

L'AVENIR DE LA CYTOGENETIQUE APRES LE SEQUENCAGE DU GENOME HUMAIN

SIFFROI J.-P., CHANTOT-BASTARAUD S.
Service d'Histologie, Hôpital d'Enfants Armand-Trousseau, Paris

Résumé

Depuis la découverte en 1956 du nombre de chromosomes dans l'espèce humaine, la cytogénétique n'a cessé de progresser dans l'analyse de son sujet d'étude, le chromosome humain. La sensibilité et le degré de résolution des techniques de cytogénétique n'ont cessé de s'accroître tout d'abord avec l'introduction des techniques de marquage en bandes dans les années 1970 puis de celles dites de cytogénétique en haute résolution, mais aussi et surtout avec l'apparition des techniques d'hybridation in situ dans le début des années 1990 ouvrant ainsi le champ à la Cytogénétique moléculaire. Ces dernières ont permis d'une part d'augmenter considérablement le pouvoir de résolution de la cytogénétique et d'autre part de s'affranchir de la nécessité de travailler à partir de cellules en division, c'est-à-dire vivantes à leur arrivée dans les laboratoires. Les avancées les plus récentes de la cytogénétique moléculaire concernent la possibilité de rechercher des désordres génomiques non plus directement par l'observation chromosomique mais par l'utilisation directe de L'ADN brut lors de techniques d'hybridation génomique comparative (CGH) parmi lesquelles, la micro-CGH, utilisant un support de puces à ADN, jouera très certainement un rôle majeur. La cytogénétique humaine ne s'affranchira néanmoins jamais des techniques de cytogénétiques classiques, qui sont les seules à pouvoir diagnostiquer des remaniements équilibrés du génome. Ainsi, la cytogénétique moderne, alliant l'utilisation de techniques classiques à d'autres plus modernes et situées à la limite de la biologie moléculaire, devrait-elle tenir une place privilégiée dans l'identification de nouveaux gènes responsables des maladies héréditaires ou acquises.

INTRODUCTION

Il serait tentant de croire que la cytogénétique, science de l'étude des chromosomes à l'échelle du microscope photonique, deviendrait une discipline obsolète avec l'achèvement du séquençage du génome humain. En effet, comment imaginer que l'observation des chromosomes à un grossissement $\times 1\ 000$, donnant un pouvoir de résolution maximum de 4 à 5 mégabases, pourrait résister à des techniques de biologie moléculaire capables de discerner des anomalies d'une paire de bases et disposant de la totalité de l'alphabet constituant notre génome ? L'avenir de la cytogénétique paraissait alors devoir se cantonner au simple diagnostic routinier des anomalies chromosomiques classiques, comme les aneuploïdies, pour lesquelles la mise en oeuvre de techniques moléculaires lourdes ne semblait pas adéquate et, ce, pour des raisons strictement économiques. En fait, il s'avère que non seulement la cytogénétique ne risque pas d'involuer avec la fin du séquençage du génome mais que ce dernier va permettre au contraire un formidable développement de cette discipline, développement rendu possible grâce aux différentes révolutions technologiques qu'a connues la cytogénétique depuis son avènement il y a bientôt cinquante ans. Le futur de la cytogénétique est maintenant tracé dans deux directions : d'une part l'étude à un niveau moléculaire de ce qui a toujours été son objet, à savoir les désordres génomiques avec la mesure de leur importance en pathologie humaine, et d'autre part une collaboration toujours plus intense avec la génétique moléculaire pour l'identification des gènes responsables des maladies héréditaires ou de ceux impliqués dans des processus tumoraux.

