ($2n$), identique à la cellule mère (conservatisme héréditaire).

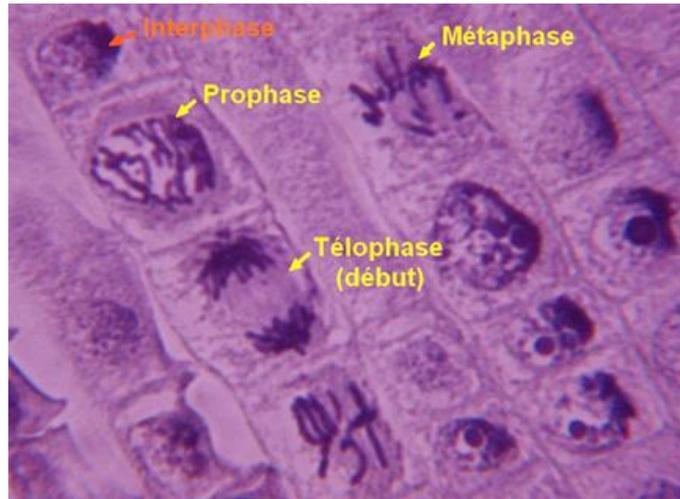


Fig. 10.7. Les phases de la division

La mitose est la division caractéristique des cellules somatiques, tandis que la méiose est la division qui forme les gamètes matures.

Divisions mitotiques anormaux

Le **mosaïcisme** est l'état dans lequel coexistent 2 ou plusieurs clones de cellules avec un nombre différent de chromosomes, dans le même corps (Fig. 10.8.).



Fig. 10.8. Le mosaïcisme

Les écarts par rapport à la division mitotique normale se produisent lors de l'anaphase, par un processus appelé la non-disjonction, ce qui entraîne l'apparition de cellules avec un nombre inégal de chromosomes - l'état des mosaïques.

La non-disjonction apparaît s'il n'y a pas de clivage des centromères ou de séparation des chromatides (Fig. 10.9.), avec la formation

- d'une cellule trisomique ($2n + 1$) et
- d'une cellule monosomique ($2n - 1$).

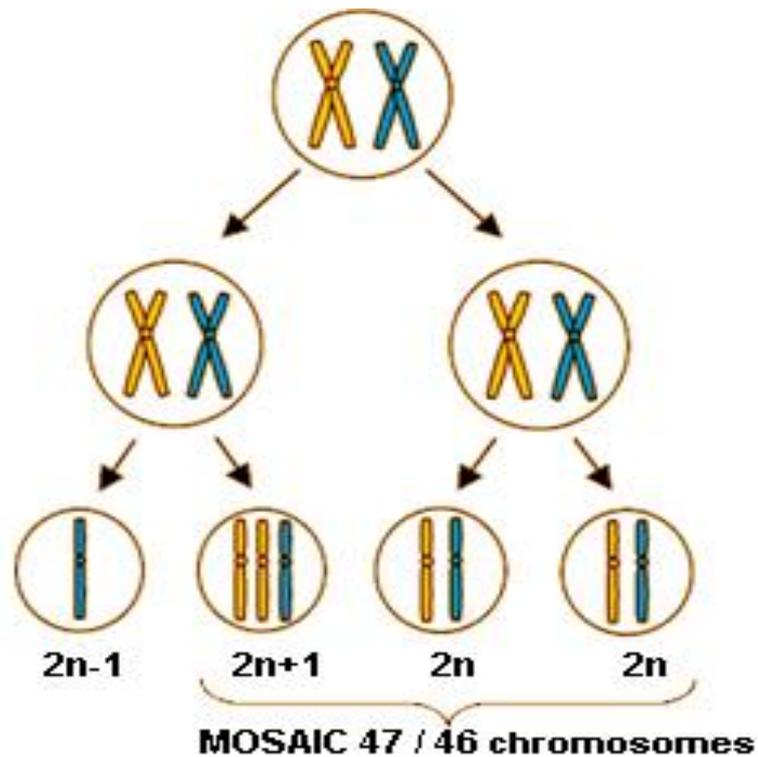


Fig. 10.9. Formation d'une mosaïque cellulaire avec 2 clones ($2n + 1 / 2n$) ou 3 clones cellulaires ($2n-1/2n+1/2n$)

Une autre erreur pouvant survenir lors de la division peut être un «retard» à l'**anaphase** – par le fait que deux chromosomes sont en retard dans la migration vers le même pôle, suivie par la restauration de la membrane nucléaire, le chromosome monochromatidique retardé étant exclu du futur noyau.

Le résultat sera la formation

- d'une cellule avec **monosomie** et
- d'une avec **nombre normal** de chromosomes (euploïde).

Le clivage transversal du centromère est le mécanisme par lequel, de la division cellulaire, résultent les **isochromosomes**. Ils sont des chromosomes parfaitement métacentriques qui ont le même matériel génétique au-dessus et au-dessous du centromère.

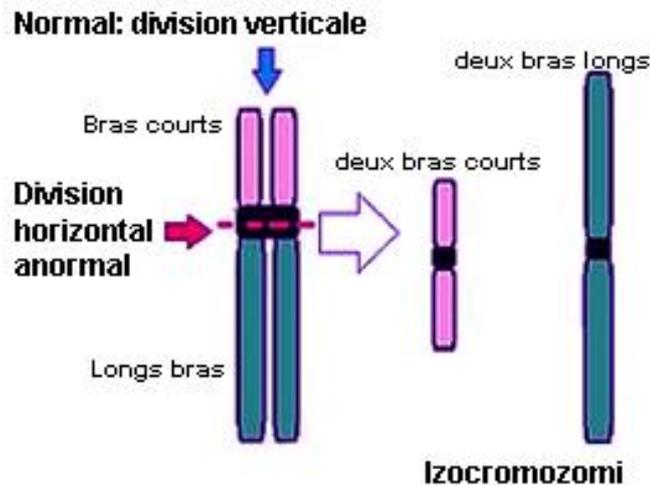


Fig. 10.10. Formation d'isochromosomes par division horizontale anormale du chromosome.

2. La division méiotique

Suite à la division méiotique de la cellule initiale se forme quatre cellules, chacune avec un nombre haploïde de chromosomes (n), qui sont différents de chromosomes de la cellule mère et différents les uns des autres (se produisent des recombinaisons génétiques au cours de la première division méiotique respectivement en prophase et anaphase primaire et des recombinaisons au cours de la seconde division méiotique, qui fournissent la variabilité héréditaire).

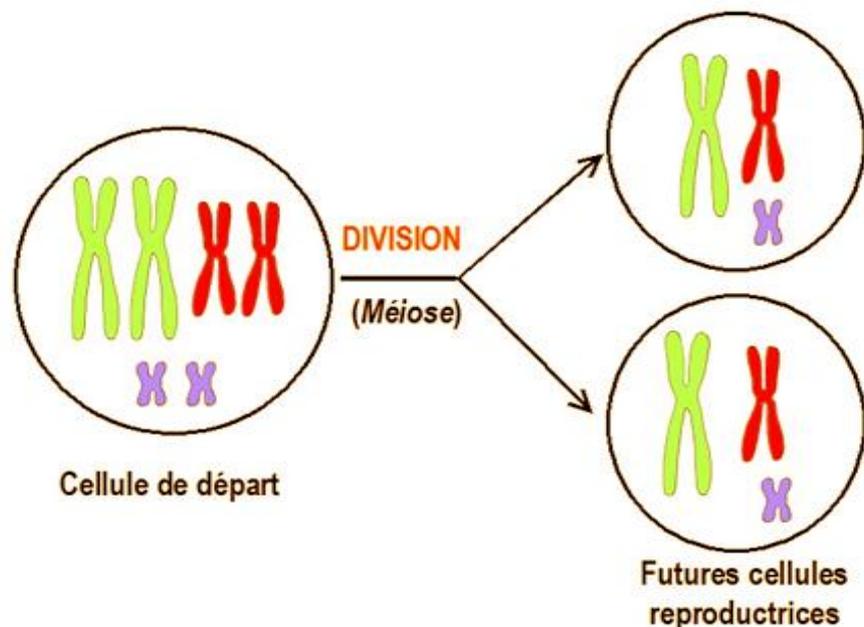


Fig. 10.11. Schéma: méiose d'une cellule (3 paires de chromosomes sont suivies)

Aspects comparatifs entre mitose et méiose

Il convient de bien distinguer méiose et mitose:

<u>Mitose</u>	<u>Méiose</u>
Division équationnelle qui sépare les chromatides sœurs	Une première division, réductionnelle, sépare les chromosomes homologues; les chromatides sœurs ne sont séparées qu'au cours d'une seconde division, équationnelle.
Une division par cycle.	Deux divisions par cycle.
Pas d'appariement des chromosomes homologues; de ce fait, on n'observe ni enjambement, ni échange de matériel héréditaire (=recombinaison).	Les chromosomes homologues s'apparient; on observe des enjambements; du matériel héréditaire peut être échangé entre chromatides homologues: c'est la recombinaison génétique.
Une cellule-mère produit deux cellules-filles par cycle.	Une cellule-mère produit quatre gamètes ou spores par cycle.
Tous les produits portent la même information héréditaire.	L'information héréditaire diffère d'un produit à l'autre, par mélange des chromosomes du parent mâle et des chromosomes du parent femelle, et par des recombinaisons génétiques.
Les cellules-filles ont autant de chromosomes que la cellule-mère.	Les cellules-filles ont moitié moins de chromosomes que la cellule-mère.
Les cellules issues de la mitose sont en général capables de subir de nouvelles mitoses.	Les cellules issues de la méiose ne peuvent subir une autre méiose, mais éventuellement bien des mitoses.
La mitose se produit généralement dans presque toutes les cellules somatiques.	La méiose ne se produit que dans les cellules spécialisées de la lignée germinale.
Les mitoses commencent dès le stade du zygote et continuent tant que l'organisme est en vie.	La méiose ne se produit qu'à maturité chez les organismes supérieurs (animaux, plantes à fleurs, conifères, ptéridophytes), mais elle apparaît dans le zygote de nombreuses algues et champignons.

Alors que la mitose est réalisée en une seule étape, la méiose se compose de deux phases:

- division méiotique primaire (réductionnelle, hétérotypique);
- seconde division méiotique (équationnelle, homotypique).

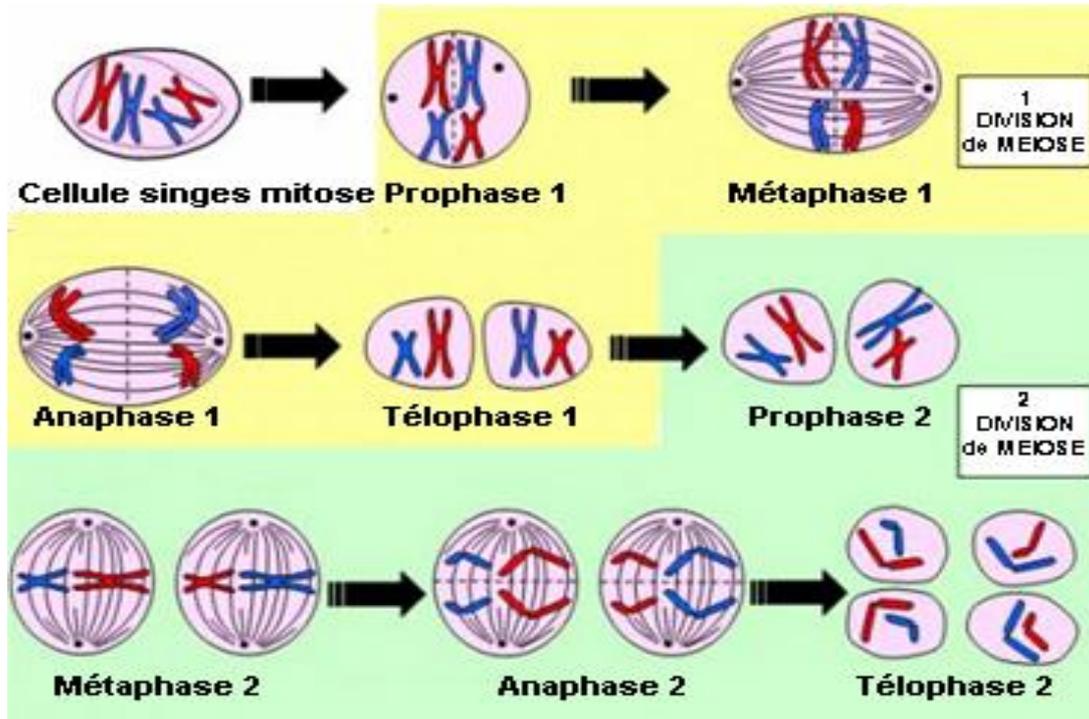


Fig.10.12. Méiose: transformations cytologiques lors de la méiose.

2.1. Première division méiotique (méiose I)

En ce qui concerne la division mitotique, les premières cellules sexuelles, masculines et féminines, répliquent leur ADN avant la première division méiotique. Ainsi, au début des divisions précoces conduisant à la maturation des gamètes, les cellules primordiales contiennent de l'ADN deux fois plus et chaque chromosome est bi-chromatidique.

Un trait caractéristique de la division méiotique est la *formation des paires de chromosomes homologues ou bivalents*. Le chevauchement est exacte, point par point, à l'exception des chromosomes X et Y. Ils ont une région appelée "pseudo-autosomique"; les chromosomes X et Y peuvent se chevaucher et changer des portions homologues. Les régions centromériques des chromosomes homologues ne se chevauchent pas. Parce que chaque chromosome est bichromatidique, la paire homologue se composera de quatre chromatides. Au cours de la mitose, les chromosomes homologues ne se chevauchent pas (ils ne forment jamais de paires).

La première division méiotique est le *crossing over* (recombinaison intra-chromosomique) et se compose de l'échange de segments de chromatides entre les 2 chromosomes homologues.

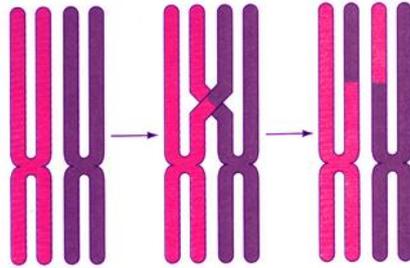


Fig.10.13. Les recombinaisons intra-chromosomiques en méiose I (crossing over). Exemple d'unique recombinaison génétique de chromatides homologues (rouge et verte) (à droite) consécutive à un enjambement (au milieu) entre deux chromosomes homologues (rouge et vert) rapprochés en métaphase de méiose 1 (à gauche).

Plus tard, lorsque chaque membre (bichromatidique) de la paire homologue clive longitudinalement, apparaissent un ou plusieurs points de rupture transversale dans les chromatides et un interchangeement des segments de chromatides entre les deux chromosomes homologues. Lors de leur séparation, les points d'échange restent temporairement unis et donc la structure des chromosomes a l'apparence de X (croix), connu sous le nom chiasma.

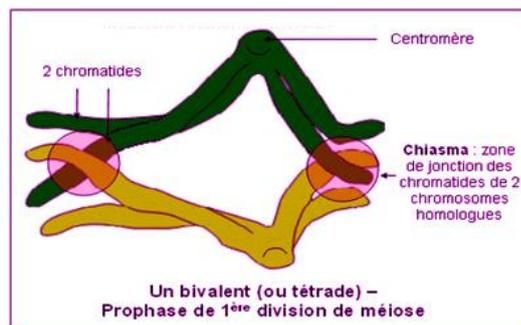


Fig.10.14. Chiasma.

Pendant ce stade, les blocs de gènes sont échangés entre les chromosomes homologues. Dans le même temps, la séparation continue et les membres homologues de la paire sont placés dans le fuseau de division. Par la suite, les chromosomes homologues sont séparés, chaque migrant à un pôle de la cellule de manière aléatoire.

A la fin de la première division méiotique, chaque cellule fille possède 23 chromosomes, un de chaque paire, bi-chromatidiques et recombinés (Fig.10.15). Étant donné que chaque chromosome est resté bichromatidique, en termes quantitatifs, les cellules filles auront une quantité d'ADN égale aux cellules somatiques normales, mais le nombre de chromosomes réduit de moitié.

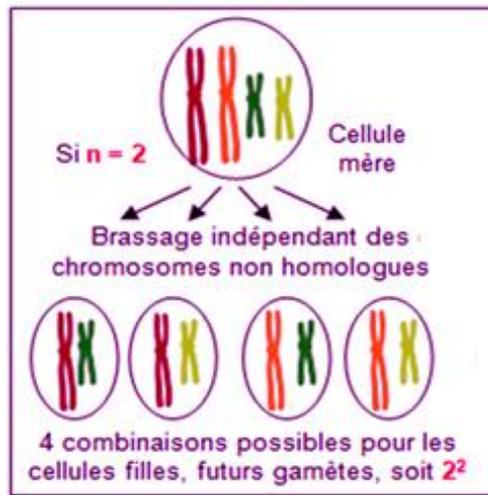


Fig. 10.15. Brassage des chromosomes en division I de méiose

Les chromosomes homologues sont séparés, chaque migrant à un pôle de la cellule de manière aléatoire (Fig.10.16.).

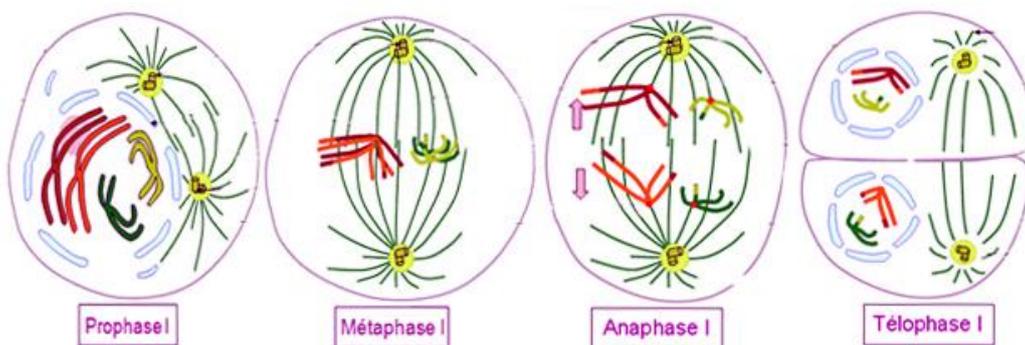


Fig. 10.16. Les étapes de la première division méiotique

2.2. La deuxième division méiotique (méiose II)

Peu de temps après la première division méiotique, commence la seconde division cellulaire sans la synthèse de l'ADN. Les 23 chromosomes bi-chromatidiques clivent le centromère lors de l'anaphase secondaire ; les chromosomes monochromatiques subissent une recombinaison inter-chromosomique (mélange en termes d'origine et la migration aléatoire vers les pôles cellulaires) ainsi qu'à la fin, chacune des cellules filles (nouvellement créée) recevra 23 chromosomes monochromatiques et recombinaison, la quantité d'ADN se réduisant à la moitié de celle des cellules somatiques.

