



UNIVERSITE Félix Houphouët BOIGNY  
COCODY-ABIDJAN



UFR BIOSCIENCES  
LABORATOIRE DE GENETIQUE

COURS MAGISTRAUX  
L3 DE GENETIQUE

---

# UNITE DE VALEUR GENE 2112

## L3 DE GENETIQUE

### *Cytogénétique Humaine*

**Responsable de l'UE (Unité d'Enseignement) :**

**Dr COULIBALY FOUNGOTIN HAMIDOU**

Expert auprès des Tribunaux (Test d'ADN, Génétique)

**Spécialités :** *Génétique Humaine*  
*Biologie de la Procréation*  
*Cytogénétique*  
*Spermiologie*  
*Essais Cliniques*

**Site web :** [www.crieafrique.net](http://www.crieafrique.net)

**E-mail :** [info@crieafrique.net](mailto:info@crieafrique.net)

# CYTOGENETIQUE HUMAINE

Depuis la découverte du nombre exact de chromosomes humains par Tjio et Levan en 1956, la cytogénétique humaine s'est développée dans plusieurs directions:

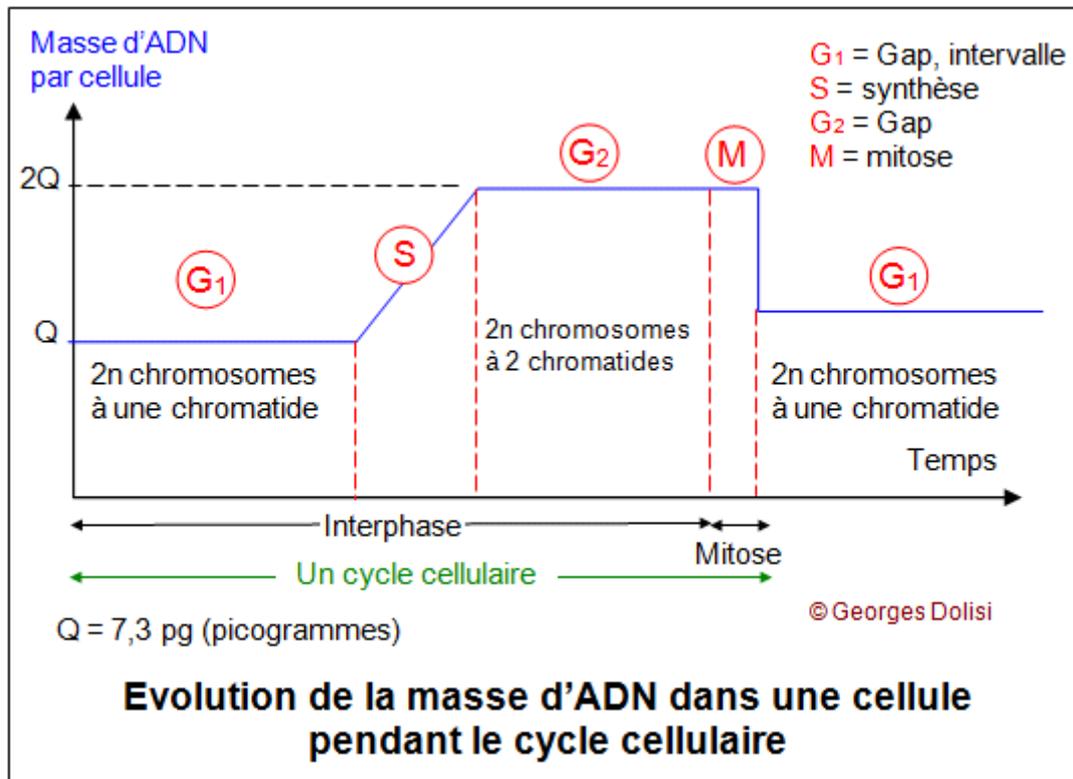
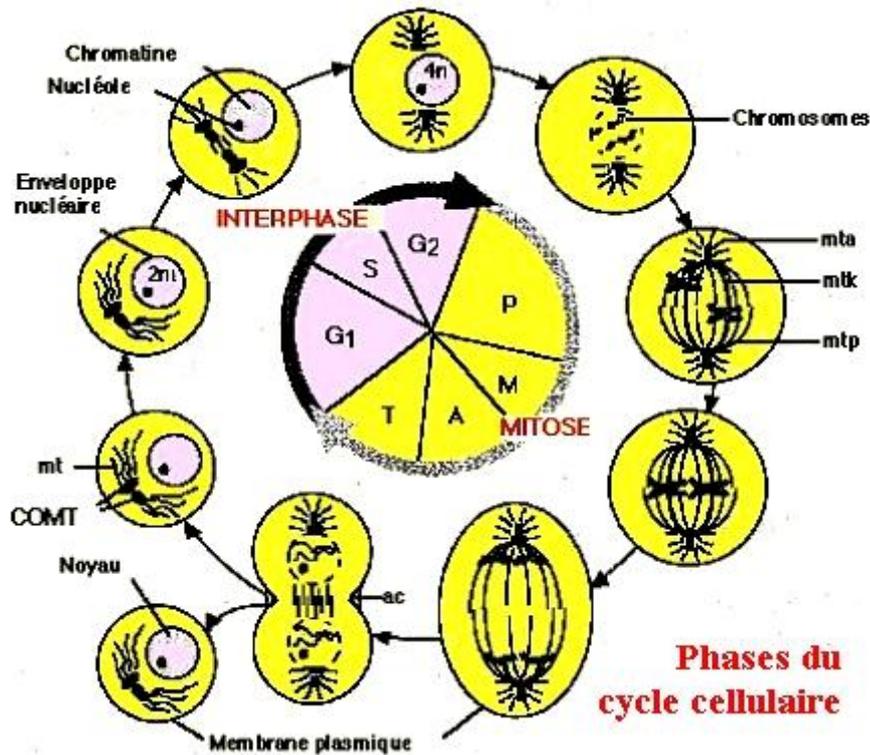
- 1) étude des anomalies chromosomiques constitutionnelles chez des enfants affectés de malformations et/ou de dysmorphies, chez leurs parents et chez des sujets stériles ;
- 2) dépistage anténatal d'aberrations chromosomiques ;
- 3) analyse des anomalies chromosomiques acquises, présentes dans les cancers et les leucémies, ou consécutives à l'exposition aux radiations ionisantes, à des substances toxiques ou à des agents mutagènes ;
- 4) localisation de gènes ou de segments d'ADN sur les chromosomes, dans l'objectif d'établir une carte cytologique, puis intégrée, du génome humain.

LA CYTOGENETIQUE a pour objet l'étude cytologique des chromosomes. Leur analyse est effectuée au cours d'un stade du cycle cellulaire où les chromosomes sont bien individualisés et peuvent être observés au microscope. C'est le plus souvent la métaphase mitotique qui est observée, mais l'étude de la méiose est également possible et, plus récemment, grâce à des techniques d'hybridation *in situ* utilisant des sondes d'ADN non radioactives, s'est développée celle des noyaux en interphase.

## I / MITOSE ET CYCLE CELLULAIRE

Avant de se diviser, la cellule réplique son ADN au cours d'une période du cycle cellulaire appelée phase S. La réplication est suivie d'une phase G2 qui précède la mitose. Après la mitose, la cellule entre en phase G1.

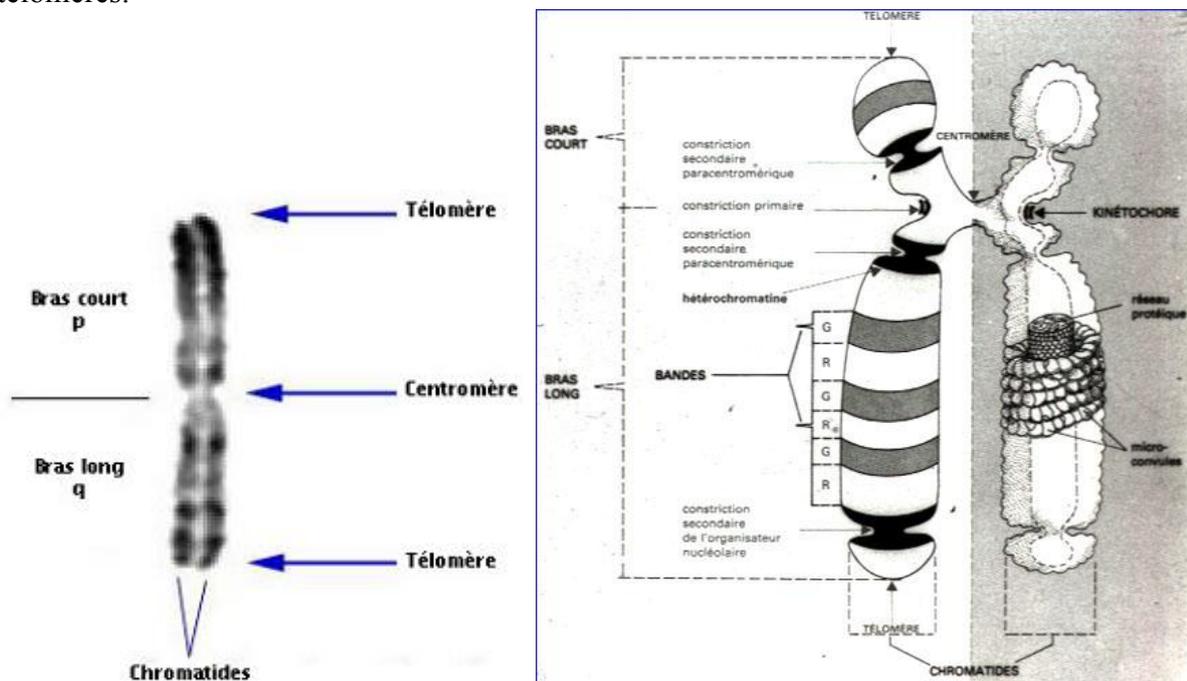
La mitose elle-même est divisée en quatre stades. Au cours de la prophase, les chromosomes deviennent des structures visibles au microscope sous forme de filaments longs, fins et enchevêtrés, encore partiellement déspiralisés. A la métaphase qui lui fait suite, la membrane nucléaire disparaît et les chromosomes, maintenant condensés et bien individualisés, se rassemblent au niveau de la plaque équatoriale ; à ce stade, ils sont formés de deux chromatides réunies au niveau du centromère ; le fuseau cellulaire commence à être visible. A l'anaphase, les deux chromatides sœurs se séparent et chacune migre, le long du fuseau, à l'un des pôles de la cellule. Au cours de la télophase, les chromosomes se décondensent, tandis que les deux noyaux fils se reconstituent et que les cytoplasmes des deux cellules filles se séparent. La conséquence de la mitose est une distribution égale du matériel chromosomique entre les deux cellules filles.



Les protéines intervenant au cours des phases successives du cycle cellulaire sont en partie identifiées. Dénommées cyclines (A, B, C, D, E), elles s'associent à différentes kinases (CDK pour *cyclin dependent kinases*)

Des anomalies d'expression des cyclines ont été découvertes dans certaines tumeurs malignes, et plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs se sont avérés être des inhibiteurs de kinases, comme celui codant la **protéine p16** (La protéine P16 est une protéine normalement exprimée au cours de la division cellulaire. Elle fait partie d'un ensemble de protéines chargées de réguler le cycle, et intervient pour ralentir la préparation de la phase G1/S de synthèse des brins complémentaires d'ADN, qui prélude à la mitose. Sa propre synthèse est commandée par un gène situé sur le bras court du chromosome 9. Au cours de plusieurs cancers (leucémies, vessie, voies aérodigestives supérieures, poumons...), la fonction de la protéine P16 est perdue, par mutation ponctuelle, délétion ou méthylation de l'ADN. Dans les lésions de haut grade induites par une infection persistante par un type oncogène d'HPV et les cancers du col utérin s'observe au contraire une accumulation importante de P16, à la fois nucléaire et cytoplasmique. Ce paradoxe est lié à l'intégration dans le génome humain de l'ADN du virus HPV. Le matériel génétique viral se trouve intégré au génome humain. Cela a pour effet de bloquer la synthèse de la protéine P53, ce qui, en retour, conduit à une surexpression de la P16)

Classiquement, le chromosome est défini comme une structure subcellulaire colorable (d'où son nom), portant les gènes. Un chromosome est caractérisé par un centromère, point d'attache au fuseau mitotique, relié à un **bras court (p)** et à un **bras long (q)** qui comportent une ou deux chromatides selon le stade de la mitose, et dont les extrémités constituent les télomères.



. Il existe sur certains chromosomes humains (1, 9, 16) des constrictions secondaires qui correspondent à de l'hétérochromatine (formée d'ADN répétitif). Sur le bras court des cinq chromosomes acrocentriques (13-15 et 21-22) existent des structures ayant peu d'affinité pour les colorants habituels, mais colorables avec des réactions au nitrate d'argent, et que l'on appelle **satellites** : ils correspondent aux organisateurs nucléolaires (NOR, *nucleolar*

*organizer regions*). Ces régions contiennent des copies multiples, disposées en tandem, des gènes des ARN ribosomiques.

## II / METHODES D'ETUDE DES CHROMOSOMES

Deux astuces techniques ont permis le développement initial de la cytogénétique humaine : l'emploi d'une solution hypotonique pour faire gonfler les cellules (choc hypotonique) et le séchage à l'air qui complète l'étalement des chromosomes. La mise au point de cultures de lymphocytes au début des années 1960, puis des techniques de bandes à partir de 1970, a aussi grandement contribué à l'essor de la cytogénétique moderne, laquelle connaît un renouveau avec l'emploi des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence.

### 2.1 Cultures cellulaires et établissement du caryotype

#### 2.1.1 TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL

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

##### A) ETAPE DE CULTURE DES CELLULES

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

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

##### B) OBTENIR DES MÉTAPHASES NOMBREUSES ET DE BONNE QUALITÉ

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

On procède ensuite au choc hypotonique. Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique.

Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées. Les constituants cellulaires sont ensuite fixés grâce à un fixateur, par exemple un mélange acide acétique méthanol. Les

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

## C) IDENTIFIER LES CHROMOSOMES

### C.1 Les techniques classiques, utilisées en routine

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

Les méthodes de marquage ou banding révèlent le long des chromosomes une alternance de bandes transversales, faiblement ou fortement colorées, dont la disposition topographique est spécifique de chaque paire chromosomique. Les bandes G (GTG) obtenues par dénaturation enzymatique et les bandes R (RHG) par dénaturation thermique ont chacune un contenu spécifique en ADN. Ces deux marquages, en contretypage, sont complémentaires.

Lorsque l'on a une bande sombre avec l'une des techniques, avec l'autre on obtient une bande claire. Le marquage révèle l'euchromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement transcrit et l'hétérochromatine c'est à dire les régions chromosomiques où l'ADN est préférentiellement inactif. Un marquage en bandes G ou R permet de visualiser 300 à 600 bandes par lot haploïde de chromosomes.

### C.2 Les techniques spécifiques

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

### C.3 Les techniques de haute résolution

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

## 2.1.2 DESCRIPTION DU CARYOTYPE HUMAIN

### A) LE CHROMOSOME MÉTAPHASIQUE

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

sont impliqués dans les translocations Robertsoniennes. Les télomères sont les extrémités distales des chromosomes.

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

## B) LA CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES

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

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

### 2.1.3 INDICATIONS DU CARYOTYPE CONSTITUTIONNEL

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

#### A) EN PÉRIODE ANTÉNATALE

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

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

#### B) EN PÉRIODE POSTNATALE

##### B.1 Patient présentant

- phénotype évocateur d'un syndrome chromosomique connu

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

Jusqu'à récemment, le caryotype était un élément essentiel du bilan d'un patient présentant une déficience intellectuelle associée ou non à une dysmorphie faciale, à une ou des malformations congénitales, à un trouble envahissant du développement. Il permettait la détection d'un déséquilibre chromosomique, délétion ou duplication. Les développements récents des puces à ADN génomique ont modifié les indications du caryotype dans

l'exploration de la déficience intellectuelle. Des déséquilibres de beaucoup plus petite taille peuvent être mis en évidence augmentant considérablement le niveau de résolution comparé à ce qui peut être obtenu grâce à un caryotype standard.

