

Université de Sherbrooke

**Étude de l'inactivation des kinétochores à l'aide de deux isodicentriques
du bras long du chromosome Y caractérisés par les techniques de
cytogénétique.**

Par

Marie-Chantal Grégoire

Service de génétique, Département de pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

25 janvier 2008

Mémoire évalué par

Dr Régen Drouin, Département de Pédiatrie, Université de Sherbrooke

Dr Guylain Boissonneault, Département de Biochimie, Université de Sherbrooke

Dre Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, University of Manitoba

*Je dédie ce mémoire à ma mère, qui a été,
bien malgré elle, la cause de mon attrait
pour la recherche. Repose en paix.*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	VII
RÉSUMÉ.....	
MOTS CLÉS	
INTRODUCTION.....	1
HISTORIQUE.....	1
TECHNIQUES CLASSIQUES EN CYTOGÉNÉTIQUE.....	3
<i>Récolte des chromosomes</i>	<i>3</i>
<i>Marquage chromosomique.....</i>	<i>5</i>
Marquage en bandes R et en bandes G.....	6
Marquage en bandes C.....	9
Autres techniques de marquage	11
<i>Techniques de cytogénétique moléculaire</i>	<i>11</i>
Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).....	12
Synthèse <i>in situ</i> amorcée (PRINS).....	15
Autres techniques de cytogénétique moléculaire	16
LES CHROMOSOMES	18
<i>Structure.....</i>	<i>18</i>
<i>Fonction</i>	<i>20</i>
<i>Nomenclature.....</i>	<i>21</i>

LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES	23
<i>Les anomalies de nombre</i>	<i>23</i>
<i>Les anomalies de structure</i>	<i>23</i>
LES CENTROMÈRES ET LES KINÉTOCHORES.....	25
<i>Centromère</i>	<i>25</i>
<i>Chromatine centromérique.....</i>	<i>27</i>
<i>Kinétochore</i>	<i>27</i>
Principales composantes.....	29
Protéines motrices.....	30
Protéines associées à la plaque externe	31
Protéines associées à la plaque interne.....	32
Protéines associées à l'ADN centromérique	32
<i>Centromère, activité du kinétochore et divisions cellulaires</i>	<i>33</i>
<i>Activité du kinétochore et chromosomes dicentriques.....</i>	<i>36</i>
JUSTIFICATIONS DE NOTRE ÉTUDE	39
CHAPITRE 1.....	41
AVANT PROPOS	41
RÉSUMÉ	42
ARTICLE	43
<i>ABSTRACT</i>	<i>44</i>
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>45</i>
<i>MATERIALS AND METHODS</i>	<i>49</i>
<i>Subjects.....</i>	49
<i>Cytogenetic studies</i>	50
<i>Fluorescence in situ hybridization (FISH).....</i>	50
<i>Immunofluorescence</i>	51
<i>Analysis and microscopy.....</i>	52
<i>RESULTS.....</i>	<i>53</i>
<i>Karyotypes.</i>	53
<i>Characterization of the dicentric chromosomes</i>	54

<i>Mosaicism</i>	55
<i>Kinetochores activation</i>	56
DISCUSSION	59
AKNOWLEDGEMENTS	64
REFERENCES	65
DISCUSSION GÉNÉRALE	70
LES CHROMOSOMES Y DICENTRIQUES	70
<i>Mécanisme de formation des chromosomes Y dicentriques</i>	70
<i>Isodicentrique du bras long du chromosome Y</i>	71
<i>Point de cassure</i>	77
<i>Phénotype</i>	77
CARACTÉRISATION DES IDIC(Y)(P11.3) CHEZ LES DEUX PATIENTS ET SYMPTÔMES ASSOCIÉS	80
<i>Mosaïcisme et symptômes</i>	80
<i>Point de cassure et symptômes</i>	81
<i>Inactivation de kinétochores et symptômes</i>	82
INACTIVATION DES KINÉTOCHORES	83
<i>Distance entre les centromères</i>	83
<i>Stabilité mitotique et mosaïcisme</i>	84
<i>La protéine CENP-B et l'inactivation des kinétochores</i>	85
CONCLUSIONS	87
REMERCIEMENTS	89
BIBLIOGRAPHIE	91

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

<i>Figure I.1 Caryotype en bandes G.</i>	8
<i>Figure I.2 Métaphase marquée en bandes C.</i>	10
<i>Figure I.3 Technique FISH utilisant diverses sondes.</i>	14
<i>Figure I.4 FISH sur idic(Y)(p11.3) du patient 1 utilisant des sondes maisons extraites de BACs.</i>	15
<i>Figure I.5 Les différents niveaux de condensation de l'ADN.</i>	19
<i>Figure I.6 Structure d'un chromosome métaphasique.</i>	20
<i>Figure I.7 Nomenclature du chromosome Y.</i>	22
<i>Figure I.9 Représentation schématique des HOR dans le centromère du chromosome Y.</i>	26
<i>Figure I.10 Structure microscopique du kinétochore.</i>	29
<i>Figure I.11 Composantes protéiques du kinétochore.</i>	30
<i>Figure I.12 Schéma représentant l'attachement des microtubules aux kinétochores.</i>	34
<i>Figure I.13 Chromosome dicentrique et division cellulaire.</i>	37

CHAPITRE 1

<i>Fig. 1 Cytogenetic characterization of the dicentric Y chromosomes for both subjects.</i> ..	53
<i>Fig. 2 Schematic representation of the immunofluorescent staining of the short arm of.</i>	55
<i>Fig. 3 DAPI staining (left) with immunofluorescence against CENP-C (right).....</i>	57
<i>Fig. 4 Immunofluorescence against CENP-B on metaphase spreads</i>	58

DISCUSSION GÉNÉRALE

<i>Figure 3.1 Schéma du mécanisme de formation d'un isodicentrique du bras long du chromosome Y.</i>	71
------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Table 1: Clinical features of the subjects.....	49
Table 2. Primary and secondary Antibody Conditions for Immunofluorescence	51
Table 3. Levels of mosaicism in interphase cells of different tissues analyzed using TelVysion Xp/Yp, TelVysion Xq/Yq and CEP X (DXZ1) probes.	56

DISCUSSION GÉNÉRALE

Tableau I. Revue de littérature de tous les chromosomes idicYq depuis 1965	72
----------------------------------------------------------------------------------	----

