10ème Bulletin de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française



1997

Editorial

Présidente :
Catherine Turleau
Vice-présidents :
Anne-Marie Capodano
Jean-Louis Taillemite
Jacqueline van den Akker
Sylvain Briault
Secrétaire général:
François Picard
Trésorier :
François Thépot

Avec l'augmentation des actes de diagnostic prénatal due au remboursement des marqueurs sériques maternels et face aux problèmes juridiques que peuvent être amenés à rencontrer certains cytogénéticiens, l'ACLF s'interroge et tente de fixer des règles de bonne conduite et d'établir des standards de qualité.

Sommaire

- CR de la réunion du 19 Mars
- A propos des marqueurs sériques
- Informations diverses

COMPTE-RENDU DE LA REUNION DU 19 MARS

***

La réunion de l'ACLF du 19 Mars, qui s'est tenue à l'hôpital Saint Antoine comportait deux thèmes principaux : - les aspects techniques du diagnostic prénatal ,- les problèmes juridiques liés à l'activité de cytogénétique.

ASPECTS TECHNIQUES DU DIAGNOSTIC PRENATAL.

I - Standard de qualité en Europe : compte rendu de la réunion de Louvain

R Saura, CHU de Bordeaux.

A la réunion de travail de Louvain qui eut lieu du 8 au 10 novembre 1996, 24 généticiens de 15 pays Européens (une majorité de cytogénéticiens et quelques biologistes moléculaires), se sont rencontrés pour discuter des standards minimums de qualité pour le diagnostic prénatal. Le but de cette rencontre était d'élaborer un manuel de références utilisable, en Europe et en particulier dans les pays ne disposant pas de standard national de qualité, par les Centres de diagnostic prénatal afin de maintenir un bon niveau des résultats.

Chacun des représentants a rapporté quelles étaient pour son pays, les modalités de la réalisation du conseil génétique, de la cytogénétique, de la biologie moléculaire, et l'évaluation de la qualité dans le domaine du prénatal.

La réunion de travail a été limité à une discussion sur l'évaluation des procédures invasives pour le diagnostic prénatal par la cytogénétique et la biologie moléculaire. La question du dépistage de la trisomie par les facteurs sériques maternels et les investigations en cours d'évaluation comme les cellules foetales dans le sang maternel ou les techniques d'hybridation in situ n'ont pas été discutés. Il faut espérer que de futures discussions concernant tous les aspects de la génétique clinique et biologique aboutiront à la mise en place d'un guide commun pour tous les pays de la communauté Européenne.

Le guide des bonnes pratiques pour le diagnostic prénatal devrait être publié dans la revue: *European Society of Human Genetics*.

☞ A la suite de cet exposé, une discussion s'engage sur les normes à adopter en France et sur d'éventuels contrôles de qualité. Bérangère de Martinville mentionne les normes instaurées aux USA. Décision est prise d'organiser un groupe de travail coordonné par Sylvie Girard-Orgeolet afin d'établir des normes françaises. Il conviendrait d'envisager non seulement le

nombre de métaphases examinées, caryotypées, le nombre de clones sélectionnés et l'ensemble des standard minimum pour la technique elle-même mais aussi l'archivage, et les modalités de réponse (voir page n°14: groupes de travail).

II Problème de formation des cytogénéticiens

J-L Taillemite attire l'attention sur la suppression du certificat de cytogénétique.

Une décision ministérielle vient en effet de supprimer la plupart des certificats de biologie humaine pour les remplacer par une dizaine de certificats de préparation à la recherche. Initialement ces certificats avaient pour objectif la préparation à un DEA mais ils avaient été un peu détournés de ce but initial.

Le certificat de cytogénétique était jusqu'à présent considéré comme nécessaire pour obtenir l'autorisation ministérielle d'effectuer des diagnostics prénatals cytogénétiques. Aucune formation analogue n'est actuellement prévue.

Le DESC est très limité dans la mesure où la deuxième année ne peut se faire qu'avec un poste d'assistant ou avec au moins six vacations par semaines. Rares sont les laboratoires universitaires ayant actuellement des DESC en cours. Le DES dans sa formule actuelle ne semble pas pouvoir donner la même formation, en particulier dans la mise en pratique des techniques cytogénétiques. Un DESS ou un DIU pourraient être proposés.

III Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques.

Par arrêté en date du 23 Janvier 1997, le remboursement des marqueurs sériques en vue d'un diagnostic prénatal de trisomie 21 est désormais remboursé ainsi que l'amniocentèse dans les cas où le calcul de risque atteint 1/250, risque communément admis pour les femmes de 38 ans. Un fascicule vient d'être récemment adressé à tous les médecins afin de les informer sur l'utilisation des marqueurs sériques ainsi que de la nécessité d'informer les femmes enceintes, quel que soit leur âge, de la possibilité de recourir à cet examen si elles le désirent, et en gardant toute latitude de ne pas le demander.

Cette décision ministérielle aura des répercussions différentes selon les régions. Le recours aux marqueurs sériques est actuellement extrêmement variable. Mais il va, de toute manière, augmenter considérablement la charge des laboratoires de diagnostic prénatal cytogénétique. Pour certains laboratoires publics qui ne peuvent financièrement accroître leur personnel ni leur équipement, cet surcroît de travail ne pourra sans doute pas être assumé,

bien qu'il soit de l'intérêt de tout CHU de disposer d'un laboratoire de cytogénétique de qualité, en équilibre avec les laboratoires privés de la région.

PRESENTATIONS DUR LE THEME

Marqueurs sériques maternels dans le dépistage de la trisomie 21 et autres anomalies du caryotype. Résultats d'une étude prospective utilisant hCG et oestriol non conjugué et portant sur 83772 gestations.

Nathalie Leporrier - CHU Caen.