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

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

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

- un retard de croissance

A tout âge, un caryotype peut être demandé devant un retard de croissance. Lorsque le retard de croissance est isolé, la recherche d'une délétion de l'ensemble ou d'une partie (i.e. un ou plusieurs exons) du gène SHOX (Short Stature Homeobox-containing gene) (Rao et al, 1997) par une technique ciblée de génétique moléculaire, par exemple PCR quantitative, est de plus en plus utilisée en complément ou remplacement du caryotype

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

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

- une suspicion d'un syndrome d'instabilité chromosomique

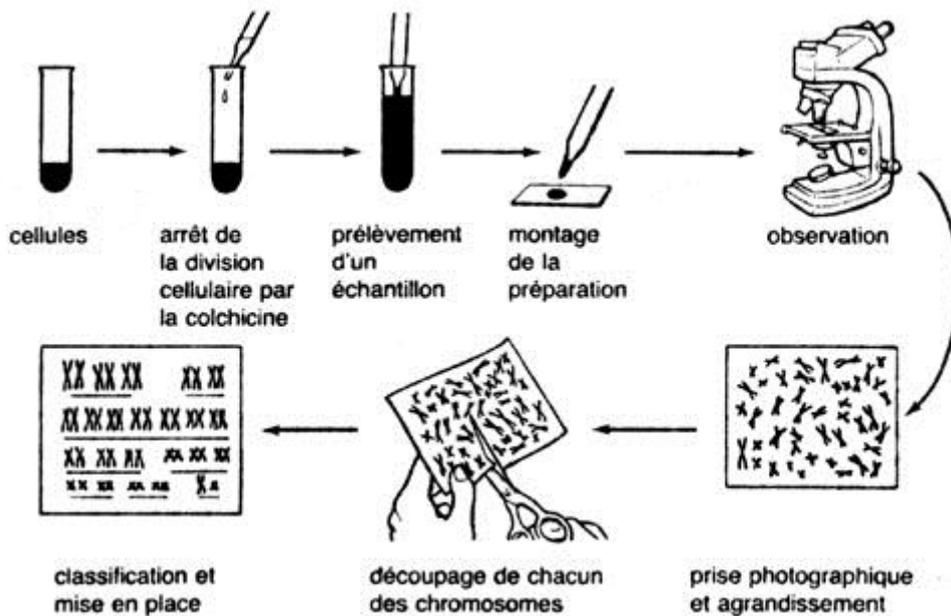
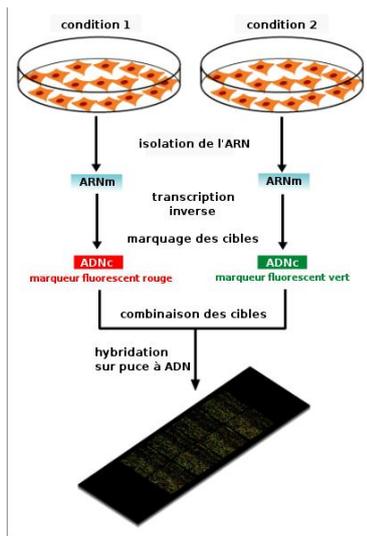
## B.2 Couple présentant un trouble de la fertilité ou des avortements spontanés à répétition

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

### B.3 Devant un remaniement de structure familial connu

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

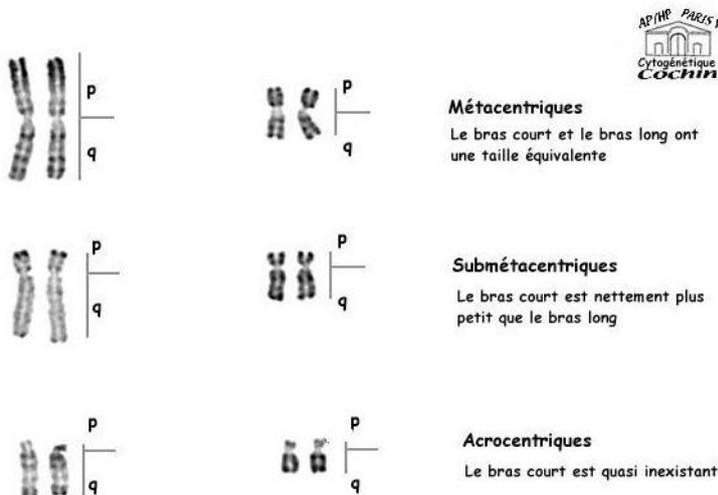
Le caryotype est également un examen essentiel au diagnostic et à la caractérisation de pathologies acquises dont les hémopathies et les tumeurs solides. Nous ne détaillerons pas ces indications qui ne relèvent pas de la cytogénétique constitutionnelle.



Les chromosomes appartenant à une même paire sont des homologues, ceux de paires différentes des hétérologues.

Lorsqu'ils sont classés en fonction de leur taille, et que leur morphologie est prise en compte, les chromosomes humains peuvent se répartir en 7 groupes: A (paires 1-3), B (4-5), C (6-12 et X), D (13-15), E (16-18), F (19-20) et G (21-22 et Y).

- Groupe A (grand métacentrique 1 à 3)
- Groupe B (grand submétacentriques 4-5)
- Groupe C (moyens submétacentriques 6 à 12 et chromosome X)
- Groupe D (moyens acrocentriques 13 à 15)
- Groupe E (petits submétacentriques 16 à 18)
- Groupe F (petits métacentriques 19-20)
- Groupe G (petits acrocentriques 21-22 et chromosomes Y)



#### Aspects morphologiques des chromosomes en fonction de l'indice centromérique

Avec les méthodes cytologiques utilisées jusque vers 1970, certains chromosomes pouvaient ne pas être complètement identifiables au sein d'un groupe.

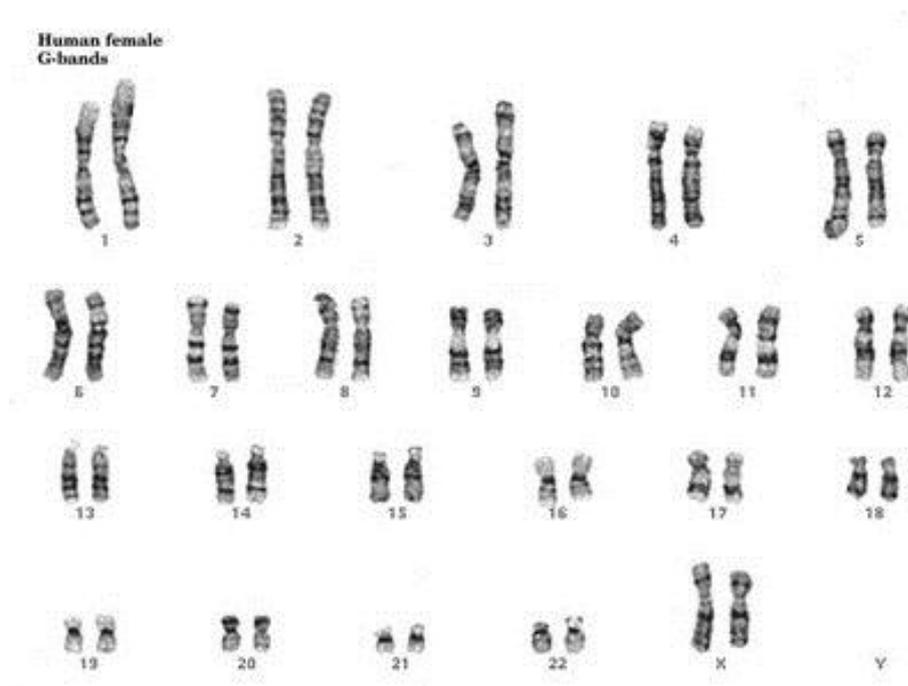
## 2.2 Bandes chromosomiques

Au début des années 1970 furent mises au point des techniques permettant d'obtenir des bandes sur les chromosomes (techniques de **banding** ou **zébrage**). Les principaux types en sont les **bandes Q** (pour quinacrine, nom du colorant utilisé) qui nécessitent l'observation en fluorescence, les bandes G (pour Giemsa, nom du colorant utilisé), obtenues le plus souvent après action de la trypsine mais dont il existe de nombreuses variantes, les **bandes R** (pour reverse) qui donnent un marquage inverse de celui des **bandes G** et les **bandes C** (pour centromère) qui marquent les régions péri-centromériques et la partie distale du chromosome Y. Les régions marquées par les bandes C correspondent à l'hétérochromatine, définie comme un type de chromatine condensée dans le noyau interphasique, où elle est colorée plus intensément que la chromatine décondensée ou euchromatine. On peut adjoindre l'étude des **bandes T** ou se colorent préférentiellement les régions télomériques des chromosomes et les techniques de coloration des satellites ou **NOR**.

Techniques de Bandes :

- Bandes Q (Quinacrine)
- Bandes G (trypsine + Giemsa)
- Bandes R (Reverse-Bands)
- Bandes C (Centromérique)
- Bandes T (Téломérique)

Après marquage Q, R et G, le chromosome présente une alternance de bandes claires et sombres dont la position, la succession, la dimension et l'intensité sont caractéristiques de chacun des chromosomes. Avec ces techniques, il devenait donc possible, non seulement de reconnaître individuellement chacun des chromosomes humains, mais encore de détecter des remaniements affectant de courts segments chromosomiques (perte d'une bande, délétion, ou son transfert sur un autre chromosome, translocation) et enfin de localiser précisément les points de cassure sur les chromosomes.



## Les techniques de fluorescence

1970 : Casperson

Coloration moutarde de quinacrine + observation en lumière UV

Apparition de bandes fluorescentes sur les chromosomes : bandes Q



*Figure : bandes Q*

Inconvénients :

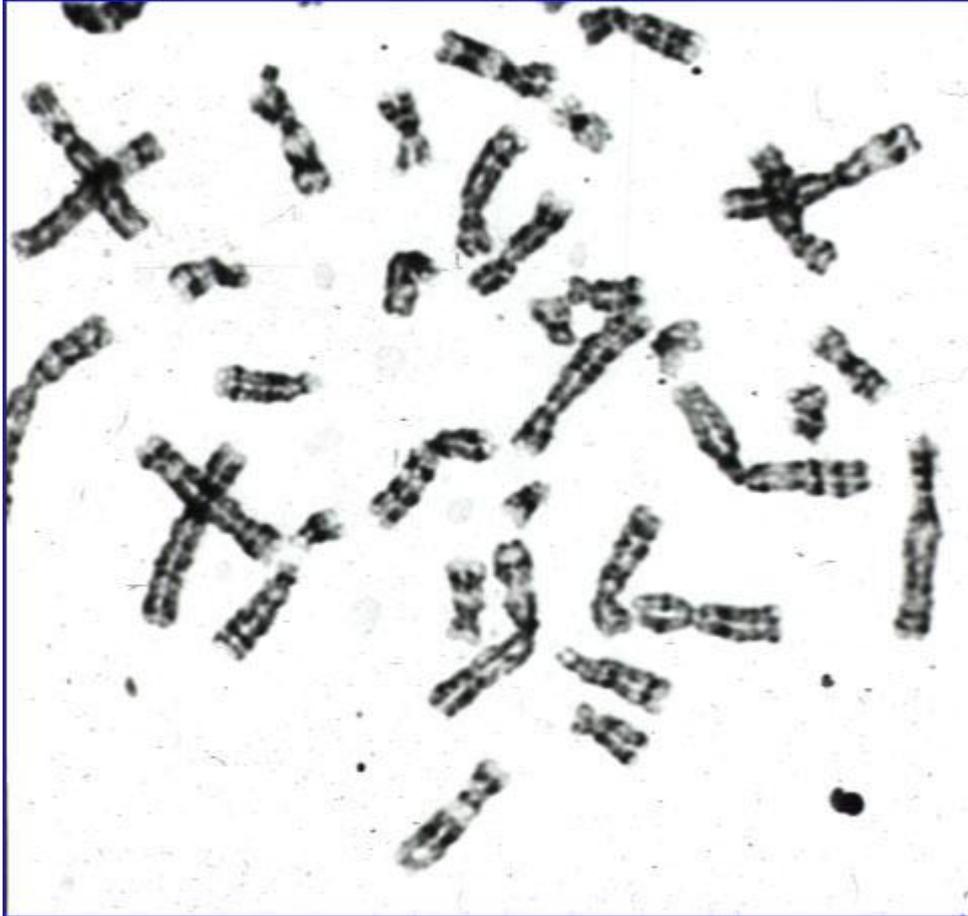
- télomères peu colorés
- préparations peu stables

### **VII.2.3. Les techniques de dénaturation**

Ces techniques comportent 2 étapes :

- séparation des 2 brins de l'ADN :dénaturation
- reconstitution de l'ADN bicaténaire : renaturation

*a) Bandes G (Fig)*



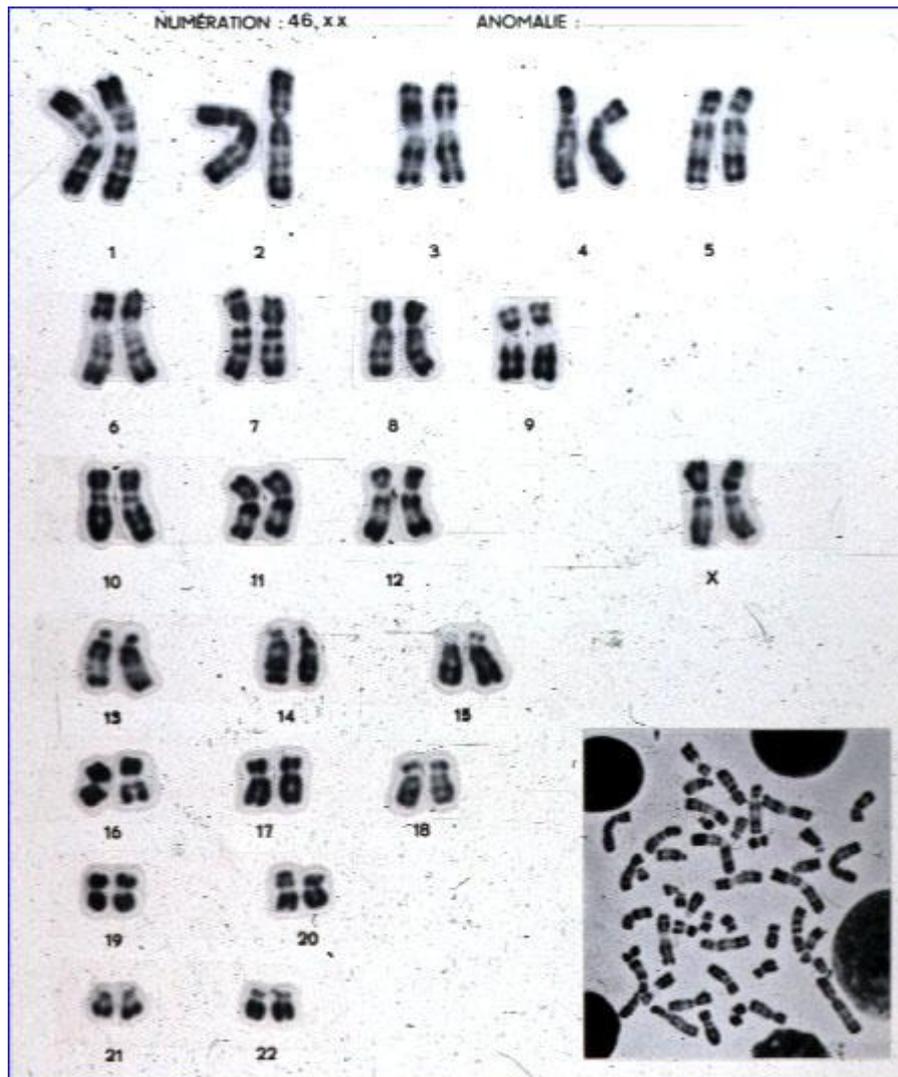
### *Bandes G*

- topographie superposable aux bandes Q
- chromosomes traités par l'action ménagée de la trypsine ou par incubation en solution saline à 60°C

Inconvénients : télomères pâles

Les bandes G et Q marquent des régions d'ADN riches en liaison A-T et correspondent à des centres de condensation précoces pauvres en gènes actifs.

***b) Bandes R : reverse band*** (Fig)



### *Bandes R*

- dénaturation thermique à 87° - solution de pH 5,8
- télomères bien colorés

Les bandes R sont riches en liaisons C-G, en gènes actifs à réplication précoce

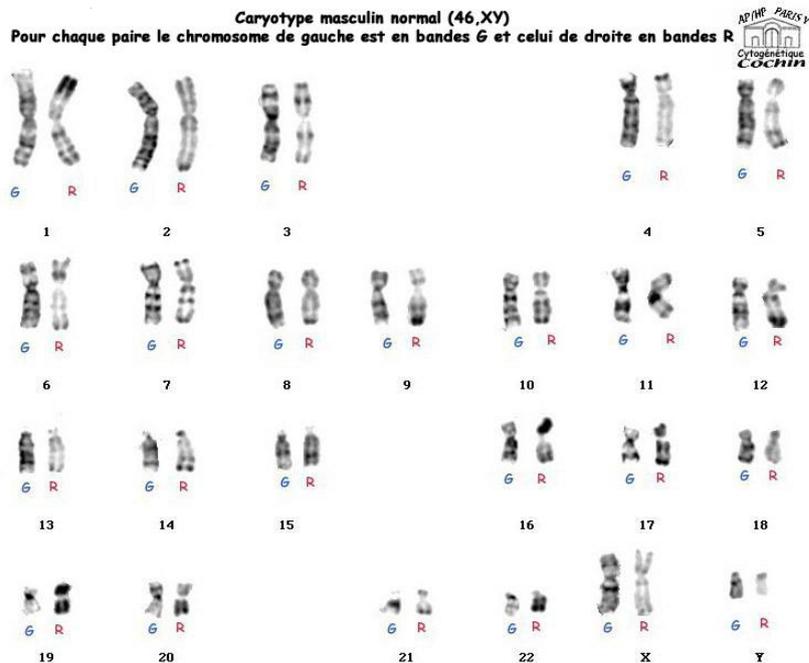
### *c) bandes T*

Une dénaturation thermique poussée ne laisse persister le marquage qu'au niveau des télomères

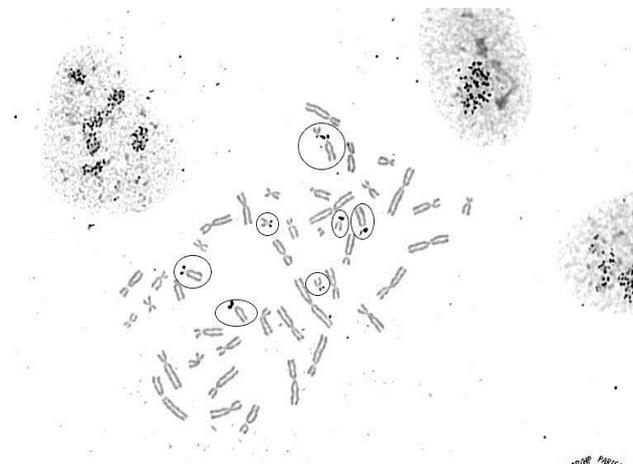
### *d) bandes C*

- mise en évidence des centromères, des constriction secondaires et de la partie distale du chromosome Y

- ces régions chromosomiques ont de l'ADN répétitif ou ADN satellite, à réplication tardive
- 10 à 15% du génome
- polymorphisme marqué +++



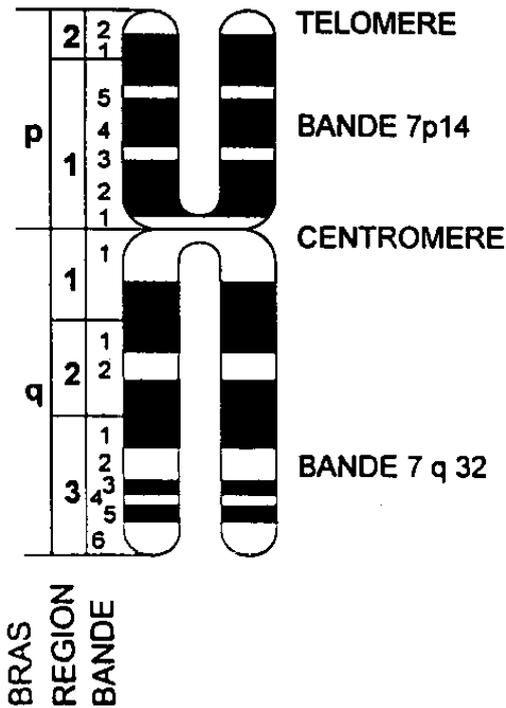
Métaphase en bandes C



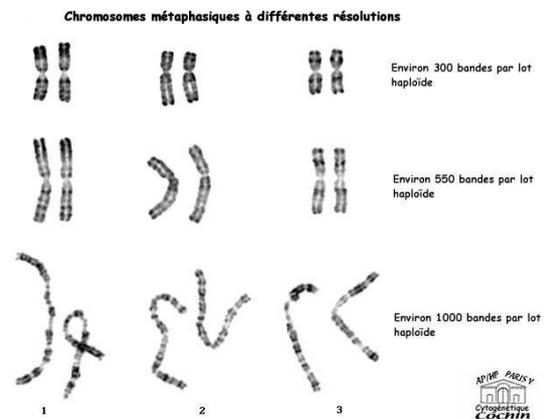
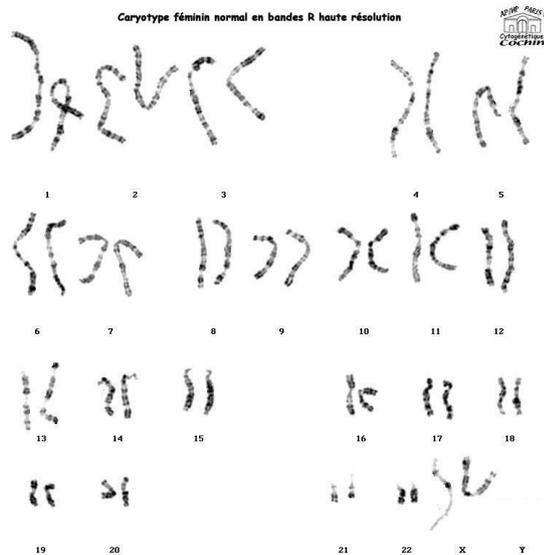
Métaphase après imprégnation argentique des organisateurs nucléolaires (Coloration NOR)

La première nomenclature internationale prenant en compte les bandes a été établie à la Conférence de Paris en 1971 (Paris Conference, 1971). Elle définit pour chaque chromosome la position des bandes, numérotées à partir du centromère, séparément sur chaque bras chromosomique. Par exemple, l'expression 1p32 désigne la bande 2 de la région 3 du bras court (p) du chromosome 1.

