

# Considérations Générales sur la Cytogénétique Médicale Humaine et Vétérinaire

## THESE

Présentée et soutenue publiquement le 19 Juillet 1984 devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR  
pour obtenir le grade DOCTEUR VETERINAIRE  
(DIPLOME D'ETAT)

**PAR**

**ABOU BAKARY BADO**

né le 28 Août 1958 à Toussiana - Gare (HAUTE - VOLTA)

### **JURY:**

**Président:** Professeur François DIENG  
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR

**Rapporteur:** Professeur Ahmadou Lamine NDIAYE  
de l'E. I. S. M. V.

**Directeur de thèse:** Docteur José Marie AFOUTOU  
Maître Assistant à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR

**Membres:** Professeur Abdou SANOKHO  
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR

Professeur Agrégé Alassane SERE  
de l'E. I. S. M. V.

Professeur Charles Kondi AGBA  
de l'E. I. S. M. V.

I - PERSONNEL A PLEIN TEMPS

1. - PHARMACIE-TOXICOLOGIE

François adébayo ABIOLA.....Maître-Assistant  
Marcel NAGALO.....Moniteur

2. - PHYSIQUE MEDICALE - CHIMIE BIOLOGIQUE

Germain Jérôme SAWADOGO.....Maître-Assistant  
Godefroy PODI.....Moniteur

3. - ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE

Charles Kondi AGBA.....Maître-Assistant  
Mme Marie-Rose ROMAND.....Assistante de Recherches  
Jean-Marie AYAYEZU.....Moniteur  
Denis Boniface AKPLOGAN.....Moniteur

4. - PHYSIOLOGIE-PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE

Alassane SERE.....Maître de Conférences  
Agrégé  
Moussa ASSANE.....Assistant  
Herménégilde TWAGIRAMUNGU.....Moniteur

5. - PARASITOLOGIE-MALADIES PARASITAIRES-ZOOLOGIE

Louis Joseph PANGUI.....Maître-Assistant  
Jean BELOT.....Assistant  
Yalacé KABORET.....Moniteur

6. - HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES D'ORIGINE ANIMALE

Malang SEYDI .....Maître-Assistant  
Serge LAPLANCHE.....Assistant  
Léopoldine ASUL.....Monitrice.

7. - MEDECINE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE-CLINIQUE AMBULANTE

Théodore ALOCNINOUBA.....Maître-Assistant,  
Roger PARENT.....Maître-Assistant  
Bahissa BEMBAH.....Moniteur

8. - REPRODUCTION ET CHIRURGIE

Papa El Hassan DIOP... ..Maître-Assistant  
Eric HUMBERT.....Assistant  
Ibrahima DIAWARA.....Moniteur

9. - MICROBIOLOGIE-PATHOLOGIE GENERALE-MALADIES CONTAGIEUSES ET  
LEGISLATION SANITAIRE

Justin Ayayi AKAKPO.....Maître-Assistant  
Pierre SARRADIN.....Assistant  
Pierre BORNAREL.....Assistant de Recherches  
Emmanuel KUZINDANA.....Moniteur

10. - ZOOTECHE-ALIMENTATION-DROIT-ECONOMIE

Ahmadou Lamine NDIAYE... ..Professeur  
Abasso KODJO.....Assistant  
Soulèye DIOUF.....Moniteur

CERTIFICAT PREPARATOIRE AUX ETUDES VETERINAIRES (CPEV)

Aladji YADDE.....Moniteur

11. - PERSONNEL VACATAIRE

BIOPHYSIQUE

René NDOYE.....Maître de Conférences  
Faculté de Médecine  
et de Pharmacie

UNIVERSITE DE DAKAR

Alain LECOMTE.....Maître-Assistant  
Faculté de Médecine  
et de Pharmacie

UNIVERSITE DE DAKAR

AGRONOMIE

Simon BARRETO.....Maître de Recherches  
O.R.S.T.O.M.  
DAKAR

BIOCLIMATOLOGIE

Cheikh BA.....Maître-Assistant  
Faculté des Lettres  
et Sciences Humaines  
UNIVERSITE DE DAKAR

BOTANIQUE

Guy MAYNART.....Maître-Assistant  
Faculté de Médecine  
et de Pharmacie  
UNIVERSITE DE DAKAR

DROIT ET ECONOMIE RURALE

Mamadou NIANG.....Docteur en Sociologie  
Juridique, Chercheur  
à l'I.F.A.N.  
UNIVERSITE DE DAKAR

ECONOMIE GENERALE

Oumar BERTE.....Assistant  
Faculté des Sciences  
Juridiques et Economiques  
UNIVERSITE DE DAKAR

GENETIQUE

Jean Pierre DENIS.....Docteur Vétérinaire  
Inspecteur Vétérinaire  
I.N.E.R.V.  
DAKAR/HANN

RATIONNEMENT

Ndiaga MBAYE.....Docteur Vétérinaire  
I.N.E.R.V.  
DAKAR/HANN

AGROSTOLOGIE

Jean VALENZA.....Docteur Vétérinaire  
I.N.E.R.V.  
DAKAR/HANN

GUERIN.....Docteur Vétérinaire  
I.N.E.R.V.  
DAKAR/HANN

III - PERSONNEL EN MISSION (prévu pour 1983 - 1984)

ANATOMIE PATHOLOGIQUE GENERALE

Michel MORIN.....Professeur  
Faculté de Médecine  
Vétérinaire  
SAINT-HYACINTHE-QUEBEC

ANATOMIE PATHOLOGIQUE SPECIALE

Ernest TEUSCHER.....Professeur  
Faculté de Médecine  
Vétérinaire  
SAINT-HYACINTHE-QUEBEC

PARASITOLOGIE

Ph. DORCHIES.....Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE

CHIRURGIE

J. P. GENEVOIS.....Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE

PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION - OBSTETRIQUE

Daniel TINTURIER.....Professeur  
E.N.V. - NANTES

DENREOLOGIE

Jacques ROZIER.....Professeur  
E.N.V. - ALFORT

PATHOLOGIE DES EQUIPES

R. MORAILLON.....Professeur  
E.N.V. - ALFORT

PATHOLOGIE BOVINE

Jean LECOANET.....Professeur  
E.N.V. - NANTES

PATHOLOGIE GENERALE-MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE

Jean OUDAR.....Professeur  
E.N.V. - LYON

PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Jean CHANTAL.....Professeur  
E.N.V. - TOULOUSE

PHARMACIE-TOXICOLOGIE

Philippe JAUSSAUD.....Maître-Assistant Agrégé  
E.N.V. - LYON.

J E

D E D I E

C E

M O D E S T E

T R A V A I L . . .

A MON PERE

*En témoignage de ma reconnaissance pour tous les sacrifices consentis et pour l'Amour que tu nous a toujours porté.  
Je te dois infiniment.*

A MA MERE

*Bien faible témoignage de ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as consentis pour mon avenir et celui de mes frères et soeurs.  
Puisse ce travail t'honorer.*

A MES MARÂTRES

*En gage de ma reconnaissance pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour nous élever et éduquer dans une ambiance de parfaite entente.  
Je vous dois infiniment.*

A mon oncle Augustin BADO

*Ton dévouement, tes hautes qualités morales pour la famille, et la bonne humeur dans laquelle tu nous a éduqué, nous ont permis de surmonter bien des problèmes  
Ce travail est le modeste témoignage de mon profond attachement.*

A tous mes oncles et à toutes mes tantes.

*Profonde reconnaissance.*

A mes frères et soeurs

*Puisse ce travail vous servir d'exemple.*



A tous mes cousins et cousines

Attachement fraternel.

A la grande famille BADO.

A la famille SERE et BENAÏ à Gibraltar II.

En témoignage de mon profond attachement.

A mes grands parents.

A tous mes copains et copines de la "bande"

"With a little help from my friends..."

A mes voisins et voisines de Gibraltar I et II, Centenaires.

A mes nombreux copains et copines.

A mes amis et amies.

A mes camarades de promotion (EBENE)

AUX étudiants voltaïques de l'E.I.S.M.V.

A l'A.E.V.D.

A tout le personnel administratif et technique de l'E.I.S.M.V.  
en particulier à Mme DIOUF.

Au personnel du Laboratoire d'Histologie Embryologie et Cytologie du C.H.U. de DAKAR, notamment la secrétaire Mme Bineta NDIAYE et le technicien-chef Mr. Boubacar DIARRA.

Au peuple voltaïque, sénégalais et africain.

A tous ceux qui souffrent de malnutrition.

A tous ceux qui souffrent des maladies génétiques.

---

A NOS MAITRES ET JUGES

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur François DIENG  
Chaire de Médecine Légale à la Faculté  
de Médecine et de Pharmacie de DAKAR.

*En témoignage de notre profonde gratitude  
pour l'honneur que vous nous faites en  
acceptant de présider notre jury de thèse.*

*Trouvez ici l'expression de notre respectueuse  
reconnaissance pour la chaleur de votre  
accueil.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR Ahmadou Lamine NDIAYE  
Département de Zootechnie Alimentation à l'E.I.S.M.V.

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail  
et en suivre l'élaboration avec un soin  
particulier.*

*Nous avons admiré vos hautes qualités intellec-  
tuelles et votre sens du travail bien fait.*

*En acceptant de rapporter ce travail, vous  
nous faites un grand honneur auquel nous  
sommes très sensibles.*

*Nous vous prions d'accepter l'hommage de notre  
profond respect et notre vive reconnaissance  
pour votre enseignement.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR Abdou SANOKHO  
Chaire de Pédiatrie et Génétique Médicale.

*Malgré vos nombreuses occupations vous avez  
accepté de siéger à notre jury de thèse.*

*Soyez assuré de notre sincère reconnaissance  
pour la chaleur de votre accueil.*

*Hommages respectueux.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR Alassane SERE  
Agrégé de Physiologie à l'E.I.S.M.V.

*Votre amour du travail, votre rigueur scientifi-  
que et vos grandes qualités humaines nous ont  
séduits.*

*Nous ne dirons jamais assez la reconnaissance  
que nous vous devons pour le soutien et les  
marques de sympathie que vous nous avez toujours  
accordés. Vos conseils ont constitué pour nous  
un précieux enseignement.*

*C'est un grand honneur que vous nous faites en  
acceptant de siéger dans notre jury de thèse.*

MONSIEUR LE PROFESSEUR Charles KONDI AGBA  
Département d'Anatomie à l'E.I.S.M.V.

*Vos qualités autant dans le travail que dans les rapports humains ont toujours suscité en nous une sincère admiration.*

*Nous voudrions ainsi mieux exprimer ce que nous ressentons pour vous, en vous associant à notre jury de thèse. Et c'est une grande joie pour nous que vous ayez accepté d'y siéger.*

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE LE DOCTEUR José-Marie AFOUTOU  
Maître-Assistant en Histologie-Embryologie et Cytogénétique  
Faculté de Médecine et de Pharmacie. Médecin Biologiste  
au C.H.U. de DAKAR.

*Votre amour du travail et du travail bien fait, votre passion pour la génétique en générale et la Cytogénétique en particulier nous ont marqué tout le long de ces deux années passées auprès de vous.*

*Ce travail, vous l'avez initié et conduit avec toute votre volonté, votre collaboration ne nous a jamais fait défaut. L'ambiance dans laquelle nous avons travaillé atteste de vos qualités humaines. Vos nombreux conseils ont été pour nous un précieux enseignement.*

*Soyez assuré de votre profonde reconnaissance.*

*\*Par délibération, la Faculté et l'Ecole ont arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation ni improbation\*.*

# TABLE DES MATIERES

-----

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION .....	1
I - CHAPITRE PREMIER : Historique et généralités .....	2
1°) La première période .....	3
chez le cheval .....	5
chez les porcins .....	5
chez les bovins .....	6
2°) La deuxième période .....	6
3°) La troisième période .....	8
II - CHAPITRE DEUXIEME : Les techniques cytogénétiques de laboratoire .....	
X I. Les Tests chromatinienens .....	12
I.1 - Généralités .....	12
X I.2 - Etude de l'hétérochromatine sexuelle .....	14
I.2.1 - Techniques d'étude du cor- puscule chromatinien de BARR .....	14
I.2.1.1 - Matériel cellulaire .....	15
I.2.1.2 - Technique d'urgence .....	16
I.2.1.3 - Technique à court terme .....	17
I.2.1.4 - Les résultats nor- maux et leur signification .....	18
I.2.1.5 - Technique utilisant des cellules amniotiques .....	19
1) Matériel cellulaire .....	19
2) La technique .....	20
3) Résultats chez les animaux .....	20
I.2.2 - Technique d'étude du corpus- cule fluorescent Y, F. Body ou Y. Body .....	21

I.2.2.1 - Procédés I .....	22
I.2.2.2 - Variante technique de PEARSON .....	23
I.2.2.3 - Résultats .....	23
I.2.2.4 - Signification du corpus- cule fluorescent Y .....	24
I.3 - Intérêts cliniques des tests chroma- tiniens .....	25
I.3.1 - En Médecine humaine .....	25
I.3.1.1 - Intérêts du test chroma- tinien de BARR .....	25
1) Les anomalies rencontrées .....	25
a) La fréquence .....	25
b) Les anomalies du nombre de CB	25
c) Les anomalies de la taille du CB .....	25
2) Interprétation clinique des résultats .....	26
a) Sujets CB ou CB (-) .....	26
b) Sujets à CB ou CB (+) ....	26
3) Intérêt clinique de la fluo- rescence de l'Y .....	30
I.3.2 - En Médecine vétérinaire .....	30
✓ I.3.2.1 - Le syndrome de Klinefelter	31
✗ I.3.2.2 - Le syndrome de Turner .....	32
✗ I.3.2.3 - Intersexualité ou herma- phrodisme vrai .....	32
I.4 - Conclusion partielle .....	33
II - Les techniques du caryotype .....	34
II.1 - Les Principes généraux de l'analyse caryotypique	34
II.1.1 - Obtention de cellules en division : la culture .....	34
II.1.2 - Dispersion des chromosomes : le choc hypotonique .....	35



II.1.3 - Traitement des préparations.....	36
II.1.4 - Observation, photographie, montage et analyse du caryotype .....	37
II.2 - Les Techniques d'obtention des préparations chromosomiques (60) .....	38
II.2.1 - A partir des lymphocytes .....	38
II.2.1.1 - La technique d'étude des chromosomes humains .....	39
1) Le prélèvement .....	39
a) Micro-prélèvement de sang capillaire .....	39
b) Prélèvement veineux .....	39
2) La culture .....	40
a) Le matériel .....	40
b) le milieu de culture .....	41
c) la mise en culture .....	42
3) La récolte des mitoses .....	43
a) Accumulation des métaphoses .....	43
b) Traitement hypotonique .....	43
c) La fixation .....	44
d) L'étalement .....	45
II.2.1.2 - La technique d'étude des chromo- somes des animaux domestiques (1)....	47
a) le prélèvement .....	47
1) Chez les bovins, les petits ruminants, le cheval et l'âne .....	47
2) chez le porc .....	47/49
Tableau n° 2 (particularités de l'ana- lyse chromosomique chez les animaux domestiques).....	48
3) Chez le chien et le chat ....	49
b) Technique de culture .....	49
II.2.2 - A partir des fibroblastes .....	49
a) Le prélèvement .....	50

b) Etablissement de la culture .....	52
b.1 - Réalisation des explants .....	52
b.2 - Mise en culture .....	52
c) Divisions de la culture (passages) .....	54
d) Préparations chromosomiques .....	55
II.2.3 - A partir des cellules amniotiques variantes	56
a) Le prélèvement .....	56
b) la mise en culture .....	56
c) Croissance .....	56
d) Réalisation des préparations .....	57
d.1 - Le choc hypotonique fixation .....	58
II.2.4 - Etude de la moëlle osseuse et du sang	
leucémique .....	58
a) Protocole (cf. tabl. n° 3) .....	59
a.1 - Prélèvement .....	60
a.2 - Ensemencement .....	60
a.3 - Récolte des cellules .....	60
a.4 - Technique cytologique .....	60
b) Technique d'étude du sang leucémique .....	61
II.2.5 - Etude à partir des cellules germinales ou	
étude de la méiose .....	61
a) Le prélèvement .....	62
b) le transport .....	62
c) obtention des cellules .....	62
II.2.5.2 - Méthode différée d'étude de la	
méiose. DUTRILLAUX 1971 .....	64
II.3 - Coloration et marquages chromosomiques .....	65
II.3.1 - Technique standard .....	65
1) La technique .....	66
2) Résultats .....	66
II.3.2 - Les techniques de marquage .....	67
II.3.2.1 - Technique de moyenne résolution,	
technique de haute résolution .....	68
a) Les bandes Q (quinacrine) .....	68

a.1 - Technique.....	69
a.2 - Résultats.....	69
b) - Les bandes G (Giemsa).....	70
b.1 - Technique.....	71
b.2 - Résultats.....	72
c) - Les bandes R.....	72
c.1 - Technique.....	73
c.2 - Résultats.....	74
c.3 - Remarques.....	75
d) - Les bandes T (Terminales).....	75
d.1 - Technique.....	75
d.2 - Résultats.....	76
d.3 - Remarques.....	76
e) - Les bandes C.....	76
e.1 - Technique.....	77
e.2 - Résultats.....	77
e.3 - Remarques.....	78
f) - Les bandes CT.....	78
f.1 - Technique.....	78
f.2 - Résultats.....	79
g) - Remarques.....	79

II.3.2.2 - Technique à haute résolution : obtention et marquage des cellules en prophase ou prométaphase.....	80
a) - Synchronisation par la thymidine.....	80
b) - Synchronisation par l'améthoptérine.....	82
c) - Marquage des cellules en prophase ou prométaphase....	82
d) - Synchronisation par la thymidine et incorporation de BrDU.....	83
e) - Synchronisation par le BrDU.....	83
e.1 - Principe.....	84
e.2 - Résultats.....	84
e.3 - Technique détaillée.....	85

II.3.2.3 - Comparaisons des résultats obtenus par les différentes techniques de "banding".....	87
II.3.2.4 - Les techniques de marquage utilisées chez les animaux.	91
II.3.2.5 - Les conséquences de l'amélioration des techniques du caryotype.....	92
II.4 - OBSERVATIONS MICROSCOPIQUE ET MICROPHOTOGRAPHIE.....	94
II.4,1 - Observation microscopique.....	94
II.4.1.1 - Observation en lumière ordinaire.....	94
II.4.1.2 - Observation en fluorescence.....	94
 <u>CHAPITRE TROISIEME - LES RESULTATS-INTEREST ET INDICATIONS DE L'ANALYSE CHROMOSOMIQUES...</u>	
← I - LE CHROMOSOME NORMAL.....	96
II - CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES : LES NOMENCLATURES.....	98
II.1 - Généralités.....	98
II.2 - L'établissement pratique du caryotype standard.....	99
II.3 - L'établissement pratique du caryotype standard de quelques espèces domestiques.....	103
II.3.1 - Le caryotype du porc normal.....	105
II.3.2 - Etablissement du caryotype du cheval normal.....	109
II.3.3 - Le caryotype normal des bovins.....	112
II.3.4 - Le caryotype normal des petits ruminants.....	115
II.3.4.1 - Le caryotype normal des ovins.....	115
II.3.4.2 - Le caryotype normal des caprins.....	116
II.3.5 - Le caryotype normal du chat et du chien.....	116
II.3.5.1 - Le caryotype du chat domestique ( <u>Felis catis</u> ).....	116
II.3.5.2 - Le caryotype du chien.....	117
II.4 - Remarques	
II.5 - Nomenclature des bandes chromosomiques : Principes généraux.....	119

↙	III - LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES.....	121 -
✓	III.1 - Les aneuploïdies.....	121
✗	III.1.1 - Les polyploïdies.....	122
✓	III.1.1.1 - Les triploïdes.....	122
	III.1.1.2 - La tétraploïdie.....	123
	III.1.2 - Les hyperdiploïdies.....	123
✓	III.1.2.1 - Les trisomies autosomiques.....	124
✓	III.1.2.2 - Les trisomies gonosomiques.....	125
	III.1.3 - Les hypoploïdies.....	126
	III.2 - Remarque : le freemartinisme.....	126
✓	III.3 - Les aneusomies.....	127
	III.3.1 - Les remaniements intra-chromosomiques.....	127
✓	III.3.1.1 - Les délétions.....	127
✓	III.3.1.2 - Les anneaux.....	129
	III.3.1.3 - Les duplications.....	129
	III.3.1.4 - Le syndrome de fragilisation chromosomique.....	129
	III.3.1.5 - Les isochromes.....	130
	III.3.1.6 - Les inversions.....	131
	III.3.2 - Les remaniements inter-chromosomiques.....	132
	III.3.2.1 - Les translocations simples.....	132
	III.3.2.2 - Les translocations réciproques.....	132
	a) - Les fusions centriques.....	133
	b) - Translocation par fusion télomérique.....	133
	III.3.3 - Cas particuliers des animaux domestiques.....	133
	III.3.3.1 - Chez les bovins.....	134
→ ✓	III.3.3.2 - Chez les porcins.....	137.
	IV - INDICATION ET INTERETS DU CARYOTYPE.....	140
	IV.1 - En médecine humaine.....	140

IV.1.1 - Les indications en fonction de l'âge.....	141
IV.1.1.1 - Pendant la vie intra-utérine.....	141
IV.1.1.2 - L'âge maternel .....	141
IV.1.1.3 - Présence d'un remaniement chromosomique chez l'un ou les deux parents.....	142
IV.1.1.4 - Antécédents d'enfants trisomie 21 dans la fratrie.....	143
IV.1.1.2 - A la naissance.....	143
IV.1.1.3 - Chez l'enfant.....	144
IV.1.1.4 - Chez l'adolescent.....	145
IV.1.2 - Indication des techniques particulières d'analyse chromosomique.....	146
IV.2 - En médecine vétérinaire.....	147
<u>CONCLUSION GENERALE</u> .....	149
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

I N T R O D U C T I O N

En Octobre 1982, le Département de ZOOTECHNIE et ALIMENTATION de l'E.I.M.S.V. et le Département d'HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE de la Faculté de Médecine de l'Université de DAKAR, ont décidé de mettre en commun leurs moyens matériels, techniques et humains pour développer le laboratoire de Cytogénétique du C.H.U. de DAKAR afin de lui permettre de faire face enfin efficacement aux demandes multiples d'analyse chromosomique que lui adressent médecins et vétérinaires éventuellement. Les initiateurs de ce projet s'étaient fixés deux objectifs à atteindre en cinq ans. (1983-1988)

Premièrement - Cerner pour les vulgariser en milieu africain les bases techniques théorique et pratique d'une pratique cytogénétique correcte et acceptable : ce document en fait le point.

Deuxièmement - Effectuer l'inventaire cytogénétique des différentes espèces animales domestiques et des marqueurs chromosomiques humains dans la région intertropicale d'Afrique.

Au bout de deux ans de stage théorique et pratique auprès du Docteur José-Marie AFOUTOU nous avons étudié la faisabilité, en milieu sous-équipé, de 193 techniques standards et spéciales d'analyse chromosomique. Cette recherche a débouché sur la mise au point et l'adoption, au niveau du laboratoire de Cytogénétique du C.H.U. de DAKAR, d'une ou deux variantes techniques **simplifiées** mais efficaces permettant :

----- Le test chromatinien de BARR

----- L'étude de la fluorescence de l'Y



----- Obtention de préparations chromosomiques analysables à partir de divers matériels biologiques : sang total, moëlle osseuse, liquide d'ascite, liquide céphalo-spinal etc...

- la réalisation de marquage chromosomique : G, Q, R, C et T.

- L'obtention de chromosomes prométaphasiques.

Dans les pages qui suivent on retiendra :

Les détails techniques, les résultats et une étude des principales indications de ces techniques en médecine humaine et vétérinaire.

Notre exposé comportera trois chapitres :

CHAPITRE PREMIER - Historique et généralités.

CHAPITRE DEUXIEME - Les techniques cytogénétiques de laboratoire.

CHAPITRE TROISIEME - Résultats, intérêts et indications de l'analyse chromosomique en médecine humaine et vétérinaire.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE ET GENERALITES

Depuis les premières observations chromosomiques, à la fin du 19e siècle jusqu'à la découverte des techniques d'analyse chromosomique les plus raffinées en 1980, l'histoire naturelle de la cytogénétique se divise en trois périodes :

- Naissance et jeunesse : de 1900 à 1959
- Période de maturité et de gloire : 1960 à 1970
- L'apothéose : 1970 à 1984.

1°) - La première période

Elle commence au début du siècle et se termine en 1959. Durant cette période, les chromosomes étaient observés en histologie et sur des tissus en division. La mauvaise qualité des préparations conduisait à une confusion sur le nombre exact des chromosomes chez les différentes espèces.

Tous les auteurs ayant étudié les chromosomes humains utilisaient des coupes de testicules. Mais la plupart des prélèvements étant réalisés post-mortem sur des suppliciés, les tissus présentaient déjà de graves altérations avant même d'être fixés. Par ailleurs les comptages sur coupe étaient rendus difficiles par la superposition des images aussi bien que par la perte possible d'un ou de plusieurs chromosomes. C'est pourquoi les premières observations des chromosomes humains donnèrent lieu à des estimations fort contradictoires.

De 1898 à 1912, le nombre varie de 16 à 36.

C'est WINIWATER, en 1912 qui va se rapprocher le plus de la réalité. Il utilise un matériel de choix, à savoir des biopsies testiculaires prélevées chirurgicalement et immédiatement fixées. Le mérite lui revient surtout d'avoir mis au point une épaisseur de coupe qui lui permettant de

garder intact l'ensemble de la garniture chromosomique d'une cellule. Il décrira ainsi:- chez l'homme 46 Autosomes + X  
-chez la femme 46 Autosomes + 2 X.

PAINTER en 1921, s'inspirant de ce résultat, découvre le chromosome Y, et en 1923, il conclut à l'existence de 48 chromosomes :

46 A + X + Y pour l'homme

46 A + X + X pour la femme.

A partir de cette date, tous les auteurs vont mettre un accent particulier sur l'amélioration des techniques.

Ainsi KEMP en 1929, utilise la culture de tissus pour observer des mitoses somatiques.

KROUTCHOV et BERLIN en 1934 observent des mitoses à partir de cultures de lymphocytes.

GAVAUDAN et POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF en 1937, découvrent l'action antimitotique de la colchicine et de ses dérivés, permettant ainsi le blocage de la métaphase. Grâce à ces trois dernières innovations et surtout grâce à la découverte du choc hypotonique par HSU en 1952, le nombre des chromosomes humains sera définitivement fixé à 46 par TJO et LEVAN en 1956.

44 A + X + Y chez l'homme.

44 A + X + X chez la femme.

----- cette période de confusion s'observe également chez les animaux domestiques.

### Chez le cheval

Depuis la première étude des chromosomes du cheval par KIRILLOV en 1912, jusqu'à 1944, le nombre  $2n$  a varié de 33 à 66. Ce n'est qu'en 1959 que le nombre exact de 64 sera obtenu, fortuitement d'ailleurs par ROTHFELS, AXELRAD, SMINOVITCH, Mac CULLOCH et PARKER, qui, lors d'une étude sur l'origine de lignées cellulaires anormales de souris, de singe et d'homme, furent amenés à envisager la contamination de leurs cultures par des cellules sanguines de cheval provenant d'un serum anormalement purifié. Plusieurs travaux (onze au total) sont venus par la suite confirmer de façon absolue le nombre 64 établi par ces auteurs.

### Chez les porcins

Bien avant les années 60, le nombre des chromosomes chez les porcs était l'objet de controverse.

Les premières études de KRALINGER (1931), sur les cellules de la lignée germinale, avaient conclu à un complément de 38 chromosomes chez le mâle et 40 chez la femelle.

Par la suite, MAKINO (1944), SACHS (1954), SPALDING et BERRY (1956), APARICIO (1960), ont avancé le nombre de 40 chromosomes avec un dimorphisme sexuel XY ; XX.

Mais le nombre de 38 chromosomes avancé par BRYDEN (1933) SMITH et coll. (1938) CREW et KOLLER (1939), MULDAL (1948) a été finalement confirmé par de nombreux auteurs dont CLAUSEN et SYVERTON (1961), RUDDLE (1961) GIMENEZ-MARTIN et coll. (1967), MAKINO et coll. (1967), De NORONHA (1963), STONE (1963) GERNKE (1964), NAAG et SANTUCCI (1964), Di ANTONIO (1964), De CASTRO et PISANI (1964), EVANS (1965), Mac FEELY et HARE (1965) pour ne citer que ceux-là.

Comme l'a indiqué HULOT (1969) (160) tout le monde s'accorde aujourd'hui sur le nombre  $n = 38$ . Mais il y a eu cependant des confusions quant à la description et au classement des chromosomes. Mais depuis l'avènement des techniques de bandes en 1970 un grand pas a été franchi pour pallier à ces difficultés de classement.

### Chez les bovins

Les premières observations de chromosomes de bovins sont dues à KRALLINGER (1927). Il faudra attendre 1957 pour que l'étude de chromosomes de bovins, à partir de culture de cellules par MELANDER, confirme le nombre  $2n = 60$  admis aujourd'hui.

### 2°) - La deuxième période

Elle correspond à ce que l'on peut appeler les années de gloire. En effet c'est durant cette période que les plus grandes **aberrations** chromosomiques ont été **réalisées** et associées à de nombreuses affections, ouvrant ainsi l'ère à la cytogénétique dite médicale.

La découverte de la trisomie 21 chez l'homme en 1959 par J. LEJEUNE, M. GAUTIER et R. TURPIN en sera le point de départ.

Dans la même année (1959) JACOBS et STRONG découvrent le déterminisme 47, XXY du syndrome de Klinefelter. Tandis que celui du syndrome de Turner (monosomie X) est découvert par FORD, JAMES, POLANI, de ALMEIDA et BRIGGS.

Une année plus tard (1960) furent découvertes la trisomie 13 par PATAJ et coll. la trisomie 18 par EDWARDS et coll. et le syndrome triplo X par JACOBS et coll. en 1960.

de même que de nombreuses combinaisons gonosomiques allant de 47,XYY à 50,XXXXYY chez les hommes.

de 45,XO à 49,XXXXX chez les femmes.

La cytogénétique devenait ainsi un excellent moyen de diagnostic occupant une place de choix dans le bilan anatomo-clinique de tous les syndromes polymalformatifs avec ou sans débilité mentale.

Face à ce succès éclatant, la nécessité de se réunir pour harmoniser les diverses nomenclatures cytogénétiques utilisées s'imposait. D'où la conférence de Denver en 1960 suivie de celle de Londres en 1963. La classification numérale proposée par PATAU et coll. sera en 1966 est adoptée à la suite de ces consultations. D'autres anomalies seront découvertes :

en 1963, le syndrome du "cri du chat" ou syndrome (Sp-) par Jérôme LEJEUNE.

le syndrome de délétion du bras long du chromosome 18 (18q-) par Jean de GROUCHY en 1964.

En 1966 la conférence de Chicago adopte des symboles pour désigner les anomalies chromosomiques : par exemple Ph1 pour le chromosome de Philadelphie.

Cette période se caractérise chez les animaux domestiques par la découverte de la translocation 1/29 par GUSTAVSONN et coll. en 1964. Mais il faudra surtout attendre les années 1970 avec l'application des nouvelles techniques cytogénétiques pour assister à une moisson beaucoup plus riche en matière d'anomalies chez les animaux domestiques.

3°) - La troisième période

Elle débute peu avant 1970 avec la découverte des techniques des bandes. Avant, l'identification précise de chaque paire de chromosomes chez les espèces humaine et animales, était la plus grande difficulté.

A partir de 1969, des techniques nouvelles pour une identification plus précise ont commencé à se faire jour.

CASPERSON et ses coll. (1968) eurent l'idée d'utiliser un agent alkylant fluorescent, la moutarde de quinacrine ou mépacrine, pour colorer les chromosomes de végétaux et de hamster chinois. L'examen en microscopie à fluorescence montra des structures particulières le long des chromosomes, des bandes plus ou moins fluorescentes. Dans les mêmes conditions les chromosomes humains ont également une structure en bandes particulières (CASPERSON et coll. 1970) : On parle alors de bandes Q.

Dès lors les techniques d'examen en fluorescence se développent en cytogénétique, et la possibilité de mettre en évidence une différenciation le long du chromosome, visible au microscope, allait stimuler la recherche d'autres techniques d'examen, reposant sur des principes physiques et biochimiques divers, faisant intervenir les différents composants chromosomiques, ADN et protéines, ainsi que la dynamique de la replication de l'ADN, et de la condensation des chromatides.

Vont succéder aux bandes Q de CASPERSON et coll. :

- les bandes G (Giemsa) par :

les méthodes de "dénaturation" chimique :  
SUMMER et coll. (1971), SCHNELDL (1971)  
DUTRILLAUX et coll. (1971), SEABRIGHT (1971).



SCIENTIFIC RESEARCH  
AND DEVELOPMENT  
VEGETABLE AND ANIMAL  
SCIENTIFIC RESEARCH

- Les bandes R (Reverse) par les méthodes de "dénaturation" thermique : DUTRILLAUX et LEJEUNE (1977) ; CARPENTIER et coll. (1972), DUTRILLAUX et COVIC (1974), SEHESTED (1974), DUTRILLAUX (1975).
- Les bandes T (Téломériques) par DUTRILLAUX (1973).
- Les bandes C (Centromériques) (ARRIGHI et HSU 1977 ; GRAIG-HOLMES et SHAW, 1971 ; YUNIS et coll., 1971 ; SUMMER, 1972)
- Les bandes CT par SCHERES, 1976.
- Les méthodes de traitement par le BrdU progressivement développées par ZAKHAROV et EGOLINA en 1968, PALMA en 1970 et ZAKHAROV et EGOLINA en 1972.
- Enfin, les techniques de haute résolution. Dès 1978, DUTRILLAUX et collaborateurs (60) utilisant des artifices techniques, arriveront à déplacer le stade d'étude des chromosomes de la Métaphase vers la Prophase sub-terminale ou Prométaphase. Cette innovation technique devait permettre le doublement du nombre de bandes au moins analysable sur les chromosomes et un raffinement extrême dans l'analyse des anomalies de structures des chromosomes. Certains auteurs dont J.M. ROBERT (160) considèrent à juste titre que nous avons atteint là la limite optique d'analyse cytogénétique.

Ces méthodes, toutes adaptées avec succès chez les animaux, ont pris une place importante, de tout premier rang, dans l'analyse chromosomique.