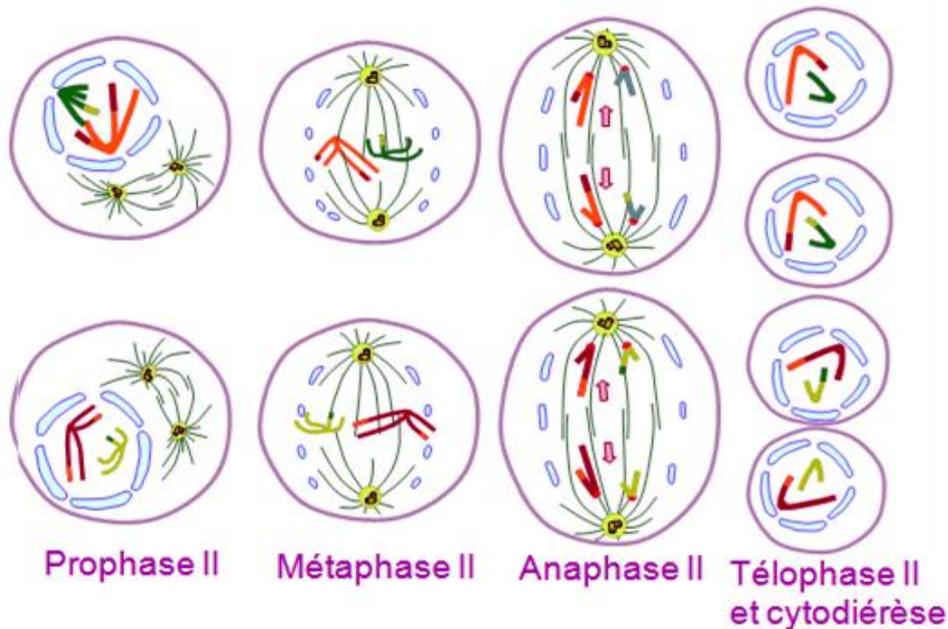


Fig. 10.17. La méiose II

Divisions mitotiques anormales

Les écarts par rapport à la division mitotique normale se produisent lors de l'anaphase, par un processus appelé *la non-disjonction*, ce qui entraîne l'apparition de cellules avec un nombre inégal de chromosomes - l'état des mosaïques.

Le *mosaïcisme* est l'état dans lequel coexistent deux ou plusieurs clones de cellules avec un nombre différent de chromosomes, dans le même corps.

La *non-disjonction* apparaît s'il n'y a pas de clivage des centromères ou de séparation des chromatides, avec la formation d'une cellule trisomique ($2n+1$) et d'une cellule monosomique ($2n-1$).

Une autre erreur pouvant survenir lors de la division peut être un «retard» à l'anaphase – par le fait que deux chromosomes sont en retard dans la migration vers le même pôle, suivie par la restauration de la membrane nucléaire, le chromosome monochromatidique retardé étant exclu du futur noyau. Le résultat sera la formation d'une cellule avec monosomie et d'une avec nombre normal de chromosomes (euploïde).

Le clivage transversal du centromère est le mécanisme par lequel, de la division cellulaire, résultent les *isochromosomes*. Ils sont des chromosomes parfaitement métacentriques qui ont le même matériel génétique au-dessus et au-dessous du centromère.

Les anomalies chromosomiques homogènes (présentent dans toutes les cellules) ont l'origine lors de la division méiotique.

La non-disjonction des chromosomes homologues de l'anaphase en première méiose ou des chromatides dans l'anaphase II, et le « retard » à l'anaphase, vont conduire à la formation de gamètes aneuploïdes. Ceux-ci, grâce à la fertilisation, feront des corps avec des anomalies chromosomiques numériques et homogènes héritées.

Les erreurs pendant la méiose ou mitose se produisent sous l'action d'agents mutagènes et peuvent impliquer une des paires de chromosomes.

Les effets seront variables selon le type du chromosome, l'action du facteur mutagène, le temps de la division en cours.

Les écarts dans la gamétogenèse féminine (ovogenèse) ou masculine (spermatogenèse) sont à l'origine du déterminisme des maladies chromosomiques innées et cohérentes.

Dans le cours normal de disjonction, se forment des gamètes euploïdes contenant chacun un ensemble haploïde (n) de chromosomes recombinants.

Pendant le processus de la gamétogenèse, le matériel génétique est sujet aux changements en raison de:

- non-disjonction chromosomique;
- cellules filles pas séparées après la division;
- *crossing-over* pathologique entre X et Y;
- mutations *de novo*;
- mutations dynamiques.

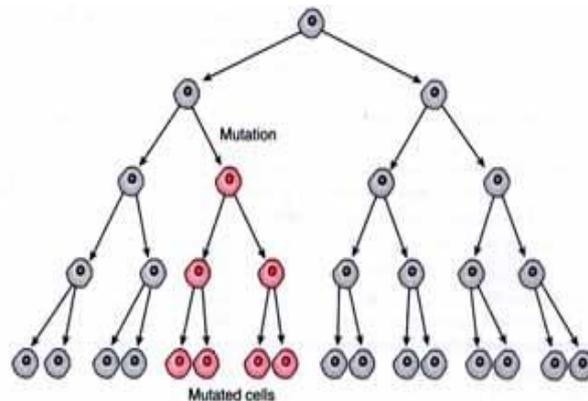


Fig. 10.18. Le mosaïcisme

La non-disjonction chromosomique par l'absence de la séparation des chromosomes homologues (anaphase I) est plus visible que la non-disjonction chromatidique (anaphase II). A cause de la non-disjonction, sont formées les gamètes aneuploïdes nullisomiques ($n-1$) ou disomiques ($n+1$).

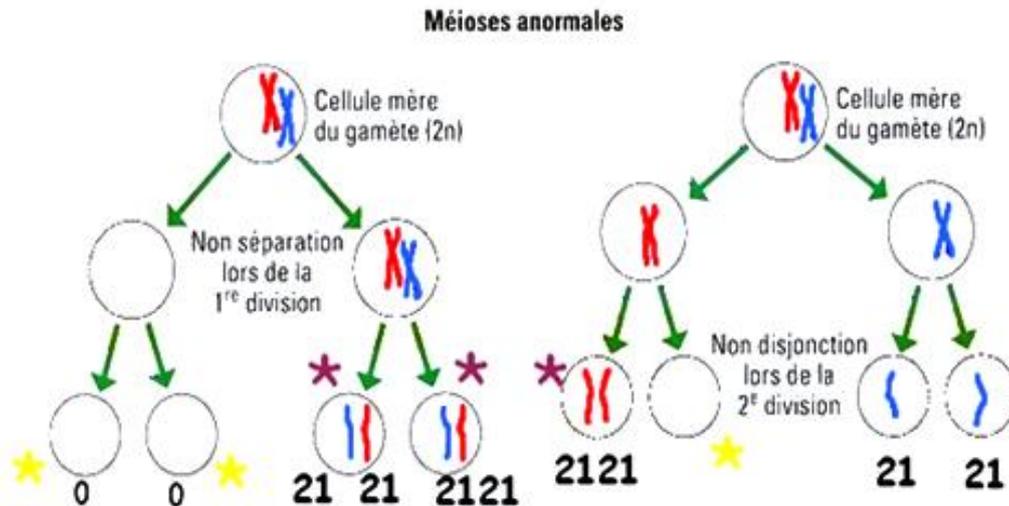


Fig. 10.19. Formation de gamètes $n + 1$ anormaux, dans la méiose II, à travers lesquels apparaissent des enfants atteints du syndrome de Down.

On a constaté que les mécanismes de la non-disjonction affectent principalement l'ovogenèse et donc l'âge maternel avancé est fréquemment incriminée pour développer l'apparition des trisomies autosomiques (21, 18, 13) et le syndrome de Klinefelter. La non-disjonction de la spermatogenèse est, généralement, la cause de la monosomie X et le mécanisme pathogénique pour le syndrome XYY.

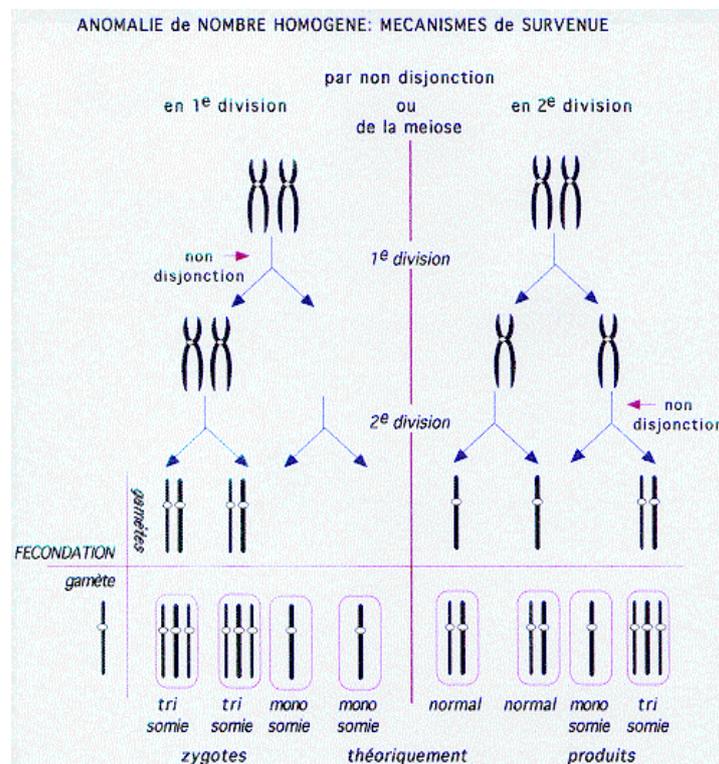


Fig. 10.20. Anomalie de nombre homogène

GAMÉTOGÉNÈSE HUMAINE

La spermatogenèse

La spermatogenèse a lieu durant toute la vie de l'homme dans les **tubules séminifères** où la maturation des cellules souches appelées **spermatogonies** commence à la **puberté**. La première division de méiose transforme chaque **spermatocyte 1** diploïde en deux **spermatocytes 2** haploïdes, la méiose 2 produisant à partir de ces deux cellules quatre **spermatides**, qui se transforment sans division en **spermatozoïde**.

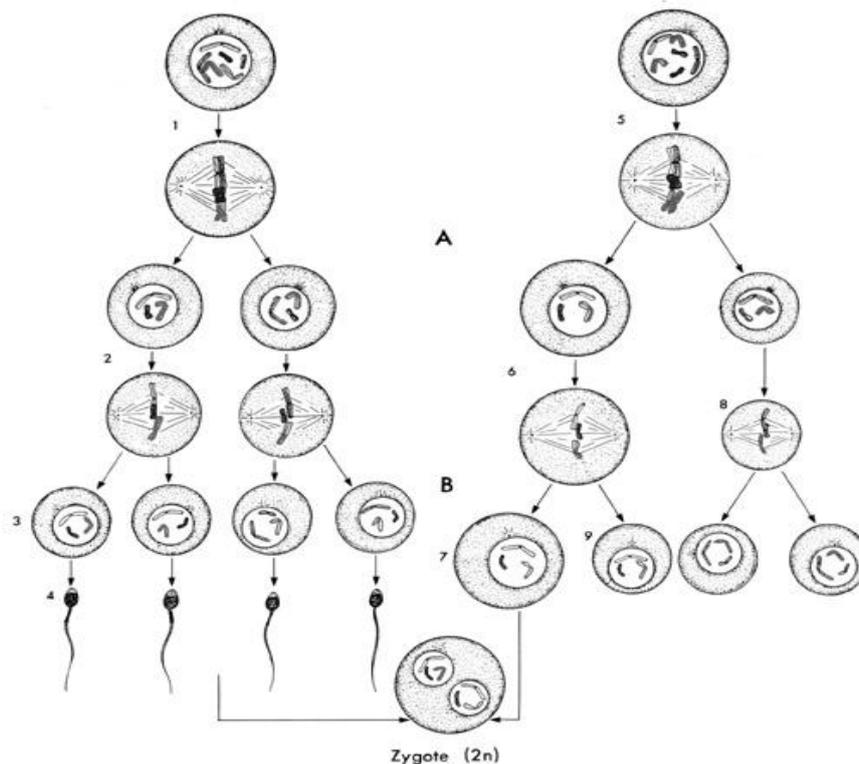


Fig.10.21. Spermatogenèse (à gauche) et ovogenèse (à droite).

A=division réductionnelle ou méiose 1.

5=O(v)ocyte 1.

B=division équationnelle ou méiose 2.

6=O(v)ocytes 2.

1=spermatocyte 1.

7=O(v)otides.

2=spermatocytes 2.

8=premier globule polaire.

3=spermatides (haploïdes).

9=deuxièmes globules polaires.

4=spermatozoïdes.

Non-disjunction au cours de la méiose I de la spermatogenèse

Une non-disjunction au cours de la méiose I (orange) peut être à l'origine de la trisomie/monosomie des chromosomes sexuels.

Après la fécondation de ces cellules germinales, le nombre de chromosomes sera anormal, à savoir inférieur ou supérieur à 46.

Les anomalies du nombre de chromosomes sexuels sont relativement fréquentes.

Les anomalies gonosomiques de type numérique les plus fréquentes sont: le syndrome de Klinefelter et le syndrome de Turner.

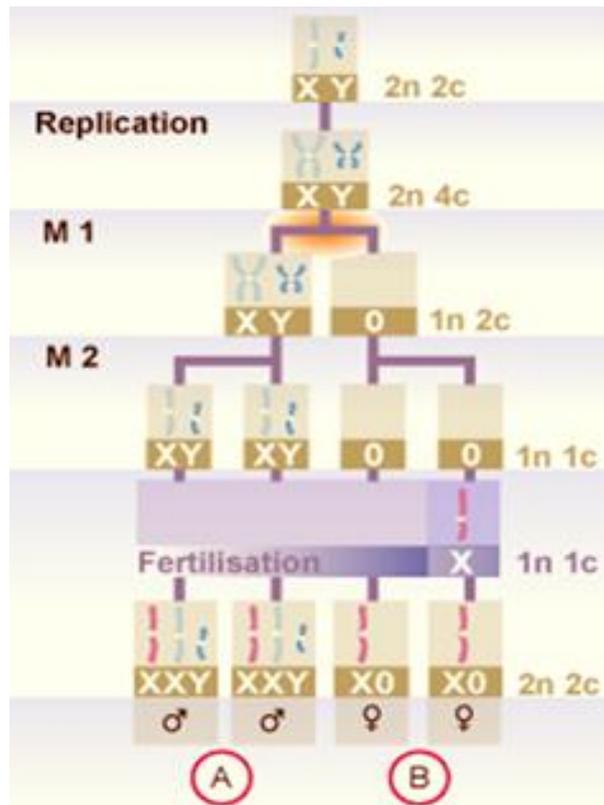


Fig. 10.22. Non-disjunction au cours de la **méiose I (orange)** peut être à l'origine de la trisomie/monosomie des chromosomes sexuels

Un défaut de ségrégation des chromosomes durant la méiose 2 (orange) conduit à des gamètes contenant un chromosome en excès ou un chromosome manquant.

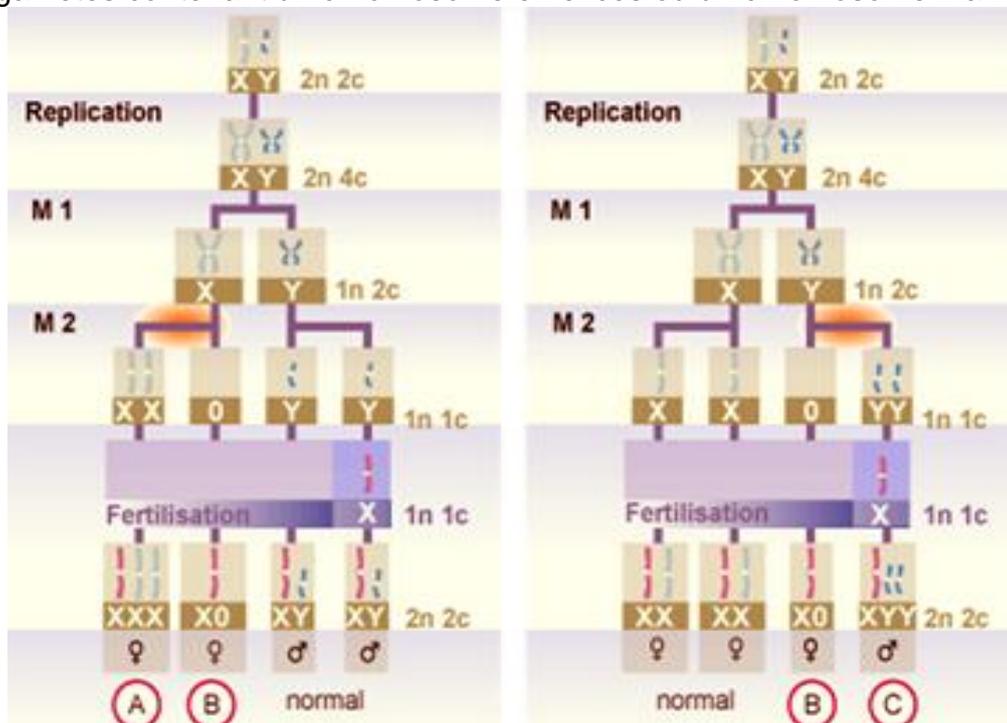


Fig. 10.23. Non-disjunction au cours de la **méiose I (orange)** peut être à l'origine de la trisomie/monosomie des chromosomes sexuels

L'ovogenèse

L'ovogenèse a lieu dans les ovaires. Elle débute pendant la vie embryonnaire de la femme et par la multiplication par mitoses des cellules souches ou ovogonies. Ces cellules accumulent des réserves et deviennent des ovocytes I. A la naissance, les ovaires contiennent quelques 400 000 ovocytes diploïdes entourés chacun de cellules folliculaires. Une grande partie de ce stock dégénère au cours de la vie.

Ovogenèse et méiose

Dès la vie fœtale, les ovocytes entrent en prophase de première division de la méiose mais ce phénomène s'arrête et se bloque pour un bon nombre d'années. Il ne reprendra que bien plus tard, quelques heures seulement avant l'ovulation ou ponte ovulaire (qui ne débute qu'à la puberté). La première division de la méiose se termine alors et donne naissance à un ovocyte II (cellule haploïde) et à un globule polaire destiné à dégénérer.

La deuxième division méiotique débute alors et reste bloquée en métaphase. La deuxième division ne se terminera que si l'ovocyte est fécondé par un spermatozoïde. En effet la pénétration de celui-ci déclenche la reprise de la méiose et donc l'expulsion d'un second globule polaire et donc la poursuite de la méiose.