# CHROMOSOME 7



Le caryotype défini à la Conférence de Paris comprenait environ 330 bandes par génome neutre (22 autosomes + X), et une bande correspondait en moyenne 107 paires de bases d'ADN (10 Mb) environ. Cette dernière valeur montre que la puissance de résolution des études du caryotype est relativement limitée par rapport aux techniques de la biologie moléculaire qui permettent de pousser l'analyse jusqu'au niveau du nucléotide; en revanche, elles permettent de prendre en considération, en une seule analyse, l'ensemble du génome. Des techniques de synchronisation, plus résolutes, ont été développées dans le but d'obtenir des préparations de chromosomes prométaphasiques, à un stade plus précoce que les préparations ordinaires, lorsque les chromosomes sont moins condensés. Ces méthodes de haute résolution permettent d'obtenir des caryotypes ou 600, 800 ou 1 000, voire 2 000 bandes, peuvent être résolues par génome neutre.



Ces techniques se sont avérées particulièrement puissantes pour détecter des anomalies mineures du caryotype comme les microdélétions, définir plus précisément les points de cassures des translocations et localiser plus finement des gènes sur les chromosomes. Les nomenclatures de 1981, 1985, 1991 et 1995 (ISCN : International System for human Cytogenetic Nomenclature) tiennent compte de l'augmentation de la résolution du nombre de bandes qu'autorise la condensation moindre des chromosomes. Les sous bandes ainsi détectées sont numérotées à l'intérieur des bandes habituelles et indiquées après un point : par exemple, 7q31.32 désigne la deuxième bande fine de la sous-région 3 de la bande 7 q31.

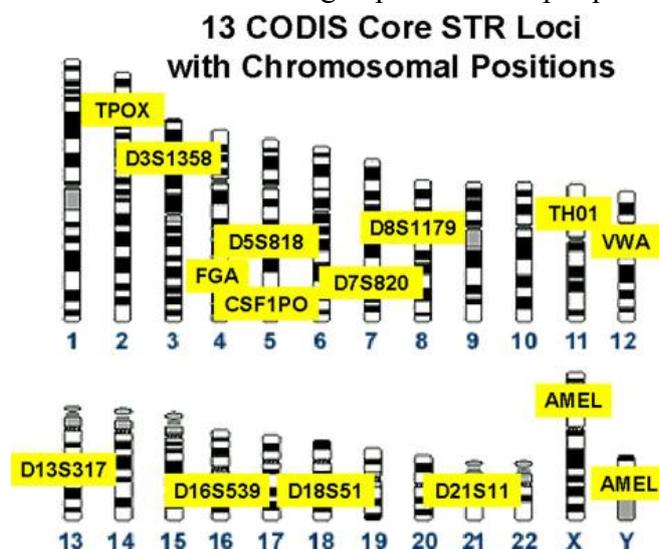
Malgré la relative imprécision des techniques de la cytogénétique, l'analyse des chromosomes s'est révélée extraordinairement efficace pour comprendre un certain nombre d'anomalies chromosomiques et leurs conséquences moléculaires.

### 2.3 Mécanismes de production des bandes

La signification biologique des bandes chromosomiques n'est pas encore totalement élucidée. Trois éléments ont été particulièrement considérés : la variation de la composition moyenne en bases le long de la molécule d'ADN, la précocité de la réplication de l'ADN, la richesse en gènes et leur activité. Les bandes G, colorées par le colorant de Giemsa, sont riches en AT, se répliquent tardivement, contiennent relativement peu de gènes et sont riches en séquences LINE ; les bandes R, colorées par le Giemsa, sont riches en bases GC, se répliquent précocement, contiennent de nombreux gènes et sont riches en séquences *Alu*.

### 2.4 Polymorphisme du caryotype humain

Il existe une variation normale de la morphologie de certains chromosomes humains, que l'on qualifie de polymorphisme pour traduire l'absence de liaison avec des anomalies phénotypiques. Un chromosome polymorphe est transmis comme un caractère mendélien codominant et peut donc servir de marqueur pour des études familiales. Les polymorphismes les plus fréquents concernent les régions hétérochromatiques et se traduisent par des différences de longueur particulièrement aisées à mettre en évidence avec les techniques de bandes Q sur divers chromosomes (par exemple, 3,4, 13-15,21-22 et Y) et de bandes C sur les régions hétérochromatiques des chromosomes 1, 9, 16 et Y. Il a été estimé que la longueur de 2 chromosomes homologues peut différer par plusieurs millions de paires de bases.



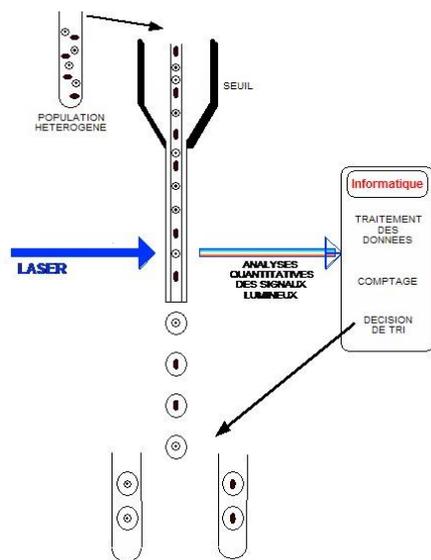
## 2.5 Sites fragiles

Les sites fragiles ont été définis à l'origine comme des lacunes non colorées visibles sur les deux chromatides d'un chromosome métaphasique. Les premiers décrits étaient le siège de cassures induites par l'emploi de différents traitements dans les cultures cellulaires in vitro. La présence/absence de certains de ces sites sur des homologues a été considérée comme ségrégant de façon mendélienne. Par la suite, la notion de site fragile a été étendue à des lacunes et des cassures des chromosomes, localisées de façon non aléatoire et induites par l'action de diverses substances et conditions de cultures. Il est commode de distinguer des sites fragiles communs révélés par action de l'aphidicoline ou encore par celle de la 5-bromo-2'-désoxy-uridine (BrdU), et des sites rares induits par les inhibiteurs du métabolisme des folates (comme le méthotrexate) ou la distamycine A (La distamycine A est un antibiotique peptidique qui se fixe également sur l'ADN riche en bases AT mais qui n'émet pas de fluorescence), d'autres étant BrdU dépendant.

Le nombre maintenant considérable de sites fragiles décrits chez l'homme et l'absence habituelle de rapport évident avec la pathologie conduit à considérer la plupart d'entre eux comme des variants chromosomiques. Cependant, l'exemple du syndrome de l'X fragile, correspondant au site fragile localisé sur la bande Xq27, montre que certains peuvent être associés à des situations pathologiques, essentiellement un retard mental et des dysmorphies dans ce cas.

## 2.6 Caryotype en flux

La cytométrie en flux est une technologie qui permet d'analyser les paramètres (taille, fluorescence) caractérisant des cellules en suspension. Appliqué à des préparations de chromosomes en suspension, cet ensemble de techniques a permis d'établir le caryotype en flux, en caractérisant individuellement les chromosomes en fonction de leur longueur relative et de leur contenu en ADN. En utilisant un seul fluorochrome, on obtient des histogrammes dont chaque pic correspond soit à des chromosomes isolés, soit à des groupes de chromosomes. La fluorocytométrie utilisant deux fluorochromes permet d'obtenir des caryotypes en flux plus précis puisque chacun des chromosomes humains (sauf les éléments 9 à 12 avec les appareils du commerce) correspond à un pic particulier. Outre son intérêt pour suivre, par exemple, le caryotype d'une lignée cellulaire, le caryotype en flux peut être suivi d'un tri permettant de recueillir chaque chromosome dans un pic défini. Cette possibilité de tri ouvre ainsi la voie à différentes applications, comme l'établissement de banques spécifiques de certains chromosomes ou la localisation de séquences d'ADN sur les chromosomes.



**Figure : Principe simplifié d'un cytomètre en flux**

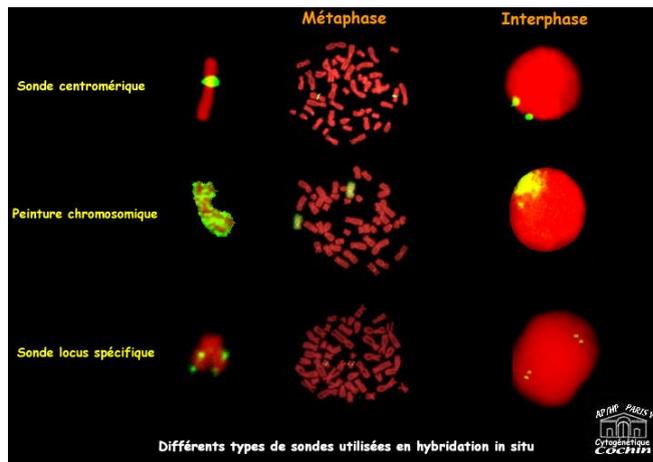
## 2.7 Hybridation in situ en fluorescence ou FISH

L'hybridation *in situ* sur chromosomes a d'abord été développée avec des sondes marquées radioactivement dans le but de localiser des gènes. Au cours des années 1980, des techniques de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), utilisant des sondes moléculaires associées à des fluorochromes, ont été mises au point. Les sondes peuvent correspondre à des séquences répétées ou uniques, ou à des inserts d'ADN génomique de plus grande taille contenus dans différents vecteurs comme des phages, des cosmides ou des chromosomes artificiels de levure (YAC, *yeast artificial chromosomes*).

La multiplicité des fluorochromes utilisables offre maintenant des moyens nouveaux qui permettent non seulement de localiser des gènes mais aussi d'analyser les anomalies de nombre et de structure des chromosomes. La possibilité d'employer simultanément plusieurs fluorochromes augmente en effet considérablement l'efficacité des techniques de FISH. L'hybridation sur chromosomes métaphasiques permet, par exemple, de détecter des anomalies de structure, notamment les translocations, soit en décorant un ou plusieurs chromosomes entiers avec des sondes spécifiques de ces chromosomes (*chromosome painting*), soit en utilisant des sondes moléculaires correspondant à des gènes ou à des séquences d'ADN dont la localisation sur les chromosomes est connue. On peut ainsi définir entre quels marqueurs moléculaires sont situés les points de cassure chromosomique et par conséquent les localiser, par référence à des cartes Chromosomiques connues. On peut aussi utiliser des séquences d'ADN de grande taille (contenues dans des cosmides ou des YAC) et qui renferment le point de cassure chromosomique. Alors que l'on voit un seul signal d'hybridation de la séquence sur chacun des chromosomes homologues normaux, on observe trois signaux dans les cas de translocation, puisque l'un des chromosomes a été scindé en deux par la translocation : un signal correspond à la partie de la séquence restée sur le chromosome donneur, l'autre à la partie transférée sur le chromosome receveur.

Cette cytogénétique moléculaire peut également être appliquée aux noyaux interphasiques pour détecter les anomalies de nombre des chromosomes. A cette fin, on utilise le plus souvent comme sondes des séquences alphas spécifiques de chaque chromosome (séquences de 171 pb répétées et disposées en tandem, homologues du satellite  $\alpha$  du singe

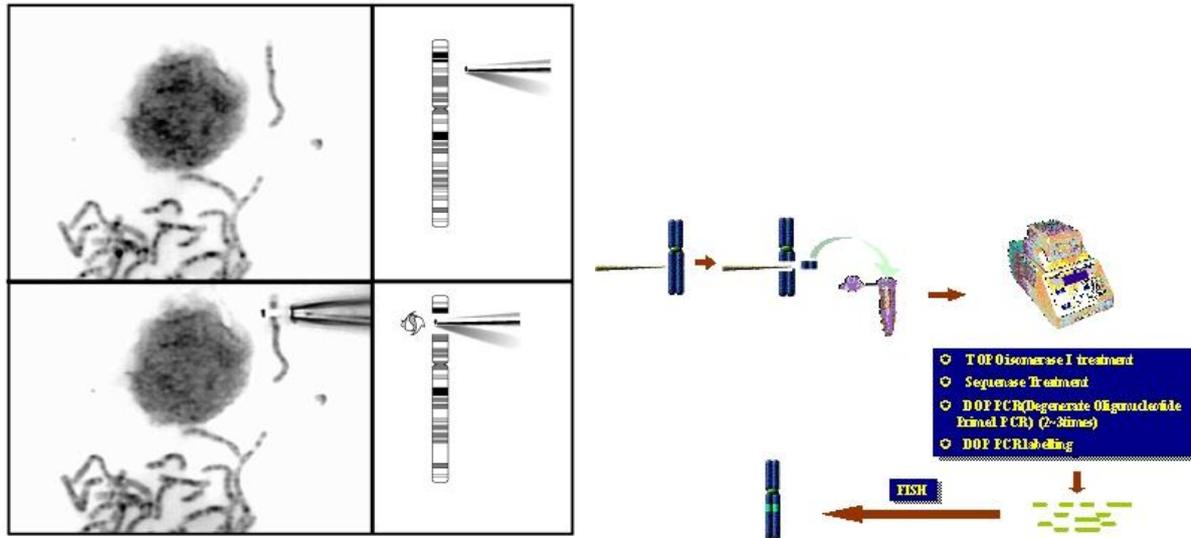
vert africain). Elles donnent autant de signaux d'hybridation, dans la région hétérochromatique jouxtant le centromère, qu'il y a d'exemplaires du chromosome étudié. Il est possible d'identifier aussi des remaniements de structure (translocations ...) en utilisant des sondes moléculaires correspondant à des séquences d'ADN situées à proximité des points de cassures colorées de façon différente, rouge et vert par exemple. Dans le caryotype normal, les deux signaux de chacune des deux couleurs, obtenus avec une sonde spécifique de chaque partenaire de la translocation, sont dispersés dans le noyau interphasique. En cas de translocation, un signal vert est accolé à un signal rouge si les sondes ont été convenablement choisies parmi des séquences d'ADN, c'est-à-dire à proximité du remaniement et du bon côté de la cassure. Lorsqu'une sonde unique renferme le point de cassure, il est aussi possible de détecter une translocation sur des noyaux interphasiques grâce à la présence de 3 signaux d'hybridation, au lieu de 2 dans le noyau normal.



## 2.8 Microdissection de chromosomes

Depuis quelques années, des techniques de microdissection de chromosomes ont été mises au point. Le but initial était d'isoler des fragments chromosomiques pour établir des banques d'ADN correspondant à de courtes régions de chromosomes, une bande par exemple. Un fragment déterminé de chromosome est isolé à l'aide d'un micromanipulateur parmi des chromosomes métaphasiques identifiés par leurs bandes. La bande est recueillie immédiatement dans une goutte préparée sur la lame et contenant les solutions nécessaires à l'isolement et la digestion de l'ADN. Celui-ci est ensuite cloné, en incluant les fragments de restriction dans un vecteur, ou amplifié par PCR. Il peut alors servir à préparer des banques spécifiques pour isoler des séquences d'intérêt, ou être utilisé comme sonde pour les FISH. Une variante technique consiste à détruire à l'aide d'un rayon laser tous les chromosomes d'une métaphase, à l'exception du fragment choisi.

La microdissection peut aussi être combinée avec le FISH pour identifier un chromosome marqueur ou un fragment de chromosome. Le chromosome, ou le fragment, est isolé par microdissection et son ADN est amplifié pour servir de sonde moléculaire. L'hybridation *in situ* sur chromosomes métaphasiques normaux permet alors d'identifier le ou les chromosomes portant cette séquence.