L'arrêté du 23 Janvier 1997 modifiant celui du 3 Avril 1985 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale, fait apparaître une sixième indication au caryotype foetal "grossesse à risque de trisomie 21 foetale égal ou supérieur à 1/250, le risque ayant été estimé après dosage d'au moins deux marqueurs sériques maternels, dont l'hCG3. Cet arrêté va contribuer à augmenter de façon considérable l'activité des laboratoires de cytogénétique. Nous rapportons ici notre expérience menée à Caen depuis plus de 7 ans. Nous avons débuté en Janvier 1990 une étude prospective utilisant deux marqueurs : l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) et l'oestriol non conjugué (uE3) associé à l'âge maternel.

Un tel protocole a été recommandé sur les résultats d'une étude rétrospective publiée par Wald et Cuckle en 1990, pour les centres qui ne mesurent pas systématiquement l'alpha foetoproteine (aFP) or le dépistage des défauts de fermeture du tube neural et choisissent d'utiliser 2 marqueurs au lieu de 3.

Notre étude prospective a été conduite en collaboration avec les gynécologues obstétriciens de Basse Normandie, région dont le taux de natalité est d'environ 20.000 naissances par an. Elle a été financée de 1993 à 1996 par le ministère de la Santé au titre du PHCR (Programme Hospitalier de Recherches Cliniques).

Les dosages avec calcul de risque ont été proposés à toutes les femmes enceintes de moins de 38 ans. Le sang a été prélevé sur EDTA entre 15 et 19 semaines d'aménorrhée et le plasma recueilli après centrifugation. L'âge gestationnel était déterminé à partir de la date des dernières règles, corrigé éventuellement après évaluation échographique du diamètre biparièta au 2ème trimestre ou de la taille du foetus à 10 semaines.

L'hCG (molécule entière) était mesurée par dosage radio-immunologique utilisant le réactif Behring, l'uE3 par un dosage radio-immunologique "maison" sur un extrait brut. Les valeurs de référence pour chaque semaine de gestation de l'hCG et de l'uE3 avaient été établies au préalable sur 3.000 grossesses dont les issues normales étaient connues. Les valeurs de référence des grossesses avec foetus trisomiques 21 étaient tirées de la littérature (F Muller pour l'hCG, Wald pour l'uE3) pour l'élaboration d'un logiciel de

calcul de risque que nous avons utilisé jusqu'en 1993. Ce logiciel a été ensuite modifié en utilisant nos propres valeurs de référence. le calcul de risque utilisé au début de l'étude était donc un calcul approximatif. Toutes les naissances d'enfant trisomiques 21 dans la population des femmes à risque inférieur à 1/250 ont été répertoriées.

Notre étude porte actuellement sur 83.772 gestations et un total de 99 trisomies 21. Rétrospectivement, un calcul de risque précis basé sur nos propres valeurs de référence, donne un taux de dépistage de 64 % (63/99 trisomies 21) pour 5,2 % d'amniocentèses, avec un risque seuil de 1/250.

Le taux de couverture de la population étudiée est supérieure à 50% (plus de 10.000 cas par an). En 1992, une comparaison des tranches d'âge de notre population par rapport à celle des femmes ayant accouché en 1987 dans la région (données de l'INSEE), nous a permis de vérifier la bonne représentativité de la population étudiée et l'absence de biais de sélection lié à l'âge. Ces résultats nous permettent d'évaluer l'efficacité de la méthode par tranches d'âge. Le taux de détection est différent selon la tranche d'âge étudiée. Le calcul du risque est basé sur le risque *a priori* , selon l'âge de la femme et modulé en fonction du taux d'hCG et d'uE3 observés. Ainsi pour un même risque-seuil (1/250), le taux de détection est d'autant plus faible que la population est plus jeune (55% pour les femmes de moins de 30 ans versus 73% pour les femmes de 30 à 38 ans), le taux d'amniocentèses étant également plus faible (4% versus 8%).

Onze anomalies chromosomiques responsables de handicaps sévères, autres que la trisomie 21 ont été dépistées (2 trisomies 13, 3 trisomies 18, 4 délétions ou duplications diverses, 2 triploïdies). Douze anomalies portant sur les chromosomes sexuels (3 Turner, 2 Klinefelter, 2 triplo X, 2 double Y et 3 divers autres) et vingt quatre anomalies chromosomiques dites équilibrées sans conséquence *a priori* sur le phénotype (14 translocations réciproques, 2 translocations robertsoniennes, 8 inversions) ont également été observées au cours de l'étude. Ces anomalies "mineures" du caryotype (anomalies des chromosomes sexuels, anomalies équilibrées), c'est à dire ne justifiant pas de façon systématique une interruption médicale de grossesse, sont source d'anxiété pour le couple. Elles nécessitent une prise en charge non seulement génétique (conseil génétique, caryotype parental souvent) mais également psychologique. Cette difficulté n'est pas propre aux amniocentèses sur marqueurs sériques, puisqu'on la rencontre également pour les amniocentèses effectuées pour âge maternel élevé.

La pratique des marqueurs sériques maternels dans le dépistage d'une population à haut risque de trisomie 21 fait apparaître non seulement des difficultés d'ordre technique (pour nous, cytogénéticiens, elle double l'activité prénatale) mais également d'ordre psychologique et éthique. Pour y pallier, ceci nécessite une étroite collaboration avec les médecins prescripteurs. C'est eux qui doivent procéder obligatoirement à une information soigneuse des femmes préalablement à toute

investigation, à la fois oralement et par un document écrit (inclus dans la brochure distribuée à tous les médecins par le ministère du travail et des affaires sociales). Le médecin prescripteur est responsable de l'information donnée individuellement à chaque femme. Il doit donc connaître parfaitement les implications de la démarche et les résultats attendus. Au cours de ces 7 années, nous avons largement informé les médecins de la région dans le cadre de la formation médicale continue et nous avons constaté, au fil des années, une amélioration sensible du message transmis et une diminution de l'anxiété des femmes.