La diacinèse est une phase de repos inexistante ou très brève dans la spermatogenèse, mais de longue durée dans l'ovogenèse, et comportant une réapparition de l'activité du nucléole, qui cessera à la métaphase 1. L'ovocyte 1 de mammifère connaît en effet une longue pause entre le début de la première division de méiose, qui commence dans l'espèce humaine au troisième mois de la vie embryonnaire pour se bloquer en métaphase, et l'ovulation, qui ne peut avoir lieu qu'à partir de la puberté. Ce n'est qu'avec l'entrée d'un spermatozoïde dans l'ovule (en réalité au stade ovocyte 2 haploïde) que prend place la seconde division de méiose.

Des quatre ovotides naissant des deux divisions de méiose d'un ovocyte 1, trois sont petits et dégèrent: ce sont les globules polaires. Le quatrième, beaucoup plus gros est l'ovule.

Contrairement à ce qui se passe chez l'homme, la multiplication des cellules souches que sont les o(v)ogonies est définitivement terminée alors que la petite fille est encore dans l'utérus maternel. Toutes les o(v)ogonies sont devenues des ovocytes 1 à la naissance du bébé. La maturation des cellules germinales commence à la puberté et s'arrête à la ménopause.

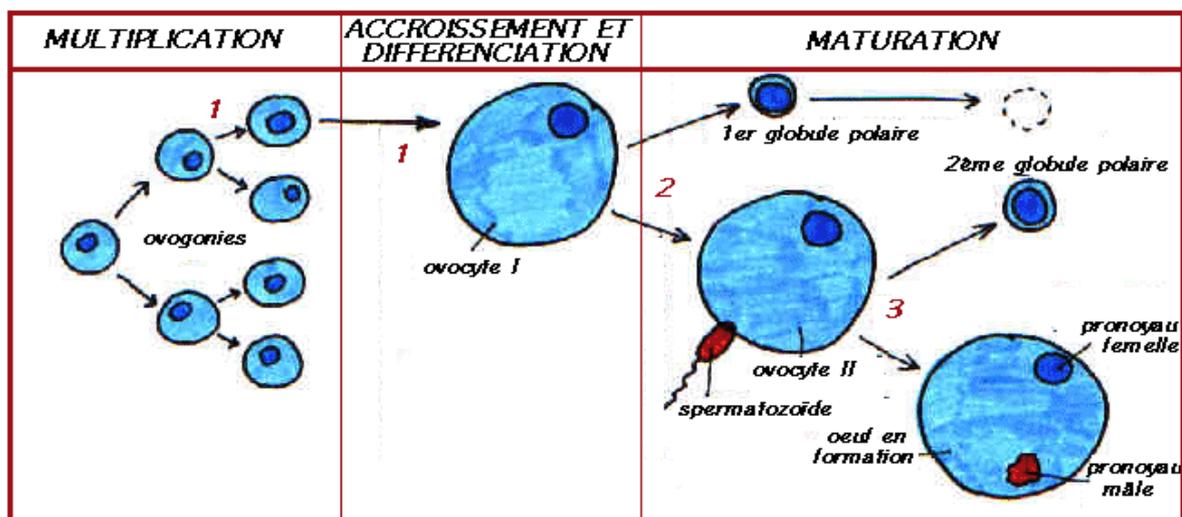


Fig.10.24. L'ovogenèse

Travaux pratiques nr. 11.

ASPECTS CYTOGÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DU CANCER

Le cancer est une maladie génétique dans laquelle diverses anomalies chromosomiques ou mutations génétiques peuvent être détectées. La prédisposition héréditaire et les cancérogènes ont chacun leur contribution. Les cellules ne sont pas également sensibles à l'action des facteurs mutagènes, les plus touchées étant celles à indice mitotique élevé.

11.1. Anomalies chromosomiques rencontrées dans les processus malignes

Les anomalies chromosomiques numériques et les aneuploïdies sont fréquentes et sont dues, dans la grande majorité des cas, à une disjonction mitotique. Les situations suivantes peuvent se produire:

- **Pseudodiploïdie** = bien que le nombre de chromosomes soit de $2n$, le caryotype n'est pas normal, car il y a des monosomes totaux pour certains chromosomes, et pour d'autres trisomies totales;
- **Hyperdiploïdie** = le nombre de chromosomes est compris entre 46 et 50;
- Les **trisomies autosomiques** ($2n+1$) rencontrées dans les cellules malignes ne diminuent pas la viabilité mais, par les déséquilibres géniques qu'elles produisent, peuvent même conférer un avantage sélectif aux cellules porteuses;

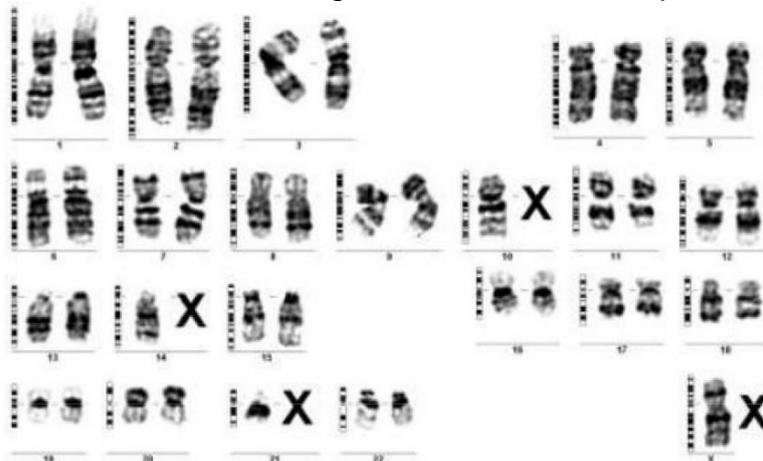


Fig.11.1. Caryotype avec hypodiploïdie, nombre modal de chromosomes 42 dans un cas de leucémie lymphoblastique aiguë (Collection Dr Cristina Gug)

- **Hypodiploïdie** = le nombre de chromosomes est inférieur à $2n$;
- Les **monosomies autosomiques** ($2n-1$) dans les cellules malignes ne semblent pas affecter les fonctions vitales;
- **Polyplôïdie** = le nombre de chromosomes est un multiple de n ($3n$, $4n$). Ce phénomène est possible en raison de l'endomitose, c'est-à-dire d'une mitose sans cytokinèse. Le blocage total de la mitose sous l'influence de mutagènes conduit à un état polyplôïde.

Ce phénomène est possible en raison de l'endomitose, c'est-à-dire d'une mitose sans cytokinèse. Blocage total de la mitose sous l'influence d'agents les mutagènes conduisent à un état polyploïde.



Fig.11.2. Caryotype avec polyploïdie et marqueur chromosomique (méthode SKY)

Anomalies chromosomiques structurales considérées comme évocatrices de cellules cancéreuses:

- *fragments acentriques;*
- *chromosomes dicentriques (ont 2 centromères)*
- *chromosomes en anneau*

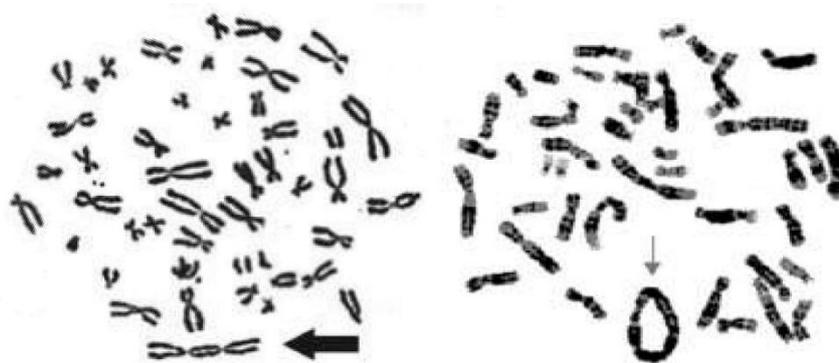


Fig. 11.3. Chromosome dicentrique. (gauche); *chromosomes en anneau* géant (droite).

- *chromosomes marqueurs;* ils ont une forme et une taille spéciales et se trouvent généralement en plus d'un nombre chromosomique normal et sont donc appelés chromosomes surnuméraires. Bien qu'à première vue, cela semble être une anomalie numérique, le chromosome marqueur est un réarrangement structurel.
- *les chromosomes minuscules (doubles minutes)* sont de petits fragments d'ADN extrachromosomique observés qui sont des manifestations d'amplification génique au cours du développement de la tumeur qui donnent aux cellules un avantage sélectif de croissance et de survie pour les cellules tumorales.
- *régions de couleur homogène,* sont des manifestations d'amplification génique



Fig. 11.4. Chromosomes minuscules (deux minutes) et régions de couleur homogène (ROC)

11.2. Aspects cytogénétiques et moléculaires des leucémies

Dans toutes les leucémies aiguës ou chroniques ainsi que dans les syndromes myélo-dysplasiques, des modifications chromosomiques se produisent en corrélation avec le pronostic de la maladie. Par exemple, j'ai choisi deux situations.

11.2.1. Leucémie myéloïde chronique (LMC)

La LMC est une forme de leucémie caractérisée par une augmentation des cellules précurseurs myéloïdes dans la moelle hématogène et leur accumulation dans le sang.

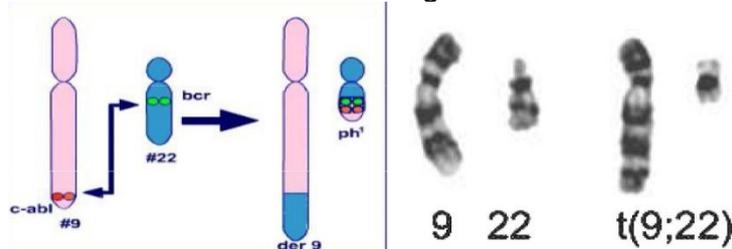


Fig.11.5. Schéma de formation de translocation $t(9;22)(q34; q11)$ résultant en un chromosome Ph1 (à gauche) et un caryotype partiel (à droite)

La LMC est un type de maladie myéloproliférative associée à une translocation caractéristique $t(9,22)(q34;q11)$ aboutissant au chromosome Ph1, le marqueur cytogénétique de la maladie. L'oncogène **abl** sur le chromosome 9 est transloqué vers le chromosome 22 dans la région **bcr** et un nouveau gène hybride **bcr/abl** est formé (Fig. 11.5) avec un rôle dans la leucémogénèse.

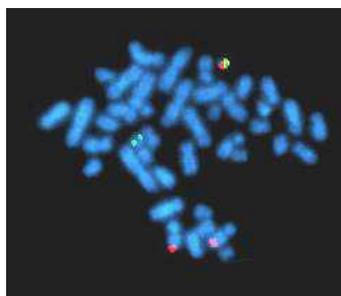


Fig. 11.6. Gène de fusion Bcr / abl (méthode FISH)

L'identification et la détection quantitative par la méthode PCR des produits géniques de fusion BCR-ABL1 sont utiles dans le diagnostic et la surveillance du traitement chez les patients atteints de leucémie granulocytaire chronique.

Nous décrivons 3 phases cliniques caractérisées par des changements chromosomiques fonctionnalités:

- phase chronique: la translocation caractéristique t (9;22)(q34; q11) et apparaît Chromosome Ph1, un changement considéré comme pathognomonique pour Leucémie myéloïde chronique (Fig.)
- phase accélérée: des modifications chromosomiques supplémentaires se produisent: duplication Ph1 (Ph1, Ph1), trisomie 8 (+8), isochromosome du bras long de chromosome 17, respectivement i (17q), trisomie 19.



Fig. 11.7. Isochromosome i(17q)

- phase aiguë (leucémie blastique), chez la plupart des patients il existe une instabilité génomique traduite cytogénétiquement par l'existence de divers clones cellulaires présentant diverses anomalies chromosomiques, notamment par aneuploïdie ou caryotypes complexes.

11.2.2. Leucémie myéloblastique aiguë (LMA)

Une prolifération néoplasique se produit qui provoque une croissance excessive de myéloblastes (cellules myéloïdes immatures). Dans les leucémies de novo, des translocations équilibrées sont identifiées, et dans les leucémies secondaires ou post-thérapeutiques, notamment des délétions ou des monosomies 5 (-5) ou 7 (-7) apparaissent.

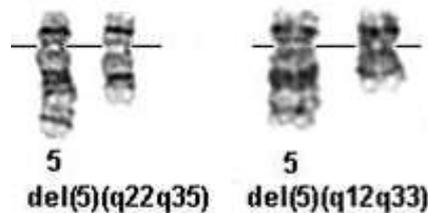


Fig. 11.8. Délétion du bras long du chromosome 5 (bandes GTG)

Les modifications cytogénétiques donnent des indications sur le pronostic comme suit:

- aspects cytogénétiques favorables inv (16);

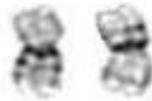


Fig. 11.9. Inversion chromosomique 16 (coloration par bandes GTG)

- aspects cytogénétiques intermédiaires t (15; 17);

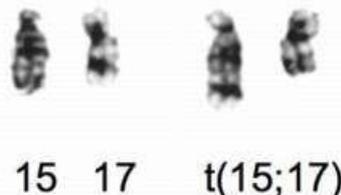


Fig.11.10. Translocation t(15; 17) (bandes GTG)

- aspects cytogénétiques défavorables -7, -5, de 7q, +8, t (9; 22).

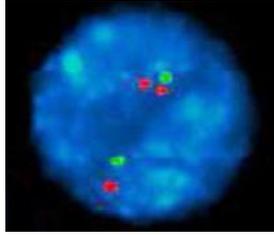


Fig. 11.11. Trisomie 8 mise en évidence à l'aide de la sonde colorée en rouge; en vert, une sonde pour le chromosome 7 (méthode FISH interphase).

11.3. Aspects cytogénétiques et moléculaires des tumeurs malignes

Le cancer est une maladie clonale, à son origine une seule cellule devenue anormale par l'acquisition de mutations somatiques.

11.3.1. Rétinoblastome

Dans la tumeur blastique de la rétine, des changements structuraux sont observés sur le chromosome 13 (microdélétion 13q14). L'état d'hétérozygotie (première étape de l'évolution du cancer) est obtenu par inactivation préférentielle de l'allèle paternel. Le développement tumoral est conditionné par la perte ou l'inactivation de l'anti-oncogène RB1 en homozygotie.

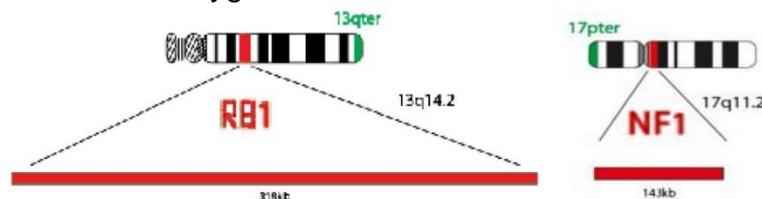


Fig.11.12. Localisation de RB1 à 13q14.2 (à gauche) et du gène NF1 sur le chromosome 17q11.2 (à gauche)

11.3.2. Neurofibromatose de type 1 (NF1) Von Recklinghausen

La neurofibromatose de type 1 est une maladie qui se manifeste par des taches de café au lait sur la peau et des tumeurs le long des nerfs appelées neurofibromes.



Fig.11.13. Taches de café au lait sur la peau et neurofibromes dans la neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose de type 1 est déterminée par la mutation du gène NF-1 (17q11.2) qui code pour la protéine neurofibrine avec un rôle régulateur négatif de l'oncogène Ras. S'il existe une mutation pathogène dans NF1, le risque de développer une néoplasie est de 5%.

11.3.3. Cancer du poumon

Le processus d'initiation est donné par l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes de suppression tumorale.

On pense que les protooncogènes se transforment en oncogènes lorsque le corps est exposé à certains cancérigènes. La mutation du proto-oncogène K-ras est responsable de 30% des cancers à petites cellules.

Les délétions chromosomiques telles que: 3p-, 5q-, 13q- et 17p- provoquent la perte d'hétérozygotie, ce qui provoque l'inactivation des gènes de suppression tumorale situés dans ces régions. Le changement moléculaire le plus courant est la perte du gène p53 situé à 17p.

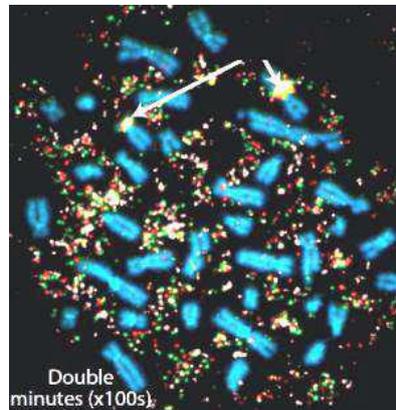


Fig. 11.14. Anomalies cytogénétiques dans l'évolution du cancer du poumon: régions de couleur homogène (près de la flèche) et minutes doubles

11.3.4. Cancer du sein

Les défauts héréditaires des gènes de réparation de l'ADN, des gènes BRCA1, BRCA2 et p53 sont à l'origine de 95% des cancers du sein et les 5% restants sont attribués à des syndromes héréditaires. Les personnes présentant des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 ont un risque accru de cancer du sein et de l'ovaire.

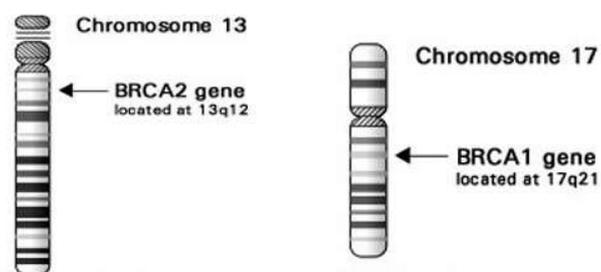


Fig.11.15. Gène BRCA1 localisé sur 17q21 et gène BRCA2 localisé sur 13q12 avec un rôle étiologique dans le cancer du sein héréditaire

Les tests génétiques BRCA1 / BRCA2 sont utiles:

- à des fins de diagnostic chez les personnes présentant une suspicion clinique de cancer héréditaire du sein / de l'ovaire
- tests de prédisposition chez les parents à haut risque; si le résultat est positif, des conseils adéquats sur le dépistage et les options de prophylaxie primaire sont nécessaires.

Plus de 1 200 mutations du gène BRCA1 et 900 mutations du gène BRCA2 ont été identifiées.

Les tests moléculaires impliquent le séquençage de tous les exons géniques.

Les caryotypes obtenus à partir de tumeurs mammaires mettent en évidence la multiclonalité, suggérant l'existence d'un degré élevé d'hétérogénéité intratumorale.

