

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

**Licence en Sciences & Techniques :
Biologie & Santé**

Le caryotype Sanguin Technique et
application en pathologie humaine dans le
diagnostic du syndrome de Turner

présenté le : 13/06/2011

par : Imad Aharchaou

Encadré par :

FSTF : Pr. Nawel Benbrahim

Etablissement d'accueil : Dr. Laila Rifai

Soutenu le : 15/06/2011

Devant le jury composé de :

- **Pr. Nawel Benbrahim** : Présidente
- **Dr. Laila Rifai** : Encadrante
- **Pr. Mohammed Houssaini Iraqui** : Examineur

Année Universitaire : 2010-2011

Sommaire

Introduction

I. Généralités sur la cytogénétique

1. Définition

.....
1

2. Historique.....1

.....1

3. Le caryotype

humain.....1

3.1.

Chromosomes.....

.....2

3.1.1. Définition des

chromosomes.....2

3.1.2. Structure du chromosome

métaphasique.....2

3.2. Classement /

Banding.....2

3.2.1. Classification des

chromosomes.....3

3.2.2. Types de

bandes.....

..4

3.3. Types des

prélèvements.....

4

4. Les anomalies chromosomiques

4.1. Généralités sur les anomalies

chromosomiques5

4.2. Anomalies de

nombre.....6

4.2.1. Définition et mécanismes de formation

4.2.2. Conséquences

4.3. Anomalies de

structure.....7

4.3.1. Remaniements intra-chromosomique	8
4.3.1.1. Délétions (del).....	8
4.3.1.2. Microdélétions.....	8
4.3.1.3. Chromosomes en anneaux (r).....	8
4.3.1.4. Duplications (dup).....	9
4.3.1.5. Inversions (inv).....	9
4.3.1.6. Isochromosomes(i).....	10
4.3.2. Remaniements inter-chromosomiques.....	11
4.3.2.1. Translocations(t)	
4.4. Les sites fragiles.....	11
5. Les indications habituelles du caryotype.....	11
5.1. Indications du caryotype constitutionnel post-natal.....	12
6. Rappel sur le syndrome de Turner	
6.1. Définition et informations générales.....	13
6.2. Aspects cliniques.....	13
6.3. Aspects cytogénétiques.....	14
II. Matériel et méthodes	
Réalisation du caryotype sanguin	

1. Mode	
opérateur.....	
.....	15
1-1. Prélèvement du	
sang.....	15
1-2. La culture cellulaire et la stimulation des	
mitoses.....	15
1-3. L'incubation.....	
.....	16
1-4. Blocage des cellules en	
métaphase.....	16
1-5. Le choc	
hypotonique.....	
....	16
1-6. La	
fixation.....	
.....	17
1-7. L'étalement.....	
.....	17
1-8. La fixation de	
berger.....	17
1-9. La dénaturation : les bandes	
R.....	17
1-10. La coloration au	
Giemsa.....	17
1-11. L'observation au	
microscope	17
Etude statistique du syndrome de Turner	
III. Résultats et	
discussion :.....	21
1. Caryotype sanguin	
réalisé.....	21
2. Caryotypes portants sur le syndrome de	
Turner.....	21
Conclusion	
.....	32

Introduction :

La cytogénétique est la science qui permet l'étude du génome humain sans la nécessité d'extraire l'ADN. Cette étude se fait par la réalisation du caryotype.

Le caryotype est devenu une technique d'analyse de routine qui permet le diagnostic des différentes anomalies chromosomiques et en particulier le syndrome de Turner.

Le caryotype normal comporte chez l'être humain 46 chromosomes répartis en 23 paires.

Toute modification du nombre de chromosomes représente une anomalie chromosomique. Il en est ainsi pour la modification de la structure d'un ou plusieurs chromosomes.

Le syndrome de Turner est dû à une anomalie du nombre ou de la structure des chromosomes sexuels. Un cas sur 2500 nouveau-nés en est atteints, il se manifeste principalement par un retard staturo-pondéral.

Le diagnostic du syndrome de Turner est strictement chromosomique, basé sur la réalisation d'un caryotype sanguin et permet d'orienter la prise en charge.

Notre étude comporte deux objectifs, soit :

- La réalisation d'un caryotype sanguin en utilisant les techniques de la cytogénétique.
- L'exploitation des données du laboratoire de cytogénétique à l'IPM concernant le syndrome de Turner.

Ce travail a été effectué au laboratoire de cytogénétique à l'institut Pasteur de Casablanca pendant une durée de 2 mois (Avril – Mai) 2011.

I. Généralités sur la cytogénétique :

1) Définition :

La cytogénétique est une discipline médicale qui concerne l'étude des chromosomes ainsi que leurs anomalies.

Ainsi, les anomalies peuvent être la cause de :

- ✓ Malformations congénitales
- ✓ Retard mental
- ✓ Troubles de la reproduction
- ✓ Cancers [1]

2) Historique :

1882: W Flemming visualise la mitose

1905: JS Farmer et JES Moore introduisent la notion de méiose

1923: Painter: 48 chromosomes chez l'homme

1956 : Réalisation du premier caryotype humain par TIJO et LEVAN

1956: JH Tijo corrige le nombre à 46

1959: Découverte de la trisomie 21

1969: Première technique de banding

1977: début de la FISH(Fluorescent in Situ Hybridization)

1996: début de la CGH(Hybridation Génomique Comparative)

2004: début de la CGH-array [2].

3) LE CARYOTYPE HUMAIN :

Parmi les analyses génétiques, le caryotype permet un examen global du génome ainsi que la détection de la majorité des anomalies dont la taille est supérieure à 5 Mb [3].

Le caryotype permet aussi l'identification et le classement des chromosomes d'un individu, et donc la configuration chromosomique d'un sujet [4].

Son étude permet de diagnostiquer les anomalies ou aberrations chromosomiques [5].

3.1. LES CHROMOSOMES :

3.1.1. Définition des chromosomes :

Les chromosomes sont constitués d'une molécule d'ADN et de nombreuses protéines. Ils servent de support à l'information génétique.

Le nombre de chromosomes par cellule est une caractéristique de l'espèce.

Dans l'espèce humaine le nombre des chromosomes par cellule est de 46 (22 paires de chromosomes autosomiques et une paire de chromosomes sexuels). Pendant la métaphase, les chromosomes apparaissent constitués de 2 bras, séparés par une zone étranglée appelée **centromère** [6].

3.1.2. Structure du chromosome métaphasique :

En métaphase, le chromosome est constitué de deux chromatides sœurs réunies par un centromère, dont la position définit le bras court ou « p » et le bras long ou « q », l'indice centromérique, $p/(p+q)$ permet de distinguer les chromosomes méta et submetacentriques des chromosomes acrocentriques caractérisés par un centromère distal. Les télomères sont les extrémités distales des chromosomes (figure 1 et 2) [7]

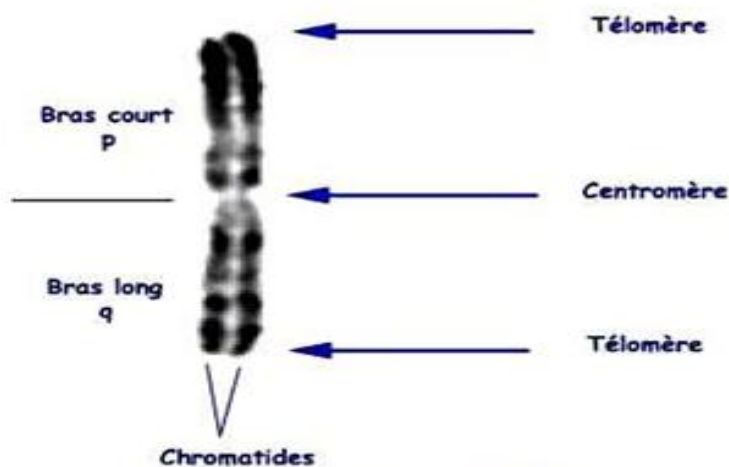


Figure1 : Structure d'un chromosome métaphasique

3.2. Classement / Banding :

3.2.1. Classification des chromosomes :

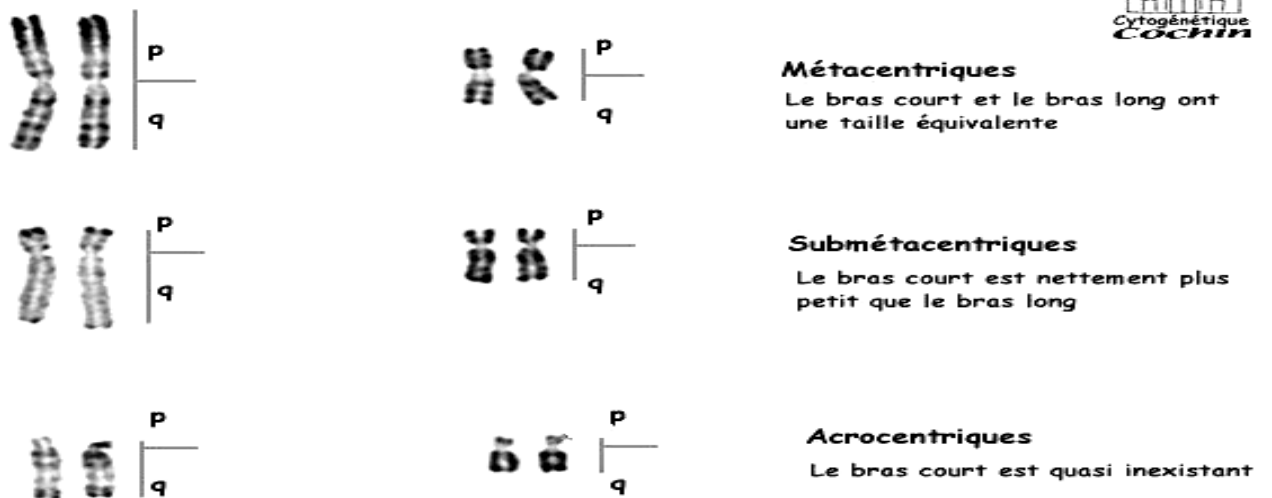


Figure2 : Classification des chromosomes selon l'indice centromérique.

Plusieurs critères permettent de reconnaître et de classer les chromosomes :

- ❖ **Taille** : les chromosomes sont classés du plus grand au plus petit
- ❖ **Index centromérique** : rapport entre la taille du bras court et la taille totale du chromosome
- ❖ **Banding** : Les techniques de bandes permettent de faire apparaître des séries de bandes spécifiques sur chaque chromosome [8].



Figure3 : classification des chromosomes selon les bandes présentes sur chaque chromosome [9].

3.2.2. Types de bandes

En général il existe 4 types de bandes ou techniques de marquage :

- **Bandes G** : coloration au Giemsa après dénaturation à la trypsine

C'est une technique qui marque les régions d'ADN qui sont riches en base A et T et qui correspondent à des zones de réplication tardive.