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
BAC	« Bacteria artificial chromosome » (Chromosome artificiel bactérien)
BrdU	5-bromo-2'-désoxyuridine
CAD	« CENP-A nucleosomes distal » (Distal au nucléosome contenant CENP-A)
CGH	« Comparative genomic hybridization » (Hybridation génomique comparative)
CPC	« Chromosomal passenger complex » (Complexe passager)
FISH	« Fluorescence <i>in situ</i> hybridization » (Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence)
H3K9Me3	Tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9
HOR	« Higher-order repeats » (Répétition de haut niveau)
idic	Isodicentrique
idicYp	Isodicentrique du bras court du chromosome Y
idicYq	Isodicentrique du bras long du chromosome Y

idic(Y)(p11.3)	Isodicentrique du bras long du chromosome Y avec point de cassure en Yp11.3
LINE	« Long interspersed element » (Élément rétrotransposable long répété dans le génome)
mBAND	« Multicolor banding » (Marquage en bandes multicolores)
M-FISH	« Multicolor FISH » (Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence multicolore)
NAC	« Nucleosome associated complex » (Complexe associé au nucléosome)
NOR	« Nucleolar organizing region » (Région organisatrice du nucléole)
PAR1	« Pseudoautosomal region 1 » (Région pseudo-autosomique 1)
pb	Paires de bases
PHA	Phytohémagglutinine
Phase M	Phase mitotique
Phase S	Phase de synthèse
PRINS	« Primed <i>in situ</i> labelling » (Synthèse <i>in situ</i> amorcée)
SINE	« Short interspersed element » (Élément rétrotransposable court répété dans le génome)

SKY « Spectral karyotyping » (Caryotype spectral)

YAC « Yeast artificial chromosome » (Chromosome artificiel de levure)

RÉSUMÉ

Université de Sherbrooke

Étude de l'inactivation des kinétochores à l'aide de deux isodicentriques du bras long du chromosome Y caractérisés par les techniques de cytogénétique.

Par

Marie-Chantal Grégoire

Service de génétique, Département de pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

23 janvier 2009

La cytogénétique est une branche de la génétique qui étudie les chromosomes et leur intégrité ainsi que les conséquences de leur transmission et de leur expression. Plusieurs syndromes et maladies ont pu être expliqués par cette discipline. Certaines anomalies chromosomiques de structure ont d'ailleurs contribué à identifier des gènes, des fonctions de gènes ou à caractériser des structures chromosomiques.

Dans cet ordre d'idées, nous avons utilisé deux isodicentriques du bras long du chromosome Y (idic(Y)(p11.3)) pour étudier la fonction d'une protéine du kinétochore, CENP-B, dans le mécanisme d'inactivation de kinétochore. Pour ce faire, nous avons premièrement fait une caractérisation cytogénétique des deux idic(Y)(p11.3) à l'aide des techniques de cytogénétique classique et de cytogénétique moléculaire. Nous avons ainsi déterminé approximativement le point de cassure des deux isodicentriques, soit en Yp11.3. Comme les deux chromosomes avaient une structure très semblable, mais que les patients présentaient un phénotype clinique très différent, nous avons investigué les niveaux de mosaïcisme dans différents tissus chez les deux patients.

Il est connu qu'un chromosome possédant deux centromères capables de former le kinétochore peut être très instable lors des divisions cellulaires. Ainsi, la cellule a mis au point un mécanisme permettant d'inactiver un des kinétochores du chromosome dicentrique. Une récente revue a proposé que la protéine CENP-B jouerait un rôle dans ce mécanisme. Cependant, comme le chromosome Y ne possède pas la séquence d'ADN liant cette protéine, il était intéressant de vérifier si une inactivation des kinétochores avait eu lieu dans nos idic(Y)(p11.3). À l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine CENP-C, connue comme un marqueur de kinétochore actif, nous avons montré que plus de 40% des chromosomes dicentriques avaient subi une inactivation d'un de leur kinétochore. Enfin, la présence de la protéine CENP-B dans ces kinétochores a été étudiée. Nous avons montré que la protéine CENP-B était présente à tous les autres centromères, sauf ceux de l'idic(Y)(p11.3). Ainsi, nous proposons que la protéine CENP-B n'est pas impliquée directement dans le mécanisme d'inactivation de kinétochore du chromosome Y. Par contre, nous ne pouvons pas exclure qu'elle joue un rôle indirect, soit par une interaction protéine/protéine, soit à une étape en amont dans le mécanisme d'inactivation.

MOTS CLÉS

Chromosome Y isodicentrique

Hybridation *in situ* en fluorescence

Kkinétochore

Immunohistochimie

Centromère

INTRODUCTION

I.1. HISTORIQUE

La cytogénétique est une branche de la génétique qui étudie les chromosomes et leur intégrité ainsi que les conséquences de leur transmission et de leur expression. Le terme «chromosome» a été proposé par Waldeyer en 1888, inspiré des mots grecs *khroma* et *soma*, qui signifient couleur et corps (Waldeyer, 1888). Depuis la découverte, en 1956 du nombre de chromosomes dans les cellules somatiques chez l'humain, la cytogénétique a connu un essor considérable (Tjio et Levan, 1956; Ford et Hamerton, 1956). Les premières anomalies chromosomiques ont été découvertes peu de temps après. La première anomalie de nombre, la trisomie 21, a été découverte par Jérôme Lejeune et son équipe (Lejeune et al., 1959). En 1960, Nowell et Hungerford ont publié une étude montrant la première anomalie de structure, dans ce cas une translocation 9;22 (Nowell et Hungerford, 1960). Avec l'avènement des techniques de marquage chromosomique, permettant d'identifier, de nommer et de vérifier l'intégrité des 23 paires de chromosomes, la cytogénétique devenait un outil indispensable pour comprendre les diverses maladies héréditaires et syndromes jusque-là non expliqués (Caspersson et al., 1968).

La cytogénétique à l'échelle chromosomique apporte une résolution satisfaisante pour les anomalies grossières des chromosomes, mais tous les réarrangements à petite échelle,

microdélétions et autres anomalies fines sont difficiles à mettre en évidence avec les techniques de cytogénétique classique. Cette lacune technique a été corrigée par le développement des techniques de cytogénétique moléculaire, notamment la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Pinkel et al., 1986). La technique FISH permet de déceler des anomalies microscopiques sur les chromosomes et dans les noyaux en interphase. Ainsi, des tissus difficilement analysables par les techniques classiques, par échec de culture ou par difficultés techniques, ont pu être investigués.

Aujourd'hui, nous utilisons encore les techniques de l'époque avec très peu de modifications. La cytogénétique et la cytogénétique moléculaire sont devenues des outils de routine dans le diagnostic et le dépistage de maladies héréditaires ou syndromiques, soit en stade prénatal, soit au cours de la vie. Elles permettent aussi d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes reliés au développement des cancers, des maladies dégénératives ou incurables.

I.2. TECHNIQUES CLASSIQUES EN CYTOGÉNÉTIQUE

La cytogénétique étant l'analyse des chromosomes, certains principes et certaines techniques sont nécessaires à connaître. Quelques unes d'entre elles n'ont subi que très peu de modifications depuis leur découverte, tandis que d'autres sont très récentes et constituent des outils à la fine pointe de la technologie.

I.2.1. Récolte des chromosomes

Étant donné que les chromosomes ne sont récoltables que pendant une très courte période du cycle cellulaire, la technique de récolte vise à obtenir le plus de cellules possible synchronisées en phase mitotique. Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir soit des cellules néoplasiques qui se divisent très rapidement, soit d'établir une culture cellulaire. Les tissus les plus couramment analysés par la cytogénétique sont le sang (cellules lymphocytaires), la peau (cellules fibroblastiques), la moelle osseuse, le liquide amniotique et les villosités chorales.