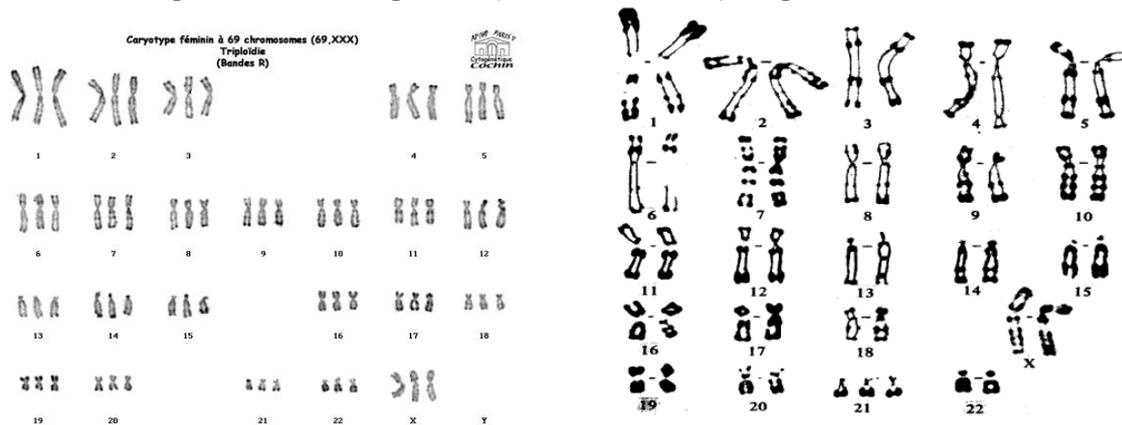


### III / TYPES D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

On distingue classiquement les anomalies de nombre et celles de structure. Les translocations robertsoniennes qui modifient le nombre de chromosomes sont fondamentalement des anomalies de structure.

#### 3.1 Anomalie de nombre

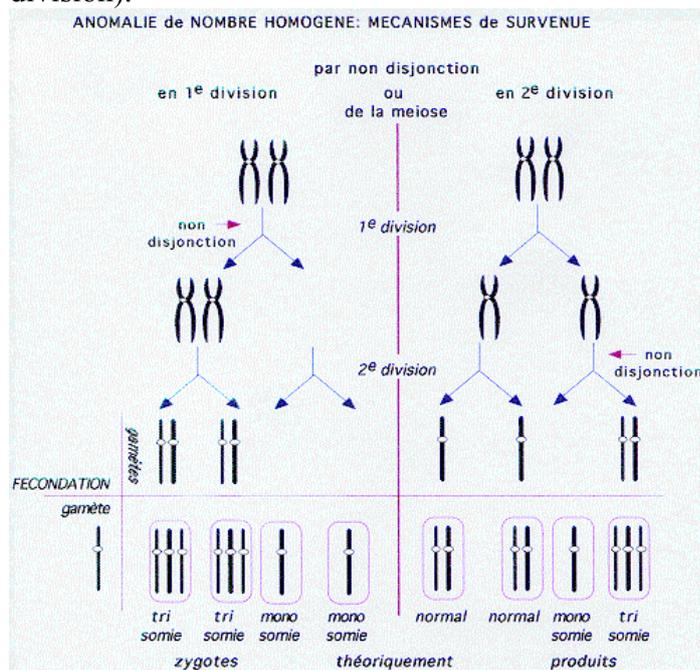
L'euploïdie correspond à un nombre de chromosomes qui est un multiple exact du nombre haploïde (23 chromosomes). L'état diploïde (46 chromosomes) est normal dans les cellules somatiques et dans les cellules germinales avant la méiose, l'état haploïde (23 chromosomes) dans les gamètes. Les cas de triploïdie (69 chromosomes) sont nombreux parmi les avortements spontanés, la tétraploïdie (92 chromosomes) est plus rare.



L'aneuploïdie, ou existence d'anomalies de nombre portant sur un ou quelques éléments de la garniture chromosomique, est plus fréquente. La cellule normale est disomique pour chaque autosome. La trisomie correspond à la présence de trois exemplaires d'un chromosome au lieu de deux dans le caryotype normal, la tétrasomie à la présence de quatre homologues, la monosomie à un seul exemplaire, la nullisomie à l'absence complète d'un chromosome. Des trisomies pour plusieurs chromosomes peuvent aussi être rencontrées. La notion d'aneuploïdie

peut être étendue aux gamètes, en utilisant les mêmes termes ; mais alors que la disomie est normale dans les cellules somatiques, la disomie gamétique est un état anormal.

Une trisomie provient de la non-disjonction des deux homologues lors de la première division méiotique ou de la non-disjonction des deux chromatides reliés au même centromère lors de la deuxième division méiotique. Si l'accident se produit à la première division, les gamètes disomiques ont des centromères provenant des deux chromosomes de l'individu, alors que si l'accident s'est produit à la deuxième division, les deux centromères proviennent du même chromosome. Il est donc possible en utilisant divers marqueurs (polymorphismes cytogénétiques des bandes C ou RFLP, par exemple) de déterminer à la fois l'origine parentale de la trisomie et le moment de l'accident méiotique (première ou deuxième division).



Les anomalies du nombre des chromosomes peuvent ne pas être homogènes et n'intéresser qu'une partie des cellules d'un individu. On distingue les mosaïques et les chimères.

Une mosaïque est définie par la présence d'au moins deux populations différentes de cellules issues du même zygote (œuf fécondé). Par exemple, la constitution 46,XY /47 ,XY,+21 définit un individu possédant une population cellulaire normale et une population cellulaire trisomique 21, la seule différence entre les deux populations étant la présence d'un chromosome 21 en excès dans les cellules à 47 chromosomes. Un individu mosaïque peut résulter de deux types de non-disjonction mitotiques : ou le zygote était trisomique 21 et une cellule, devenue disomique à la suite d'une non-disjonction, est à l'origine de la population cellulaire avec deux chromosomes 21, ou le zygote était initialement disomique 21 et une partie de la population est devenue trisomique à partir d'une cellule ayant subi une non disjonction. On admet, dans ce cas, que la réciproque (cellule monosomique 21), peu viable, n'a pas donné la population cellulaire monosomique 21 attendue.

Une chimère est définie par la présence de deux populations cellulaires (ou plus) provenant de deux zygotes différents. C'est le cas, par exemple, de certaines constitutions 46,XX/46,XY provenant de la fécondation de deux ovocytes suivie de la fusion des deux zygotes. Les deux

populations diffèrent dans ce cas, non seulement par les chromosomes sexuels, mais aussi par les autosomes qui ne possèdent donc pas nécessairement les mêmes allèles

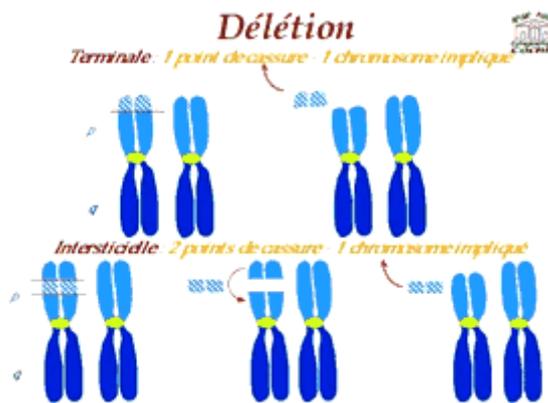
### 3.2 Anomalie de structure

Les anomalies de structure sont diverses et se traduisent par des variations de la longueur des chromosomes, de la position de leur centromère et/ou de la disposition des bandes. Elles concernent un seul ou plusieurs chromosomes.

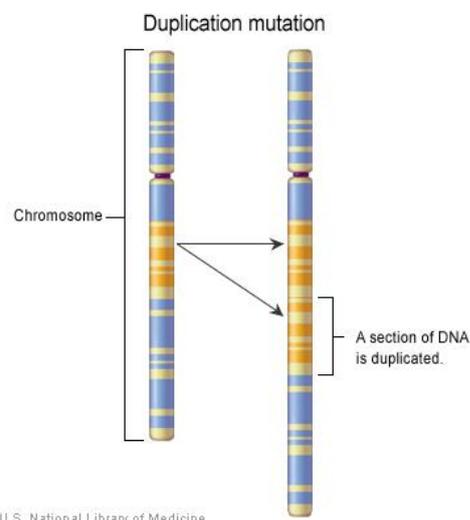
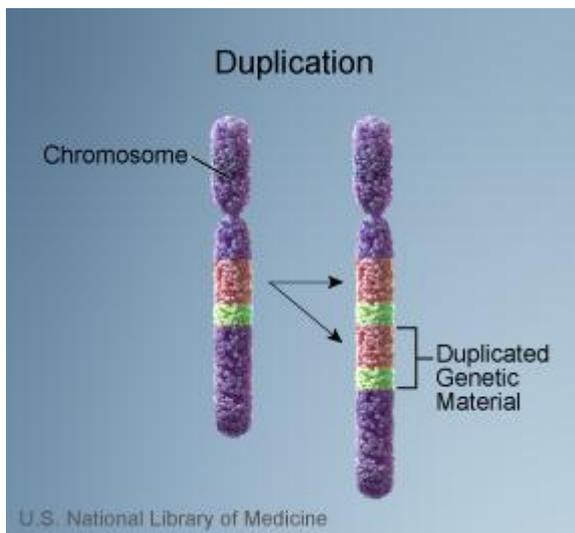
#### 3.2.1 Anomalies impliquant un seul chromosome

Les principaux types d'anomalies de structure affectant un seul chromosome.

- **Délétion (del) ou déficience** : l'absence du segment chromosomique peut être interstitielle ou paraître terminale. En théorie, du fait de l'existence des télomères, toute délétion devrait être interstitielle.



- **Duplication (dup)** : un segment chromosomique est présent en double exemplaire.

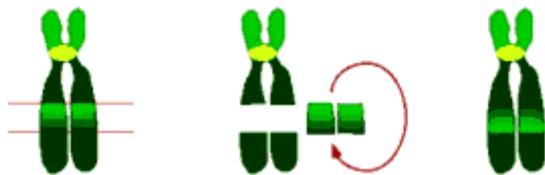


Les délétions et les duplications sont aussi qualifiées respectivement de monosomies et trisomies partielles.

- **Inversion (inv)** : le remaniement est consécutif à une double cassure suivie de recollement après retournement à  $180^\circ$  du segment chromosomique encadré par les cassures. Elle est péricentrique si elle comprend le centromère, paracentrique dans le cas contraire. La totalité du matériel génétique est conservée et l'inversion n'est en général pas délétère par elle-même, sauf si les cassures se produisent dans des régions vitales du génome. Cependant, les recombinaisons méiotiques chez des individus hétérozygotes de structure, comportant un chromosome normal et un chromosome inverse, peuvent aboutir à la formation de gamètes déséquilibrés, ce qui constitue le risque principal des inversions chromosomiques dans l'espèce humaine. Le mot déséquilibré désigne le fait que la garniture haploïde du gamète, ou la garniture diploïde du zygote qui en résulte, ne possède pas le contenu normal en matériel génétique et comporte des duplications et/ou des pertes de ce matériel.

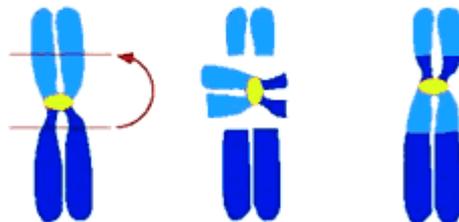
### *Inversion paracentrique*

2 points de cassure - 1 chromosome impliqué



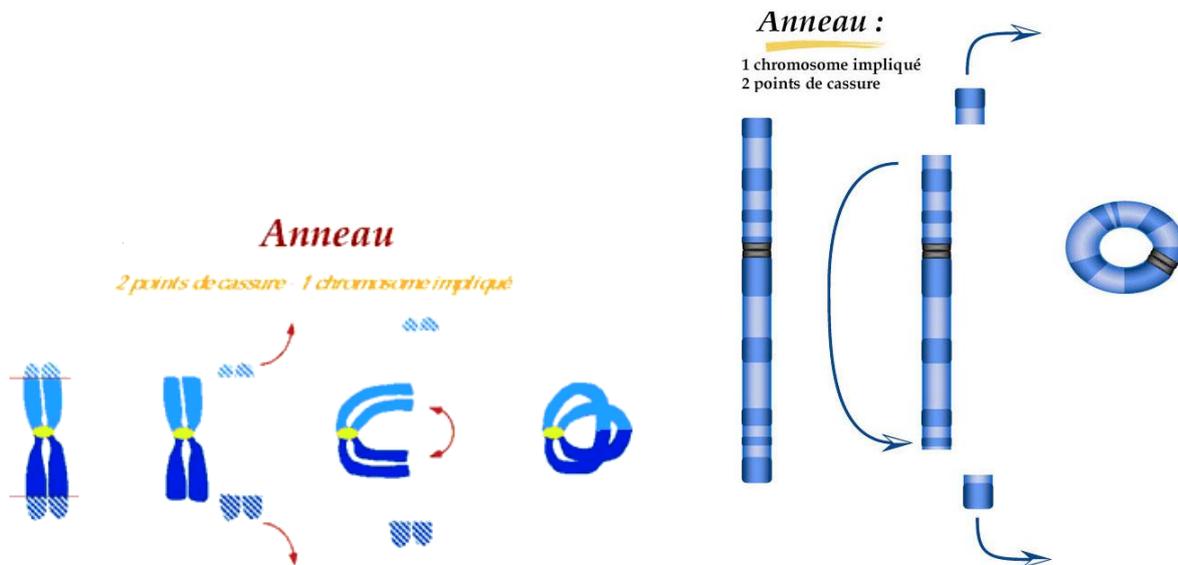
### *Inversion péricentrique*

2 points de cassures - 1 chromosome impliqué



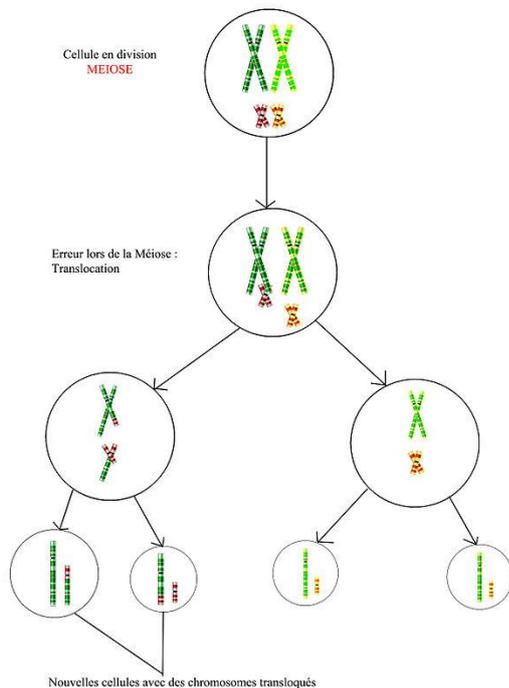
-**Isochromosome (i)** : cette structure fait suite à la duplication d'un bras chromosomique et à la perte de l'autre bras du même chromosome. Il existe donc des isochromosomes pour le bras court et des isochromosomes pour le bras long. Ils résultent classiquement d'une cassure transversale au niveau du centromère, mais les techniques récentes ont permis de montrer que certains isochromosomes étaient en fait dicentriques (dic), résultant de cassures proches du centromère suivies de recollement.

-**Chromosome en anneau (r)** : les anneaux sont le résultat d'une double cassure suivie de recollement des extrémités et leur formation est accompagnée d'une double délétion. Un anneau centrique est pourvu d'un centromère, un anneau acentrique dépourvu. Toute structure en anneau est instable du fait des remaniements qui s'y produisent au cours des mitoses successives. Les anneaux acentriques quant à eux sont rapidement perdus au cours des divisions cellulaires.

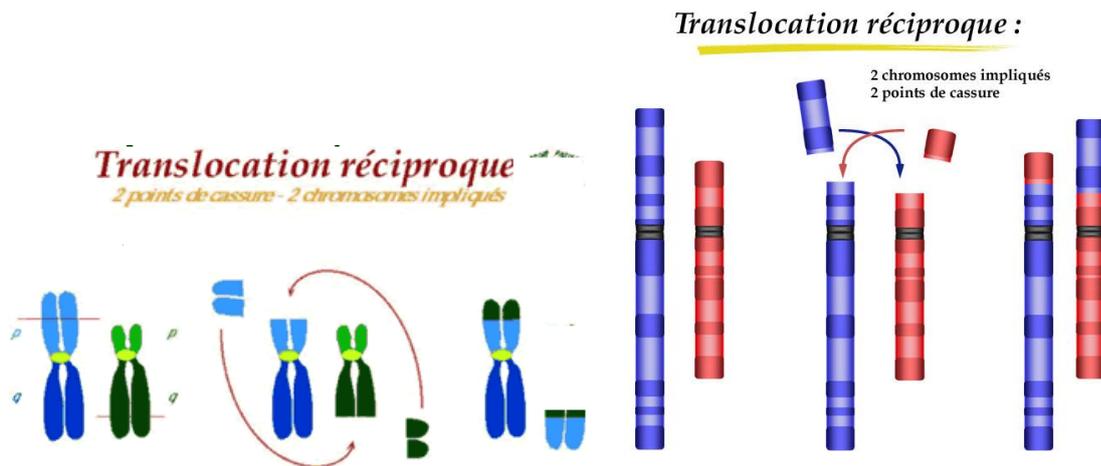


### 3.2.2 Anomalies impliquant plusieurs chromosomes

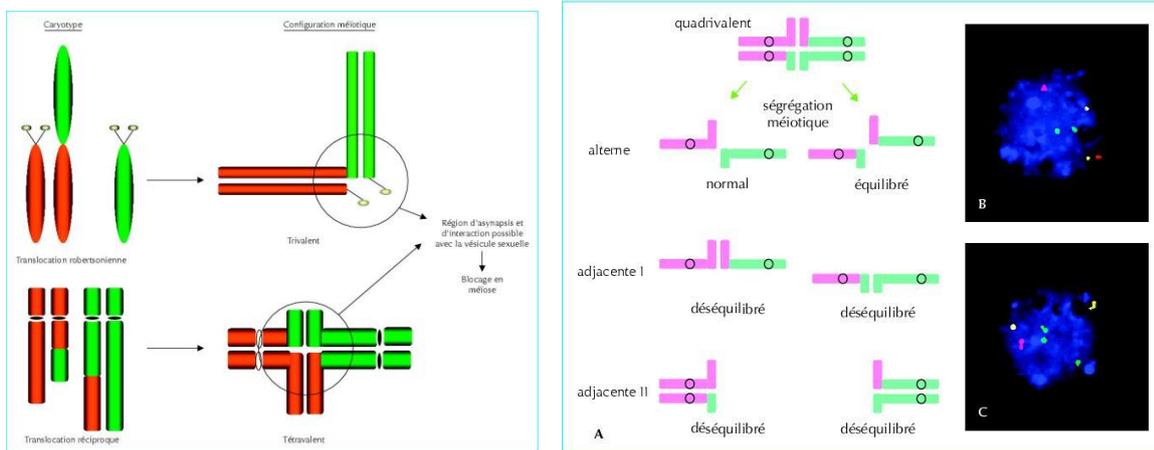
Les plus fréquentes sont les translocations (t), qui correspondent au transfert d'un segment de chromosome sur une autre région du génome; il en existe plusieurs types.