HISTORIQUE

De son origine, en 1956, jusqu'à nos jours, la cytogénétique n'a cessé de progresser dans l'analyse de son objet d'étude, le chromosome humain. En 1959 était décrite la trisomie 21, première anomalie chromosomique constitutionnelle que les techniques de l'époque avaient permis de diagnostiquer. Basées sur une simple coloration des chromosomes et sur leur classement par les seuls critères de leur taille et de la position de leur centromère, ces techniques ne permettaient que le diagnostic des anomalies de nombre, ou aneuploïdies, et celui des anomalies de structure suffisamment importantes pour pouvoir être repérées à ce niveau d'analyse. Dans les années 1970 apparurent les premières techniques de marquage en bandes, ou banding, qui introduisaient une succession de bandes claires et sombres le long des chromosomes, succession qui était spécifique d'une paire chromosomique donnée et différente d'une paire à une autre. Ces techniques permirent rapidement de préciser des anomalies de structure relativement fines et d'instaurer une nomenclature internationale dans la numérotation des différentes régions chromosomiques. Elles sont toujours à la base de l'étude standard du caryotype pour nombre d'indications. Malgré ces progrès, le fait d'analyser des chromosomes au stade de la mitose où ils sont le plus condensés rendait difficile le diagnostic des anomalies fines de leur structure. De nouvelles techniques, basées sur la synchronisation des cultures cellulaires, rendirent possible l'obtention en grand nombre de chromosomes au stade de la prométaphase, voire de la prophase, c'est à dire à un stade mitotique où ils sont beaucoup moins condensés. Couplées à l'incorporation de composés fluorescents dans la molécule d'ADN au cours de sa synthèse, ces techniques dynamiques permirent d'obtenir des chromosomes marqués beaucoup plus allongés que précédemment et, à la manière d'un ressort qui se déplie, firent passer le nombre de bandes analysables d'environ 400 à plus de mille. Cette méthode d'analyse du caryotype, dite en haute résolution, fut à l'origine de progrès décisifs en cytogénétique sur la description des anomalies très fines du caryotype. Elle est couramment pratiquée pour la recherche des syndromes chromosomiques, notamment en pédiatrie devant la constatation de troubles du développement, de retards mentaux ou de dysmorphies évocatrices. La reconnaissance, et donc le classement, des chromosomes par les techniques cytogénétiques classiques, qu'elles soient en haute résolution ou non, repose sur leur identification par un oeil entraîné et est basée sur un mécanisme psychologique de reconnaissance de formes assez complexe. Ce mécanisme explique les difficultés rencontrées dans la mise au point de dispositifs automatiques de classement, dispositifs qui nécessitent toujours le contrôle humain et qui, en aucun cas, ne sont encore capables de formuler un diagnostic cytogénétique fiable. Au-delà d'un certain degré de décondensation, ce mécanisme d'identification à l'oeil n'est plus possible car les chromosomes apparaissent alors comme une masse de filaments enchevêtrés qui ne présentent plus aucun élément de reconnaissance. La limite de la cytogénétique conventionnelle est alors atteinte par l'analyse de ces chromosomes extrêmement décondensés où chaque bande représente entre 3 et 5 millions de paires de bases de la molécule d'ADN.

LA FISH : UN « SAUT TECHNOLOGIQUE MAJEUR »

Pendant une vingtaine d'années, un fossé infranchissable a donc séparé la cytogénétique, qui offrait une vision globale du génome mais une vision limitée en terme de résolution, et la biologie moléculaire qui, tout en accédant au niveau de la paire de base donc du gène, ne pouvait offrir qu'une approche ciblée, c'est à dire nécessitant la connaissance préalable des séquences d'ADN à étudier.