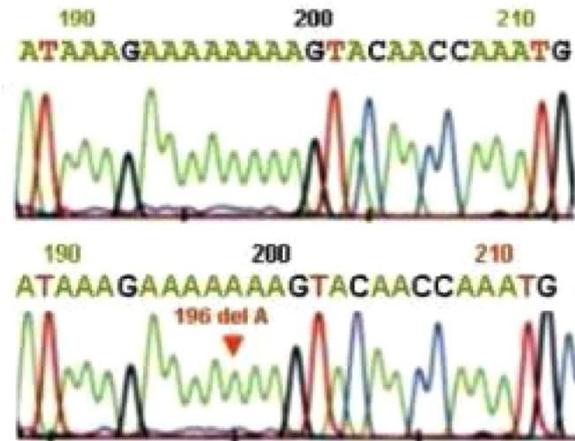


Fig. 11.16. Ci-dessus: la séquence normale du gène BRCA1; En bas: la mutation en position 196 par délétion d'une adénine provoque la formation d'un codon STOP.

11.3.5. Cancer des ovaires

Une prédisposition génétique a été démontrée dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire et représente 5 à 10%. Il existe 3 syndromes héréditaires associés à carcinome ovarien, tous à transmission autosomique dominante:

1. syndrome du cancer héréditaire du sein et des ovaires;
2. cancer colorectal héréditaire sans polypose (cancer de la famille Lynch II);
3. syndrome spécifique du cancer de l'ovaire.

Cytogénétiquement, des aneuploïdes, des pseudo-triploïdes ont été identifiés, mais ils n'ont pas été réarrangements pathognomoniques identifiés. La mutation p53 est fréquemment identifiée.

11.3.6. Cancer du colon

Le cancer colorectal survient dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Elle peut être héréditaire ou causée par des mutations somatiques dans:

- les gènes impliqués dans la réplication de l'ADN
- les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN
- les gènes de suppression tumorale: APC, K-Ras, p53 qui entraînent une division cellulaire incontrôlée

Les gènes associés à un risque élevé de cancer du côlon sont rares.

Seuls 10% des cancers du côlon sont liés à des gènes héréditaires.

Les cancers colorectaux héréditaires sont classés dans les types suivants:

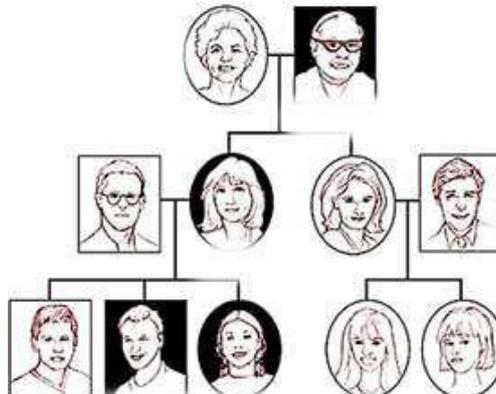


Fig. 11.18. L'arbre généalogique d'une famille atteinte d'un cancer colorectal héréditaire

11.3.6.1. Polypose adénomateuse familiale (FAP): caractérisée par le développement de centaines de polypes dus à des mutations du gène APC. Chaque polype peut conduire au cancer. Les personnes atteintes de polypose ont 90% de chances de développer un cancer du côlon.

Les tests moléculaires consistent à séquencer tous les exons APC et constituent la méthode la plus précise.

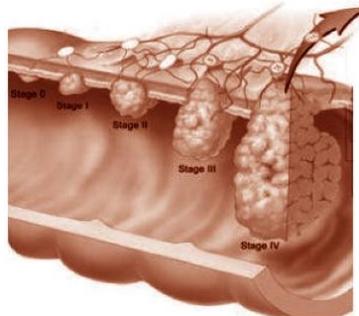


Fig. 11.17. Schéma du développement d'un polype au stade du cancer métastatique

La plupart sont des mutations non-sens ou décalées.

Les tests génétiques APC sont utiles pour:

- diagnostic précoce des membres de la famille à haut risque
- diagnostic de FAP chez les patients présentant des signes cliniques précoces (<100 polypes).
- diagnostic prénatal.

11.3.6. 2. Cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch causé par une mutation dans un gène de réparation de l'ADN (mismatch repair- MMR).

Les tests HNPCC sont effectués par séquençage d'ADN et sont utiles pour:

- les personnes avec suspicion clinique pour préciser le diagnostic;
- tests de prédisposition chez les membres asymptomatiques de la famille;
- dépistage prénatal.

11.3.7. Néoplasie endocrinienne multiple type 1 - MEN1

Le syndrome MEN1 comprend une combinaison de tumeurs endocrines et non endocrines transmis autosomique dominant.

La présence de 2 tumeurs endocrines (parathyroïde, hypophyse ou gastro-entéro-pancréatique) est le critère de diagnostic clinique. Le syndrome MEN1 a des triades cardinales composées de 3 P: Parathyroïde + Pancréas + Pituitary adenoma (hypophyse).

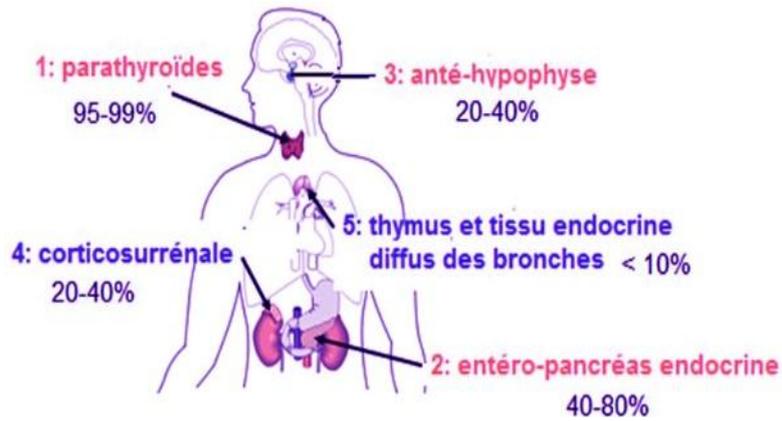


Fig. 11.19. Combinaison de tumeurs endocrines qui survient dans le syndrome MEN1

Le gène MEN1 (11q13) est constitué de 10 exons et plus de 400 mutations sont décrites. La meilleure méthode d'analyse est le séquençage des gènes.

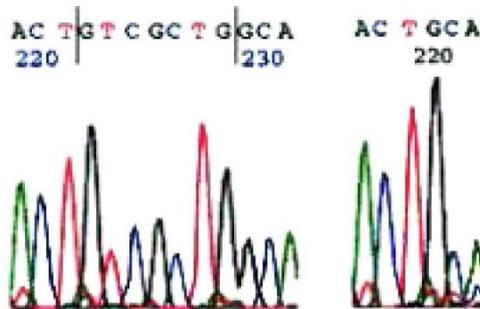


Fig. 11.20. La séquence normale du gène MEN1 avec le profil de l'exon 10 (à gauche), et avec la partie de délétion entre les lignes verticales (à droite). La délétion comprend 7 bases azotées (GTCGCTG) dans l'exon 10.

Travaux pratiques nr. 12

DIAGNOSTIC PRÉNATAL DES MALADIES GÉNÉTIQUES

Le diagnostic prénatal a pour but de diagnostiquer les maladies incurables ou à haut risque d'invalidité et éventuellement de permettre au couple de demander une interruption médicale de grossesse, dans le respect des conditions légales.

Le rôle du généticien est d'accompagner le couple tout au long du processus. Les informations fournies lors d'une consultation de conseil génétique doivent être aussi complètes que possible. Par la suite, le patient signe un formulaire de consentement pour un diagnostic prénatal chromosomique ou moléculaire. Le résultat de l'analyse sera envoyé au patient par le médecin. Dans tous les cas, il doit être possible de proposer un accompagnement psychologique spécialisé.

L'avantage du diagnostic prénatal

Dans la plupart des pays européens, l'intérêt pour la conception de produits de qualité s'est accru et les soins prénatals et périnatals se sont considérablement améliorés.

Dans ce contexte, le dépistage et le diagnostic prénatals font désormais partie des services médicaux les plus demandés. Les couples à haut risque génétique ou malformatif ont une option reproductive: ils pourront concevoir une grossesse en sachant que la présence ou l'absence de la maladie chez le fœtus peut être confirmée par des tests.

Dans plus de 95% des cas, les résultats du diagnostic prénatal sont normaux et, par conséquent, la grande majorité des couples / femmes enceintes à risque seront assurés que leur futur enfant sera en bonne santé. Dans une petite proportion des cas, le fœtus sera gravement atteint et en l'absence de thérapie prénatale efficace, les couples choisiront la solution à l'avortement. Cela entraînera une diminution de l'incidence des maladies génétiques graves dans la population.

INDICATIONS DU DIAGNOSTIC PRÉNATAL

Indications du caryotype fœtal

Les anomalies chromosomiques surviennent le plus souvent accidentellement. Le diagnostic chromosomique prénatal se fait surtout chez les couples sans antécédents particuliers, mais pour lesquels les méthodes classiques de détection (échographie, marqueurs sériques maternels) ont défini un risque élevé d'anomalies chromosomiques.

Les principales indications sont:

- Indicateurs d'appel échographiques. Il existe des malformations fœtales majeures et des marqueurs échographiques qui devraient être systématiquement recherchés par les médecins qui évaluent la morphologie fœtale.
- Grossesse avec risque biochimique fœtal égal ou supérieur à 1/250. Il est évalué sur la base d'une combinaison d'âge maternel, de marqueurs sériques maternels au premier trimestre (double test) ou au deuxième trimestre (triple test, quadruple test) et de l'épaisseur du pli cervical mesurée à la semaine 11-13 (moyenne de la semaine 12).
- Âge maternel supérieur ou égal à 35 ans; il ne s'agit plus d'une indication systématique mais reste une indication exceptionnelle dans les situations où le patient ne pourrait pas bénéficier d'autres méthodes de détection.
- Anomalies chromosomiques parentales. La présence chez l'un des parents d'un réarrangement chromosomique (translocation, inversion) justifiera dans tous les cas la proposition d'un diagnostic prénatal. Ses modalités seront discutées avec le patient en fonction des risques liés au réarrangement chromosomique et au prélèvement.
- Antécédents pathologiques d'un couple ayant eu des grossesses avec un caryotype anormal. Lorsque le caryotype des deux parents est normal, le risque de récurrence est celui de la population générale, plus précisément, il est donné par le risque d'âge maternel. L'obtention du caryotype fœtal permet cependant à un couple ayant déjà vécu une situation difficile de se calmer.
- Diagnostic sexuel des maladies liées au chromosome X. Cette technique de biologie moléculaire recherche la présence de la séquence SRY dans le sang maternel. Leur présence signifie la présence d'un fœtus masculin et conduit à un diagnostic prénatal génétiquement invasif. Leur absence prouve que le fœtus est une femme et que les investigations génétiques ne sont plus effectuées.
- L'anxiété parentale extrême est une indication secondaire, mais il a été observé qu'une issue normale permet aux parents d'être rassurés.

1. MÉTHODES DE DIAGNOSTIC ANTÉNATAL NON INVASIF

1.1. Échographie fœtale

L'échographie est la méthode la plus couramment utilisée pour visualiser le fœtus, car elle est sans danger pour la mère et le fœtus. Il est utilisé comme méthode de diagnostic prénatal depuis 1972, le but initial étant de détecter l'anencéphalie. Une échographie est effectuée systématiquement chez toutes les femmes enceintes pour évaluer la morphologie et la croissance du fœtus.

L'échographie fœtale permet d'évaluer l'âge et l'évolution de la grossesse, la localisation du placenta, la présence de l'éventuelle grossesse gémellaire, la présence d'éventuelles malformations congénitales (anomalies du tube neural, anomalies des membres, anomalies cardiaques).

L'échographie fœtale a l'avantage d'être non invasive et totalement inoffensive pour le fœtus et la mère. Elle est réalisée à partir de la 8ème semaine de gestation, avec des réévaluations périodiques des paramètres fœtaux et placentaires dans les 12 et 20ème semaines de grossesse.



Fig. 12.1. Translucidité nucale évaluée au premier trimestre

Le premier trimestre de la grossesse est la période de dépistage idéale des aneuploïdies principalement en raison de la mesure de l'épaisseur du pli cervical appelé et de la translucidité nucale (TN) (Fig.12.1) qui est une composante importante du test de dépistage combiné du premier trimestre. La mesure du TN est effectuée dans la semaine 11-13 + 6 jours et est utile pour déterminer le risque d'anomalie cardiaque congénitale ainsi que d'un certain nombre de syndromes génétiques et non génétiques. La mesure du TN est considérée comme une excellente méthode de dépistage des aneuploïdies foétales. L'incorporation de TN dans le test biochimique combiné et / ou d'autres marqueurs peut entraîner un taux de détection du syndrome de Down de 95% avec un taux de faux positifs de 5%.

Malformations foétales échographie visible au premier trimestre

- 2 vaisseaux dans le cordon ombilical (Doppler couleur)
- Holoprosencefalia
- Anencéphalie (défauts de l'ossification de la voûte crânienne) (Fig. 12.2)
- méningocèle / encéphalocèle
- Spina bifida ouvert (crâne en forme de citron et cervelet de type banane en coupe)
- Hydrocéphalie (hypertrophie des ventricules)
- Omphalocèle (si elle ne contient que de l'intestin)
- Gastroschisis (anomalie de la paroi abdominale)
- Agénésie rénale bilatérale
- Variante infantile polykystique du rein ou
- hydronéphrose
- oligohydramnios.

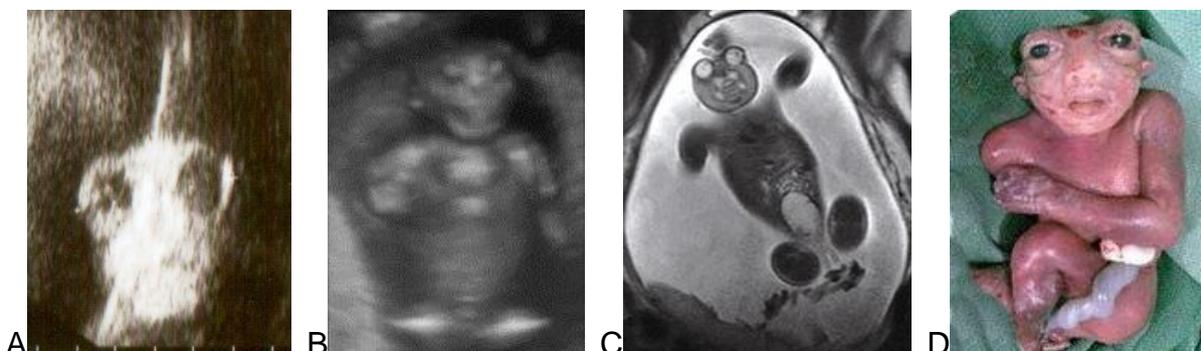


Fig. 12.2. Anencéphalie foétale: (A) échographie 2D, (B) échographie 3D, (C) IRM foétale, (D) foetus avorté

Marqueurs échographiques importants

- Retard de croissance fœtale
- Translucidité nucléaire
- Hygroma kystique
- Os nasal absent ou hypoplasique
- Augmentation de l'angle fronto-maxillo-facial
- Valve tricuspide (Doppler)
- Canal veineux (Doppler)
- Taux de battements fœtaux
- Grand placenta

Deuxième trimestre de grossesse: une évaluation de routine de l'anatomie fœtale entre 15 et 20 semaines de grossesse est une composante importante des soins prénatals. «L'échographie génétique» est un terme évocateur pour l'évaluation du risque d'aneuploïdie au deuxième trimestre de la grossesse. La capacité du dépistage échographique à détecter des anomalies génétiques implique l'identification de malformations majeures associées à des aneuploïdies ou marqueurs dits bénins, évocateurs mais moins spécifiques. Dans de nombreux cas, les marqueurs légers disparaissent au troisième trimestre. Le risque de trisomie 21 est directement proportionnel au nombre de marqueurs détectés.

Anomalies structurelles observables par échographie au cours du deuxième trimestre de la grossesse

- Dolicocéphalie, brachycéphalie, hydrocéphalie
- Holoprosencéphalie, méningomyélocel
- Agénésie du corps calleux
- Fente labiale et palatine
- Hygroma kystique et hydrops
- Anomalies cardiaques
- Atrésie duodénale, Omphalocèle
- Jambe congénitale tordue (en piolet)
- Aplasie du rayon
- Doigts qui se chevauchent, polydactylie
- Kyste du cordon ombilical.

1.2. Screening biochimique

1.2.1. Screening du premier trimestre appelé Double test

Sont déterminés 2 marqueurs biochimiques:

- Protéine plasmatique A associée à la grossesse (PAPP-A)
- sous-unité β libre de HGC

S'il y a une diminution de la concentration (PAPP-A) et une augmentation des taux sériques de β HGC, il y a un risque accru que le fœtus ait une trisomie 21.

Il est effectué dans la semaine 10-12 et a une précision d'environ 80%.

Cependant, les résultats peuvent être considérablement améliorés par l'ajout de marqueurs ultrasonores (par exemple, translucidité nucale ≥ 3 mm). C'est ce qu'on appelle le test combiné.

1.2.2. Screening prénatal des anomalies du tube neural (ATN) au deuxième trimestre

La détermination de l'alpha foetoprotéine (AFP), à 16 semaines d'âge gestationnel, a des valeurs significativement plus élevées chez les femmes enceintes dont le fœtus a des MNT ouvertes (spina bifida, anencéphalie). Toute anomalie fœtale, qui permet au sérum fœtal de s'infiltrer dans le liquide amniotique, entraînera une augmentation significative de l'AFP dans le liquide amniotique puis dans le sérum maternel.

La cause principale de ce phénomène est représentée par des défauts ouverts du tube neural, suivis par des défauts de la paroi abdominale.

Un seuil arbitraire a été introduit - correspondant au multiple de 2,5 de la médiane - au-dessus duquel l'existence d'un DTN peut être affirmée. Environ 1-2% des femmes enceintes auront des taux élevés d'AFP dans le sang de leur mère au-dessus du seuil de 2,5 MoM et subiront des tests de diagnostic: échographie et amniocentèse pour déterminer le niveau d'AFP et d'acétylcholinestérase dans le liquide amniotique. Le dosage d'AFP dans le liquide amniotique permet de confirmer le diagnostic d'ATN à des valeurs supérieures à 3,5 MoM.

La détermination de l'AFP est largement utilisée et, associée à une supplémentation periconceptionnelle en acide folique, a conduit à une diminution significative de l'incidence des ATN dans de nombreux pays.

1.2.3. Screening du deuxième trimestre appelé le triple test

Sont déterminés 3 marqueurs biochimiques:

- alpha-foetoprotéine (AFP)
- gonadotrophine chorionique humaine (β HCG)
- estriol non conjugué (uE3)

On a constaté que la grossesse avec le syndrome de Down était associée à une diminution de l'AFP, une augmentation de la HCG sérique et une diminution de l'uE3 dans le sérum maternel. Cela se fait entre 16 et 20 semaines de grossesse. L'augmentation de l'AFP montre également un risque d'ATN. Dans le cas du syndrome d'Edwards, les 3 valeurs sériques sont diminuées. A une précision d'environ 75%.