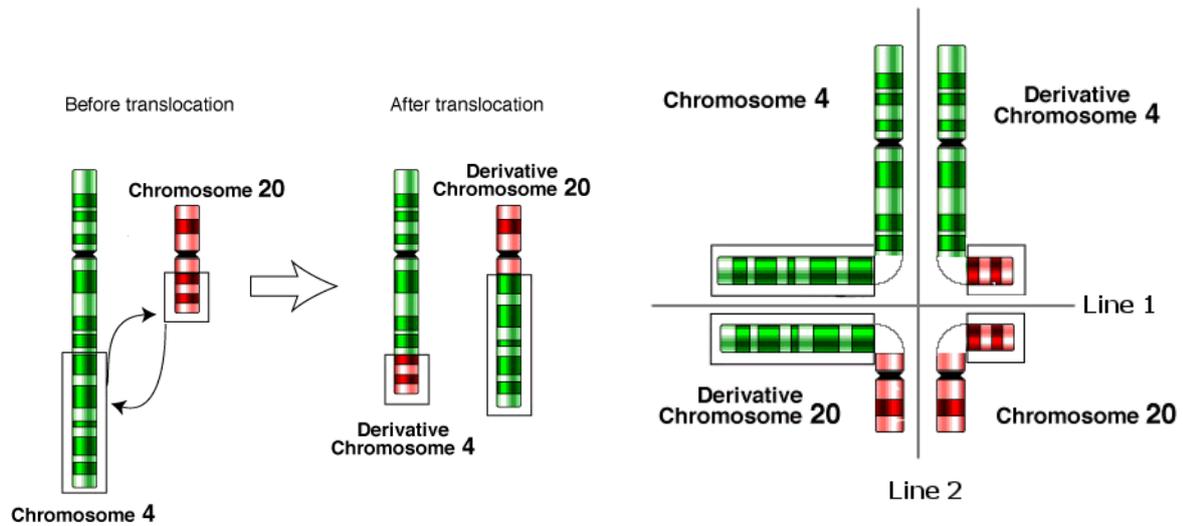
**-Translocation réciproque (trcp) :** c'est un échange de matériel entre deux chromosomes n'appartenant pas à la même paire. Il en résulte la formation de nouvelles séquences d'ADN au niveau des points de recollement. Une translocation de ce type peut être équilibrée s'il n'y a pas d'altération quantitative du matériel génétique ou déséquilibrée dans le cas contraire (monosomie, trisomie partielle).



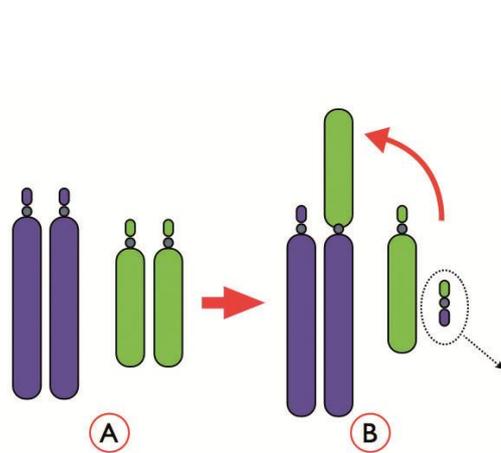
L'étude de la ségrégation méiotique des translocations réciproques équilibrées explique les risques qu'elles représentent pour la descendance. L'appariement des chromosomes normaux et transloqués aboutit lors de la méiose à une figure quadriradiale.



Trois types de ségrégation de cette structure sont possibles : l'un, alterne, donne deux types de gamètes équilibrés (normaux et porteurs de la translocation équilibrée) ; les deux autres, adjacente 1 et adjacente 2, aboutissent à la formation de gamètes déséquilibrés. La distinction adjacente 1/2 se fait sur la nature des centromères qui migrent dans la même cellule fille. Après fécondation, il y aura donc en théorie six types de zygotes possibles, dont deux seulement ont un contenu génétique équilibré. En pratique, les risques de déséquilibre qui surgissent des ségrégations adjacentes dépendent de plusieurs facteurs tels que les chromosomes en cause, les points de cassure de la translocation, la position des chiasmas, et de facteurs sélectifs.



**-Translocation robertsonienne (trob), ou fusion centrique :** c'est la fusion apparente de deux chromosomes acrocentriques (paires 13 à 15 et 21-22) qui aboutit à la formation d'un chromosome métacentrique. Si elle est équilibrée, elle est associée à une hypodiploïdie (45 chromosomes avec la perte apparente de deux acrocentriques et le gain d'un métacentrique). La ségrégation des translocations robertsoniennes est exposée avec la trisomie 21.

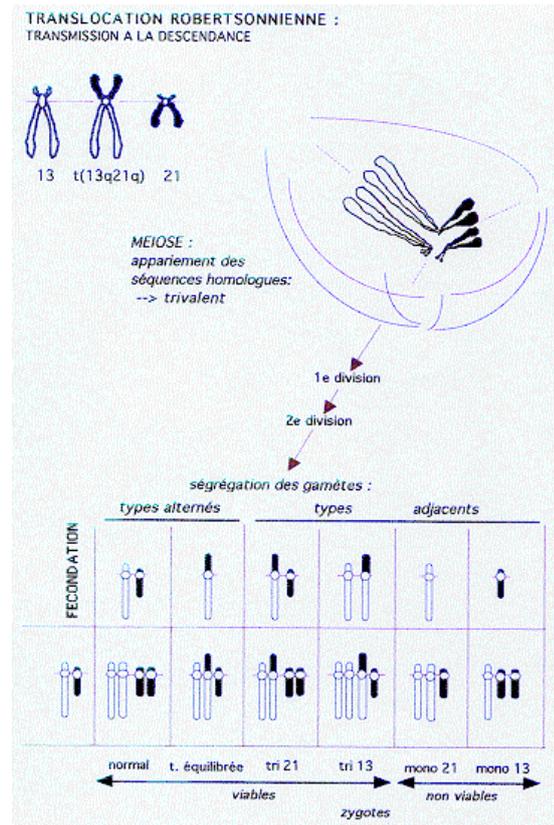
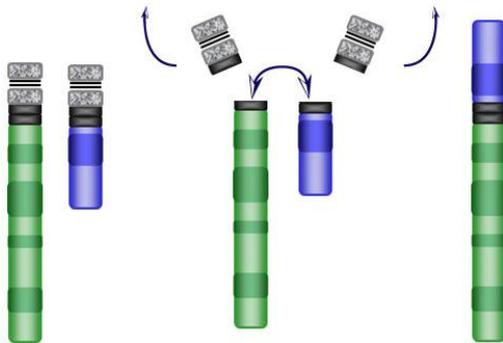


**Fig 4 - Translocation robertsonienne.**  
Le risque d'avortements spontanés est estimé à 20-33% chez les couples présentant une translocation robertsonienne.



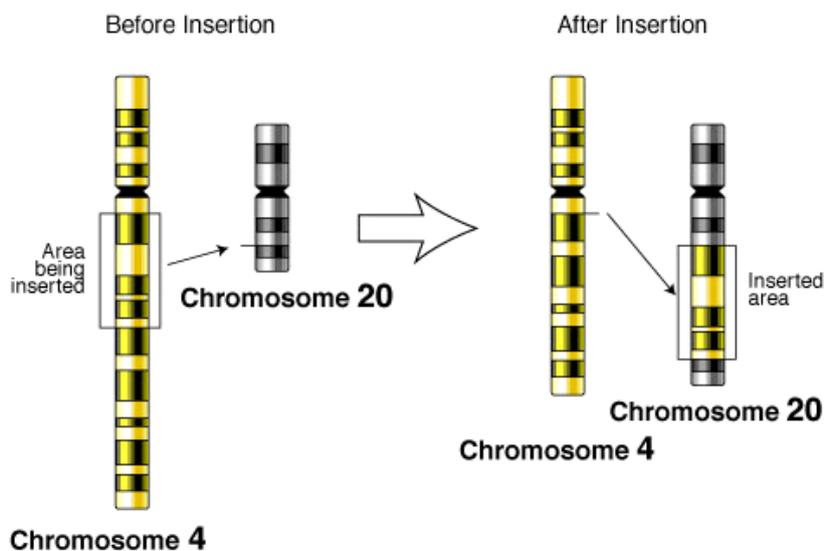
## Translocation robertsonienne :

2 chromosomes impliqués  
2 points de cassure  
perte des bras courts



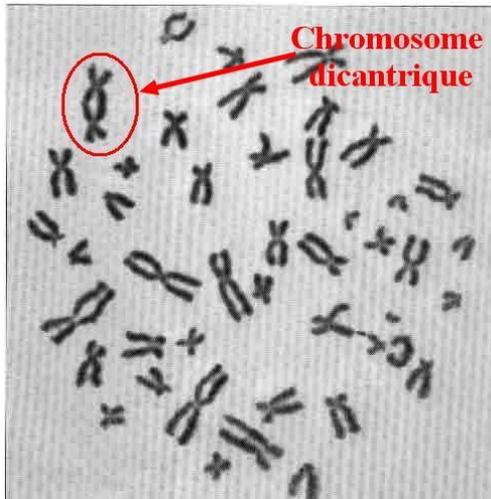
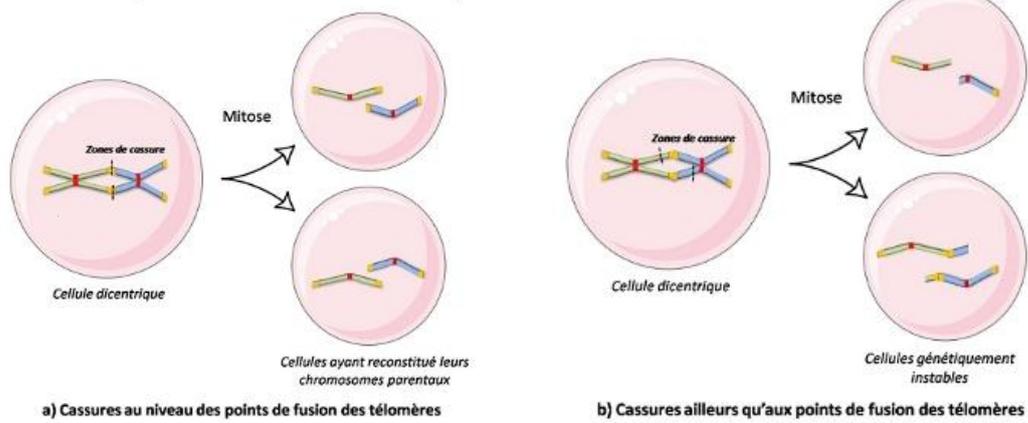
-**Translocation complexe** : elle implique des segments chromosomiques venant de plus de deux chromosomes différents.

-**Insertion (ins)** : elle correspond au transfert d'un segment de chromosome dans un autre, homologue ou hétérologue.

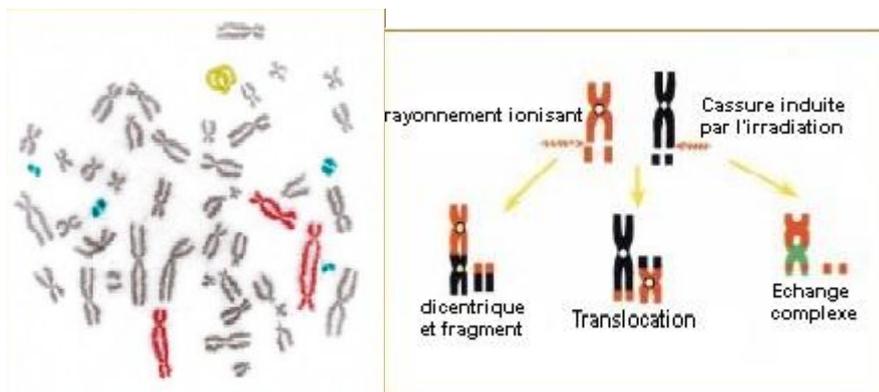


-**Chromosomes dicentriques (dic) ou pluricentriques** : ce sont souvent des anomalies acquises instables.

**Schéma 2 : conséquences d'une mitose sur une cellule dicentrique**



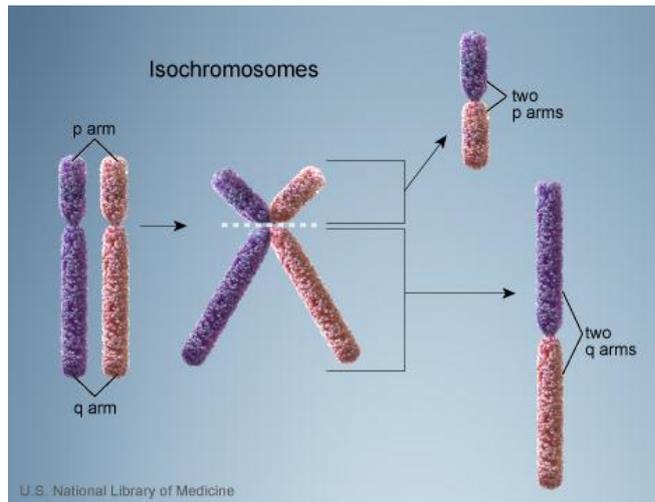
**On peut observer le caryotype d'un lymphocyte humain irradié et le schéma d'exemple d'échanges des chromosomes pouvant être observé lors d'une exposition aux rayonnements ci desous:**



## -Les Isochromosomes

Un isochromosome est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec perte de l'autre bras. Il peut être monocentrique ou dicentrique selon le mécanisme de formation. L'isochromosome le plus souvent rencontré est l'isochromosome pour le bras long de l'X qui constitue une variante cytogénétique du syndrome de Turner.

Un isochromosome peut remplacer un chromosome normal, ou coexister avec les deux chromosomes normaux de la même paire réalisant alors une tétrasomie pour le bras dupliqué.



Chez l'homme, les anomalies chromosomiques sont de deux types bien différents, constitutionnelles ou acquises. Les premières concernent les anomalies présentes dans le zygote et transmises à toutes les cellules de l'individu (à l'exception des mosaïques et des chimères), les secondes sont limitées à certaines cellules ou certains tissus. Elles sont présentées successivement.

## IV / ANOMALIES CONSTITUTIONNELLES

Les anomalies chromosomiques constitutionnelles sont étudiées dans des contextes divers : recherche d'une anomalie chromosomique chez un enfant ou un sujet atteint de retard mental et de malformations, chez un sujet ayant des anomalies du développement sexuel, chez des couples présentant des avortements spontanés à répétition, ou encore dans des familles où une anomalie est déjà connue. L'investigation est effectuée dans un contexte postnatal (recherche d'une translocation familiale, par exemple) ou prénatal. Les problèmes proprement médicaux posés par l'existence de ces anomalies ne sont pas développés, et seuls sont envisagés quelques aspects intéressant le généticien.

D'une manière générale, la plupart des anomalies chromosomiques constitutionnelles déséquilibrées (trisomies ou monosomies totales ou partielles) ont pour conséquence des anomalies de dosage génique. C'est là une caractéristique fondamentale les opposant aux maladies par mutation génique (anomalies qualitatives du message héréditaire). Les anomalies autosomiques déséquilibrées sont caractérisées au plan phénotypique par l'association de déficience mentale de degré variable et de dysmorphies et/ou de malformations suffisamment

caractéristiques de chacune d'elles pour que l'on puisse les identifier à l'examen clinique. Les anomalies de structure équilibrées, quant à elles, ne sont généralement pas associées à des maladies mais posent la question du risque de transmission sous forme déséquilibrée à la génération suivante.

La fréquence des anomalies chromosomiques chez l'homme est très différente selon que l'évaluation est effectuée à la naissance chez les nouveau-nés vivants, dans les avortements spontanés, ou à l'âge adulte. Globalement la fréquence des anomalies chromosomiques est de l'ordre de 0,7 % chez les nouveau-nés vivants, de 7 % au moins chez les enfants décédés dans la période périnatale, et de 50 % environ dans les avortements spontanés précoces survenant avant le troisième mois de gestation. Le tableau donne une estimation de la prévalence des anomalies chromosomiques établie à partir de nombreuses études menées par différents groupes. Le taux d'anomalies chromosomiques varie aussi chez les nouveau-nés vivants avec l'âge maternel : de l'ordre de 0,3 % pour les femmes de 35 ans, la fréquence atteint 2,5 à 3 % à 45 ans

## **4.1 Anomalies autosomiques**

L'exposé se limite aux anomalies autosomiques viables les plus fréquentes et à leurs caractéristiques génétiques, notamment à leur origine, à leur transmission et aux risques encourus.

### **4.1.1 Trisomies**

Les trisomies sont les anomalies numériques autosomiques constitutionnelles les plus fréquentes chez l'homme et celle du 21 est la plus fréquente des trisomies autosomiques (1,3 p. 1 000 naissances vivantes). Son phénotype très particulier associe une dysmorphie caractéristique (aspect du faciès avec un épicanthus et une orientation des fentes palpébrales évoquant une morphologie asiatique, qui a fait donner indûment à ces sujets le nom de mongoliens), des malformations dont les plus fréquentes sont cardiaques et digestives, et une débilité mentale de degré variable qui entraîne des difficultés d'intégration lorsque les trisomiques 21 parviennent à l'âge adulte, du fait de leur absence d'autonomie.

L'anomalie habituelle est une trisomie 21 libre correspondant au caryotype 47,XY ou XX,+21 (95 % des cas). Elle résulte d'une non-disjonction méiotique qui a pu se produire lors de la première ou de la deuxième division. En dehors de l'effet de l'âge maternel, les facteurs à l'origine de ces non-disjonctions ne sont pas bien compris. Plus exceptionnellement, la trisomie 21 résulte de la ségrégation adjacente d'une translocation (2-3 % des cas) en général robertsonienne, le plus souvent t(14;21)(q10;q10), plus rarement t(21;22)(q10;q10). Enfin, dans les rares cas de trisomie 21 en mosaïque (2-3 % des cas), l'origine de la non-disjonction est mitotique.