Certains tissus nécessitent un agent mitogène pour entrer en phase mitotique; c'est le cas des lymphocytes sanguins. Le principal agent mitogène utilisé en laboratoire de cytogénétique est la phytohémagglutinine (PHA). La PHA est une lectine extraite de haricots rouges (*Phaseolus vulgaris*) qui a la capacité de stimuler la division cellulaire chez les lymphocytes en amenant leur transformation lymphoblastique (Nowell, 1960). Les autres tissus classiquement utilisés en cytogénétique se divisent spontanément lorsqu'ils sont mis en culture dans un milieu adéquat.

Pour obtenir le plus grand nombre possible de cellules en phase mitotique, une synchronisation cellulaire peut être faite lors de la culture. Deux principes peuvent être exploités, soit le blocage en phase mitotique à la fin de la métaphase (phase M) par la dépolymérisation du fuseau mitotique, soit le blocage en phase de synthèse de l'ADN (phase S) en créant un déséquilibre dans le pool des nucléotides (Drouin et al., 1988).

- Blocage en phase M : Le blocage en phase M se réalise en utilisant un agent dépolymérisant les microtubules et empêchant la formation de nouveaux tubules. Il inhibe ainsi la formation du fuseau mitotique, empêchant la cellule d'entrer en anaphase et la cellule demeure donc bloquée en métaphase. Le premier agent utilisé pour le blocage en phase M a été la colchicine, qui a été remplacée par la Colcémide®, un agent beaucoup moins toxique pour la cellule (Ford et Hamerton, 1956). L'ajout de Colcémide® est assez efficace pour tous les tissus classiquement analysés.
- Blocage en phase S : La phase S du cycle cellulaire peut être divisée en 2 parties : la phase de réplication précoce et la phase de réplication tardive. Ces deux phases de réplication sont séparées par le point de contrôle (*checkpoint*) intra-S. Le blocage en phase S tire profit de ce point de contrôle. En effet, plusieurs agents chimiques (thymidine, méthotrexate, 5-fluorodésoxyuridine, 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU)) peuvent bloquer les cellules à ce point de contrôle. Ces agents chimiques perturbent la synthèse de certains désoxyribonucléotides triphosphates, ce qui modifie l'équilibre des nucléotides et fait arrêter la cellule au

point de contrôle le plus près. Après quelques heures de synchronisation, l'inhibition peut être relâchée en effectuant quelques lavages. Ainsi, en réalisant chaque étape au bon moment, on peut récolter une bonne quantité de cellules en métaphase (Drouin et al., 1994).

Après avoir cultivé et, si nécessaire, synchronisé les cellules, une récolte doit être exécutée. La première étape de la récolte consiste à faire subir un choc hypotonique aux cellules. Les cellules sont donc resuspendues dans un milieu hypotonique (chlorure de potassium 0.4% ou citrate de sodium 0.8%), ce qui fera gonfler les cellules par osmose et fragilisera la membrane plasmique. Ensuite les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de méthanol et d'acide acétique glacial. Les cellules ainsi fixées sont alors étalées sur des lames en laissant tomber une goutte de la préparation de cellules sur une lame propre. Lorsque la goutte touche la surface de la lame, la membrane plasmique éclate, libérant ainsi les chromosomes. Lors de cette étape, il est très important de contrôler les conditions environnementales (température de la pièce et pourcentage d'humidité) puisque celles-ci auront un effet direct sur la qualité de l'étalement des chromosomes.

I.2.2. Marquage chromosomique

Lorsque les chromosomes sont récoltés et étalés, il est nécessaire de les colorer pour réussir à les identifier et les analyser. Pour ce faire, plusieurs types de marquages chromosomiques ont été mis au point, révélant différents patrons de bandes transversales plus ou moins foncées sur chacun des chromosomes. Ces divers marquages permettent de visualiser différentes parties des chromosomes et ainsi d'en vérifier l'intégrité.

I.2.2.1. Marquage en bandes R et en bandes G

Les marquages en bandes R et en bandes G sont les plus couramment utilisés en laboratoire de cytogénétique. Ces marquages sont complémentaires, c'est-à-dire qu'une bande positive en bandes R sera négative en bandes G (Drouin et al., 1990). Il existe quelques techniques permettant de visualiser ces patrons de bandes, utilisant certaines propriétés des chromosomes.

- La première technique, ainsi que ses dérivées, utilise les propriétés du BrdU lorsque celui-ci a été incorporé à l'ADN lors de la synchronisation cellulaire. C'est une technique de marquage dite dynamique. En effet, tout dépendant si on a utilisé le BrdU comme agent de synchronisation ou de relâche, il aura été incorporé dans différentes bandes chromosomiques. En effet, les bandes R sont répliquées en phase précoce de la phase S (avant le point de contrôle intra-S) tandis que les bandes G le sont en phase tardive de la phase S (après le point de contrôle intra-S). Par la suite, on pourra visualiser le patron de bandes selon 2 techniques différentes. Premièrement, un anticorps dirigé contre le BrdU permettra de visualiser les bandes qui auront incorporé cet analogue (Drouin et al., 1994). Alternativement, l'ADN ayant incorporé du BrdU et ayant été coloré avec du Hoechst a la propriété d'être très sensible aux rayons ultra-violets. Il est donc facile de détruire les bandes contenant du BrdU pour ainsi visualiser les bandes qui n'avaient pas incorporé cet analogue (Drouin et al., 1990). Ainsi, en choisissant à quel moment le BrdU sera incorporé lors de la synchronisation cellulaire ainsi que la technique de révélation des bandes, on peut facilement visualiser les deux types

de patrons de bandes, soit des bandes R ou des bandes G. Un des avantages de ce marquage dynamique est le fait qu'on peut différencier le chromosome X actif du chromosome X inactif d'un caryotype féminin, ceux-ci ne se répliquant pas dans la même partie de la phase S.

- Les bandes R morphologiques peuvent aussi être obtenues par une dénaturation thermique des chromosomes. En effet, les bandes R sont moins sensibles à la chaleur et pourront être colorées à l'aide du Giemsa pour être visualisées (Richer et al., 1983). Ce sont les régions chromosomiques de réplication précoce et sont riches en GC. Elles contiennent la majorité des gènes de ménage et de spécificité tissulaire et contiennent la majorité des séquences SINE (Drouin et al., 1994).
- Les bandes G morphologiques peuvent être obtenues par l'action protéolytique de la trypsine et une coloration au Giemsa (Figure I.1). En effet, un traitement à la trypsine permet digérer préférentiellement les protéines localisées au niveau des bandes R et ainsi de visualiser les bandes G après coloration au Giemsa (Figure I.1). Les bandes G correspondent aux régions chromosomiques de réplication tardive, sont AT riches, contiennent peu de gènes et sont riches en séquences LINE (Drouin et al., 1994).