Les techniques de FISH sur noyaux en interphase en vue de dépister la trisomie 21

J-L Bresson -Besançon

J-L Bresson rappelle un travail de l'équipe de Besançon, publié en 1995 dans les Annales de Génétique, et qui rapportait l'expérience du repérage en prospectif des aneuploïdies des chromosomes X, Y, 13, 18 et 21 par FISH interphasique sur étalements d'amniocytes non cultivés de 630 échantillons de liquide amniotique.

En fonction des résultats de ce travail et malgré les divergences de la littérature, il estime que la FISH est susceptible de fournir dans les trois jours qui suivent la ponction une information diagnostique fiable concernant le nombre des chromosomes correspondant aux sondes sélectionnées pour l'investigation. Elle pourrait constituer une alternative en cytogénétique prénatale et mérite d'être précisément évaluée comme moyen d'une autre conception du diagnostic prénatal, qui ne prétendrait pas à l'exhaustivité, qui ne chercherait à dépister que les anomalies numériques les plus fréquentes (95% des anomalies susceptibles d'entraîner une interruption de grossesse) mais, du fait d'un moindre coût, pourrait être proposé à une plus large population.

Il soumet la proposition, avec d'autres équipes (Pr Rumpler, Dr Croquette) de mettre sur pied une étude multicentrique visant à évaluer la faisabilité technique et la fiabilité du repérage des principales aneuploïdies foetales par hybridation *in situ* interphasique et à tenter d'en apprécier l'impact en terme d'Économie de la Santé.

FISH sur amniocytes non cultivés : expérience du laboratoire MARCEL MERIEUX

Lyon, V. Bellec

Le Laboratoire Marcel MERIEUX a participé à la validation du protocole VYSIS basé sur la détection des aneuploïdies 13, 18, 21, X et Y par la technique de FISH sur amniocytes non cultivés.

L'étude a porté préférentiellement sur les cas anormaux (nous avons donc sélectionné les dossiers à haut risque : risque de trisomie 21 après tests sériques > 1/100, femmes de plus de 40 ans, signes d'appel échographiques fortement évocateurs).
Sont exclus de l'étude les prélèvements de moins de 16 ml, les liquides bruns ou hémorragiques.

Nous avons suivi le protocole complet, à partir de 2 ml de liquide, incluant systématiquement le pré-traitement des lames à la pepsine. Une amélioration par des lavages supplémentaire au 2xSSC permet de réduire le bruit de fond (procédure disponible sur demande).

L'hybridation est faite sur deux lames à l'aide de deux mélanges de sondes (alpha-satellites pour les chromosomes 18, X et Y, et spécifiques 13q14 et 21q22.13 - 21q22.2).
Le comptage des spots est réalisé sur 50 noyaux sur chaque lame.

Les résultats sont confrontés à ceux de la FISH sur amniocytes après culture et à ceux de la cytogénétique (15 cellules à partir de 12 clones minimum, 3 caryotypes).
Nous avons étudié 53 cas d'aneuploïdies et 12 cas normaux : dans les cas d'aneuploïdies, le nombre de noyaux aneuploïdes pour le chromosome concerné est supérieur au seuil de 60% annoncé par VYSIS (minimum 88% pour les trisomies 21, 74% pour les trisomies 18, 94% pour les 45,X), et le taux maximal de noyaux aneuploïdes de 6%.
Les aneuploïdies révélées par FISH ont toutes été confirmées par la cytogénétique.
Un dossier a soulevé le problème d'une contamination par des cellules maternelles (XX par FISH avant culture, XX/XY par FISH après culture, rendu XY en cytogénétique).

Cette technique nous semble intéressante pour la détection urgente d'une aneuploïdie avec un résultat disponible en 48h pour l'obstétricien mais ne doit pas exclure l'étude cytogénétique. Les résultats normaux XX en FISH laissent le doute d'une hybridation de cellules maternelles.

Hybridation in situ et diagnostic prénatal des aneuploïdies

G Viot et M Vekemans,
Département de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris

Les techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) permettent de déterminer avec une très grande spécificité le nombre, la nature et la localisation des séquences d'ADN dans les cellules humaines aussi bien dans les noyaux en interphase que directement sur les chromosomes en métaphase. Cette précision a fait de la FISH un outil de recherche et de diagnostic extrêmement performant. Cependant les sondes sont spécifiques d'une séquence chromosomique donnée, et seule une information concernant ces séquences peut être obtenue. Ceci, nous le verrons, limite considérablement l'utilisation de la FISH au cours du diagnostic prénatal.

La détection des aneuploïdies par la FISH au cours du diagnostic prénatal se fait le plus souvent sur noyaux en interphase de cellules placentaires ou foetales obtenues après choriocentèse ou amniocentèse. Les cellules sont préparées pour l'hybridation *in situ* de sondes spécifiques. Ces sondes peuvent être des cosmides contenant des séquences alphoïdes ou des séquences uniques. Au cours de l'analyse, le nombre de signaux par noyaux est déterminé pour chacune des sondes soit directement au microscope, soit avec l'aide d'un analyseur d'images. Si moins de 20% des cellules possèdent un nombre anormaux de signaux, l'analyse est considéré comme normale pour la sonde utilisée. Si au contraire plus de 80% des cellules examinées possèdent un nombre anormale signaux, l'analyse est considérée comme anormale. Si le nombre de cellules présentant un nombre anormal de signaux se situe entre ces deux seuils, l'analyse est considérée comme équivoque et ne permet pas de conclure.

Cette technique a l'avantage d'être rapide, l'analyse pouvant s'effectuer 48 h après le prélèvement. Cette rapidité d'obtention du résultat constitue l'attrait principal de la technique et se compare favorablement au temps de réponse habituel (7-10 jours) de l'analyse cytogénétique conventionnelle. Enfin, l'absence de culture cellulaire et sa simplicité font de cette technique une approche en théorie peu coûteuse.