Les relations entre trisomies et phénotypes ne sont pas élucidées. Il n'y a pas de différences de phénotype entre les trisomies libres et celles par translocation. Cependant, parmi ces dernières, des trisomies partielles sont possibles et revêtent un grand intérêt. Il ressort en effet de l'étude des trisomies partielles que la région 21q22.2-21q22.3 du chromosome 21 est critique pour réaliser le phénotype anormal. Certains chercheurs fondent beaucoup d'espoir sur une cartographie détaillée du bras long du chromosome 21 qui pourrait être mise en parallèle avec la présence ou l'absence des différents traits phénotypiques.

Les translocations sont de deux types différents selon le chromosome partenaire du 21. Les translocations impliquant un 14 (ou un 13 ou un 15) sont familiales dans environ la moitié des cas. Un parent porteur d'une translocation t(14;21) équilibrée peut produire six types de gamètes différents: deux normaux avec un 14 et un 21 libres, ou avec une translocation t(14;21) équilibrée ; deux anormaux porteurs de la translocation et d'un chromosome libre 14 ou 21 (disomiques 14 et 21 respectivement) ; deux anormaux correspondant à leur réciproque avec nullisomie 21 et 14. Après fécondation, six types de zygotes sont théoriquement possibles ; en pratique, seules trois possibilités sont observées (zygote normal, zygote porteur de la translocation équilibrée, trisomique 21 par translocation), les autres combinaisons étant probablement incompatibles avec la vie. Le risque de naissance d'un enfant trisomique 21 est dans ce cas de 10-15 % si la translocation est d'origine maternelle et inférieur à 5 % si elle est d'origine paternelle. Les translocations t(21;21) et t(21;22) sont sporadiques dans 95 % des cas environ. Il est important de déceler les rares translocations t(21;21) équilibrées, car le risque de naissance d'un enfant trisomique 21 est de 100 % puisqu'après la fécondation, les deux types de gamètes, disomiques et nullisomiques 21, donnent des zygotes trisomiques 21 et des monosomiques 21 non viables.

Les autres trisomies fréquentes à la naissance sont celles du 18 (0,1-0,3 p. 1 000 naissances vivantes) et du 13 (0,1 p. 1000 naissances vivantes). Il s'agit habituellement de trisomies libres, mais les trisomies 13 peuvent aussi être la conséquence d'une translocation robertsonienne équilibrée chez l'un des parents. Dans les avortements spontanés précoces, on observe également la trisomie 16, incompatible avec la survie in utero. Bien d'autres trisomies autosomiques, complètes ou partielles, ont été décrites et les anomalies phénotypiques qui leur sont associées sont souvent suffisamment caractéristiques ou évocatrices pour qu'elles puissent être affirmées ou suspectées au seul examen clinique.

Aucune monosomie autosomique complète n'est compatible avec la vie, mais on connaît maintenant de nombreux syndromes associés à des délétions partielles.

#### **4.1.2 Délétions**

Les délétions partielles autosomiques sont beaucoup plus rares que les trisomies. L'une des premières décrites chez l'homme est la **maladie du cri du chat** (qui doit son nom au cri particulier du nourrisson porteur de l'anomalie), résultant d'une délétion partielle du bras court du chromosome 5. Elle associe en outre une dysmorphie particulière et une débilité mentale profonde, mais ne comporte pas habituellement de malformation viscérale incompatible avec la survie jusqu'à l'âge adulte. La délétion est de taille variable selon les sujets, mais la région critique, commune à toutes les délétions, correspond à la bande 5p15. L'anomalie, le plus souvent sporadique, peut aussi résulter d'une translocation équilibrée portée par l'un des parents.

D'autres délétions partielles ont été décrites, les plus fréquentes sont celles du bras long du 18 (18q-), qui peut être reconnue cliniquement, et celles du bras court du 18 (18p-). L'emploi des techniques de bandes à haute résolution a permis de décrire un certain nombre de microdélétions associées à des syndromes particuliers, parfois désignés comme syndromes de gènes contigus pour montrer que les anomalies résultent de l'implication de plusieurs gènes différents. Parmi ces microdélétions, on peut citer celle de la sous-bande 8q24.1, associée au **syndrome de Langer-Giedion**, et de la sous-bande 17p13.3, associée au **syndrome de Miller-Dieker**.

La délétion 15q11-ql3 est associée soit au **syndrome d'Angelman**, soit au **syndrome de Prader-Willi**. Ce dernier, qui regroupe une débilité mentale légère, une hypotonie, un hypogonadisme et une obésité, est cliniquement très différent du syndrome d'Angelman, qui associe un retard mental sévère avec une absence de développement du langage et des crises d'épilepsies. Or les anomalies cytogénétiques sont apparemment identiques puisque l'on trouve la même délétion partielle de l'un des chromosomes 15 dans environ 75 à 80 % des cas (voir ci-après pour les autres cas). Cette identité est confirmée au plan moléculaire par la perte des mêmes marqueurs. La différence entre les deux réside dans le fait que le syndrome de Prader-Willy résulte de la perte de matériel génétique du 15 provenant du père, alors que la perte concerne le 15 maternel dans le syndrome d'Angelman. Les contributions des deux parents ne sont donc pas équivalentes pour cette partie du génome et l'on rapporte ce fait à des différences épigénétiques, dénommées empreinte parentale, qui rendent silencieux l'un des deux allèles des gènes correspondants. Tout se passe alors comme si la cellule était hemizygote pour le ou les gènes considérés.

### **4.1.3 Isodisomie parentale**

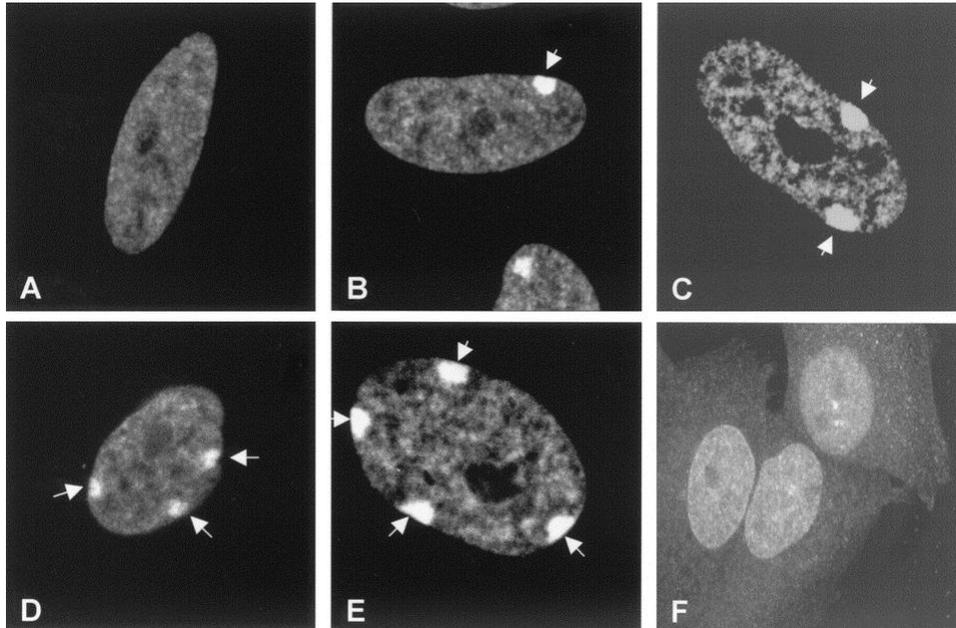
Chez 20 % des patients porteurs de l'un des deux syndromes décrits précédemment, le caryotype est normal et on peut confirmer l'absence de délétion avec les méthodes de la biologie moléculaire. Il a été démontré que, dans ces cas, les anomalies sont liées au fait qu'un seul parent a apporté le chromosome 15 en double exemplaire. Lorsque cette disomie uniparentale provient d'une contribution paternelle, il en résulte un syndrome d'Angelman ; lorsqu'elle provient d'une contribution maternelle, il en résulte un syndrome de Prader-Willy. Ces deux syndromes sont devenus en quelques années des modèles de référence pour l'empreinte génétique et l'unidisomie parentale.

La contribution d'un seul parent - présence d'un seul de ses chromosomes à l'état dupliqué (**isodisomie**) ou de ses deux homologues (**hétérodisomie**) a été décrite pour d'autres régions chromosomiques, par exemple pour le chromosome 7, mais elle ne semble pas avoir toujours des conséquences pathologiques.

## **4.2 Anomalies des chromosomes sexuels**

Les anomalies des chromosomes sexuels sont fréquentes dans l'espèce humaine. Ce sont surtout des aneuploïdies, mais il existe aussi des anomalies de structure, particulièrement importantes pour comprendre les mécanismes de la détermination du sexe. Leur étude cytologique porte sur les chromosomes métaphasiques, la chromatine sexuelle et la chromatine Y.

Il a été montré qu'il existe chez la femme une formation dense, le corpuscule de Barr, ou corpuscule chromatinien X, accolée à la membrane du noyau interphasique et qui correspond au chromosome X inactif. Dans les caryotypes sexuels normaux ou anormaux sont présents autant de corpuscules de Barr qu'il y a de chromosomes X moins 1 : aucun dans les cellules XY, 1 dans les cellules XX et XXY, 2 pour XXX, etc.



Le concept d'inactivation de l'X, nommé aussi **Lyonisation** en hommage à Mary Lyon qui l'a initialement développé, rend compte du fait qu'il n'y a pas de différence phénotypique apparente pour les gènes à effets non sexuel portés par l'X, en dépit de la différence du nombre de chromosomes dans les deux sexes. Si, par exemple, l'activité du gène sauvage codant la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est la même dans des cellules XX et XY, il faut admettre qu'une seule copie de chromosome X est active dans les cellules XX. Il a en effet été montré que l'inactivation de l'un des chromosomes X est acquise très tôt au cours du développement embryonnaire et que l'X inactive est d'origine paternelle ou maternelle selon les cellules. L'inactivation s'effectuant au hasard et persistant dans les cellules filles, on peut donc admettre que l'X actif est, pour la moitié des cellules, d'origine paternelle, et pour l'autre moitié d'origine maternelle. Il en résulte, chez une femme hétérozygote pour une mutation d'un gène porte par l'X, que la moitié de ses cellules exprime l'allèle sauvage et l'autre moitié l'allèle muté. C'est dans ce sens que l'on a pu affirmer que les cellules XX sont des mosaïques fonctionnelles pour les caractères qu'elles portent à l'état hétérozygote. Le gène Xist, localise en Xq 13, est responsable de l'initiation de l'inactivation de l'X. Le mécanisme n'est pas encore entièrement élucidé, mais on suppose que la méthylation pourrait en être au moins partiellement la cause. Il existe à l'extrémité du bras court de l'X une région pseudo-autosomique qui ne subit pas l'inactivation comme le reste du chromosome

L'étude de la chromatine Y est moins souvent réalisée. Le corpuscule Y est visible en microscopie à fluorescence après coloration avec des dérivés de la quinacrine. Le nombre de corpuscules Y par cellule est égal à celui du nombre d'Y présents (1 chez l'homme normal, 0 chez la femme).

Les anomalies des gonosomes ont, par rapport aux anomalies autosomiques, deux particularités principales : elles ne sont pas obligatoirement associées à une déficience mentale; elles sont souvent en mosaïque.

Le caryotype 47,XXY, correspondant au **syndrome de Klinefelter**, est l'une des anomalies les plus fréquentes des gonosomes (0,9 p. 1 000 naissance. de garçons). Elle est caractérisée par un phénotype masculin, une grande taille, un hypogonadisme, une stérilité. Il en existe des variantes, 48,XXXXY et 49,XXXXXY en particulier. L'anomalie XXY résulte d'une non-

disjonction de la première division méiotique paternelle (50 % des cas) ou maternelle (33 % des cas), et pour le reste de non-disjonctions lors de la deuxième division méiotique ou lors des mitoses zygotiques, ces dernières aboutissant alors à des mosaïques. La fréquence des non-disjonctions méiotiques, survenant lors de la première division, augmente avec l'âge maternel.

**L'anomalie 47, XYY** est aussi fréquente que l'anomalie XXY (0,9 p. 1 000 naissances de garçons). Elle n'est pas associée à un phénotype particulier, si l'on excepte la grande taille de l'individu. La fréquence de l'anomalie est anormalement élevée dans les populations carcérales et asilaires, l'anomalie est aussi tout à fait compatible avec intelligence et une vie normales. Elle est due à une non-disjonction au cours de la deuxième division méiotique paternelle.

Le problème posé par les garçons XX, comme celui posé par les états intersexués et les hermaphrodismes vrais, est discuté plus loin.

**L'anomalie 47,XXX** (1 p. 1 000 naissances de filles) est due à une non-disjonction méiotique maternelle. Elle n'est pas incompatible avec la fertilité mais entraîne souvent un degré modéré de débilité mentale.

**Le syndrome de Turner** (0,1-0,2 p. 1 000 naissances de filles) est caractérisé par des dysmorphies et des malformations, une petite taille et un infantilisme sexuel lié à l'absence de gonades. Il correspond à plusieurs caryotypes possibles, le plus fréquent étant 45,X. Les autres cas comportent un isochromosome pour le bras long de l'X, i(X)(q10), et diverses anomalies de structure du chromosome X. Les anomalies associées au syndrome de Turner sont en mosaïque dans environ un quart des cas, ce qui contribue sans doute à la diversité du phénotype. L'anomalie 45,X est fréquente dans les avortements spontanés. Cette mortalité intra-utérine explique probablement que le syndrome de Turner soit moins fréquent à la naissance que les autres anomalies des gonosomes.

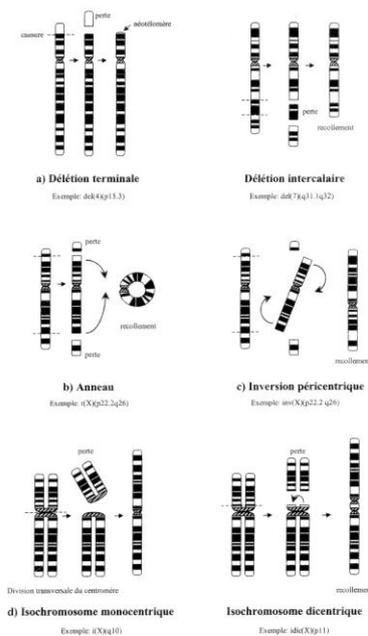


Figure 3.1. Principaux mécanismes d'apparition des anomalies de structure

Les translocations X; autosome sont des événements plus rares. Chez la femme porteuse d'une translocation équilibrée, c'est l'X normal qui est inactive, probablement à la suite d'un processus de sélection cellulaire, dans plus de 3/4 des cas. Ces translocations ont permis d'identifier des gènes liés au sexe, comme celui de la myopathie de Duchenne. En effet, lorsque le point de cassure chromosomique se trouve dans le gène lui-même, l'allèle porté par l'X remanié est désorganisé et l'allèle porté par l'X normal, inactive, ne s'exprime pas. La femme présente alors une maladie qui n'existe normalement que chez les garçons hemizygote porteurs d'une mutation du gène.

Les délétions survenant dans le chromosome X sont en général mieux tolérées que sur les autosomes, car l'X anormal est préférentiellement inactive chez la femme, probablement aussi à la suite d'un processus de sélection cellulaire.

### 4.3 Syndromes d'instabilité chromosomique

**Les syndromes d'instabilité chromosomique** (initialement dénommés **syndromes de cassures chromosomiques**) sont caractérisés par un pourcentage anormalement élevé de cassures chromatidiennes et chromosomiques et de remaniements structuraux, ainsi que de figures triradiales et quadriradiales attestant la survenue de crossing-over somatiques. Quatre syndromes sont particulièrement affectés par ces instabilités : **l'anémie de Fanconi, l'ataxie-télangiectasie, le syndrome de Bloom et le Xeroderma pigmentosum**. Tous ces syndromes sont transmis héréditairement sur le mode autosomique récessif et sont remarquables par la fréquence avec laquelle ils se compliquent d'affections malignes appartenant à différents types selon le syndrome concerné. Les instabilités chromosomiques sont surtout visibles après des cultures de courte durée de cellules provenant de tissus normaux (le plus souvent des lymphocytes), et ne sont pas clonales.

**L'anémie de Fanconi** est caractérisée au plan cytogénétique par une fréquence élevée d'endomitoses (division cellulaire sans anaphase, de sorte que les centromères des chromosomes métaphasiques dédoublés restent accolés), d'échanges asymétriques entre chromosomes non homologues, et par une grande sensibilité à de nombreux agents chimiques, ce qui permet d'utiliser des tests diagnostiques de sensibilisation aux cassures. **L'ataxie-télangiectasie** est caractérisée par une sensibilité particulière aux radiations ionisantes et aux substances ayant un effet analogue. **Le Syndrome de Bloom** est remarquable par la fréquence des échanges de fragments entre chromosomes d'une même paire et chromatides-sœurs. Dans le **Xeroderma pigmentosum**, qui correspond à différentes anomalies de la réparation de l'ADN, les cassures chromosomiques sont induites par l'exposition aux rayons UV.

### 4.4 Indications des examens chromosomiques en pathologie constitutionnelle

En pratique médicale, les circonstances dans lesquelles les examens chromosomiques sont utiles à la recherche d'anomalies constitutionnelles sont très variées :

- découverte d'anomalies somatiques (malformations, dysmorphies) à la période néonatale, et plus tard, association de débilité mentale et de dysmorphies et/ou de malformations ;

- décès néonataux ou avortements spontanés, en particuliers précoces, surtout s'ils sont répétés ;
- stérilité ;
- recherche d'une anomalie familiale lorsqu'une anomalie chromosomique est survenue soit dans la famille nucléaire, soit dans le reste de la famille. C'est dans ces conditions, en particulier, que se posent les indications d'un diagnostic anténatal;
- détection anténatale d'une anomalie chromosomique lorsque l'âge maternel est avancé.

## V / ANOMALIES CHROMOSOMIQUES ACQUISES

On distingue deux sortes d'anomalies chromosomiques acquises : celles des cellules malignes et celles résultant de l'action de toxiques (agents chimiques, radiations ionisantes). Les virus infectieux usuels entraînent des cassures et des pulvérisations des chromosomes et ne sont pas considérés ici.