Ces dernières années, on assiste au développement de l'étude cytogénétique de très jeunes embryons tant en Médecine humaine, qu'en Médecine vétérinaire. Dans cette dernière discipline, les progrès sont beaucoup plus nets, en liaison avec le développement de la **transplantation** embryonnaire, particulièrement chez les bovins.

Les premières études ont été faites sur des embryons âgés de 13-14 jours (HARE et coll., 1978 ; WINTENBERGER-TORRES et POPESCU, 1980).

De nos jours des embryons de 6 à 7 jours sont utilisés avec des résultats très concluants.

Les techniques de culture à partir de cellules embryonnaires ont également été améliorées. Et les prélèvements de ce type de cellules, sont maintenant possible grâce à l'amniocentèse et à de micromanipulations.

La cytogénétique, comme pratiquement toutes les sciences, a connu des débuts difficiles. Elle a surtout souffert d'insuffisances techniques pendant plus d'un demi-siècle. Cependant, la découverte d'une anomalie chromosomique, et surtout la liaison de cette anomalie à une maladie stimulera les recherches, permettant, l'amélioration d'année en année des techniques d'étude, condition essentielle et principale pour l'obtention et l'exploitation d'un caryotype : d'où, toute l'importance du chapitre suivant qui est consacré à une revue analytique et critique des principales techniques d'étude **en** cytogénétique, à la lumière de l'expérience acquise au laboratoire de Cytogénétique de l'Université de DAKAR - Sénégal.

CHAPITRE DEUXIEME

LES TECHNIQUES CYTOGENETIQUES DE  
LABORATOIRE

La cytogénétique dont le but est la description des chromosomes des animaux et des végétaux, est, dans le vaste ensemble de la biologie un domaine commun à la cytologie et à la génétique. Elle est cytologique par ses méthodes d'analyse, par sa nature descriptive, ainsi que par son objet d'étude, le chromosome : organite cellulaire ; elle est génétique parce que cet organite est le support de l'hérédité.

Notre propos dans ce chapitre sera consacré à l'aspect cytologique à savoir les techniques d'étude en cytogénétique. Les examens cytogénétiques de laboratoire sont de deux types :

----- Les techniques d'étude de la chromatine dans le noyau interphasique (noyau non en division) ou tests chromosomiques : corpuscule de Barr (cB), Drumstick (Dr), Fluorescence de l'Y (corpuscule fluorescent Y : CFY).

----- Les techniques d'étude du noyau mitotique (noyau en division) ou tests chromosomiques à proprement parler.

# I - LES TESTS CHROMATINIENS

## I.1 - GENERALITES

Chez l'homme, comme chez la plupart des animaux supérieurs, le matériel génétique est constitué par de l'acide désoxyribonucléique ADN ou (DNA) localisé essentiellement dans le noyau. L'organisation de ce matériel héréditaire possède deux variantes **caractéristiques dans les** deux grandes périodes du cycle cellulaire, à savoir l'interphase et la division cellulaire ou mitose.

Dans le noyau interphasique, le DNA est en masse plus ou moins organisée : la chromatine.

Pendant la division cellulaire l'ADN s'organise sous la forme de chromosomes (dont le nombre et la forme sont caractéristiques de l'espèce considérée) **constituant le** caryotype (cf Chap.III). L'observation en microscopie optique des noyaux de cellules fixées et colorées révèle des plages fortement colorées par les colorants basiques alternant avec des **zones** claires. On appelle chromocentres les régions colorées intensément : ils sont constitués d'hétérochromatine, les plages claires étant formées d'euchromatine. L'euchromatine, claire, est formée essentiellement des fibres de DNA de 35 à 60 Å de diamètre (fibre A) tandis que l'hétérochromatine, sombre, présente surtout des fibres épaisses de 200 à 300 Å de diamètre (fibre B).

- l'hétérochromatine constitutive,
- l'hétérochromatine facultative,

L'hétérochromatine constitutive occupe une région du chromosome où les filaments de DNA restent constamment

condensés, et dont la localisation est identique sur le chromosome homologue. Elle serait génétiquement inactive. Elle est largement dispersée sur tous les chromosomes. Les segments les plus volumineux se retrouvent au niveau des constriction secondaires des chromosomes A<sub>1</sub>, Cg, E<sub>16</sub> chez l'homme, ainsi qu'à l'extrémité du bras long du gonosome Y (ARRIGHI et HSU, 1971). Des observations cytologiques indiquent que la majorité de ces segments hétérochromatiques, y compris celui de l'Y se situent près du nucléole pendant l'interphase (JONES, CANEO et coll. 1972)

L'hétérochromatine facultative correspond à une région chromosomique qui n'est pas obligatoirement condensée pendant l'interphase ; toutefois, les gènes de structure qu'elle porte sont inactivés. Elle est soit gonosomique, soit autosomique.

L'hétérochromatine facultative autosomique est peu connue et insuffisamment étudiée. Quant à l'hétérochromatine facultative gonosomique, elle correspond à l'inactivation de tout ou d'une partie (bras long "q") de l'un des gonosomes X chez les individus de sexe féminin. Elle correspond à la chromatine sexuelle pouvant être mise en évidence et étudiée dans les cellules interphasiques sous la forme de corpuscule de Barr, et dans les cellules sanguines polynucléaires sous la forme de "bagette" de Lamb ou "Drumstick".

AU TOTAL :

On peut retenir que, l'exploration cytogénétique des noyaux interphasiques peut donc porter :

- soit sur l'hétérochromatine constitutive autosomique des paires A<sub>1</sub>, Cg et E<sub>16</sub> (chez les humains mieux étudiées sur caryotype (cf II)).

- soit sur l'hétérochromatine constitutive gonosomique du bras long du chromosome Y (corpuscule fluorescent Y ou Y Body ou F Body),

- soit enfin l'hétérochromatine facultative gonosomique X : corpuscule chromatinien de Barr et Drumstick.

## I.2 - ETUDE DE L'HETEROCHROMATINE SEXUELLE

Le terme de corpuscule chromatinien sexuel, désigne un "chromocentre" correspondant à un chromosome sexuel et qui peut être mis en évidence, par des techniques adéquates, dans un noyau interphasique.

On distingue :

----- le corpuscule chromatinien de Barr, correspondant à un chromosome X. Seul le deuxième chromosome X et les chromosomes X surnuméraires peuvent être mis en évidence dans un noyau interphasique. Le Drumstick est l'équivalent de la chromatine de Barr dans les cellules sanguines nucléées.

----- le corpuscule chromatinien Y ou corpuscule fluorescent ou F BODY dérive du chromosome Y mis en évidence après coloration par les fluorochromes.

L'étude du Drumstick a perdu tout intérêt parce que trop aléatoire. Nous ne la traiterons pas ici.

### I.2.1 - Techniques d'étude du corpuscule chromatinien de Barr.

Le dimorphisme nucléaire des cellules animales pendant l'interphase a été mis en évidence en 1937 par

---

GEITLER (17). En 1945 SMITH (164) a suggéré qu'il pouvait servir à la détermination du sex-ratio. En 1949, BARR et BERTRAM (13) ont découvert dans le noyau des cellules nerveuses de chatte un corpuscule intensément coloré par les colorants basiques et qui est absent chez les chats. Ce corpuscule leur apparut associé au nucléole : ils l'appellèrent corpuscule nucléolaire. Deux ans plus tard, en 1951, Barr (1) établira que ce corpuscule chromatinien était le plus souvent contre la membrane nucléaire. Le terme corpuscule de Barr est alors devenu populaire.

Ce sexe chromatinien, révélateur du sexe génétique, est très facile à mettre en évidence puisqu'on le trouve au niveau des divers tissus y compris les plus accessibles comme l'épithélium buccal. La chromatine sexuelle a été mise en évidence chez de nombreuses espèces, en particulier chez l'homme, le chien, le chat, les petits ruminants, les bovins et les équidés. (18)

Les variantes techniques permettant la mise en évidence et l'étude du corpuscule de Barr sont nombreuses (1) nous rapportons ici, les trois variantes techniques couramment utilisées au laboratoire de Cytogénétique de l'Université de DAKAR (Sénégal).

#### I.2.1.1 - Matériel cellulaire

- Toutes sortes de frottis de cellules épithéliales ou conjonctives non sanguines, peuvent être utilisées, notamment :

- \* Des cellules de la muqueuse buccale
  - \* Des cellules de la muqueuse vaginale
  - \* Des cellules de la racine des cheveux
-



- \* Des cellules urothéliales sur culot urinaire
- \* Des cellules mésothéliales obtenues sur culot de centrifugation des liquides d'épanchements, pleural, péritonéal ou ascite, synovial.

Cependant le frottis buccal est le plus couramment utilisé, de loin le plus simple comme le plus efficace.

- Prélèvement dans une bouche propre débarrassée de toute particule alimentaire, par rinçage soigneux. Grattage doux mais efficace, au niveau du cul-de-sac postérieur de la joue, ou au niveau du "rouge" de la lèvre inférieure, avec une spatule métallique mousse ou une lame de verre, en évitant de faire saigner.

- Etalement immédiat des cellules ainsi obtenues, sur une lame porte-objet propre.

- Réaliser pour chaque joue un frottis distinct en prélevant avec une spatule différente (intérêt pour le dépistage des mosaïques gonosomiques).

#### I.2.1.2 - Technique d'urgence

(Délai de réponse : 1 heure, préparation éphémère).

- Déposer une goutte fixante et colorante d'Orcéine-Acétique (1) sur le frottis puis recouvrir d'une lame couvre-objet propre.

- Laisser à la température ambiante (20 à 30°) pendant 15 à 30 mn.

- Sceller avec du vernis à ongle
- Observer au microscope ordinaire au (X 10) puis au (X 100) à immersion.

#### I.2.1.3 - Technique à court terme

(Délai de réponse : 2 à 3 heures) (GUARD).

(Préparation permanente).

- Fixation dans un mélange à volume égal d'alcool 90° à 100° et d'éther ou avec de la laque à cheveux ou spray-cyte.

Laisser fixer pendant 30 mn.

- Hydratation (alcool 90°, 70°, 50°, enfin eau distillée).

- Hydrolyse acide : HCl normal à 56°C pendant 8 mn ou HcP 5 X normal pendant 25 mn.

Cette opération élimine le cytoplasme et atténue la coloration des chromocentres sauf celle du ou des corpuscules de Barr.

- Coloration avec une solution aqueuse de bleu de toluidine à 1%

- Différenciation rapide à l'eau acétifiée à 1% pendant quelques secondes

- Déshydratation (alcool 50°, 70°, 90°, 100° et enfin xylol)

- Montage sous lamelle à l'Eukitt au Baume du Canada

- Lecture (X 10) puis (X 100) à l'immersion.

On appréciera la présence, la fréquence et la taille du corpuscule de Barr.

I.2.1.4 - Les résultats normaux et leur signification

Le corpuscule de Barr typique est de forme sub-triangulaire à base externe accolée contre la membrane nucléaire. Il est souvent entouré d'un halo clair.

L'appréciation de sa taille exige une grande habitude.

Chez la femme et les femelles normales en général, il y a deux gonosomes (46,XX : femme ; 60,XX : vache), tandis que l'homme et les mâles en général ne possèdent qu'un seul X secondé d'un Y porteur du déterminant sexuel ou déterminant sexuel principal (46,XY : homme ; 60 XY : taureau). Or à quelques rares exceptions près, l'homme et les mâles en général, avec leur seul X, **fabriquent** les mêmes variétés protéiques que les individus de sexe féminin.

Ce qui signifie qu'il existe chez les individus de sexe féminin, du matériel génétique non seulement excédentaire, mais également superflu, porté par l'un des gonosomes X qui, de ce fait, est dit inactif. Ce X se condense pendant l'interphase et forme le corpuscule de Barr ou le Drumstick, par ailleurs il est à "réplication tardive" pendant la phase préparant la mitose.

Femme et femelles normales :

1 (X) actif plus 1 (X) inactif.

Homme et mâles (normaux) :

1 (X) actif plus 1 (Y) actif.

(nombre de cB = nombre de X-1)

$NX = (n-1)cB$  ou  $ncB = (n + 1) X$

- . Femme et femelles normales : 2 X --- 1cB (2X et 1cP)
- . Homme et mâles normaux : 1 X --- ocB (cB-)

De l'avis général, le pourcentage de cellules buccales montrant un corpuscule de Barr typique, varie entre 10 et 30 p 100 chez la femme normale avec une moyenne de 16 p 100.

Chez un homme normal il n'y a pas de cB.

Chez les animaux, le pourcentage de (cB+) est particulièrement élevé : 30 à 70 p 100 chez la femelle contre 5 p 100 chez le mâle.

#### I.2.1.5 - Technique utilisant des cellules amniotiques (1 ; 76)

Elle est applicable à l'homme et aux animaux.

##### 1) - Matériel cellulaire

Le liquide amniotique est récolté soit :

- sur une femme gestante à la 19e semaine d'aménorrhée.
- sur des vaches gestantes sacrifiées par nécessité, à l'abattoir. Dans ce cas, le liquide amniotique est récolté après l'éviscération, directement du sac amniotique.
- Sur des vaches gestantes, le liquide est obtenu par amniocentèse, effectué latéralement à la ligne blanche.

On prélève stérilement 30 à 50 ml de liquide amniotique, pouvant également servir pour l'analyse caryotypique.

2) - La technique

- Centrifuger le liquide pendant 15 minutes à 2500 tr/mn.

- Rejeter le surnageant. Remettre en suspension le culot dans un résidu de surnageant.

- Effectuer des frottis sur des lames enduites préalablement d'albumine d'oeuf ou de sérum glycérimé.

- **Colorer** les lames pendant 5 mn en les plongeant dans une solution aqueuse à 1 p. 100 de violet de crésyl. On peut également utiliser du bleu de toluidine à 1 p. 100 comme précédemment.

- Rincer à l'eau courante et laisser sécher.

3) - Résultats chez les animaux

- La chromatine sexuelle se présente comme une particule identifiable bien contournée, intensément basophile collée à la face interne de la membrane nucléaire.

- Si la chromatine est positive (CB+) dans les proportions de 60 à 90 p. 100, le produit est de sexe femelle.

- Si la chromatine est négative (CB-) ou si le taux

Ce test permet d'établir le sexe du veau avec certitude dans 91 p. 100 des cas.

Par la détermination intra-utérine du sexe à la période foetale, c'est-à-dire pendant les deux derniers tiers

de la gestation, on peut diriger le développement du foetus, par une alimentation équilibrée riche en principes nutritifs plastiques et énergétiques, particulièrement dans le cas où le foetus est mâle et provient d'une mère record, vu sa destination pour la reproduction.

#### REMARQUE

Mis à part les artéfacts (plicatures, encoches nucléaires, amas bactériens) le corpuscule de Barr subirait l'influence des administrations d'hormones sexuelles qui sont administrées souvent à hautes doses chez les animaux.

Sa fréquence serait augmentée par les oestrogènes et abaissée par la testostérone et la progestérone. (132)

#### I.2.2 - Technique d'étude du corpuscule fluorescent Y, F. Body ou Y.Body ( 1 )

Se servant de la technique de fluorescence mise au point en 1968 par CASPERSON et coll. (34) ; PEARSON et coll. (141), vont découvrir le corpuscule fluorescent Y. Ils furent les premiers à observer un corpuscule fluorescent dans les cellules interphasiques humaines mâles normales colorées par la moutarde de quinacrine et deux corpuscules fluorescents dans les cellules interphasiques de sujets à caryotype 47,XYY. Il apparut rapidement que chaque corpuscule fluorescent correspond à la fluorescence particulière du segment distal du bras long du gonosome Y. La mise en évidence de ce corpuscule n'est pas aussi aisée que celle des corpuscules chromatiniens (cB et Drumstick)

Les variantes techniques sont nombreuses (1) nous retiendrons ici pour la description, deux variantes utilisées au Laboratoire de Cytogénétique de l'Université de DAKAR (Sénégal) qui elles mêmes dérivent de la technique princeps de PEARSON (141) comme tous les autres procédés techniques. Et pour ce faire elles reposent donc sur les principes généraux suivants :

- \* Obtention d'un bon frottis cellulaire
- \* Fixation immédiate dans un bon fixateur nucléaire :  
'Alcool-Ether Ethanol absolu, alcool acétique 3/1)
- \* Coloration dans une solution de fluochrome (Acebrine-Bayer de préférence)
- \* Lavage-rinçage et montage
- \* Observation immédiate en lumière ultra-violet.

Les modifications peuvent intervenir ( ), portant essentiellement sur :

- Le type de fixateur et la durée de fixation
- La durée de séjour des préparations dans le fluorochrome
- le temps de lavage et de rinçage, de la composition et du pH des liquides utilisés pour se faire.

#### I.2.2.1 - Procédés I (PEARSON) 1970 (Princeps)

- Fixer le matériel cellulaire par du méthanol absolu ou de l'alcool-éther à à.
- Plonger les lames dans le bain de fluorochrome :  
ici une solution aqueuse d'hydrochloride de quina-crine ou acébrine-Bayer à 0,5 p. 100 pendant 5 minutes.

- Laver doucement pendant 3 minutes à l'eau du robinet.
- Rincer dans une solution tampon
- Monter avec du tampon pH 5,5.
- Examiner immédiatement au microscope à fluorescence équipé de filtre variant selon le type d'appareil (lampe à vapeur de mercure, filtre d'excitation BG<sub>12</sub> ou BE<sub>3</sub>, filtre d'arrêt 530 nm).

I.2.2.2 - Variante technique de la technique de PEARSON  
(utilisée couramment par nous) (1)

Sur un frottis sanguin très mince ou autre matériel cellulaire,

- fixer avec du méthanol absolu pendant 5 minutes
- colorer pendant 5 minutes dans une solution aqueuse Atébrine-Bayer à 0,5 p. 100.
- rincer dans du tampon de Mc Ilvaine pH 5,5
- monter dans le tampon
- observer et photographier comme à l'accoutumée.

I.2.2.3 - Résultats

L'observation immédiate et attentive au microscope à fluorescence des préparations ainsi traitées permet de voir dans un grand nombre de cellules humaines normales d'origine masculine un corpuscule fluorescent brillant se caractérisant par :

- sa taille environ 0,25  $\mu$
- sa fluorescence particulièrement vive par rapport au fond nucléaire
- sa position parfois périphérique, mais le plus souvent central voire "juxta-nucléolaire".



On observera dans chaque cellule autant de corpuscule Y que le sujet étudié possèdera de chromosome Y dans sa garniture chromosomique.

L'interprétation des images est parfois délicate : en effet on devra se méfier de la possibilité de faux positifs du fait de l'existence éventuelle d'un marqueur hétérochromatique très fluorescent (région péricentrique du 3 par exemple).

#### I.2.2.4 - Signification du corpuscule fluorescent Y

Elle est la même chez l'homme et les animaux.

On observe dans le noyau de chaque cellule autant de corpuscules fluorescents Y (CFY) que le sujet examiné possède de chromosomes Y dans sa garniture chromosomique.

nY ---- n CFY

Un homme ou un mâle normal a 1 Y donc 1 CFY  
(homme : 46, XY : taureau 60,XY)

Une femme ou une femelle normale n'a pas de Y donc pas de CFY (femme : 46,XX, vache 60,XX).

Il faut savoir en outre :

- que l'appréciation de la taille du CFY dépend de la race (par exemple le CFY des japonais et surtout des sémites est nettement plus gros, celui des négroïdes est plus petit, et exige une grande expérience.

- Qu'on devra se méfier de la possibilité de noyaux faux CFY (+) du fait de l'existence de marqueurs autosomiques eux-mêmes très fluorescents: l'habitude, les renseignements cliniques et une technique de coloration et d'observation excellente permettent de contourner ces écueils.

### I.3 - INTERETS CLINIQUES DES TESTS CHROMATINIENS

#### I.3.1 - En Médecine humaine

##### I.3.1.1 - Intérêts du test chromatinien de Barr

###### 1) - Les anomalies rencontrées

Elles portent sur : la fréquence, le nombre de cB typique et la taille du ou des cB observés.

###### a) - La fréquence

Le test chromatinien de Barr ne doit pas être pratiqué pendant la 1ère quinzaine de vie extra-utérine

Les fréquences de cB inférieures à 10% ou supérieures à 30% doivent être considérées comme anormales (1 ; 111 ; 171).

\* Une fréquence inférieure à 10% correspond le plus souvent à une anomalie non homogène du nombre du gonosome X. Il s'agit presque toujours de monosomie X ou syndrome de Turner en mosaïque (45,X0/46,XX) (9).

\* Une fréquence supérieure à 3% doit faire suspecter une garniture contenant plus de 2 X. Il faut refaire une lecture attentive. Souvent, il s'agit d'un frottis pléïomorphe comportant à la fois des noyaux à 0cB, des noyaux à 1 cB et un nombre très variable de noyaux à 2 ou plus de 2cB.

Le cas le plus fréquent est la trisomie X ou syndrome triplo X (47,XXX).

b) - Les anomalies du nombre de cB

Elles sont regroupées dans le tableau n° I p.

c) - Les anomalies de la taille du cB

L'appréciation de l'anomalie de taille d'un cB exige une grande habitude. Outre les cB de taille normale, on rencontre parfois de cB de petite taille ou de grande taille.

- un cB de petite taille signifie une délétion d'un ou des deux bras du gonosome X : on parle de monosomie partielle ( $Xp^-$  ;  $Qq^-$  ; X en anneau ou  $Xr$ ). Le cB- $Xr$  est plus petit que  $Xq$  (-), lui-même plus petit que  $Xp$  (-). Tous correspondent à un syndrome de Turner.

- un cB de grande taille témoigne de l'existence d'une anomalie de la taille de l'X en rapport soit avec une translocation (X,X) ou (X ; autosome) ou un isochromosome X généralement ( $Xisoq$ ) l'autre isochromosome, isop donnant un cB généralement de taille subnormale.

N.B : Lorsqu'un malade porte entre autres un X anormal, c'est toujours celui-là qui s'inactive, se condense pour former le cB.

2) - Interprétation clinique des résultats

On se trouve le plus souvent devant une des deux situations suivantes : sujets cB (+) ou sujets cB (-).

a - Sujets cB ou cB (-)

Si c'est un homme, c'est normal (46,XY) le seul diagnostic différentiel théoriquement concevable étant la monosomie X (45, OY), **mais elle est létale.**

- Chez la femme, un tel résultat peut signifier une des trois éventualités suivantes :

\*Une monosomie X : 45,XO : syndrome de Turner.

\*Une délétion tellement importante de l'X que le morceau restant en s'inactivant réalise un micro cB non identifiable : 46, XXp- ou 46 XXq-Xr, (variantes du syndrome de Turner).

Le syndrome de Morris ou du testicule féminisant femme cB (-) de bonne taille, au physique habituellement généreux, souvent absence de pilosité axillaire et pubienne, mais surtout aménorrhée primaire. Le plus souvent en rapport avec un défaut de sensibilité des tissus foetaux (absence de récepteurs cytologiques des hormones androgènes) ou une inactivité ou une non production d'une enzyme essentielle de la 5 $\alpha$  réductase qui catalyse la transformation de la testostérone inactive en 5 $\alpha$  déhydrotestostérone active et la seule efficace sur la masculinisation des voies génitales internes et des organes génitaux externes.

b) - Sujets à cB ou cB (+)

Chez la femme, rien de plus normal. Cependant, **attention !**

\*Si la fréquence de cB est inférieure à 10%, il faut penser au syndrome de Turner en mosaïque et demander les caryotypes lymphocytaires et/ou fibroblastiques (voir 2ème partie).

---

\*Si le cB est de petite taille, il faut penser à une délétion de l'X (Xp- ou Xq-) ou un X en anneau (Xr).

Notons que le bras "q" étant légèrement plus long que p, et (Xr) résultant d'une double délétion (Xp-) (Xq-) le cB (Xr) est plus petit que cB (Xp-): tous correspondent à un syndrome de Turner mais avec des composantes somatiques ou **génitales** variables.

Si on est en présence d'un retard pubertaire, ou d'une puberté retardée, avec des troubles menstruels inexpliqués chez un sujet du sexe féminin - - obèse, caractériel et présentant des anomalies osseuses, il faut demander un test chromatinien à la recherche d'une anomalie en excès du nombre de gonosomes X : triplo X ou autres (cf. tableau).









----- Chez l'homme, cB (+) a deux significations essentiellement :

\*avant tout le syndrome de KLINEFELTER et ses variantes. Il s'agit de dysgénésies gonadiques avec comme signe constant une azoospermie sécrétoire en rapport avec une hyalinose testiculaire "Sertoli-Cells"-Only-Syndrome" responsable d'une stérilité masculine primaire et définitive.

Au delà de 2 X, à l'aspect typique fait de : grande taille, maroskélie et aspect gynoïde, s'ajoute une dysostose et une débilité mentale dont l'intensité est en rapport direct avec le nombre d'X supplémentaires.

\*secondairement, il peut s'agir soit d'un homme XX dérivant vraisemblablement d'1 oeuf 47, XXY avec perte secondaire de l'Y après différenciation testiculaire ; soit d'un homme XX avec translocation sur ou insertion dans l'un des X du segment péracentrique de l'Y, celui-là même qui porte les

**TABLEAU I - Récapitulatif des principales anomalies gonosomiques dépistables par les tests chromatinien.**

SEX	Tc BARR	Fluo.del'Y	CARYOTYPE	REMARQUES
F		OCFY	46,XX	Femme normale
F		OCFY	45,XO	Syndrome de TURNER
F		1CFY	46,XY	Syndrome de MORRIS
F		OCFY	47,XXX	Triplo X
F		OCFY	48,XXXX	Tetra X (rare)
F		ocfy	49,XXXXX	Pentaplo X (rare)
F		OCFY	46,XXr ou 46,XXq- ou 46,XXp- ou	Variante aneusomiques du syndrome de TURNER
F			46,XXisoq ou 46,XX,t (x ? auto)	TURNER-LIKE Syndrome polymalformatif variable F (autosome)
M	OCB	1CFY	46,XY	Homme normal
M	ICB	1CFY	47,XXY	Syndrome de KLINEFELTER
M	1CB	OCFY	46,XX	KLINEFELTER-LIKE
M	2CB	1CFY	48,XXXY	VARIANTES DU SYNDROMES DE
M	3CB	1CFY	49,XXXXY	KLINEFELTER
M	4CB	1CFY	50,XXXXXY	
M	OCB	2CFY	47,XYY	Sujet diplo. Y
M	OCB	1 microCFY	46,XYiso(-)	Délétion du bras long de l'y
M	OCB	1 macroCFY	46,XYisoq ou 46,XY,t (YqYq)	Isochrome Yq Translocation par fusion centrique de deux Y.

gènes de différenciation testiculaire notamment celui codant pour la synthèse de l'Ag HY. Du reste, ce sont des sujets klinefelter)like (gynécomastie, atrophie testiculaire, stérilité primaire).

### 3) - Intérêt clinique de la fluorescence de l'Y.

Cette technique a un triple intérêt :

a - Elle permet une approche directe du gonosome Y sans avoir recours d'emblée au caryotype (plus long à établir et plus onéreux).

b - couplée avec le test chromatinien de Barr, elle permet d'être informé sur l'équipement gonosomique de la cellule et partant de son porteur. A ce titre, elle occupe une place de choix dans le bilan anatomo-clinique des dysgénésies gonadiques, des ambiguïtés sexuelles, des hermaphroditismes et pseudo-hermaphroditismes.

c - elle permet, enfin, le diagnostic prénatal du sexe foetal à partir des cellules d'1 foetus au morphotype inconnu ou non diagnostiqué par l'échotomographie (cellules amniotiques). Diagnostic du sexe foetal d'autant plus intéressant qu'un ou les deux parents sont porteurs d'un gène délétère lié au sexe.

#### I.3.2 - En médecine vétérinaire

Les tests chromatinien, en plus de la détermination intra-utérine du sexe (cf 76 ), se révèlent être des moyens très pratiques d'investigation en Médecine vétérinaire, surtout lors du dépistage de l'intersexualité chez

les espèces domestiques. L'intersexualité, caractérisée par la coexistence chez un même individu, d'attributs des deux sexes, sera étudié dans le cadre général des anomalies chromosomiques. Les tests chromatiniens permettent de déterminer le sexe génétique. Ce domaine est très riche en exemple, et concerne presque toutes les espèces domestiques :

1) - Le syndrome de Klinefelter

- Chez le chat

Le cas le plus caractéristique est celui des chats mâles tricolores (écaille de tortue). Dans cette espèce seules les femelles hétérozygotes peuvent présenter une robe tricolore. Le mâle, hémizygote pour X, ne peut être que bicolore. Chez ces sujets anormaux on a :

39,XXY (au lieu de 38,XY) avec chromatine sexuelle positive (12 ; 17 ; 19 ; 131 ; 132).

- Chez le bélier : 55, XXY (            et coll. 1969)
- Chez le bouc : 62, XXXY  
63, XXXXY (GLUHOVSCHI et coll. 1973)
- Chez le porc : 39, XXY (HULOT, 1969 (107)  
(GLUHOVSCHI, 1973) (    )
- Chez le taureau : 67, XXY (RIECK, 1973) (19)
- Chez le chien (CLOUGH et coll. 1970) (12 ; 132)  
(HARE et coll. 1966) (12)
- Chez le cheval : 66, XXXY (GLUHOVSCHI et coll.  
1975) (29)



2 - Le syndrome de Turner

- Chez le porc : 37, XO (GLUHOVSCHI et coll. 1975)
- Chez la vache : 61, XXX (RIECK et coll. 1970 ;  
1973) (19)
- Chez le chat  
mosaïque XY - XYY (LOUGHMANN et FRYE, 1974(12))

3 - Intersexualité gonadique ou hermaphrodisme vrai

- Chez le porc : 39, XXY ovotestis avec sexe chromatinien femelle. (GLUHOVSCHI et coll. 1970 (12) ; JOHNSON et coll. 1958 (12)).
- Chez le cheval : ovotestis avec sexe chromatinien femelle.  
(GRANZ et WIDMAIER ; 1960) (1)
- Chez le chat : phénotype mâle avec testicule d'un côté et ovaire de l'autre. Présence de la chromatine sexuelle et mosaïque gonosomique XX/XY.  
(THULINE ; 1964) (12)

Le domaine de l'intersexualité est certes riche en exemple mais elle est assez complexe car les données cytogénétiques ne se superposent souvent pas en pathologie animale, aux données anatomiques.

---

#### 1.4 - CONCLUSION PARTIELLE

Il ressort de ce qui précède, une grande efficacité des tests chromatinien, notamment le test chromatinien de Barr et l'étude de la fluorescence de l'Y. Ces tests constituent, sans aucun doute, une méthode de choix parfaitement adaptée aux conditions matérielles précaires de nos pays sous-équipés. Pratiqués et interprétés par les bio-cliniciens expérimentés et avertis de leurs limites, ces tests peuvent fournir des renseignements précieux aux pédiatres, aux endocrinologues, aux psychiatres, aux gynécologues et aux urologues, aux vétérinaires, cliniciens, zootechniciens et aux sélectionneurs, pour ce citer que ceux-là. Si le Drumstick n'est pas toujours significatif et la fluorescence de l'Y très onéreuse, le test chromatinien de Barr est une technique de choix pour le dépistage des anomalies du chromosome X, principalement celui du syndrome de Turner (45, XO) et ces variantes (mosaïques ; 46, XXq-, 46, XXr) dont le diagnostic précoce dans la prime enfance permet une thérapie assez spectaculaire, bien que ne résolvant pas le problème fondamental de la stérilité primaire, puisque tous les signes psychosomatiques sont atténués sinon annihilés (1;9 ;60 ).

En Afrique, toute promotion de la cytogénétique médicale doit commencer par l'étude chromatographique, pour, dès que les conditions d'équipements matériel et humain le permettront, se poursuivre avec l'analyse du noyau mitotique : le caryotype qui est, du reste, l'objet de la 2ème partie de ce chapitre.

## II - LES TECHNIQUES DU CARYOTYPE

Les techniques d'étude du caryotype sont très nombreuses. Presque chaque laboratoire dispose aujourd'hui de sa propre technique. Mais malgré cette diversité, toutes les méthodes d'analyse reposent sur un certain nombre de principes ( ).

C'est de par leur respect strict que l'on peut aboutir aux renseignements souhaités, sur le nombre, la forme et la structure des chromosomes.

### II.1 - LES PRINCIPES GENERAUX DE L'ANALYSE CARYOTYPIQUE

Les techniques de l'étude du caryotype doivent satisfaire à quatre impératifs (LEJEUNE et coll. 1960) ( ) :

Obtention de cellules en division présentant une dispersion correcte des chromosomes (afin de pouvoir les compter),

Traitement entraînant une déformation minimum de ceux-ci (afin de pouvoir les identifier)

L'aplatissement des préparations (afin d'obtenir des photographies dans lesquelles les chromosomes soient simultanément au même point,

Coloration révélant au mieux la forme et la structure des chromosomes (afin de les analyser et classer).

C'est à ce prix qu'une technique peut fournir le maximum de renseignements souhaités sur le nombre, la forme et la structure des chromosomes.

#### II.1.1 - OBTENTION DE CELLULES EN DIVISION : LA CULTURE

On peut cultiver n'importe quel tissu humain. Toutefois les tissus les plus couramment utilisés sont :

Les tissus en voie de prolifération naturelle, notamment le tissu testiculaire, le tissu hématopoïétique (la moëlle osseuse)

Le tissu conjonctif (fibroblastes) et les lymphocytes circulants.

Quelque soit le mode de culture, deux possibilités s'offrent à nous pour accumuler les mitoses :

soit obtenir une "vague" de mitoses en contrôlant le milieu de culture, ce qui permet d'observer des mitoses normales (techniques délicates).

soit bloquer l'anaphase pour accumuler des figures métaphasiques en utilisant l'action mitostatique de la colchicine et de ses dérivés. ( )

L'adjonction de colchicine est indispensable dans les cultures peu fécondes (sang et moëlle osseuse à court terme); par contre, lorsque la croissance cellulaire est intense (culture de fibroblastes) il devient possible d'étudier les stades précoces (prométaphase) et d'éliminer l'action propre de la colchicine sur les chromosomes eux-mêmes. En effet l'action mitostatique de la colchicine n'est pas restreinte à la seule inhibition du fuseau achromatique, mais elle provoque également une anomalie des chromosomes eux-mêmes (AMAROSE, 1959) ( ) et un trouble du rythme de la synthèse de l'ADN (LIMA DE FARIA et BOSE, 1962) ( ). Parfois on peut avoir une séparation préanaphasique des centromères, voire une fragmentation des chromosomes. L'usage de la colchicine doit être évité dans tous les cas où l'efficacité de la technique autorise à n'y point recourir.