L'utilisation de cette technique a donc été préconisée dans les situations suivantes :

1- Une détection rapide (2 jours) et systématique des aneuploïdies les plus fréquentes.

Selon une étude récente, 27% des anomalies chromosomiques détectées par les méthodes de cytogénétique conventionnelles ne sont pas détectées par la FISH. Bien que la grande majorité des anomalies non détectées soit dans le groupe des résultats équivoques, le taux de faux négatifs est beaucoup plus élevé que celui observé par la choriocentèse ou l'amniocentèse. En outre, 18% des analyses échouent en raison de petit nombre de cellules d'une contamination par des cellules du sang maternel, de problèmes techniques d'hybridation ou d'interprétation. Ceci constitue un désavantage de cette technologie en particulier pour la détection des mosaïques.

2- Un résultat rapide lorsque le terme de la grossesse est avancé.

Il apparaît que le nombre de cas équivoque et d'échantillons inadéquats augmente avec le terme de la gestation entraînant par voie de conséquence une diminution correspondante de la sensibilité.

3 - Un résultat rapide en présence d'un examen échographique anormal

L'incidence élevée des anomalies de la structure chromosomique chez les foetus porteurs de malformations détectées à l'échographie est bien documentée. Dans ces conditions, l'intérêt et le bien fondé de réserver 10% de l'échantillon se discute sachant que la totalité de l'échantillon pour une étude en cytogénétique conventionnelle aurait permis d'obtenir un résultat dans un délai de 7 à 10 jours.

4- Un résultat rapide dans les grossesses où les marqueurs sériques sont anormaux.

Aucune étude n'a apporté la preuve de la fiabilité de la FISH dans les grossesses où les marqueurs sériques sont anormaux. En théorie l'étude par FISH apparaît indiquée. Cependant le nombre de cas où on ne peut conclure augmente en fonction de la prévalence des aneuploïdies. Ce manque de sensibilité limite l'application de la technique et son indication reste à démontrer.

5- Un tri des échantillons acceptés dans le laboratoire.

Dans le climat actuel de réduction des dépenses, le coût additionnel entraîné par l'analyse en FISH, lorsqu'aucune information supplémentaire n'est obtenue, apparaît peu justifié.

En conclusion, il semble qu'il y ait peu de cas où la seule étude par FISH puisse s'imposer dans le cadre du diagnostic prénatal des aneuploïdies. En revanche, il semble que dans les cas où le terme de la gestation est avancé et où le foetus est porteur de "malformations pathognomoniques" d'une anomalie chromosomique (hygroma kystique et monosomie X, holoprosencéphalie et trisomie 13, anomalie de position des doigts et trisomie 18) une étude en FISH puisse être indiquée. Fans ces cas, on pourrait concevoir par exemple, qu'une partie de l'échantillon soit utilisé pour l'analyse. Bien entendu, l'utilisation de la FISH est indiquée lorsque le problème de l'identification d'un chromosome marqueur, d'un remaniement déséquilibré ou d'un syndrome microdélétionnel est posé. Ces indications sortent cependant du cadre de notre discussion.

Références

1- Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization. Am J Hum Genet 1993 ; 52 : 854-65.

2- Schwartz S. Efficacy and applicability of interphase fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1993 ; 52 : 851-)3.

3- American College of Medical Genetics : Pernatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) policy statement. Am J Hum Genet 1993 ; 53 526-7.

4- Lubs HA, Elsas LJ, Tharapel AT, et al. Position statement on interphase in situ hybridization prenatal diagnosis. Am J Med Genet 1993 ; 46 : 478.

Philip J, Bryndorf T, christensen B. Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluyorescence in situ hybridization (FISH) Prenat Diagn 1994 ; 14 : 1203-16.

☞ A la suite de ces présentations dont les conclusions ne sont pas totalement concordante, une discussion s'engage sur l'intérêt du dépistage de la trisomie 21 par FISH. Cette technique est simple, peu coûteuse et rapide. Elle peut entraîner toutefois des erreurs et semble devoir être plutôt utilisée, ainsi

que le note JL Bresson, et V Bellec, comme méthode préalable à un examen cytogénétique complet.

Se limiter à ce simple examen soulève un problème éthique, car peu de femmes, même parmi les plus jeunes qui seraient amenées à effectuer une amniocentèse en raison de marqueurs sériques anormaux, accepteraient de faire courir à leur enfant le risque d'un incident de ponction pour un examen aussi limité.

Mais il est possible qu'à l'avenir, la technique FISH sur cellules foetales dans le sang maternel se développe et que des améliorations techniques, avec multiplication des sondes utilisées rendent la technique plus fiable. Pour l'heure, la nécessité d'une évaluation s'impose et un groupe de travail est constitué sur ce thème, coordonné par JL Bresson (voir page n°4 groupes de travail).

♠♠♠

PROBLEMES JURIDIQUES LIES A L'ACTIVITE DE CYTOGENETIQUE

La connaissance de plusieurs procès en cours pour des erreurs de diagnostic chromosomique suscite une inquiétude légitime des cytogénéticiens, et un intérêt accru pour les problèmes juridiques. Cette réunion a été l'occasion de soulever de nombreuses questions, qui dépassent souvent le cadre juridique.

Deux juristes ont participé à cette réunion : Maître Ghislaine PRADO, avocat, et Madame HARICHAUX, maître de conférence à Paris II et directrice des études a l'IEJ.