Avantages : technique rapide

Inconvénients : les télomères apparaissent peu colorés

- **Bandes R** : coloration au Giemsa après dénaturation thermique en milieu salin à pH déterminé

Donne des résultats en négatif des bandes G

Avantages : les télomères sont bien colorés

Inconvénients : technique longue [6].

- **Bandes Q** : le marquage en bandes Q utilise un fluorochrome, la Quinacrine, et donne des bandes fluorescentes comparables aux bandes G.

Les régions chromosomiques fluorescentes en bandes Q sont caractérisées par leur richesse en bases A et T.

- **Bandes C** : hétérochromatine du centromère et des constriction secondaires [10].

3.3. Types de prélèvements :

PRENATAL	POSTNATAL	ONCOHEMATOLOGIE
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Villosités choriales ➤ Liquide amniotique ➤ Sang fœtal 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sang périphérique ➤ Fibroblastes de la peau ➤ Organe (muscle, foie) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Moelle osseuse ➤ Ganglion ➤ Tumeur solide

Différents types de prélèvement pour la réalisation d'un caryotype.

4) Les Anomalies chromosomiques :

4.1. Généralités sur les anomalies chromosomiques

Les anomalies chromosomiques sont le résultat de mutations qui modifient le nombre de chromosomes ou changent la structure du chromosome. Elles peuvent altérer la capacité d'une cellule à survivre et à fonctionner de façon normale.

Une anomalie chromosomique peut être soit **constitutionnelle**, c'est-à-dire que **toutes les cellules de l'individu ont le même caryotype**, ou peut être **acquise**. A ce moment là **seuls certains tissus sont touchés**.

Les anomalies constitutionnelles surviennent dès la conception ou lors des premières divisions du zygote, tandis qu'une anomalie acquise survient plus tard au cours de la vie de l'individu [6].

L'anomalie acquise est souvent liée à un processus de tumorigenèse (Par exemple, les anomalies chromosomiques des leucémies)[6].

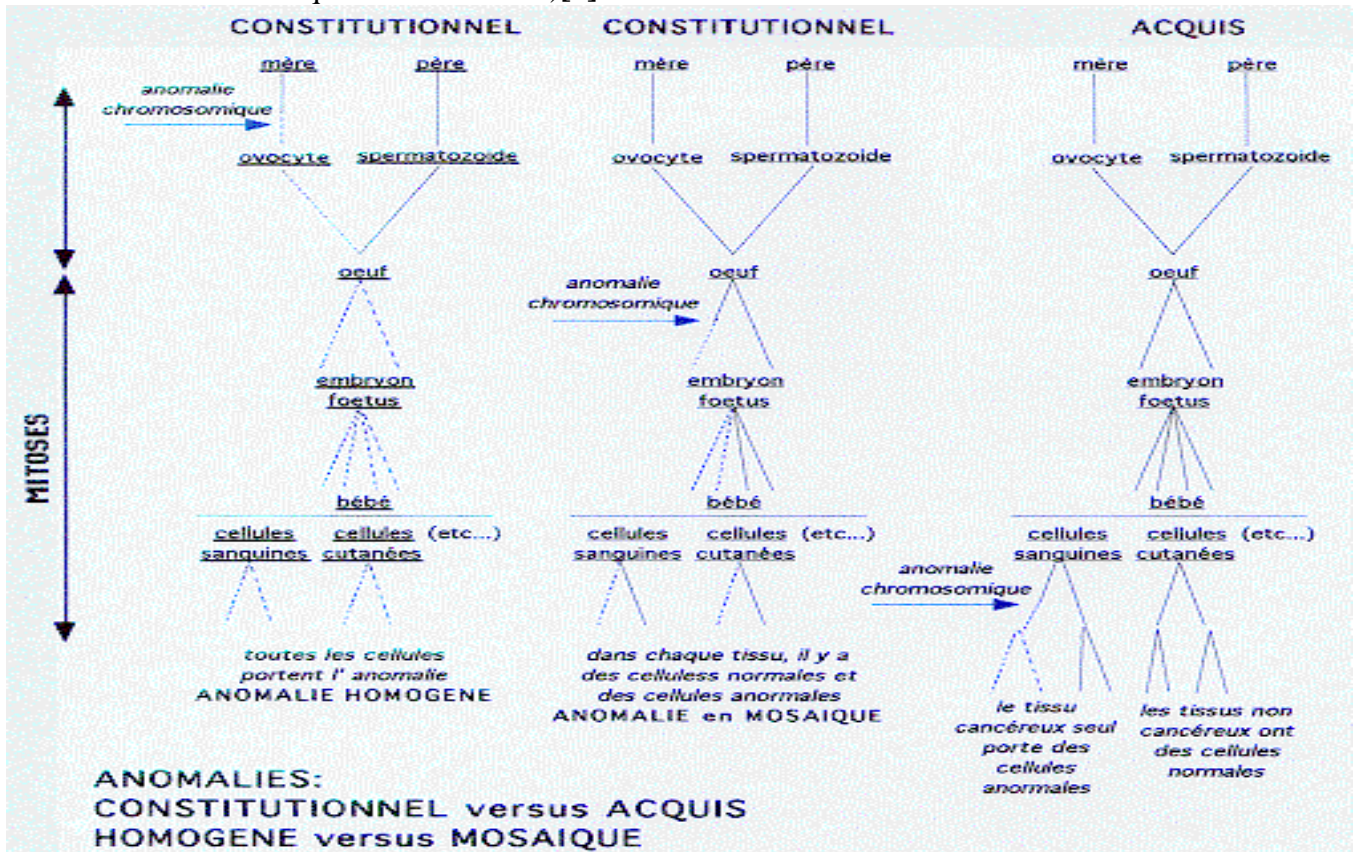


Figure 4 : anomalies constitutionnelles et acquises, homogènes et en mosaïques [14]

Anomalies homogènes :

- **Anomalie constitutionnelle** : présente dans toutes les mitoses analysées ou dans plusieurs tissus analysés différents.
- **Anomalie acquise** : *survenue* au cours d'une leucémie et **présente dans toutes les cellules sanguines analysées chez l'individu**[11].

Anomalies en mosaïques :

- **Anomalie constitutionnelle** : N'est pas présente dans toutes les mitoses analysées différentes.
- ⇒ Présence de 2 populations cellulaires différentes chez un même individu (pourcentage variable de cellules normales). «ex : Trisomie 21 en mosaïque »
- **Anomalie acquise** : dans une leucémie présente dans une proportion de cellules analysées [11].

Généralement on classe les anomalies chromosomiques en trois grands axes qui sont :

4.2. Anomalies de nombre : [7]

4.2.1. Définition et mécanismes de formation :

Elle apparaît quand un individu possède un nombre anormal de chromosomes par une perte ou un gain d'un chromosome entier entraînant une modification du nombre des chromosomes.

Par définition les anomalies de nombre affectent le nombre de chromosomes et non leur structure qui demeure normale, elles peuvent être homogènes présentes dans toutes les cellules de l'organisme, ou en mosaïque. Lorsqu'elles sont homogènes elles résultent le plus souvent d'une non disjonction méiotique et peuvent se traduire par trisomie (présence d'un chromosome normal surnuméraire) ou par une monosomie (perte d'un chromosome) [7].

Une non-disjonction est définie par le fait que deux chromosomes migrent vers le même pôle lors de l'anaphase et passent ensemble dans la même cellule fille, au lieu de migrer chacun dans une cellule fille. Elle peut survenir en première ou deuxième division méiotique La non-disjonction peut survenir aussi lors de la mitose [7].

Ces anomalies peuvent toucher aussi bien les chromosomes sexuels que les Autosomes [12].

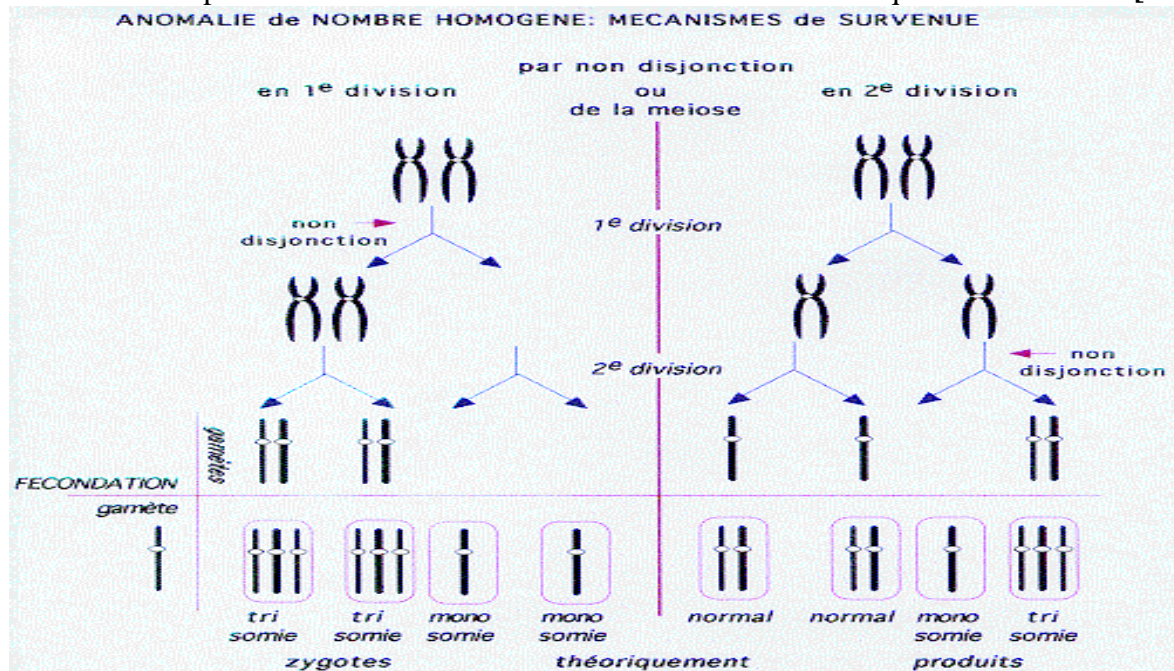


figure5 : Mécanismes de survenue d'anomalie de nombre par non disjonction méiotique [13] .

4.2.2. Conséquences :

Les gamètes possédant un autosome en excès produisent un zygote trisomique. Les trisomies les plus susceptibles d'être observées à la naissance sont les trisomies 21,9,18, et 13 (il existe la trisomie 16 observée dans le cas des fausses couches spontanées) [14].

Les trisomies des gonosomes sont très fréquentes, et portent aussi bien que sur l'X que sur l'Y : 47, XXX ; 47, XXY ; 47, XYY [14].