Ce fossé s'est comblé, dès le début des années 90, grâce à l'utilisation par les cytogénéticiens d'outils de la biologie moléculaire représentés par les sondes. Ces dernières sont des fragments d'acide nucléique spécifiques de régions chromosomiques particulières et peuvent être manipulées, amplifiées et surtout marquées pour permettre leur localisation après hybridation in situ sur des chromosomes préparés de façon classique. Après une période pendant laquelle le marquage des ces sondes se faisait par des techniques utilisant la radioactivité, la simplification de la méthode est venue par leur marquage en fluorescence, d'où le terme d'hybridation in situ fluorescente ou FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) qui qualifie cette technique. Dès lors, la cytogénétique devenait moléculaire et se libérait de deux handicaps majeurs : d'une part son pouvoir de résolution limité et, d'autre part, la nécessité d'obtenir des chromosomes en mitoses c'est-à-dire de travailler à partir de cellules vivantes capables de se diviser. En effet, l'utilisation des sondes pouvait se faire directement sur des noyaux en interphase, stade auquel les chromosomes sont complètement déliés dans le noyau, ouvrant ainsi la voie à ce qu'il est courant d'appeler la cytogénétique interphasique. Ces sondes sont variées (fig. 1). Celles qui marquent les centromères permettent de compter des chromosomes dans des noyaux de cellules non cultivées, c'est à dire directement après le prélèvement comme c'est le cas en prénatal pour les ponctions de liquide amniotique, ou de donner la nature de petits chromosomes surnuméraires non identifiables par les méthodes classiques. Les sondes dites de peinture marquent par définition la totalité d'un chromosome donné et permettent de préciser des remaniements chromosomiques complexes. Les sondes locus-spécifiques, quant à elles, vont pouvoir détecter des anomalies chromosomiques invisibles au caryotype standard, et même au caryotype en haute résolution, et sont à l'origine de la description d'un nombre croissant de pathologies liées à des microdélétions ou des microduplications chromosomiques.

Une place à part doit être faite aux sondes télomériques (fig. 2) qui permettent également de détecter des anomalies cryptiques des extrémités des chromosomes, anomalies dont on sait maintenant qu'elles touchent environ 7 % des enfants avec retard mental et malformations ou dysmorphie. Certains de ces enfants ayant déjà eu un caryotype en haute résolution rendu normal, il est évident que l'utilisation de ces sondes apporte un bénéfice considérable en matière de conseil génétique et de diagnostic prénatal lorsque l'anomalie détectée est due à un remaniement cryptique équilibré chez un des parents. La FISH permet donc maintenant de diagnostiquer des anomalies infra-microscopiques et ouvre ainsi la voie à la génétique moléculaire qui, dans les régions impliquées, va rechercher le ou les gènes dont la perte ou la duplication sont éventuellement responsables du phénotype anormal. Les techniques de FISH profitent aussi continuellement des progrès réalisés dans l'utilisation des fluorochromes pour le marquage des sondes. Ainsi, les techniques de Multi-FISH ou de caryotypie spectrale (SKY) utilisent maintenant des combinaisons de ces fluorochromes dans le marquage de sondes de peinture et sont capables de reconnaître des profils de fluorescences particulières le long des chromosomes. Chaque profil est alors assigné à un chromosome donné et leur transformation en « fausse couleur » facilement reconnaissable permet d'obtenir un caryotype bigarré où chaque paire chromosomique apparaît colorée de façon spécifique. Des chromosomes extrêmement remaniés, comme ceux rencontrés dans les cellules tumorales par exemple, peuvent donc être décortiqués de cette manière, chose qu'il était pratiquement impossible de faire avec les techniques de banding classiques (fig. 3). La constatation, dans les chromosomes d'une tumeur, d'une région particulièrement amplifiée, ou au contraire délétée, est devenue un excellent outil pour dépister les oncogènes ou les anti-oncogènes dont les dérèglements sont à la base de nombreux processus tumoraux.

LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉE AUX DÉSORDRES GÉNOMIQUES