Les différentes juridictions devant lesquelles un médecin peut être amené à comparaître ont été rappelées, ainsi que les procédures qui en découlent. Ces juridictions sont différentes selon le type d'exercice, public ou privé. Les médecins libéraux exerçant dans une structure privée peuvent être amenés à comparaître devant une juridiction judiciaire **civile** ou **pénale**. La procédure civile vise à indemniser la personne victime d'une erreur médicale, alors que la procédure pénale a pour rôle de réprimer et de punir l'auteur d'une infraction. Les chefs d'accusation au pénal peuvent être homicide ou blessure involontaire par maladresse, inattention ou négligence, violation du secret professionnel, non assistance à personne en danger, etc... Pour les médecins hospitaliers, le médecin n'agit que comme agent avec les moyens que lui donne l'hôpital. C'est l'administration qui est responsable, et les problèmes éventuels relèvent des juridictions administratives, sauf faute personnelle détachable du service.

La notion d'obligation de moyens ou de résultat est basée sur la notion d'aléas. Pour les analyses courantes (ex : NFS), il y a obligation de résultat ; pour des analyses plus complexes, comme le caryotype, où il y a un risque potentiel d'erreur, il y a obligation de moyens. L'erreur de diagnostic n'est pas une faute en soi, mais seulement en cas d'erreur grossière par manque de compétence, inattention, etc... Les moyens à mettre en oeuvre sont définis par la pratique courante.

Une nouvelle jurisprudence renforce **la notion d'obligation d'information,** et introduit dans ce domaine la présomption de faute. C'est au médecin de faire la preuve qu'il y a bien eu information.

* Vous pouvez trouver différents textes concernant la génétique dans le livre de Madame **HARICHAUX : La Protection des Libertés et Droits Corporels.** Préparation au CRFPA. Libertés et Droits Fondamentaux. Montchrestien. 1996.

✦✦✦

LA MEIOSE NORMALE ET LES ANOMALIES MEIOTIQUES

M.R.GUICHAOUA
Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction
Faculté de Médecine de Marseille

Présentation faite lors du précédent colloque (Sept 1996).

Tous les travaux qui ont été consacrés à l'étude du comportement méiotique des chromosomes normaux et plus encore des réarrangements chromosomiques illustrent combien est important pour la cellule germinale et pour l'embryon la nécessité:

-d'un génome intact qui va contrôler le déroulement d'une série d'événements parfaitement ordonnés qui constituent le programme méiotique

-du fonctionnement correct des chromosomes qui peuvent être soumis à l'influence d'autres facteurs que les facteurs génétiques.

Bien que la méiose soit répandue dans toute les espèces animales et végétales à reproduction sexuée, certaines espèces ont contribué plus largement que d'autres à la connaissance de la méiose (maïs, levure, drosophile, souris et Homme).

C'est surtout vers l'espèce humaine que se porte maintenant l'attention des chercheurs: en effet, l'étude du comportement des chromosomes méiotiques présente un intérêt croissant depuis l'avènement des techniques de procréations médicalement assistées qui permettent d'accéder à l'ovocyte II. Par ailleurs la technique d'ICSI (injection intra cytoplasmique des spermatozoïdes) qui rend possible l'obtention d'embryons avec des spermatozoïdes de patients présentant des oligoasthénotératospermies sévères, pose le problème du risque de transmission d'une mutation paternelle à l'embryon.

Schéma général de la méiose

La méiose est définie comme la succession de deux divisions cellulaires précédées par une phase unique de réplication de l'ADN. Au cours de ces deux divisions le nombre de chromosomes est divisé par 2 (2n à n chromosomes) et l'on obtient 4 cellules haploïdes à partir d'une cellule qui subit la méiose; le capital génétique est divisé par 4 (4C DNA à C DNA), il est identique pour toutes les cellules qui entrent en méiose chez un même individu, tandis qu'à la fin de la méiose les possibilités sont infinies du fait du brassage de l'information génétique qui se produit au cours de la première division.

Avant le démarrage de la méiose, le noyau des cellules germinales contient deux exemplaires de chaque chromosome appelés homologues, ayant chacun une seule chromatide. Au cours du stade préleptotène se produit la dernière synthèse d'ADN précédant la méiose, à la fin de cette phase chaque chromosome présente 2 chromatides soeurs étroitement liées l'une à l'autre au niveau de leurs bras et de leur centromère.

La première division méiotique comprend une **prophase** très longue qui occupe plus de 90% de la durée de la méiose et se subdivise en 5 stades:

* un stade *leptotène* marqué par la condensation des chromosomes
* un stade *zygotène* correspondant au début des appariements des chromosomes homologues
* un stade *pachytène* au cours duquel les homologues sont complètement appariés sous la forme de bivalents. Lors de ce stade se déroulent les phénomènes de recombinaison génétique
* un stade *diplotène* marqué par la dissociation des bivalents, les chromosomes homologues restant reliés par les chiasmas
* la *diacinèse*, étape de transition vers la métaphase I.

Lors de **l'anaphase I**, la résolution des chiasmas entraîne la séparation des homologues qui migrent chacun à un pôle opposé de la cellule. En même temps, les chromatides soeurs se séparent au niveau de leurs bras mais restent attachées au niveau de leur centromère. Après la **télophase I**, il n'y a pas dans l'espèce humaine d'intercinèse ni de prophase II, la cellule passe directement à la **métaphase II**; puis il y a clivage des centromères au début de **l'anaphase II**, ce sont des chromatides qui migrent vers les pôles et la méiose s'achève à la **télophase II**.

Appariement des chromosomes homologues (synapsis)

Les mécanismes qui gouvernent l'appariement des chromosomes au cours de la prophase de la première division méiotique sont encore mal connus. La reconnaissance entre chromosomes homologues se ferait dès le début du stade leptotène au niveau des sites prévus pour les cassures doubles brin de l'ADN qui initient la recombinaison génétique. En même temps, on voit apparaître sur chaque chromosome un axe protéique: le futur élément latéral du complexe synaptonémal. Puis le synapsis est initié au niveau des télomères des chromosomes et s'étend progressivement à toute leur longueur; lorsqu'il est achevé, les homologues sont reliés entre eux par une structure protéique appelée *complexe synaptonémal (CS)* en forme de rail, constitué de deux éléments latéraux et d'un élément central.