Les gamètes nullosomiques produisent des monosomies. Les monosomies autosomiques sont rarement observées à la naissance du fait, de leur élimination dès les premiers stades de la vie

embryonnaire. Pour ce qui concerne les chromosomes sexuels, la monosomie X est responsable du syndrome de Turner [14].

4.3. Anomalie de structure :

Elles sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs réarrangements. L'anomalie chromosomique est équilibrée ou déséquilibrée[7].

- a) **Une Anomalie équilibrée** : Absence de perte génétique malgré les anomalies présentes. Ainsi les individus touchés ne présentent pas d'effets phénotypiques, ou rarement une pathologie lorsque la cassure se fait sur un gène important. « ex : inversion, translocation robertsonnienne » [7].
- b) **Une Anomalie déséquilibrée** : est une anomalie qui entraîne une modification visible de la quantité d'ADN, et est accompagnée toujours par un gain ou perte du matériel génétique [7].

Les anomalies chromosomiques de structure résultent d'un réarrangement des chromosomes. Quand le réarrangement ne provoque ni perte ni gain de matériel génétique, alors il est dit équilibré.

Si au contraire, il y a gain ou perte de matériel génétique, à ce moment là on parle d'anomalie déséquilibrée [15].

Les anomalies équilibrées peuvent affecter un ou deux chromosomes homologues ou non. Elles peuvent entraîner, lors de la méiose, la formation de gamètes déséquilibrés donnant des zygotes anormaux. Ceci se traduira par la survenue d'avortements ou par la naissance d'un enfant porteur d'une anomalie congénitale. Les anomalies non équilibrées peuvent survenir de *novo* ou tout simplement être la conséquence d'un remaniement parental équilibré [15].

4.3.1. Remaniements intra-chromosomiques :

4.3.1.1. Délétions :

Les délétions se définissent par la perte d'un segment chromosomique. Il s'agit toujours d'une anomalie déséquilibrée.

Elles peuvent être :

- terminales (portant sur l'extrémité du chromosome), ou
- Interstitielles (intervenant sur des segments plus proximaux des bras chromosomiques)[16].

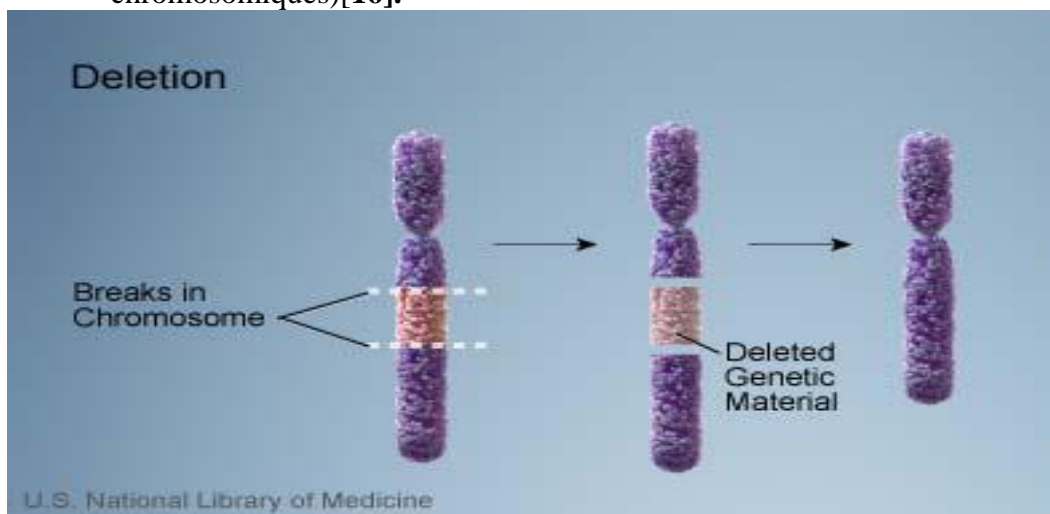


Figure 6 :délétion d'un segment chromosomique [16]

4.3.1.2. Microdélétions :

Les microdélétions sont des délétions de toute petite taille inférieure à 5 mégabases invisibles sur le caryotype standard. Les pertes de matériel génétique concernent des sous bandes chromosomiques, et ne sont détectées qu'avec des techniques de haute résolution c'est-à-dire par l'hybridation *in situ* en fluorescence en utilisant des sondes moléculaires spécifiques[15].

4.3.1.3. Chromosomes en anneaux (r) :

Les chromosomes en anneaux résultent de deux cassures subterminales, le chromosome peut se fermer en anneau. Il forme un « ring » qui se perd facilement lors des mitoses successives (figure7). Les sujets atteints présentent les caractères d'une véritable monosomie létale à court terme [15].

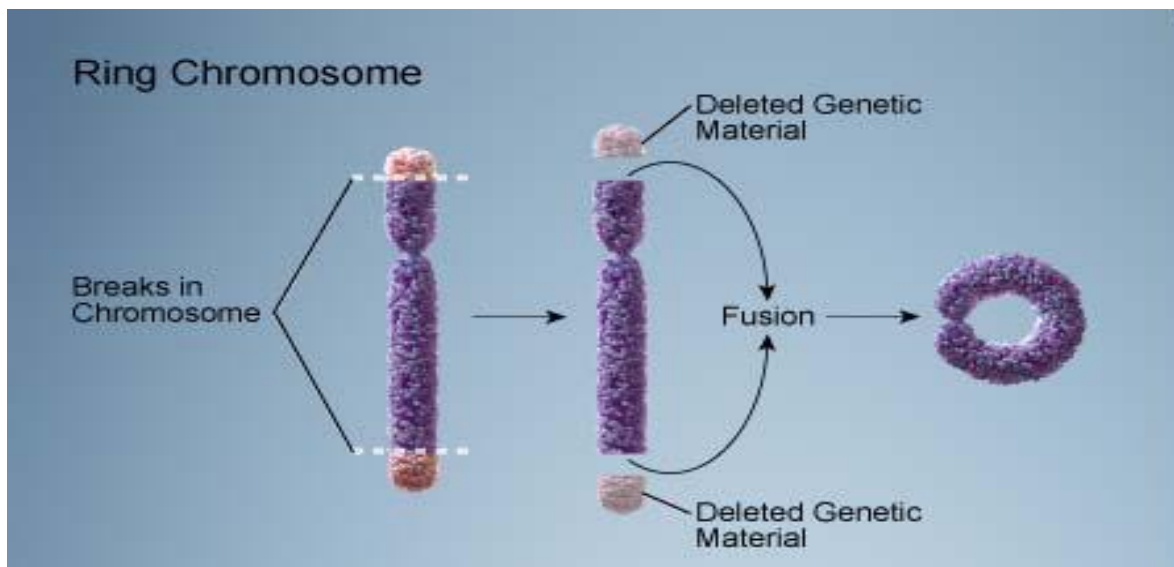


Figure 7 : formation du chromosome en anneau[16].

4.3.1.4. Duplications (dup):

Il s'agit de la répétition d'un fragment chromosomique. Elles entraînent généralement des trisomies partielles aboutissant à des anomalies morphologiques et/ou un retard mental.[16]

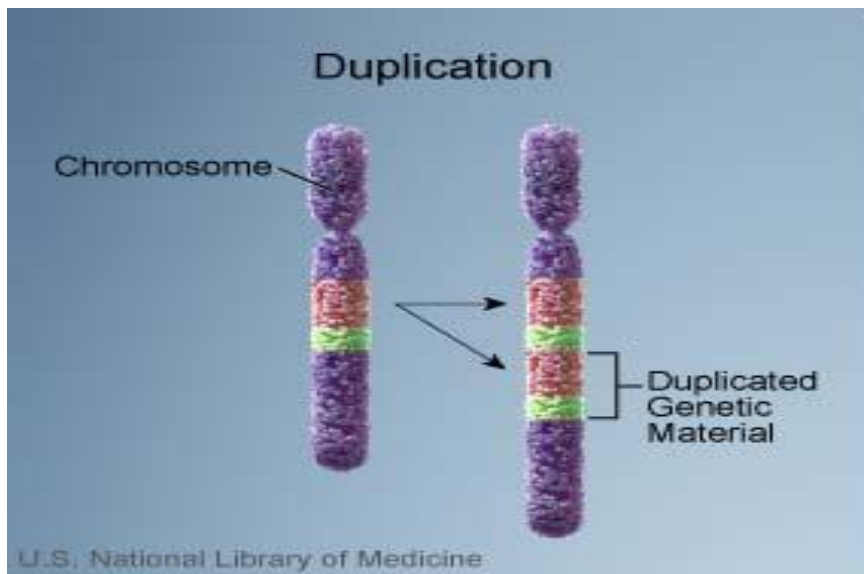
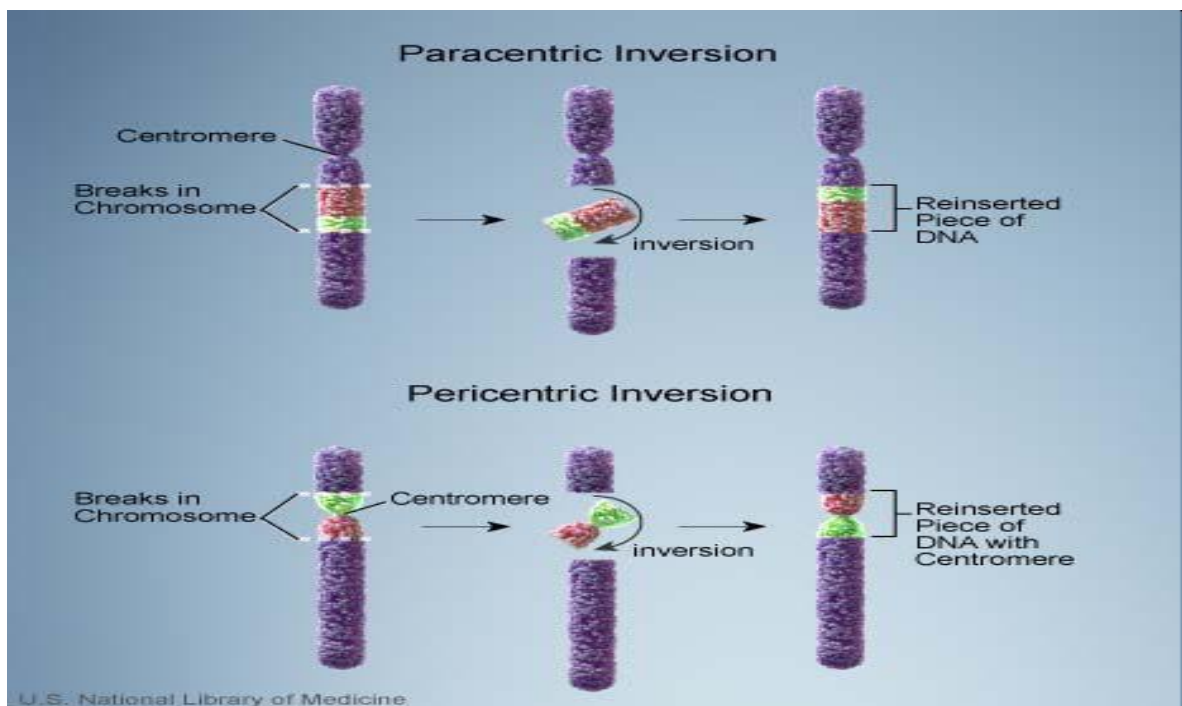


figure 8 : duplication intra-chromosomique[16].