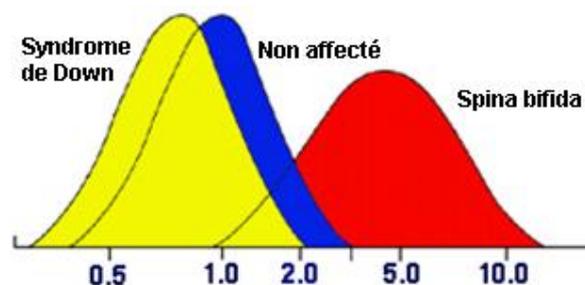


Fig. 12.3. Les valeurs médianes pour l'âge gestationnel; le résultat est exprimé en MoM (*Multiply of Median*)

Les valeurs obtenues par des mesures de 3 marqueurs sériques sont interprétés en fonction des valeurs médianes pour l'âge gestationnel, et le résultat est exprimé comme MoM (*Multiply of Median*) et rapporté à l'intervalle accepté pour risque de 0,4 à 2,5 MoM.

Le test est indicatif. La plupart des femmes enceintes qui reçoivent un résultat positif de la trisomie 21 (syndrome de Down), la trisomie 18 (syndrome d'Edwards) et les anomalies du tube neural peuvent avoir un enfant normal. Par conséquent, un résultat positif nécessite d'autres examens de diagnostic (amniocentèse).

1.2.4. Screening du deuxième trimestre appelé Quadruple test

Sont déterminés 4 marqueurs biochimiques:

- alpha-foetoprotéine (AFP)
- gonadotrophine chorionique humaine (β HCG)
- estriol non conjugué (uE3)
- inhibine A

Chez les femmes enceintes atteintes du syndrome de Down, il est associé à une diminution de l'AFP, une augmentation de la β HCG sérique, une diminution de l'uE3 et une augmentation de l'inhibine A. Ce test permet d'augmenter la sensibilité des trisomies 13, 18 et 21.

Cela se fait dans la semaine 16-18. 80% des grossesses affectées sont détectées.

Dans tous ces tests (test Double, Triple, Quadruple), le traitement informatisé des valeurs biochimiques liées aux facteurs mentionnés est effectué et l'ampleur du risque est établie. Dans le syndrome de Down, par exemple, le seuil est de 1/250 (correspondant au risque de trisomie 21 chez les femmes enceintes de 35 ans, mais inférieur au risque d'avortement après amniocentèse).

1.2.5. Test sec

Il est fabriqué à partir de sang maternel séché. Il peut être réalisé au premier trimestre (vérifier les mêmes marqueurs sériques que dans le test Double) ou au deuxième trimestre (vérifier les mêmes marqueurs sériques que dans le test Triple) et donc le risque de maladies chromosomiques et de MNT est calculé.

Sa spécificité consiste en des tests complémentaires pour 2 maladies monogéniques:

- fibrose kystique (mutation $\Delta F508$),
- surdité non syndromique (mutation 35delG).

1.3. Isolement des cellules fœtales du sang maternel

La présence de cellules fœtales dans la circulation sanguine maternelle peut fournir des informations importantes sur le génotype fœtal. L'isolement des érythroblastes fœtaux (Fig. 12.4) du sang maternel est difficile en raison de leur faible fréquence. Cependant, ces érythrocytes nucléés fœtaux présentent l'inconvénient d'être confondus avec des éléments similaires d'origine maternelle. Les cellules fœtales isolées sont utilisées dans le diagnostic prénatal en utilisant diverses techniques pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques et les mutations génétiques. Le principal avantage est qu'il n'est pas invasif.

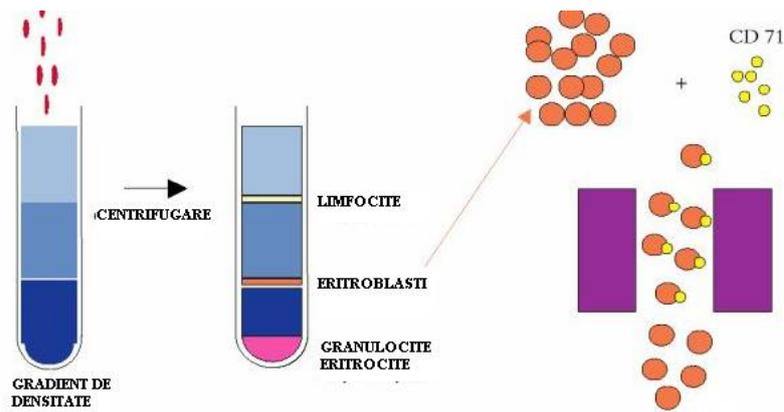


Fig. 12.4. Isolement des cellules fœtales du sang maternel.

1.4. Isolement de l'ADN fœtal libre circulant du sang maternel

Il s'agit du test de diagnostic prénatal le plus récent au monde. Il est basé sur l'ADN fœtal libre circulant à partir du sang maternel de l'interface mère-fœtus (Fig. 12.5). On analyse les chromosomes 21, 18, 13, X et Y et un nombre de 6 microdélétions. Plus de 20 000 SNP (polymorphisme nucléotidique unique) sont étudiés par séquençage et le nombre de chromosomes fœtaux peuvent être déterminés à l'aide d'un algorithme de bioinformatique. L'analyse peut être effectuée à partir de la semaine 10 de la grossesse. La durée de l'analyse est de 7-10 jours. Les avantages de la méthode sont une précision de 99%, un faible coût relatif et le fait qu'il s'agit d'un test non invasif. Le principal inconvénient concerne la technique laborieuse.

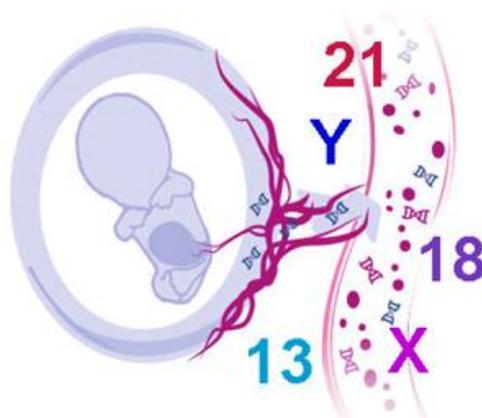


Fig. 12.5. Aneuploïdies détectables par le test prénatal non invasif.

Une étude de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel peut être proposée dans de rares situations telles que:

- spécification du groupe sanguin fœtal Rh
- aneuploïdies fœtales majeures
- identification des mutations d'origine paternelle /maternelle
- diagnostic précoce de la prééclampsie (la concentration d'ADN fœtal augmente de 5x);
- établir la paternité.

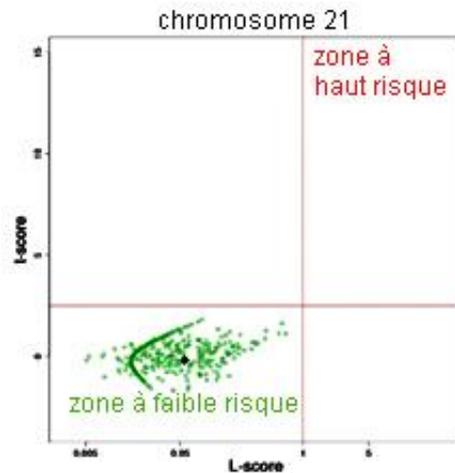


Fig. 12.6. Le diagramme montre le résultat de l'analyse qui montre un faible risque de trisomie 21.

2. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC PRÉNATAL

Pour chaque indication, le type de prélèvement dépend du risque chromosomique, de l'âge de la grossesse et du risque associé au prélèvement.

Il est conseillé d'effectuer une consultation génétique pour discuter des risques et des avantages du dépistage et du dépistage prénatal avant de procéder à une procédure invasive. En ce sens, les antécédents familiaux sont recherchés et le risque génétique d'avoir un fœtus atteint d'une maladie génétique est calculé. Une nouvelle discussion avec les parents est également nécessaire lorsque le résultat du test est connu.

2.1. Échantillonnage de trophoblastes ou de villosités choriales

Le prélèvement trophoblastique est le plus souvent réalisé entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée, ce qui nous permet d'avoir un résultat précoce pendant la grossesse. La ponction des villosités choriales se fait sous contrôle échographique, souvent transabdominale (Fig. 12.7.) ou moins souvent transcervicale. Environ 10 à 15 mg de tissu aspiré sont collectés dans une seringue.

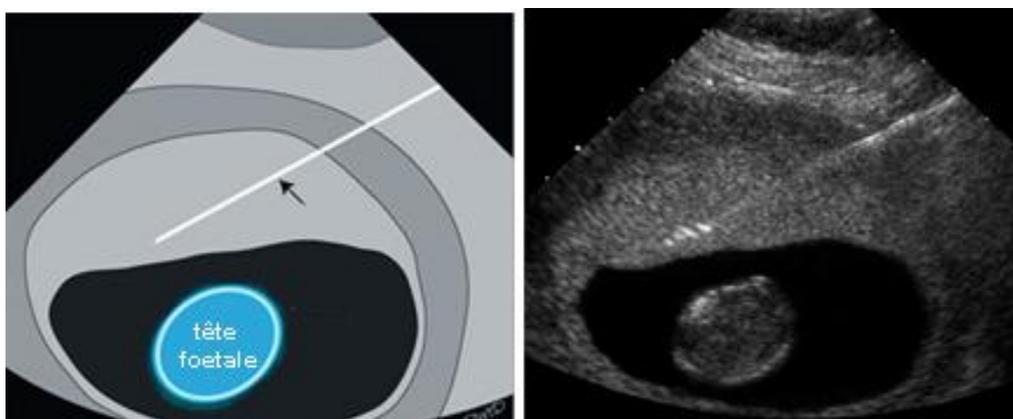


Fig. 12.7. La ponction des villosités choriales se fait sous guidage échographique.

Le caryotype est réalisé après la culture de cellules mésenchymateuses. (Fig. 12.8). Si un mosaïcisme est trouvé alors il est nécessaire de confirmer l'analyse chromosomique par un nouveau prélèvement de cellules foetales par amniocentèse.

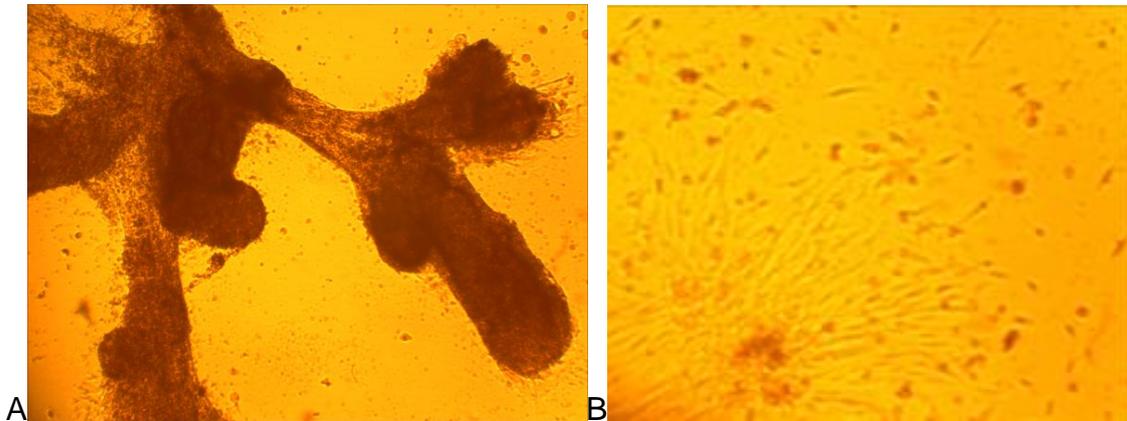


Fig. 12.8. (A) Les villosités chorales dans la culture et (B) Fibroblastes de culture obtenus à partir de cellules mésenchymateuses (Collection Dr Cristina Gug)

La culture cellulaire avec caryotype (Fig. 12.8) avec bandes après 18 jours est la méthode préférée car elle reflète plus précisément le caryotype de l'embryon.

Le mosaïcisme placentaire n'altère pas la capacité du placenta à fonctionner. C'est une issue très stressante pour les futurs parents. Il nécessite l'utilisation d'une méthode supplémentaire (amniocentèse, cordocentèse, biopsie des cellules cutanées) pour déterminer si le fœtus est en bonne santé.

Avantages de la méthode:

- les résultats sont obtenus plus rapidement
- diminue la période d'incertitude et de stress psychologique
- si l'interruption de grossesse est choisie, elle peut se faire à la fin du premier trimestre, par des méthodes plus simples.

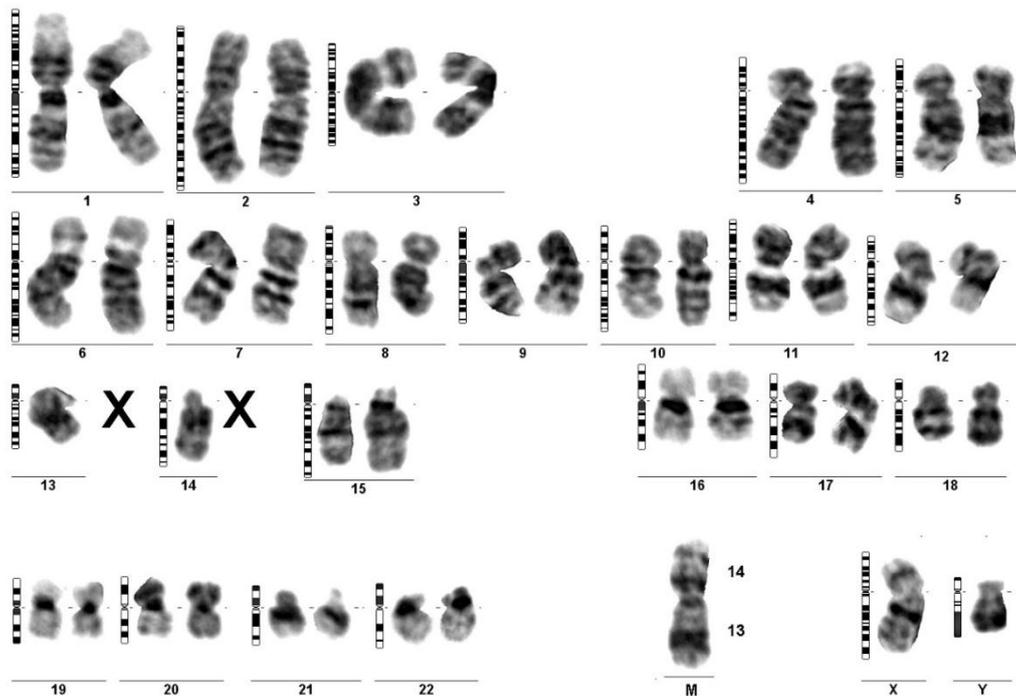


Fig. 12.9. Caryotype obtenu à partir de villosités chorales montrant une translocation trob (13;14) d'origine maternelle chez un fœtus normal (Collection Dr Cristina Gug)

Inconvénient de la technique:

- le risque de fausse couche est double par rapport à l'amniocentèse (1,5%),
- contamination par des cellules souches
- L'AFP ne peut pas être testé
- mosaïcisme placentaire, une situation courante qui conduit à de faux résultats et la nécessité de réaliser une amniocentèse à l'étape 2, pour un diagnostic définitif

Complications: 1 à 2% de risque de fausse couche (abdominale), d'infections, de saignements, d'anomalies des membres dues aux bourgeons embryonnaires. Les complications sont rares si le médecin pratiquant la ponction a suffisamment d'expérience.

Actuellement, une vérification des principales aneuploïdies (trisomie 13, 18, 21) peut être réalisée par la technique moléculaire QF-PCR (résultat en 2 jours) ou par la méthode interphase FISH (4 jours).

2.2. Amniocentèse ou prélèvement de liquide amniotique

L'échantillonnage de liquide amniotique est le plus couramment utilisé. Elle est réalisée à partir de 16 semaines d'aménorrhée et est possible jusqu'à la fin de la grossesse. L'amniocentèse tardive (dans la dernière partie de la grossesse) est rarement pratiquée uniquement pour:

- diagnostic de vaccination de type Rh
- tester la maturité des poumons fœtaux, en particulier dans les situations où une naissance prématurée est envisagée, pour des raisons médicales.
- à des fins thérapeutiques en cas de polyhydramnios.

Le risque de fausse couche est de 0,5-1%, en outre, des complications infectieuses, hémorragiques ou une iso-immunisation Rh peuvent survenir.

Dans tous les cas, l'amniocentèse doit être précédée d'une échographie minutieuse pour déterminer: le nombre de fœtus, la conformation et la viabilité du fœtus, l'âge gestationnel, la position placentaire, le volume approximatif de liquide amniotique et le site de ponction (selon le placenta et le fœtus). Sous échographie (fig. 12.10), le liquide amniotique (10-20 ml) est aspiré par voie transabdominale, plus précisément 1 ml / semaine de grossesse.

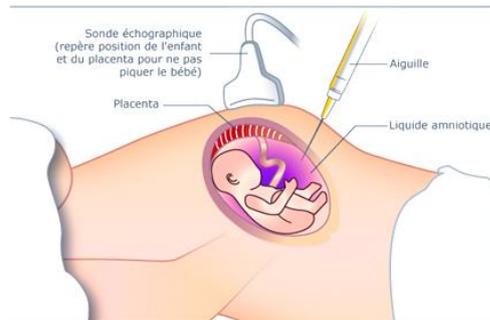


Fig. 12.10. Amniocentèse

Si le père est Rh positif et la future mère Rh négatif après amniocentèse, la femme enceinte doit recevoir une dose intramusculaire d'immunoglobuline anti-Rh pour éviter l'iso-immunisation Rh.

Tests réalisés à partir de liquide amniotique:

- Caryotype foetal: toutes les anomalies chromosomiques numériques et structurales peuvent être mises en évidence; nécessite une culture pendant 1-2 semaines
- PCR, FISH (de cellule à interface) pour un diagnostic rapide des anéoploïdes
- Dosage d'AFP: en cas de suspicion d'anomalies du tube neural;
- Dosage d'acétylcholinestérase (augmentation du taux d'anomalies du tube neural);
- Tests biochimiques: pour le diagnostic des maladies métaboliques;
- Tests génétiques moléculaires pour le diagnostic des maladies monogéniques (thalassémie, hémophilie A et B, phénylcétonurie, maladie de Duchenne, syndrome X-fragile, ostéogenèse imparfaite).

La réalisation du caryotype nécessite une étape de culture cellulaire (Fig. 12.11).



Fig.12.11. Fibroblastes dans la culture obtenus à partir de cellules amniotiques

Le caryotype (Fig. 12.12, 12.13) permet une étude morphologique globale du matériel héréditaire (anomalies du nombre et de la structure des chromosomes).