Une évolution particulière des techniques de FISH concerne la possibilité de rechercher des désordres génomiques non plus directement par l'observation des chromosomes d'un sujet malade ou d'une tumeur mais par l'utilisation directe de l'ADN brut, et ceci sans idée *a priori* de la région chromosomique en déséquilibre. Ce dernier point sépare fondamentalement cette technique dite d'hybridation génomique comparative ou CGH (Comparative Genomic Hybridisation), qui reste une méthode de cytogénétique à la base, de l'approche par génétique moléculaire classique qui nécessite la connaissance préalable de la région du génome incriminée pour pouvoir l'étudier. La CGH est basée sur la co-hybridation, en quantité égale, d'un ADN témoin et d'un ADN à tester, tous deux marqués par des fluorochromes différents (fig. 4). Appliqué sur des chromosomes normaux, ce mélange d'ADNs va induire une fluorescence moyenne dont la déviation, dans un sens ou un autre, signera localement soit un gain soit une perte de la région correspondante dans l'ADN à tester. Cette technique présente le très grand avantage de partir directement de l'ADN et permet de diagnostiquer des déséquilibres génomiques de l'ordre de 5 millions de paires de bases, c'est-à-dire l'équivalent d'une bande chromosomique : l'avantage n'est donc pas quantitatif mais qualitatif car la nature de ce déséquilibre sera donnée par la position de la variation de fluorescence sur les chromosomes témoins qui servent alors de révélateur. Si ces chromosomes témoins, avec la limite de résolution qui est inhérente à leur observation au microscope, sont remplacés par des fragments d'ADN connus et immobilisés sur un support physique (puce à ADN), alors la même technique de CGH permet de diagnostiquer des déséquilibres génomiques dont la taille ne dépend que de la distance séparant ces fragments d'ADN « marqueurs » le long des chromosomes. L'avenir de la cytogénétique passe donc par l'analyse de ces puces qui pourront être soit « pan-génomiques », c'est-à-dire couvrant l'ensemble des chromosomes avec une résolution de l'ordre de quelques centaines de milliers de paires de bases, voire moins, soit ciblées sur une partie du génome avec un degré de résolution encore supérieur (fig. 5). Nul doute que l'utilisation des puces apportera son lot de questions, notamment sur le caractère pathologique ou non (polymorphisme dans la population) des déséquilibres ainsi diagnostiqués. La « micro-CGH » devra être alors vérifiée *in situ* sur les chromosomes des patients par des techniques de FISH classiques utilisant comme sondes les marqueurs trouvés en déséquilibre. Ceci impose donc que les laboratoires puissent disposer d'une banque de sondes au moins équivalente au nombre des marqueurs déposés sur les puces. Ces banques de sondes sont le produit direct du séquençage du génome humain car constituées de fragments génomiques inclus dans des vecteurs de clonage particuliers [Cosmides, chromosomes artificiels de bactéries ou de phages (BACs ou PACs)].

DE LA CYTOGÉNÉTIQUE CLASSIQUE AU GÈNE : LES PATHOLOGIES DE POINTS DE CASSURE CHROMOSOMIQUES

Si la cytogénétique classique est intrinsèquement limitée par son niveau de résolution, elle offre toujours cependant un avantage considérable qui est de pouvoir diagnostiquer des remaniements équilibrés du génome. Ceux-ci, translocations, inversions ou insertions, sont le plus souvent diagnostiqués chez des sujets sains