4.3.1.5. Inversions(inv) :

Impliquent la cassure d'un chromosome en 2 points avec inversion du segment entre ces 2 points suivie de re-soudure. Elles sont soit péricentriques si le centromère est compris dans le segment intermédiaire, soit paracentriques si les deux cassures se sont produites sur le même bras chromosomique.[15]



[1

6]

figure 9 : inversion paracentrique et péricentrique.

4.3.1.6. isochromosomes (i) :

Les isochromosomes résultent de la division d'un chromosome selon un axe perpendiculaire à son axe de division, le chromosome résultant possède deux copies de l'un des bras et aucune copie de l'autre [15].

Donnent un chromosome médiocentrique portant deux fois les mêmes gènes

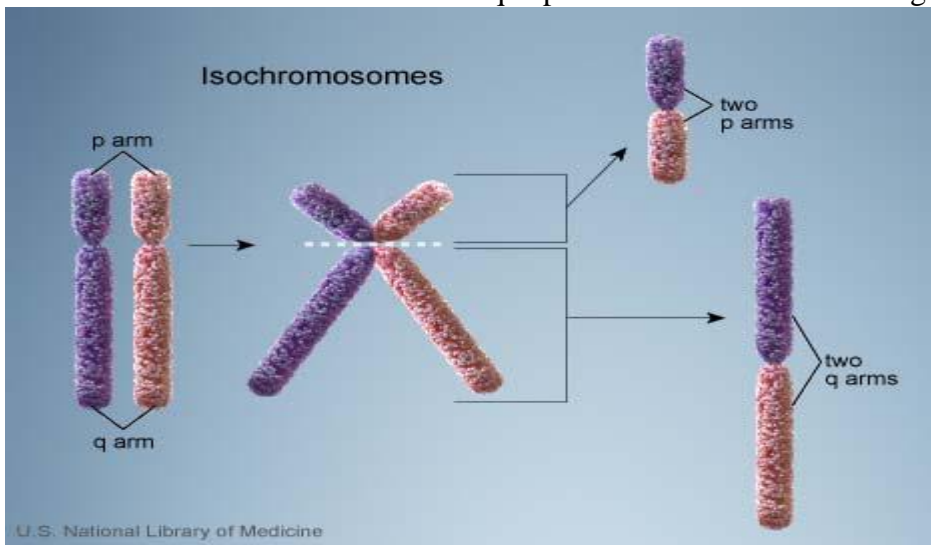


Figure 10 : mécanisme de formation de l'isochromosome [16].

4.3.2. Remaniements inter-chromosomes :

4.3.2.1. Translocations :

une translocation est considérée comme un échange de matériel génétique entre des chromosomes non homologues [15].

Les translocations sont souvent réciproques et équilibrées [5].

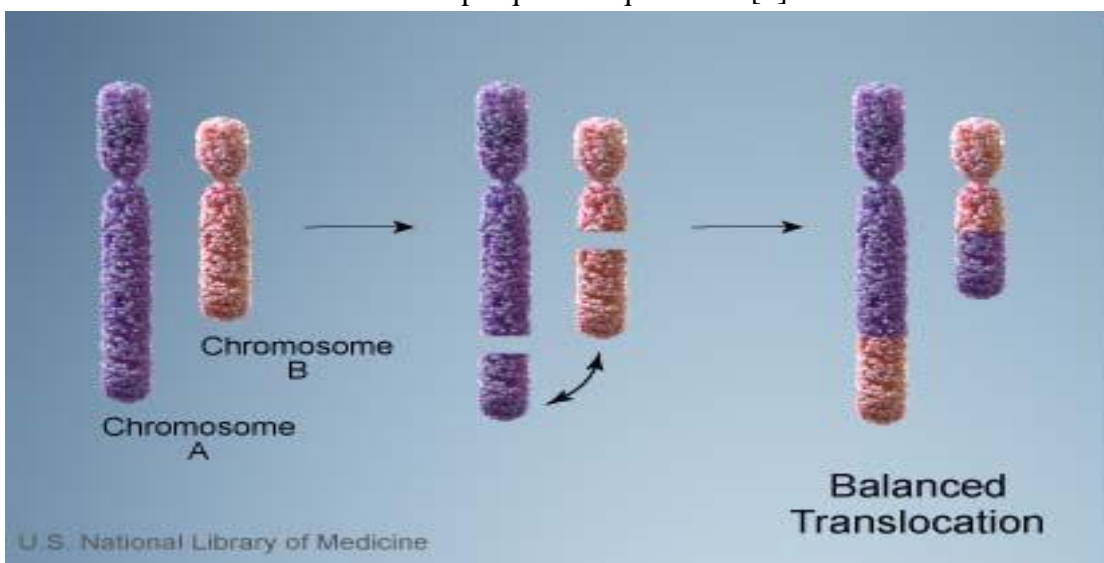


figure11 :translocation chromosomique.

4.4. Les sites fragiles :

Des zones de fragilité sont observables sur les autosomes et les gonosomes. Les autosomes les plus souvent touchés sont les chromosomes 2, 10, 11 et 16 sans conséquences phénotypiques apparentes [17].

Néanmoins, la cassure de l'extrémité distale des bras longs du chromosome X (site fragile de l'X) s'accompagne du syndrome de l'X fragile [17].

5) Indications habituelles du caryotype.

PRENATAL	POSTNATAL	ONCOHEMATOLOGIE
<ul style="list-style-type: none"> - Age maternel avancé - Signe d'appel échographique - Anomalies chromosomiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Syndrome malformatif - Retard mental ou staturo-pondéral - Ambigüité sexuelle - Stérilité ou absence de caractères sexuels 	<ul style="list-style-type: none"> - Leucémie aigue et chronique - Syndrome myélodysplasique - Lymphome - Tumeur solide.

Les indications des différents types des caryotypes.

Généralement le diagnostic prénatal s'adresse surtout au couple qui présente un risque particulier d'avoir un enfant avec une anomalie.

Afin de déterminer le caryotype en période post-natale, les lymphocytes doivent être prélevés par ponction veineuse périphérique. Ainsi les biopsie cutanées permettent d'obtenir des fibroblastes qui sont ces cellules capables de maintenir une croissance continue pendant plusieurs générations.

5.1. Indications du caryotype constitutionnel post-natal :

Après un examen clinique : on retrouve souvent les symptômes suivants :

- Dysmorphie cranio-faciale
- Retard mental
- Troubles du tonus (en général : hypotonie)
- Syndrome polymalformatif (Anomalies viscérales multiples)

❖ Chez l'enfant :

Phénotype évocateur d'une aberration chromosomique :

- Hypotonie/ Dysmorphie/ Malformation
- Ambigüité sexuelle
- Retard mental/ troubles du comportement
- Troubles du développement sexuel et retard de croissance.

❖ **Chez l'adulte :**

- Parents d'enfants porteurs d'une anomalie chromosomique.
- avortements spontanés (fausses couches spontanés).
- Antécédents de mort fœtale.
- Ménopause précoce.
- Aménorrhée primaire.

6) RAPPEL SUR LE SYNDROME DE TURNER :

6.1. Définition et informations générales :

Le syndrome de Turner est une monosomie totale ou partielle du chromosome X chez une fille. Sa fréquence est de l'ordre de 1/2500 naissances féminines en moyenne [18].

Le syndrome de Turner est la seule monosomie viable [20]

Le tableau clinique est très variable incluant un retard statural, un syndrome dysmorphique et polymalformatif ainsi qu'un impubérisme en rapport avec une dysgénésie gonadique.

Cette grande variabilité phénotypique est en fonction des variants caryotypiques (corrélation entre le phénotype et le caryotype).

En effet, sur le plan cytogénétique le syndrome de Turner correspond à plusieurs caryotypes possibles dont le plus fréquent est la monosomie 45,X. Les autres formules chromosomiques sont soit des mosaïques soit des anomalies de structure du chromosome X[19].

6.2. Aspects cliniques :

Les signes cliniques sont très variables et il est très rare qu'ils se trouvent tous associés chez la même patiente. Selon les stades on a :

⇒ **Chez le nouveau né et le nourrisson :**

- Petite taille (45 à 47cm à la naissance)
- Retard staturo-pondéral
- lymphoedème des extrémités (dos des mains et des pieds)
- excès de peau sur la nuque

⇒ **chez la fillette (puberté et adulte) :**

- Petite taille : entre -3 et -4DS, s'accroît à la puberté.
- Taille adulte 142cm (+/- 6,4cm)
- Dysgénésie gonadique
- Impubérisme
- Absence de développement des caractères sexuels secondaires
- Aménorrhée primaire ou secondaire.
- Dismorphie (écartement exagéré des mamelons et/ou élargissement du thorax)

- Malformation :
 - Cardiaques : coarctation de l'aorte
 - Rénales : reins en fer à cheval
 - Peau : naevi pigmentaires, cicatrices chéloïdes
- Fonctions intellectuelles : possibles difficultés d'apprentissage[20].

6.3. Aspects cytogénétiques :

Aspect cytogénétique	Formules chromosomiques
Monosomie	⇒ 45,X
Mosaïque :	⇒ 45,X / 46,XX ⇒ 45,X / 47,XXX ⇒ 45,X / 46,XX / 47,XXX
Isochromosome X :	⇒ 46, Xi (Xq) ⇒ 46, Xi (Xq) / 45, X ⇒ 46, Xi (Xp) ⇒ 46, Xi (Xp) / 45, X
Délétion de l'X :	⇒ 46, X, del(Xp) ⇒ 46, X, del(Xq) ⇒ 46, X, del(Xp)/ 45, X ⇒ 46, X, del(Xq)/ 45, X
Anneau de l'X :	⇒ 46,X,r(X)/45,X
Chromosome Y :	⇒ 45,X /46,XY ⇒ 45,X/47,XYY ⇒ 46,X,del(Yq)/45X ⇒ 46,X,i(Yq)

Tableau 1 : différentes formules chromosomiques et aspects cytogénétiques du Syndrome de Turner.