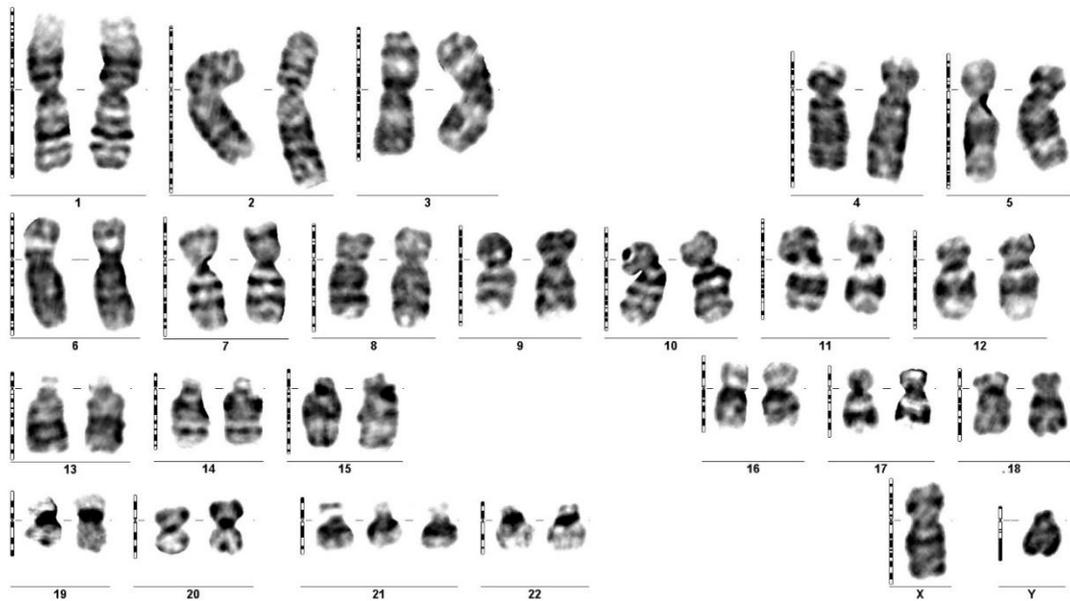


Fig. 12.12. Trisomie 21 libre (bande GTG) obtenue à partir d'une culture de cellules amniotiques (*Collection Dr Cristina Gug*)

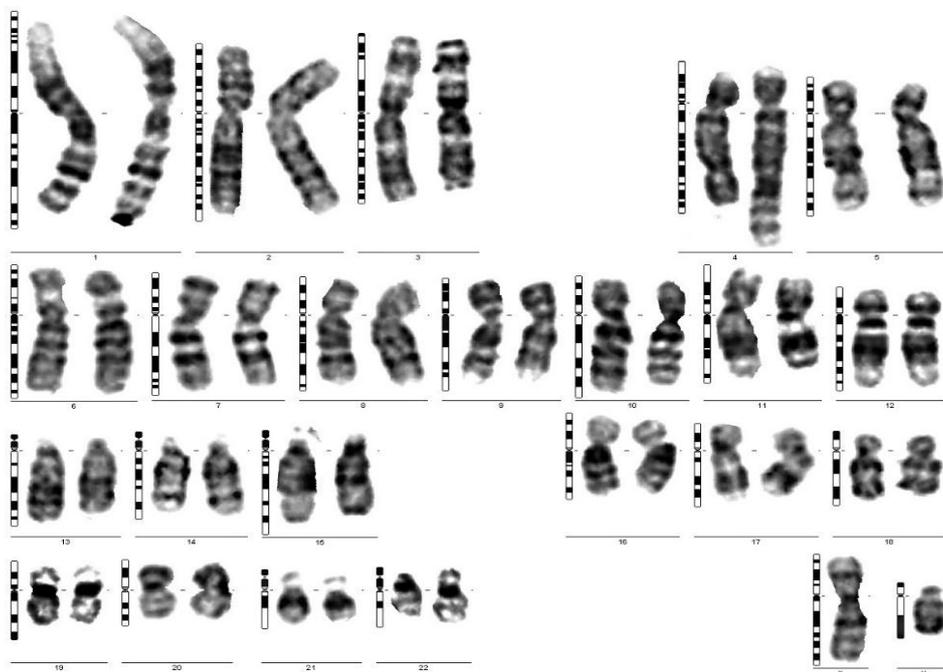


Fig. 12.13. Caryotype fœtal (bande GTG) obtenu à partir de cellules amniotiques montrant une duplication $\text{dup}(10)(\text{q}22.2\text{-ter})$ due à des translocations maternelles équilibrées (4;10) (*Collection Dr Cristina Gug*)

Dans les situations de risque élevé d'aneuploïdie (indicatifs d'appel échographiques), on peut également utiliser l'une des techniques rapides (QF-PCR ou FISH dans l'interphase) pour les chromosomes 13, 18, 21, X, Y.

2.3. Prélèvement de sang foetal ou cordocentèse

Elle est réalisée sous contrôle échographique (Fig. 12.14.), Est réalisée à partir de la 22ème semaine d'aménorrhée, présente un risque d'avortement de 2-3% et un risque important de morbidité. Pour ces raisons, il est moins utilisé que les techniques précédentes.

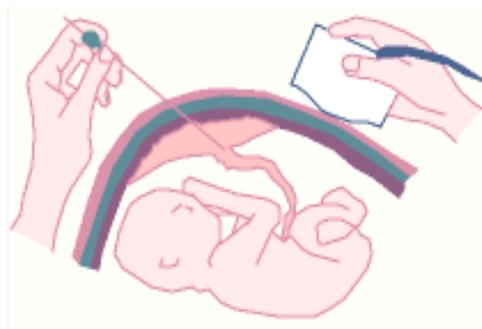


Fig. 12.14. Cordocentèse

Les principales indications sont:

- cas à haut risque découverts tardivement
- des situations exceptionnelles pour confirmer une anomalie rare trouvée dans le liquide amniotique, par exemple des mosaïques
- diagnostic des maladies hématologiques: hémoglobinopathies, hémophilie;
- diagnostic des infections fœtales;
- diagnostic d'hydrops fœtaux immunitaires ou non immuns.

Complications: saignements, infections, iso-immunisation Rh, avortement (3-5%), mort fœtale, naissance prématurée.

2.4. Tests rapides

2.4.1. Méthode FISH

FISH, grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes (fragments d'ADN spécifiquement marqués pour identifier certaines régions spécifiques (centromères, télomères), permet une étude précise de certaines régions chromosomiques. Cette technique peut être appliquée aux noyaux en interphase (immédiatement après prélèvement, avant culture) ou sur les chromosomes en métaphase (après l'étape de culture).

En diagnostic prénatal, il est utilisé pour diagnostiquer les aneuploïdes, les syndromes microdeletaux (par exemple: cardiopathie tronconale ou délétion 22q11.2) ou pour caractériser les anomalies structurales chromosomiques.

FISH dans l'interphase permet l'identification des principales aneuploïdies (trisomie 13, 18, 21) dans les noyaux interphase (Fig. 12.15) sans utiliser l'étape de culture cellulaire.

L'inconvénient est le coût élevé de ces sondes, mais dans de nombreux pays européens, cette analyse fait partie du programme national de dépistage de l'aneuploïdie fœtale.

Metaphase FISH identifie dans les chromosomes métaphase les principaux syndromes avec microdélétions ou microduplications.

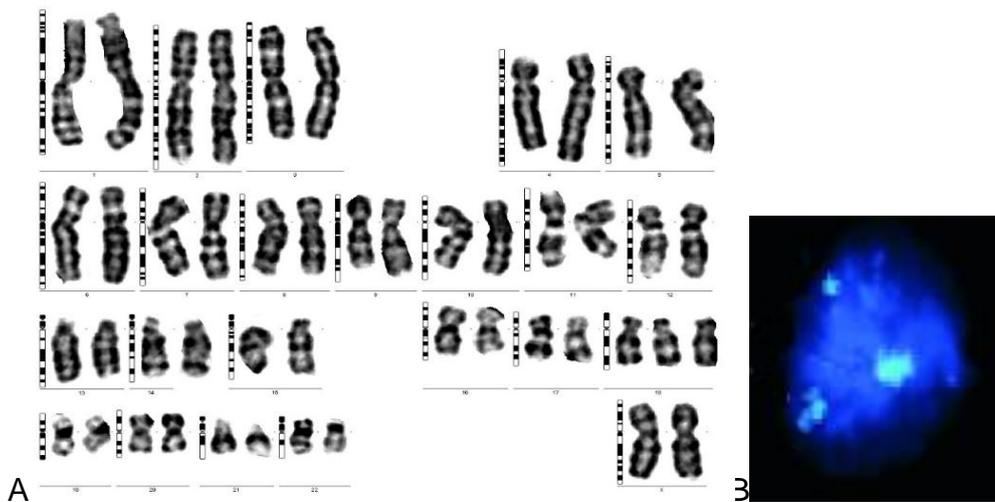


Fig. 12.15. (A) Caryotype avec trisomie 18 (B) FISH dans l'interphase montre la présence de 3 copies du chromosome 18 (bleu) présent dans une amniocyte

2.4.2. Méthode de fluorescence quantitative (QF-PCR)

Il y a eu une augmentation de la demande de toutes parts pour des méthodes de diagnostic plus rapides qui ne nécessitent pas de culture cellulaire. 24 séquences nucléotidiques (microsatellites) ont été notées par amplification directe de l'ADN suivie d'une électrophorèse capillaire fluorescente du segment d'ADN amplifié. Des méthodes de détection rapide des aneuploïdies ont été mises en place pour permettre une détection rapide (1 à 2 jours) des aneuploïdies courantes (trisomie 13, 18 et 21, triploïdie et aneuploïdie des chromosomes sexuels) qui représentent plus de 80% des anomalies chromosomiques (Fig. 12.16) diagnostiqué pendant la période prénatale.

Avantages de la méthode:

- le résultat est rapide 24-48 heures
- peut détecter le mosaïcisme dans environ 20 à 30% des cas
- moins cher
- alloue un nombre beaucoup plus grand d'échantillons simultanés que FISH.

Pour ces raisons, la méthode QF-PCR a remplacé la méthode interphase FISH dans un nombre croissant de laboratoires de génétique en Europe.

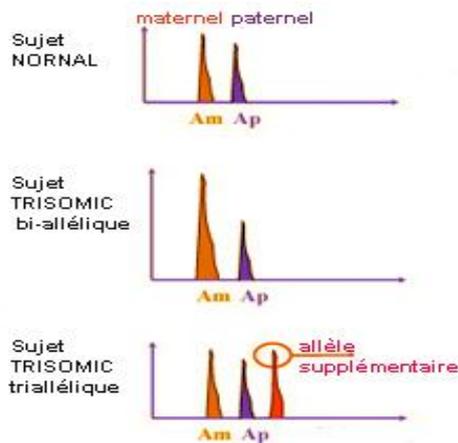


Fig. 12.16. Analyse QF-PCR:

ci-dessus sont 2 allèles (rapport 1:1) pour le chromosome 21 (foetus normal);

au milieu sont 3 allèles (rapport 2:1) qui indique une trisomie 21, donnée par une non-disjonction de la méiose II

ci-dessous sont 3 allèles (1:1:1) donnés par une non-disjonction de la méiose I

2.4.3. Diagnostic prénatal moléculaire

Les principales indications sont:

- mère porteuse pour une maladie récessive liée à l'X;
- maladies monogéniques précédemment détectées dans la petite famille ou la famille élargie;
- les parents porteurs de gènes récessifs, qui peuvent être diagnostiqués avant la naissance.

Les méthodes de prélèvement des cellules fœtales sont les mêmes que pour le diagnostic chromosomique prénatal. Le choix du type de prélèvement dépend du risque génétique, de l'âge de la grossesse et du risque associé au prélèvement. Cependant, le risque de lésions fœtales étant le plus souvent de 25 à 50%, le prélèvement des villosités chorionales est préféré en raison de sa précocité. De plus, ce tissu permet généralement l'extraction directe d'une quantité suffisante d'ADN pour des mutations / mutations et pour une étude familiale indirecte.

Des études de biologie moléculaire peuvent également être réalisées à partir d'ADN extrait de cellules amniotiques (analyse directe ou post-culture) ou de cellules sanguines fœtales (prélevées par cordocentèse). Dans tous les cas, il est essentiel d'éliminer la suspicion de contamination par l'ADN maternel.

Le diagnostic prénatal moléculaire a pour but d'identifier les anomalies génétiques par des techniques de biologie moléculaire. Le plus souvent, il consiste à rechercher chez le fœtus la présence d'une ou 2 mutations préalablement identifiées, chez les parents ou un autre parent. Le diagnostic est alors direct (Fig. 12.17).

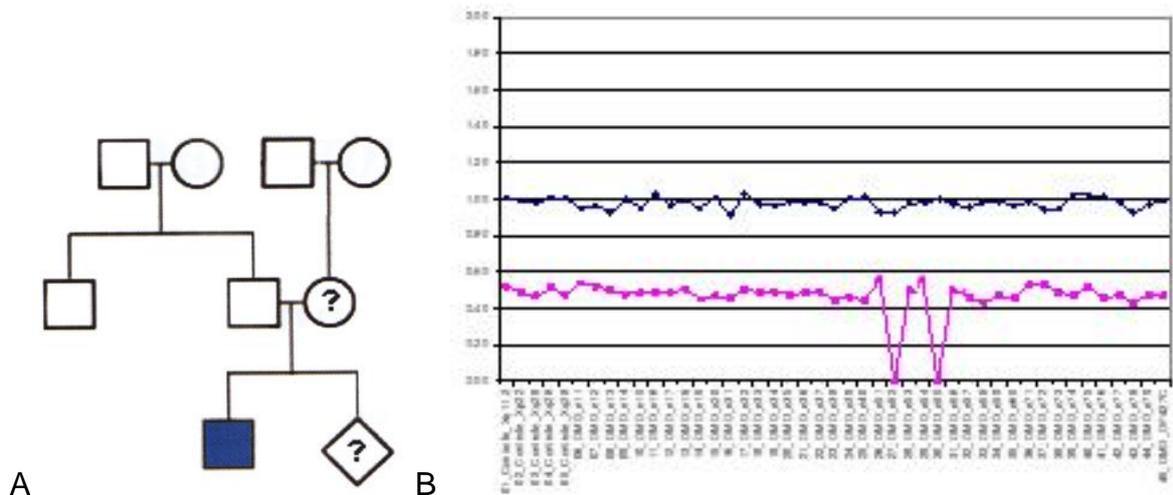


Fig. 12.17. (A) Arbre généalogique d'une famille avec un enfant atteint de myodystrophie de Duchene; (B) La technique MLPA pour l'identification des mutations majeures dans le gène de la dystrophine appliquée aux cellules des villosités choriales révèle la deletions des exons 52 et 55 chez un fœtus mâle affecté.

2.4.4. Autres techniques complémentaires

Il s'agit de techniques d'étude quantitative du génome qui permettent d'identifier les pertes ou gains de matériel héréditaire, soit de manière ciblée (techniques PCR quantitatives) ou pangénomique (analyse CGH). Le niveau de résolution de ces techniques est intermédiaire entre le caryotype et les techniques classiques de biologie moléculaire.

Ils ne sont actuellement utilisés qu'en présence de certains indicatifs échographiques ou pour identifier des anomalies de la structure chromosomique anormale. Comme pour toute technique réalisée à partir de l'extraction d'ADN, elles nécessitent une vérification de l'absence de contamination maternelle.

3. Dépistage avant la conception

Il permet la détection d'anomalies du gamète femelle, en étudiant le premier globe polaire (Fig. 12.18). Normalement, le premier globe polaire a la même doublure chromosomique et le même génotype que l'œuf et peut être utilisé pour la fécondation in vitro. Cependant, il existe des cas où la mutation se produit dans une seule de ces 2 cellules, situation où le diagnostic est erroné.

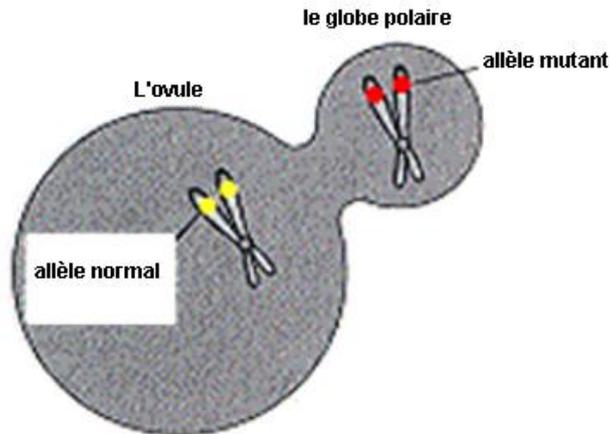


Fig. 12.18. L'ovule (à gauche) et le premier globe polaire (à droite)

Toute maladie chromosomique ou monogénique dans laquelle le défaut génétique est préalablement connu (parent porteur du défaut génétique) peut être détectée si la procédure de fécondation in vitro est également appliquée. L'avantage de la méthode est d'éviter les avortements car seuls les embryons vérifiés sont implantés.

4. Diagnostic préimplantatoire

Le diagnostic préimplantatoire est une variante du diagnostic prénatal qui évite le recours à l'avortement. Cette technique complexe nécessite une fécondation in vitro avec ICSI (injection intracytoplasmique d'un sperme). Au 3ème jour après la fécondation (Fig.19A), chez les embryons au stade 8 blastomères, une biopsie embryonnaire permet le prélèvement d'une ou 2 cellules (Fig.19B) pour réaliser un diagnostic chromosomique (FISH) ou moléculaire (PCR).



Fig. 12.19. Aspiration d'un blastomère à partir duquel des tests génétiques peuvent être effectués

La difficulté réside dans la faible quantité de matériel génétique et le risque de contamination par de l'ADN exogène (maternel ou autre) pour les tests moléculaires. Seuls les embryons sains sont transférés dans l'utérus de la mère.

Les indications de cette procédure doivent être soigneusement pesées et une consultation interdisciplinaire est nécessaire. Les indications:

- Couples porteurs d'une mutation connue au niveau moléculaire
- Couples porteurs de réarrangements chromosomiques connus;
- Couples avec des échecs répétés de FIV;
- Les hommes infertiles qui ont besoin d'ICSI.
- Détermination du sexe génétique de l'embryon.

Cependant, des contraintes supplémentaires liées à cette technique doivent être prises en compte. D'une part, la femme doit avoir une réserve ovarienne suffisante avec une bonne qualité d'ovocytes. En revanche, le nombre de pathologies pour lesquelles un diagnostic préimplantatoire est disponible est limité.

Actuellement, cette technique est pratiquée dans plusieurs centres en Europe et le temps d'attente est long. En général, cette technique permet d'obtenir un taux de natalité de 16-20%.

Perspectives du diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal peut être suivi d'interventions chirurgicales intra-utérines ou néonatales pour corriger certaines anomalies congénitales

La thérapie in utero est déjà une option thérapeutique pratique et à l'avenir, des maladies monogéniques de plus en plus graves pourront être traitées de cette manière. Le diagnostic prénatal avec transplantation utérine offre la possibilité de traiter un grand nombre de maladies en transplantant des cellules normales sur un fœtus présentant une anomalie congénitale.