consultant pour des problèmes de fertilité ou liés à la transmission déséquilibrée du remaniement à la descendance entraînant fausses couches à répétition ou naissance d'un enfant handicapé. Rarement, mais de façon extrêmement intéressante, les anomalies équilibrées du caryotype s'accompagnent d'un phénotype anormal correspondant à une maladie héréditaire connue mais non encore élucidée quant à son origine et ce phénotype peut alors être mis sur le compte d'une microdélétion ou de la cassure d'un gène d'intérêt au niveau de l'un des points de cassure chromosomique. Une telle constatation est actuellement le moyen le plus fréquent de diagnostiquer les gènes responsables des maladies héréditaires non encore étiquetées : en effet, la génétique moléculaire, par les méthodes de génétique inverse, a besoin de nombreuses familles informatives pour mettre en oeuvre des études de liaisons et réduire ainsi au minimum la région génomique dans laquelle doit se situer le gène responsable de la maladie étudiée avant de le rechercher dans les banques de données issues du séquençage du génome. Ces familles ne sont pas nombreuses et ont déjà été étudiées pour beaucoup d'entre elles ce qui oblige les généticiens à élargir leur champ d'action géographique en établissant des collaborations internationales pour pouvoir recruter de nouveaux patients et de nouvelles familles. La cytogénétique, quant à elle, peut permettre dans certains cas de court-circuiter cette démarche. Après un repérage le plus précis possible de la région chromosomique impliquée dans le remaniement, et ce par des méthodes de cytogénétique classique en haute résolution, une marche sur le chromosome est effectuée en FISH avec des sondes. Ces dernières sont choisies dans les banques de données du génome humain et reçues dans les laboratoires sous la forme de cultures de bactéries ou de levures recombinantes les contenant. Après extraction et marquage de l'ADN, ces sondes sont hybridées sur les chromosomes transloqués. Le passage d'une de ces sondes du chromosome où elle devrait se situer normalement sur le chromosome transloqué de l'autre paire indique que le point de cassure a été dépassé. En resserrant l'intervalle entre les sondes, il est alors possible de déterminer exactement l'endroit où se situe ce dernier, l'idéal étant bien sûr de trouver une sonde cassée en deux par la translocation et générant alors trois signaux fluorescents : deux sur le chromosome normal et le chromosome transloqué de la paire d'origine et un sur le chromosome transloqué de l'autre paire (fig. 6). Il suffit ensuite de rechercher dans les banques issues du séquençage humain les gènes de cette région potentiellement en rapport avec la pathologie étudiée et d'aller étudier un ou plusieurs d'entre eux pour trouver des mutations ponctuelles dans les familles de malades sans translocation. La découverte de telles mutations signe en effet l'implication directe d'un gène dans la maladie. A condition d'avoir de tels patients, cette méthodologie est donc une approche extrêmement intéressante des maladies héréditaires et représente un vaste champ de collaborations entre les cytogénéticiens et les généticiens cliniciens et moléculaires. La même démarche prévaut dans l'étude des gènes impliqués dans les processus tumoraux, notamment hématologiques où les remaniements chromosomiques récurrents sont utilisés depuis longtemps pour classer les maladies, adapter les traitements et établir les pronostics. Le clonage des points de cassure de ces remaniements permet maintenant de trouver les oncogènes, anti-oncogènes ou gènes de fusion impliqués et d'espérer des traitements plus efficaces. L'exemple typique est celui de la translocation t(9;22) de la leucémie myéloïde chronique dans laquelle l'anomalie chromosomique aboutit à la constitution d'un gène chimère BCR-Abelson codant pour une protéine de fusion transformante qui possède une activité tyrosine-kinase et contre laquelle un médicament, le Gleevec, a pu être mis au point.

UN AVENIR PROMETTEUR

Ainsi, la cytogénétique moderne, tout en conservant un ensemble de techniques classiques pour les diagnostics de routine, se place maintenant au niveau de la biologie moléculaire. Elle conserve cependant sa spécificité car elle est capable de diagnostiquer à la fois des déséquilibres génomiques allant de la trisomie 21 à la délétion ou la duplication d'un gène mais aussi, et surtout, des anomalies équilibrées du génome. La grande majorité des examens génétiques réalisés actuellement est en fait constituée d'examen cytogénétiques. L'évolution des techniques de cytogénétique moléculaire permet d'affiner sans cesse le niveau de résolution de l'analyse chromosomique comme cela est parfaitement illustré par l'utilisation des sondes télomériques chez les enfants présentant un retard mental chez lesquels une anomalie cryptique est détectée dans 6 % à 8 % des cas. Avec les futurs moyens d'investigation comme la CGH-Array, on estime que cette fréquence pourrait s'élever à 30 % ou 40 %. Puisque ces enfants seront initialement adressés pour caryotype à des services de cytogénétique, il appartient à ces derniers de maîtriser ces nouvelles techniques, qui se situent à la limite de la biologie moléculaire, pour espérer développer une recherche fructueuse dans l'identification des gènes responsables des maladies héréditaires.