Sur le plan biologique : le syndrome de Turner se caractérise par une diminution importante des œstrogènes et de la progestérone. Les gonadotropines FSH et LH sont augmentés[20].

II. *Matériel et méthodes :*

Réalisation du caryotype sanguin :

1) Mode opératoire :

1.1. Prélèvement sanguin :

Le patient passe au service de prélèvement sanguin où on lui retire 5ml de sang périphérique qu'on introduit dans un tube hépariné sur lequel on note le nom du patient ainsi qu'un code de référence pour l'archive de l'institut.

1.2. Culture cellulaire et stimulation des mitoses :

Principe :

Le sang est la source de cellules la plus utilisée en cytogénétique. Chez l'homme les lymphocytes B et T sont les seules cellules sanguines nucléées donc susceptibles d'être transformées en cellules actives et proliférantes. Cette transformation lymphoblastique induite *in vivo* par les antigènes peut être stimulée *in vitro* par des composés tels que les lectines. Il existe plusieurs types de lectines dont les plus couramment utilisées pour la transformation lymphoblastique sont la phytohémagglutinine (extrait d'haricot *Phaseolus vulgaris*), la canavaline et le pokweed.

Protocole expérimental :



figure 12 : hotte à flux laminaire verticale (laboratoire de cytogénétique à l'IPM)

La préparation du milieu de culture se fait sous une hotte à flux laminaire vertical. Ce milieu est nommé milieu RPMI. On l'utilise pour la culture cellulaire, surtout pour les cellules humaines ou les tissus isolés, afin d'avoir un milieu RPMI enrichi (annexe 1).

Ce milieu contient une grande quantité de phosphate.

Sur des flasques de 50ml on commence par noter les renseignements du patient (Nom, Prénom et numéro de référence du laboratoire). Avec une pipette poire on ajoute :

- 18ml de RPMI enrichi
- 1200 µl de sang
- 200 µl de PHA (Un agent mitogène qui a comme effet la stimulation de la mitose cellulaire).

1.3. Incubation :

On introduit les flasques dans l'étuve à 37°C pendant 72 heures.

1.4. Blocage des cellules en métaphase :

Principe :

Les mitoses sont bloquées en métaphase en incubant les cellules en présence d'un poison du fuseau mitotique. La colchicine dépolymérise la tubuline du fuseau.

La colchicine est un alcaloïde du colchique (*colchicum autumnale*) qui présente une grande affinité pour la tubuline. A faible concentration, la colchicine se fixe à l'extrémité des microtubules et empêche leur raccourcissement ou leur croissance. A forte concentration, elle provoque leur dépolymérisation. Expérimentalement elle est utilisée expérimentalement pour bloquer en métaphase la mitose des cellules en culture.

Protocole expérimental :

Cette étape consiste à bloquer les mitoses en métaphase. Ainsi on ajoutera au flasque 200 µl de colchicine.

Après l'homogénéisation manuelle, le flasque est remis à 37°C pendant une heure.

1.5. Le choc hypotonique :

Principe :

Dans un milieu hypotonique les cellules gonflent jusqu'à éclatement et on assiste à la dispersion des chromosomes dans le milieu.

Protocole expérimental :

Après l'incubation du flasque, le contenu de ce dernier est mis dans un tube que l'on centrifuge à 1500 tours/minute pendant 10 minutes.

On élimine le surnageant et on garde le culot.

On ajoute 17ml d'une solution hypotonique (voir annexe 1) aux cellules contenues dans le culot tout en vortexant. Les cellules gonflent par phénomène d'osmose. Puis éclatent. On assiste à la libération des cellules dans le milieu.

On incube ensuite le tube à 37°C pendant 15minutes.

1.6. la fixation :

Principe :

La fixation est réalisée par un mélange de méthanol et d'acide acétique « fixateur de Cranoy ». (Annexe 1).

Ce mélange a pour but de fixer les chromosomes.

Protocole expérimental :

❖ première fixation :

Après l'incubation, le tube est centrifugé à 1500tours/minute pendant 10minutes et le surnageant est éliminé.

Le culot est remis en suspension dans 17ml de fixateur de Cranoy tout en vortexant, puis le tube est incubé à +4°C pendant 25minutes.

❖ Deuxième fixation :

Après l'incubation à +4°C pendant 25 minutes, le tube est centrifugé à 1500tours/minute pendant 10minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et 16ml de fixateur sont ajoutés au culot tout en vortexant.

Enfin, le tube est conservé à -20°C pendant au moins 5 heures.

1.7. L'étalement :

A la fin de la deuxième fixation et après un temps de latence d'au moins 5heures et allant jusqu'à 24heures, le tube est centrifugé et le surnageant est éliminé.

On remet le culot en suspension dans le volume restant du fixateur, à l'aide d'une pipette pasteur.

On prend des lames propres et on y écrit la référence du patient, on les recouvre par un film d'eau.

Quelques gouttes de la suspension cellulaire sont déposées sur les dernières lames qui sont maintenues horizontalement pour assurer un bon étalement.

Ensuite, les lames sont laissées à l'air libre afin de sécher et puis sont remises dans l'étuve à 37°C pendant une nuit.

1.8. La fixation de berger :

Principe :

La fixation de berger a comme rôle de fixer les chromosomes sur la lame.

Protocole expérimental :

Les lames déjà étalées antérieurement sont ensuite plongées dans le fixateur de berger(voir annexe1) pendant 15minutes et séchées à l'air libre.

1.9. La dénaturation les bandes R :

Principe :

Les bandes R sont obtenues par le traitement des chromosomes par la chaleur en présence d'une solution saline appelée solution Earle. (Annexe 1).

Les régions riches en bases adénine et thymine sont facilement dénaturées, alors que les régions riches en guanine et cytosine restent intactes car elles résistent à la chaleur.

Protocole expérimental :

Pour cette dénaturation on utilise la solution Earle qu'on a dilué au 1/10(annexe 1).

Le PH est ajusté à 5.5 par l'ajout de deux gouttes d'une solution basique.

La solution de dénaturation est mise dans un bac. Ce dernier est placé dans un bain-marie à 86°C pendant 15minutes.

Ensuite on dépose les lames dans le bac, et on replace le tout dans un bain-marie à une température de 86°C. Le temps de dénaturation prend environ 20minutes. Afin d'arrêter la dénaturation on lave les lames rapidement à l'eau.

1.10. La coloration au Giemsa :

Principe :

Le colorant Giemsa est un mélange de deux colorants (bleu de méthylène et éosine). Les molécules du groupe de thiazines, chargées positivement, interagissent avec les groupements phosphates de l'ADN.

La liaison thiazine-ADN provoque une diminution de la longueur d'onde d'absorbance du colorant qui passe du bleu pâle au bleu foncé.

Protocole expérimental :

Après la dénaturation, les lames sont mises dans un bac contenant le colorant Giemsa (annexe 1) pendant 7 à 10 minutes. Ces lames sont par la suite lavées et séchées à l'air libre.

1.11. L'observation au microscope :

❖ Prise de photos

L'observation des lames est faite à l'aide d'un système automatisé composé d'un photomicroscope en contraste de phase, d'une caméra et d'un ordinateur avec un logiciel permettant la classification des chromosomes.

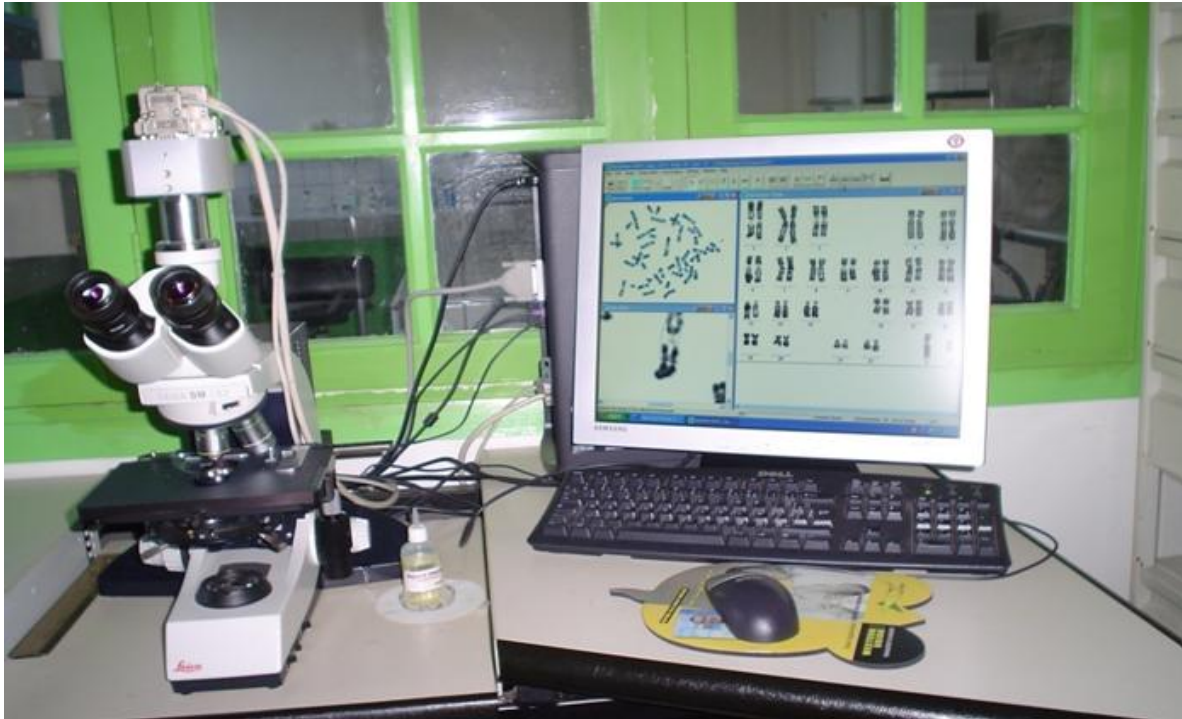


Figure 13 : photomicroscope en contraste de phase associé à un ordinateur.



Figure 14 : chromosomes en métaphase d'une cellule éclatée.

❖ Etude des mitoses :

Pour chaque patient, on examine au moins 16 mitoses et pour les cas particuliers, on peut aller jusqu'à 50 mitoses.

Pour chaque mitose, on étudie :

- Le nombre et la forme des chromosomes
- Le sexe du patient

❖ Choix des meilleures métaphases pour le classement :

Le choix des meilleures métaphases se fait selon les critères suivants :

- La taille des chromosomes ; En effet, plus le chromosome est long, plus on a plus de bandes.
- Le nombre et la disposition des bandes chromosomiques.

Ainsi, on choisit les trois meilleures métaphases pour le classement.

✚ **Etude statistique du syndrome de Turner :**

Pour l'étude statistique on s'est basé sur les informations notées sur les archives du département de la cytogénétique à l'Institut Pasteur du Maroc. Comme cette étude concerne le syndrome de Turner, on a tenu compte du nombre de patients présentant les symptômes qui s'y relie.