#### II.1.2 - Dispersion des chromosomes : le choc hypotonique.

Pendant longtemps, il fut difficile de dénombrer les chromosomes à cause de leur enchevêtrement comme les pièces d'un jeu de jonchet. En 1958, HSU découvre "le choc

hypotonique" qui permet d'obtenir une bonne dispersion des chromosomes dans le noyau gonflé. Toutefois, malgré son utilité incontestable, la dispersion obtenue par choc hypotonique fait perdre une partie des informations désirables spécialement en ce qui concerne l'association probable des chromosomes à satellite entre eux, l'appariement somatique possible des homologues ou même une structure spatiale caractéristique de la plaque équatoriale. BURTON, DAVID et coll. (1963) ( 1 ) pensent qu'il y a une tendance à l'association entre les chromosomes homologues, surtout dans les cellules féminines. De leur côté O.J. MILLER et coll. (1963) ( 1 ) considèrent que certains chromosomes ont une tendance à se trouver plus fréquemment que d'autres à la périphérie des figures mitotiques, **après** dispersion des chromosomes. Quant à TURPIN ; LEJEUNE et coll. ; ils pensent que le choc hypotonique doit être modéré pour éviter de perturber la structure même des chromosomes.

### II.1.3 - Traitement des préparations

Toutes les méthodes de dispersions et de fixation actuellement en usage sont efficaces mais non équivalentes.

Dispersion = La "squash-method" ou technique d'écrasement présente des avantages certains sur le choc hypotonique (intégrité chimique des chromosomes) mais également de graves inconvénients (déformations mécaniques et surtout, perte de chromosomes).

Les difficultés de fixation et coloration peuvent être résolues d'un seul coup par l'emploi de l'orcéine-acétique, mais les préparations sont instables, quoiqu'un artifice dû à HSU et GILL ( 109), permette de les rendre permanentes. Par ailleurs, le contraste entre les chromosomes et le suc nucléaire laisse à désirer et l'individualisation des

satellites est souvent insuffisante. Pour ces raisons, TURPIN et LEJEUNE pensent "qu'il est impératif d'obtenir des préparations d'emblée et une différenciation des chromosomes par hydrolyse préalable du cytoplasme. Bien sûr, les techniques de marquage chromosomique constituent le meilleur artifice permettant actuellement une analyse plus précise des chromosomes.

Enfin, l'aplatissement des préparations par simple séchage à l'air libre ( 1 ) donne toute satisfaction et reste le point commun de la plupart des techniques d'études du sang périphérique.

#### II.1.4 - Observation, photographie, montage et analyse du caryotype

Les préparations chromosomiques ainsi obtenues doivent être méthodiquement exploitées. Cette exploitation comportera :

- coloration ou traitements standards ou spéciaux
- l'observation des bonnes métaphases
- la prise de vue, le développement du film et le tirage sur papier.
- le découpage et le classement des chromosomes métaphasiques et leur montage.
- enfin l'interprétation clinique du caryotype qui est le stade qui offre le plus d'intérêt au clinicien.

## II.2 - LES TECHNIQUES D'OBTENTION DES PREPARATIONS CHROMOSOMIQUES (60)

Les préparations chromosomiques peuvent être obtenues directement en faisant appel à des tissus spontanément en division (moëlle osseuse, tissu testiculaire, tissus néoplasiques etc...) soit en ayant recours à la culture de cellules (lymphocytes, fibroblastes, cellules amniotiques etc..)

De nos investigations bibliographiques, il ressort, que la culture des lymphocytes, est de loin, la technique la plus utilisée.

Pour toutes les techniques proposées, il existe une multitude de protocoles. Les décrire tous, serait une tâche fastidieuse et inutile, dans le cadre de ce travail nous n'en retiendrons que les principaux et dans une large mesure celle en usage au laboratoire de cytogénétique de l'Université de DAKAR.

### II.2.1 - A partir des lymphocytes

La culture de cellules sanguines nucléées a été inventée par KROUTCHOV et BERLIN en 1934 ( 1 ). Elle fut réactualisée par MOORHEAD et coll. en 1960 ( ). Toutes les techniques utilisant le sang périphérique, dérivent de la technique initiale de MOORHEAD et coll., il existe un très grand nombre de variantes qui s'équivalent dans l'ensemble.

Au laboratoire de DAKAR il est utilisé avec succès deux macro techniques : l'une pour l'homme, **dérivant de** la variante technique de LEJEUNE (1960) (121); la seconde pour les animaux dérivant de la technique princeps de MOORHEAD (1960) (132)

## II.2.1.1 - La technique d'étude des chromosomes humains

### 1 - Le prélèvement

Le prélèvement est certes avec la culture, l'étape la plus importante, pour l'obtention d'une carte chromosomique. Aussi le respect de certaines règles est-il nécessaire notamment dans des conditions d'aseptie absolue. Ceci afin d'éviter la multiplication de germes banaux lors de la mise en culture. Car d'une façon générale, l'échec des cultures peut être attribué essentiellement à la toxicité ou à la contamination du milieu.

Deux modes de prélèvements peuvent être employés ; le microprélèvement de sang capillaire et le prélèvement veineux.

#### a) - Micro-prélèvement de sang capillaire

Réalisable au Laboratoire sur les humains et particulièrement chez les nourrissons. Une pulpe digitale ou le talon est désinfecté à l'alcool à 70°, puis à l'éther. Après séchage, une scarification est effectuée à l'aide d'un vaccinostyle. Le sang est recueilli à la pipette Pasteur et directementensemencé dans le milieu.

#### b) - Prélèvement veineux

Cette méthode permet de faire des prélèvements hors du laboratoire, réalisable sur les adultes.

La région où doit s'effectuer le prélèvement est soigneusement lavée à l'alcool à 60°-70°.



Si le prélèvement est réalisé à la seringue, l'aiguille, après ponction est laissée en place avant l'adaptation de la seringue, de manière à ce qu'elle soit lavée par le sang qui s'écoule. Ceci afin d'éviter la pénétration d'alcool, à effet anti-mitotique, dans le sang. Ne jamais utiliser ni de l'alcool absolu ni de l'alcool iodé.

Le prélèvement (5cc à 10cc de sang) est placé dans un flacon stérile contenant de l'héparine sèche (100 UI) ou gardé dans la seringue, rincée au paravant à l'héparine liquide.

Le flacon a l'avantage de permettre l'expédition facile du prélèvement. Il est encore plus aisé d'utiliser des tubes vacutainer héparinés.

Le temps de latence entre le prélèvement et la mise en culture doit être le plus rapide possible, mais peut atteindre une semaine, en moyenne 4 à 5 jours et de préférence à une température légèrement supérieure à 0°C. On obtient aussi de bons résultats avec des températures de conservation comprises entre +4°C et 20°C. Les conditions de transports dans nos régions chaudes obligent à une surveillance redoublée du mode d'emballage protecteur.

## 2 - La culture

Signalons encore une fois que le prélèvement et la culture cellulaire sont des étapes importantes dans toute technique d'établissement du caryotype : pas de mitose pas de métaphase ; sans cellules métaphasiques, pas de caryotype.

a) - Le matériel

- Il faut disposer d'une étuve maintenue à 37°C.
- les cultures sont effectuées dans des tubes de verre ou de plastique stériles ayant une contenance de 9 à 10 ml, munis d'un bouchon à vis et présentant un méplat afin de pouvoir être disposés horizontalement dans l'étuve.

Le tube Rossignol a l'avantage d'avoir un fond conique, ce qui évitera de faire des opérations de transvasement pour les centrifugations.

b) - Le milieu de culture

--- Plusieurs milieux de culture sont actuellement utilisés. Nous employons au laboratoire de cytogénétique de DAKAR :

soit le TC 199 de l'Institut Pasteur  
soit le RPMI 1640.

Le milieu est composé comme suit :

TC 199 ou RPMI 1640 avec antibiotiques (pénicilline : 100 UI/ml; streptomycine : 100 ug/ml) = 6 ml.

Serum humain du groupe AB stérile ou du serum de veau foetal stérile = 2 ml. L'expérience a montré que tout **sérum** Rh (+) de tout groupe peut être utilisé sans dommage.

Le **sérum** est l'élément le plus significatif d'un milieu de culture. On peut, si nécessaire, utiliser du sérum autologue.

Phytohémagglutinine ou PHA-C (I.B.F.) ou PHA-P (Difco) = 0,05 ml.

La PHA est au paravant réhydraté à la concentration finale de 1,5%. Elle est utilisée comme démarreur des mitoses. Sous son action, les lymphoblastes issus de lymphocytes périphériques, commencent à se diviser après un temps de latence de 30 à 36 heures. La PHA est donc un inducteur de la transformation lymphoblastique et des mitoses. Son bon emploi dépend de son dosage. Dans certains cas on peut être amené à employer d'autres lectines comme la concanavaline A (Con A) et pokeweed mitogen.

L'héparine à raison de 100 UI. Ceci pour éviter toute coagulation possible durant toute la période de culture coagulation, qui peut être provoquée par le pouvoir agglutinogène de la PHA.

#### c) - La mise en culture

Le sang total estensemencé à raison de 0,5 ml par tube chez le grand enfant et l'adulte, ou de 0,4ml, chez le nourrisson. Rappelons que cette étape doit être faite avec les précautions d'aseptie absolue.

Les tubes de culture (du type LEJEUNE) sont placés horizontalement dans l'étuve à 37°C. L'incubation a lieu en règle pendant 72 heures, mais peut être prolongée 24 heures de plus sans inconvénient. Elle peut être raccourcie également de 24 heures si l'on veut analyser les mitoses de premières générations. Dans ce cas, la quantité de mitose recueillie est beaucoup moindre. L'expérience nous a montré à DAKAR que dès la 56<sup>e</sup> heure on a des mitoses en nombre suffisant et de qualité satisfaisante.

Il faut veiller à ce qu'au moment de la mise en culture, le pH du milieu soit compris entre 7,2 et 7,4. On sait par expérience que les pH alcalins, ont un effet défavorable sur la multiplication des leucocytes. ( 1 )

### 3 - La récolte des mitoses

#### a) - Accumulation des métaphases

Une heure et demi à deux heures avant la fin de la culture, les divisions sont arrêtées par l'addition dans chaque tube de 0,1 ml d'une solution de colchicine à 4 ug/ml. Les tubes sont remis à l'étuve à 37°C.

#### b) - Traitement hypotonique

A la fin du traitement par la colchicine, les tubes sont centrifugés (5mn à 110g ou 800 tours/mn) comme toutes les centrifugations suivantes.

- Le surnageant est rejeté par aspiration à la pipette Pasteur, ou vite rejeté d'un geste franc.

- Aspirer le culot pour homogénéiser, en allant jusqu'au fond, et rejeter doucement le long de la paroi du tube.

- Les tubes sont alors remplis (8 à 10 mn) du milieu hypotonique suivant, maintenu à 37°C :

Serum humain groupe AB ou serum de veau foetal :  
1 volume

Eau distillée stérile : 5 volumes.

Nous avons parfois utilisé avec succès comme solution hypotonique du KCl 0,075 M à 37°C.

- Le culot est soigneusement remis en suspension par aspiration et refoulement à la pipette Pasteur, sans provoquer la formation de bulles d'air.

- Les tubes sont ensuite à nouveau remis à l'étuve (37°C) ou dans un bain marie (37°C) pour 7 à 10 mn.

Toutes ces manipulations de mise en choc hypotonique ne doivent pas dépasser 1 mn pour chaque tube.

c) - La fixation

Pendant qu'agit le choc hypotonique, préparer extemporanément le 1er fixateur (CARNOY II). Le milieu hypotonique est décanté par centrifugation et le surnageant rejeté par aspiration à la pipette Pasteur ; toutefois, une hauteur de 2 mm de milieu est laissée au-dessus du culot, cette couche supérieure est riche en leucocytes. Délier et homogénéiser délicatement, d'abord sans fixateur selon les mêmes minutieuses manipulations (en tournant autour de la paroi, rejeter en remontant).

- Le premier fixateur est alors ajouté : ajouter initialement 0,5ml de fixateur ou 2 à 3 gouttes le long de la parois du tube. Le mélange doit pratiquement se faire dans la pipette. Les cellules sont soigneusement mises en suspension par quelques aspirations et expulsions lentes dans la pipette. Compléter ainsi, en 3 fois, jusqu'à 5 ml environ de fixateur. Il est très important d'éviter la formation de toute bulle.

Cette manipulation provoque la rupture des hématies et la libération de l'hémoglobine. (Coloration brunâtre de la suspension).

- Les tubes sont laissés pendant 15 mn à la température ambiante.

- Composition du CARNOY II :

- 1 - Acide acétique : 1 volume
- 2 - Chloroforme : 3 volumes
- 3 - Ethanol absolu : 6 volumes.

(Tous les réactifs sont du degré de degré de pureté "pour analyse").

Le deuxième fixateur (CARNOY I) peut être préparé en même temps que le CARNOY II, ou pendant que celui-ci agit.

- Les tubes sont alors centrifugés et le premier fixateur est rejeté à la pipette Pasteur. Homogénéiser doucement (tourner et aspirer une fois).

Ajouter au culot 1 à 2 ml de fixateur II, remettre le culot en suspension avec les précautions habituelles.

Composition du CARNOY I

- 1 - Acide acétique : 1 vol.
- 2 - Ethanol absolu : 3 vol.

La durée de cette seconde fixation est de 25 mn au moins, à la température ambiante, mais peut être prolongée sans inconvénient de quelques heures, permettant ainsi, si besoin, de différer l'étalement d'un jour à l'autre.

d) - L'étalement

Les lames auront été préparées, au préalable, de la façon suivante :

- choisir des lames de bonne qualité, non recouvertes de paraffine. De préférence des lames neuves.
- brosser au savon
- les rincer soigneusement en les frottant une à une entre le pouce et l'index sous l'eau courante. Reprendre cette opération 3 fois mais sans eau distillée de façon à ce qu'un film d'eau puisse se maintenir parfaitement dessus. Elles sont ensuite placées dans un Bêcher d'eau distillée et mise à la température de la glace fondante.

-Les tubes sont centrifugés et le fixateur est en partie rejeté : on laisse une quantité variable **selon** l'importance du culot (en moyenne : 5 à 6 mm au-dessus de celui-ci). Les cellules sont remises en suspension dans ce volume. Cette suspension est reprise à la pipette Pasteur ; on laisse tomber d'une hauteur de 3 à 4 cm, l'une à côté de l'autre, deux gouttes sur une lame froide recouverte d'un fin film d'eau (pour ce faire, la lame est soigneusement drainée, sur **champ**, sur papier filtre). D'autres lames sont ainsi préparées jusqu'à épuisement de la suspension (en moyenne, six lames par tube peuvent être ainsi obtenues). On laisse les préparations soit - sécher spontanément à l'air ou en soufflant doucement sur la surface à l'aide d'un sèche cheveux soit sécher à la flamme.

On peut également retirer les lames de l'eau distillée, les laisser égoutter puis les placer dans de l'alcool méthylique à 60%-70%. Retirer la lame de l'alcool et y déposer II ou III gouttes de cellules en suspension, et faire passer celle-ci rapidement dans une flamme. Les préparations ainsi obtenues peuvent être ensuite, soit simplement colorées au Giemsa, soit traitées pour obtenir les marquages. (cf. II.3)

II.2.1.2 - La technique d'étude des chromosomes des animaux domestiques. ( 1 )

Cette technique est très voisine de la précédente. Toutes les précautions énoncées ci-dessus (aseptie rigoureuse, minutie dans la manipulation) sont à respecter.

a) - Le prélèvement

La région où doit s'effectuer le prélèvement est soigneusement lavée à l'alcool à 60°-70°. La tâche est beaucoup plus difficile sur les animaux, à cause de leurs poils (source évidente de souillure) et de leur contention (qui nécessite un personnel humain disponible). Réaliser, autant que faire se peut, un prélèvement stérile. Nous employons plus couramment les tubes à prélèvement "vacuitainer" modèles héparinés.

Le prélèvement ne présente donc aucune particularité. Cela mérite d'être connu des cliniciens susceptibles de fournir des cas cliniques au laboratoire de cytogénétique.

1 - Chez les bovins, les petits ruminants, le cheval et l'âne.

Prélever au niveau de la veine jugulaire, 10 à 20 ml de sang voir même 80 ml (selon que l'on désire ou non obtenir du sérum isologue, c'est-à-dire du sérum animal utilisé).

2 - Chez le porc

Les prélèvements de sang chez le porc posent un problème pratique, en particulier lorsqu'il est nécessaire de recueillir plus de 2 ml. La prise de sang à la veine thoracique interne est relativement simple et rapide, quelle que



Tableau n° 2 : Particularités de l'analyse chromosomique à partir des lymphocytes, chez les animaux domestiques.

Espèce	Protocole	Mise en culture	Accumulation des Mitoses	Choc hypotonique	Fixation
Bovin et ovin caprin		<ul style="list-style-type: none"> <li>- M. 199 : 65 p. 100</li> <li>- Sérum Fovin 25 p. 100</li> <li>- PHA : 0,5 ml/10 ml</li> <li>- Sang total : 1,5 ml/10 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation : 72h à 37°C</li> <li>- colchicine : 0,05 µg/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kcl à 0,56 p. 100</li> <li>15 mn à 37°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>carnoy I :</li> <li>pendant 30 mn</li> </ul>
Porcin		<ul style="list-style-type: none"> <li>- TC 199 : 70 p. 100</li> <li>- Sérum : 30 p. 100</li> <li>- PHA : IV gouttes</li> <li>- Sang total : 0,25 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation : 60-72h à 37°C-38,5°C</li> <li>- colchicine : 0,8 µg/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kcl à 0,7 p. 100</li> <li>15 mn à 37°C ou 38,5°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>carnoy I ou II</li> <li>pendant 30 mn</li> </ul>
Equin		<ul style="list-style-type: none"> <li>- TC 199 : 75 p. 100</li> <li>- Sérum : 25 p. 100</li> <li>- PHA : IV gouttes</li> <li>- Sang total : VI gouttes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation 72 h à 37°C</li> <li>- colchicine : 375 /10 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>citrate de sodium</li> <li>10 mg/1 ml eau dist.</li> <li>15 mn à 37°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>carnoy I</li> <li>pendant 45 mn</li> </ul>
Chien et Chat		<ul style="list-style-type: none"> <li>- TC 199 : 75 p. 100</li> <li>- Sérum : 25 p. 100</li> <li>- PHA : 0,5 ml/10 ml</li> <li>- Sang total : 2 ml/6 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- incubation : 72 h à 37°C</li> <li>- colchicine : 4 µg/ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>cf Humain</li> <li>15 à 20 mn à 37°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>carnoy II</li> <li>pendant 30 mn</li> </ul>

soit la taille de l'animal, toutefois, dans ce dernier cas, la quantité de liquide prélevé est réduite. On peut, par cette méthode, obtenir 6 à 10 ml de sang. (25)

La prise de sang peut également être effectuée au niveau de la veine cave antérieure (sous anesthésie) méthode à éviter, ou au niveau de la veine auriculaire rostrale (en particulier chez les animaux de grande taille).

### 3 - Chez le chien et le chat

Le prélèvement peut s'effectuer à :

- la veine sous-cutanée antérieure de l'avant-bras, ou
- la veine saphène du membre postérieur, ou
- la veine jugulaire (chez le chiot).

#### b) - Technique de culture

Elle **dérive** de celle utilisée pour le matériel sanguin humain. Les particularités vétérinaires sont regroupées dans le tableau n° 43 .

#### I.2.2 - A partir des fibroblastes

Pour le travail de routine, du diagnostic cytogénétique, la culture du sang périphérique est sûrement, la méthode de choix, étant plus rapide et plus simple que la culture de fibroblastes. Cependant, dans certaines situations, la culture de fibroblastes est indispensable :

- La confirmation d'un nouveau type ou un type inattendu de caryotype, mis en évidence par l'examen des lymphocytes.

---- le diagnostic des mosaïques, quand il est nécessaire d'examiner plus d'un tissu.

---- le contrôle de la normalité du caryotype, quand une anomalie est trouvée dans le sang périphérique ou dans la moëlle osseuse d'un sujet porteur d'une maladie du système réticulo-histiocytaire.

---- la détermination du caryotype d'un embryon ou d'un jeune polymalformé, après le décès, avant l'examen des chromosomes lymphocytaires.

L'expérience a montré que les caryotypes obtenus par la culture de fibroblastes sont fiables à plusieurs égards :

- les chromosomes demeurent intacts après plusieurs repiquages, mais on peut avoir une accumulation des cellules aneuploïdes (SAKSELA et MOORHEAD, 1963) (1)

- chez un certain nombre de sujets présentant une aberration de type déterminé (GERMAN, 1972 ; TAYLOR et coll. 1973), (1) et chez les sujets irradiés (ENGEL et coll. 1964), (1), des clônes cellulaires présentant une anomalie cytogénétique peuvent être trouvés. Toutefois, dans ces conditions, les chromosomes des fibroblastes peuvent ne pas refléter la situation in vivo parce qu'il peut y avoir une sélection de types cellulaires particuliers. Cette technique n'est pas pratiquée en routine à DAKAR. Nous rapportons ici la technique utilisée avec succès à l'Institut de Progenèse de PARIS LEJEUNE, DUTRILLAUX, COUTURIER ( ).

#### I.2.2.1 - Le prélèvement

Les biopsies cutanées sont la source la plus habituelle de fibroblastes pour l'obtention de cultures cellulaires

en vue de la détermination du caryotype. Cependant, des fragments de nombreux autres tissus (aponévrose, muscles, reins, gonades...) peuvent être aussi utilisés pour initier des cultures cellulaires.

Toutes les manipulations décrites doivent être, bien entendu, effectués stérilement.

a.1 - Nettoyage de la région choisie (habituellement la face interne des membres) à l'alcool à 70° puis à l'éther

a.2 - Infiltration sous-cutanée de xylocaïne à 1 p. 100. Attendre l'installation de l'anesthésie.

a.3 - Prélèvement à l'emporte-pièce de 4 mm (une profondeur de 1 mm est suffisante). Saisir à la pince le fragment détaché et couper le pédicule le retenant au tissu sous-cutané, de sorte à emporter le derme.

Le prélèvement fait, tamponner à la compresse, le léger écoulement sanguin pouvant se produire ; rapprocher les deux lèvres de l'incision à l'aide de "steri-strips" et faire un pansement légèrement compressif qui sera laissé en place une semaine.

En général, la cicatrisation est très rapide.

Le prélèvement peut être aussi effectué au bistouri : un petit bourrelet d'épiderme fermé par une pince est découpé au-dessus de celle-ci sur une hauteur de 1 mm et une longueur de 2 mm.

a.4 - Placer les fragments, ainsi recueillis, dans des tubes stériles contenant du milieu de culture ou une solution saline équilibrée (solution de Hanks, par exemple).

b - Etablissement de la culture

b.1 - Réalisation des explant

Quel qu'ait été le mode de prélèvement, la mise en culture et les diverses manipulations sont réalisées selon un protocole identique.

L'échantillon est placé dans une boîte de Pétri, avec une petite quantité de milieu de culture. Il est ensuite découpé en petits fragments cubiques de 0,5 mm de côté environ, à l'aide d'un scalpel.

b.2 - Mise en culture

Dix de ces fragments environ, sont transférés, à l'aide d'une pipette Pasteur, dans un flacon plastique de 25 cm<sup>2</sup> où ils sont régulièrement répartis. On ajoute alors la quantité de milieu de démarrage juste suffisante pour baigner les explants, sans le faire flotter ( soit environ 0,7 ml par flacon de 25 cm<sup>2</sup>).

Milieu de démarrage

- milieu de Eagle MEM à base Hanks = 80 p. 100
- sérum de veau foetal = 20 p. 100
- pénicilline = 100 UI/ml
- kanamycine = 100 ug/ml
- mycostatine = 100 ug/ml (facultatif).

Chaque flacon est gazé (de manière que lors des étapes suivantes) avec un mélange air 95 p. 100, CO<sub>2</sub> 5 p. 100, hermétiquement fermé, et mis à l'étuve à 37°.

Au bout de deux jours, les explants doivent adhérer au fond du flacon ; le milieu est retiré et remplacé par 2 ml de milieu frais. Les flacons sont ensuite laissés tels quels une semaine.

Le milieu est ensuite renouvelé deux fois par semaine environ, et, dès que la multiplication cellulaire est active (virage rapide du rouge de phénol au jaune), le milieu de démarrage est remplacé par le milieu de croissance.

#### Milieu de croissance

- milieu de Eagle MEM à base Earle 90 p. 100
- sérum de veau foetal = 10 p. 100
- antibiotiques (comme milieu de démarrage).

Fréquemment, la première pousse cellulaire, à partir de biopsies cutanées, est de type épithélial. Il a été remarqué que, bien que rarement très gênante, celle-ci pouvait être évitée par une mise en culture différée des biopsies : une attente de 3 à 4 jours à + 4°C dans le milieu de culture donne de bons résultats.

Lorsque l'auréole de croissance est suffisante (généralement entre la 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> semaine), les explants sont retirés et éventuellement transférés dans un autre flacon. Une trypsination est effectuée afin d'assurer une meilleure répartition des cellules et une multiplication plus rapide : après rejet du milieu, le flacon est d'abord, rapidement rincé par une solution de trypsine à 0,2 p. 100, ensuite, 1 ml de la solution de trypsine est ajouté et le flacon est remis à l'étuve.

Solution de trypsine à 0,2g/100 ml.

- trypsine (1/250 Difco) : 0,2g
- milieu Eagle MEM : 100 ml
- ajuster le pH à 7,6 par addition de tampon Tris à 2 p. 100.
- filtrer.

La désagrégation des amas cellulaires par la trypsine est surveillée au microscope inversé et lorsqu'elle est jugée satisfaisante (en général au bout de 5 minutes), 5 ml de milieu de croissance sont ajoutés. Un pipetage énergique est effectué afin d'achever la dissociation des cellules et d'assurer leur répartition. La confluence est le plus souvent atteinte dans les 72 heures.

c) - Divisions de la culture (passages)

Lorsque la confluence est atteinte, le flacon est trypsiné comme ci-dessus mais quand le décollement des cellules est complet, l'action de la trypsine est neutralisée par l'addition de seulement 1 ml de milieu de culture.

Ces 2 ml de suspension cellulaire sont répartis dans deux nouveaux flacons de 25 cm<sup>2</sup>, (ou un flacon de 75 cm<sup>2</sup>).

Le milieu est renouvelé deux fois par semaine (6 ml pour les flacons de 25 cm<sup>2</sup>, 18 ml pour ceux de 75 cm<sup>2</sup>).

Lorsque la confluence est à nouveau atteinte, une nouvelle division de la culture est à effectuer.

d - Préparations chromosomiques

Dès que l'on a obtenu deux flacons de 25 cm<sup>2</sup>, l'un peut être destiné à la détermination du caryotype, l'autre permet tant de poursuivre la culture de la souche.

La récolte des cellules est effectuée de préférence le lendemain d'un passage.

Un volume de 0,1 ml d'une solution de colchicine à 4 ug/ml est ajouté dans le flacon. Deux heures après, le milieu de culture est récupéré dans un tube à centrifuger de 10 ml, et les cellules adhérant au flacon sont trypsinées à 37°C par addition d'1 ml de la solution de trypsine. Lorsqu'elles sont bien individualisées, la suspension est reprise à la pipette Pasteur et transférée dans le tube à centrifuger.

Les étapes suivantes : choc hypotonique, fixation, étalement, sont exactement identiques à celles de la technique utilisée pour les lymphocytes sanguins.

Cette technique donne d'excellents résultats, tant en ce qui concerne le nombre de mitoses, que leur qualité. En principe, un petit fragment entouré, prélevé stérilement, permet d'obtenir en une quinzaine de jours, plusieurs centaines de métaphases d'excellente qualité.

II.2.3 - A partir des cellules amniotiques

Cette technique est utilisée : afin d'assurer le diagnostic chromosomique.



- d'aider à la différenciation des mosaïques constitutionnelles et des "pseudo-mosaïques" liées à des accidents de culture in vitro.

Il est recommandé d'utiliser une technique de culture en foyers et d'analyser les chromosomes in situ.

### Variante

#### a) - Le prélèvement

#### b) - La mise en culture

Les cultures sont faites dans des boîtes à pétri de 35 mm de diamètre au fond desquelles est placée une lamelle de verre de 30 mm de diamètre. Deux milieux de croissance sont utilisés parallèlement pour chaque prélèvement. RPMI et HAM F10 ; les milieux sont supplémentés avec des antibiotiques et 20 p. 100 de sérum de veau foetal.

- mettre dans chaque boîte de pétri, 1,5 ml de liquide amniotique tel qu'il a été prélevé et y ajouter 1,5 à 2 ml de milieu de croissance.

#### c) - Croissance

- mettre les boîtes de pétri à incuber à 37°C dans une étuve à circuit d'air - CO<sub>2</sub> maintenant le pH à 7,3.

- ne jamais bouger les boîtes pendant les 4 à 5 premiers jours, pour permettre aux cellules de se fixer sur la lamelle.

- dès le 5<sup>e</sup> jour aspirer le mélange liquide amniotique et milieu et le remplacer par du milieu de croissance.

Renouveler le milieu toutes les quarante huit heures.

Examiner régulièrement les boîtes au microscope inversé pour déceler et suivre la formation des premiers foyers de cellules.

Si tout se passe bien, dès le 10<sup>e</sup> jour, les foyers de cellules sont suffisamment abondants pour permettre la réalisation de bonnes préparations chromosomiques.

Les lamelles sélectionnées sont prélevées stérilement avec des petites pinces et transportées dans une nouvelle boîte de pétri contenant du milieu frais.

Le lendemain on contrôle au microscope, le moment où les mitoses sont nombreuses (environ 20 à 22 heures après le changement) pour effectuer sur place les préparations chromosomiques.

#### d) - Réalisation des préparations chromosomiques

- Pas d'usage de colchicine. Celle-ci n'est pas nécessaire compte-tenu de la relative synchronisation induite par les changements de milieu.

##### d.1 - Le choc hypotonique

Le milieu hypotonique est composé comme suit :

5 ml de solution de Hanks

95 ml d'eau à pH = 7.

Ce milieu est porté à 37°C.

Le milieu de culture est rejeté, la boîte de pétri est rincée rapidement avec le milieu hypotonique, remplie à nouveau et mise à incuber ainsi 15 minutes à 37°C.

#### Fixation

Au bout de ce temps, les lamelles sont fixées par immersion dans du Carnoy chloroformé (voir technique sur lymphocyte) durant une heure. On les laisse ensuite sécher spontanément à l'air.

Toutes les techniques de marquage décrites peuvent être appliquées à ces préparations.

#### II.2.4 - Etude de la moëlle osseuse et du sang leucémique

Elle peut se faire soit en examen direct ou après culture à court terme de 24 ou 48 h. Nous rapportons ici le protocole et les techniques qui sont utilisées avec succès au laboratoire de DAKAR (1), elle dérive du reste de celles de DUTRILLAUX et COUTURIER (60) FORD et JACOBS 1958 (71).

b) - Protocole (cf. tableau n° 3)

<p><u>EXAMEN</u></p> <p><u>DIRECT</u></p> <p><u>MOELLE</u></p>	<p>Dans un tube à centrifuger (30 ml)</p> <p>10 ml de milieu 199</p> <p>+ 0,5 ml héparine 5.000 U.I./ml</p> <p>1 ml colchicine à 0,4%</p> <p>+ 0,5 ml moëlle</p> <p>2 heures à 37°C</p> <p>Technique cytogénétique classique</p>		
<p><u>CULTURE</u></p> <p><u>MOELLE</u></p> <p>et</p> <p><u>SANG</u></p>	<p>Milieu 199            16 ml</p> <p>Sérum AB              4 ml</p> <p>1 million de <b>cellules/ml</b></p> <p>Technique cytologique classique</p>	<p>24 H.</p> <p>48 H.</p>	<p>Avec PHA</p> <p>une goutte de M</p> <p>et</p> <p>une goutte de F</p> <p>Sans PHA</p> <hr/> <p>Avec PHA</p> <p>une goutte de M</p> <p>et</p> <p>une goutte de P</p> <hr/> <p>Sans PHA</p>

Préparation des cultures pour l'analyse chromosomique de cellules médullaires et sanguines dans le cas des leucémies.

b.1 - Le prélèvement

La moëlle est prélevée au trocart de Mallarmé comme pour un examen hématologique ; un prélèvement de 0,5ml est suffisant.

b.2 - Ensemencement

Les tubes employés sont identiques à ceux utilisés pour la culture des lymphocytes décrite en (II.2.1). Ils sont remplis avec le même milieu en omettant simplement d'ajouter de PHA. Trois tubes seront ensemencés chacun par 0,1 ml de moëlle, immédiatement après le prélèvement ; l'un contenant de la colchicine à la concentration habituelle, est destiné à l'examen direct, un autre sera mis à l'étuve durant 24 h. à 37°C, le dernier durant 48 h. (examen différé à court terme).

b.3 - Récolte des cellules

Dans chaque cas, les cellules sont récoltées après deux heures de traitement par la colchicine selon la technique décrite pour les lymphocytes. Les résultats sont variables selon les patients c'est la raison pour laquelle il est nécessaire de prévoir trois tubes récoltés à des moments différents. En moyenne, c'est la culture de 24 h. qui donne les mitoses les mieux analysables.

b.4 - Technique cytologique

La même que pour l'étude lymphocytaire.

c) - Technique d'étude du sang leucémique

Variante de DUTRILLAUX et COUTURIER (60) adaptée à DAKAR.

Dans les cas où existent des cellules blastiques circulantes, il est utile de faire un examen à partir du sang périphérique. Celui-ci présente deux avantages : les mitoses observées contrairement à celles de la moëlle, sont à coup sûr pathologiques, d'autre part, leur qualité est souvent meilleure.

Les conditions de culture, sont identiques à celles de la moëlle étudiée en examen direct.

La quantité de sang à ensemerer est fonction du nombre de leucocytes : par exemple,

Exemple : pour un nombre de 100.000 leucocytes par  $\text{mm}^3$ , onensemencera 0,7 ml de sang par tube. Parallèlement, on effectuera une culture de 72 heures en présence de PHA afin d'établir le caryotype constitutionnel du patient et d'affirmer la nature acquise d'un remaniement constaté dans la moëlle ou dans les cultures de sang périphérique sans PHA.

II.2.5 - Etude à partir des cellules germinales ou étude de la méiose.

Elle peut se faire soit de façon extemporanée (examen direct), soit après culture.