Travaux pratiques nr. 13

LA CONSULTATION GÉNÉTIQUE

La consultation génétique- définition

La consultation génétique est un acte médical qui consiste à informer le couple de son risque de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie grave. Elle consiste également à aborder avec le couple les aspects plus ou moins invalidants de la maladie, en tenant compte de l'éventuelle variabilité clinique d'un individu à l'autre, du pronostic vital, des possibilités thérapeutiques actuelles et de leurs perspectives d'avenir, de l'existence d'un diagnostic prénatal (sa sensibilité et sa précocité pendant la grossesse) et l'éventuelle demande d'interruption de grossesse en cas de diagnostic positif.

13.1. Les circonstances de la consultation génétique

Les consultations génétiques peuvent être:

- *La consultation prénuptiale* (avant le mariage) s'adresse aux futurs partenaires d'un couple conjugal qui, soit eux-mêmes ou seulement l'un d'eux, présente une carence héréditaire ou des antécédents familiaux de maladies héréditaires.
- *La consultation des couples stériles*, qui peut détecter ou exclure l'existence d'anomalies chromosomiques gonosomiques (monosomies, trisomies, délétions, translocations etc.)
- *La consultation demandée à la suite de la naissance d'un enfant difforme ou un fœtus mort.*
- *La consultation à la suite de la naissance d'un enfant atteint de maladie moléculaire ou un syndrome chromosomique.*
- *La consultation des couples ayant des fausses couches multiples.*
- *La consultation des familles qui ont un enfant avec une carence héréditaire et veulent une nouvelle grossesse.*

13.2. Les objectifs de la consultation génétique

La consultation génétique suit:

- la détection des *maladies chromosomiques* (translocations équilibrées, y compris);
- la détection des *maladies génétiques*;
- la détection des *porteurs (hétérozygotes)*;
- la détection des *mosaïques chromosomiques*;
- le diagnostic des *dysgénésies gonadiques*;
- le diagnostic correct des *phénocopies*.

13.3. Les étapes de la consultation génétique

I. La consultation adéquate comprend:

- la déclaration d'enregistrement et les motifs de consultation
- l'enquête sur la famille
- l'examen clinique
- les tests de laboratoire
- l'analyse des données et la détermination précise du diagnostic

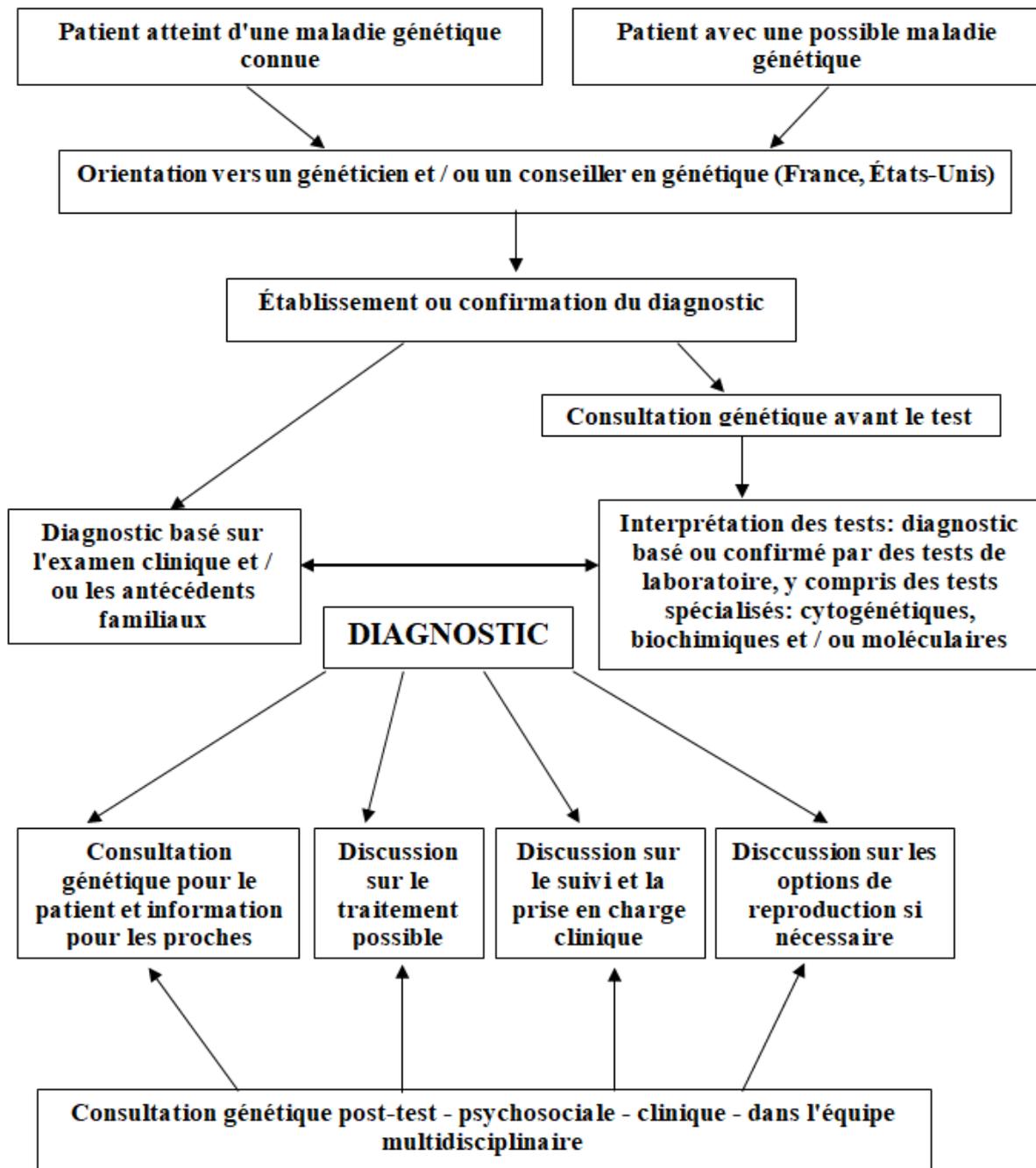


Fig. 13.1. Les étapes de la consultation génétique

II. L'évaluation du pronostic et du risque génétique

- Le calcul de la fréquence (de la concentration) du gène pathologique dans une population = la fréquence des hétérozygotes par l'application de la loi Hardy Weinberg.
- Le calcul du risque de récurrence basé sur les lois de l'hérédité en utilisant le calcul des probabilités.

III. Conseil génétique

- Communication des résultats
- La surveillance du patient

I. La consultation adéquate

1. Enquête sur la famille et la composition de l'arbre généalogique

L'enquête familiale comprend l'anamnèse prénatale et / ou postnatale, selon les aspects cliniques présents dans la famille, la maladie suspectée et l'âge du proband.

Les données obtenues sont enregistrées graphiquement, constituant l'arbre, à l'aide de certains signes conventionnels.

Les informations obtenues par anamnèse feront référence à l'existence d'avortements spontanés, de naissances prématurées, de la naissance du fœtus morts, éventuellement de mariages consanguins, de données sur la période de la puberté, la fonction reproductrice, etc. Il est particulièrement important de suivre et d'apprécier la transmission généalogique, de génération en génération, ainsi que la répartition familiale des caractères normaux ou pathologiques.

L'enquête familiale part du cas principal, nommé consultant ou proband et marqué d'un P ou d'une flèche à côté de son signe conventionnel dans l'arbre généalogique.

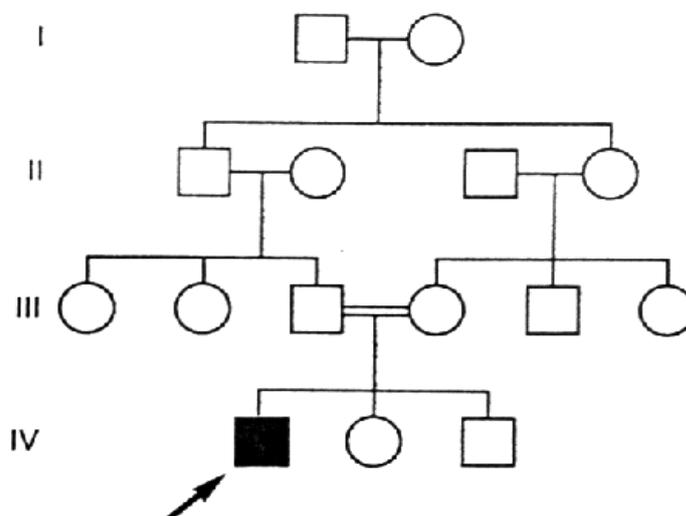


Fig. 13.2. L'arbre généalogique contenant 4 générations.
La flèche indique le proband

L'enquête familiale doit être faite très soigneusement, en enregistrant toutes les conditions détectées, qu'elles aient ou non un lien apparent avec la maladie du probant.

On notera également:

- les naissances spontanées, les naissances prématurées, les naissances de fœtus morts, les couples sans enfants;
- la consanguinité, les décès etc.

Pour réaliser une enquête familiale, il est nécessaire de tact et de compréhension, et l'information requise sera expliquée au sujet ou à sa famille.

Lorsqu'il y a plusieurs anomalies dans la famille en même temps (génétiques, génétiques communes), d'autres signes précisés dans la légende (hachures, couleurs différentes) peuvent être utilisés.

Parfois, il peut y avoir des obstacles causés par la dispersion géographique des membres de la famille, le manque de sincérité dans la présentation des données et même le manque de coopération généré par l'embarras envers les cas pathologiques et le phénomène de culpabilité qui peut présenter le partenaire dans la famille duquel il existe une riche pathologie.

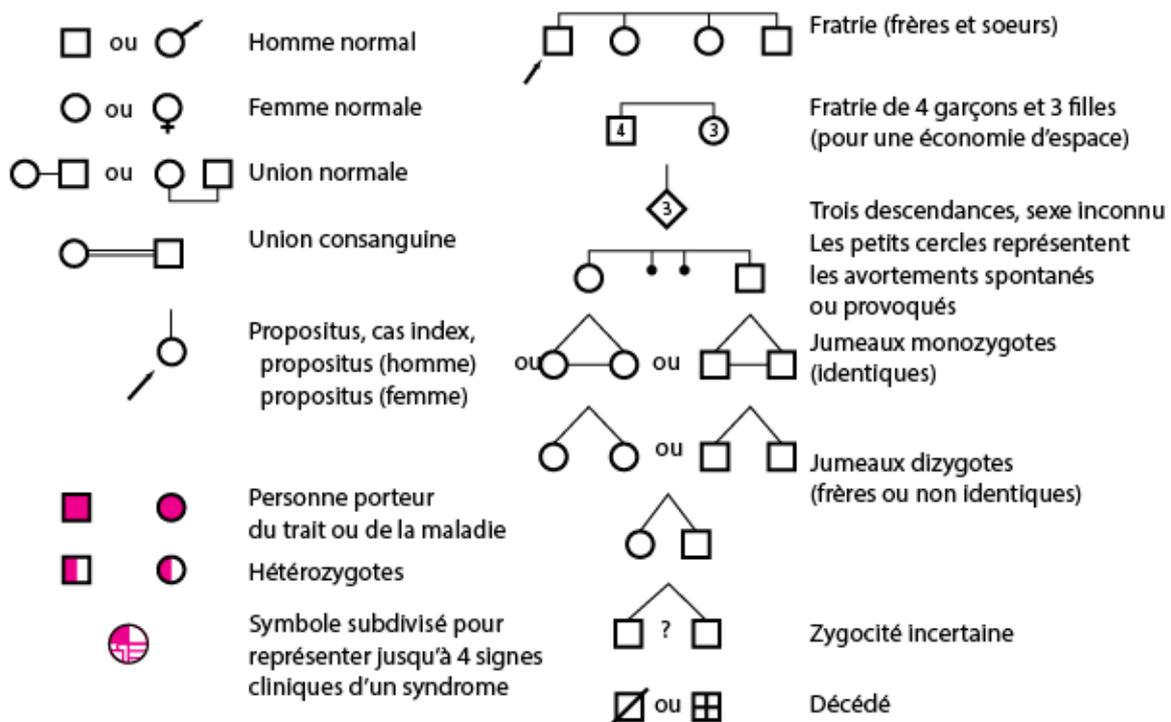


Fig. 13.3. Signes et symboles utilisés pour construire un arbre généalogique

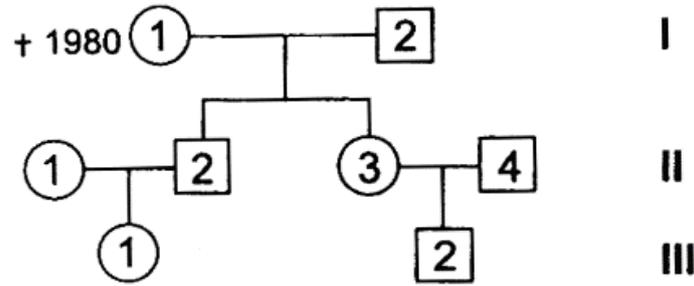


Fig. 13.4. Signes et symboles utilisés pour construire un arbre généalogique

2. *L'examen clinique* est un examen complet du sujet par un médecin, surveillant et enregistrant tous les caractères héréditaires morphologiques; ce stade comprend aussi l'examen des dermato-glyphes.

3. *Les examens de laboratoire*: généraux (Rx, ECG, EEG, EMG, échographie, biopsie, des études biochimiques etc.) et spécialisés (cytogénétique classique, FISH, des tests d'ADN).

Les examens de laboratoire spécialisés

Le caryotype: l'examen chromosomique est indiqué dans les situations suivantes:

- dysmorphies génétiques somatiques et dysfonctionnement des organes;
- retard mental non diagnostiquée;
- sous-développement staturo-pondéral chez les enfants et les adolescents;
- dysgénésie gonadique;
- retard de la puberté;
- aménorrhée primaire et secondaire;
- échecs de la reproduction:
 - fausses couches répétées;
 - un accouchement prématuré avec un fœtus mort;
 - stérilité masculine et féminine;
- parents qui ont (ou ont eu des antécédents) un enfant avec de malformations congénitales ou un syndrome chromosomique;
- syndromes d'instabilité chromosomique;
- personnes qui travaillent dans un milieu avec des facteurs mutagènes et veulent procréer;
- une catégorie spéciale constitue les hémopathies malignes, dans lesquelles sont nécessaires l'étude et le surligne des chromosomes, des changements chromosomiques dépendant de la période évolutive.

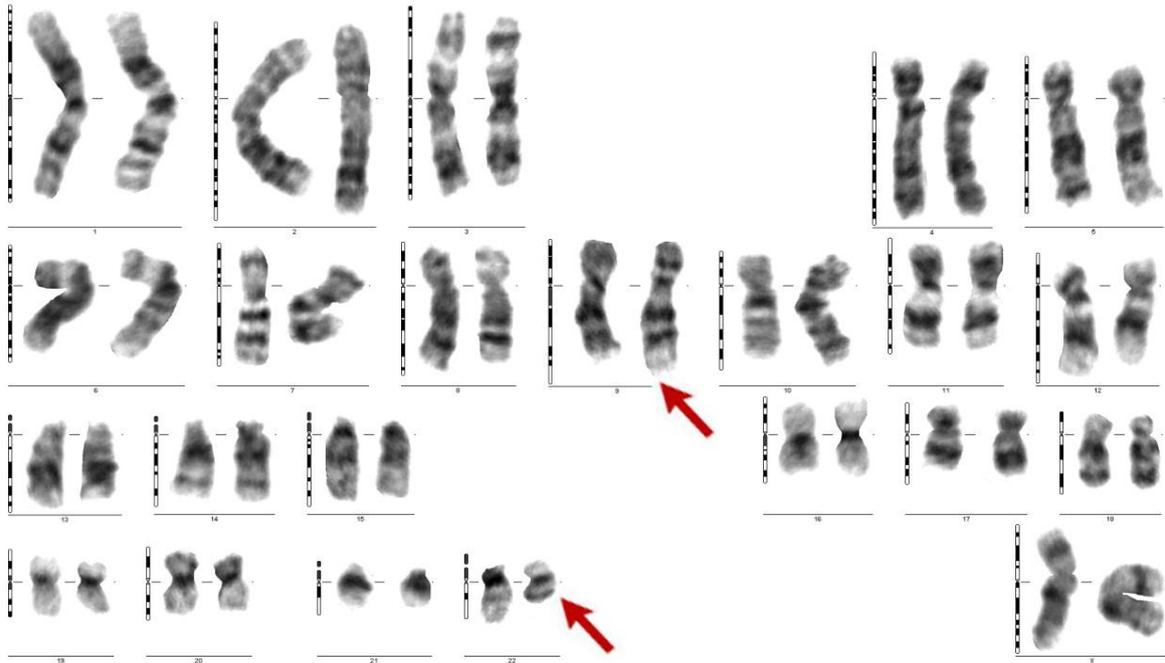


Fig. 13.5. Caryotype montrant la translocation des chromosomes 9 et 22, aboutissant à la fusion des gènes BCR (Breakpoint Cluster Region) et ABL1 (Abelson), ce qui forme le gène de fusion BCR-ABL1, associée à la leucémie myéloïde chronique. Le chromosome dérivé est aussi connu sous le nom de chromosome Philadelphie (Collection Dr Cristina Gug).

II. L'évaluation du pronostic et du risque génétique

Pour développer le pronostic il y a deux étapes:

1. Le calcul de la fréquence du gène pathologique (par les méthodologies fournies par des études de Génétique des populations)
2. Le calcul du risque génétique (risque de récurrence)=> conseil génétique

Applications de la loi de Hardy-Weinberg (HW) dans les maladies monogéniques

Les maladies autosomique dominantes (AD)

Dans le cas des maladies AD, la loi de Hardy-Weinberg est appliquée en tenant compte des aspects suivants:

- la fréquence **p** du gène mutant **A** est très faible par rapport à la fréquence **q** du gène normal **a**
- la fréquence des hétérozygotes **Aa (2pq)** est bien supérieure à la fréquence des homozygotes anormaux **AA (p²)**

Puisque $p^2 \ll 2pq$, le nombre d'homozygotes affectés est très faible. Dans le même temps, comme p est très petit et q est approximé par 1, la fréquence de la maladie sera environ deux fois la fréquence du gène mutant ($2p$). Par conséquent, les applications pratiques de la loi de Hardy-Weinberg dans les maladies AD sont plus faibles, la fréquence d'une maladie dominante étant pratiquement égale à la fréquence des hétérozygotes.