Les critères d'inclusion dans mon étude sont :

- Le retard staturo-pondéral
- L'aménorrhée primaire
- L'ambiguïté sexuelle
- Le Retard pubertaire
- Suspicion directe du syndrome de Turner
- Retard staturo-pondéral associé à une dysmorphie et/ou retard mental

III. RESULTATS ET DISCUSSION :

1. Caryotype sanguin réalisé :

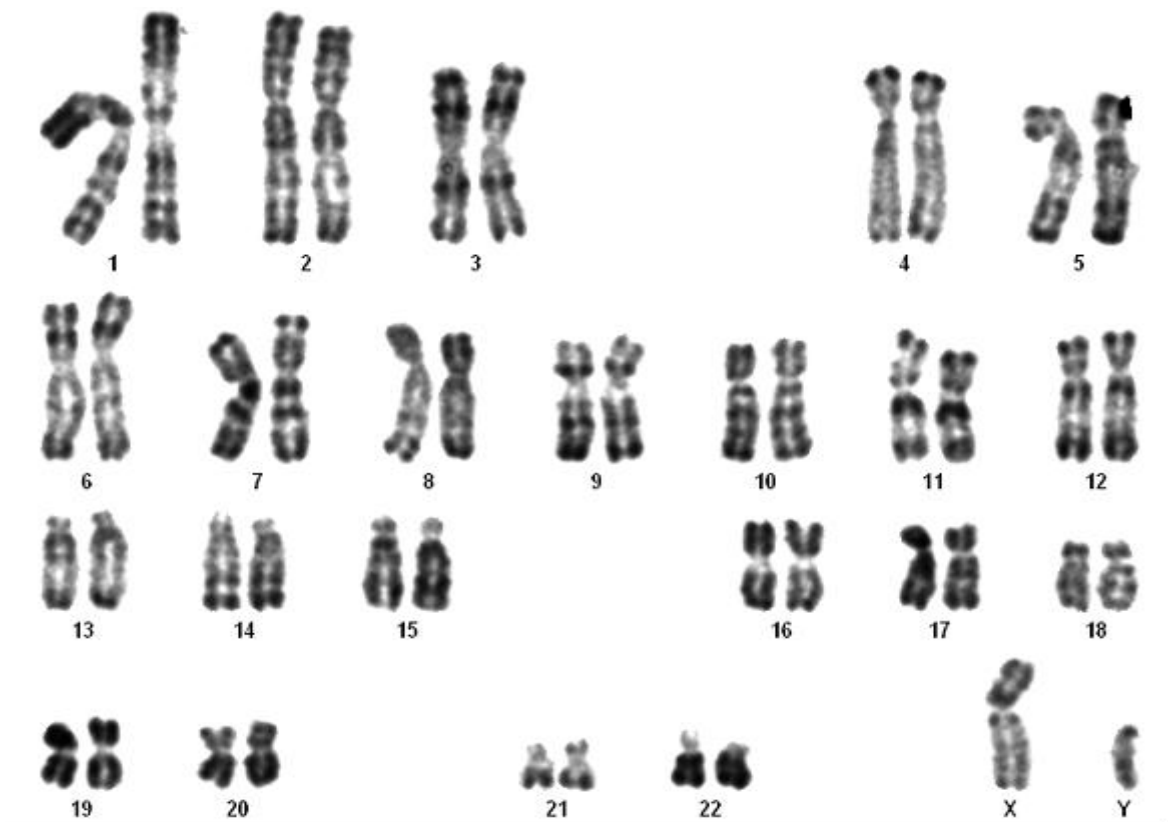


Figure 15 : Caryotype sanguin réalisé (bandes R) : 46, XY résolution à 400 bandes (service de cytogénétique à l'IPM)

L'analyse du caryotype sanguin réalisé permet de constater la présence de 46 chromosomes dont 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes XY.

La présence du chromosome Y avec un chromosome X montre que c'est un caryotype d'un homme.

La taille et la disposition des bandes chromosomiques révèlent l'absence d'anomalies chromosomiques dans la limite de cet examen.

2. Caryotypes portants sur le syndrome de Turner

Sur les caryotypes réalisés, la dénaturation est faite par la chaleur (bandes R).

Parmi les demandes de caryotype pour suspicion de Turner (entre 01/01/2010 et 31/03/2011), qui présentent les symptômes inclus dans mon étude et qui sont de 84 demandes, le service

de cytogénétique a pu confirmer par étude cytogénétique le diagnostic chez 11 cas (13.10% des cas suspectés).

Le motif de consultation ou l'aspect clinique le plus fréquent est le retard staturo-pondéral qui est présent chez 43 patients (51.19% des cas).

Pour les autres motifs ils sont présentés dans le tableau suivant avec le nombre de demande de chaque signe et la fréquence de chaque motif dans mon étude statistique :

Sur 84 caryotypes réalisés pour suspicion de Turner, 43 sont réalisés pour la présence d'un retard staturo-pondéral, 11 pour une aménorrhée primaire (absence des règles menstruelles), 1 pour une ambiguïté sexuelle, 2 montrent un retard pubertaire, 20 caryotypes sont demandés pour une suspicion directe du Syndrome de Turner, et 7 pour un retard staturo-pondéral associé à une dysmorphie et / ou un retard mental.

Motif de consultation	Nombre de patients	Fréquence (%)
Retard staturo-pondéral	43	51,19
Aménorrhée primaire	11	13,10
Ambiguïté sexuelle	1	1,19
Retard pubertaire	2	2,38
Suspicion directe du syndrome de Turner	20	23,81
Retard staturo-pondéral associé à une dysmorphie et /ou un retard mental	7	8,33

Tableau 2 : nombre et fréquence des différents motifs de consultation chez les patients .

fréquence des différents motifs de consultation dans les caryotypes réalisés

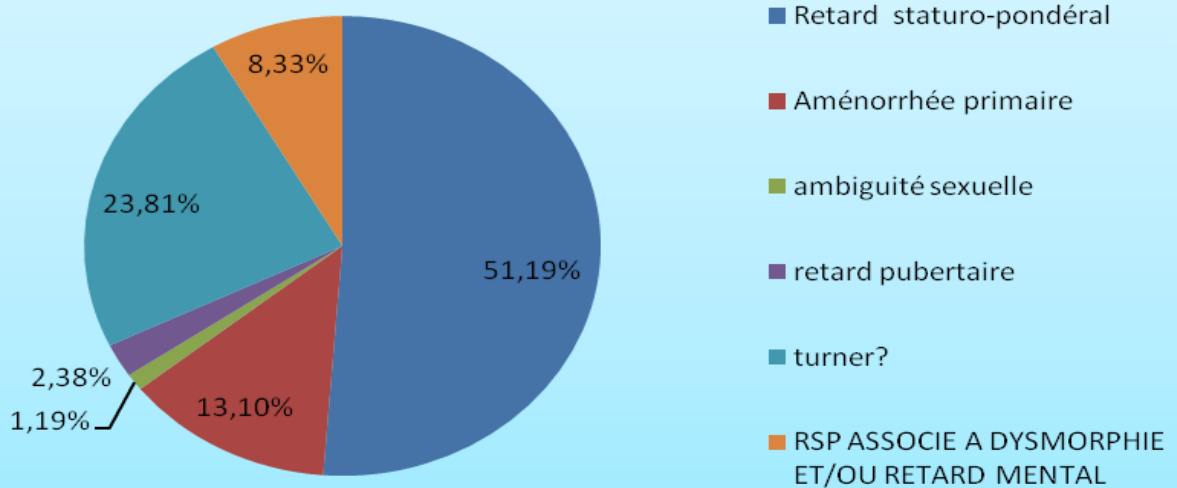


figure 16 : fréquence des différents motifs de consultation dans les caryotypes réalisés.

D'après la figure on constate que le retard staturo-pondéral est le motif le plus présent dans notre étude, soit, une fréquence de 51.19%, suivi d'une suspicion de Turner par les médecins qui demandent l'analyse. Ceci montre la fréquence du diagnostic chez le médecin qui en cas de doute ou en cas d'existence d'un ou plusieurs symptômes du syndrome, demande la réalisation d'un caryotype sanguin qui permettra d'identifier l'existence de cette anomalie. En effet ce motif de consultation a une fréquence de 23.81%. L'aménorrhée primaire a eu aussi un pourcentage important dans notre étude soit 13.10%. Ceci montre que l'absence des règles (aménorrhée) chez la fille ou la femme fait suspecter le syndrome de Turner. Le Retard staturo-pondéral associé à une dysmorphie ou un retard mental représentent 8.33% des cas. Le retard pubertaire est de 2.38% et 1.19% pour l'ambiguïté sexuelle.

une répartition selon les motifs de consultation ainsi que le nombre de caryotypes normaux et de caryotypes pathologiques dans chaque motif, les résultats de cette répartition sont présentés dans le tableau suivant :

Motif de consultation	nombre	Fréquence (%)	CARYOTYPE NORMAL		CARYOTYPE PATHOLOGIQUE	
			nombre	Fréquence (%)	nombre	Fréquence (%)
RETARD STATURO PONDERAL	43	51.19	40	93.02	3	6.98
AMENORRHEE PRIMAIRE	11	13.10	9	81.82	2	18.18
AMBIGUITE SEXUELLE	1	1.19	1	100	0	0
RETARD PUBERTAIRE	2	2.38	2	100	0	0
TURNER ?	20	23.81	14	70	6	30
RSP associé à une dysmorphie et /ou retard mental	7	8.33	7	100	0	0

Tableau 3 : répartition des caryotypes selon les motifs de consultation

Sur 84 caryotypes sanguins réalisés pour le diagnostic du syndrome de Turner, 11 caryotypes ont été positifs et ont montré l'existence de cette anomalie. Ainsi le syndrome de Turner est présent chez 13.10% des patients.