### 5.1 Anomalies chromosomiques des cancers et des leucémies

Par opposition aux anomalies constitutionnelles, les anomalies chromosomiques des tumeurs et des leucémies sont acquises. Elles sont donc présentes dans les cellules anormales, mais ne figurent pas dans les tissus qui ne sont pas impliqués par le processus tumoral. Ce sont en général des anomalies clonales, c'est-à-dire qu'elles dérivent de la même cellule initialement remaniée, ce qui n'exclut pas la possible coexistence de plusieurs sous-clones dérivés et d'un bruit de fond d'anomalies parfois non clonales liées à l'instabilité chromosomique. On peut distinguer les anomalies qui sont la manifestation cytologique d'amplifications génomiques et les anomalies clonales qui ont souvent un caractère non aléatoire.

#### 5.1.1 Amplification génomique

Les anomalies cytologiques qui témoignent d'amplifications génomiques sont de deux types principaux. Le premier concerne des chromosomes minuscules, dépourvus de centromère et apparaissant dédoublés à la métaphase (d'où leur nom de double minutes) et qui sont en nombre variable selon les cellules. Le second correspond à des segments chromosomiques colorés de façon homogène (HSR pour *homogeneously staining region*) ou anormale (ABR pour *abnormal banded region*). Ces régions, ainsi que les *double minutes*, contiennent des segments chromosomiques amplifiés, ou amplicons, le nombre de copies pouvant varier considérablement. Les gènes contenus dans les amplicons ne sont pas tous identifiés, mais ils semblent être soit des oncogènes, soit des gènes de résistance aux substances antimétaboliques.

#### 5.1.2 Anomalies non aléatoires

Les anomalies chromosomiques des cancers et des leucémies sont numériques, structurales ou les deux à la fois. Les plus complexes associent plusieurs anomalies (chromosomes marqueurs), dont certaines étaient très difficiles à analyser avec les techniques habituelles. L'emploi des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence, particulièrement efficace dans ces circonstances, rend maintenant possible l'identification de ces chromosomes marqueurs.

Le caractère non aléatoire des anomalies chromosomiques a été progressivement établi à partir de la fin des années 1970 pour les hémopathies malignes. Ce caractère non aléatoire revêt deux aspects différents. Certaines anomalies sont simplement plus fréquentes que ne le voudrait le seul hasard, par exemple la trisomie 8 qui n'est pas associée à un type particulier d'hémopathie. D'autres, le plus souvent structurales, sont plus spécifiques d'un type donné d'hémopathie, comme la translocation  $t(15;17)(q22;q12-21)$ , caractéristique de la leucémie aigüe à promyélocytes. L'existence de remaniements plus ou moins spécifiques conduit à distinguer des anomalies primaires, communes à un type donné de prolifération et que l'on suspecte fortement d'être par conséquent proches de l'événement causal, et des anomalies secondaires, associées ou non aux précédentes, mais plus inconstantes, survenues au cours du développement de la prolifération maligne.

L'étude cytologique des tumeurs solides a été retardée par des difficultés techniques et par la complexité des anomalies rencontrées. A ces anomalies chromosomiques des cellules malignes s'ajoutent actuellement deux autres catégories: les délétions et les cancers familiaux. Néanmoins, toutes ces anomalies, acquises ou familiales, peuvent se combiner entre elles.

### **5.1.3 Anomalies liées au type de différenciation du processus malin**

Une grande variété d'anomalies chromosomiques récurrentes a été décrite et une mise à jour en est régulièrement publiée (HGM, Mitelman, 1994). Eu égard au type de différenciation, leur spécificité n'est en général pas absolue, mais elle est cependant significative. La translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  donne un bon exemple de ce genre de situation. Elle correspond au chromosome Philadelphie décrit en 1960 et considéré initialement comme spécifique de la leucémie myéloïde chronique. On a montré depuis que cette même anomalie pouvait aussi être présente dans certaines leucémies aiguës, lymphoblastiques, myéloblastiques ou mixtes. De plus, il existe des variantes de la translocation impliquant un troisième chromosome, différent selon les cas. Un point fondamental est que, dans tous ces cas, la conséquence de la translocation est la production d'un gène chimère résultant de la fusion d'une partie du gène BCR situé sur le chromosome 22 et du gène ABL situé sur le chromosome 9.

Les conséquences moléculaires des remaniements de structure (translocations et inversions) sont de deux types. Le remaniement peut aboutir, comme dans la  $t(9;22)$ , à la constitution de gènes de fusion ayant des fonctions différentes de celles des gènes normaux. Il peut aussi conduire à la dérégulation de l'expression de gènes, sans modification de leur structure. Ce dernier cas est bien illustré par la plupart des translocations impliquant les gènes de la superfamille des immunoglobulines et caractérisant les proliférations lymphoïdes.

### **5.1.3 Délétions et gènes suppresseurs de tumeurs**

Le rétinoblastome est une tumeur maligne de la rétine dont il existe des formes familiales transmises héréditairement sur le mode dominant. On a montré qu'il pouvait exister dans ces familles une délétion constitutionnelle de la bande chromosomique 13q14 à l'état hétérozygote, suggérant qu'elle était responsable d'une prédisposition à développer ces tumeurs. L'analyse des caryotypes des cellules tumorales elles-mêmes a prouvé que dans certains cas, seul le 13 remanié était présent, parfois en deux exemplaires, et que le chromosome 13 normal était perdu. Cette constatation est en accord avec la notion qu'il existe un gène suppresseur de tumeur, dont la perte ou l'altération entraîne le développement de la tumeur. Elle donne également un argument expérimental en faveur de l'hypothèse développée initialement par Knudson (cf. revue de Knudson, 1993), qui soutenait que le développement

du rétinoblastome était un événement en deux étapes (*two hit hypothesis*), la première étant une mutation germinale du gène du rétinoblastome pouvant être transmise héréditairement, et la seconde une mutation somatique intervenant sur l'autre allèle. Le gène *RBI* localisé sur la bande 13q14 a depuis été caractérisé et son introduction dans des cellules tumorales a en effet pu empêcher la prolifération tumorale dans des modèles expérimentaux.

De nombreux autres gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés depuis (**voir tableau**). Leur recherche a été stimulée par la constatation qu'il existe des délétions récurrentes dans certains types de tumeurs humaines. L'un des premiers exemples rapporté fut la délétion partielle du bras court du 3, del(3)(p14-p23) dans les cancers du poumon à petites cellules (Whang-Peng et al., 1982).

Une élégante méthode d'hybridation *in situ* en fluorescence, l'hybridation comparative, permet actuellement d'apporter une grande finesse à ce type d'études (Lichter et al., 1988). Elle consiste à utiliser simultanément comme sondes de l'ADN extrait de cellules tumorales et de cellules normales pour effectuer une hybridation *in situ* sur des métaphases normales. Si l'on utilise deux fluorochromes différents pour marquer les deux sondes, les métaphases sont marquées par trois couleurs. La première résulte de la superposition des couleurs des deux sondes et correspond à l'ADN présent en quantité équivalente dans les deux types de cellules. Une deuxième correspond principalement à la sonde marquant les cellules malignes dans les régions d'amplification génomique. La troisième enfin caractérise les régions chromosomiques de la cellule normale délétées dans la tumeur. On peut ainsi définir les régions délétées communes à plusieurs tumeurs de même type afin d'orienter les recherches vers les régions du génome concernées par les pertes d'hétérozygotie, résultant de ces délétions dans lesquelles doivent être localisés les gènes suppresseurs de tumeurs.

## **5.2 Anomalies induites par des agents mutagènes**

Les agents mutagènes sont responsables d'anomalies acquises ; chez l'homme, ils n'affectent que très rarement les cellules de la lignée germinale.

### **5.2.1 Agents chimiques**

De nombreux agents mutagènes et/ou cancérigènes provoquent des cassures chromosomiques. Cette propriété a été utilisée pour effectuer des études de mutagenèse, en particulier pour détecter l'action des divers agents mutagènes. L'analyse des échanges entre chromatides sœurs est également utilisée en raison de sa haute sensibilité.

Il existe deux types principaux de cassures des chromosomes. Les cassures de type chromatidique, qui affectent une seule chromatide des chromosomes métaphasiques, surviennent après la phase S du cycle cellulaire. Les cassures de type chromosomique se produisent dans les cellules avant la phase S du cycle. Certaines de ces cassures sont à l'origine de translocations, de délétions de chromosomes dicentriques, d'anneaux et de fragments.

Pour analyser quantitativement l'effet d'un agent mutagène, il faut tenir compte de tous les accidents recensés ; le nombre de cassures chromosomiques par cellule est déduit des types d'anomalie observés. Par exemple, un dicentrique ou une translocation correspondent à deux cassures. Certains expérimentateurs comptabilisent séparément ou ne comptabilisent pas les

lacunes (gaps) chromatidiques ou chromosomiques correspondant à des absences localisées de coloration, tandis que d'autres les considèrent comme équivalentes à des cassures. Les échanges entre chromatides sœurs sont mis en évidence après culture en présence de 5 bromo-2' -désoxy-uridine (BrdU) qui est incorporée dans les chromosomes au cours de leur réplication.

La chromatide nouvellement formée ayant des affinités tinctoriales différentes de celles de la chromatide parentale, on observe aisément les échanges entre chromatides sœurs qui suivent la réplication (**voir figure**). Le nombre moyen d'échanges est comparé entre les cellules soumises à l'action de la substance étudiée et des cellules témoins; il offre un moyen très sensible pour détecter un effet mutagène.

### **5.2.2 Radiations ionisantes**

Les radiations ionisantes sont capables d'induire des cassures chromosomiques et il existe une relation quantitative entre les cassures induites et la dose de radiation ionisante reçue. Cette observation constitue le principe d'une dosimétrie biologique fondée sur l'analyse des chromosomes métaphasiques. Les relations mathématiques établies varient en fonction du type d'irradiation, aiguë ou chronique, et du type de radiation. Par exemple, le nombre de chromosomes dicentriques, équivalents à deux événements, est proportionnel au carré de la dose reçue en cas d'irradiation aiguë par les rayons X et directement proportionnel à la dose reçue en cas d'irradiation aiguë par des rayons gamma de forte énergie. Cette dosimétrie biologique s'est avérée particulièrement utile dans les cas d'irradiations aiguës accidentelles, au elle a prouvé son efficacité.

Les domaines d'intérêt de la cytogénétique humaine se sont considérablement développés depuis que Tjio et Levan ont montré en 1956 que le nombre de chromosomes humains est de 46. Ce développement est partiellement dû à l'amélioration des techniques, celles des bandes et d'hybridation *in situ* en fluorescence en particulier. L'apport de l'hybridation *in situ*, aussi bien pour la cartographie génétique que pour l'analyse des anomalies constitutionnelles et acquises, qu'il s'agisse de celles des cellules malignes ou de celles induites par des agents mutagènes, montre à l'évidence que la cytogénétique et la cytogénétique moléculaire continueront à occuper une place importante parmi les méthodes de la génétique. La cartographie cytologique est en outre associée à la cartographie génétique et physique du génome pour constituer un ensemble de référence sous forme de cartes intégrées.

## **6 / MECANISME GENETIQUE DE LA DETERMINATION ET DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE**

### **INTRODUCTION**

La détermination du sexe comprend toutes les étapes génétiques conduisant une gonade indifférenciée à s'engager dans une voie de développement mâle ou femelle pour aboutir à un testicule ou à un ovaire. La différenciation sexuelle, quant à elle, englobe l'ensemble des événements permettant la réalisation d'un phénotype sexuel mâle ou femelle (organes génitaux internes et externes, caractères sexuels secondaires), une fois la gonade fonctionnelle en place. Cette distinction est assez artificielle mais utile pour séparer les deux phénomènes. Ce chapitre décrit les notions connues chez les mammifères sur la détermination du sexe et quelques exemples de pathologies de la différenciation sexuelle.

Il existe plusieurs niveaux possibles de définitions du terme biologique sexe. Le sexe génétique d'un individu désigne la partition chromosomique qui le caractérise, 46,XX pour une femme et 46,XY pour un homme. Le sexe gonadique se définit par la présence d'ovaires ou de testicules. Le sexe phénotypique, enfin, englobe les différents critères d'aspect féminin ou masculin. Dans la grande majorité des individus, il existe une corrélation stricte entre toutes ces définitions, mais certaines discordances peuvent apparaître.

La figure rappelle de façon très schématique la structure des organes génitaux masculins et féminins ainsi que leur origine embryonnaire ; la constitution du testicule est présentée dans le tableau

Le rôle déterminant du testicule dans la différenciation sexuelle fut montré très tôt par les travaux de Jost (revue, 1991). La castration d'embryons de lapins, au stade où la gonade n'est pas encore différenciée, permet le développement de lapins de phénotype féminin. La présence de testicules est indispensable pour la réalisation d'un phénotype masculin. La différenciation sexuelle male se réalise sous l'influence de deux hormones, la testostérone et l'hormone antimüllérienne, produites par le testicule fœtal. En revanche, la présence d'ovaires ou l'absence de testicules permet l'apparition d'un phénotype féminin (Bogan & Page, 1994). On peut donc simplifier en assimilant la détermination du sexe à celle du testicule. L'hypothèse d'un facteur permettant d'orienter la gonade dans la voie testiculaire, aux dépens de la voie ovarienne, a alors été formulée.

Le chromosome Y s'est révélé comme ayant un rôle essentiel dans la détermination du testicule. L'étude de patients présentant des anomalies chromosomiques des gonosomes a permis de conclure qu'il existait une corrélation stricte entre la présence d'un chromosome Y et la présence de tissu testiculaire, indépendamment du nombre de chromosomes X (tableau) : les individus de caryotype 46,XY, 47,XXY et 47,XYY sont des hommes, alors que les caryotypes 46,XX, 47,XXX ou 45,X correspondent à des phénotypes féminins. Une longue recherche du facteur codant le déterminant testiculaire ou TDF (*testis determining factor*) a alors commencé sur le chromosome Y.

## **6.1 / DETERMINATION DU SEXE**

### **6.1.1 Chromosome Y**

Ce gonosome présente des caractéristiques très particulières. Le chromosome Y est l'un des plus petits chromosomes chez l'homme. Il ne possède pas d'homologue dans la paire de gonosomes et les caractères qu'il porte sont transmis sur le mode holandrique. De par l'hétéromorphisme de la paire X- Y, la recombinaison homologue entre ces deux chromosomes ne peut se produire à la méiose. Cependant, il existe dans la partie terminale du petit bras du chromosome Y une région présentant une homologie quasi parfaite avec la partie terminale du petit bras du chromosome X. Dans cette région, baptisée pseudoautosomique, se produit un crossing-over obligatoire lors de la méiose masculine. La fréquence de ce crossing-over décroît depuis le télomère jusqu'à la frontière pseudoautosomique. Cette dernière est définie sur le chromosome Y par la présence d'une séquence A/Lt, qui s'interpose entre la région pseudoautosomique et les séquences spécifiques de l'Y. Le chromosome Y possède dans la partie terminale de son grand bras une région d'hétérochromatine, de taille variable selon les ethnies, mais facilement reconnaissable par sa fluorescence en coloration par le Giemsa ou la quinacrine.

Il existe peu de gènes sur ce chromosome. La région pseudoautosomique en contient quelques-uns, dont l'antigène de surface M1C2. Outre le gène SRY, le bras court du chromosome Y porte les gènes RPS4Y (codant une protéine ribosomale) et ZFY (codant une protéine à doigts de zinc). Ces deux derniers gènes ont la particularité d'avoir, sur le chromosome X, des homologues qui échappent à l'inactivation. Ils apparaissent donc comme de bons gènes candidats impliqués dans le syndrome de Turner (femmes 45,X) : en effet, les symptômes dont souffrent les patientes atteintes de ce syndrome sont attribués à une haplo-insuffisance de gènes exprimés à partir des deux X chez la femme, de l'X et de l'Y chez l'homme. Depuis longtemps, on suspecte également que le bras Yq abrite des gènes influençant la spermatogenèse. Des délétions de la région distale de l'euchromatine du bras long du chromosome Y entraînent l'azoospermie des patients, c'est-à-dire l'absence de spermatozoïdes. Enfin, l'existence sur l'Y de certains gènes intervenant dans la croissance et le développement squelettique est suspectée.

## **6.1.2 TDF, facteur déterminant le testicule**

### **A) Recherche du TDF, pathologies de la détermination sexuelle**

La stricte relation entre la présence d'un chromosome Y et le développement de testicules a orienté les recherches du facteur déterminant le testicule ou TDF vers ce chromosome. L'étude de cas pathologiques de la détermination du sexe a permis son identification. En effet, il existe de rares cas d'inversion sexuelle, c'est-à-dire d'individus dont le sexe génétique ne correspond pas au sexe phénotypique (Voir tableau).

Certains de ces patients sont des individus de phénotype féminin, présentant une aménorrhée primaire et une formule caryotypique 46,XY. L'analyse histologique montre que leurs gonades sont constituées de tissu fibreux non différencié, dépourvu de follicules. Ces patientes sont atteintes de dysgénésie gonadique, soit complète lorsque les gonades ne sont constituées que de ce stroma fibreux, soit partielle lorsqu'il existe quelques traces de différenciation testiculaire dans ce tissu fibreux. Leur phénotype étant par ailleurs normal, ces femmes atteintes de dysgénésie gonadique sont de bonnes candidates pour être porteuses de mutations dans le TDF. Une analyse fine de la structure du chromosome Y de ces patientes a permis de révéler des délétions dans certains cas.

Les hermaphrodites vrais, fréquemment de caryotype XX, sont des individus porteurs à la fois de tissu testiculaire et de tissu ovarien. Le phénotype de ces individus est variable, généralement ambigu.

Il existe également des patients de phénotype masculin ambigu ou non, porteurs de testicules, ayant un caryotype XX. Dans les années 1960, l'hypothèse de la présence chez ces hommes XX d'un petit fragment du chromosome Y a été émise. Effectivement, la présence de matériel Y a pu être mise en évidence sur le chromosome X de ces patients et sa localisation a permis de comprendre par quel mécanisme se produisait ce phénomène : le crossing-over entre les chromosomes X et Y se produit avec une très faible fréquence au-delà de la région pseudoautosomique et le chromosome X d'origine paternelle emporte un petit fragment provenant du chromosome Y (de la Chapelle, 1981).