Maladies autosomiques récessives (AR)

Dans le cas des maladies AR, la loi HW permet le calcul de la fréquence des hétérozygotes (la probabilité que chaque parent soit porteur du gène pathologique = **Aa**) en utilisant la fréquence du gène anormal ou de la maladie dans la population (individus homozygotes pour le gène pathologique récessif = **aa**), la fréquence de la maladie sera égale avec la fréquence des hétérozygotes = q^2 . Puisque dans les maladies AR, q est très petit et p est d'environ 1, la fréquence des hétérozygotes est d'environ $2q$, donc beaucoup plus élevée que la fréquence de la maladie ($2pq \gg q^2$).

Maladies récessives liées au chromosome X

La fréquence des génotypes pour un locus chromosomique X spécifique est différente pour les deux sexes, les hommes n'ayant qu'une seule copie de chaque gène sur le chromosome X et les femmes ayant deux copies. Ainsi, chez l'homme, la fréquence du gène anormal (q) est égale à la fréquence de la maladie. Le nombre de femmes atteintes ($X^a X^a$) est bien inférieur à celui des hommes affectés ($X^a Y$) car $q > q^2$ mais le nombre de porteurs sains $X^N X^a$ ($2q$) est le double par rapport aux hommes atteints (q).

13.4. Le conseil génétique

Un conseil génétique préliminaire peut être donné par tout médecin, à condition qu'il ait un bagage génétique de base et en connaisse suffisamment sur le consultant/proband et sa famille.

Dans des situations plus complexes ou à chaque fois qu'il y a des doutes sur le diagnostic, les consultants seront dirigés vers des centres spécialisés (bureaux de génétique qui ont des possibilités d'investigation plus larges).

Afin de formuler le conseil génétique, le généticien est obligé de connaître et d'élucider une multitude de problèmes:

- Déterminer si la maladie (trouble ou anomalie) est héréditaire ou déterminée postconceptionnellement;
- Suivre lors de la consultation la présence de certains éléments pouvant préciser le caractère congénital et / ou familial de la maladie;
- Si la maladie est héréditaire, précisez son mode de transmission (autosomique ou gonosomique, dominant ou récessif);
- Si une anomalie congénitale a été causée par un facteur environnemental (environnement toxique, maladies maternelles préexistantes à la grossesse), le pronostic de la prochaine grossesse dépend de la possibilité d'éliminer ou de neutraliser le facteur environnemental incriminé;

La spécification du risque de récurrence nécessite toutes ces données, ainsi que celles obtenues grâce à une enquête familiale laborieuse et prendra en compte un certain nombre d'aspects particuliers des maladies génétiques, tels que: l'hétérogénéité génétique, l'expressivité et la pénétration variables, l'apparition de mutations de novo, etc.

Souvent, l'avis génétique donné est le résultat d'une consultation interdisciplinaire qui vise à établir, avec une précision maximale, le diagnostic et le pronostic de la maladie, ainsi que le risque génétique.

L'analyse de toutes les données issues de la consultation génétique, sur le risque de récurrence d'une maladie héréditaire, sera présentée exactement aux personnes concernées, toujours avec beaucoup de tact et de compréhension, mais aussi en utilisant un langage adapté aux possibilités de compréhension des intéressés.

Le devoir du médecin est d'apporter une réponse sur le risque, de conseiller mais non d'influencer la décision qui appartiendra aux intéressés.

Travaux pratiques nr. 14

LE DEPISTAGE DES MALADIES GENETIQUES. LES TESTS BIOCHIMIQUES

Certaines maladies monogéniques bénéficient de méthodes de laboratoire qui permettent leur détection immédiatement après la naissance. Si la méthode est facile à interpréter, a une sensibilité élevée et est facile à réaliser, elle peut être utilisée comme test de dépistage de masse, y compris dans le dépistage des nouveau-nés.

Le dépistage néonatal est utilisé pour détecter certaines maladies congénitales chez les nourrissons, qui ne reçoivent un traitement que lorsqu'ils sont diagnostiqués immédiatement après la naissance, dans les premiers jours de la vie.

Le dépistage néonatal effectué pour détecter les maladies traitable est aujourd'hui partie des services de santé de routine dans presque tous les pays. Les recommandations détaillées sur la politique de dépistage varieront d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre, en fonction des facteurs locaux économiques, politiques, médicaux et de l'organisation de la santé publique.

Des lignes directrices pour le dépistage néonatal en général, ainsi que pour des conditions spécifiques sont publiées.

Composantes du système de dépistage néonatal:

- Éducation (impliquant: personnel médical, inspecteurs de la santé publique et parents)
- Le dépistage lui-même (prélèvement d'échantillons, analyse en laboratoire)
- Détection précoce
- Diagnostic (examen clinique et évaluation biochimique)
- Prise en charge (conseil, mise en place d'une thérapie, suivi de la thérapie, suivant une méthodologie claire)
- Évaluation (suivi et contrôle de la qualité des échantillons et de l'activité au sein du système de dépistage)

Principes du dépistage des nouveau-nés:

- Les conditions dans lesquelles les symptômes ne sont cliniquement présents qu'après une altération irréversible et pour lesquelles il y aurait eu un traitement;
- Prévalence des blessures ou des maladies dans la population;
- Méthode simple du prélèvement;
- Répétabilité du test avec peu de résultats faux positifs ou faux négatifs;
- Les enfants de moins de 72 heures après la naissance et de préférence 24 heures après avoir mangé des protéines;
- Évitement de la contamination croisée.

14.1. Types de tests de dépistage

Un test spécifique utilisé pour le dépistage est un test simple qui identifie le risque d'éventuels troubles métaboliques congénitaux ou d'autres maladies génétiques, endocrinologiques, etc., qui ne sont pas évidents dès la naissance.

Effectuer des tests néonataux:

Actuellement, le test est réalisé 24 heures après la naissance, à 48-72 heures, après en avoir informé les parents (fig. 14.1.).

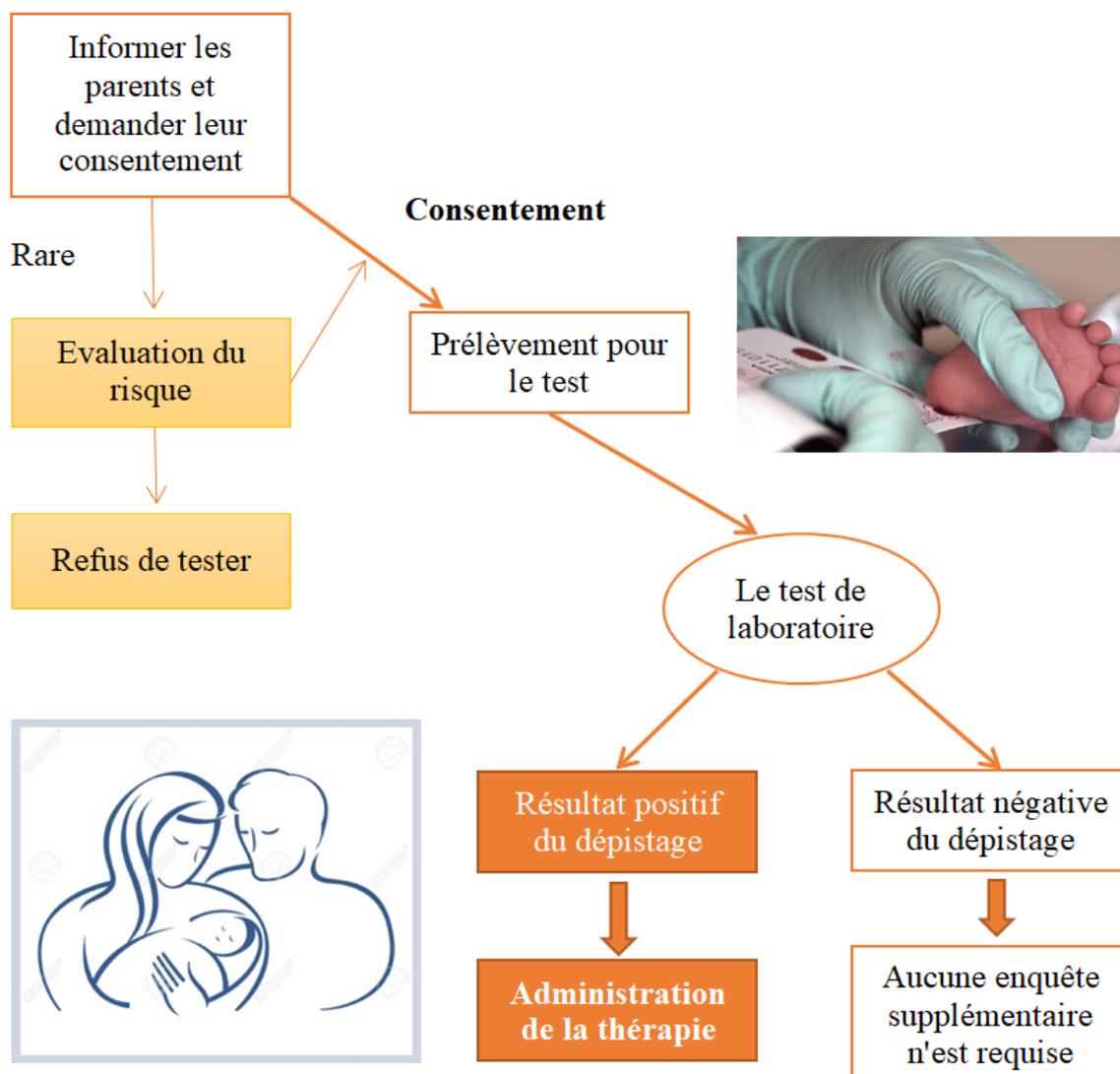


Fig. 14.1. Modèle de dépistage néonatal

Les **tests biochimiques** nécessitent quelques gouttes de sang prélevées sur le talon du nouveau-né, recueillies sur un papier spécial.

Le test est répété:

- lorsque le sang a été prélevé dans les 24 heures suivant la naissance
- lorsque le bébé est né prématurément
- lorsque le premier test suggère qu'une condition qui doit être confirmée est possible.

Il existe de nombreuses conditions auxquelles les programmes de dépistage s'appliquent immédiatement après la naissance, par exemple:

- phénylcétonurie;
- fibrose kystique;
- hypothyroïdie congénitale;
- toxoplasmose congénitale;
- hyperplasie surrénale congénitale;
- galactosémie;
- homocystinurie;
- hémoglobinopathies;
- tyrosinémie;
- déficit en glucose 6-phosphate déshydrogénase

I. Détection de la fibrose kystique

La fibrose kystique est la maladie métabolique la plus courante, avec une incidence de 1/2000 dans la population caucasienne.

Le diagnostic biologique de la fibrose kystique peut également être établi par:

- mise en évidence de la concentration d'électrolytes dans la sueur (en particulier Na qui dépasse 60 mEq/ L);
- détermination de l'amylasémie;
- détermination des enzymes pancréatiques dans les selles;
- déterminer la présence d'albumine dans le méconium; cela se fait par précipitation avec de l'acide sulfosalicylique ou de l'acide trichloracétique. Dans plus de 90% des cas de fibrose kystique, la réaction est positive.

II. Détection de la phénylcétonurie

La phénylcétonurie est un trouble du métabolisme de la phénylalanine dû à une carence en enzyme phénylalanine - hydroxylase. Incidence: 1/12 000 naissances vivantes.

a) Dosage de l'acide phénylpyruvique dans l'urine (réaction de Fölling)

Principe: L'ion Fe du perchlorure ferrique se combine avec l'acide phénylpyruvique dans l'urine, donnant une couleur verte en quelques minutes. Chez les nourrissons avec une collecte d'urine difficile, le réactif peut être appliqué directement entre les couches ou avec une bande de papier filtre imprégné d'au paravant avec un réactif. Lorsque le prélèvement est possible, 1 ml de réactif est ajouté à plus de 10 gouttes d'urine fraîche et agité vigoureusement; après 2-3 minutes, la couleur verte apparaît, indiquant la présence d'acide phénylpyruvique dans l'urine.

Pour éviter les erreurs techniques, doit toujours être collectée de l'urine fraîche. De fausses réactions négatives sont données par une urine ancienne et préservée. Des réactions faussement positives peuvent survenir après l'administration de médicaments tels que l'aspirine, des antibiotiques, etc. Notez que le test n'est positif que lorsque la concentration de phénylalanine dans le sang dépasse 15 mg%.

b) Dosage de la phénylalanine dans le sang (test de Guthrie)

Chez les patients atteints de phénylcétonurie, le déficit enzymatique entraîne une accumulation de phénylalanine dans le sang. Son dosage peut être effectué par la méthode microbiologique -test de Guthrie; la méthode est plus sensible que la réaction au perchlorure ferrique et assure un diagnostic précoce dans la première semaine de vie; bien que complexe et coûteuse, la méthode est utilisée avec succès pour la détection dans les programmes de dépistage néonatal.

Principe: la croissance du bacillus subtilis (souche standard) en milieu de culture peut être inhibée par une substance antagoniste de la phénylalanine (2-bétathiénylalanine); S'il y a de la phénylalanine dans le milieu, l'inhibition a disparu, remarquant une riche culture de bacillus subtilis.

Méthode: prélever quelques gouttes de sang sur un papier filtre spécial; laissez-les sécher. Une petite rondelle au centre du spot est déposée sur le milieu de culture Difco PKU. Incuber pendant 16 heures sur le thermostat. Si la rondelle contient du sang avec de la phénylalanine, l'inhibition de la croissance des germes est supprimée et un halo blanchâtre donné par la culture de bacilles est observé autour de la rondelle. La zone de croissance est proportionnelle à la quantité de phénylalanine dans l'échantillon.

c) Détection des hétérozygotes (test de surcharge phénylalanine)

Méthode: un échantillon de sang est prélevé le matin (échantillon de contrôle), puis 100 mg de phénylalanine/ kg de poids corporel sont administrés par voie orale, après quoi un prélèvement de sang est repris à 2 et 4 heures.

Les échantillons sont chromatographiés pour la détermination quantitative de la phénylalanine et les valeurs sont comparées à la normale (échantillon témoin). La haute précision de diagnostic est la spectrofluorimétrie; cependant, la technique est laborieuse et nécessite un équipement approprié.

III. Détection de l'hypothyroïdie

Incidence: 1/3600 - 5000 naissances.

À l'aide d'un test de dépistage, l'hypothyroïdie congénitale peut être détectée immédiatement à la naissance.

Principe:

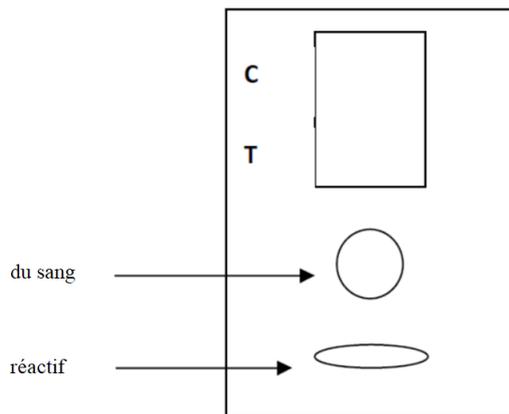


Fig. 14.2. Principe de la méthode

1. mettez 2 gouttes (50 μ l) de sang;
2. attendez 90 secondes;
3. ajoutez 4 gouttes de réactif (solution tampon);
4. lire après 10 minutes.

Interprétation du test:

- **Positif (+):** La présence d'une ligne rose horizontale à la fois près de la position T (test) et près de la position C (contrôle) dans la fenêtre de la cassette indique que le sérum est TSH > 20 μ U/ ml. L'intensité de la couleur près de la position T reflète la concentration de TSH. La présence d'une ligne en position T (test) dont la couleur peut varier (du rose clair au rose foncé) signifie un test positif.
- **Négatif (-):** La présence d'une seule ligne rose près de la position C dans la fenêtre de la cassette indique une TSH sérique <20 μ U/ ml.
- **Erreur (\emptyset):** le test ne peut être utilisé que si une ligne rose apparaît près de la position C (contrôle) 10 min après l'ajout du réactif.

IV. Détection de l'hyperplasie congénitale des surrénales due à un déficit en 21 β -hydroxylase

L'hyperplasie congénitale des surrénales est secondaire à une carence enzymatique qui affecte la biosynthèse des stéroïdes. La forme la plus courante est causée par une carence en 21 β - hydroxylase. Fréquence différente, selon la région, de 1/12500 à 1/23000.

Lors d'un déficit à la naissance, l'aldostérone et le cortisol combinés peuvent provoquer une déshydratation avec perte de sel au risque de collapsus et de mort très rapidement. En l'absence de dépistage néonatal, les plus exposés sont les garçons, car chez les filles l'ambiguïté sexuelle conduit rapidement au diagnostic.

La méthode de détection est la détermination de la progestérone 17OH du sang séché sur papier filtre. La valeur normale est inférieure à 60 nmol/ L. Les nouveau-nés atteints présentent des valeurs élevées. La prématurité induit des résultats faussement positifs par immaturité enzymatique. Des résultats faussement positifs apparaissent également en cas d'insuffisance pondérale à la naissance, certaines maladies, détermination dans les 24 premières heures.

V. Le test auditif

En plus des tests biochimiques, pendant la période néonatale, la fonction auditive est également testée dans le programme de dépistage.

Pour les tests, 2 méthodes peuvent être utilisées, d'une durée de 5 à 10 minutes, toutes deux sans risques:

- émissions otoacoustiques. Ce test détermine si certaines parties de l'oreille d'un enfant répondent au son. Un casque et un microphone miniature sont placés dans l'oreille et les sons sont joués. Si le nouveau-né a une audition normale, le microphone capte un écho renvoyé dans le conduit auditif.
- la réponse auditive du cerveau. Ce test évalue une partie du nerf auditif qui transporte le son de l'oreille au cerveau et la réponse du cerveau au son.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Cristina Gug, Genetică Medicală - Note de curs, Editura Eurobit, Timisoara, 2011, ISBN 978-973-729-131-8

Cristina Gug, Genetică – Curs pentru studenții de la Asistență Medicală Generală, 2014, ISBN 978-973-592-285-6

Maria Puiu, Cristina Gug, Carmen Haivas, Génétique médicale pour les étudiants en médecine, Editura Eurostampa, 2013, ISBN 978-606-569-2,

Maria Puiu, Dorina Stoicănescu, Cristina Gug, Simona Farcaș, Cristina Popa, Nicoleta Andreescu, Adela Chiriță Emandi, Corina Pienar, Noemi Meszaros, Genetică medicală Caiet de lucrări practice, Editura Eurostampa, 2013, ISBN 978-606-569-563-4.

Mircea Covic, Dragoș Ștefănescu, Ionel Sandovici, Genetică Medicală, Ediția a II-a revăzută și actualizată, Polirom, Iași, 2011, ISBN 978-973-46-1960-3

Puiu, Maria, Notes de génétique médicale: à l'usage des étudiants en médecine de langue française, Timisoara, EUROBIT, 1998,

<http://www.orpha.net/>

<http://www.genome.ucsc.edu>

<http://www.ensembl.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

<http://www.hgmd.org>

<http://fr.wikipedia.org/wiki/>