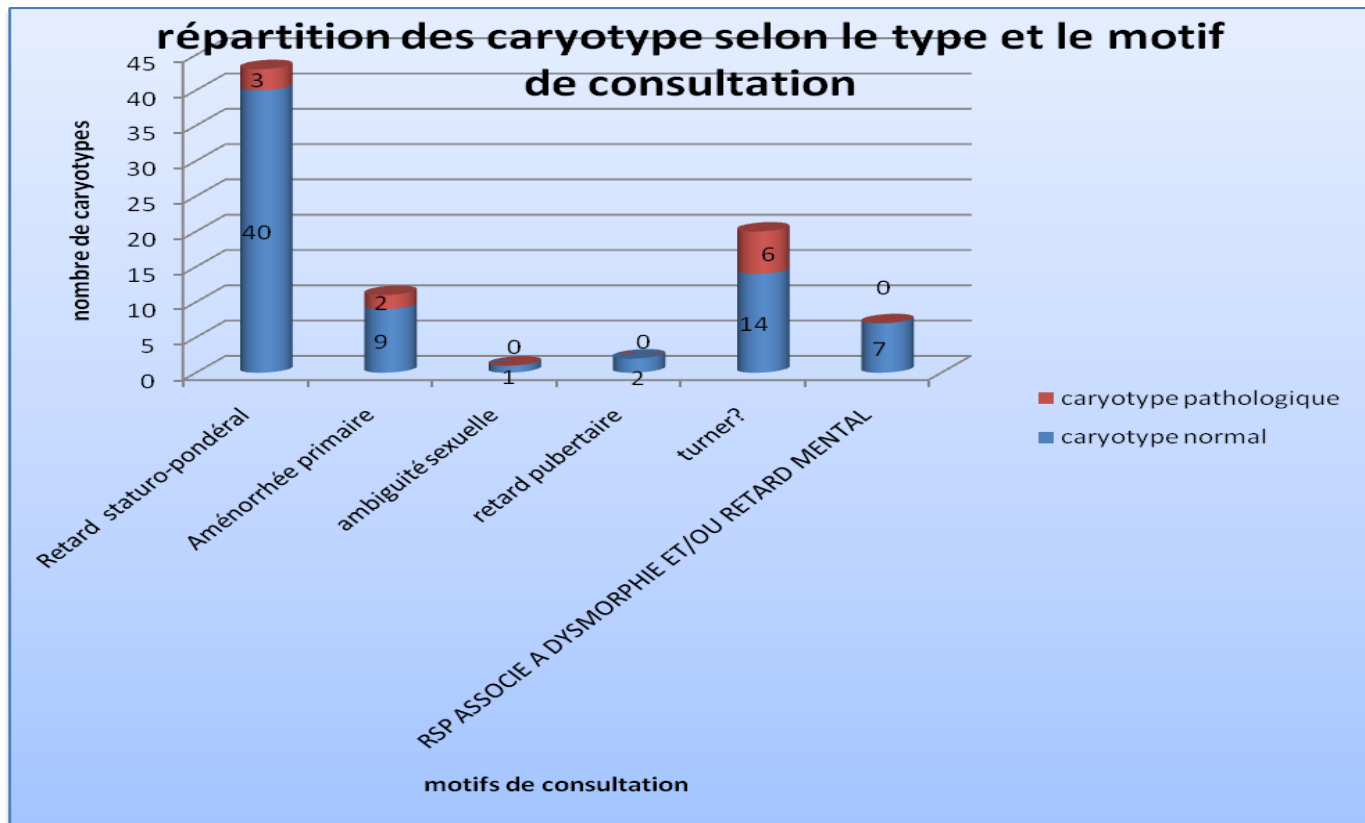


figure 17 :répartition des caryotypes selon le type et les motifs de consultation.

- 43 patientes présentent un retard staturo-pondéral et parmi elles 3 de leurs caryotypes ont montrés l'existence du syndrome de Turner alors que 40 caryotypes normaux, le retard staturo-pondéral est un signe clinique qui demande absolument la réalisation d'un caryotype car c'est généralement un signe qui apparait souvent chez les femmes ayant le syndrome de Turner.
- 11 patientes présentent une aménorrhée primaire, 2 d'entre elles présentent un caryotype pathologique et 9 un caryotype normal. En effet l'existence d'une aménorrhée nécessite souvent la réalisation d'un caryotype.
- 1 des patientes présente une ambiguïté sexuelle cependant, son caryotype est normal.
- 2 patientes ont un retard pubertaire mais ont aussi un caryotype normal.
- 20 patientes sont venues pour une suspicion directe du syndrome de Turner par leurs médecins , 14 patientes ont un caryotype normal et 6 présentent le syndrome de Turner ce qui montre l'importance du diagnostic au début chez un médecin qui en général en cas d'existence de symptomes demande la réalisation d'un caryotype.
- 7patientes ont un retard staturo-pondéral associé à une dysmorphie et/ou un retard mental mais aucune patiente ne présente un caryotype pathologique ce qui montre que le retard staturo-pondéral associé à une déformation ou à un retard mental n'est pas spécifique du syndrome de Turner .

Les demandes de caryotype sont classées par catégorie d'âge avec les fréquences des caryotypes pathologiques obtenus pour chaque tranche d'âge :

AGE	Nombre de patients	FREQUENCE (%)	CARYOTYPE NORMAL		CARYOTYPE PATHOLOGIQUE	
			nombre	Fréquence (%)	nombre	Fréquence (%)
[1jr-5ans[20	23,81	20	27,40	0	0
[5ans-10ans[22	26,19	20	27,40	2	18,18
[10ans-15ans[25	29,76	22	28,77	3	36,36
[15ans-20ans[9	10,71	5	8,22	4	27,28
20ans et plus	8	9,53	6	8,22	2	18,18

Tableau 4 : répartition des caryotypes selon les tranches d'âge des patients.

Dans la littérature la grande majorité consultent avant l'âge de 7ans soit 21% des cas. De même pour la série d'étude faite par l'équipe du département de génétique médicale, à l'institut d'hygiène de rabat qui dans une étude portant sur une série de 66cas à partir du janvier 1993 jusqu'à juillet 2004, ont trouvé que 19.32% ont consulté avant l'âge pédiatrique.

Comme les résultats ont démontré que 0% des cas ont consulté avant l'âge de 5ans, et que 63.64% ont consulté à un âge entre 10 et 20ans, on constate alors que notre étude diffère avec les données de la littérature et du travail de l'équipe du laboratoire de génétique médicale à l'institut d'hygiène de rabat. (Médecine du Maghreb. Edition électronique Octobre 2007 - n°150) [21].

En effet les demandes de caryotype concernent, dans notre étude, des patientes plus âgées pour la plupart. Cela pourrait s'expliquer par un retard au diagnostic.

18.18% des caryotypes réalisés concernent les enfants âgées entre 5 et 10 ans et le même pourcentage est trouvé pour les personnes ayant plus de 20 ans.

- 29.76% des caryotypes concernent les patientes âgées entre 10 et 15 ans ;
- 26.19% pour des patientes âgées entre 5 et 10ans ;
- 23.81% pour des personnes à l'âge pédiatrique entre 1jour et 5 ans,

- 10.71% pour les patientes entre 15 et 20ans,
- 9.53% pour les patientes ayant plus de 20ans.

Ceci montre en effet que le symptôme majeur qui pousse à la consultation est le retard pubertaire, le retard statural n'étant pas manifesté dans cette tranche d'âge.

On remarque que sur 20 caryotypes réalisés à l'âge pédiatrique, aucun ne décèle la présence du syndrome de Turner. Le caryotype est demandé systématiquement chez une fille en cas de retard statural non étiqueté, pour dépister précocement le syndrome de Turner.

Pour les cas avérés comme atteints du syndrome de Turner (11 cas ont été confirmés). Les 11 patientes de notre étude ont consultés après l'âge de 5ans. Ce résultat est en accord avec celui de l'équipe de Pédiatrie - Hôpital d'Enfants de Rabat, Maroc. (Médecine du Maghreb 2001 n°85)[22].

Un diagnostic précoce permettra au médecin de prescrire un traitement d'hormone de croissance en vue d'un meilleur gain statural ou un traitement oestrogénique en période pré pubertaire, à faible dose, pendant 2 à 3 ans pour l'induction de la féminisation.

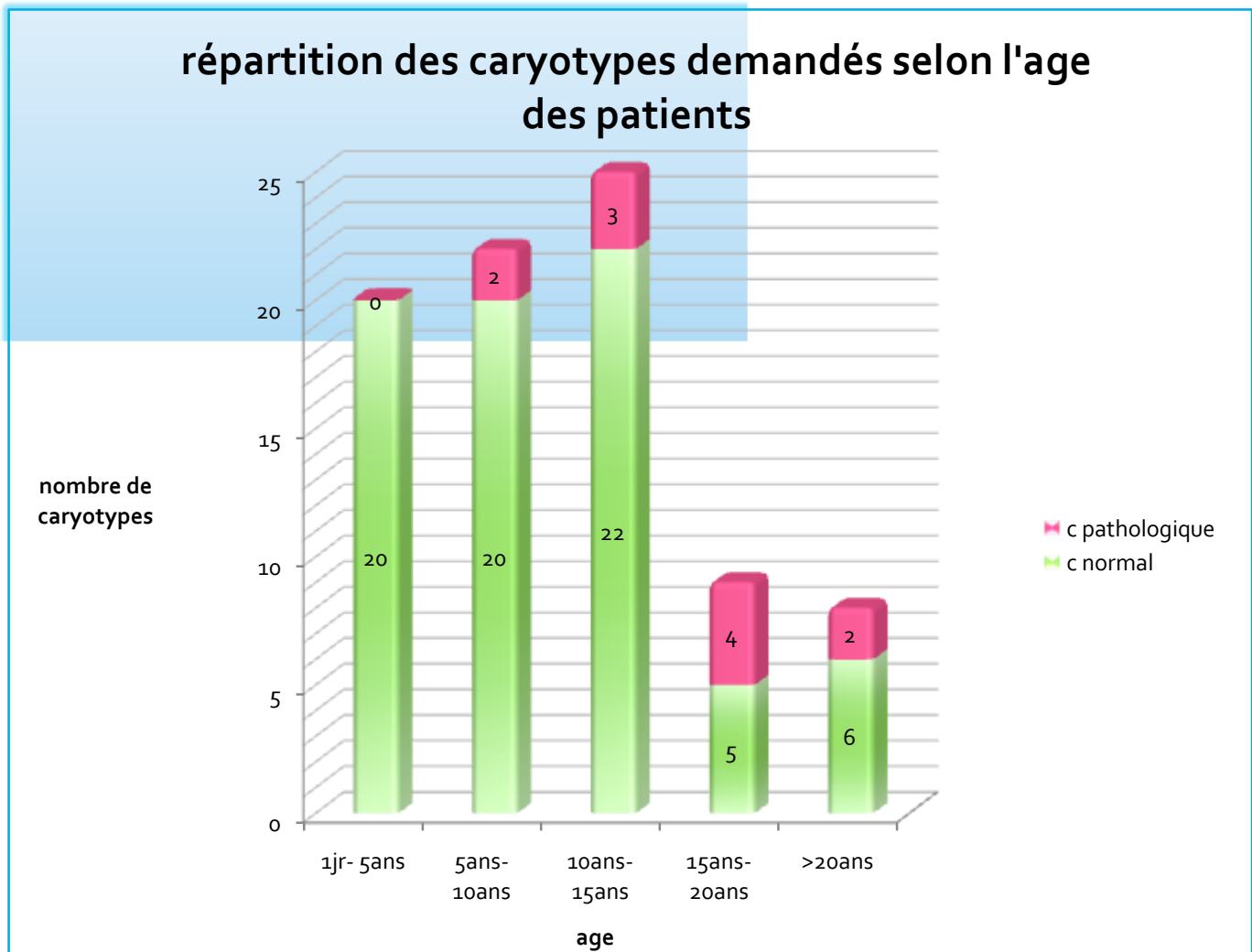


figure 18 : répartition des caryotypes demandés selon l'âge des patients.