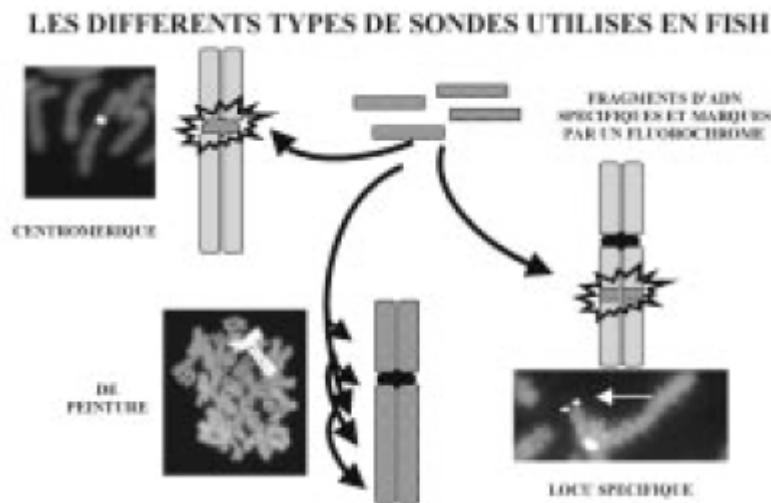


Figure 1. Les sondes utilisées en cytogénétique moléculaire appartiennent à trois catégories. Les premières reconnaissent les séquences répétées des centromères de façon spécifique sauf pour certaines paires chromosomiques comme le 13 et le 21 ou le 14 et le 22. Les secondes, dites de peinture, sont constituées d'une multitude de petites sondes qui vont reconnaître chacune une région d'un chromosome donné aboutissant ainsi à une couverture quasi-totale de ce chromosome. Enfin, les sondes locu-spécifiques, comme leur nom l'indique, vont marquer un endroit bien précis des chromosomes.

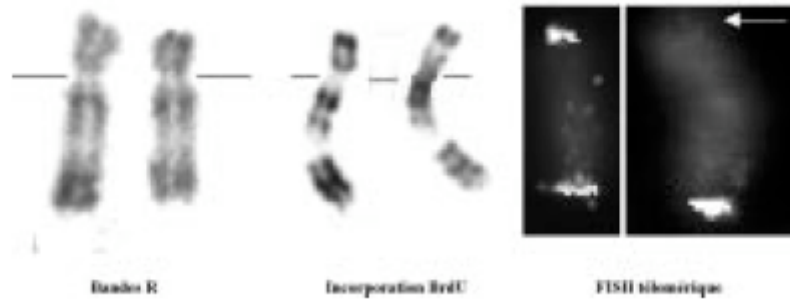


Figure 2. Illustration de la précision diagnostique apportée par la FISH télomérique : délétion du bras court du chromosome 12 invisible par les techniques classiques (bandes R ou incorporation de BrdU) mise en évidence uniquement par l'emploi de sondes télomériques (flèche).

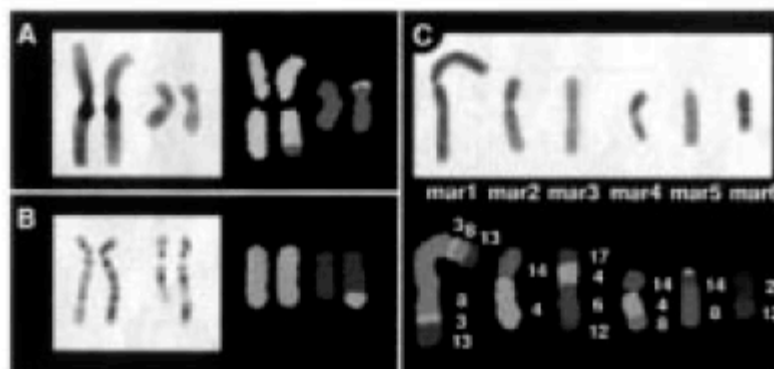
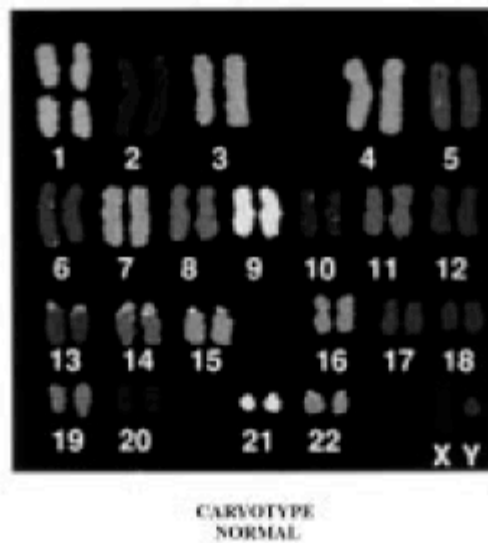