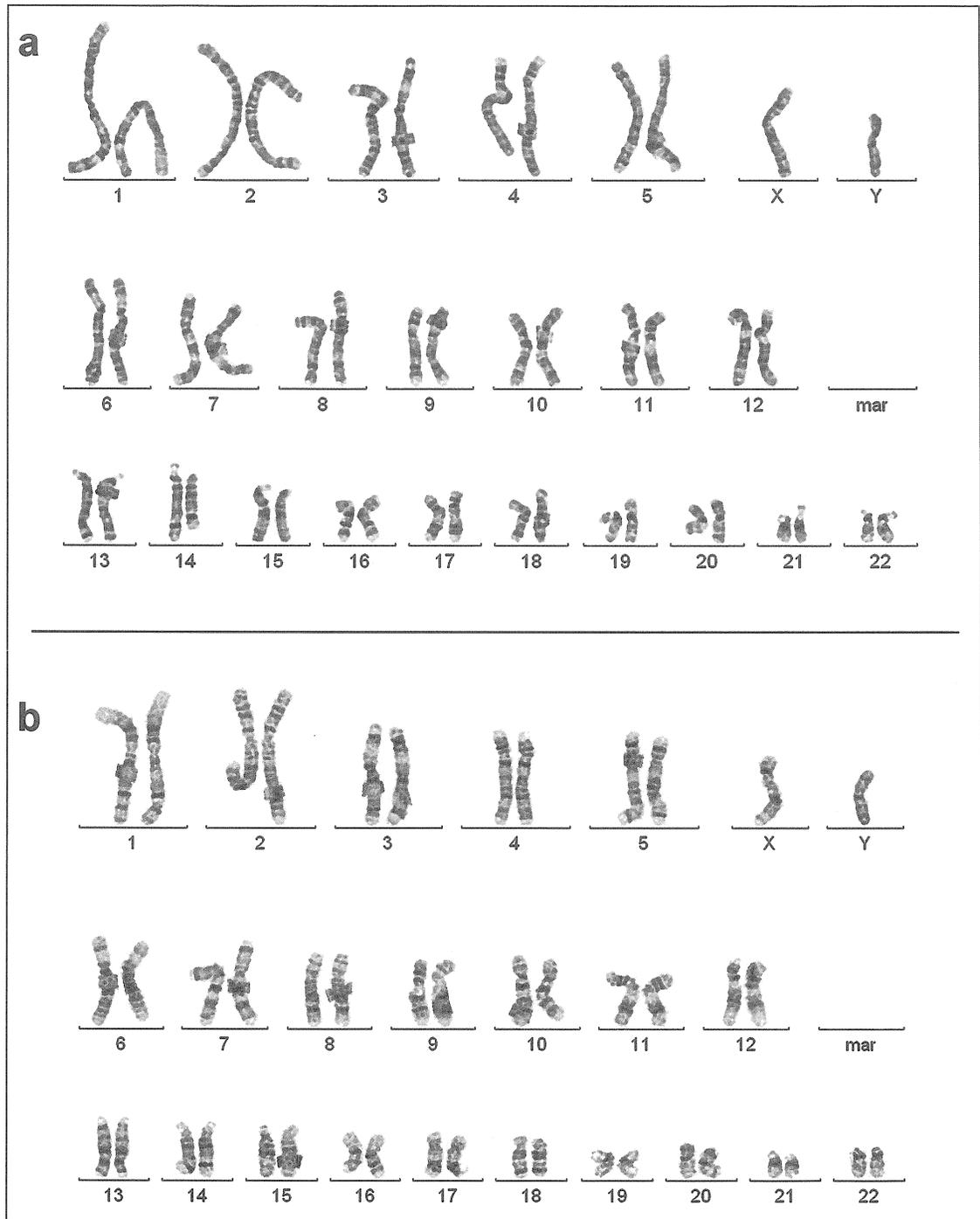


Figure I.1 Caryotype en bandes G. (a) Lymphocyte du patient 1 montrant un caryotype 46,X,idic(Y)(p11.3). (b) Lymphocyte du patient 2 montrant un caryotype 46,X,idic(Y)(p11.3).

I.2.2.2. Marquage en bandes C

La technique de marquage en bandes C est utilisée pour visualiser l'hétérochromatine constitutive des chromosomes, soit les régions centromériques, la région péri-centromérique des chromosomes 1, 9 et 16, ainsi que la moitié distale du bras long du chromosome Y. Cette technique de marquage consiste à extraire l'ADN des régions chromosomiques ne correspondant pas aux bandes C (Comings et al., 1973). Il s'agit de faire subir à l'ADN des traitements successifs dans des conditions acides, alcalines et salines à température élevée. L'acide a pour but de d'hydrolyser les liens glycosidiques entre les purines de l'ADN. Cet ADN sera ensuite dénaturé par la condition alcaline, souvent de l'hydroxyde de baryum. L'ADN ainsi dépuriné et dénaturé sera coupé et lavé dans un bain de solution saline à température élevée, ce qui aura pour but de ne conserver que les régions hétérochromatiques constitutives, soit les bandes C (Holmquist, 1979). Ces bandes pourront enfin être colorées au Giemsa et visualisées au microscope (Figure I.2). Bien que le mécanisme d'obtention des bandes C ne soit pas entièrement résolu, il a été proposé que la conformation très compacte de l'hétérochromatine constitutive avec des protéines non-histones ainsi qu'un taux de renaturation plus rapide des séquences hautement répétées contenues dans ces régions pourraient expliquer pourquoi l'ADN des bandes C réagit différemment aux traitements (Holmquist, 1979).