Nous rapportons ici le protocole technique adéquat dans chaque cas.

a) - Le prélèvement

Biopsie ou ponction au trocart peuvent être toutes deux utilisées, en milieu chirurgical. La biopsie toutefois est nettement préférable car les risques d'hémorragie sont moindres, et elle permet d'obtenir plus de matériels.

b) - Le transport

Aussi bref que possible, il peut toutefois durer jusqu'à près d'une heure à température ambiante sans inconvénient majeur. Le fragment biopsique est placé dans du citrate trisodique à 1 p. 100 fraîchement préparé.

c) - Obtention des cellules

c.1 - Les tubes séminifères sont dilacérés, soit à l'aide de petits ciseaux, soit avec des aiguilles montées. Cette manipulation se fait dans le milieu de transport, placé dans une petite boîte à pétri ou dans un verre de montre.

La suspension cellulaire ainsi obtenue est placée, à la pipette, dans un tube à centrifuger. Cette opération est répétée aussi longtemps que le liquide reste opalescent après dilacération. Elle nécessite, au plus, 5 minutes. La suspension recueillie sera laissée en attente une dizaine de minutes avant d'être centrifugée à 1000-1500 t/mn (400 à 600 g) pendant 5 minutes.

Le liquide surnageant sera ensuite éliminé et remplacé par du fixateur.

La fixation et l'étalement sont identiques à ceux décrits pour les cellules mitotiques. Cette méthode permet

l'observation de cellules en diacinèse et en métaphase I et II de bonne qualité et en grand nombre. Elle diffère très peu de la description originale de EVANS et coll. (1964)

c.2 - Variante pour l'obtention de mitoses spermatogoniales.

L'utilisation d'un milieu de transport physiologique, telle la solution de Earle, de Hanks etc... dans lequel est aussi effectuée la dilacération constituée de sérum humain dilué au tiers dans de l'eau distillée, permet d'obtenir plus de figures mitotiques et de meilleure qualité.

c.3 - Variante pour l'obtention de stade pachytène

Pour améliorer la dispersion des chromosomes des cellules au stade pachytène durant lequel les chromosomes montrent spontanément des structures caractéristiques, plusieurs auteurs ont proposé des variantes techniques : celle décrite est celle proposée par LUCIANI et coll. en 1975.)

Placer les fragments biopsiques dans une solution de Kcl à 0,44 p. 100, et les laisser ainsi durant 8 à 10 heures, à la température ambiante.

Transférer les fragments dans du fixateur composé d'alcool méthylique (3 vol.) et d'acide acétique (1 vol.) où ils séjourneront 12 à 18 heures avant de les y dilacérer

Récupérer la suspension pour la centrifuger.

Rediluer le culot dans de l'acide acétique glacial dilué à 45 p. 100 et centrifuger immédiatement avant de procéder à l'étalement du culot remis en suspension dans quelques gouttes de surnageant.



c.4 - Marquage des cellules germinales

Les techniques utilisées sont strictement superposables à celles utilisées pour les cellules somatiques.

II.2.5.2 - Méthode différée d'étude de la méiose.  
DUTRILLAUX 1971.

Elle permet de réaliser de bonnes préparations chromosomiques après culture, soit en suspension, soit sur coagulum de tissu germinale. La qualité des images est souvent supérieure à celle obtenue après examen direct.

Les cellules peuvent être maintenues à 36°C en suspension, ou du moins en phase liquide pendant 48-72 heures après dilacération effectuée stérilement. Le milieu utilisé est constitué de liquide de Eagle additionné de 10 p. 100 de sérum de veau foetal.

Le simple maintien du fragment biopsique, non dilacéré, dans ce même milieu, permet encore d'observer des images méiotiques après 8 jours.

Procédé technique :

Dilacérer les tubes séminifères fraîchement prélevés dans un milieu stérile de culture.

Transférer cette suspension dans un tube stérile et laisser incuber pendant 48 heures à 37°C.

Réaliser les préparations chromosomiques suivant les mêmes méthodes (choc hypotonique, fixation, étalement sur lame et coloration) que celles utilisées dans les techniques d'examen direct de suspension de cellules germinales.

### Remarques

- La difficulté de telles manipulations chez la femme et les femelles , en raison de la localisation interne des ovaires et du caractère discontinu de l'ovogénèse, fait que nous ne décrivons pas les techniques d'analyse de la méiose femelles.

- La méthode d'analyse de cellules méiotiques, bien que n'ayant pas suivi les mêmes progrès que celle des chromosomes mitotiques, a permis de faire des progrès dans la compréhension de la stérilité masculine.

### II.3 - COLORATIONS ET MARQUAGES CHROMOSOMIQUES

Les techniques de culture et de préparations chromosomiques, précédemment décrites, permettent lorsqu'elles sont soigneusement appliquées, l'obtention de métaphases bien dispersées. Pour faciliter une bonne exploitation de ces préparations chromosomiques, le cytogénéticien fait appel à des techniques de colorations et de marquages.

On distingue trois groupes de techniques :

- la technique standard (GIEMSA)
- les techniques à moyenne résolution banding  
Q, G, R, T, C, CI.
- les techniques à haute résolution prométaphase.

#### II.3.1 - Technique standard

"Coloration classique (au GIEMSA).

## 1 - La technique

- La solution colorante est préparée extemporanément comme suit :

eau distillée : 94 ml ou 92 ml

tampon phosphate : 3 ml ou 4 ml M/15 à pH 6,3.

Giemsa R : 3 ml ou 4 ml

- Cette solution est instable et doit être renouvelée après une heure.

- Les lames sont plongées dans la solution colorante pendant 10 à 15 mn.

- Rincer abondamment à l'eau courante.

- Le séchage est spontané ou accéléré à l'air chaud.

LEJEUNE et coll. (169), hydrolisent auparavant les préparations, en plongeant les lames dans un godet contenant du Hcl N maintenu à 58°C - 60°C pendant 7 mn 30 sec. Les structures cytoplasmiques colorables sont ainsi éliminées.

## 2 - Résultats (Planche n° , fig. )

Les chromosomes apparaissent uniformément colorés, toutes fois les régions hétérochromatiques (centromères, constriction secondaires, bras courts des grands et petits acrocentriques, région distale du bras long de l'Y) prennent moins de colorant.

Cette méthode de coloration conserve encore tout son intérêt, car elle donne une idée exacte de la morphologie générale des chromosomes. Par contre, elle n'en permet pas une étude fine. Elle est par ailleurs, largement utilisée par nous au laboratoire de DAKAR car elle permet non seulement

la révélation du marquage induit par de nombreux traitements préalables, mais aussi le classement des chromosomes des différentes espèces.

### II.3.2 - Les techniques de marquage

Les techniques initiales de recherche des chromosomes décrites en II.2, à savoir les méthodes de culture cellulaire, l'utilisation de solutions hypotoniques et séchage à l'air libre et des méthodes de coloration classique, ont permis l'analyse détaillée du caryotype humain et animal normal, de ses variantes et des anomalies de nombre et de structure des chromosomes. Mais au fur et à mesure ces techniques initiales se sont révélées partiellement insuffisantes. Les nomenclatures successives de DENVER 1960, LONDRES 1963, CHICAGO 1966 reflètent bien les difficultés de la description des chromosomes observés.

En effet ces techniques initiales ne permettent pas une identification individuelle de chaque chromosome. Pour suppléer cette carence, la technique de marquage à la thymidine tritiée de GERMAN en 1963 a permis de résoudre un certain nombre de problèmes (115). En apportant une certaine précision supplémentaire.

A partir de 1969 des techniques nouvelles pour une identification plus précise ont commencé à se faire jour : les techniques des bandes ou de marquages.

Les techniques de marquage correspondent à l'ensemble des procédés permettant de mettre en évidence des structures, appelées bandes, sur les chromosomes mitotiques ou méiotiques. (60)

Ces techniques sont diverses et plus ou moins complexes. Elles reposent sur des principes biochimiques divers, faisant intervenir les différents composants chromosomiques, ADN et protéines, ainsi que la dynamique de la replication de l'ADN et de la condensation des chromatides.

DUTRILLAUX et COUTURIER (60) déterminent 3 types principaux de marquage :

- deux pour l'euchromatine, c'est-à-dire les segments non variables représentant chez la plupart des espèces la quasi-totalité de la longueur des chromatides. Ce sont les bandes Q et G d'une part qui ont la même localisation et colorent environ 50 p. 100 de l'euchromatine, et d'autre part les bandes R qui colorent le reste. L'euchromatine se compose donc de l'alternance des bandes Q ou G et R.

- une pour l'hétérochromatine, qui correspond chez la plupart des mammifères au marquage C, localisé aux régions centromériques.

Les procédés techniques étant très divers, il est difficile de les décrire selon un plan entièrement rationnel. Nous les traiterons en techniques de moyenne solution et techniques à haute résolution.

#### II.3.2.1 - Technique de moyenne résolution de technique de haute résolution

##### a) - Les bandes Q (quinacrine)

Les bandes Q furent les premiers à apparaître : CAPERSSON, ZECH, JOHANSSON et MODEST (33) les obtinrent initialement en 1970, sur des chromosomes humains, en utilisant un fluorochrome, la moutarde de quinacrine (d'où le terme "Q-banding"). Les bandes Q correspondraient aux segments d'ADN riches en cytosine et en guanine. ( 1 )

a.1 - Technique (1, 15 : 16 ; 60 ; 115).

Il est préférable d'utiliser des préparations chromosomiques récentes (quelques jours) : toutefois au prix de quelques manipulations supplémentaires on peut réaliser le marquage fluorescent de presque toutes les anciennes préparations sauf celles colorées à l'orcéine acétique. (60)

Les lames sont hydratées par passage dans des bains successifs d'éthanol de titre dégressif.

Rincer à l'eau distillée.

Plonger les lames dans un ou deux bains de tampon phosphate Mac Ilvaine pH 6,7 (voir annexe) pendant 5 minutes.

Colorer pendant 20 minutes dans une solution aqueuse de moutarde de quinacrine à raison de 5 mg/100 ml d'eau distillée.

Rincer par passage dans un nouveau bain du même tampon phosphate.

Monter avec une lamelle dans le même tampon.

Les lames sont observées au microscope à fluorescence.

a.2 - Résultats (Planche n° A , photo n° 12

Les chromosomes n'apparaissent plus colorés de façon homogène comme avec les colorations classiques, mais des bandes plus ou moins larges situées à des distances équivalentes à partir du centromère sur les chromatides soeurs (bandes isochromatidiques) sont visibles. Et la séquence spécifique d'une paire donnée permet ainsi son identification.

Les constriction secondaires sont sombres, certaines régions hétérochromatiques sont très brillantes : surtout la région distale du bras long de l'Y.

Tableau n° 4 - Résultats des bandes Q.

Territoires chromosomiques	Résultats locaux de la fluorescence
Bandes distales	Peu fluorescentes
Bandes intermédiaires	Plus ou moins fluorescentes
Centromères	Peu fluorescentes
Satellites	Fluorescence variable
Constrictions secondaires	Peu fluorescentes
Y <sub>p</sub>	Peu fluorescent
Y <sub>p</sub>	Très fluorescent (technique de choix de l'Y.

b) - Les bandes G (GIEMSA)

Les bandes G apparaissent à la suite de la mise en oeuvre de divers traitements de dénaturation, toujours suivis d'une coloration au Giemsa, d'où leur nom. La méthode initiale fut découverte par DUTRILLAUX, De GROUCHY, FINAZ et LEJEUNE ( ) en 1971 et fait intervenir une digestion par les enzymes protéolytiques.

Ils existent également plusieurs techniques pour les bandes G.

Nous proposons la description des plus utilisées actuellement:

b.1 - Techniques (60 )

- Méthodes de "dénaturations" A S G

(Acetic, Saline, Giemsa) de SUMMER et coll. (1971).(166)

Incuber les lames dans une solution de SSC X 2 (NaCl 0,3 M, citrate trisodique 0,03 M) pendant une heure à 60°C.

Rincer à l'eau distillée.

Colorer pendant une heure 30 mn dans une solution de Giemsa à 2% tamponnée à pH 6,8

- Traitement par la trypsine (SEABRIGHT 1971) (152)

Plusieurs auteurs ont proposé, depuis de légères modifications de cette technique protéolytique, mais le principe demeure le même.

Préparer une solution de trypsine à 0,25% (trypsine 1 250 Difco) dans du NaCl isotonique ou mieux dans du PBS modifié sans calcium ni magnésium :

NaCl	:	8000 mg/l
Kcl	:	200 mg/l
Na <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	:	1440 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	200 mg/l.

Plonger les lames dans cette solution pendant 10 à 45 secondes à la température ambiante.

Rincer au NaCl isotonique ou au PBS.

Colorer au Giemsa.



b.2 - Résultats des bandes G

Tableau n° 5

TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES	RESULTATS LOCAUX DU "G-BANDING"
Bandes distales	Peu colorées
Bandes intermédiaires	Variables
Centromères	Bien colorés
Satellites	Peu colorés
Constrictions secondaires	- Du AI : bien colorées - Du C9 : peu colorées - Du E16 : bien colorées
Y <sub>p</sub>	Peu coloré
Y <sub>q</sub>	Bien coloré

La topographie des bandes G est dans l'ensemble superposable à celle des bandes Q (fig. 6).

Les bandes colorées sont celles qui étaient très brillantes avec la moutarde de quinacrine. Cependant, des différences existent au niveau des régions hétérochromatiques.

c) - Les bandes R (Reverse)

Le marquage chromosomique par les bandes R fut la première des méthodes de dénaturation, et fait appel à la chaleur (60). Elle fut mise au point chez l'homme par DUTRILLAUX et LEJEUNE en 1971 (62).

Les bandes R constituent le type de bandes exactement inverse (reverse en anglais) des bandes Q.

La technique originale de dénaturation ménagée a subi depuis, plusieurs améliorations:(CAMPENTIER et coll. 1972 (28);BOBROW et coll. 1972 (21);LUBS et coll. 1972 (1); ZAKHAROV et coll. 1973 (1); COUTURIER et coll. 1973 (39); DUTRILLAUX et COVIC 1974 (1); VERMA et LUBS 1975 (1).

c.1 - Technique (60)

DUTRILLAUX et COUTURIER proposent la technique variante de DUTRILLAUX et COVIC (1974) et DUTRILLAUX (1975) qui semble particulièrement adaptée à une pratique de routine

Traiter les préparations dans un milieu physiologique à pH 6,5 à 87°C.

Préparer tout d'abord une solution de Earle sans bicarbonate à partir des sels ou des milieux concentrés du commerce, ou bien par pesées :

NaCl	6800 mg/l
KCl	400 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	140 mg/l
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200 mg/l
Glucose	1000 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	200 mg/l.

Cette solution a un pH voisin de 5,2 ajusté alors à pH 6,5 sous pH mètre par addition de cristaux de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

La solution est portée à 87°C au bain-marie. La température est un paramètre critique de la technique.

Pour les lames étalées le même jour, les plonger dans la solution pendant 1 à 2 heures.

Pour des lames vieilles de 8 jours les plonger pendant 15 à 45 minutes.

Rincer rapidement les lames à la fin du traitement à l'eau courante.

Colorer au Giemsa.

c.2 - Résultats (Planche n° A , fig. n° 3 ; 4 ; 5 ; 16 ; 10)

Les lames étant le plus souvent assez mal colorées il est préférable de les observer au microscope en contraste de phase.

La topographie des bandes R est réciproque à celle des bandes Q ou G.

TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES	RESULTATS LOCAUX DU R-BANDING
Bandes distales	nettement colorées
Bandes intermédiaires	plus ou moins colorées
Centromères	peu colorés
Satellites	variable
Constrictions secondaires	peu colorées
Y <sub>p</sub>	bien coloré
Y <sub>q</sub>	peu coloré

c.3 - Remarques (60)

Un traitement thermique insuffisant procède un aspect général trop coloré, entraînant l'apparition de points réfringents en contraste de phase.

Cette technique de marquage utilisée actuellement en routine permet un classement très facile du caryotype et une analyse très fine.

d) - Les bandes T (Terminales)

Les bandes T ont été découvertes par DUTRILLAUX en 1973 (60) sur des chromosomes humains et font appel à une dénaturation par la chaleur, selon deux méthodes possibles, avec coloration par l'acridine orange, ou le Giemsa. Leur nom provient du fait que les chromosomes apparaissent surtout marqués au niveau des télomères (c'est-à-dire en partie terminale).

d.1 - Technique (60)

Elle dérive de la technique des bandes R. Elle permet de caractériser certaines de ces bandes, particulièrement résistantes à la dénaturation.

Plonger les préparations dans une solution de Earle sans bicarbonate non ajustée (soit pH voisin de 5,2) à 87°C. La durée du traitement est variable selon l'âge des préparations comme dans le cas des bandes R.

Rincer à l'eau courante

Colorer soit au Giemsa ou mieux à l'acridine orange et **observer** en lumière ultra-violette.

#### d.2 - Résultats

Les chromosomes présentent seulement quelques bandes colorées, situées, pour la plupart, à leurs extrémités, si la coloration est faite au Giemsa. A l'acridine orange, les bandes T, jaune-brillant, se détachent sur le reste des chromatides rouge-sombre.

#### d.3 - Remarques

Pour un traitement thermique insuffisant, les chromosomes sont trop colorés et un grand nombre de bandes R persistent.

Le choc hypotonique au sérum dilué donnent les meilleurs résultats.

Les bandes T permettent une étude plus précise des délétions terminales et des translocations des fragments chromosomiques même les plus minimes.

#### c) - Les bandes C

Les bandes C furent obtenues par PARDUE et GALL en 1970 (137) chez la souris par une méthode assez complexe faisant intervenir une dénaturation puis une régénération de l'ADN à l'aide de divers agents chimiques et biochimiques. La technique originale était auto-radiographique. HARRICHI et HSU en 1971 (10), préfèrent se limiter à son aspect cytochimique et furent les seconds à présenter ce type de bandes, mais cette fois-ci chez l'homme. Depuis ces bandes furent de nouveau obtenues par de nombreux auteurs le plus souvent par des méthodes beaucoup plus

simples : GRAIG-HOLMES et SHAW en 1971 ( 1 ) YUNIS et YASMINEH 1971 ( 1 ) ; VOSABIANCHI 1972 ( 1 ) ; SUMMER et EVANS 1972 ( 1 ) ; DUTRILLAUX et COUTURIER 1972 ( 60 ) ; GAGNE et LABERGE 1972 ( 1 ). Les chromosomes apparaissent clairs, sauf en région centromérique fortement colorés, d'où le nom de bande C.

#### c.1 - Technique (60)

DUTRILLAUX et COUTURIER (1981) ont choisit celle de SUMMER avec une légère modification. Ils obtinrent des résultats réguliers.

Plonger les lames dans du NaCl 0,2N pendant une heure à la température ambiante

Rincer à l'eau distillée

Traiter pendant 30 secondes à une minute dans une solution de baryum 0,3 à 50°C.

Rincer à l'eau distillée

Plonger dans une solution de SSC X 2 (NaCl 0,3, citrate trisodique 0,03 N) à 60°C pendant une heure

Rincer à l'eau distillée

Colorer au Giemsa pendant 5 minutes

Observer de préférence en contraste de phase.

#### c.2 - Résultats

Les chromatides sont uniformément pâles, seules apparaissent fortement colorées les régions centromériques, les constriction secondaires et la partie distale du bras long du Y.

TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES	RESULTATS LOCAUX DU "C-BANDING
Bandes distales	peu colorées
Bandes intermédiaires	peu colorées
Centromères	très colorées
Satellites	plus ou moins colorés
Constrictions secondaires	celles des chromosomes A1, C9 et D15 sont très colorées
Y <sub>p</sub>	peu coloré
Y <sub>q</sub>	très coloré

c.3 - Remarque

Un traitement insuffisant par l'hydroxyde de Baryum entraîne une coloration trop poussée.

f) - Les bandes CT

SCHERES (1976) (60)

f.1 - Technique (60)

Les lames sont placées dans une solution saturée de Ba (OH)<sub>2</sub> à 60°C pendant 10 mn.

Elles sont rincées à l'eau distillée puis mises à incuber dans une solution de SSC X 2 à 60°C pendant 30 mn.

Après rinçage à l'eau distillée, les lames sont colorées pendant 10 mn dans une solution à 0,005 p. 100 de "Stains all" dans un mélange de 1 : 1 formamide - eau.

Elles sont enfin rincées à l'eau distillée et séchées.

f.2 - Résultats

Les bandes C et les bandes T sont colorées simultanément.

g) - Remarques

Des techniques plus raffinées permettent la coloration de régions particulières telles que :

- des régions portant certains types d'ADN satellite (constriction secondaire du 9 humain par exemple) techniques de GAGNE et LABERGER (1972) (60).

- de certaines régions hétérochromatiques pour la technique de coloration à la DA-DAPI. On peut se référer à la technique de SCHEIZER et coll. (1978) (60).

- régions porteuses des organisateurs nucléaires (NOR). Ces régions peuvent être mises en évidence par deux types de méthodes :

\*méthodes de "dénaturation" (bande N), se référer à la technique de FUNAKI et coll. (1975) (60).

\*méthode de précipitation argentique : coloration par le nitrate d'argent. Se référer à la technique de BLOOM et GOODPSTURE (1976) (60).

- Il peut être utile (par exemple pour préciser les points de cassure d'un remaniement, localiser les centromères d'un dicentrique), de mettre en évidence toutes les structures des bandes décrites précédemment (Q, G, R, C) sur la même mitose. Ceci est possible à condition de respecter un ordre dans le déroulement des techniques successives, et de n'utiliser que des lames préparées au moins 10-15 jours plus tôt.

Chronologie Q - R dégraissage sans décoloration - C  
ou G puis R.



### II.3.2.2 - Technique à haute résolution : obtention et marquage des cellules en prophase ou prométophase. (60)

Avec le marquage chromosomique, dont nous venons de voir les principales méthodes, il est possible de dénombrer des structures, essentiellement bandes R ou G, dont le nombre est assez proportionnel à la longueur des chromatides. Ainsi, en métaphase, sur des chromosomes condensés, il est possible de distinguer environ 300 bandes par lot haploïde.

Si l'on sélectionne les mitoses dont les chromosomes sont les plus longs, on peut dénombrer de 400 à 600 bandes (PRIEUR et al., 1973, SKOVBY, 1975). A cet égard, l'utilisation d'un milieu composé de sérum dilué pour réaliser le choc hypotonique est un élément important pour obtenir de longs chromosomes. Cependant, l'obtention de cellules en prophase demeurant aléatoire, on a maintenant recours à des méthodes de synchronisation, qui permettent d'atteindre le but recherché.

De nombreux agents sont susceptibles de bloquer à une phase donnée le cycle cellulaire, de façon réversible. Parmi d'autres, citons le fluorodéoxyuridine (FudR), l'améthoptérine ou méthotrexate, la thymidine, et le 5-bromodéoxyuridine (BrdU). Seuls les trois derniers ont été efficacement utilisés.

#### II.3.2.2.1 - Synchronisation par la thymidine

La thymidine bloque le cycle cellulaire pendant la phase S par inhibition de synthèse de la 2-déoxycytidine (Xeros, 1962) lorsqu'elle est mise en excès dans le milieu de culture. D'après les essais réalisés avec un double traitement de thymidine et de BrdU, le blocage principal survient au milieu de la phase S, soit, après réplication de l'ADN des bandes R et avant celle des bandes G (DUTRILLAUX, 1975, VIEGAS-PEQUIGNOT et DUTRILLAUX 1978. (60)

Ceci signifie que pour obtenir un maximum de cellules en prophase prométaphase, il faut les récolter 5 à 7 h. après la levée du blocage.

. Technique (60)

- Culture de cellules sanguines

- Bien qu'elle puisse être mise d'emblée, on préfère ajouter la thymidine après 48 à 72 h. de culture, à la concentration finale de 0,3 mg par ml de milieu. Les cultures sont laissées ainsi, à 37°C, pendant 15 h. environ (durant la nuit). Puis le milieu contenant la thymidine est retiré, après centrifugation et pipetage et remplacé par un milieu de rinçage, constitué d'une solution physiologique saline (PBS par exemple). Les cellules sont remises en suspension par pipetage, à nouveau centrifugées, et le milieu de rinçage est éliminé. Après un deuxième rinçage, semblable au premier, du milieu complet (TC 199+ sérum) est remis, pendant les 5-7 dernières heures de culture.

Pour éviter les rinçages, on peut simplement ajouter de la 2-déoxycytidine, à la dose de 0,5 mg par ml et laisser la culture évoluer ainsi 5 à 7 h. de plus.

Le reste de la technique est identique à celle qui a été décrite plus haut. On a cependant intérêt à multiplier les fixations (4 à 6) pour obtenir un meilleur étalement.

- Culture de fibroblastes. - D'une façon générale, il est délicat d'obtenir une bonne synchronisation des cultures de fibroblastes.

La thymidine est ajoutée 8 h. après la division, à la concentration finale de 1 mg par ml.

Le reste de la technique est identique à celle des lymphocytes. Selon la qualité des cultures, le cycle cellulaire peut varier sensiblement, et il peut être nécessaire de faire plusieurs essais pour ajuster les temps.

#### SYNCHRONISATION PAR L'AMETHOPTERINE

Dans les cultures de cellules, l'améthoptérine est ajoutée après 72 h., à la concentration finale de  $10^{-7}$  M (YUNIS, 1976). Après une nuit (environ 15 h.), le milieu est remplacé, après rinçage comme pour la thymidine, par un milieu normal, pendant 5-7 h.

#### MARQUAGE DES CELLULES EN PROPHASE OU EN PROMETAPHASE

Les prométaphases et prophases obtenues par les méthodes de synchronisation sont ensuite traitées pour obtenir un marquage comme s'il s'agissait de mitoses ordinaires. Pour obtenir des bandes R, il faut faire un traitement thermique un peu plus court que pour les métaphases.

#### . Variantes pour l'obtention des bandes G

YUNIS et coll. (1978) (60) obtiennent des bandes G sans prétraitement, par simple coloration des préparations par le colorant de Wright. Celui-ci est préparé ainsi : 1 volume de la solution mère (à 0,25 p. 100 dans du méthanol) est dilué dans 3 volumes de tampon phosphates 0,06 M, pH 6,8. Les lames sont colorées pendant 3 mn à 3 mn 30.

FRANCKE et OLIVER (1978) (60) recommandent un prétraitement des préparations par chauffage et action protéolytique. Les lames sont chauffées pendant 3 jours à 55°C, ou une nuit à 65°C, ou encore 10 à 20 min. à 90°C. Après refroidissement, elles sont traitées 15 à 60 sec. par une solution de trypsine à 0,05 p. 100 dans du chlorure de sodium isotonique. Les lames sont rincées rapidement dans deux bains de chlorure de sodium ou d'éthanol 95°. Elles sont séchées puis colorées pendant 90 sec. à 2 min. au colorant de Wright ou au Giemsa.

#### SYNCHRONISATION PAR LA THYMIDINE ET INCORPORATION DE BrdU

Par rapport à la méthode de synchronisation par la thymidine décrite plus haut, il suffit d'ajouter du BrdU, à la dose de 10 ug par ml de milieu final, durant les 6-7 dernières heures (VIEGAS-PEQUIGNOT et DUTRILLAUX, 1978). Ceci permet d'obtenir, après coloration par l'acridine orange, ou coloration FPG (un très beau marquage en bandes R.

Pour cette technique, il n'est pas possible de remplacer les rinçages par l'addition de 2'-déoxycytidine.

En plus des deux colorations citées ci-dessus, on peut encore effectuer une coloration au Giemsa des cellules observées après coloration par l'acridine orange. Il faut pour cela effectuer un bref traitement thermique, à 87°C, pendant 15-60 secondes, dans une solution de Earle à pH 6,5, avant la coloration au Giemsa (DUTRILLAUX et coll., 1980). Ce traitement rend les préparations définitives, et améliore le marquage de certaines mitoses.

#### SYNCHRONISATION PAR LE BrdU

Le 5-bromodéoxyuridine, à forte dose induit le même blocage que la thymidine et le méthotrexate, en milieu de phase S. En utilisant cette propriété et la modification

chromatidienne résultant de son incorporation dans les bandes R qui effectuent leur replication avant le blocage, on obtient, après coloration par l'acridine orange ou technique FPG, un très beau marquage G des prophases et prométaphases.

. Principe - A une culture de cellules sanguines, on ajoute pendant une nuit (15 h. environ) du BrdU à forte concentration. Après rinçage, les cellules sont remises dans un milieu.

. Résultats - La figure montre une mitose **en** prométaphase marquée en bandes G après coloration FPG. Ce type de mitose est nettement prépondérant. Toutefois, il semble exister d'autres points de blocage du cycle cellulaire, de sorte qu'une petite partie des mitoses porte un autre marquage.

Ainsi, un second aspect observé correspond à un marquage R typique, dont la figure donne un aperçu. Ceci correspond vraisemblablement à un blocage en fin de phase S de cellules qui se trouvaient en milieu de phase S au moment où le traitement par le BrdU a été commencé. Le troisième aspect correspond à un marquage de l'hétérochromatine et des bandes G les plus tardives. Il est semblable à celui induit par un traitement par le BrdU durant les 3-4 dernières heures. Enfin, un faible pourcentage de mitoses montre une asymétrie chromatidienne associée à un marquage G.

Cette méthode de synchronisation par le BrdU donne donc, sur les mêmes préparations, un très beau marquage G, un très beau marquage R, et divers autres aspects. Il nous paraît très probable qu'elle tiendra un rôle prépondérant dans la cytogénétique future.

Pour cette raison, nous allons en donner tous les détails, même si cela entraîne quelques redites.

. Technique détaillée. - Après 48 à 72 h. de culture de cellules sanguines, le BrdU est ajouté à la concentration finale de 0,2 mg par ml. Laisser pendant une nuit (environ 15 h.). Centrifuger, retirer le surnageant, ajouter du milieu de rinçage (PBS, par exemple, à 37°C), remettre en suspension, et effectuer un second rinçage. Remettre du milieu complet (TC 199 + sérum) enrichi de thymidine (3 ug par ml) et laisser à 37°C pendant 5-7 h. Plus de prophases sont obtenues pour 7 h.

Faire le choc hypotonique (sérum : 1 vol. eau : 5 vol.) pendant une vingtaine de minutes. Après une première fixation de 10-15 min. au CARNOY II (chloroformé), effectuer 3 ou 4 fixations de 10 min. successives au CARNOY I (éthanol-acétique).

Etaler sur lames froides et humides.

Colorer par l'acridine orange, ou encore par une modification de la technique FPG :

Colorer par le HOECHST 33258 à 1 mg pour 100 ml d'eau distillée pendant 15 min. Rincer, monter avec du SSC X 2.

Placer la lame dans une boîte de Pétri contenant du papier filtre recouvert de SSC X 2.

Mettre la boîte de Pétri sur le faisceau de lumière émise par une lampe à vapeur de mercure (type HBO 200). On prendra, par exemple, un luminaire habituellement utilisé pour la microscopie en fluorescence. Afin de maintenir la lampe verticale, ce qui est recommandé pour son utilisation, et de placer la boîte de Pétri à plat, on interposera un miroir, incliné à 45° sur le trajet lumineux. Le trajet total du faisceau peut être de l'ordre de 30 à 40 cm.

On peut encore utiliser un tube fluorescent, type "lumière noire", moins onéreux que la lampe à vapeur de mercure. Les lames sont alors placées à 10 cm, environ, du tube.

Plusieurs lames peuvent être superposées pour être irradiées simultanément.

La boîte de Pétri, posée sur un fond noir mat, atteindra une température de plus de 50°C après quelques minutes d'irradiation. Elle sera maintenue environ 1 h. sous le faisceau lumineux.

Rincer les lames à l'eau courante, et colorer en Giemsa à 1,5 p. 100 pendant 7 min.

Ce seul traitement permet d'obtenir les différentes figures dont nous avons parlé plus haut.

Il peut arriver que les chromosomes soient trop colorés par le Giemsa. Dans ce cas, il suffit, après les avoir dégraissés au toluène, soit de traiter les lames par le SSC X 2 à 60°C pendant une ou deux heures (amélioration des bandes G surtout), soit de les traiter par du Earle à pH 6,5 à 87°C pendant 20 à 60 secondes (amélioration des bandes R surtout).

Plusieurs traitements-colorations successifs peuvent être effectués, en cas de besoin.

On peut encore faire varier soit la durée ou le mode de l'exposition aux U.V., soit la durée de la coloration au Giemsa ou la concentration de celui-ci, soit la durée des

traitements thermiques. Ces différentes variantes ne doivent pas faire croire que la technique est difficile ou aléatoire. Elle est finalement de réalisation très simple, très adaptable, et permet d'obtenir chaque fois des images chromosomiques d'une qualité supérieure.

COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE "BANDING".

Elle révèle que, d'une manière générale :

- la plupart des bandes Q correspondent aux bandes G
- le "R. BANDING" montre des images inverses de celles obtenues par le "G-BANDING" et Q-BANDING.
- tandis que les marquages T et C sont sectionnels : T pour les extrémités (télomères) et C pour les centromères (cen) et les constriction secondaires (h).
- ces observations sont regroupées dans le tableau n°8.

T E C H N I Q U E ASPECTS OBSERVES	BANDES Q	BANDES G	BANDES R	BANDES C	BANDES T
TELOMERES	Sombres	Pâles	Noires	Pâles	Sombres
CENTROMERES	Sombres	Pâles	Pâles	Sombres	Pâles
ZONES INTERCALAIRES ALTERNATIVEMENT	Brillantes et sombres	Noires et pâles	Pâles et noires	Pâles	Pâles
EXTREMITES DE L'Y ou Y <sub>q</sub>	Très brillantes	Pâles	Pâles	Noires	Pâles
CONSTRICIONS SECONDAIRES					
. A 1	Sombre	+ pâle	Pâle	Noire	Pâle
. E16	Sombre	+ pâle	Pâle	Noire	Pâle
. C 9	Sombre	Pâle	Pâle	Noire	Pâle



Il ressort de ce tableau que pour certaines régions chromosomiques on a intérêt à utiliser un marquage donné, par exemple le "C-BANDING" pour les centromères et les constriction secondaires de A1, C9 et E16 et l'Y<sub>q</sub>;

- le Q-BANDING pour l'Y<sub>q</sub> ;
- le T-BANDING pour les télomères.

Il ressort que le R-BANDING est la technique de choix pour un classement et une analyse plus raffinée du caryotype, tandis que le G-BANDING demeure le plus simple, le moins onéreux donc le mieux adapté à la routine cytogénétique en pays sous-équipés.

Remarques :

Des variations peuvent être observées d'un individu à l'autre pour certains chromosomes avec une même technique de marquage, d'où la notion de polymorphisme du caryotype humain.