- Sur 34 caryotypes demandés, 7d'entre eux montrent la présence du syndrome de Turner pour des patientes ayant entre 10 et 20ans. Ceci accentue l'importance de la

réalisation du caryotype chez des filles qui ont surtout un retard statural et/ou une aménorrhée après l'âge de 10ans.

- Sur 8 caryotypes réalisés sur des patientes ayant plus de 20 ans, 2 caryotypes présentent une pathologie, soit 25% des cas.
- Les différents caryotypes réalisés ont mis en évidence 3 cas de monosomie homogène 45, X (figure 20 de l'annexe 2), 1 X en anneau (figure 23 de l'annexe 2), 3 cas d'anomalie de structure dont 4 cas isochromosome(Xq) (figure 21 de l'annexe 2) et 3 délétions dont 2 touchant le bras long(Xq) et 1 touchant le bras court (Xp). Le tableau suivant résume le nombre et la fréquence des anomalies chez nos 11 patients :

Formule chromosomique	Nombre	Fréquence(%)
Monosomie homogène : 45, X	3	27.28
Chromosome X en anneau : 45, X/ 46, X, r(X)	1	9.09
Isochromosome : 46,X, i (X) (q10) 45, X/ 46, X, i(X) (q10)	2 2	18.18 18.18
Deletion: 46, X, del (X) (q25) 45,X/ 46,X, del(X) (q13) 45, X/ 46, X, del (x) (p11)	1 1 1	9.09 9.09 9.09
TOTAL	11	100

Tableau 5 :répartition des différentes formes du syndrome de Turner trouvées .

nombre des différents aspects cytogénétiques dans les 11 cas de Turner

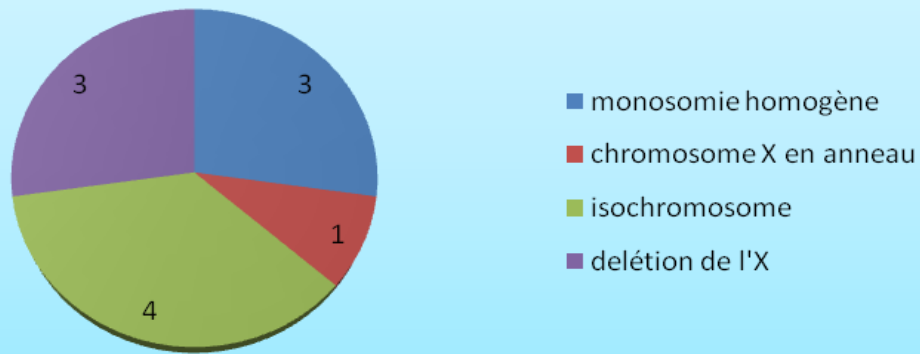


Figure 19 : nombre des différents aspects cytogénétiques dans les 11 cas du syndrome de Turner

Dans notre étude, on constate que :

⇒ Sur 11 cas atteints du syndrome de Turner:

- 3 d'entre eux présentent une monosomie homogène $45,X$, soit 27,28% des cas.
- 1 cas du chromosome X en anneau $45,X/ 46, X, r(X)$ (9.09%). (figure 22 de l'annexe 2).
- 4cas de l'isochromosome X avec 2 en mosaïque touchant le bras long q du chromosome X à la bande 10 avec formule chromosomique : $45, X/ 46, X, i(X) (q10)$ et 2 avec formule chromosomique $46,X, i (X) (q10)$. (36,36%) (voir figure 23 de l'annexe 2).
- 3 cas de délétion de l'X avec 1 cas de $46,X, del(X)(q25)$ et 2 cas en mosaïque dont 1 touchant le bras long q avec une formule chromosomique de $45,X/ 46,X, del (X) (q13)$, et 1 touchant le chromosome X au niveau du bras court avec une formule chromosomique de $45,X/ 46, X, del(X) (p11)$ (27,28%).

⇒ la grande majorité des cas du syndrome de turner sont d'une forme d'isochromosome de l'X (36.36%) (voir figure23 annexe 2)

La monosomie homogène et la délétion de l'X(voir figure 24 de l'annexe2) ont aussi un grand pourcentage dans notre étude dont on trouve pour chaque aspect des deux 27,28% des cas.

Le chromosome X en anneau (figure 25 de l'annexe 2) est le dernier aspect du syndrome de turner trouvé dans notre étude avec une fréquence de 9,09%

AGE	MOTIF DE CONSULTATION	FORMULE
-----	-----------------------	---------

Une comparaison avec la série d'étude faite par l'équipe du laboratoire de génétique médicale à l'institut d'hygiène de rabat. (Médecine du Maghreb. Edition électronique Octobre 2007 - n°150) a été faite et le tableau suivant résume les résultats :

Aspect cytogénétique	Notre série	Série de l'Institut d'hygiène Rabat
Monosomie homogène	27,28%	45,45%
Isochromosome X	36,36%	30,02%
Chromosome X en anneau	9,09%	3,03%
Délétion de l'X	27,28%	3,02%
autres	0%	18.48%

Tableau 6 : comparaison entre les résultats trouvés dans notre série d'étude et celle du groupe d'IHR.

Dans la série d'étude faite par l'équipe du laboratoire de génétique médicale à l'institut d'hygiène de rabat. (Médecine du Maghreb. Edition électronique Octobre 2007 - n°150) **la monosomie homogène** est l'aberration chromosomique la plus fréquente, **45,45% des cas**, dans notre cas **l'isochromosome X** est l'aberration la plus fréquente.

Néanmoins la fréquence des isochromosomes X et du chromosome X en anneau est légèrement augmenté par rapport à la série d'étude à l'IHR, alors que la fréquence des délétions de l'X est beaucoup plus importante dans notre série (27,28%).

Cette différence peut être due à la différence du choix de population ainsi que la durée d'étude qui est de 1 année et 3 mois dans notre série et de 11 ans et 6mois dans la série avec laquelle on compare , ce qui influence sur le nombre de caryotypes étudiés donc sur le nombre et l'aspect cytogénétique des cas pathologiques trouvés.

1	35ANS	Aménorrhée primaire	46, X, del (X) (q25)
2	27ANS	Aménorrhée primaire	45, X
3	18ANS	Suspicion de Turner	45,X
4	17ANS	Suspicion de Turner	46,X,i(Xq)
5	16ANS	Suspicion de Turner	45, X/46, X, i(X) (q10)
6	16ANS	Suspicion de Turner	45,X/46, X, r(X)
7	13ANS	Suspicion de Turner	45, X/46, X, i(X) (q10)
8	12ANS	Retard staturo-pondéral	45, X/46, X, del(X) (q13)
9	10ANS	Retard staturo-pondéral	45, X
10	8ANS	Suspicion de Turner	45, X /46, X, del(X) (P11)
11	5ANS	Retard staturo-pondéral	46, X,i(X) (q10)

Tableau 7 : résumé des 11 cas atteints du syndrome de Turner.

D'après les résultats du tableau on constate que pour les patientes ayant comme motif de consultation :

- le retard staturo-pondéral : plusieurs formules chromosomiques sont observées, donc il n'y a pas de corrélation génotype-phénotype.
- Suspicion de Turner : il n'y a pas de signe clinique précis chez ces patientes, donc il n'y a pas de possibilité d'établir une corrélation génotype-phénotype.

On observe aussi que la majorité des cas sont âgés de plus de 10ans ce qui montre qu'il y a un diagnostic qui est tardif.

Conclusion :

le caryotype sanguin à un rôle très important dans l'identification de plusieurs anomalies chromosomiques qui peuvent être de nombre, de structure ou des sites fragiles.

Ces anomalies engendrent plusieurs maladies tels que les syndromes malformatifs, l'ambiguïté sexuelle, la stérilité ainsi que le retard mental ou statural.

notre travail nous a permis d'une part de connaître la méthode de réalisation du caryotype sanguin, d'autre part de répartir les différents aspects cytogénétiques du syndrome de Turner en fonction des signes cliniques en se basant sur les résultats de 84 caryotypes sanguins réalisés au laboratoire de cytogénétique à l'IPM.

L'étude des caryotypes sanguins a révélé que :

- La demande de réalisation des caryotypes sanguins pour diagnostic du syndrome de Turner a beaucoup augmenté. Ceci prouve que les médecins connaissent de plus en plus l'importance du rôle du caryotype sanguin dans le diagnostic et la confirmation des anomalies chromosomiques.
- Le retard statural ou staturo-pondéral est le signe le plus fréquent chez les patients qui ont demandé un diagnostic génétique de syndrome de Turner (51,19%) au service de cytogénétique à l'IPM entre 01/01/2010 et 31/03/2011.
- Sur les 20 caryotypes réalisés pour une suspicion directe du syndrome de Turner par les médecins, 14 caryotypes ne sont pas pathologiques. On constate donc que malgré la présence des symptômes cliniques et une suspicion par le médecin chez ces patientes aucune anomalie n'a été observée sur le caryotype sanguin. Ceci s'explique par le fait que parfois on trouve le syndrome de Turner en mosaïque seulement sur les fibroblastes et non pas sur les lymphocytes.
- La majorité des patientes qui sont atteintes dans notre série ont entre 10 et 20 ans ce qui montre qu'il y a un diagnostic assez tardif chez beaucoup de patientes.
- La majorité des cas du syndrome de Turner dans notre étude ont une formule chromosomique de 46,X,i(X)(q10) qui présente l'isochromosome de l'X (36.36%). On constate également l'absence de cas ayant la présence du chromosome Y, ou d'une translocation entre le chromosome X et un autosome. Ceci peut s'expliquer par la très petite série de cas étudiés.
- le conseil génétique est rassurant (le risque de récurrence lors des grossesses ultérieures est considéré non accru) lors de la mise en évidence d'anomalies accidentelles à type de monosomie X homogène ou en mosaïque, d'isochromosome du bras long de l'X ou bien d'un anneau de l'X.
En revanche, la présence des autres anomalies de structure, principalement la translocation de l'X avec un autosome impose la réalisation d'un caryotype parental. La présence d'un remaniement parental est associée à un risque accru de récurrence pour les grossesses ultérieures d'où la nécessité d'un diagnostic anténatal. Par contre,

la constatation d'un caryotype normal des parents confirme que l'anomalie de structure est survenue de novo et donc, un conseil génétique serait rassurant.