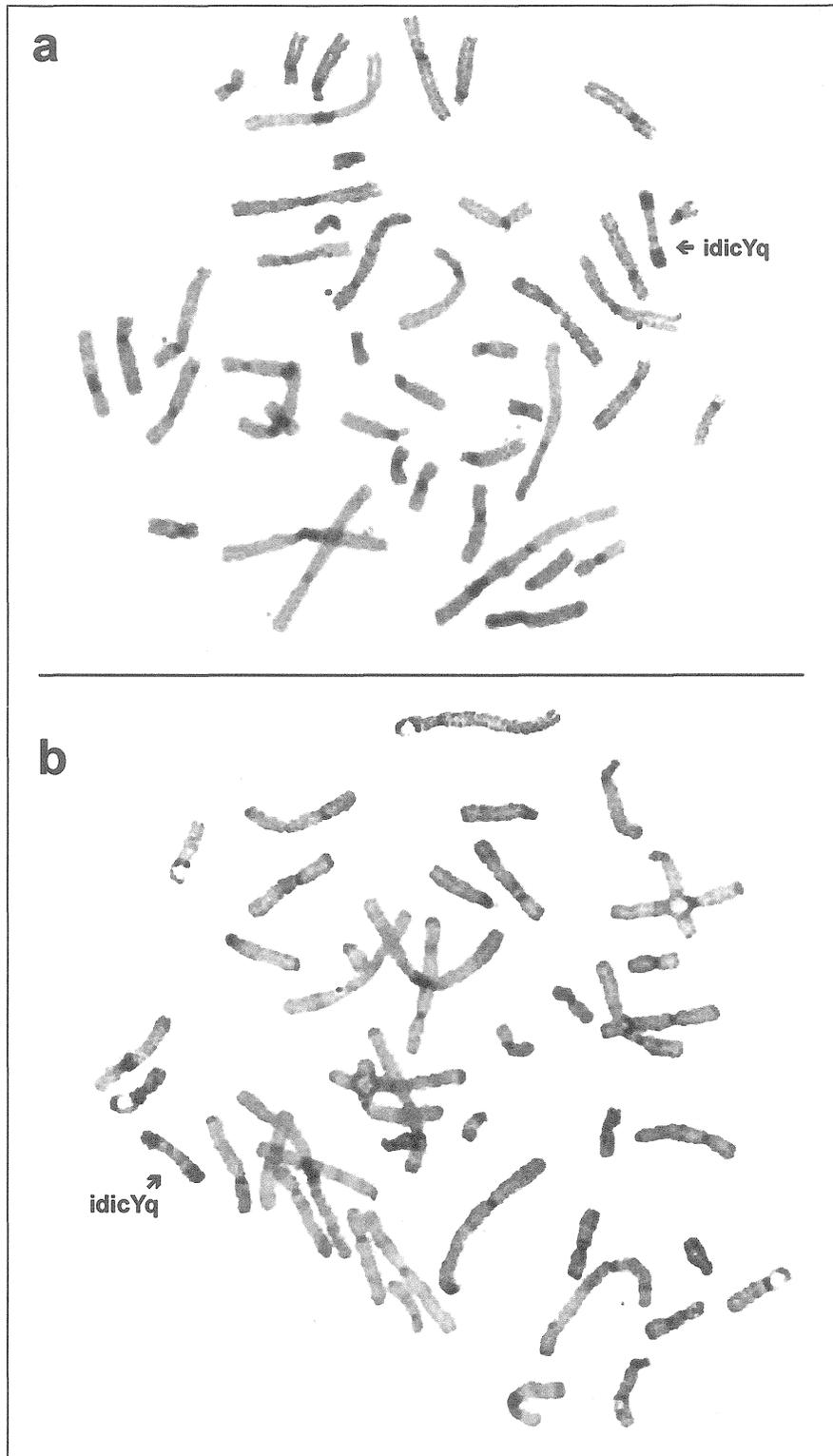


Figure I.2 Métaphase marquée en bandes C. (a) Lymphocyte du patient 1. (b) Lymphocyte du patient 2.

I.2.2.3. Autres techniques de marquage

Il existe quelques autres techniques de marquage chromosomique permettant de visualiser différentes parties des chromosomes. La première à avoir été découverte est celle utilisant la moutarde de quinacrine, qui permet de visualiser les bandes Q en fluorescence (Caspersson et al., 1968; Caspersson et al., 1970). Les bandes Q correspondent aux bandes G additionnées de certaines régions hétérochromatiques, notamment la moitié distale du bras long du chromosome Y.

Une autre technique couramment utilisée en laboratoire de cytogénétique est le marquage des NOR. L'acronyme NOR correspond à « Nucleolar Organizing Region » ou région organisatrice du nucléole. Cette technique consiste à marquer les régions satellites des chromosomes acrocentriques, c'est-à-dire les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22, à l'aide d'une coloration au nitrate d'argent (Bloom et Goodpasture, 1976).

I.2.3. Techniques de cytogénétique moléculaire

Comme les techniques de marquage chromosomique en bandes offrent une résolution à l'échelle chromosomique et nécessitent des chromosomes en métaphase, certaines anomalies plus fines et certains tissus difficiles à mettre en culture ne pouvaient pas être étudiés. Ainsi, plusieurs techniques ont été mises au point et sont devenues des outils indispensables en laboratoire de cytogénétique. Elles sont utilisées comme complément à l'analyse du caryotype lors de diagnostics.

I.2.3.1. Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La première technique de cytogénétique moléculaire a été mise au point à la fin des années 60 (Pardue et Gall, 1969). À la base, ces techniques utilisaient des sondes radioactives, mais dans les années 80, une technique en fluorescence a été mise au point (Pinkel et al., 1986). La technique FISH repose sur le principe de dénaturation et d'hybridation de l'ADN. En effet, elle consiste à hybrider une sonde d'ADN complémentaire à une séquence d'intérêt sur une préparation chromosomique ou nucléaire dénaturée. Cette sonde est généralement marquée avec un fluorochrome. Ensuite, l'ADN est contre-coloré et peut être visualisé au microscope à fluorescence à l'aide de filtres spécifique des différents fluorochromes. Les avantages d'une telle technique sont nombreux, notamment la diversité des sondes disponibles, la rapidité et la facilité d'exécution, sa facilité d'interprétation ainsi que le fait de pouvoir utiliser des noyaux en interphase. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'établir une culture cellulaire et d'obtenir des cellules en métaphase pour réaliser une telle technique. Plusieurs types de sondes sont maintenant disponibles commercialement, différentes par leur taille ainsi que la séquence spécifique qu'elles reconnaissent.

- Les sondes de séquences répétées reconnaissent des segments d'ADN hautement répétés. Elles peuvent correspondre à l'ADN alpha-satellite contenu dans les centromères de tous les chromosomes, aux télomères situés à chaque extrémité des chromosomes, aux séquences bêta-satellite, satellite II et satellite III situées aux régions péricentromériques des chromosomes 1, 9, 16 et Y ainsi que sur les bras courts des chromosomes acrocentriques. Elles permettent de diagnostiquer

certaines maladies chromosomiques de nombre ou de préciser la structure de chromosomes remaniés.

- Les sondes de séquences uniques ne correspondent qu'à une seule séquence d'ADN spécifique d'une seule région chromosomique. Il s'agit soit de gènes d'intérêt diagnostique, soit d'une séquence unique comme les régions subtélomériques. Ces sondes permettent de diagnostiquer des syndromes, de préciser des points de cassure et de visualiser des translocations. Elles sont aussi utilisées en oncologie pour caractériser certaines néoplasies.
- Les sondes de peinture chromosomique reconnaissent spécifiquement un chromosome en entier. Elles sont utiles pour vérifier l'intégrité d'un chromosome en particulier ou pour caractériser les points de cassures d'une translocation. Il existe aussi certaines sondes spécifiques d'un bras chromosomique uniquement ou de quelques bandes chromosomiques seulement.