En effet, les segments hétérochromatiques, comme les constriction secondaires, les bras courts des acrocentriques, et le bras long de l'Y illustrent le plus cette notion de polymorphisme.

- Les constriction secondaires de chromosomes 1, 9 et 16 ont des dimensions variables. La constriction secondaire du C9 est toujours juxta-centromérique. Dans la majorité des cas elle se situe sur le bras long. Cependant, on l'observe parfois sur le bras court et avec une fréquence accrue chez les Noirs aux U.S.A. (LUBS et RUDDLE, 1971). Chez les noirs africains (19h + ; 9q +; et 16 qh + sont des marqueurs physiologiques très fréquents.

La constriction secondaire des chromosomes 9 et 16 est ainsi assez variable. Lorsqu'il existe une élongation

particulièrement accentuée, le chromosome qui le porte devient aisément reconnaissable. Le chromosome marqueur peut être retrouvé chez les différents sujets d'une même famille, où il se transmet comme un caractère dominant. DONAHUE et coll. (1968) ont montré que la transmission du gène déterminant le groupe sanguin Duffy était souvent liée à celle de la constriction secondaire du 1. On en a conclu que le gène Duffy est situé à proximité de la constriction secondaire du 1.

D'une façon générale, l'allongement d'une constriction secondaire ne semble pas porter préjudice au sujet qui le porte ; pas de désavantage sélectif, d'où la transmission durant de nombreuses générations.

Pour pouvoir interpréter ces variations physiologiques des constriction secondaires à leur juste valeur il faut savoir : Qu'on a observé de nombreuses constriction secondaires sur les chromosomes de lignées cellulaires normales (de GROUCHY et coll. 1970 ; PATAU, 1971. Que le nombre et la taille des constriction secondaires peuvent varier sous l'effet de certains facteurs physico-chimiques.

. La fixation par de l'alcool acétique ââ exagère la longueur des constriction secondaires préexistantes, et est capable d'induire la formation d'autres constriction (PALMER et FUNDERBURK, 1965).

. L'association d'un milieu de culture sans calcium et du BrdU permet de reconnaître un certain nombre de chromosomes. (PALMER, 1970) par une étude plus appropriée de leurs constriction secondaires.

#### - Les bras courts des acrocentriques sont variables

Les satellites sont eux-mêmes variables par leur taille et leurs affinités tinctoriales. Ces propriétés offrent des applications d'un intérêt certain, puisqu'elles semblent

se transmettre, telles quelles, de générations en générations. Sur les prix acrocentriques du caryotype humain normal, il en existe toujours un au moins dont le bras court, caractéristique, constitue un système de marquage précieux. Une étude systématique pourrait aboutir à une utilisation médico-légale, au même titre que les analyses des groupes sanguins, pour les recherches de paternité par exemple. Ces bras courts portent des gènes codant la synthèse des ARN ribosomiaux. Ce sont des organisateurs nucléolaires, ils sont mieux étudiés par la technique des NOR. (60)

- Proportionnellement à sa longueur, l'Y est assurément le chromosome le plus variable du caryotype humain. Sa longueur varie selon les populations. Les grands Y sont notamment plus fréquents chez les jaunes, les Sémites et chez les Blancs d'Europe. L'Y le plus court est celui des négroïdes.

Des études familiales ont montré que l'Y se transmettait tel quel, de père en fils, durant des siècles. Ainsi, GENEST et LEJEUNE (1971) ( 1 ) ont retrouvé le même petit Y chez des CANADIENS et les FRANCAIS de même patronyme. Certains membres de la famille avaient émigré au Canada au XVIIe siècle, et le dernier des ancêtres communs avait vécu au milieu du XVIe siècle. Par contre, la petite taille de l'Y semble aussi caractériser le caryotype d'une secte américaine, les AMISH, tous originaires d'une même famille. Voici qui permettra peut être une étude plus fouillée des mouvements des populations africaines aux différentes ères historiques et d'établir, en relation avec les historiens négrologues, les relations généalogiques entre les différents nègres de la Diaspora.

Au total, il existe dans le caryotype humain pour ne parler que de lui, 22 structures variables chez les femmes et 23 chez les hommes. Par leur nombre, les variants constituent un système de marquage précieux qui permet, presque à coup sûr, d'individualiser le caryotype de chacun et de le rattacher ou détacher de celui de ses parents. Ainsi la notion que tous les individus normaux d'une espèce donnée possèdent le même caryotype se révèle fausse si on considère l'hétérochromatine.

- Toutes les techniques de marquage décrites ci-dessus sont largement appliquées en cytogénétique animale. Elles permettent à l'heure actuelle d'approfondir la connaissance des caryotypes normaux et sont utilisées en pathologie pour l'identification et la description des anomalies. A titre indicatif, nous résumons dans le tableau ci-dessous les types de bandes obtenus chez les mammifères domestiques.

Bandes	Chien	Chat	Cheval	Bovin	Ovin	Caprin	Porc	Lapin
Q			+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+
R		+	+	+				
C			+	+	+	+	+	
T							+	

La technique des bandes G à cause de sa mise en oeuvre facile, est la technique la plus largement utilisée. La seule nomenclature internationale chez les animaux est basée sur cette technique ( 1 ). Cependant les bandes R, tout comme chez l'homme, restent les mieux indiquées pour l'étude du caryotype des animaux où d'une façon générale tous les chromosomes sont acro- ou télocentriques.

### II.3.2.5 - Les conséquences de l'amélioration des techniques du caryotype.

L'amélioration des techniques du caryotype comme on devait s'y attendre, à produit une révolution dans la connaissance cytogénétique de l'homme. Le domaine d'action de la cytogénétique s'est considérablement élargi avec la découverte des techniques du marquage ou "Banding". Riche des acquisitions de la dernière décennie (1960-1970), la cytogénétique a pu confirmer l'essentiel des résultats accumulés, transformer en certitude de brillante hypothèse et avancer d'un pas plus sûr dans la recherche et l'analyse des remaniements chromosomiques d'une part et celle de la structure d'autre part.

#### Analyse des remaniements chromosomiques

Elle a révélé l'insuffisance de la nomenclature de CHICAGO (1966) d'où la nécessité d'en "confectionner" une autre plus adaptée aux besoins d'une cytogénétique qui a atteint sa maturité. Le quatrième congrès de cytogénétique réuni à PARIS (Printemps 1971) a mis au point une nouvelle nomenclature dont voici les principaux éléments :

- Une des innovations importantes concerne les signes + ou - utilisés pour désigner l'excès ou l'absence d'un autosome, ces signes sont maintenant placés avant l'élément considéré. Ainsi la formule chromosomique d'un mongolien s'écrit : 47, XY, + 21 ; une monosomie 4 s'écrit : 45, XX, -4. Notons qu'une monosomie autosomique homogène est létale et par conséquent une telle garniture chromosomique ne se verra que dans les avortons.

- Les signes + et - sont placés après mention du bras de l'étalement considéré quand ils concernent un allongement ou un raccourcissement de ce bras : par exemple 46, XY, 18p+ signifie que le bras court du E18 est allongé 47, XY, + 13p+, indique que le bras court d'un D13 en excès est allongé.

- Les anomalies de structure ou aneusomie s'écrivent en mentionnant avant le chromosome remanié, placé entre parenthèse, le symbole de remaniement (cf. tableau), par exemple : 46, XX, (18), signifie qu'il existe un chromosome 18 en anneau (r = ring) chez une fille. 46, X, I (Xq) désigne l'isochromosome pour le bras long de l'X, 46, XY, dic (Y) indique que le chromosome Y est un dicentrique.

Pour le noyau interphasique, les termes de chromatine X et de chromatine Y sont proposés à la place de corpuscule de Barr et corpuscule F.

Une nomenclature tenant compte des bandes a été proposée. (cf. chap. II.5)

SYMBOLES	SIGNIFICATIONS
del	Délétion
der	Chromosome dérivé
dup	Duplication
ins	Insertion
inv - ins	Insertion renversée ou péricentrique
rep	Translocation réciproque ou équilibrée
rec	Chromosome recombinant
rob	Translocation Robertsonienne (fusion centique)
tan	Translocation en tandem
ter	Terminal ou au bout
:	Cassure
::	Cassure et ressoudure
—	— à...

## II.4 - OBSERVATION MICROSCOPIQUE ET MICROPHOTOGRAPHIE

### II.4.1 - Observation microscopique

#### II.4.1.1 - Observation en lumière ordinaire

Les mitoses sont recherchées au faible grossissement (X 10). Ce repérage permet un examen rapide des préparations tout en permettant un premier diagnostic sur la qualité des mitoses. Avec le grossissement (X 40) les cellules réellement favorables seront, sélectionnées pour être ensuite examinées, analysées et photographiées à l'immersion (X 100). Pour chaque individu, 16 à 20 cellules mitotiques sont choisies pour être ainsi photographiées.

#### II.4.1.2-- Observation en fluorescence

Celle-ci nécessite un appareillage parfaitement adapté au matériel et aux fluorochromes employés. Le microscope doit être muni d'un diaphragme à iris. Actuellement, deux systèmes d'excitation sont disponibles.

- Système d'excitation par transmission
- Système d'excitation par "réflexion" ou épifluorescence.

### II.4.2 - La microphotographie

On doit utiliser des films à grain fin et à gamma élevé. La qualité de la coloration des préparations chromosomiques est une condition primordiale de la qualité des clichés. La qualité de l'émulsion utilisée est également très importante. Le traitement des clichés doit être des plus soigneux. Les conditions de développement du film dépendent de sa marque et de ses propriétés, elles sont du reste précisées par le fournisseur. Le tirage est fait sur papier en général de format

18 X 24 cm. Les négatifs sont agrandis 7 fois environ, ce qui donne un agrandissement final de 2800 fois. Pour les images en lumière ordinaire, on utilise la gradation G<sub>2</sub> (normal), pour la fluorescence et coloration par l'acridine orange, G<sub>3</sub> et pour la coloration par la moutarde de quina-crine, G<sub>5</sub> (plus dur).



# CHAPITRE TROISIEME

RESULTATS - INTERET ET INDICATIONS DE

L' ANALYSE CHROMOSOMIQUE,

## I - LE CHROMOSOME NORMAL

Le chromosome, tel qu'il apparaît sur les photographies de caryotype est déjà fissuré en deux chromatides et achève de se dédoubler. Les chromatides n'adhèrent plus entre elles que par un seul point, le centromère ou constriction primaire (cen). Selon sa position on distingue :

des chromosomes métacentriques : le centromère est en position centrale (A1, A3, C12, X, E16, F19, F20)

Les chromosomes macrocentriques et télolocentriques : le centromère est en position sub-terminale.

Entre ces deux cas ~~extrêmes~~ on distingue des positions intermédiaires du centromère :

- chromosome sub-métacentrique, le centromère est plus porté vers la position médiane.

- chromosome sub-télolocentrique.  
Le centromère porte plus vers l'extrémité.

On distingue de part et d'autre du centromère :

le bras court (p : comme petit) qui par convention est dirigé vers le haut sur les photographies.

le "bras long" ou "q" qui est dirigé vers le bas.

Le centromère représente la constriction primaire (cen).

On observe également au niveau de certains chromosomes des zones de constriction secondaires, on les a constatées principalement au niveau des chromosomes 1, 9, 16 et du chromosome Y. En général on les trouve près du centromère.

Ce sont des détails de structure qui, associés aux autres caractères morphologiques permettent, de reconnaître un chromosome particulier.

On observe aussi, au niveau de certains chromosomes notamment les petits acrocentriques des petites formations chromatiniennes qui prolongent le bras court. On les appelle, "satellites

Chaque chromosome est divisé en sites ou locus. Deux loci sont dits homologues s'ils sont situés sur des chromosomes d'une même paire, à la même distance du centromère et sur le même bras ("p" ou "q").

Chaque sujet possède donc chaque locus en deux exemplaires. Ces deux loci homologues peuvent être occupés par des gènes qui ont une action identique : le sujet est dit homozygote.

Ils peuvent au contraire être occupé par des gènes qui exercent des actions différentes : le sujet est dit hétérozygote.

Des gènes qui occupent des loci homologues sont appelés allèles, grâce à la connaissance de la structure morphologique des chromosomes. Les chercheurs ont pu proposer des classifications.

## II - CLASSIFICATION DES CHROMOSOMES : LES NOMENCLATURES

### II.1 - GENERALITES

Ayant confirmé, la constance du nombre et de la morphologie des divers éléments du caryotype humain normal, les chercheurs ont éprouvé la nécessité d'utiliser une classification internationale afin de permettre un échange facile des informations. De multiples réunions d'experts : DENVER, 1961, CHICAGO 1966, PARIS 1971, STOCKHOLM 1977 pour les humains et READING, 1976, pour les animaux ont abouti à une nomenclature actuellement utilisée dans la plupart des laboratoires.

L'essentiel des règles adoptées a été regroupé sous forme d'un document intitulé : "International system for chromosome Nomenclature, 1978) (110). S'inspirant de celle des humains, une nomenclature similaire est proposée chez les animaux domestiques, c'est celle issue de la conférence de READING, ANGLETERRE en 1976 (72).

Il nous est apparu difficile de donner le détail de ces nomenclatures ici compte-tenu du volume que ceux-là nécessiterait. Aussi nous sommes-nous contentés de relater simplement les principes généraux en nous inspirant de la classification de DENVER 1960 qui, si elle est tombée en désuétude depuis l'utilisation du marquage, conserve tout de même une certaine valeur : elle constitue la base de toutes les classifications proposées. Nous traiterons également des nomenclatures récentes chez différentes espèces domestiques et chez l'homme en invitant pour des connaissances plus précises, selon les besoins de se rapporter au I S C N et à la nomenclature de READING. (72)

## II.2 - L'ETABLISSEMENT PRATIQUE DU CARYOTYPE HUMAIN STANDARD.

Il ne peut se faire qu'en bonne connaissance de la nomenclature cytogénétique classique telle qu'elle a été définie à la Conférence de DENVER (1960) (52)

Dans l'espèce humaine, le noyau de chaque cellule somatique contient 46 chromosomes répartis en 23 paires :  $2n = 44$  autosomes + 2 gonosomes. Chaque paire autosomique est constituée d'un chromosome paternel et d'un chromosome maternel : les deux chromosomes d'une même paire sans être identiques, se ressemblent suffisamment pour qu'on puisse parler d'homologie, ils sont dits "homologues".

La convention de DENVER a établi une classification numérale des chromosomes. Chaque paire d'autosomes est désignée par un numéro de 1 à 22 dans l'ordre de taille décroissante. La première paire, qui est la plus grande, porte le numéro 1 ; la dernière paire, qui est la plus petite porte le numéro 22. Les deux gonosomes, X et Y, conservent leur appellation classique.

Avec des techniques classiques, il est extrêmement difficile, voire impossible, de faire la différence entre des chromosomes qui ont à peu près la même taille et dont le centromère à une position identique. C'est pour cette raison que PATAU et coll. ont proposé de ranger les 23 paires de chromosomes en 7 groupes distincts, désignés par les lettres majuscules A, B, C, D, E, F, G. L'intérêt de cette classification est que tout chromosome normal peut être rapporté à un groupe donné. Par contre, à l'intérieur même d'un groupe, les difficultés d'identification des chromosomes de ce groupe d'après les seuls critères morphologiques appréciables par les

Tableau n° 10 - Classification selon la conférence de DENVER.  
(1960)

Groupes (PATAU)	Les éléments	T Taille relative	Ic Indice centromérique	Position du centromère	Caratères morphologiques	
A	1	8,8	0,48	Médian	Grands métacentriques	
	2	8,2	0,39			
(1 - 3)	3	6,7	0,45	Sub-médian	Grands submétacentriques	
B	4	6,3	0,27	Sub-télocentrique	Grands subtélocentriques	
	5	5,9	0,27			
C	X	5,7	0,37	Sub-médian	Moyens submétacentriques	
	6	5,4	0,36			
	7	5,0	0,37			
	9	4,6	0,37			
	X	11	4,3	0,38		
		8	4,7	0,30	Sub-médian	Moyens Moins métacentriques que les précédents
	10	4,5	0,29			
	12	4,2	0,31			
D	13	3,3	0,17 ?	Sub-terminal	Moyens acrocentriques avec des satellites	
	14	3,2	0,18 ?			
	15	3,2	0,20 ?			
E	16	3,0	0,40	Médian	Petits métacentriques	
	17,17,18)	17	2,9	0,31	Sub-médian	Petits submétacentriques
		18	2,7	0,20		
F	19	2,3	0,44	Médian	Très petits métacentriques en croix "Saint André"	
	20	2,2	0,43			
G	21	1,6	0,3 ?	Sub-terminal	Très petits acrocentriques avec satellites	
	22	1,6	0,30 ?			
Y	Y	1,7	0,26 ?	Sub-terminal	Très petits acrocentriques sans satellites	

L = Longueur de l'élément étudié = Longueur relative

Longueur totale 22 Z + X.

Ic = Longueur du bras le plus court

Longueur totale de l'élément

? = Incertain.

Tableau n° 11 - Les symboles et leurs significations dans la nomenclature des chromosomes.

SYMBOLES	SIGNIFICATIONS
A à G	Groupes de chromosomes (PATAU)
1 à 22	Les numéros des autosomes
X, Y	Les gonosomes
{ / }	Séparation des différentes lignées cellulaires constituant une mosaïque. Exp : 47, XXX/45, XO
?	In connu
	Chromosome commenté dans le texte
Ace	Acentrique
cen	Centromère ou constriction primaire
Dic	Dicentrique
End	Endoreplication
h	Constriction secondaire ou région négativement colorée
i	Isochromosome
Inv	Inversion
mar	Chromosome marqueur
mat	Chromosome d'origine maternelle
pat	Chromosome d'origine paternelle
p	Bras court
q	Bras long
r	Chromosome en anneau
s	Satellite
t	Translocation

techniques standards (taille et indice centromérique) restent souvent très grandes : cependant, en procédant méthodiquement, comme nous le verrons par la suite, on peut identifier un certain nombre de chromosomes (1, 2, 3, 16, Y), les autres ne pouvant être reconnus individuellement recevront une classification de groupe.

Une des règles fondamentales de la terminologie cytogénétique a été adoptée à DENVER : dans l'écriture de la formule chromosomique, le nombre placé en tête, **est** le nombre total de chromosomes, y compris les chromosomes sexuels. Ce nombre est suivi d'une virgule. La nature des chromosomes sexuels est indiquée après la virgule. Ainsi, la formule 47, XXY désigne un sujet ayant au total 47 chromosomes dont deux X (un surnuméraire) et un Y : il s'agit d'un syndrome de Klinefelter. Les autosomes ne sont spécifiés que s'ils sont anormaux. Dans ce cas ils sont indiqués après les chromosomes sexuels dont ils sont séparés par une virgule : ainsi la formule d'un mongolien s'écrit :  
47, XY, 21+.

Le tableau regroupe les principaux aspects de la classification de DENVER dont la connaissance est le meilleur requis pour prétendre classer et monter un caryotype.

N.B. : Si le comptage révèle un certain taux d'aneuploïdies n'excédant pas 10% pour les hypoploïdies (TURNER): 45, XO) et 20% pour les hyperploïdies (trisomies, klinefelter etc...) on ne doit pas en tenir compte car il peut s'agir de mutation de novo constituée in vitro. Lorsque le taux d'aneuploïdies dépasse 10% soit plus de 2 mitoses sur les **20 photographiées** et comptées, il faut analyser 30 mitoses supplémentaires car un minimum de 50 excellentes mitoses est requis pour suspecter une mosaïque. Pour la confirmer il faut étendre le bilan cytogénétique à d'autres tissus dont nécessairement le tissu conjonctif, car un résultat donné ne s'applique qu'à la fraction de tissu effectivement examiné et l'extrapolation à l'individu entier n'est que plausible.



L'examen attentif de ce tableau montre qu'on peut tirer un grand profit et d'excellents renseignements de l'utilisation soigneuse des techniques classiques d'analyse caryotypique. Elles peuvent notamment permettre :

Le diagnostic de toutes les aberrations numériques ou aneuploïdies notamment les polypes, les hyperploïdies (trisomies autosomiques poly X, double ou poly Y etc.)

la suspicion (au prix d'une grosse expérience pratique et de beaucoup de soins) des aberrations chromosomiques de structure ou aneusomies : les translocations, les endoreplications, les inversions et les chromosomes anormaux parfois marqueurs tels les chromosomes acentriques, les dicentriques, les dupliqués, les chromosomes en anneau, que seuls les techniques plus élaborées notamment les techniques de marquage ou de "BANDING" permettent de corroborer.

### II.3 - L'ETABLISSEMENT PRATIQUE DU CARYOTYPE STANDARD DE QUELQUES ESPECES ANIMALES DOMESTIQUES.

Disons tout de suite que l'établissement du caryotype des espèces animales domestiques n'est pas chose aisée compte-tenu du nombre très élevé des paires de chromosomes et de la morphologie souvent presque identique de ces chromosomes.

Le nombre diploïde des chromosomes est donné dans le tableau n° 12 p. 104, classés par importance numérique décroissantes.

Malgré de très grandes difficultés des chercheurs ont proposé des classifications. Il n'existe cependant pas une nomenclature internationale similaire à celle de DENVER.

Espèces	Nbre. diploïde	Autosomes		Gonosomes	
		Métacentri-ques	Acrotélo-centriques	Métacentri-ques	Acro ou télé-centriques
CHIEN	78		76	X - Y	
COBAYE	64		62	X	Y
CHEVAL	64	26	36	X	Y
ANE	62	38	22	X	Y
BOVINS	60		58	X - Y	
CAPRINS	60		58	Y	X
OVIN	54	6	46	Y	X
HUMAIN	46	34	10	X	Y
LAPIN	44	34	8	X - Y	
HAMSTER	44	34	8	X - Y	
RAT	42	22	18		X - Y
SOURIS	40		38		X - Y
CHAT	38	32	4	X	Y
PORC	38	24	12	X - Y	
VISON	30	26	2	X - Y	

Tableau n° 12 - Le nombre 2n chromosomes chez différentes espèces animales.

II.3.1 - Le caryotype du porc normal.

Planche n° B Fig. n°VII)

Les études chromosomiques des suiformes se sont développées parallèlement à celle des ruminants, depuis le début du XXe siècle et tout particulièrement depuis 1960 où l'utilisation des cultures cellulaires a ouvert des possibilités nouvelles pour l'étude des chromosomes de tissus somatiques variés. Bien que quelques auteurs se soient intéressés aux espèces sauvages du genre sus comme sus scrofa Seul le porc domestique sus scrofa domesticus L. a fait l'objet de recherches approfondies notamment avec EVANS (1965) BRUYERE (1966), MAC LEE, BANNER et RAY (1966), MAC HULOT (1969), QUEINNEC, DARRE et BERLAND (1970). Une description et une **identification** récente des chromosomes du porc ont été données par HANSEN (1980) (101) ; LIN et coll. (1980), sur la base de la longueur relative et de plusieurs marquages. Une revue générale sur la génétique du porc est enfin due à OLLIVER ET SELLIER P. en 1982 ( ).

Après de nombreuses polémiques, les auteurs s'accordent à présent pour attribuer au porc domestique un nombre de 38 n (100 ; 102 ; 107) dont 18 paires d'autosomes et une paire de gonosomes, le dysmorphisme sexuel étant du type XX et XY .

La morphologie de ces chromosomes est très variable, on y retrouve des éléments à centromère médian sub-médian, sub-terminal ou terminal.

Cette diversité a le grand avantage de permettre une identification certaine au microscope de 12 paires d'autosomes et du chromosome Y. Ce qui rend relativement ardue l'étude de ce caryotype par rapport à celui des autres espèces domestiques.

Par contre, les 6 paires autosomiques restantes ainsi que le chromosome X sont difficiles à apparier et à classer en raison de leur taille très voisine et de la position médiane ou sub médiane du centromère.

La plupart des auteurs ont réparti les chromosomes en 6,7 ou 8 groupes, ces groupes étant ensuite classés de diverses façons. Certains ont inclus le chromosome X dans l'un de ces groupes alors que d'autres, pensant l'identifier, le classent à part.

Pour notre part, nous avons repris la classification proposée par Mc FEELY et HARE en 1965 en 6 groupes désignés par les lettres A à F.

- groupe A - Paire 1

c'est le plus grand élément du complément, son centromère est sub-médian

- groupe B - Paires 2, 3, 4.

Tous ces chromosomes sont télocentriques : la paire 2 étant nettement plus grande que les paires 3 et 4.

- groupe C - Paires 5 et 6.

Ces 2 paires très caractéristiques ont un centromère subterminal.

- groupe D - Paires 7 à 13 inclus.

Il s'agit de 14 chromosomes difficilement apparia-  
bles. HAAG J. et NIZZA P. (1969) (90) incluent dans ce groupe le chromosome X qui ressemble morphologiquement à ceux de ce groupe. Et ils retirent donc du groupe D de MAC FEELY et HARE, la plus petite paire, très caractéristique par sa constriction

secondaire, pour la mettre en tête du groupe E. Ce déplacement selon les auteurs à l'avantage de rassembler dans le groupe D les 7 paires difficiles à appairer et à classer. "

Les 5 autres groupes ne comprenant alors que les chromosomes facilement identifiables et appariables. Ces 2 modifications ont permis de réaliser le tableau suivant.

Le classement dans les groupe D se fait de la façon suivante :

x classer d'abord la plus grande paire en n° 7 et la plus petite en n° 13.

x classer en n° 10 et 11, les 4 chromosomes ayant un centromère médian (3 chromosomes chez le mâle)

x classer n° 9, la paire qui présente plus ou moins nettement une zone hétérochromatique à proximité du centromère.

x classer en n° 12 la paire à centromère nettement submédian et dont les bras courts ont volontiers la forme de tenailles. (Cette caractéristique n'est pas toujours évidente).

x classer enfin en n° 8 la paire restante.

- Groupe E - Paires 14, 15, 16.

La paire 14 est très caractéristique par la présence constante d'une constriction secondaire entre le centromère et le bras court.

Les paires 15 et 16 ont un centromère à peu près médian. Il n'est pas possible de les différencier entre elles et on les classe arbitrairement selon la taille.

- groupe F - Paires 17, 18, 19.

Ces chromosomes ont un centromère terminal. La paire 17 est aisément différenciée des paires 18 et 19 qui sont arbitrairement classées selon leur taille.

- Particularités des chromosomes X et Y.

L'identification du chromosome X ne paraît pas certaine. On peut préciser les points suivants. Il appartient sûrement au groupe D.

x Il ne s'identifie ni à la plus grande paire ni à la plus petite de ce groupe.

x Il ne présente pas de constriction secondaire.

x Il fait partie d'un ensemble de 4 chromosomes (3 chez le mâle) à contromère presque médian.

x sa taille se placerait entre la paire 10 ou 11 avec une préférence pour la paire 11, sans qu'il soit possible de donner une plus grande précision en raison de la très faible différence de taille entre ces paires.

- L'identification du chromosome Y ne présente aucune difficulté. Il s'agit du plus petit chromosome de l'ensemble ; sa taille est légèrement inférieure à celle de la paire n° 10 et son contromère apparaît presque médian.

La classification proposée ainsi a l'avantage de regrouper, d'une part, tous les éléments du caryotype facilement et indiscutablement identifiables à vue et d'autre part, de réunir en un seul groupe (groupe D) tous les éléments qui présentent des difficultés d'appariements.

N.B : Sur notre planche nous avons classé selon la classification de Mc FEELY et HARE.

II.3.2 - Établissement du caryotype du cheval normal  
(Planche n° B , Fig. n° I )

Le caryotype du cheval a fait l'objet de nombreuses études. CARLOTTI en 1977 (29) a fait une analyse descriptive récapitulative synthétique et surtout méthodologique des travaux originaux concernant l'établissement du caryotype du cheval. Les enseignements qu'il en a tiré lui ont permis de proposer une méthode à suivre pour réaliser le caryogramme dans cette espèce domestique. C'est cette méthode que nous rapportons dans ce paragraphe.

Après de nombreuses polémiques les auteurs s'accordent aujourd'hui sur le nombre  $2n = 64$  chez le cheval normal composé de 26 métacentriques, 36 acrocentriques, un X métacentrique et un Y acrocentrique.

De nombreux auteurs ont réparti les chromosomes en 5 groupes de A à E.

La classification proposée par BORNSTEIN en 1967 et rapportée par CARLOTTI repose sur la position du centromère et la taille des autosomes qui sont divisés en 5 groupes : A, B, C, D, E.

- Le groupe A

est constitué par la seule paire n° 1 formée de 2 grands chromosomes submétacentriques.

- Le groupe B - Paires 2, 3, 4

ce sont de grands chromosomes métacentriques dont l'une des paires est un peu plus grandes que les deux autres, identiques entre elles.

HAGELTORN et GUSTAVSSON, 1974 (26) et CARLOTTI, 1977 ramène dans ce groupe la dernière paire du groupe C.

- Le groupe C - Paires 5 à 10 inclus (26) ou 5 à 9 inclus (26).

Ce groupe est formé de 5 ou 6 paires (selon la classification choisie) de moyens submétacentriques classées par taille décroissante. La dernière paire (C10) est selon BORNSTEIN, difficile à distinguer de la 3ème paire du groupe B (Bu) ce qui amène HAGELTORN et GUSTAVSSON et CARLOTTI à considérer le groupe B avec 4 paires et le groupe C avec 5 paires seulement

- Le groupe D - Paires 11, 12, 13

Ce groupe est composé de 3 paires de petits métacentriques (dont la dernière D13), serait plutôt submétacentrique), classée par taille décroissante.

- Le groupe E - Paires 14 à 31 incluses.

Ce groupe est donc constitué des 18 paires restantes dont tous les chromosomes sont télocentriques ; elles sont classées par taille décroissante. Une ou deux des plus petites paires pourraient être acrocentriques.

- Le chromosome X est submétacentrique assez facilement repérable, sa taille étant la seconde par ordre décroissant parmi les chromosomes submétacentriques.

- Le chromosome Y n'est pas décrit par BORSTEIN.

- La méthode pratique d'établissement du caryotype du cheval proposée par CARLOTTI est la suivante:



x Dans un premier temps séparer les chromosomes métacentriques et submétacentriques au nombre de 27 des chromosomes acrocentriques au nombre de 37. Chacun des deux gonosomes appartiendra donc à l'une de ces deux catégories

x Parmi les 27 premiers chromosomes, un gonosome s'isole très facilement : c'est un moyen submétacentrique qui présente une constriction secondaire vers le milieu des grands bras. Sa grande taille, par rapport à l'autre gonosome, acrocentrique, le désigne comme l'X.

x Les 26 chromosomes restants sont alors facilement divisés en trois catégories de taille : grands, moyens et petits. On obtient ainsi 2 grands, 18 moyens et 6 petits.

x Les 2 grands, appariés, peuvent alors former l'unique paire du groupe A.

x les 18 moyens peuvent à leur tour être divisés en deux groupes l'un de 8 métacentriques sensu stricto (4 paires), et l'autre de 10 submétacentriques (5 paires).

Il faut préciser que la séparation est délicate. Ces deux derniers groupes sont respectivement baptisés B et C.

x Ensuite appairer les autosomes dans B et dans C, classer les paires obtenues par taille décroissante. Ces appariements et ce classement sont parfois difficiles à réaliser et donc arbitraires.

x Les 6 derniers autosomes restants vont former le groupe D. L'appariement n'y est pas plus facile. Les deux plus grandes paires sont de vrais métacentriques, alors que la plus petite réunirait deux submétacentriques.

x Les difficultés d'appariement et de classement sont encore plus nettes en ce qui concerne l'ensemble des 37 chromosomes acrocentriques. Le premier problème rencontré est la détermination précise du chromosome Y qui est pratiquement impossible à réaliser. Beaucoup d'auteurs choisissent arbitrairement le plus petit acrocentrique, par analogie à d'autres espèces. La détermination de celui-ci est d'ailleurs tout à fait imprécise.

x La détermination de l'Y est liée au classement des autosomes acrocentriques. En effet selon l'Y choisi, les appariements des 26 autosomes restants ainsi que le classement des paires par taille décroissante sont sensiblement différents.

x Compte-tenu de ces difficultés il est pratiquement impossible de diviser l'ensemble des acrocentriques. On les regroupe dans un même cinquième groupe baptisé E. Dans ce groupe il existe une très faible différence de taille qui existe d'une paire à la suivante.

### II.3.3 - Le caryotype normal des bovins (Planche n° B , Fig. n°II)

Les bovins et les porcins sont les 2 espèces domestiques qui ont fait l'objet d'études cytogénétiques poussées. Ainsi POPESCU rapportait en 1982 (149) que près de 20.000 bovins avaient fait l'objet d'une analyse cytogénétique à travers le monde certes. Ce nombre est réduit et ne demande qu'à être amélioré et surtout à être plus équitablement réparti géographiquement.

Notons que depuis la confirmation du nombre de chromosomes chez les bovins en 1959 par NELANDER et la découverte de la translocation 1/29 par GUSTAVSSON et ROCKBORN en

---

1964 (88), beaucoup de publications ont été consacrées à la cytogénétique baskine. Nous signalons à titre indicatif les travaux de : COSSEC (37) CRIBU et coll. (40, 41, 42, 43) ; DARRE et coll. (45, 46, 47, 48) Di BERNARDINO (54) ; ELCHIDGE (64) ; FECHLEINER (65, 66) ; FRANCK et coll. (74) GUSTAVSSON (81, 82, 83, 84, 85, 86) ; HALMAN (92, 93, 94, 95, 96, 97) ; HARVEY (103, 104) ; KING et coll. (112, 113) ; PASCAL (139) ; POLLOCK (143) ; POPESCU (144, 146, 147, 149, 150) ; POTTER (157, 158) ; ROLDAN et coll. (160) ; SCHNEDL (163).

Signalons surtout, les travaux consacrés à quelques races de la sous-région de l'Afrique de l'Ouest (Cote-d'Ivoire) par POPESCU et coll. en 1979 (153).

Le caryotype normal des bovins et particulièrement du boeuf domestique (bostaurus L.) est composé de 60 chromosomes dont 58 autosomes acrocentriques et 2 chromosomes sexuels X et Y submétacentriques. Cette caractéristique morphologique permet de différencier aisément et indiscutablement les gonosomes des autosomes. Révélant ainsi une relative facilité dans l'établissement du caryotype bovin.

En effet il ne s'agira plus que d'apparier les autosomes et de les classer en fonction de leur taille décroissante. Cependant, tout comme dans l'établissement du caryotype du cheval et du porc, des difficultés de classement existent souvent pour les 6 dernières paires autosomiques.