Figure 3. Un des aspects les plus spectaculaire de la cytogénétique moléculaire est donné par le caryotype spectral (SKY) où chaque paire chromosomique est reconnue par des sondes de peinture marquées par des combinaisons spécifiques de fluorochromes. Après reconnaissance du spectre de fluorescence émis et transformation en fausse couleur, chaque paire de chromosomes apparaît colorée différemment. Cette technique est surtout utile pour élucider les caryotypes très complexes.

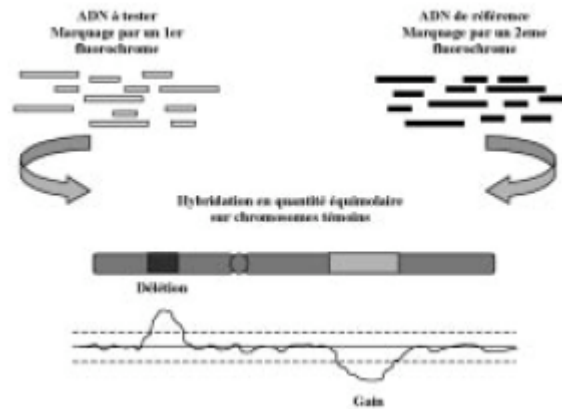


Figure 4. Schéma de la technique de CGH. Les déviations de fluorescence enregistrées sur les chromosomes « révélateurs » traduisent la non équiprobabilité d'hybridation des deux ADN en rapport avec des pertes ou des gains de matériel chromosomique de la région concernée dans l'ADN à tester

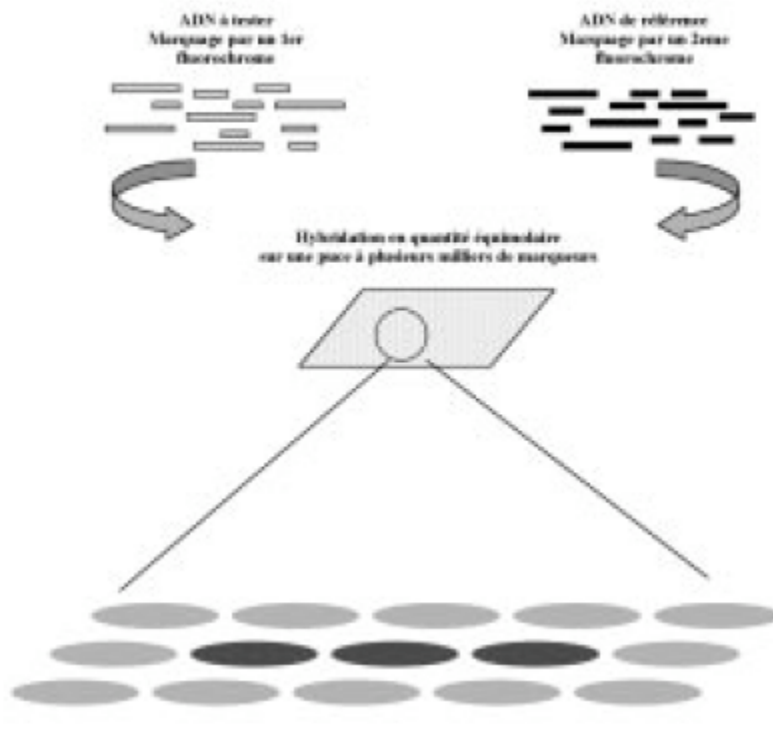


Figure 5. La même technique, appliquée non plus à des chromosomes « révélateurs » mais à des puces pouvant contenir l'ensemble du génome fragmenté en plusieurs milliers de segments (CGH-Array), permet de diagnostiquer des déséquilibres génomiques avec une précision qui dépend uniquement de la taille et de l'espacement des marqueurs déposés sur la puce.