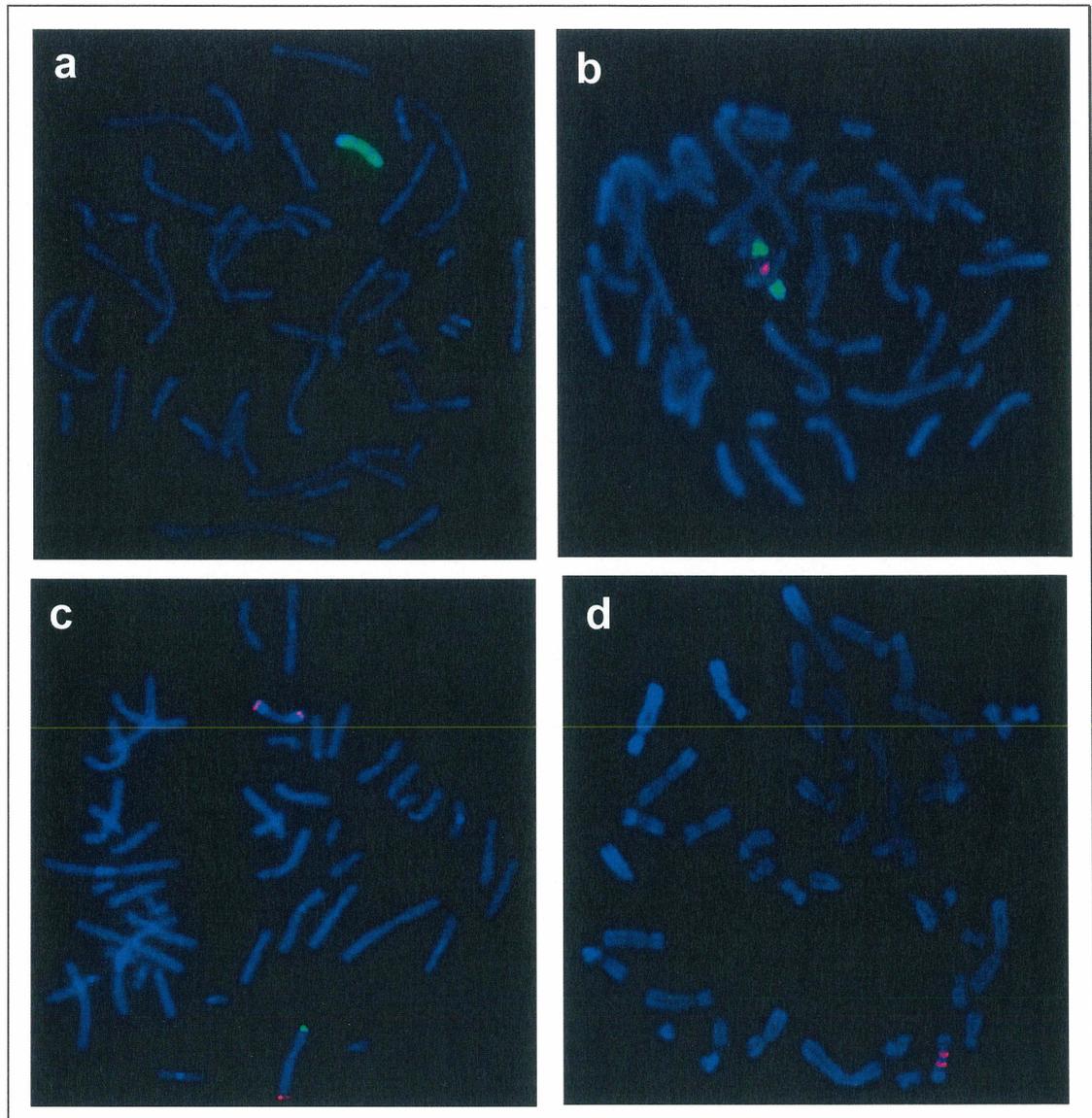


Figure I.3 Technique FISH utilisant diverses sondes. (a) Métaphase du patient 1 avec une peinture du chromosome Y (vert) et une contre-coloration au DAPI (bleu). (b) Métaphase du patient 1 avec des sondes correspondant aux séquences satellites III du chromosome Y (vert), correspondant à la séquence LSI-SRY (rouge) et une contre-coloration au DAPI (bleu). (c) Métaphase du patient 2 avec les sondes subtélomériques Xp/Yp (vert), Xq/Yq (rouge) et une contre-coloration au DAPI (bleu). (d) Métaphase du patient 1 avec la sonde centromérique du chromosome Y (rouge) et une contre-coloration au DAPI (bleu).

Les sondes « maison » sont obtenues par l'extraction, la purification et le marquage de chromosomes artificiels contenant une séquence d'intérêt. Ces chromosomes artificiels peuvent être contenus dans des bactéries, appelés BAC (Bacteria Artificial Chromosome), soit dans des levures, appelés YAC (Yeast Artificial Chromosome). Une très grande banque de BACs et de YACs sont disponibles commercialement, permettant ainsi d'obtenir une très grande diversité de sondes spécifiques au besoin.

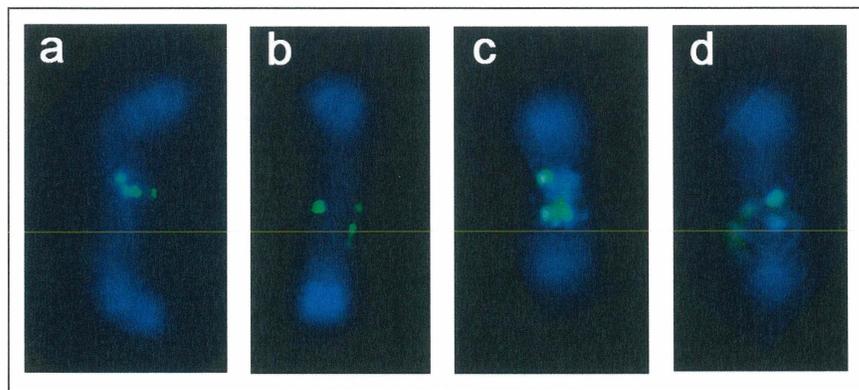


Figure 1.4 FISH sur *idic(Y)(p11.3)* du patient 1 utilisant des sondes maisons extraites de BACs. (a) BAC RP11-257F2. (b) BAC RP11-349O6. (c) BAC RP11-1151M7. (d) BAC RP11-1023O4

I.2.3.2. Synthèse *in situ* amorcée (PRINS)

La technique PRINS a été élaborée à la fin des années 80 et consiste en une synthèse d'ADN *in situ* à l'aide d'une amorce spécifique à la séquence d'intérêt (Koch et al., 1989). Elle peut se faire sur des chromosomes métaphasiques ou directement sur des noyaux en interphase. La technique nécessite l'hybridation d'une amorce à une séquence d'ADN spécifique et la polymérisation du brin d'ADN par une polymérase thermostable

qui ajoutera des nucléotides couplés à un haptène et non-couplés. Le site de polymérisation pourra ensuite être détecté à l'aide de l'anticorps spécifique de l'haptène utilisé. Cette technique est adaptée à la détection de séquences répétées, bien que quelques équipes réussissent à la réaliser sur des séquences uniques (Cinti et al., 2002; Kadandale et al., 2002; Tharapel et al., 2002).