Remarquons que les chromosomes des bovins ne sont pas classés en groupe. Le chromosome Y est caractérisé par son grand polymorphisme ; variation relative de la longueur. Ce caractère est hautement héritable et de ce point de vue, certains auteurs considèrent la plus ou moins grande taille

du chromosome Y comme un moyen éventuel d'investigation dans les recherches d'un caractère ethnique distinctif appréciable à l'échelle statistique (130).

Par exemple la taille du Y chez les charolais est comprise entre la 22e et 26e paire d'autosomes et elle est supérieure à la taille de l'Y dans les autres races (40, 41).

x Variation de la morphologie. Le tableau ci-dessous résume la morphologie du chromosome Y chez quelques races africaines.

Tableau n°13 : La morphologie du chromosome Y chez quelques races bovines africaines. (153)

Races	Morphologie du chromosome Y
N'Dama	Sub-métacentrique
Baoulé	Sub-métacentrique
Zébus (Peul)	Acrocentrique
Zébu Gobra	Acrocentrique
Baoulé X Zébu Peul	Acrocentrique
N'Dama X Zébu Peul	Acrocentrique
N'Dama X Baoulé	Sub-métacentrique
Zébu Peul X Zébu Gobra	Acrocentrique

L'examen de ce tableau montre que le chromosome Y des races taurines africaines est identique à celui des autres races taurines. Le chromosome Y des zébus et des croisés Zébus sont acrocentriques. Ce caractère trouverait une application pratique en ethnologie.

---

#### II.3.4 - Le caryotype normal des petits ruminants

Les petits ruminants n'ont pas fait l'objet d'autant d'analyses cytogénétiques que les bovins. Néanmoins un certain nombre de travaux ont permis de connaître avec certitude le nombre et la morphologie des chromosomes dans ces espèces. Nous n'avons pas bénéficié d'une bibliographie abondante pour faire une étude plus approfondie de leur caryotype ; cependant nous essaierons de présenter une analyse certes limitée mais non moins intéressante.

##### a) - Le caryotype normal des ovins (ovis)

(Planche n° B , Fig. n° V)

Le caryotype des ovins est composé de  $2n = 54$  chromosomes dont 26 paires d'autosomes et 2 chromosomes sexuels X et Y.

Les 26 paires d'autosomes sont divisées en 2 groupes :

- Le groupe 1 est constitué par les paires 1, 2, 3. Ce sont de grands chromosomes métacentriques facilement repérables par leur taille et la position de leur centromère.

- Le groupe 2 est constitué par les 23 paires restantes, formées de chromosomes acrocentriques que l'on peut classer et numéroter de 6 à 26 en fonction de leur taille décroissante.

- Le chromosome X est un métacentrique nettement plus petit que les métacentriques du groupe 1 donc facilement identifiable.

- Il en est de même pour le chromosome Y qui est un tout petit chromosome métacentrique.

Les difficultés de classification se situent surtout au niveau des 10 premières paires du groupe 2 qui ont pratiquement les mêmes tailles.

b) - Le caryotype normal des caprins

(Planche n° B , Fig. n°IV)

Le caryotype des caprins ressemble à beaucoup d'égard à celui des bovins : d'abord par le nombre ;  $2n = 60$ . Et ensuite par la morphologie des chromosomes.

Le caryotype des caprins est composé de 58 autosomes acrocentriques et 7 chromosomes sexuels X et Y. Le chromosome X est également acrocentrique (d'où la difficulté de l'identifier), tandis que l'Y est un tout petit chromosome métacentrique.

L'étude de ces 3 dernières espèces montre que les chromosomes des bovins, des ovins et des caprins sont à quelques exceptions faites totalement similaires. Une étude de plus par les bandes G en tire quelques conclusions très intéressantes pour l'étude de l'évolution dans ces espèces.

II.3.5 - Le caryotype normal du chat et du chien

a) - Caryotype du chat domestique (Felis catis)

En ce qui concerne le chat domestique (et les Félidés en général) la nomenclature de leur chromosome a été précisée au cours de la réunion cytogénétique internationale de San JUAN (14 Novembre 1964 - Conférence on karyotype of Felidae). Après un examen approfondi de nombreux caryotypes, le groupe d'étude de SAN JUAN s'est mis d'accord sur le fait que le chromosome X de *Felis domesticus* est un sub métacentrique de taille moyenne. Le groupe a ensuite adopté le

système de classement de HSU et coll. (109) en subdivisant les chromosomes en groupes naturels selon leur taille et leur morphologie.

Les chromosomes du chat domestique sont répartis en six groupes :

- 5 groupes d'autosomes de A à F
- 1 groupe de gonosomes.

Le nombre  $2n = 78$  est réparti selon le tableau d'accompagnement suivant :

x Autosomes :

- x groupe A 3 paires grands submétacentriques
- x groupe B 4 paires grands submétacentriques
- x groupe C 2 paires grands submétacentriques
- x groupe D 4 paires moyens submétacentriques
- x groupe E 3 paires petits métacentriques
- x groupe F 2 paires télacentriques.

x Gonosomes :

- x chromosome X submétacentrique de taille moyenne
- x chromosome Y petit acrocentrique.

b) - Le caryotype du chien (Planche n°B , Fig n°III)

Le caryotype du chien est composé de 76 autosomes et de 2 chromosomes sexuels X et Y.

Les caractéristiques morphologiques des chromosomes du chien sont :

- uniformité des autosomes tous acrocentriques.
- diminution très progressive de leur taille.
- leur nombre très élevé.

On peut classer les chromosomes en 38 paires autosomes homologues selon leur taille décroissante.

Le chromosome X est relativement bien défini, grâce à son centromère submédian. Du point de vue taille il est identique, à la première paire d'autosomes.

Le chromosome Y est très petit et assez difficile à identifier : il semble submétacentrique.

#### II.4 - REMARQUES

De cette étude de la classification des chromosomes des espèces domestiques et de l'homme, nous retiendrons quelques remarques :

1°) - Hormis dans l'espèce humaine et chez les Felidae, la nomenclature des chromosomes n'a pas été précisée dans les autres espèces animales. Il n'existe pas de références à caractère définitif sur la nomenclature des chromosomes des porcins, des bovins, des ovins, des caprins et enfin du chien.

2°) - De cette première remarque découle le caractère approximatif qui est pour beaucoup dans l'établissement des différents caryotypes des animaux. Soulignant ainsi la grande difficulté d'apparier certains chromosomes :

Les 6 dernières paires autosomiques des bovins, les autosomes du groupe E des porcins.

Il est donc indispensable de faire appel à une technique complémentaire afin de permettre une individualisation de chaque chromosome par la mise en évidence de leur structure interne et de mieux les classer ainsi. On y parvient, à petit pas, avec l'application de plus en plus généralisée des techniques de marquages chromosomiques.



## II.5 - NOMENCLATURE DES BANDES CHROMOSOMIQUES : PRINCIPES GÉNÉRAUX.

Il est hors de propos de donner la nomenclature de toutes les techniques de marquages. Nous rappelons uniquement les principes généraux et présenterons quelques exemples pour illustrer nos commentaires. C'est dans ce cadre que nous feront à la classification des bandes R chez les bovins par Di BERNADINO et coll. (53).

Les principes généraux sont :

- les principaux critères restent la taille relative des chromosomes et la position du centromère, comme la classification de DENVER.

- A ces deux critères s'ajoute bien sûr le marquage, qui est devenu le seul véritable moyen d'identification des chromosomes.

La nomenclature des bandes ne connaît pas une grande homogénéité d'une espèce à l'autre, aussi faut-il se satisfaire de la quasi-unanimité concernant les chromosomes humains.

- S'inspirant de la nomenclature de CHICAGO (tableau n°11) on symbolise chaque bras par la lettre p (bras court) et q (bras long). Chaque bras est ensuite subdivisé en régions (de 1 à 4). Les régions qui sont délimitées par des repères cytologiques (bandes très, ou très peu colorées), sont subdivisées en bandes.

Ainsi, la 2e bande de la 3e région du bras court du chromosome 1 se définira par 1 p 32. La numérotation des bandes et des régions s'effectue des centromères vers les télomères.

Les bandes elles-mêmes peuvent être subdivisées : en sous-bandes lesquelles peuvent être encore subdivisées par exemple 1 p. 32. 12.

Les subdivisions des bandes sont indiquées par un point dans la formule. Elles s'avèrent nécessaires lorsque des chromosomes prophasiques sont étudiés.

### III.- LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

Un sujet normal présente un caryotype qui se caractérise par le nombre des chromosomes ( $2n$ ) et la structure de ses chromosomes : lorsque ( $2n$ ) est normal le sujet est dit euploïde. Lorsque tous les chromosomes d'un même sujet sont de structure normale le sujet est dit eusomique.

On appelle anomalie ou aberration chromosomique, toute variation ou modification atypique du nombre et/ou de la structure des chromosomes. On parle d'aneuploïdie lorsqu'il y a anomalie du nombre des chromosomes ; d'aneusomie lorsqu'il y a anomalie de la structure d'un ou plusieurs chromosomes. Une mention particulière sera faite du freemartinisme.

#### III.1 - LES ANEUPLOÏDIES

On distingue trois groupes d'aneuploïdies :

- les polyploïdies
- les hyperdiploïdies
- les hypodiploïdies

##### III.1.1 - Les polyploïdies

Elles obéissent à la formule générale  $2N = (2 + \alpha)n$ . Le nombre de chromosomes est un multiple entier du nombre haploïde ( $n$ ). Dans les espèces animales le facteur ( $\alpha$ ) est souvent égal à 1 et ne dépasse pas 2.

- Lorsque  $\alpha = 1$   $2N = (2 + \alpha)n = (2 + 1)n = 3n$   
on parle de triploïdie.

- Lorsque  $\alpha = 2$   $2N = (2 + \alpha)n = (2 + 2)n = 4n$   
on parle de tétraploïdie.

Ces anomalies sont mieux connues chez l'homme que chez les animaux.

a) la triploïdie

- Elle répond à la formule générale  $2N = 3n = 69$  (chez l'homme). Les formules caryotypiques rencontrées sont par ordre de fréquence décroissante : 69, XXX ; 69, XXY ; 69, XYY. La formule 69, YYY est incompatible avec le moindre développement embryonnaire. La triploïdie correspond chez l'homme à deux tableaux classiques :

+ la mole embryonnée qui est une dystrophie vésiculaire partielle et localisée du placenta associée à un embryon hypotrophique poly-malformé. A l'examen histologique on note une discrète hypertrophie trophoblastique périvilositaire discrète souvent focale, avec formation de microkystes trophoblastiques intrachoriaux, correspondant aux résultats d'invagination du trophoblaste.

+ On connaît quelques observations de nouveaux nés atteints de triploïdie. Tous avaient des malformations très sévères, assez caractéristiques pour constituer un syndrome cliniquement identifiable : anomalie du visage, syndactylie, hypospadias, malformation du système nerveux central. Il s'agit de nouveaux nés qui décèdent dans les premières heures ou premiers jours extra-utérins ou aériens.

- Le mécanisme intime de constitution du caryogramme triploïde fait intervenir trois modalités différentes de fécondation :

+ La dispermie : fécondation d'un ovocyte à (n) chromosomes par deux spermatozoïdes. Ce mécanisme s'explique généralement par une fécondation tardive d'un ovocyte vieux de quelques jours, devenu incapable d'effectuer l'indispensable autoplasmolyse empêchant la double fécondation.

+ La digynie : fécondation d'un ovocyte diploïde ( $2n$ ) par un spermatozoïde haploïde normal. La digynie peut s'expliquer par l'absence d'expulsion du deuxième globe polaire. Vraisemblablement la cause d'une anomalie constitutionnelle et fonctionnelle du cyto-squelette ovocytaire.

+ La diandrie : fécondation d'un ovocyte normal ( $n$ ) par un spermatozoïde diploïde ( $2n$ ). La diandrie peut s'expliquer par une absence totale de disjonction chromosomique au cours de la deuxième division méiotique conduisant à la formation des spermatides.

Dans l'espèce humaine et bovine la dispermie est le mécanisme habituel de réalisation de la triploïdie, cependant il semble qu'en pays sous-équipés où règnent la malnutrition protéique, les anomalies du cytosquelette devenues plus fréquentes entraînent une augmentation des risques de diandrie et de digynie.

#### b) la tétraploïdie

obéit à la formule générale  $2N = 4n$  elle est toujours létale et correspond à un arrêt ultraprécoce du développement embryonnaire avec avortement spontané d'un oeuf clair n'ayant pas atteint le stade de la gastrulation.

#### III.1.2 - Les hyperdiploïdies

Elles obéissent à la formule générale.  $2N = 2n +$  . Certains auteurs les considèrent comme étant les vraies aneuploïdies. Le nombre de chromosomes est anormal sans être un multiple entier du nombre haploïde.

Le nombre ( $X$ ) peut varier entre 1 et 4. Dans les cas où  $X > 1$  il s'agit généralement d'hyperdiploïdie gonosomique (49, XXXXY) ou mixte (49, XXY, + 21). Les hyperdiploïdies les plus fréquentes sont les trisomies : autosomiques : ( $2N = 2n + 1$ ) et les hyperdiploïdies polygonosomiques (syndromes de Klinefelter, triplox, pentaplox, diplo y etc..) nous retiendrons pour les analyser les trisomies autosomiques et le syndrome de Klinefelter.

### III.1.2.1 - Les trisomies autosomiques

Elles correspondent à la présence dans le caryotype d'un sujet, de 3 exemplaires du même numéro chromosomique au lieu de 2 exemplaires (disomie). Il s'agit chez l'homme comme chez les animaux de la plus fréquente anomalie chromosomique observée. Il faut citer notamment les trisomies 13 - 18 et 21 chez l'homme et la trisomie 18 chez les bovins. Le chromosome surnuméraire peut être séparé des autres chromosomes on parle de trisomie libre, il peut être transloqué sur un autre chromosome dans ce cas le caryotype comporte le nombre normal de chromosomes et le diagnostic repose sur l'observation d'un élément chromosomique remanié : un néo-chromosome de morphologie anormale. Enfin le chromosome surnuméraire peut être emputé d'une partie de son matériel: il s'agit alors d'une trisomie partielle. On rencontre parfois des trisomies doubles (48, XX, + 18, 21) et des trisomies mixtes avec composants autosomiques et gonosomique supplémentaires (48, XXY, + 21). Le mécanisme intime de constitution des trisomies se déroule au cours de la méiose, il s'agit de non disjonction des éléments de la tétrade (méiose I) ou des éléments des chromosomes fissurés (méiose II). On a évoqué la possibilité qu'un chromosome trainard joigne au dernier moment le pôle cellulaire où se trouve déjà son homologue. Dans tous les cas il y a fécondation d'un gamète eusomique normal. Ce phénomène s'observe chez les mères âgées (vieillissement de l'ovocyte) mais également chez des femmes porteuses saines d'une anomalie de structure ou aneusomie (translocations inversions etc..)

déséquilibrant la mécanique chromosomique et favorisant la non disjonction: on parle d'effet interchromosomique. Sur le plan cytogénétique il est possible grâce aux techniques de marquages, de connaître l'origine paternelle ou maternelle du chromosome supplémentaire qui peut être précisée, de même que le mécanisme de constitution de l'aneuploïdie (non disjonction simple, effet interchromosomique) mais également le stade méiotique de survenue de la non-disjonction : ainsi lorsque les trois chromosomes sont différents il s'agit d'un accident survenu au cours de la 1e division méiotique ; lorsqu'il y a 2 chromosomes identiques ou trois, il s'agit d'un accident survenu au cours de la 2e division méiotique. Sur le plan nosologique les trisomies autosomiques réalisent : des syndromes polymalformatifs graves dans toutes les espèces, associées dans l'espèce humaine à une débilité mentale assez importante. La gravité du syndrome dépend du chromosome en cause de sa richesse en bande R mais surtout de son contenu génique. Enfin les trisomies autosomiques sont assez fréquentes dans les produits d'avortement, représentant environ 25 p. 100 des avortements du premier trimestre. Chez l'homme la trisomie 16 est particulièrement abortive et très fréquente (15 p. 100 du total des anomalies chromosomiques observées dans les produits d'avortements.

#### III.1.2.2 - Les trisomies gonosomiques

Il s'agit essentiellement du syndrome de Klinefelter et du syndrome double Y. Ce sont des digynie gonadique polygonosomique avec une dysmorphie peu marquée, le plus souvent discrète. Une azoospermie en rapport avec une hyalurose des tubes séminifères et dans le meilleur des cas une oligo-astheno-tératozoospermie aussi sévère qu'incompatible avec une reproduction normale. Il s'agit d'anomalie universelle dont l'impact sur la reproduction humaine et animale n'est plus à démontrer.

### III.1.3 - Les hypodiploïdies

Elles obéissent à la formule générale :  $2N = 2n - \alpha$   
Lorsque  $\alpha \geq 1$  le caryogramme est incompatible avec un développement embryonnaire : l'aberration chromosomique constituée est létale selon le type de chromosome en cause. Les hypodiploïdies les mieux connues sont les monosomies et notamment : les monosomies autosomiques toutes léthales et le syndrome de Turner ou monosomie gonosomique X. Dans l'espèce humaine, la monosomie X est létale dans 95 p. 100 des cas. Les survivants présentent 1 dysmorphie caractéristique, une atrophie secondaire gonadique et gonophorique responsable d'un impubérisme et d'une stérilité définitive. Cependant depuis quelques années grâce à la recherche systématique du syndrome néo-natal évocateur : le syndrome de Bonnevie - Ullrich (lymphoedème du dos, des mains et des pieds, cutis laxa auptérygium colli, retard staturo-pondéral, implantation basse d'oreilles mal occulées) on assiste au dépistage précoce du syndrome de Turner avec possibilité d'amendement du syndrome somatique sous oestrogénothérapie. Cependant si on arrive parfois à obtenir une puberté subnormale avec installation des menstruations, la stérilité est quant à elle définitive. Malgré ce résultat incomplet, la conduite médicale actuelle devant le syndrome de Turner est un véritable succès.

### III.2 - REMARQUE : LE FREEMARTINISME

Le freemartin est une femelle, jumelle d'un mâle. La gestation gémellaire dizygotique hétérosexuée avec fusion précoce des deux sacs allantoïdiens, en est la cause. Le freemartinisme est accompagné de stérilité totale. Les lésions sont caractérisées par la présence d'organes génitaux appartenant aux deux sexes, et d'ovotestis dont le degré de masculinisation est variable.



La gémellité dizygotique hétérosexuée s'accompagne de freemartinisme dans plus de 90 p. 100 des cas ( ). Le co-jumeau mâle d'une femelle freemartin est habituellement une chimère XX/XY mais dont l'appareil génital est normal ; ces taureaux ont une faible fertilité (sperme de mauvaise qualité, taux de non-retour bas), parfois ils sont totalement stériles. On observe aussi des dysmorphies gonadiques, associées ou non à un dérèglement du fonctionnement endocrinien avec diminution de la sécrétion d'androgènes. Pour ces raisons ils est conseillé d'éliminer ces travaux.

### III.3 - LES ANEUSOMIES

Il s'agit d'anomalie de la structure des chromosomes. On distingue :

- les remaniements intrachromosomiques dont
  - x les délétions
  - x les anneaux chromosomiques
  - x les duplications
  - x les isochromosomes.

- Les remaniements interchromosomiques principalement les translocations.

#### III.3.1 - Les remaniements intra-chromosomiques

##### III.3.1.1 - Les délétions

Elles résultent de la perte d'un segment chromosomique plus ou moins grand. Elle réalise une monosomie partielle pour le segment chromosomique intéressé. La délétion peut être terminale ou interstitielle. Chez l'homme les délétions les plus célèbres sont :

- délétion interstitielle du bras court du chromosome n° 5 (syndrome 5 p - /ou monosomie 5 p ou maladie du cri du chat" (Lejeune, 1963)

- délétion du bras court du chromosome 18 (ou monosomie 18 p (Jean de Grouchy, 1963).

- délétion du bras long du chromosome 18 ou monosomie 18 p (Jean de Grouchy, 1964).

Les délétions réalisent des syndromes polymalformatifs graves avec débilité mentale sévère : au total des syndromes de morpho et psycho-dystrophie plus sévères que ceux rencontrés dans les syndromes trisomiques. Il reste que, les monosomies étant des syndromes de déficience chromosomique et les trisomies des syndromes d'excès chromosomique, il existe une relation antagoniste entre ces deux anomalies qui sont diamétralement opposées lorsque le segment chromosomique est le même : c'est le phénomène de type et contre type tel qu'on l'observe entre les monosomies et trisomies 4 p, entre les monosomies et trisomies 21 p etc... Enfin grâce aux techniques à haute résolution il a été mis en évidence des micro délétions chromosomiques. Cette véritable microcytogénétique a permis de démontrer que des syndromes depuis longtemps généralement attribués à une mutation génique donc considéré comme des génopathies récessives peuvent être dus au moins dans certains cas à des délétions extrêmement courtes de microsegments chromosomiques : ce sont les cas du syndrome de Traverwilli (délétion de segment q 1-1 q 1-2 du bras long du chromosome 15) ; le syndrome de Di George (délétion de 22 q 1-1), l'association d'anaridrie - tumeur de Wilms ou gonadoblastome (délétion 11 q 1 - 3) ; le Rétinoblastome (délétion 11 p 1 - 4) ;

### III.3.1.2 - Les anneaux

Ils résultent d'une double délétion suivie d'une soudure des deux extrémités. Il y a donc perte d'un segment de p et un segment de q. Les chromosomes en anneaux sont des éléments instables variables pouvant se dupliquer au cours des mitoses successives. Les sujets porteurs sont généralement des mosaïques complexes, certaines cellules étant dépourvues d'anneaux, d'autres en comportant deux parfois trois. Le rétinoblastome associe parfois l'anneau du 13 lorsqu'il y a perte du segment 13 q 1-14. Un tableau clinique a été isolé pour les anneaux des chromosomes 1, 9, 15, 18, 21, 22 humains. Les anneaux réalisent des doubles monosomies fonctionnelles.

### III.3.1.3 - Les duplications

La duplication est l'inverse de la délétion. Elle crée une trisomie partielle sans variation du nombre de chromosomes. On distingue plusieurs variétés de duplication :

- la duplication en tandem
- la duplication en miroir
- la duplication adjacente
- la duplication inverse
- la duplication directe
- la duplication interstitielle.

Parmi les duplications, les plus célèbres touchent les gonosomes X et Y.

### III.3.1.4 - Le syndrome de fragilisation chromosomique

On observe parfois sur certains caryotypes des zones portant des images de cassure de micro délétion interstitielle

avec réalisation de lacune. Ce sont les zones de fragilisation chromosomique des sites fragiles. Parmi elles, la mieux étudiée est la fragilité du chromosome X. En effet certaines déficiences intellectuelles liées à X décrites par Martin-Bell en 1943 puis par Repenning en 1962 semblent avoir trouvé une explication dans la cassure anormale du bras long du chromosome X au niveau de la 8e bande de la 2e région (site X q 2-8). Les mères conductrices présentent parfois la même anomalie que leur fils mais sans conséquence phénotypique. Les garçons déficients présentent un faciès particulier avec de grandes oreilles décollées et mal ourlées, la lèvre supérieure éversée et une macro-orchidie mesurable. Le fait le plus important de la fragilité de l'X en ce point encore appelée "X (fra) 928" n'apparaît que si le milieu de culture est spécifique : TC 199 pauvre en acide folique ou supplémentée par un antagoniste de l'acide folique : le métotrexate. Si l'on traite les sujets atteints pendant plusieurs mois par de l'acide folique, ou vitamine B9, le phénomène de fragilité disparaît et la cassure n'est plus reproductible même dans les conditions spéciales de culture.

Premier cas de réparation chromosomique thérapeutique in-vivo.

### III.3.1.5 - Les isochromosomes

Dans les conditions normales la bipartition préanaphasique du centromère responsable de la séparation des chromatides soeurs se fait suivant un axe antéro-postérieur parallèle au bras chromosomique. Dans quelques rares cas la ligne de loi est horizontale donc perpendiculaire au bras du chromosome se constitue ainsi 2 chromosomes anormaux appelés isochromosome : l'un constitué de deux bras courts est dit

iso p l'autre constitué de deux bras longs est dit iso q. Ces chromosomes apparaissent sous la forme de métacentrique dont les 2 bras sont identiques. Les iso p sont rarement rencontrés seuls les (iso q) sont de temps en temps observés. Le phénomène est surtout connu pour le chromosome X. La fécondation d'un gamète contenant un iso chromosome par un gamète normal réalise un syndrome chromosomique en rapport avec une double aneuploïdie partielle : trisomie partielle pour un bras chromosomique + monosomie partielle pour le même bras chromosomique.

### III.3.1.6 - Les inversions

Elles résultent de 2 cassures situées sur le même chromosome, suivies de recollement après une rotation de  $180^\circ$  du segment intercalaire. On distingue deux variétés d'inversion : les inversions para-centriques et les inversions paracentriques. Dans les inversions para-centriques les deux cassures sont situées sur le même bras chromosomique. Dans les inversions péricentriques les deux cassures sont situées de part et d'autre du centromère. Les inversions para-centriques sont généralement anodives quant aux inversions péricentriques elles entraînent des conséquences graves :

- ralentissement et perturbation de la mécanique chromosomique au cours de la méiose avec possibilité de détermination d'une non-disjonction d'une autre paire chromosomique : effet interchromosomique (ainsi les sujets porteurs d'inversion ont dans leur descendance une fréquence de trisomie 22 ~~supérieure~~ à celle de la population normale).

- au cours de la méiose, les difficultés d'appariement du chromosome inversé avec son homologue normale crée alors une boucle d'inversion qui peut être le siège de crossing-over ou enjambement. On obtient ainsi à côté de chromo-

somes fils normaux des chromosomes anormaux présentant un segment en trop et un segment différent en moins : ces chromosomes recombinants correspondent à des aneusomies de recombinaison.

La fécondation des gamètes contenant ces aneusomies, avec des gamètes normaux réalise des doubles aneuploïdies partielles responsables d'échec de la reproduction (avortements spontanés répétés, rétention d'oeufs morts, enfants polymalformés plus ou moins débiles mentaux).

### III.3.2 - Les remaniements inter-chromosomiques

Ils mettent en jeu deux ou plusieurs chromosomes. Ce sont les translocations. Elles résultent du transfert d'un segment de chromosome sur un autre chromosome. On distingue deux grandes variétés de translocations : les translocations simples et les translocations réciproques.

#### III.3.2.1 - Les translocations simples

Le segment terminal d'un chromosome est transposé sur le segment terminal d'un autre chromosome. Modifiant ainsi la longueur des chromosomes impliqués et leurs indices centromériques.

#### III.3.2.2 - Les translocations réciproques

Ici l'accident entraîne un échange mutuel de segment chromosomique entre deux chromosomes non homologues. Ces translocations réciproques peuvent revêtir un aspect particulier qu'on appelle fusion chromosomique. Ces fusions ont eu une signification et un rôle au cours de l'évolution des espèces ( ).

On distingue deux variétés de fusions:

Les fusions centriques ou centromériques et les fusions terminales ou telomériques.

a) Les fusions centriques

Elles sont encore dites robertsonienne. Elles concernent généralement 2 chromosomes **acrocentriques** dont le centromère est quasi terminal. Chez l'homme elles se passent entre les chromosomes du groupe D (les paires 13, 14, 15) T. Rob (Dq Dq) et/ou les chromosomes du groupe G (les paires 21 et 22) (t. Rob (Dq Gq) ; t. Rob (Gq et Gq). Ces translocations sont pourvoyeuses de nombreuses anomalies dans la descendance, notamment de sujet trisomique ou monosomique. Il s'y ajoutent des possibilités de non disjonction par effet interchromosomiques. Le risque de trisomie 21 dans la descendance d'un sujet portant une translocation Robert. Rob 21 q 21 q est de 100 p. 100.

b) Translocation par fusion télomérique

Elles résultent de l'accollement de 2 chromosomes par leurs extrémités. Il se forme ainsi un grand chromosome possédant deux centromères mais relativement stable car l'un des centromères est inhibé.

Lorsqu'il y a translocation entre le chromosome X et un autosome c'est généralement l'X anormal qui est inactivé : et avec le segment chromosomique transloqué ce qui réalise une monosomie pour ce segment.

III.3.3 - Cas particuliers des animaux domestiques

Les aneusomies les plus fréquemment rencontrées dans ce groupe d'animaux sont principalement les translocations et occasionnellement les inversions.

a) Chez les bovins

Chez les bovins plusieurs translocations ont été décrites. Elles sont regroupées dans les tableaux suivants :

Tableau n° 14 : Différentes translocations robertsoniennes chez les bovins.(149).

N°	Chromosomes impliqués	Race	Phénotype	Référence
1	1/29	nombreuse	normal	divers
2	2/4	Frisone	normal	Pollock, 1972
3	3/4	Limousine	normal	Popescu, 1977
4	5, 6/15, 17	Dexter	-	Eldrige, 1974
5	7, 11/20, 25	Blonde Limousine	?	Darré et coll., 1974
6	8/9	Brauviech	?	Tschudi, 1977
7	13/21 mosaïque	Holstein-Friesian	normal	Kovacs et coll., 1973
8	11, 12/15, 16	Simental	normal	Bruere et Chapman, 1973, Harvey 1974
9	1/25	Pic-rouge	normal	Stranzinger et Forster, 1976
10	14/28	Holstein	anormal	Ellsworth et coll., 1979
11	14/24	Podolian	anormal	Di Berardino, 1979
12	25/27	Alpini grey	normal	De Giovanni et coll., 1979
13	5/21	Japanese Black	normal	Masuda et coll. 1980



Tableau n° 15      Fréquence de la translocation 1/29 suivant les races (149).

Race	Nombre d'animaux étudiés	Hétérozygote pour la translocation 1/29	pourcentage
Blonde d'Aquitaine	46	6	13,04
Charclais	359	11	3,06
Limousine	133	10	7,52
Montbéliard	365	8	2,19
Vosgienne	87	1	1,23
Baoulé	85	3	3,53
N'Damas	26	-	0
Zébus et croisées	51	3	5,89

L'examen de ces deux tableaux montre que la translocation 1/23 est la plus répandue et la plus fréquente de toutes les fusions centriques. Elle a été identifiée dans une trentaine de races, réparties en Europe, en Amérique du Nord et Centrale, en Asie et en Afrique. Les fréquences sont très variables d'une race à l'autre. La fréquence dans les races africaines pourrait être élevée. Cependant les effectifs étudiés jusqu'ici sont limités et les renseignements d'ordre généalogique sur les animaux examinés sont totalement absents. C'est pourquoi les fréquences trouvées demandent à être confirmées ( ).

La fusion centrique 1/29 n'a pas d'effet visible sur le phénotype des animaux porteurs. Elle n'a aucun effet favorable ou défavorable sur la croissance et l'indice de consommation (Queinnec et Al 1974), sur les fonctions sexuelles et les caractéristiques du sperme (Dyrrendahl et Gustavsson 1979). Cependant, une telle anomalie structurale perturbe le déroulement normal de la division méiotique chez l'animal qui la possède à l'état hétérozygote. Les gamètes issus de telles divisions ont soit un chromosome excédentaire, soit un chromosome manquant. L'union de tels gamètes avec des gamètes normaux furent des zygotes monosomiques ou trisomiques pour un des chromosomes libres. Ce processus devrait donner dans les proportions suivantes : 1/6 de zygotes normaux, 1/6 de zygotes équilibrés porteurs de l'anomalie et 2/3 de zygotes à caryotype déséquilibré. Des animaux vivants à caryotype déséquilibré provenant de croisement entre un taureau porteur de l'anomalie et des individus normaux n'a jamais été mis en évidence. Ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle la baisse de fertilité des animaux anormaux, serait due à une augmentation de la mortalité embryonnaire. Hypothèse confirmée par de nombreuses études sur des embryons ( ) ont confirmé cette hypothèse.

---

Les porteurs mâles de la translocation ont une fertilité réduite de 3 à 5 points, lorsque le critère d'étude est le taux de non retour correspondant à la mortalité embryonnaire.

Les femelles, filles de taureaux transloqués sont en moyenne moins fertiles que leur contemporaine. La déduction de la fertilité, analysée également par le critère du taux de non-retour, oscille entre 3 et 6 p. 100, impliquant donc une mortalité embryonnaire d'importance non négligeable pour une espèce d'animaux de rente. C'est pourquoi la plus part des auteurs ( ) recommandent l'élimination des taureaux porteurs de l'anomalie. Ainsi dans le cadre d'un schéma de sélection, il est conseillé de faire le caryotype de tous les animaux avant la sélection individuelle, au plus tard avant la mise en testage, et au sein d'un élevage il est fortement conseillé de faire un examen caryotypique de tous les géniteurs et les génitrices "à problèmes" au moment de la mise à la reproduction.

#### b) Chez les porcins

On rencontre surtout des translocations réciproques que nous avons regroupées dans le tableau n°

Ces anomalies chromosomiques sont importantes à prendre en considération, car elles sont souvent associées à une baisse de la prolificite des animaux porteurs à l'état hétérozygote ( ). Il apparait que cette baisse de prolificité est due comme chez les bovins à une mortalité embryonnaire précoce des zygotes issus de gamètes déséquilibrés, mortalité dont l'ampleur varie selon la translocation de 26 % à 56 % et dans quelques rares cas atteint 100 %. Cette hypothèse de la mortalité embryonnaire a été confirmée par plusieurs travaux sur de très jeunes embryons

Tableau n° 16 : Les translocations réciproques identifiées chez les porcs domestiques (149, 152).

N°	Chromosome impliqué	Pays	Réduction de la prolificité	Auteurs
1	trcp (11p+ ; 15q-)	Suède	56 % 34 %	Honricson, Backstrom, (1964) Hageltorn, et coll. (1973)
2	trcp (6 p+ ; 15 q-)	Belgique	100 %	Bouters et Coll. (1974)
3	trcp (1 p+ ; 6 q+)	Yougoslavie	26 %	Lockniskar et coll., (1976)
4	trcp (13q- ; 14q+)	Suède	50 %	Hageltorn et coll., (1976)
5	trcp (6P+ ; 14 q-)	Angleterre	100 %	Madan et coll., (1978)
6	trcp (4p+ ; 14q-)	France	43 %	Popescu, Legault, (1979)
7	trcp (1p- ; 16 p+)	Allemagne	?	Föster et coll. (1981)
8	trcp (7q- ; 11 q+)	Suède	50 %	Gustavsson et Coll. (1982)
9	trcp (9p+ ; 11 q-)	Suède	50 %	Gustavsson et Coll., (1982)
10	trcp (1p- ; 8 q+)	-	?	Gustavsson et Coll. (1982)
11	trcp (1q- ; 14q-)	RDA	?	Golisch et coll. (1982)
12	trcp (7q- ; 15 q+)	France	45 %	Popescu et coll. (1983)

Les conséquences économiques de cette anomalie résultent non seulement de ses effets sur la taille de la portée à la naissance, mais aussi sur la fertilité du verrat et la viabilité des porcelets qui s'exercerait en sens opposé sur la productivité ( ). En terme de productivité numérique de la femelle (nombre de porcelets sevrés pendant une période donnée, la réduction observée chez les tracés saillies par un verrat porteur de l'anomalie pourrait atteindre jusqu'ici 9 porcelets par an, ce qui représente une perte économique sérieuse pour l'élevage touché. L'usage d'un tel verrat peut se traduire par une perte de plus de 100 porcelets avant même que l'éleveur n'ait pu se rendre compte de la mauvaise fertilité du mâle.