La chromatine des éléments ainsi appariés forme des boucles dont la base est fixée à l'élément latéral du CS, à ce niveau les chromatides soeurs sont à la fois liées entre elles et attachées au complexe synaptonémal. Les segments chromosomiques constituant la base des boucles contiennent un excès de séquences microsatellites et des fragments de séquences LINE et SINE.

Les complexes synaptonémaux sont présents du stade zygotène au stade diplotène de la prophase I. Les travaux récents suggèrent que la formation des CS résulte de l'initiation de la recombinaison génétique par l'introduction des cassures double brin. Ainsi pour Lewin, le CS serait plutôt une conséquence que la cause de la recombinaison génétique. Des observations chez l'homme vont dans le sens de cette proposition:

-la constriction secondaire du chromosome 9 se présente sous forme de paramères avec absence de CS en microscopie électronique.

-chez les patients XYY, il se forme au stade pachytène un bivalent YY avec un CS qui n'intéresse jamais les bras longs hétérochromatiques.

La formation des complexes synaptonémaux peut être perturbée par la présence d'anomalies chromosomiques et de mutations géniques.

-1- **Les anomalies chromosomiques.** Elles peuvent être responsables de retard d'appariement des homologues, d'absence d'appariement plus ou moins étendue (asynapsis) ou d'appariement hétérologue (hétérosynapsis).

a) ***les inversions péricentriques.*** Un *retard d'appariement* est fréquent au niveau des segments inversés; à ce niveau le synapsis débute au cours du stade pachytène alors que les autres chromosomes et les segments chromosomiques situés de part et d'autre des points de cassure sont déjà complètement appariés. Dans d'autres cas, on peut observer au niveau des segments inversés soit un *asynapsis,* soit un *hétérosynapsis* primitif ou secondaire à la boucle d'inversion.

b) ***les translocations.*** Un *asynapsis* est fréquemment observé dans la région des points de cassure. Ce défaut d'appariement peut être directement responsable d'un arrêt de la gamétogenèse: chez l'homme il se manifeste par une oligospermie plus ou moins sévère; dans l'ovaire foetal de souris de nombreux ovocytes présentent des défauts d'appariements, ce phénomène pourrait relié au taux élevé de dégénérescence ovocytaire pendant la vie intra-utérine. Chez la femelle adulte les asynapsis seraient responsables de la diminution de la taille des ovaires, du nombre des cellules germinales et de la taille des portées.

Cependant il est bien connu, dans le cas des translocations n'impliquant que des autosomes, que la spermatogenèse est beaucoup plus sévèrement atteinte que l'ovogenèse, ces anomalies se manifestant plutôt par une infertilité chez l'homme et par des avortements à répétition chez la femme. Il a donc été proposé que l'asynapsis pouvait agir indirectement sur la spermatogenèse, par l'intermédiaire d'une association spécifique entre les régions non appariées de la figure de translocation et les segments non appariés des chromosomes X et Y dans la vésicule sexuelle (VS). Cette *association VS-autosome* a été observée chez la souris comme chez l'homme et l'arrêt de la spermatogenèse pourrait être la conséquence d'un désordre métabolique résultant de l'interaction entre une chromatine sexuelle inactive et une chromatine autosomique transcriptionnellement active.

2- les mutations méiotiques. La plupart des travaux réalisés dans la domaine des mutations méiotiques ont été faits chez la levure *saccharomyces cerevisiae.* Chez l'homme, seule l'analyse cytogénétique de la méiose peut dépister la présence d'une mutation méiotique. En effet les hommes porteurs de telles mutations ont pour tout signe clinique et biologique une infertilité liée à des valeurs effondrées du spermogramme. L'histologie testiculaire montre une défaillance non spécifique de la spermatogenèse. L'étude méiotique visualise le comportement anormal de ces chromosomes au stade pachytène: *décondensation* des bivalents, *absence de VS, défauts d 'appariements* des chromosomes.
Ces anomalies d'appariement s'accompagnent d'anomalies de la recombinaison génétique qui vont se manifester à la diacinèse-métaphase I par une *diminution du nombre des chiasmas* avec formation de longues *chaînes chromosomiques, d'univalents* et *de fragmentation des bivalents.* Les métaphases II sont très rares et *fréquemment polyploides.*

Recombinaison génétique et chiasmas

Les chiasmas sont la traduction cytologique des événements recombinaison génétique ou *crossing-over (CO).* Ils en reflètent la fréquence et la distribution.

1- **fréquence des chiasmas:** il n'existe pas de différence entre les deux sexes si on tient compte des bivalents sexuels (50 pour l'homme, 52 pour la femme). La distance interchiasmatique est environ 2% de la longueur du génome, c'est à dire 60 mégabases dans l'espèce humaine.

2- **distribution:** les chiasmas ne sont pas distribués au hasard sur les bivalents. Il existe au moins 1 chiasma par bivalent, c'est le *chiasma obligatoire*, qui garantit la ségrégation normale des chromosomes à l'anaphase I. Ceci est lié
au phénomène *d'interférence chiasmatique* selon lequel la présence d'un CO réduit la probabilité de survenue d'un autre échange dans les régions chromosomiques adjacentes.

Dans de nombreuses espèces, dont l'espèce humaine, il existe une distribution préférentielle des chiasmas au niveau des régions distales des bivalents. Ceci suggère que la recombinaison génétique est initiée soit au niveau des séquences télomériques soit au niveau des séquences microsatellites adjacentes.

3- **chaque chiasma implique 2 chromatides** sur les 4 et seulement les chromatides homologues. Les CO ne se produisent pas entre les chromatides soeurs.