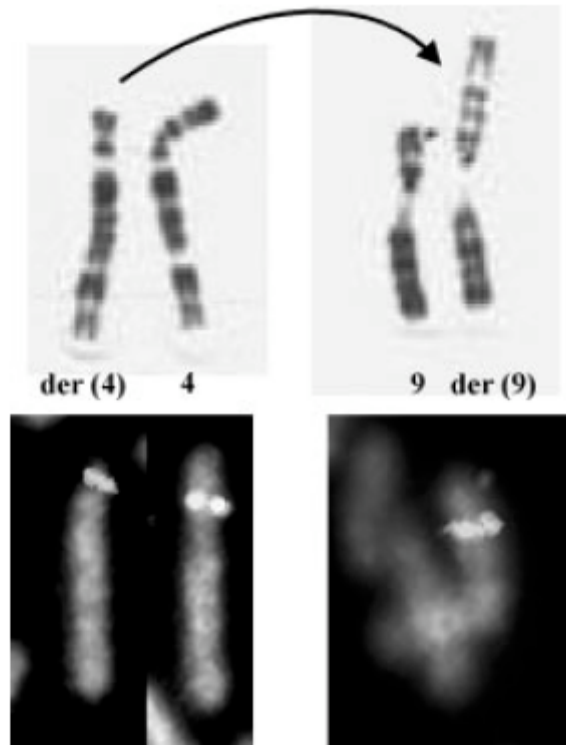


Figure 6. Exemple d'une translocation $t(4;9)$ dont le point de cassure a été déterminé à l'échelon d'un BAC qui se retrouve cassé en deux par le remaniement chromosomique.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTSON D.G., P6 D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, **12**, 145-152.
- BELAUD-ROTUREAU M.A., ELGHEZAL H., BERNARDIN C., SANLAVILLE D., RADFORD I., WEISS I., RAOUL O., VEKEMANS M., ROMANA S.P. Spectral karyotyping (SKY) principle, advantages and limitations. *Ann. Biol. Clin.*, 2003, **61**, 139-146.
- DONNENFELD A.E., LAMB A.N. Cytogenetics and molecular cytogenetics in prenatal diagnosis. *Clin. Lab. Med.*, 2003, **23**, 457-480.
- JAFFRAY J.Y., GIOLLANT M., PERISSEL B., VAGO P. From "monocolor" karyotype to "multicolor" karyotype: applications of M-FISH in hematology and oncology. *Bull. Cancer*, 2002, **89**, 174-180.
- KING W., PROFFITT J., MORRISON L., PIPER J., LANE D., SEELIG S. The role of fluorescence in situ hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. *Mol. Diagn.*, 2000, **5**, 309-319.
- LIEHR T., CLAUSSEN U. Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr. Mol. Med.*, 2002, **2**, 283-297.
- NIETZEL A., ROCCHI M., STARKE H., HELLER A., FIEDLER W., WLODARSKA I., LONCAREVIC I.F., BEENSEN V., CLAUSSEN U., LIEHR T. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum. Genet.*, 2001, **108**, 199-204.
- TACHDJIAN G., ABOURA A., LAPIERRE J.M., VIGUIE F. Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization. *Ann. Genet.*, 2000, **43**, 147-154.
- VELTRAM J.A., SCHOENMAKERS E.F.P.M., EUSSEN B.H., JANSSEN I., MERKX G., VAN CLEEF B., VAN RAVENSWAAIJ C.M., BRUNNER H.G., SMEETS D., VAN KESSEL A.G. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, **70**, 1269-1276.
- WEISS M.M., HERMSEN M.A.J.A., MEIJER G.A., VAN GRIEKEN N.C.T., BAAK J.P.A., KUIPERS E.J., VAN DIEST P.J. Comparative genomic hybridization. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, 1999, **52**, 243-251.
- XU J., CHEN Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am. J. Med. Genet.*, 2003, **117C**, 15-24.