Notons que le maintien d'une telle anomalie dans une population au fil des générations se fait essentiellement par la voie femelle : en raison de la très faible répétabilité de la taille de la portée, il est en effet difficile de détecter l'anomalie chez les femelles qui sont refermées en moyenne, après avoir produit trois à cinq portées. Il est aussi difficile de détecter des verrats "hypolifiques" dans les élevages, en raison de multiples facteurs de milieu (pathologie, nutrition, saison, surmenage du verrat etc...) qui intervient sur ce caractère.

#### IV. - INDICATIONS ET INTÉRÊTS DU CARYOTYPE.

Le caryotype est un examen artisanal hardu et onéreux, il ne saurait être question de le pratiquer systématiquement. D'où la nécessité d'une sélection des demandes en fonction des indications et des renseignements anatomo-cliniques fournis par le clinicien demandeur au Laboratoire d'anatomopathologie.

Avant toute chose, il faut signaler que le plus petit fragment de chromosome étudiable par les techniques cytogénétiques les plus perfectionnées (marquage des chromosomes prométaphasique) contient trente à cinquante gènes, certes d'intérêt et d'importance physiologiques variables. Les mutations ponctuelles affectant un à quelques gènes ne peuvent donc pas être mise en évidence par les techniques cytogénétiques.

Les syndromes malformatifs isolés (embryopathies ou foetopathies ainsi que les génopathies malformantes ne doivent donc pas pas faire l'objet d'analyse chromosomique. Quels sont les circonstances dans lesquelles, il faut un caryotype ?

##### 1. - EN MEDECINE HUMAINE.

Les travaux des différentes équipes Euro-américaines ( ) ont établi au cours des années 1970 qu'un peu moins d'un enfant sur 100 est porteur d'une aberration chromosomique équilibrée ou non. Au sein de la population générale sujet adulte 300 à 500 porteurs d'un remaniement chromosomique équilibré qui fera sa preuve par une infertilité ou par la naissance d'un enfant polymalforme atteint d'une trisomie ou d'une monosomie partielle (aneusomie de recombinaison) ou une d'aneuploïdie entière par effet interchromosomique.

D'une manière générale, l'analyse chromosomique ne se conçoit qu'à la lumière des données clinique paraclinique et biologique. Les indications du caryotype comme la nature et les conséquences des **aberrations** chromosomiques les plus fréquemment rencontrées varient en fonction de l'âge et de la symptomatologie clinique. Tandis que les indications de techniques spéciales de marquage sont en rapport avec l'anomalie autosomique à préciser.

### 1.1 - Les indications en fonction de l'âge.

On peut envisager l'examen caryotypique à différent stade de l'ontogenèse et de l'histoire naturelle intra utérine et extra utérine d'un individu.

#### 1.1.1 - Pendant la vie intra utérine.

L'analyse chromosomique est effectuée sur des cellules amniotiques obtenues par amniocentèse. Cette recherche d'analyse chromosomique est faite en face de 4 risques différents.

#### 1.1.2 - L'âge maternel.

L'amniocentèse chez la mère âgée représente 75 p.100 des indications de cette technique. En effet dès l'âge de 38 ans, il y a une élévation brusque du risque d'un enfant atteint d'aberration chromosomique. On décèle une anomalie.:

- dans 3,5 p.100 des grossesses chez les mères âgées de 40 à 45 ans.

- 8 p.100 des grossesses chez les mères âgées de 45 ans ces anomalies sont dans plus de la moitié des cas; la trisomie 21.

on observe également la trisomie 13, trisomie 18, mais aussi des aneuploïdies gonosomiques. Selon ROBERT ( ), les aberrations chromosomiques diagnostiquées, pendant la vie intra-utérine, sur amniocentèse, représente 15 p.100 de toutes les aberrations chromosomiques déséquilibrées.

1.1.3 - Présence d'un remaniement chromosomique chez l'un ou les deux parents.

En effet, il ya risque de mal ségrégation par effet interchromosomique d'une part, et d'autre part risque d'aneuploïdie partielle. double par aneusomie de recombinaison au cours de la méiose. De tels remaniements parentaux s'observent chez un couple sur 250. De façon générale, la fécondité de ces couples est faible, mais tous les auteurs s'accordent à estimer 7 à 8 p.100, le risque pour le couple de donner un enfant sévèrement atteint.

Ce risque est accru si c'est la femme qui présente le remaniement chromosomique et plus encore si elle est d'âge avancé.

1.1.4 - Antécédents d'enfants trisomie 21 dans la fraterie.

Il y a indication de caryotype prénatal chez les mères ayant donné naissance au paravant à un enfant trisomie 21 libre.

Il s'agit là d'une indication dispensable sur le plan scientifique. Néanmoins le risque de recurence établi par les dernières statistiques mondiales est de 1 p.100 dans la population générale. Par ailleurs sur le plan psychologique, un examen cytogénétique prénatal non pathologique est un diagnostic rassurant, permettant au couple d'envisager une nouvelle grossesse.



## 1.2 - A la naissance

Dans cette circonstance, le caryotype vient confirmer:

### 1.2.1 - Un diagnostic certain.

Grand syndrome chromosomique : trisomie 21, trisomie 18, trisomie 13, monosomie 5 p. ou syndrome du "cri du chat" etc...

### 1.2.2 - Diagnostic vraisemblable :

ambiguïté sexuelle; un syndrome de Turner évoqué par la présence d'un aspect de BONNEVIE- ULLRICH : lymphoedème des extrémités et cutis laxa ou pterygium colli.

### 1.2.3 - Un diagnostic possible :

d'anomalies chromosomiques (trisomie et/ou monosomie partielle). L'indication est posée devant l'association à un syndrome polymalformatif (dysmorphie faciale, anomalie des membres, microcéphalie, dermatogriffes anormaux) de trouble de tonus (hypo ou hypertonia) et des signes de malformations internes surtout cardiaques (cyanose et souffles).

Le caryotype est demandé dès qu'on sait qu'il pourrait s'agir d'une embryopathie ou d'une génopathie malformative congénitale liée à la présence d'un gène récessif muté double dose. Enfin d'une phénocopie (syndrome malformatif sans anomalie chromosomique simulant à s'y méprendre un syndrome chromosomique : c'est le cas du syndrome de NOONAN faux aspect turnérien).

Enfin il ya possibilité de caryotypage chez les mort nés frais et les mort nés de moins de 24 heures : (caryotype posthume sur mitoses lymphocytaires obtenues par culture de sang endo cardiaque ou par culture de fibroblaste du derme cutané.

### 1.3 - Chez l'enfant

Le caryotype fait partie du bilan de routine :

1.3.1 - de tout retard psychomoteur important surtout, s'il existe des malformations interne ou externe associées.

1.3.2 - de tout enfant présentant une "psychose infantile" ou un traumatisme au cours desquels, on observe des cas indiscutables d'aneuploïdie partielle.

1.3.3 - débilité mentale : en effet toute aneuploïdie même minime intéressant les autosomes se traduit obligatoirement par un déficit intellectuel.

1.3.4 - Les enfants présentant de retards scolaires importants et des troubles caractérielles. On recherchera la présence de X (frac) q/2.8 d'autant plus qu'il présente l'association syndromique caractéristique à savoir : des garçons aux facies particulier avec des oreilles décollées et mal ourlées, la lèvre supérieure éversée et une macroorchidie mesurable.

### 1.4 - Chez l'adolescent

Le caryotype fait partie du bilan bioclinique de routine :

1.4.1 - de tout retard de croissance important ou au contraire d'un excès de taille inexpliqué surtout, s'il s'y associe une macroskellie.

1.4.2 - de tout impubérisme avec aménorrhée chez la fille (syndrome de Turner ou syndrome de Morris, en eunuchisme et gynécomastie) chez le garçon (syndrome de Klinefelter).

#### 1.5 - Chez l'adulte

Le caryotype fait partie du bilan anatomo clinique de routine :

1.5.1 - de toute infertilité dont la preuve somatique n'est pas évidente surtout s'il existe oligo-asthénospermie chez l'homme, des anomalies des règles chez la femme (dysgénésie gonadique polygénosomique diverse).

1.5.2 - le bilan anatomo-clinique de tout couple présentant des avortements spontanés précédés répétés (recherche d'un remaniement chromosomique) parent. 1 équilibré pourvoyeur d'aneuploïdie de recombinaison et d'aneuploïdie polymalformative et létale pour la descendance.

Il est recommandé d'effectuer un caryotype à partir du 3<sup>e</sup> accident abortif spontané, inexpliqué, surtout s'il y a inadéquation entre l'âge embryologique et la date des dernières règles.

1.5.3 - Chez tout sujet de phénotype féminin présentant à l'évidence une génopathie liée au chromosome X avec récessivité (myopathie de DUCHEN DE BOULOGNE, hémophilie ou B, dyschromatopsie etc...) en effet dans ce cas un caryotype monosomie X (45, XO) doit être recherché de partie prise.

1.5.4 - Enfin lorsqu'un remaniement chromosomique a été diagnostiqué chez un sujet, les enquêtes gynécologiques doivent être proposées à ses ascendants et collatéraux, s'il s'agit d'un nouveau né, d'un enfant ou d'un adolescent; à ses descendants et collatéraux s'il s'agit d'un adulte.

1.6.1 - L'analyse chromosomique est indiquée dans tout syndrome myelle prolifératif. Caryotype médullaire et lymphoblastique avant toute chimiothérapie ou radiothérapie. La cytogénétique est fondamentale dans le diagnostic positif de leucémie myéloïde chronique (ALC). Elle recherchera le chromosome de Phyladelphie  $Ph_1$ , dér t-Rec (9;22) (q+; q<sup>-</sup>). Il faut signaler qu'il s'agit d'un remaniement chromosomique équilibré, une mutation de novo, une anomalie acquise qui s'observe au cours de la phase leucémique aiguë dont la disparition préfigure la remission, et la réapparition annonce une rechute clinique à brève échéance.

#### IV. 1.2 - Indication des techniques particulières d'analyse chromosomique.

Nous avons vu (chapitre II° - II), que les diverses techniques de marquage, étaient de valeur diagnostique complémentaire où il faut toutefois singulariser les techniques de bandes R et G applicables en pratique courante. En pays sous équipés, la pratique courante des bandes G est mieux indiquée parce que n'exigeant pas un équipement photomicroscopique particulier.

Mais lorsqu'une particularité chromosomique a été diagnostiquée par les techniques courantes, il faut mettre en route des techniques spéciales plus adaptées. Ce qui permet d'approfondir pour la raffiner l'analyse cytogénétique. Ainsi on utilisera :

- Les méthodes de bandes T seront utilisées lorsqu'un remaniement impliquant un segment chromosomique distal est recherché (translocation télomérique, duplication en tandem etc....).

- Les bandes C seront utilisées pour préciser la structure d'un variant chromosomique, les anomalies de la taille et du nombre des satellites des chromosomes acrocentriques, l'étude d'une translocation par fusion centromérique robertsonienne, la recherche d'un isochromosome.

- Les techniques dynamiques d'incorporation du 5 - Buor sont indispensables dans l'étude des "échanges de chromatide soeur", le repérage de l'X inactivé et l'étude (plus fondamentale) de la fréquence de réplication d'un variant ou d'un néochromosome. On a pu ainsi établir que lorsqu'un chromosome X est anormal et aneusomique c'est pratiquement toujours sur lui que porte l'inactivation, sauf dans les cas de remaniement (X, autosome) ou l'inactivation de X porteur d'un segment d'Y est polymalformante et débilitante sinon létale.

- Les techniques à haute résolution sont utilisées pour rechercher les points de cassure dans divers remaniements

#### IV -2- En Médecine Vétérinaire.

Les circonstances dans lesquelles, il faut demander un caryotype, en Médecine vétérinaire sont limitées par rapport à la Médecine humaine. Ceci est lié au caractère essentiellement économique de l'élevage. Aussi toutes entraves à la reproduction, et tout particulièrement dans les conditions ci-dessous citées, devraient amener à établir le caryotype, pour infirmer ou confirmer le diagnostic du clinicien qui n'est en fait, en matière de pathologie chromosomique qu'un diagnostic de suspicion.

La demande de caryotype se justifie dans les cas suivants :

- diminution de la fertilité ou stérilité totale.
- léthalité
- malformations graves constatées soit à la naissance, soit au moment de la mise à la reproduction.
- caractère familial de la symptomatologie observée.

Il est parfois délicat de faire une relation immédiate entre la symptomatologie et l'aberration chromosomique; seule la convergence de plusieurs observations similaires peut permettre de poser un diagnostic de certitude ( ). Très souvent les anomalies de nombres (trisomies, chimerisme, intersexualité) accompagnées d'effets graves sur la conformation et la fertilité sont rapidement éliminées par la sélection et de ce fait ne causent pas de pertes économiques importantes à l'élevage.

Néanmoins, les investigations cytogénétiques de ces anomalies ont une certaine importance pour le diagnostic correct de l'anomalie en question. Par contre les anomalies chromosomiques de structure notamment la fusion centrique 1/29 chez les bovins et les translocations réciproques chez les porcins à cause de leur conséquence économique et des risques de dissémination de l'anomalie dans la population grâce aux nouvelles techniques d'élevage (insémination artificielle par exemple), méritent d'être dépistées.

On comprend ainsi pourquoi la cytogénétique devrait être une activité de recherche appliquée active dans nos pays pour épauler la pratique d'élevage.

Au delà de cet aspect purement économique, le caryotype devrait permettre de mieux définir les nombreuses races. Le développement des techniques des bandes et leurs applications révélèrent certainement une légion de marqueurs chromosomiques non encore décrits ( ). L'étude du caryotype des animaux sauvages ( ) apparentés aux espèces domestiques permettra de mieux comprendre l'évolution du règne animal.

AA	AB	AC	AD	AE
A			B	
AA	AB	AC	AD	
C				
AA	AB	AC	AD	
D				
AA	AB	AC		
E				
AA	AB			
F				
AA	AB			
G				

Denver

1

2G

1	2	3	4	5
6	7	8	9	
10	11	12		X
13	14	15		
16	17	18		
19	20			
21	22			

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12	13	14	15
16	17	18	19	20
21	22			

47,XXX

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

2cB

8

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

C

YqYq

7

10R

11	12	13
----	----	----

9qh+

Q

12

G

R

Ph<sub>1</sub> (Rhg)

22

13

## LEGENDES DE LA PLANCHE A

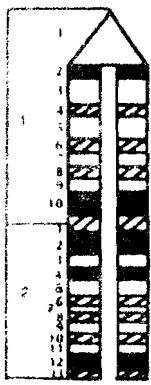
- Figure 1 - Cg 83/76 - Technique standard : Giemsa.  
Caryotype masculin normal, classification de DENVER (noter les groupes A, B, C, D, E, F, G) : 46, XY.
- Figure 2 - Cg 284/81 - Bande G (G T G).  
Caryotype masculin normal : 46,XY.
- Figure 3 - Cg 389/82 - Bande R (RHG)  
Caryotype féminin normal : 46,XX, 9qh(+) sur le 9 de gauche.
- Figure 4 - Cg 477/83 - Bandes R (RHG).  
Caryotype masculin normal : 46, XY.
- Noter le parfait appariement des chromosomes homologues et la facilitation de l'classification qu'introduit cette technique.
- Figure 5 - Cg 519/84 - Caryotype humain aneuploïde. "Bandes RHG. 47,XX,+ 21 (mère de 39 ans). Deux 21 identiques sur 3 : Non disjonction en méiose II.  
(Vraisemblablement à cause du vieillissement de l'ovocyte).
- Figure 6 - Cg 522/84 - Caryotype humain aneusomique et aneuploïde.  
"Bandes RHG". Noter le "néochromosome" moyen médiocentrique 13q 13q. 46,XX, + 21, t. Rob (13q13q). Effet interchromosomique. Non disjonction en méiose I.
- Figure 7 - Cg 393/82 - Bande C.  
Noter le marquage des centromères et le néochromosome Yq Yq der t. Rob (Y ; Y).
- Figure 8 - Cg 192/76 - Technique standard.  
Trisomie X ou Triplo X : 47, XXX.  
Montage "en cartouche" du noyau interphasique correspondant qui montre 2 corpuscules de BARR (2 cB).
- Figure 9 - Cg 319/82 - Bandes GTG chez une femme de 36 ans ayant eu 8 fausses couches et 5 rétention d'oeufs morts : 46, XX, t (1 ; 5) (p- ; p+).



- Figure 10 - Cg 198/81. Montage mettant en évidence les paires 4,5, 9, 10, 14, 15, 22 et les gonosomes (2 X et 1 Y) : 47, XXY (syndrome de KLINEFELTER).
- Figure 11 - Montage d'une paire 9 d'un nain sénégalais montrant l'hypertrophie de la constriction secondaire du bras long 9qh (+) en RHG (marqueur R physiologique de la race négroïde).
- Figure 12 - Montage comparant les marquages chromosomiques Q, G et R pour le chromosome n° 1 humain.  
Noter le caractère reverse du marquage R par rapport à Q et G et l'intérêt de disposer de plusieurs techniques de marquage pour une analyse plus raffinée des chromosomes.
- Figure 13 - Montage des paires 9 et 22 montrant le chromosome de Philadelphie (Ph<sub>1</sub>.) dans une L.M.C.  
Ph<sub>1</sub> der t. Rep (9 ; 22) (q + ; q-).

P L A N C H E B

Diagramme en bandes R après incorporation de virus chez les Bovins



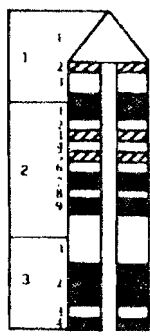
1



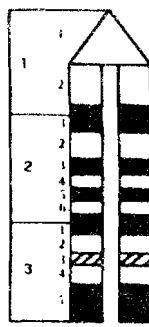
2



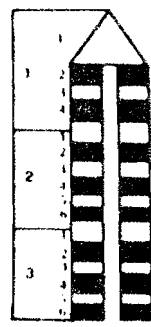
3



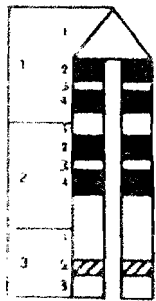
4



5



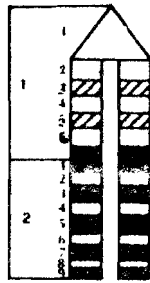
6



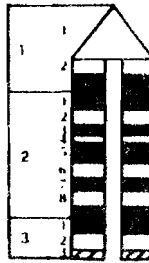
7



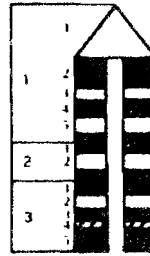
8



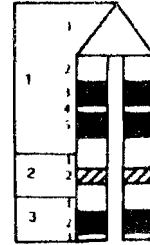
9



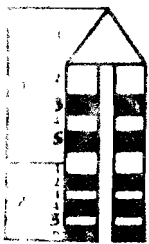
10



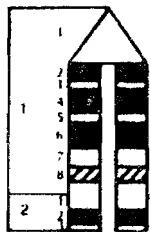
11



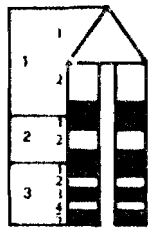
12



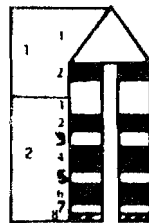
13



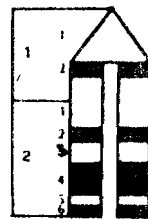
14



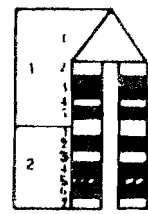
15



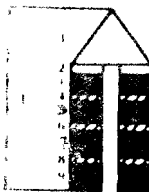
16



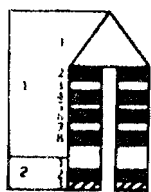
17



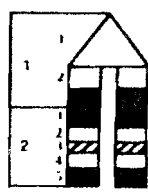
18



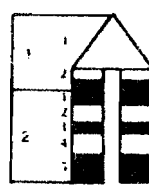
19



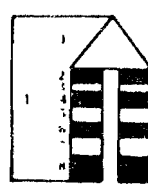
20



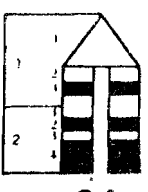
21



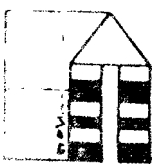
22



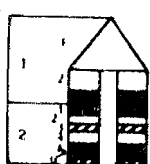
23



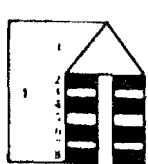
24



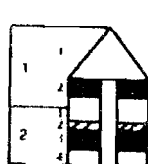
25



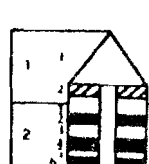
26



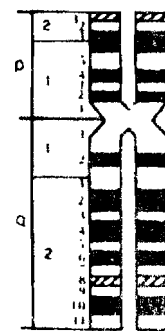
27



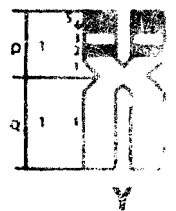
28



29



X



Y

■ Bandes R positives  
□ Bandes R négatives  
d'après

▨ Bandes R variables

Di Bernardino et Iannuzzi, 1982 (34)

# PLANCHE D

## Mécanisme de formation des anomalies chromosomiques

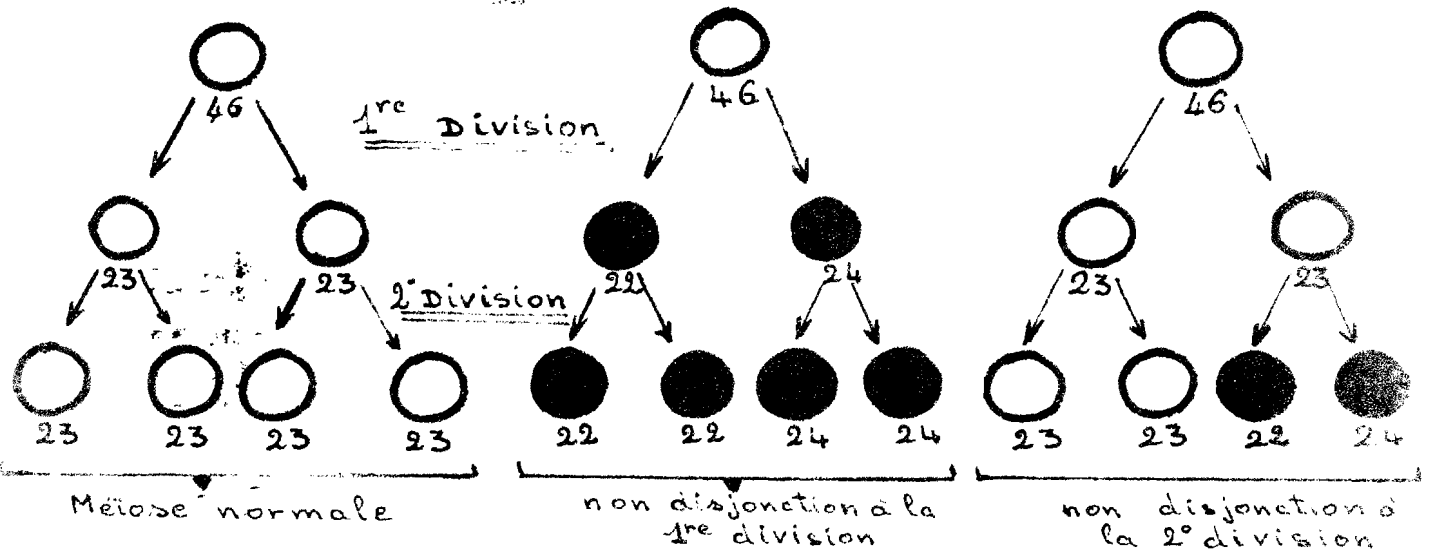


Fig. 1 : Non disjonction chromosomique à la méiose

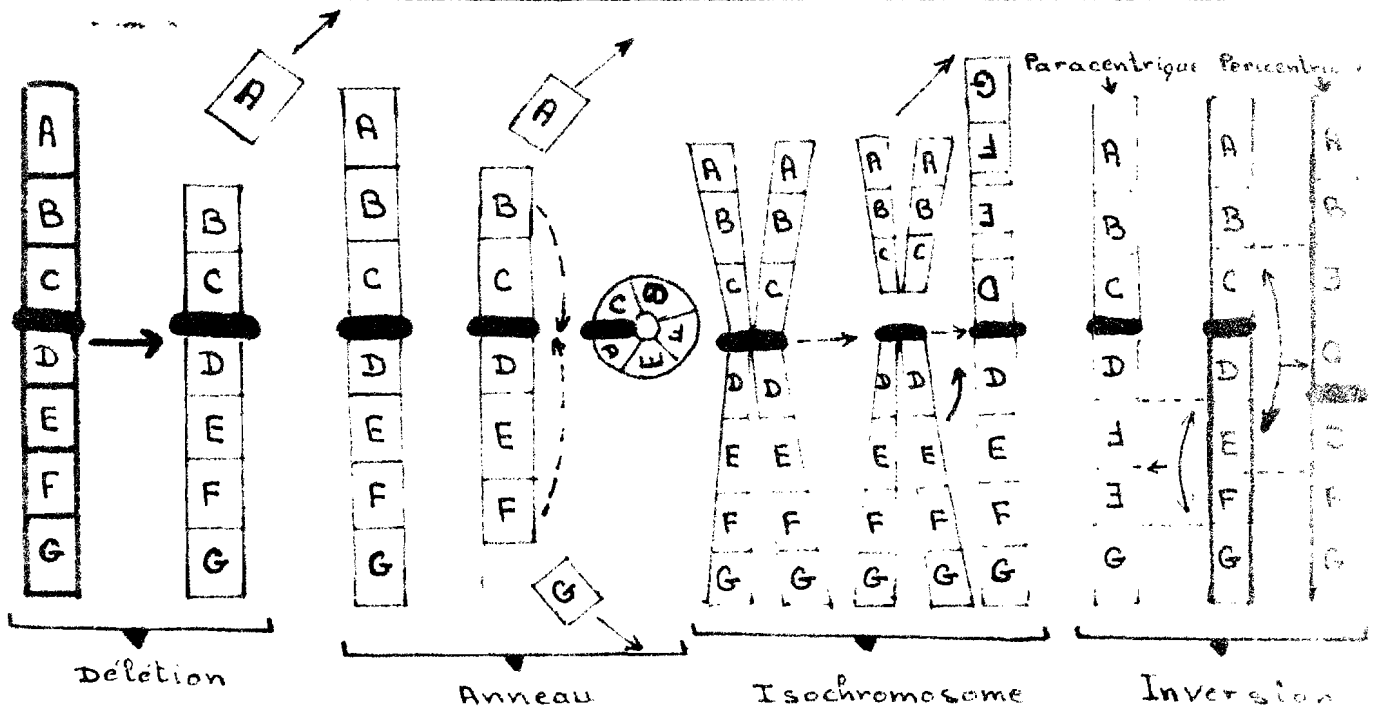


Fig. 2 : Remaniements intra-chromosomiques

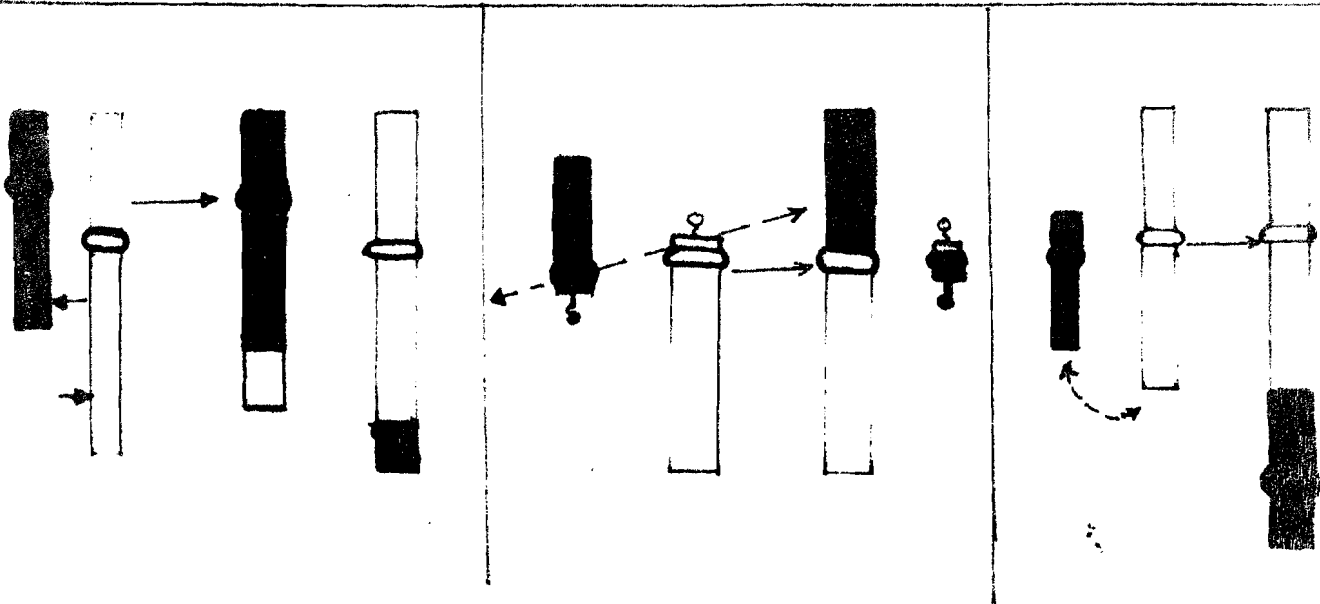


Fig. 3 : Remaniements inter-chromosomiques

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail qui traite des considérations générales sur la cytogénétique médicale humaine et vétérinaire, oeuvre préfigurant un travail collaboratif de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (Département de Zootechnie) et de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de DAKAR (Laboratoire d'Histologie-Embryologie et Cytogénétique) sur l'inventaire cytogénétique des différentes espèces animales domestiques et les marqueurs chromosomiques humains en Afrique de l'Ouest, nous avons relevé les principaux points saillants suivants :

---- Premièrement

La cytogénétique, discipline bio-clinique par excellence, regroupe l'ensemble des méthodes de laboratoire qui ont permis, au cours des années, d'affiner l'étude des chromosomes. Introduite historiquement au sein des techniques médicales pour diagnostiquer les malformations liées à une anomalie de nombre ou de la structure des chromosomes, elle a, quelques années plus tard, ramené à leur cause exacte certains échecs de la reproduction et découvert dans le noyau des cellules du liquide amniotique prélevé par amniocentèse les aberrations chromosomiques foetales, sources de lésions sévères. Elle contribue à une meilleure connaissance de la carte chromosomique humaine et, plus récemment, à une meilleure compréhension des phénomènes de la cancérogénèse. Enfin, en dehors du domaine médical, des paléontologistes utilisent ces techniques pour confirmer ou infirmer leurs théories sur la classification des espèces et leur évolution.

Née avec le siècle, la cytogénétique a connu un développement considérable au cours des trois dernières décennies "1950-1980". En effet à côté des techniques d'analyse chromatinienne, test de BARR, étude de la fluorescence de l'Y) des techniques de marquage de moyenne et à haute

résolution (bandes Q, G, R, C, T etc...) et des techniques dynamiques (BuDr, prométaphase) ont amélioré nos connaissances sur le nombre et surtout la structure des chromosomes et raffiné l'analyse étiopathologique de divers syndromes en rapport avec les aberrations chromosomiques.

----- Deuxièmement

Il faut relever la grande efficacité des tests chromatinien notament le test chromatinien de BARR et l'étude de la fluorescence de l'Y. Ces tests constituent sans aucun doute une méthode de choix parfaitement adaptée aux conditions matérielles précaires de nos pays sous-équipés. Pratiqués et interprétés par des bio-cliniciens expérimentés et avertis de leur limite, ces tests peuvent fournir des renseignements précieux aux pédiatres, aux endocrinologues, aux psychiatres, aux gynécologues, aux urologues et vétérinaires zootechniciens et cliniciens. Si le Drumstick n'est pas toujours significatif et la fluorescence de l'Y très onéreuse, le test chromatinien de BARR est une technique de choix pour le dépistage des anomalies du chromosome X principalement celui du syndrome de TURNER (45 XO) et ces variantes (mosaïques : 46,XXq- ; 46, XXp-) dont le diagnostic précoce dans la prime enfance permet une thérapie assez spectaculaire, bien que ne résolvant pas le problème fondamental de la stérilité primaire, puisque tous les signes psychosomatiques sont atténués si non anihilés. En Afrique, toute promotion de la cytogénétique médicale surtout humaine doit commencer par l'étude chromatinienne, pour, dès que les conditions d'équipements matériel et humain le permettent se poursuivre par l'analyse du noyau mitotique : le caryotype.

---

----- Troisièmement

Les techniques de marquage permettant une meilleure analyse de la structure des chromosomes et des remaniements intra-chromosomiques et inter-chromosomiques ont pour principes généraux :

- La dénaturation thermique ou chimique ménagée des chromosomes, suivie d'une coloration soit au Giemsa, soit avec un fluorochrome (Quinacrine, acridine orange etc...).

- Le raffinement est obtenu par des artifices techniques.

On arrive à étudier des chromosomes à des stades assez précoces : non plus des chromosomes métaphasiques mais des chromosomes prométaphasiques voire prophasiques donc très peu condensés. Ainsi, alors qu'on peut rencontrer sur le lot haploïde environ 320 à 550 bandes au stade de la métaphase précoce, on peut en reconnaître 550 à 850 en période prométaphasique et jusqu'à 1250 en prophase tardive. Ce qui a fait dire au Professeur Jacques Michel ROBERT de LYON que "nous avons vraisemblablement atteint la limite optique d'analyse chromosomique".