4- les chiasmas apparaissent au stade zygotène et se maintiennent jusqu'à la fin de la métaphase I la résolution des chiasmas se produisant à la transition métaphase I- anaphase I.

5- **rôle des chiasmas:** il est indispensable que les chiasmas se maintiennent pendant toute la durée de la métaphase I car ce sont eux qui vont permettre à chaque unité constituée par un bivalent d'atteindre une configuration stable et convenablement orientée sur la plaque métaphasique, conduisant à une ségrégation normale des chromosomes à l'anaphase. Le démarrage de l'anaphase est retardé jusqu'à ce que toutes les unités chromosomiques aient atteint cette orientation stable bipolaire.

6- **stabilisation des chiasmas:** le CO est nécessaire mais insuffisant pour la maintenance des chiasmas jusqu'à l'anaphase I. Les mécanismes qui assurent la stabilisation des chiasmas sont encore mal connus. Pourraient intervenir:

-des *liens chiasmatiques*, constitués de protéines provenant des CS ou des nodules de recombinaison observés sur l'élément central dés CS. Toute mutation altérant le lien chiasmatique serait responsable de la survenue de non disjonction avec formation de gamètes disomiques mais dont les chromosomes sont normalement recombinés. De telles mutations ont été identifiées chez le maïs, la levure et la drosophile.

-la *cohésion des chromatides soeurs*, établie soit à travers la topologie de la chromatine, soit par des protéines de liaison. Les mutations qui altèrent la cohésion des chromatides soeurs sont responsables de séparations précoces des chromatides (PSSC) à la première division méiotique et de non disjonctions.

D'autres mécanismes pourraient être impliqués dans la survenue **des non disjonctions chromosomiques:**

-Chez la levure et la drosophile il existe une relation entre erreur de recombinaison génétique et non disjonction: les mutations qui diminuent la fréquence de recombinaison augmentent le taux de non disjonctions. Chez l'homme, la non disjonction des chromosomes X et Y s'accompagne d'une absence de recombinaison dans la région pseudo autosomique.

-Toute anomalie du centromère, de la formation du kinétochore, de la polymérisation de la tubuline, des protéines associées au fuseau peuvent perturber la mécanique chromosomique méiotique par anomalie des interactions chromosomes-fuseau et générer l'apparition de gamètes déséquilibrés.

Ségrégation méiotique des translocations réciproques

Le risque de constitution de gamètes déséquilibrés est conditionné par le type de ségrégation à la première division méiotique. Cinq modes de ségrégation ont été décrits: les ségrégations alterne, adjacent I et II, 3/1 tertiaire et échange. Le type de ségrégation va dépendre de plusieurs paramètres:

1) la configuration du quadrivalent à la métaphase I

2) le nombre et la distribution des chiasmas, particulièrement la présence d'un chiasma interstitiel; c'est l'utilisation de la technique d'hybridation in situ en fluorescence (painting chromosomique) sur les métaphases I et II qui a permis d'introduire ce paramètre.

3) l'orientation de la figure de translocation sur le fuseau à la métaphase I.

Conclusion

L'étude cytogénétique de la méiose apporte des renseignements d'une importance fondamentale sur le déroulement normal de ce processus, sur les mécanismes qui altèrent sa progression et sur les modalités de constitution de gamètes aneuploïdes ou polyploïdes; elle est aussi indispensable pour le diagnostic d'un certain nombre de pathologies méiotiques qui se manifestent par une infertilité masculine.

✠✠✠

INFORMATIONS

GROUPES DE TRAVAIL

Les deux groupes de travail proposés à la suite de la réunion du 19 Mars sont les suivants :

Contrôle de qualité : Sylvie Girard
Laboratoire de Cytogénétique, Hopital Saint Vincent de Paul
75674 Paris Cedex 14 Fax 01 40 48 83 47

FISH interphasique : Jean Luc Bresson
Service de Cytogénétique, CHU Hôpital Saint Jacques
25030 Besançon Cedex
Fax 03 81 21 56 15

Quelques références sur les règles de bonne conduite en Cytogénétique :

Quality Assurance and Quality Control in Cytogenetics in : Current Protocols in Human Genetics. Supplement 7, 1995 John Wiley and sons, Inc.
ACMG (American College of Medical Genetics) 1994 Standards and guidelines : Clinical Cytogenetics <laboratories. AMCG, Rockville, Md, USA.

❤❤❤

A LIRE ABSOLUMENT :

➪ le numéro spécial du " European Journal of Human Genetics" : Prenatal diagnosis in Europe, Proceedings of an EUCHROMIC Worshop. Paris, May 23-24 1996, EJHGEU/5 (suppl 1) 1-900 1997.

➪ L'article de Harrigton JJ et al. Nature Genet ; 15 : 345-55, sur la fabrication artificielle de chromosomes humains obtenus pour la première fois et stable en culture depuis plus de six mois : après les YAC, voici les HAC !

➪ Le papier de Smith DJ, *et al. Nature genet* 1997 16 : 28-35, sur la découverte du gène très probablement responsable du retard mental chez le trisomique 21.

❤❤❤

A Collioure est organisé un colloque intitulé "'**Genetics of Human Fertility**" du **4 au 6 Septembre 1997**. Renseignements : Hélène Moutaffian , CHU La Grave, Laboratoire de FIV, 31052 Toulouse, France.
Tel : 05 61 77 78 58 ; FAX : 05 61 69 24 83 ; e-mail : parinaud@cict.fr

ASSOCIATIONS

Association des laboratoires agréés pour le dépistage sérique maternel de la trisomie 21 :

Dans le cadre du dépistage sérique, les 43 laboratoires agréés par le ministère de la Santé et des Affaires Sociales ont souhaité se regrouper en une association. Le but de cette association est de mettre en commun l'expérience et les compétences de chacun pour étudier les problèmes liés à la pratique quotidienne de ce dépistage. Cette information est diffusée auprès des membres de l'ACLF afin qu'ils puissent faire part des difficultés qu'ils rencontrent dans l'application de ce dépistage.