Les femmes XY et les hommes XX représentent les deux résultats possibles du même événement d'origine : les femmes XY résultent d'une perte du TDF, alors que son gain permet l'existence d'hommes XX. L'étude des séquences spécifiques du chromosome Y présentes

chez les hommes XX a progressivement permis de délimiter la région devant contenir le TDF (Voir figure). Les premières recherches s'orientèrent vers les gènes HY et ZFY, codant respectivement l'antigène d'histocompatibilité masculin HY et une protéine à doigt de zinc de fonction inconnue ; ces candidats durent être abandonnés après la découverte d'hommes XX ne portant pas ces fragments d'ADN du chromosome Y. Finalement, la région minimale devant contenir le TDF a été restreinte à un segment d'ADN de 35 kilobases (kb) situé dans la partie la plus distale de l'intervalle 1 du chromosome Y, à proximité immédiate de la frontière pseudoautosomique. Ces 35 kb correspondent au plus petit fragment de matériel Y porté par un homme XX (Gubbay et al., 1990).

## **B) Identification du SRY comme le TDF**

Une recherche systématique de séquences conservées chez les mammifères a été entreprise dans ce fragment et a permis l'identification d'une phase ouverte de lecture, baptisée SRY (*sex determining region, Y chromosome*) (Gubbay et al., 1990). Pour pouvoir affirmer que le gène SRY était bien le facteur déterminant le testicule, certaines conditions devaient être remplies et ont pu être confirmées par des études réalisées dans l'espèce humaine et, en parallèle, chez la souris.

- i) Ce gène est localisé dans la région minimale conférant un phénotype masculin et il est apparemment le seul gène présent dans cette courte région.
- ii) Le gène SRY est spécifique du chromosome Y et des séquences homologues peuvent être détectées dans l'ADN de mammifères mâles (notamment la souris), démontrant sa conservation au cours de l'évolution.
- iii) L'étude du profil d'expression des gènes SRY humain et murin a montré que le site majeur d'expression était le testicule en formation ainsi que le testicule adulte.
- iv) La présence d'un domaine de liaison à l'ADN dans la protéine SRY et sa fonction présumée de facteur de transcription est compatible avec un mode d'action cellule-autonome. En effet, des expériences ont montré que les cellules de Sertoli présentes dans les testicules de souris chimères XX-XY étaient exclusivement de caryotype XY, suggérant que le facteur TDF permettant leur détermination agit au sein même de la cellule et n'est pas diffusible.
- v) Des mutations ont été recherchées dans le gène SRY de femmes XY atteintes de dysgénésie gonadique et, dans certains cas, des substitutions nucléotidiques ont été effectivement constatées dans la région du gène correspondant au domaine fonctionnel de la protéine (ce sont nécessairement des mutations de novo puisque leur père devait posséder un gène SRY normal pour être un homme fertile) (McElreavey et al., 1992).
- vi) Enfin, le plus fort argument en faveur de l'équation  $TDF = SRY$  a été apporté par des expériences de transgénèse chez la souris. Un fragment de 14 kb contenant le gène Sry murin (homologue du SRY humain) et ses séquences flanquantes a été introduit dans des embryons de souris. Des animaux de caryotype XX et de phénotype male sont nés (Koopman et al., 1991). Le gène Sry a été suffisant pour initier le développement du testicule. Ces souris sont des mâles phénotypiquement normaux mais stériles.

### C) Gène SRY humain et homologue murin Sry

Le gène SRY humain, localisé à environ 6 kb de la frontière pseudoautosomique, comporte un seul exon (voir figure). La protéine, à localisation nucléaire, est constituée de deux domaines latéraux, de fonction inconnue, entourant une région de 80 acides aminés (aa) présentant une similitude significative avec des protéines non histones de liaison à l'ADN du *high mobility group* (HMO) et avec certains facteurs de transcription comme LEF1. Il a pu être démontré que c'était ce domaine HMO qui conférait à la protéine SRY sa capacité de se fixer à l'ADN. Cette liaison se réalise par l'intermédiaire de séquences nucléotidiques cibles dont le consensus est 5' A/TAACAAA/T 3' et également de façon indépendante de la séquence sur l'ADN cruciforme. La protéine est également capable d'infliger une courbure à l'ADN (Haqq et al., 1993).

La recherche de l'ARN messager a montré une expression majeure de Sry chez la souris dans la gonade en formation entre 10,5 et 12,5 jours post-coïtum. Il s'agit du moment précis qui précède l'apparition, dans la gonade encore indifférenciée, des premiers signes de différenciation testiculaire, c'est-à-dire lorsque les premières cellules de Sertoli commencent à former les tubes séminifères (Koopman et al., 1991). Cette date correspond à la sixième semaine de développement chez l'homme. Par des techniques de transcription inverse et PCR, des transcrits ont également pu être détectés dans certains tissus fœtaux et adultes ainsi que dans certaines lignées cellulaires (Clépet et al., 1993).

## **6.2 / MODELE DE DETERMINATION DU SEXE**

Certains cas d'inversion sexuelle peuvent donc être attribués à des anomalies du TDF : mutations et par conséquent perte d'activité chez les femmes XY, acquisition du gène et de la fonction chez les hommes Xx. Mais bien qu'il soit admis que SRY soit le TDF, c'est-à-dire la première étape de la cascade de détermination du testicule, cela n'est pas suffisant pour expliquer tous les cas d'inversion de sexe. En effet, 20 % seulement des femmes XY atteintes de dysgénésie gonadique portent une mutation du gène SRY. En outre, la présence de SRY ne peut être détectée que chez 80 % d'hommes XX et 10 % d'hermaphrodites vrais. Ces résultats imposent l'idée que d'autres gènes sont impliqués dans la cascade d'événements induisant la détermination du sexe.

L'analyse de certains cas familiaux permet de proposer certaines hypothèses et divers modèles. La figure montre l'arbre généalogique d'une famille comprenant deux frères de phénotype masculin et de caryotype XX, dépourvus du gène SRY. Les parents sont normaux. L'hypothèse la plus simple consiste à supposer l'existence d'un gène intervenant dans la détermination du sexe et différent de SRY, se transmettant selon le mode autosomique récessif.

Un modèle a été proposé pour expliquer un grand nombre des cas de pathologies de la détermination sexuelle (McElreavey et al., 1993). On suppose l'existence d'un gène Z (autosomique ou lié à l'X), agissant comme répresseur des gènes de la voie de développement masculine. Z est la cible directe de SRY, qui agit de façon négative sur Z soit par répression de son expression, soit par inhibition ou compétition. Ainsi, chez un homme normal XY ou chez un homme XX porteur du gène SRY, la séquence des événements est la suivante : SRY inhibe Z, permettant ainsi l'expression des gènes spécifiques du sexe masculin. A l'inverse,

chez une femme normale XX ou une femme XY présentant une délétion de SRY, Z n'est pas soumis à la répression de SRY et peut réprimer la voie masculine. Selon ce modèle, toute variation de l'activité ou de la spécificité de Z doit avoir des répercussions drastiques sur les individus porteurs de mutations. Ainsi une perte de fonction totale ou partielle de Z explique l'apparition d'un phénotype masculin plus ou moins ambigu chez un individu XX. La répression des gènes spécifiques du sexe masculin n'est plus complète ou n'est pas efficace. Au contraire, si une mutation affecte la relation SRY-Z pour rendre Z indépendant de SRY, ou insensible à son action, l'effet dominant du chromosome Y sur la détermination du sexe est court-circuité (mutation Zi). Les données récentes désignant la région Xp21 comme importante dans la détermination sexuelle sont parfaitement compatibles avec ce modèle. La duplication d'une région critique dans la bande Xp21 aboutit à une inversion sexuelle d'individus XY (Bardoni et al., 1993). Il est possible que Z soit localisé dans cet intervalle et que, lorsqu'il est exprimé en double dose, il ne puisse pas subir une répression complète par SRY. Ceci se traduirait par un effet de répression partiel de Z sur les gènes spécifiques du sexe masculin, conduisant donc à un phénotype ambigu.

### **6.3 / DIFFERENCIATION DU SEXE**

Contrairement aux pathologies de la détermination sexuelle correspondant à un défaut de formation de la gonade, les pathologies de la différenciation sexuelle sont dues à un dysfonctionnement de la gonade formée ; la plupart résultent de troubles hormonaux. Certaines sont résumées (Voir tableau).

#### **6.3.1 Syndrome de persistance des canaux de Muller**

L'hormone antimüllérienne ou AMH est une glycoprotéine sécrétée par les cellules de Sertoli dans le testicule fœtal et adulte, ainsi que par les cellules de la granulosa dans l'ovaire postnatal (Josso et al., 1987). Chez le male, elle est responsable de la régression des canaux de Muller, ébauches embryonnaires de l'utérus, des trompes et de la partie supérieure du vagin. Des mutations dans le gène de l'AMH ont été détectées chez des patients présentant un syndrome de persistance des canaux de Muller. Bien que pourvus d'un utérus, de trompes et d'un vagin, ces hommes ont un développement génital masculin normal (Imbeaud et al., 1994). L'expression ectopique (c'est-à-dire en position différente de son site normal) de l'AMH, par transgénèse chez des souris femelles, induit la régression des canaux de Muller et une réduction notable du nombre de cellules germinales, conduisant à la disparition totale des ovaires quelques jours après la naissance (Behringer et al., 1990). Des structures semblables à des tubes séminifères sont également observées dans leurs ovaires, comme dans des ovaires de rates traitées in vitro par l'AMH. Ces observations, ainsi que la persistance de l'expression de l'AMH après la période de régression des canaux de Muller chez le male, suggèrent une multiplicité de rôles de cette hormone dans la différenciation sexuelle. Les profils temporels d'expression de SRY et de l'AMH sont décalés, mais une séquence potentielle de fixation de SRY est identifiée dans le promoteur de l'AMH. Des expériences dans des lignées cellulaires ont montré que SRY permettait l'activation de la transcription de l'AMH grâce à son promoteur basal. Néanmoins, cette activation se produit indirectement, par l'intermédiaire de facteurs non encore identifiés (Haqq et al., 1994).

### **6.3.2 Syndromes d'insensibilité aux androgènes**

Les syndromes d'insensibilité aux androgènes, liés à l'X, résultent d'une anomalie de l'action des androgènes dans les cellules cibles, via leur récepteur, chez des sujets dont le caryotype est 46,XY (Lobbacaro et al., 1994). L'histologie des gonades de ces individus montre une structure testiculaire normale. Les taux plasmatiques de testostérone et d'hormone lutéinisante (LH) sont normaux ou élevés. L'AMH est synthétisée normalement. Il en résulte un pseudohermaphrodisme masculin, c'est à dire des organes génitaux internes de type masculin avec un phénotype externe féminin ou ambigu.

Cliniquement, on distingue deux formes: les insensibilités complètes aux androgènes (ICA), avec phénotype parfaitement féminin ; les insensibilités partielles aux androgènes (IPA), dont le phénotype varie de l'ambiguïté sexuelle profonde à un phénotype masculin normal chez des sujets stériles.

A côté de cette hétérogénéité clinique, existe une hétérogénéité biochimique. La mesure de la capacité de liaison du récepteur des androgènes (RA), déterminée sur des cultures de fibroblastes de territoires sexuellement différenciés, a permis un classement des insensibilités aux androgènes en quatre groupes : une absence de liaison de l'androgène, une liaison quantitativement diminuée, normale ou qualitativement anormale. Ces anomalies biochimiques résultent d'anomalies du gène du RA.

Ce gène est localisé en position Xq 11-12. Son analyse par la méthode de Southern ou par amplification PCR a montré que les délétions ne sont qu'exceptionnelles dans les familles atteintes d'ICA ou d'IPA, puisqu'à ce jour, seulement 9 délétions sont rapportées. Une anomalie de l'épissage a été rapportée dans 2 cas. En revanche, environ 150 mutations ponctuelles ont été décrites dans les trois domaines du récepteur aux androgènes (Sultan et al., 1993). On peut ainsi regrouper les anomalies géniques du RA en trois catégories: les mutations qui entraînent la perte ou altèrent fortement la structure du gène du RA ou de son ARNm (délétions, anomalies de l'épissage, codon stop) ; les mutations qui altèrent la structure primaire de la protéine (remplacements d'acides aminés) ; les mutations qui diminuent la synthèse du messenger.

Ainsi, le récepteur des androgènes est le récepteur nucléaire présentant le plus de mutants naturels. Après mutagenèse dirigée et analyse in vitro des mutants, l'élucidation du rôle des acides aminés importants a permis l'ébauche d'une carte structure-fonction, non seulement du RA mais également des autres récepteurs nucléaires du fait de leur homologie.

Le même syndrome a été décrit chez la souris (souris Tfm pour testicule féminisant), la chèvre, le porc et le cheval, mettant à chaque fois en cause le récepteur aux androgènes.

### **6.3.3 Anomalies de la synthèse hormonale**

La testostérone et son dérivé  $5\alpha$ -réduit, la dihydrotestostérone, tout comme les hormones féminisantes, œstradiol et progestérone, sont des dérivés du cholestérol. De nombreuses étapes enzymatiques permettent la transformation de ce précurseur en produit hormonal final. Chaque étape est sous la responsabilité d'une enzyme et le défaut de fonctionnement d'une enzyme peut être responsable de l'accumulation d'un intermédiaire et de l'absence d'un produit crucial. Par exemple, la  $5\alpha$ -reductase est l'enzyme permettant la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone, qui est la forme androgénique la plus forte et qui assure la

masculinisation des organes génitaux externes. Les patients présentant un déficit en 5 $\alpha$ -réductase naissent avec des organes génitaux externes féminins et internes masculins. A la puberté, le taux de testostérone augmente fortement et une activité résiduelle de l'enzyme peut permettre une virilisation du patient.

Les malades atteints de déficit en 17  $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17  $\beta$ -HSD) sont un autre exemple d'une anomalie de la synthèse hormonale. Ces individus sont des males pseudohermaphrodites dont les organes génitaux internes sont de type masculin, dérivés des canaux de Wolff, alors que leurs organes génitaux externes sont principalement féminins. L'enzyme 17  $\beta$ -HSD intervient à la dernière étape de la biosynthèse de la testostérone, catalysant sa formation à partir de l'androstènedione. Un nouveau gène a été récemment découvert, qui code la troisième forme différente de cette enzyme, les deux premières participant à l'oxydation des androgènes et estrogènes. Des mutations à l'état homozygote, ou hétérozygote composite, ont été mises en évidence chez des patients non apparentés et rendues responsables de l'altération de l'activité enzymatique de la 17  $\beta$ -HSD (Geissler et al., 1993).

Tous les gènes codant les enzymes de la biosynthèse des hormones sexuelles ne sont pas encore connus, mais leur identification devrait permettre de mieux comprendre l'origine des pathologies de la différenciation sexuelle.

## **6.4 / STERILITE**

Les anomalies de la détermination du sexe sont invariablement associées avec une stérilité : un mauvais développement de la gonade est fatal à la survie des cellules germinales. De plus, toute anomalie des gonosomes semble inhiber systématiquement une méiose normale.

### **6.4.1 Stérilité associée à un phénotype féminin**

Le syndrome de Turner est la seule monosomie viable. Les patientes atteintes de ce syndrome présentent un caryotype 45,X, fréquemment mosaïque. Le phénotype se caractérise par une petite taille, une série d'anomalies somatiques et une dysgénésie gonadique. Deux hypothèses ont été avancées. La première postule l'existence, sur le chromosome X, d'un gène codant un facteur nécessaire au développement de l'ovaire et dont l'activité requiert deux copies fonctionnelles (échappant, par exemple, à l'inactivation de l'X) (Zinn et al., 1993). La deuxième privilégie un effet plus mécanique des gonosomes. L'absence d'un chromosome sexuel jouerait un rôle inhibiteur sur la méiose, provoquant une dégénérescence des ovocytes. La gonade évolue en tissu fibreux non différencié.

Le gonadoblastome est une tumeur gonadique retrouvée presque exclusivement dans les gonades fibreuses de femmes XY atteintes de dysgénésie gonadique. L'apparition de cette tumeur a été corrélée avec la présence de fragments du chromosome Y, notamment chez des individus mosaïques, 45,XX46,XY. Le bras long du chromosome Y pourrait abriter un gène nommé GBY, responsable de la survenue de gonadoblastome. GBY pourrait être un gène s'exprimant normalement dans le testicule et dont l'expression ectopique dans la gonade rudimentaire des femmes XY aurait un effet tumorigène.

## 6.4.2 Stérilité associée à un phénotype masculin

Les hommes xx sans ambiguïté génitale possèdent des testicules, c'est-à-dire qu'ils produisent des hormones testiculaires (AMH et testostérone) capables de les masculiniser, mais ils sont stériles à l'âge adulte. La même observation est faite sur les souris XX transgéniques pour Sry qui possèdent un phénotype male normal mais sont également stériles. Dans les cas humain et murin, les cellules germinales sont présentes pendant la période fœtale mais finissent par mourir. Là encore deux phénomènes entrent en jeu.

Chez l'homme, des délétions du bras long du chromosome Y peuvent être la cause d'azoospermie (Vogt et al., 1992). L'intervalle 6 du chromosome Y renferme un ou plusieurs facteurs importants pour la spermatogenèse. Une famille de gènes à domaine de liaison à l'ARN a été identifiée comme candidat pour le ou les gène(s) de l'azoospermie (AZF) (Ma et al., 1993 ; Reijo et al., 1995). Certains gènes de la spermatogenèse portés par le chromosome Y ont été identifiés chez la souris, tel que *Spy*, nécessaire pour la prolifération des spermatogonies. Ces gènes portés par le chromosome Y sont absents chez les individus XX et semblent indispensables à la survie des cellules germinales.

La fertilité des souris est également dépendante d'un crossing-over se produisant dans les régions pseudoautosomiques des chromosomes X et Y. Cet appariement est nécessaire pour le développement des cellules germinales et a lieu systématiquement pendant la méiose masculine (Burgoyne et al., 1992). Le cas des individus Klinefelter peut être expliqué par un tel mécanisme. Ces patients sont des hommes présentant dans la majorité des cas un caryotype 47,XXY, ayant des testicules de taille réduite et stériles. De même qu'un seul chromosome X est insuffisant pour réaliser une méiose normale chez les individus Turner, la présence de trois chromosomes sexuels (XXY) pourrait être le facteur néfaste à la méiose et à la survie germinale.