I.2.3.3. Autres techniques de cytogénétique moléculaire

Différentes techniques dérivées de la technique FISH ont été mises au point pour affiner l'analyse des chromosomes. Les techniques de M-FISH (*multicolor-FISH*) (Dauwerse, 1992; Speicher 1996) et de SKY (*Spectral karyotyping*) (Schrock 1996) colorent chacun des chromosomes d'une couleur qui lui est propre. On peut ainsi facilement visualiser chaque paire de chromosome et en analyser son intégrité. Une autre variante de la technique FISH est la technique mBAND (*multicolor banding*), qui est basée sur le même principe que la M-FISH, c'est-à-dire qu'un seul chromosome spécifique sera coloré de façon à ce que chaque bande chromosomique aie une coloration qui lui est propre. Ainsi, le mBAND permet de distinguer des remaniements intra-chromosomiques subtils (Chudoba et al., 1999). Finalement des techniques d'Hybridation Génomique Comparative (CGH) ont été mises au point. Elles consistent à comparer deux génomes entre eux, permettant de mettre en évidence des différences dans la quantité de matériel génétique entre les deux génomes {{208 Kallioniemi,A. 1992; 207 du Manoir,S. 1993}}. Pour ce faire, deux génomes complets (celui à analyser ainsi qu'un génome dit normal) sont fragmentés et marqués à l'aide de fluorochromes de couleur différente. Par la suite,

ces deux préparations seront hybridées sur une métaphase normale. Les deux génomes seront en compétition pour les sites d'hybridation et hybrideront de façon quantitative. Ainsi, cette technique permet de visualiser les duplications, délétions et aneuploïdies, en plus de les localiser. Maintenant, la CGH est réalisée sur des puces à ADN, ce qui permet d'augmenter grandement la résolution et la précision des analyses. Les techniques de CGH sont particulièrement utilisées en cytogénétique oncologique.

I.3. LES CHROMOSOMES

I.3.1. Structure

Une chromatide est composé d'un brin d'ADN enroulé plusieurs fois autour de protéines de structure et sur lui-même. Un chromosome comprend deux chromatides soeurs. Chaque cellule somatique compte 1,8 mètre d'ADN dans un noyau d'environ 6 μm de diamètre. Lors des divisions cellulaires, la cellule doit dupliquer et séparer équitablement cet ADN dans chacune des cellules filles formées. Pour faciliter cette tâche, l'ADN se condense en chromosomes lors de la prophase, début de la phase mitotique du cycle cellulaire. À titre d'exemple, le plus court de nos chromosomes, soit le chromosome 21, passe de 14 mm d'ADN linéaire à un chromosome de 2 μm de longueur après condensation, soit un niveau de condensation de sept mille fois (Ball, 2003).

Les différents niveaux de compaction de l'ADN sont illustrés dans la figure I.5. La structure de base de la chromatine est le nucléosome. Cette structure est composée de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones (2x (H2A, H2B, H3 et H4)). Ce premier niveau de compaction forme une structure chromatinienne dite en collier de perles. Par la liaison de l'histone H1 à chacun des nucléosomes, cette structure se stabilise et se condense en une forme plus compacte, la fibre chromatinienne de 30 nm. Par la suite, plusieurs niveaux de structure de plus en plus condensés se forment, jusqu'à l'obtention du plus haut niveau de compaction, le chromosome métaphasique. Les étapes précises de la compaction de l'ADN ainsi que les mécanismes qui les gouvernent ne sont pas encore complètement résolus.

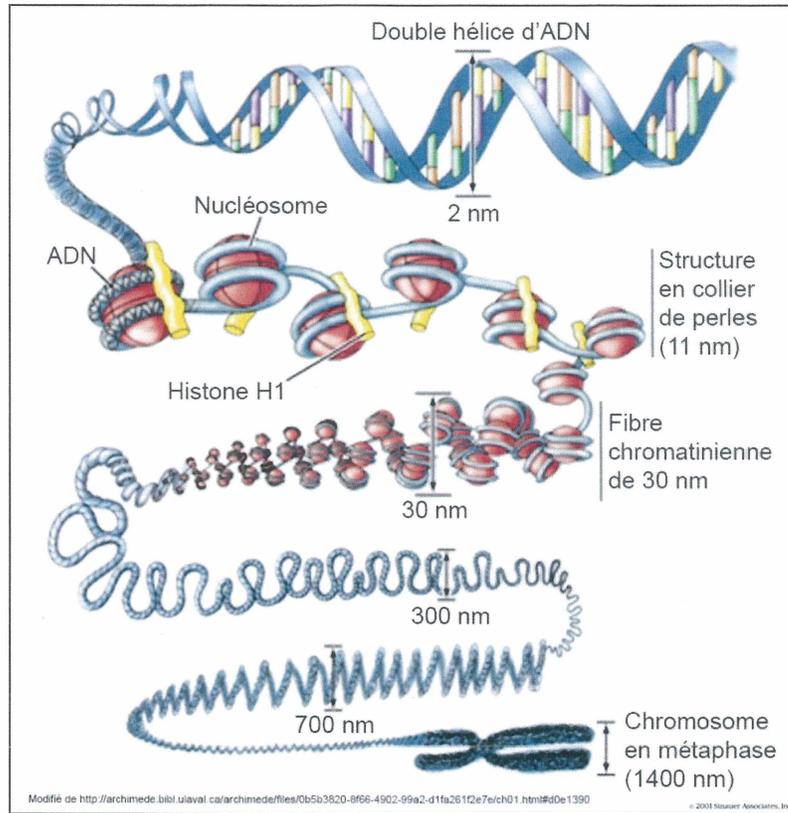


Figure I.5 Les différents niveaux de condensation de l'ADN.

Un chromosome métaphasique, représenté à la figure I.6, est constitué de deux chromatides sœurs, qui sont chacune constituées d'une molécule d'ADN compactée par des protéines histones et non-histones. Ces chromatides sœurs sont reliées entre elles par un centromère, qui est constitué d'ADN alpha-satellite. Le centromère délimite ainsi le bras court (p) et le bras long (q) du chromosome. Aux deux extrémités se trouvent les télomères qui protègent les extrémités chromosomiques de la fusion avec d'autres chromosomes ainsi que de la dégradation des extrémités par les nucléases intracellulaires.