Association des biologistes moléculaires :

Renseignements auprès du Professeur Marc Delpech, service de Biochimie Génétique, Hôpital Cochin, Paris.

Associations de familles d'enfants atteints d'anomalies chromosomiques :

Afin de porter à la connaissance de tous les cytogénéticiens les diverses associations de parents d'enfants porteurs d'anomalies chromosomiques, le bureau serait heureux d'en présenter la liste dans le prochain bulletin. Aussi, nous demandons à ceux qui en auraient connaissance de nous en adresser les coordonnées. Celles-ci seront éventuellement transmises à **Allo-gènes,** centre d'information sur les maladies génétiques.

QUALIFICATIONS

RAPPEL IMPORTANT

☞ Les médecins relevant de l'**ancien régime des études médicales** peuvent jusqu'au **1er Janvier 1998** solliciter leur qualification par la voie de Commissions de qualification.

☞ L'article 2 de la loi du 04/02/95 a prévu la possibilité de solliciter le titre de Médecin spécialiste en Génétique Médicale par la voie des Commissions de Qualification.

Cette procédure intéresse :

✎ Les médecins relevant de l'ancien régime des études médicales, titulaires de la compétence en Génétique médicale,

✎ les médecins relevant du nouveau régime des études médicales, titulaires d'un DES et pouvant justifier de compétences en génétique médicale.

La date limite pour cette demande est fixée au 1er Janvier 2000. L'arrêté du 18/04/96 portant approbation des modifications apportées au Règlement relatif à la qualification des médecins fixe la liste des compétences médicales qui pourront être exercées avec la spécialité de Génétique médicale et qui est la suivante : Anatomie et cytologie pathologiques humaines - Chirurgie pédiatrique - Endocrinologie et Maladies Métaboliques - Gynécologie Médicale - Maladies du sang - Médecine Légale - Médecine du travail - Médecine Exotique - Médecine Thermale et Climatologie Médicale - Obstétrique - Pédiatrie

Résultats de l'enquête sur les anomalies chromosomiques rencontrées lors de l'établissement du caryotype foetal sur signe d'appel biologique, réalisée à l'occasion de la réunion du 19 mars 1997.

sur 16396 caryotypes :

TRISOMIES 21		
libres	201	
par translocation		
14q21q	3	
21q21q	1	
en mosaïque	1	
TOTAL Trisomies 21	206	1,25%
AUTRES ANOMALIES AUTOSOMIQUES		
Triploïdies	7 (dont 1 en mosaïque)	
Trisomies 18	8	
Trisomies 13	4	
Trisomies ou monosomies partielles	12	
TOTAL des autres anomalies autosomiques	31	0,19%
ANOMALIES GONOSOMIQUES		
Klinefelter	14 (dont 1 en mosaïque)	
Turner	6	
Triplo X	8 (dont 2 en mosaïque)	
Double Y	7	
Xq-	1	
47,XYY/45/X	1	
46,X,der(Y)pat	1	
49,XXXXY	1	
TOTAL des anomalies gonosomiques	39	0,24%

ANOMALIES AUTOSOMIQUES ÉQUILIBRÉES

Translocations		
Robertsonniennes		
13q14q	11	
14q15q	1	
Réciproques	31	
Inversions	20	
TOTAL des anomalies équilibrées	63	0,42%
TOTAL DES ANOMALIES	339	2,06%

Enquête réalisée par le Secrétariat de l'ACLF

Laboratoires (40) ayant répondu à notre questionnaire :

AMIENS, ANGERS, BESANÇON, BORDEAUX (LAM), CAEN, CHAMBÉRY, CLERMONT-FERRAND, EPINAL, EVREUX, FORT DE FRANCE, GRENOBLE, LE HAVRE, LE MANS (LAM), LILLE, LIMOGES, LYON (MÉRIEUX), LYON (CHU), MARSEILLE (LA TIMONE), METZ (LAM), NANCY CHU, NICE (MÉRIEUX), NIMES, PARIS : BICHAT, COCHIN, HÔTEL-DIEU, INSTITUT DE PUÉRICULTURE, NECKER, INSTITUT PASTEUR, ST-ANTOINE, ST-VINCENT DE PAUL, REIMS,(CHU), REIMS(LAM) RENNES (CHU), RENNES (LAM), ROUEN, TOULOUSE (LAM), TOULOUSE (CHU), TOURS, VALENCE, VERSAILLES.

Rendez-vous à Rennes les 10 et 11 septembre pour le dixième Colloque.

ANNONCES

Hôpitaux de LYON

Le CHRU de Lyon recherche un médecin cytogénéticien pour prendre la responsabilité hospitalo-universitaire de la cytogénétique (pré et postnatale).

Contact : J.P. MAGAUD - tél : 04 72 11 73 53 -fax : 04 72 11 73 05

INSTITUT PASTEUR - Paris

recherche pour son CENTRE DE BIOLOGIE MEDICALE SPECIALISEE

MEDECIN BIOLOGISTE
spécialisé en Cytogénétique

dans le cadre d'un CDI à temps partiel.

Formation DES de biologie médicale et DESC de cytogénétique humaine ou équivalent.

Expérience indispensable du diagnostic prénatal et si possible du diagnostic moléculaire.

Adresser CV, photo et prétentions à la
Direction des Ressources Humaines (Madame RAYNAL)
28 rue du Docteur Roux - 75724 PARIS CEDEX 15

Pour tout renseignement, merci de téléphoner à
Monsieur GARRIGUE, Directeur du Centre de Biologie Médicale Spécialisée,
au 01 45 68 81 10.