----- Quatrièmement

Ces techniques ont permis :

- une connaissance certaine du nombre diploïde de l'homme et de presque toutes les espèces animales domestiques.

- une étude de l'évolution phylogénique des vertébrés (DUTRILLAUX, De GROUCHY etc...)

- la description de presque un millier de syndromes chromosomiques en 1984 contre à peine une dizaine en 1964.



- Une meilleure détermination des domaines biologiques et cliniques d'indication de l'analyse chromosomique.

L'analyse cytogénétique des chromosomes ou caryotypage est un travail "artisanal" demandant du temps et un ravitaillement régulier en milieu de culture et divers produits et réactifs. C'est une activité ardue et onéreuse il ne saurait donc être question de le pratiquer systématiquement, bien qu'un peu moins d'un nouveau-né sur 100 soit porteur d'un remaniement chromosomique équilibré ou déséquilibré et que sur 300 à 500 adultes des deux sexes il y a au moins un qui soit porteur sain d'un remaniement chromosomique (inversion, translocation) qui se traduirait par notamment des échecs de reproduction : enfants malformés et/ou débiles mentaux, avortements spontanés répétés, voire stérilité définitive avec donc des risques importants d'alourdissement du fardeau génétique humain.

Par ailleurs les dégâts que peuvent causer aux élevages, les remaniements chromosomiques tel que la translocation robertsonienne 1/29 chez les bovins ou les translocations réciproques chez les porcins soulignent l'intérêt des techniques cytogénétiques.

Or cette activité est de seconde zone, parent pauvre de la biologie médicale en Afrique noire : pas de personnels pas de moyens matériels. D'où la nécessité de saluer l'initiative des départements, de zootechnie de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires et d'Histologie-Embryologie et Cytogénétique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de DAKAR de mettre en commun leurs moyens matériels et humains pour développer au Sénégal et pour notre sous région actuelle "embryon" de Laboratoire de Cytogénétique de la Faculté de Médecine afin de pouvoir faire face efficacement à une demande abondante et

justifiée venant aussi bien des Médecins de toute spécialité et surtout des pédiatres ; mais également de fournir un instrument de plus pour épauler la pratique et le développement de l'élevage dans la région. C'est alors que le Laboratoire de de l'Université de DAKAR abordera dès 1985 le deuxième volet de ce programme : l'étude cytogénétique des différentes espèces animales domestiques et des marqueurs chromosomiques humains dans l'Ouest-africain.

## B I B L I O G R A P H I E

1. AFOUTOU, J.M., 1977.  
Les examens de Laboratoire en cytogénétique médical et leur intérêt clinique.  
Thèse, Médecine, Dakar.
2. AFOUTOU J.M., 1984.  
Les anomalies chromosomiques au cours de la L.M.C. et du Métinoblastome au Sénégal.  
Exposé des Titres et Travaux pour M.C., Dakar, 1984, 125 p.
3. AFOUTOU J.M., 1984.  
Marqueur chromosomique physiologique chez les Noirs Africains, cas du 99 h (+).  
Exposé des titres et travaux pour M.C., Dakar 1984, p. 122.
4. AFOUTOU J.M., 1984.  
Problèmes posés par la pratique cytogénétique médicale en milieu sous équipé africain.  
Exposé des Titres et Travaux pour MC, Dakar, 1984, pp 118-122.
5. AFOUTOU J.M., ANTHONIOZ Ph., FALL M. et CORREA P., 1984  
Condiérations générales sur la cytogénétique médicale.  
Première partie : les test chromatiniens sexuels. Afr. Méd., n° 218, pp. 195 - 205.
6. AFOUTOU J.M., COUTURIER J., ANTHONIOZ Ph., FAIL M., 1984  
Considérations générales sur la cytogénétique médicale.  
Deuxième partie : les techniques d'étude du noyau mitotique (caryotypage) et leurs indications. Afr. Méd. (sous presse).
7. ANTHONIOZ Ph., AFOUTOU J.M., 1977  
Place des aberrations chromosomiques dans l'étiologie des malformations.  
Bull. Soc. Méd. Afr. Noire Igue Frse., 22, pp. 404-410.

8. ANTHONIOZ Ph., SOW A.M., 1976  
Phénotypes tunériens : mise au point à propos de deux mosaïques XO/XX dont une à la naissance.  
Bull. Soc. Méd. Afr. Noire Lgue Frse., 21, 2, 165 .
9. ARAKAKI D.T. and SPARKES R.S., 1963  
Microtechnique for culturing leucocytes from whole blood.  
Cytogenetics, 2, 55-60.
10. ARRIGHI F.E. and H.S.U. T.C. (1971)  
Localization of heterochromatin in human chromosomes.  
Cytogenetics 10, 81-86.
11. ATKINS L., TISHLER P.V., ROSNER B., MANZUR M.L., 1972.  
Studies in human interphase nuclear.  
Humangenetik, 22, pp. 275-286.
12. BACHELAY P., 1972  
De l'intersexualité chez les mammifères domestiques.  
Thèse vétérinaire, Lyon, 1972, n° 82, pp. 95.
13. BARR M.L., SHAVER E.L., BLUNKETT D.H.  
The chromatine positive klinefelter syndrome among patients in mental deficiency hospital.
14. BELAISCH J., BELAISCH J.C., BENSALD F., MANDELBAUM J., 1975.  
Les maladies héréditaires et leur dépistage.  
Les Monographies CHOAY (II).
15. BERGER R., 1971  
Une nouvelle technique d'analyse du caryotype.  
C.R. Acad. Sci. (PARIS), 273, 2620.
16. BERGER R., 1972.  
Nouvelles techniques d'étude des chromosomes.  
Path. - Biol., 20, n° 7, 8, pp. 413-424.

17. BERTRAND M., 1971.  
Les anomalies chromosomiques en pathologie vétérinaire.  
Revue Méd. Vét., 122, 12, pp. 1227 - 1246.
18. BERTRAND M., 1979.  
Les anomalies chromosomiques chez les mammifères domestiques.  
Note 1 : Anomalies chromosomiques et pathologie extra-génitale.  
Revue Méd. Vét., 130, 3, pp. 155-167.
19. BERTRAND M., 1979.  
Les anomalies chromosomiques chez les mammifères domestiques.  
Note 2 : Anomalies chromosomiques et pathologie génitale.
20. BISHOP M.W.H., 1964.  
Paternal contribution to embryonic death.  
J. Reprod. Fertil., 1964, 7, pp. 383-396.
21. BOBROW M., COLLACOTT R.E.A.L., MADAM K., 1972.  
Chromosome banding with acridine orange.  
Lancet, ii, pp. 1311-1317.
22. BOSMA A.A., 1976.  
Chromosomal polymorphism and G-banding patterns in the wild boar  
(sus scrofa L.) from the Netherlands. *Genetica*, 46, pp. 391-399.
23. BOSMA A.A., COLEMBRANDER B., WENSING C.J.G., 1975.  
Studies on phenotypically female pigs with hernia infuinalis and  
ovarian aplasia. II. cytogenetical aspects.  
*Proc. Kon. Med. Akad. Wet. C* 78, 1, pp. 43-46.
24. BOUE M.A., BOUE J., CEDARD L., HENRION M.R., CHAMBRAUD, CHARTIER,  
COHEN J., SUREAU et CENTENE J., 1973.  
Table ronde sur : "Les avortements d'origine chromosomique".  
Cahier de Médecine, 14, (3) pp. 191-203.
25. BROWN C.M., 1981.  
Une méthode de prélèvement de sang chez le porc par ponction de  
la veine thoracique interne.  
*Point vétér.*, 9, 44, pp. 53-54

26. BROWN S.W., 1966.  
Heterochromatin, Science, pp. 151, 417.
27. BRUERE A.M., CHAPMAN H.M., 1973.  
Autosomal translocations in two exotic breeds of cattle in New Zealand.  
Vét. Rec., 92, pp. 615-620.
28. CARPENTIER S., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J., 1972.  
Effet du milieu ionique sur la dénaturation thermique ménagée des chromosomes humains.  
Ann. Génét., 15, 203 p.
29. CARLOTTI D.M., 1977.  
Le caryotype du cheval et ses anomalies.  
Thèse vétérinaire, Toulouse, 77, 19, 103 p.
30. CARR D.H., 1971.  
Chromosomes studies in selected abortions : Polyploidy in man.  
J. Med. Genet., 8, pp. 164-174.
31. CARPERSON T., ZECHL., MODEST E.J., FOLEY G.E., WAGH W. and SIMONSSON E., 1969  
Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in occia faba metaphase chromosomes.  
Exp. Cell. Res., 58, pp. 128-140.
32. CASPERSON T., ZECH L., MODEST E.J., FOLEY G.F., WAGH U., SOMONSSON E., 1969  
DNA banding fluorochromes for the study of the organisation of the metaphase.  
Exp. Cell. Res., 58, pp. 141-152.
33. CASPERSON T., ZECH L., JOHANSSON C., 1970.  
Analysis of the human metaphase chromosome set by aid of DNA banding fluorescent agents.  
Exp. Cell. Res., 62, pp. 490-492.
34. CASPERSON J., ZECH L., JOHANSSON C., MODEST E.J., 1970  
Identification of human chromosomes by DNA reacting fluorescing agents.  
Chromosoma (Berl), 30, pp. 215-219.
-

35. CHRISTENSEN K., SMEDEGARD K., 1978.  
Chromosome marker in domestic pigs. C-band polymorphism.  
Hereditas, 88, pp. 269-272.
36. CHRISTENSEN K., SMEDEGARD K., 1979.  
Chromosome marker in domestic pigs. A new c-band polymorphism.  
Hereditas, 90, pp. 303-304.
37. COSSEC G., 1973.  
Les anomalies chromosomiques chez les bovins et leurs effets sur  
la fertilité des filles des taureaux ; Mémoire de fin d'études.  
Section agriculture - élevage, I.M.A. Paris - Grignon.
38. COUTURIER J.  
Etude d'une technique de marquage des chromosomes humains par  
action d'enzyme protéolytiques.  
Thèse, Méd, Paris, 1972.
39. COUTURIER J., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J.  
Etude des fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes T  
des chromosomes humains.
40. CRIBU E.P., POPESCU C.P., 1974.  
L'idiogramme de Bos taurus.  
Ann. Génét. Sel anim. 6, 291 p.
41. CRIBU E.P., POPESCU C.P., 1975.  
Variation inter- raciale de la taille du chromosome Y chez Bos  
taurus L.  
Ann. Génét. Sel. anim. 7, 139-144.
42. CRIBU E.P., POPESCU C.P., 1980.  
The 1/29 Robertsonian translocation in a bovine cell line.  
4 th Eur. Colloq. Cytogénét. Domest. Anim., PP. 152-156.
43. CRIBU E.P., POPESCU, C.P., 1980.  
La cytogénétique au service de l'élevage. Fertilité du boeuf  
domestique : effet de la fusion centrique 1/29.  
Rec. Méd. Vét., 156, 4, pp. 319-322.

44. DALLIAPICCOLA B., 1971.  
Identification of the human sex chromosome complement in polymorphonuclear leucocytes : A new technique.  
The Jour. Labor. and clinic. Méd. (St-Louis), 78, 1, 88-93.
45. DARRE ET COLL., 1974.  
Variation de la longueur relative du chromosome Y chez les Bovins.  
1er Congrès Mondial de génétique Madrid.
46. DARRE R., QUEINNEC G., BERLAND H.M., RUCKEBUSCH Y., FARGEAS J., 1970.  
Sur un cas de nanisme dans l'espèce bovine.  
Revue Méd. Vét., 121, 12, 1115- 1125.
47. DARRE R., QUEINNEC G., BERLAND H.M., 1972.  
Diagnostic précoce du Free-martinisme et chimérisme leucocytaire des veaux jumeaux hétérosexués.  
Revue Méd. Vét., 123, 1, 17-33.
48. DARRE R., QUEINNEC G., BERLAND H.M., 1972.  
La translocation 1-29 des Bovins.  
Revue Méd. Vét., 123, 4, 477-493.
49. DAVIDSON W.M. and SMITH D.R., 1963.  
The nuclear sex in leucocytes in "Intersexuality" (C.OVERZIER, ed.)  
Academic Press., New York, pp. 72-85.
50. DE SCHEPPER G.G., 1982.  
Double reciprocal **trans**location heterozygosity in Bull. Vet. Rec.,  
110, 197-199.
51. DE GIOVANNI A.M., SUCCI G., MOLTENI L., GAOTIGLIONI M., 1979.  
A new autosomal **trans**location in "Alpin grey, cattle".  
Ann. Génét. Sél. Anim., 11, 115-120.
52. DENUER (Classification de) 1960.  
Proposition d'un système standard de nomenclature des chromosomes mitotiques humains.  
Ann. Genet., 1, 35-40.



53. DI BERARDINO D., IANNUZZI L., 1982.  
Detailed description of R-banded bovine chromosomes.  
*J. Hered.*, 73, 434-438.
54. DI BERARDINO, IANNUZZI L., FERRARA L., MATASINO D., 1979.  
A new case of Robertsonian translocation in cattle.  
*J. Hered.*, 70, 436-438.
55. DUTRILLAUX B., 1972.  
Les aberrations chromosomiques transmissibles.  
*J. Parisiennes de Pédiatrie*, Paris, Ed. Flammarion, pp 5-12.
56. DUTRILLAUX B., 1973.  
Sur deux méthodes de marquage des chromosomes humains - mise en évidence des bandes R et des bandes T.  
*Rev. Méd. Chir.*, 77, 329 - 332.
57. DUTRILLAUX B., 1973.  
Nouveaux systèmes de marquage chromosomique : les bandes T.  
*Chromosoma (Berl)*, 4, 395-398.
58. DUTRILLAUX B., 1974.  
New techniques in the study of human chromosomes.  
*Birth Defect. Proc.*, 4<sup>e</sup> Int. Conf. Ed. Excerpta Medica, pp. 59-70.
59. DUTRILLAUX B. 1976  
Sur la nature de l'origine des chromosomes humains.  
Monographie des Annales de Génétique. Exp. Sci., Paris, 1976.
60. DUTRILLAUX B., COUTURIER J., 1981.  
La pratique de l'analyse chromosomique.  
Collection "Techniques de laboratoire". Paris, Masson et Cie, pp. 86.
61. DUTRILLAUX B., FINAZ C., GROUCHY J. de, LEJEUNE J., 1972.  
Comparison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence, and protéolytic digestion.  
*Cytogenetics*, 11, 113-117.
62. DUTRILLAUX B. and LEJEUNE J. 1971.  
Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain.  
*C.R. Acad. Sci. Paris*, 272, 2638-2640.

63. EDWARDS J.H., 1962.  
Chromosome analysis from capillary blood.  
Cytogenetics, 1, 90-96.
64. ELDRIDGE F.E., 1975.  
High frequency of a robertsonian translocation in a herd of  
British - white cattle ;  
Vet. Rec., 96, 71-72.
65. ELLSWORTH S.M., PAUL S.R., BUNCH T.D., 1979.  
A 14/18 dicentric Robertsonian translocation in a Holstein cow.  
Theriogenology, 11, 165-171.
66. FECHHEIMER M.S., 1973.  
A cytogenetic survey of young bulls in the USA.  
Vet. Rec., 93, 20, 535-536.
67. FECHHEIMER N.S., 1979.  
Cytogenetics in Animal production.  
J. of Dairy Science, 62, 844-853.
68. FECHHEIMER M.S., 1981.  
Cytogenetics in pig production.  
Pig News and Information, 2, 387-391.
69. FERGUSON - SMITH M.A., 1965.  
Phenotypic aspects of sex chromosome aberration.  
BIR th. Defects, Or. Art. Ser, 5, 5, 3-9.
70. FINAZ C., GROUCHY J. de 1971.  
Le caryotype humain après traitement par l'alpha chymotrypsine.  
Ann. Genet., 14, 309-311.
71. FORD C.E. and HAMERTON J.L., 1956.  
The chromosomes of man.  
Nature (London), 178, 102-1023.
-

72. FORD C.E., POLLOCK D.L., GUSTAVSSON I., 1980  
Proceedings of the first International conference for the standardisation of Banded karyotypes of Domestic Animals. University of Reading. Reading, England 2nd - 6 th August 1976.  
*Hereditas*, 92, 145-162.
73. FORSTER M., 1982.  
Centrometric heterochromatin exchange by an autosomal reciprocal 1/16 translocation in the pig (*sus scrofa domestica*).  
*Ann. Génét. Sél. Anim.*, 14, 3, 279-285.
74. FRANCK M., ROBERT J.M., 1981.  
La pathologie chromosomique. Etude chez *Bos Taurus*.  
*Rev. Méd. Vét.*, 132, 6, 405-411.
75. GAVAUDAN P., GAVAUDAN N. and PONVIASKINSKY KOBOZIEFF N., 1937.  
Sur l'influence de la colchicine sur la caryocinèse dans les cellules radiculaires de l'allium.  
*C.R. Soc. Biol.*, 125, 705-707.
76. GLJHOVSCHI N. et coll., 1970.  
Détermination intra-utérine du sexe chez les bovins par l'utilisation du test cytogénétique chromatinien.  
*Rec. Méd. Vét.*, , 1055-1062.
77. GROUSCHY J., 1967.  
Aberrations chromosomiques et psychiatrie infantile.  
*REV. Neuro. Psych. Inf.*, 15, 263-273.
78. GROUCHY J. (de), ROUBIN M., PASSAGE E., 1964.  
Microtechnique pour l'étude des chromosomes humains à partir d'une culture de leucocytes sanguins.  
*Ann. Génét.*, 7, 45.
79. GROUCHY J., TURLEAU C., 1977.  
*Atlas des maladies chromosomiques*, 1 vol. Paris, Exp. Scient. Frse. Edit., pp. 355.
80. GUIRAUD S. et GERMAN D., 1973.  
Intérêt de l'étude de la fluorescence du chromosome Y dans le noyau interphasique.  
*Lyon Méd.*, 229, 141-149.

81. GUSTAVSSON I., 1969.  
Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation  
in swedish cattle.  
Hereditas, 63, (1-2), 68-169.
82. GUSTAVSSON I., 1974.  
Chromosomal polymorphism.  
1er Congrès Mondial de génétique. Madrid.
83. GUSTAVSSON I., 1977.  
Cytogenetic analysis of cattle chromosomes ; current utilization  
and speculation of future applications.  
Ann. Génét. Sél. anim., 9 (4), 459-462.
84. GUSTAVSSON I., 1979.  
Distribution and effects of the 1/29 robertsonian translocation in  
cattle.  
J. Dairy Sc. 62, 825-835.
85. GUSTAVSSON I., 1980.  
Banding techniques in chromosome analysis of domestic animals.  
Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 24, 245-290.
86. GUSTAVSSON I., 1980.  
Chromosome aberrations and their influence on the reproductive per-  
formance of domestic animals.  
A review. Z. Tierz. Züchtgobiol, 97, 176-195.
87. GUSTAVSSON I., 1983.  
The THA technique as applied to porcine chromosomes.  
Hereditas, 99, 311-313.
88. GUSTAVSSON I., ROCKBORN G., 1969.  
Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in  
Cattle. Nature, 203, 990.
89. GUSTAVSSON I., SEITTEGREN I. and KING W.A., 1983.  
Occurence of two different reciprocal translocations in the some  
litter of domestic pigs.  
Hereditas, 99, 257-267.
-

90. HAAG J., NIZZA P., 1969.  
Le caryotype du porc normal.  
Ann. Génét., 12, 4, 242-246.
  91. HABERT M., 1971.  
Les anomalies génétiques de l'espèce porcine.  
Thèse vétérinaire, Toulouse, 1971, n° 52, p. 11-52.
  92. HALMAN C.R.E., 1972.  
Autosomal deletion and infertility in cattle;  
Vét. Rec., 91, 572.
  93. HALMAN C.R.E., 1976.  
Chromosome banding a modified method for assistent G-banding in  
cattle, horses and buffaloes.  
Vet. Rec., 98, 358.
  94. HALMAN C.R.E., 1977.  
An improved technique for the preparation of chromosomes from  
cattle whole blood.  
Res. Vet. Sci. 22, 40-43.
  95. HALMAN C.R.E., FRANCIS J., 1976.  
Bos taurus y chromosome of Africander cattle and the developpement  
of improved breeds from the tropics.  
Vet. Rec., 98, 88-90.
  96. HALMAN C.R.E., WATSON J.I., 1982.  
Y chromosome variants in cattle Bos taurus and Bos indicus.  
Ann. Génét. Sel. Anim., 14, 1, 1-16.
  97. HALMAN C.R.E., WATSON J.I., MAC KEE I.J., 1981.  
G - band patterns of the karyotype of bos indicus.  
Vét. Rec., 109, 34-37.
  98. HANADA H., 1981,  
Robertsonian translocation.  
Ann. Gen. Sel. Anim., 13, 205-211.
  99. HANCOCK J.L., DAKER M.G., 1981.  
Testicular hypoplasia in a boar with abnormal sex chromosome  
constitution (39 XXY). J. Reprod. Fert., 61, 395-397.
-

100. HANSEN MELANDER E., MELANDER Y., 1974.  
The karyotype of the pig.  
Hereditas, 77, 149-157.
101. HANSEN K.M., 1980.  
The relative length of pid chromosomes, and a suggestion for a  
karyotype system.  
Ann. Génét. Sel. Anim., 12, 313-320.
102. HARVEY M.J.A., 1971.  
An autosomal translocation in the Charolais breed of cattle.  
Vet. Rec., 89, 110-111.
103. HARVEY J.A., 1974.  
Chromosome analysis of cattle populations.  
Vet. Rec. 94, 227.
104. HARVEY M.J.A., 1976.  
Veterinary cytogenetics.  
Vet. Rec., 98, 24, 479-481.
105. HENRICSON B., BACKSTROM L., 1964.  
Translocation heterozygosity in a boar.  
Hereditas, 52, 166-170.
106. HSU L.Y.F. n KLINGER M.P., WEISS J., 1967.  
Influence of nuclear selection criteria on sex chromatin frequency  
in oral mucosa cells of new born females.  
Cytogenetics, 6, 371-382.
107. HULOT F., 1969.  
Les chromosomes des suiformes.  
Ann. Génét. Sél. Anim., 1, 315-336.
108. HUNGERFORD D.A. and NOWELL P.C.  
Chromosome studies in human leukemia. II : Acute granulocyte leukemia  
J. Nat. Cancer Inst., 1962, 29, 545-565.
109. HSU T.C.  
Mammalian chromosome in vitro : the karyotype of man.  
H. Heret., 1952, 43, 167-169.

110. ISCN  
An International System for chromosome Nomenclature. Birth Defects :  
Original. Article series. The National Foundation.  
March of Dimes. Vol. XIV, n° 8, 1978.
111. KEITH L., MOORE et Coll., 1966  
The sex chromatin.  
Philadelphia, W.B. Saunders, company, pp 475.
112. KING W.A., LINARES T., GUSTAVSSON I., BANE A., 1980.  
Presumptive translocation type trisomy in embryos sired by bulls  
heterozygous for the 1/29 translocation.  
Hereditas, 92, 167-169.
113. KING W.A., LINARES T., GUSTAVSSON I., 1981.  
Cytogenetics of preimplantation embryos sired by bulls heterozygous  
for the 1/29 translocation.  
Hereditas, 94, 219-224.
114. LAFOURCADE J., 1966.  
Les conséquences mentales des aberrations chromosomiques constitu-  
tionnelles.  
Rev. Prat., 19, 2283-2293.
115. LAURENT C., BINDER P., 1972.  
Méthodes nouvelles en cytogénétique.  
Rev. Inst. Pasteur Lyon, 5, 2, 233-242.
116. LEGAULT C., POPESCU C.P., 1981.  
Mise en évidence et conséquences zootechniques d'une translocation  
réciproque chez le porc.  
Journées Rech. Porcine en France, 239-246.
117. LEJEUNE J., 1966.  
Le mongolisme : Trisomie dégressive.  
Thèse, Sciences, Paris, 1960.

118. LEJEUNE J., 1968.  
Adam et Eve ou le monogenisme.  
Nouv. Rev. Theol., 90, 191.
119. LEJEUNE J., DUTRILLAUX B., GROUCHY J. (de), 1970.  
Reciprocal translocations in human population. A preliminary analysis.  
In population cytogenetic. Edinburg University Press, pp. 81.
120. LEJEUNE J., DUTRILLAUX B., REIHORE M.O., PRIEUR M.; 1973.  
Comparaison de la structure fine des chromatides d'homosapiens et  
de pantroglodytes.  
Chromosoma (Berl.), 43, 423.
121. LEJEUNE J., GAUTHIER M. and TURPIN R., 1959  
Chromosomes humains en culture de tissus.  
C.R. Acad. Sci., Paris, 15, 201.
122. LE NOIR F., LIGHTENBERGER M.J., 1978.  
The Y chromosome of the Basolo hybrid beefalo is a Y of *Bos taurus*.  
Vét. Rec.
123. LIN C.C., BIEDERMAN B.M., JAMRO H.K., HAWTHORNE A.B., CHURCH R.B., 1980.  
Porcine (*sus scrofa domestica*) chromosome identification and sug-  
gested nomenclature.  
Can. J. Genet. Cytol., 22, 103-116.
124. LUCIANI J.M., COPODANO-VAGNER A.M., DEVICTOR-VUILLET, 1974.  
Les techniques d'analyse de la méiose chez l'homme.  
Ann. Biol. Clin., 32, 83-95.
125. LYON M.F., 1972.  
X Chromosome inactivation and developmental patterns in mammals.  
Biological Reviews of the cambridge Philosophical society, 47,  
1 and 20.
126. MASUDA H. et coll., 1980.  
Robertsonian translocation in Japanese black cattle.  
Jap. J. Zootech. Sci., 51, 26-32.



127. Mc FEE A.F., BANNER M.W., 1969.  
Inheritance of chromosome number in pigs.  
J. Reprod. Fert., 18, 9 - 14.
128. Mc FEE A.F., BANNER M.W., RARY J.M., 1966.  
Variation in chromosome number among european wild pigs.  
Cytogenetics, 5, 75-81.
129. Mc FEELY R.A., 1967.  
Chromosome abnormalities in early embryo of the pig.  
J. Reprod. Fert., 13, 579-581.
130. Mc FEELY (R.A.) et RAJAKOSKI (.), 1968.  
Chromosome studies on early embryos of the cow.  
Proc. 6 th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I., Paris, vol 11, 905-907.
131. MELANDER Y., HANSEN-MELANDER E., 1980.  
Chromosome studies in African wild pigs (Suidae, Mammalia).  
Hereditas, 92, 283-289.
132. MICHAILLARD P., 1972.  
Contribution à l'étude de la cytogénétique du chien et du chat.  
Thèse vétérinaire, Lyon, 1972, n° 19.
133. MOORHEAD P.S., 1964.  
The blood technique and human chromosomes. Symp. Mammalian Tissue  
culture cytol. Sao Paulo. Pergamon, Oxford.
134. NOWELL P.C. and HUNGERFORD O.A., 1960.  
A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.  
Science, 132, 1497-1499.
135. NOWELL P.C., 1960  
Differentiation of human leukemic leukocytes in tissue culture.  
Exp. Cell. Res., 19, 267-277.
136. OLLIVER L., SELLIER P., 1982.  
Pig genetics : a review. Ann. Génét. Sél. Anim., 14, 4, 481-544.

137. PARDUE M.L. and GALL J.G., 1970.  
Chromosomal localization of mouse satellite D.N.A.  
Science, 168, 1356-1358.
138. PARIS CONFERENCE (1971).  
Standardization in human cytogenetics. Birth Defects : Original  
Art. Ser. VIII - 7  
The Nat. Foundation. March of Dimes ; New York.
139. PASCAL P., 1983.  
Contribution à l'étude de la mortalité embryonnaire dans l'espèce  
bovine.  
Thèse vétérinaire, Toulouse, 1983, n° 66 pp 76.
140. PEARSON P.L., 1970.  
A fluorescent technique for identifying human chromatin in a  
variety of tissues.  
Bull. European Soc. Hum. Genet., 4? 35-42.
141. PEARSON D.L., BOKROW M., VOSA G.G., 1970.  
Technique for identifying y chromosome in human interphase nuclei.  
Nature (London), 1970, 226, 78-82.
142. PEARSON P.L., BOBROW M., VOSA G.G. and BARLOW P. W., 1971  
Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes.  
Nature (London), 231, 326-329.
143. POLLOCK D.L., 1972.  
A chromosome abnormality in Friesian cattle in Great Britain.  
Vet. Rec., 90, 309-310.
144. POPESCU C.P., 1973.  
L'hétérochromatine constitutive dans le caryotype bovin normal  
et anormal.  
Ann. Génét., 16, 3, 183-188.
145. POPESCU C.P., 1973.  
Nouvelles observations sur une fusion centrique chez *Bos taurus* L.  
Ann. Génét. Sél. anim., 5, 4, 435-440.
-

146. POPESCU C.P., 1977.  
Les anomalies chromosomiques des Bovins (*Bos taurus* L.). Etat actuel des connaissances.  
Ann. Génét. Sél. Anim., 9, 4, 463-470.
147. POPESCU C.P., 1980.  
Cytogenetics study on embryos sired by a bull carrier of 1/29 translocation. E th Eur. Collq. Cytogénét. Domest. Anim. 1980, 182-186.
148. POPESCU C.P., 1982  
Reciprocal translocations in pigs and their effects on performance. Pig news and Information, 3, 255-257.
149. POPESCU C.P., 1982.  
Cytogenetics in domestic animal production. 2 nd World congress on genetic applied to tivistock production, Madrid 4 th - 8th october 1982 pp. 10.
150. POPESCU C.P., BOSCHER J., 1974.  
Etude du caryotype Bovin par une nouvelle méthode cytogénétique .  
les bandes C.  
1er Congr. Mond. Génét. Appl. L'élev. Madrid.  
Madrid 7-11 Octobre 1974, 3, 159-164.
151. POPESCU C.P., BOSCHER J., 1982.  
Cytogénetics of preimplantation embryos produced by pigs heterozygous for the reciprocal translocation (4q+ ; 14 q-).  
Cytogenet. Cell. Genet., 34, 119-123.
152. POPESCU C.P., BOSCHER J., TIXIER M., 1983.  
Une nouvelle translocation réciproque t, rcp (7q- ; 15 q+) chez un verrat "hypoprolifique".  
Génét. Sél. Evol., 15, 4, 479-488.
153. POPESCU C.P., CRIBU E.P., POIREY J.P., SEITZ, J.L., 1979.  
Etude cytogénétique d'une population bovine de Côte d'Ivoire  
Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop., 32, 1, 81-84.

154. POPESCU C.P., LAUVERGNE J.J., MALYNICZ G.L., 1982.  
Le caryotype du porc villageois de Papouasie Nouvelle Guinée.  
Ann. Génét. Sel., Anim. 14, 2, 237-240.
155. POPESCU C.P., LEGAULT C., 1979.  
Une nouvelle translocation réciproque  $t(4q+, 14q-)$  chez le porc domestique (Sus scrofa domestica)  
Ann. Génét. Sel. Anim., 11, 361-369.
156. POPESCU C.P., QUERE J.P., FRANCESCHI F., 1980.  
Observations chromosomiques chez le sanglier français (sus scrofa scrofa). Ann. Génét. Sél. Anim., 12, 395-400.
157. POTIER W.L., UPTON P.C., 1979  
Y chromosome morphology of cattle.  
Aust. Vet. J., 55, 539-541.
158. POTIER W.L., UPTON P.C., BLACKSHAW A.W., 1979.  
Presumptive 1/29 autosomal translocation in Australian cattle.  
Aust. Vet. J., 55, 209-213.
159. PRIEUR M., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J., 1973.  
Planches descriptives des chromosomes humains. Analyse en bandes R et nomenclature selon la conférence de Paris 1971).  
Ann. Génét., 16, 1, 39-46.
160. ROBERT J.M., 1983.  
Génétique. Flammarion Médecine et Sciences, 1983, Paris PP
161. ROLDAN E.R.S., MERANI M.S., VON LAWZEWITSCH I., 1984.  
Two abnormal chromosomes found in one cell line of a mosaic cow with low fertility. Ann. Génét. Sel.
162. SEABRIGHT M., 1971.  
A rapid banding technique for human chromosomes.  
The Lancet, 11, 971-972.

163. SCHNEDL W., 1972.  
Gienvoa banding, quinacrine fluorescence and DNA, replication in chromosome of cattle (*Bos taurus*).  
*Chromosoma*, 38, 319-328.
164. SMITH D.W., MARDEN P.M., MC DONALD M.J., SPECKHARD M., 1967.  
LOWER incidence of sex chromatin in buccal smears of newborn females.  
*Pediatrics*, 30, 707-711.
165. SMITH M.W., 1974.  
Types reconnaissables des malformations humaines.  
Paris, Masson et Cie, pp 388.
166. SUMMER A.T., EVANS H.J. and BUCKLAND R.A., 1971.  
New technique for distinguishing between human chromosomes.  
*Nature* (London) *New Biol.*, 232, 31-32.
167. SWITONSKI, M., FRIES R., STRANZINGER  
C-band variants of telocentric chromosomes in swine : evidence and inheritance studies.  
*Géné Sél. Evol.*, 15, 4, 469-477.
168. TJIO J.H. and LEVAN A., 1956.  
The chromosome number man.  
*Hereditas*, 42, 1 -6
169. TURPIN R., LEJEUNE J. (1965).  
Les chromosomes humains.  
Paris, Gauthier-Villars, 1965, 535 pp.
170. VOGT D.W., ARAKAKI D.S., BROOKS C.C., 1974.  
Reduced litter size associated with aneuploid cell lines in a pair of full-brother Duroc boars. *Am. J. vet. res.* 35, 1127-1130.
171. YUNIS J.J., 1974.  
Human chromosome methodology.  
New York Acad. Press, pp. 337.

VU

LE CANDIDAT

LE DIRECTEUR  
de l'Ecole Inter-Etats  
des Sciences et Médecine  
Vétérinaires

LE PROFESSEUR RESPONSABLE  
de l'Ecole Inter-Etats des  
Sciences et Médecine  
Vétérinaires.

VU :

LE DOYEN  
de la Faculté de Médecine  
et de Pharmacie.

LE PRESIDENT DU JURY

VU et permis d'imprimer.....  
DAKAR, le.....

LE RECTEUR, PRESIDENT DU CONSEIL PROVISOIRE DE L'UNIVERSITE  
DE DAKAR.

SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR.

-----

"Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'Enseignement Vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

- D'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire.
- D'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code déontologique de mon pays.
- De prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire.
- De ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.

QUE TOUTE CONFIANCE ME SOIT RETIREE

S'IL ADVIENNE QUE JE ME PARJURE".