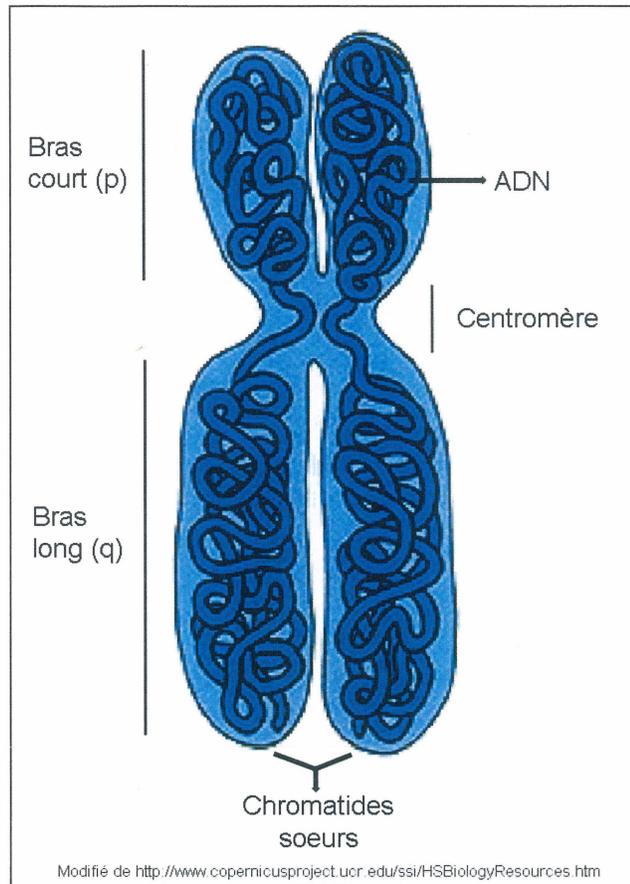


Figure I.6 Structure d'un chromosome métaphasique.

I.3.2. Fonction

La fonction principale du chromosome est d'assurer la ségrégation équitable du matériel génétique d'une cellule lors de la division cellulaire. Durant ce processus, l'ADN se duplique, se condense en chromosomes et est distribué de façon égale entre les cellules filles formées.

I.3.3. Nomenclature

Chaque cellule somatique humaine compte 23 paires de chromosomes, soit 22 paires d'autosomes, numérotées de 1 à 22 selon la taille du chromosome et la position du centromère et une paire de chromosomes sexuels, XX chez la femme normale et XY chez l'homme normal.

Après la découverte, à la fin des années 60, du marquage chromosomique en bandes (Caspersson et al., 1968), il a été possible de classer les chromosomes selon le patron de bandes, soit l'alternance de bandes claires et foncées tout le long du chromosome. La nomenclature des chromosomes a été modifiée pour la dernière fois en 2005, avec la parution de la dernière version de l'« International System for human Cytogenetic Nomenclature », appelé ISCN 2005 (Shaffer et Tommerup, 2005).

Tel que vu à la figure I.6, un chromosome possède un bras court, nommé « p », et un bras long, nommé « q ». Chaque bras chromosomique est ensuite divisé en régions, chaque région en bandes, chaque bande en sous-bandes, et ainsi de suite. Chaque région, bandes, sous-bandes, etc., porte un numéro, commençant par 1 près du centromère. Ainsi, on peut nommer précisément chaque partie d'un chromosome. Pour ce faire, la désignation débute par le numéro du chromosome, le bras chromosomique impliqué, la région, la bande, la sous-bande et ainsi de suite. Par exemple, la bande la plus télomérique du chromosome Y (figure I.7) se nomme Yp11.32.

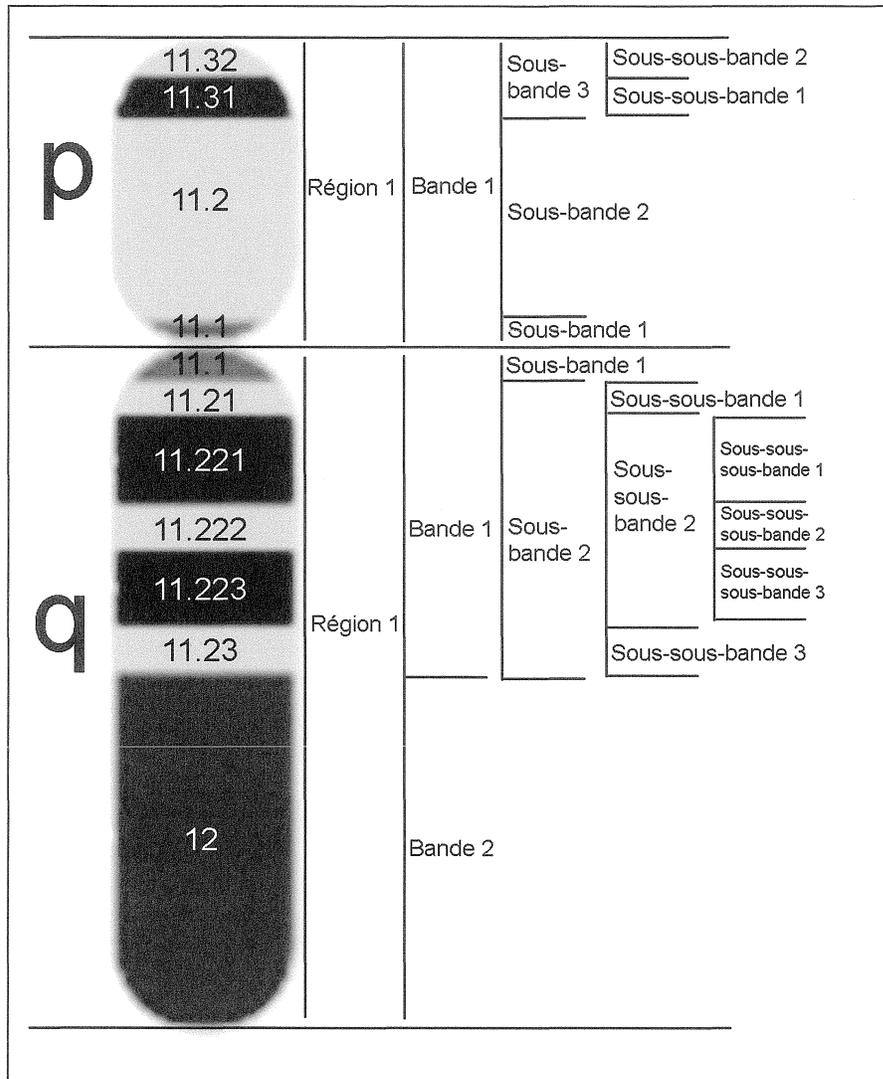


Figure I.7 Nomenclature du chromosome Y.

Les sous-bandes sont apparues lorsque les techniques de récolte et d'étalements des chromosomes se sont affinées. En effet, par les techniques de récolte initiales, les chromosomes étaient très condensés et présentaient peu de bandes après le marquage. Suite à l'augmentation de la résolution, donc l'obtention de chromosomes moins condensés, la plupart des bandes se sont avérées être composées de plusieurs sous-bandes et sous-sous-bandes.

I.4. LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

Dans certains cas, il arrive que les chromosomes ne soient pas distribués équitablement dans les cellules filles ou que les chromosomes subissent des modifications structurales. Dans les deux cas, il peut en résulter un phénotype normal ou certains symptômes, dépendamment des gènes impliqués dans l'anomalie. On peut distinguer deux types d'anomalies chromosomiques, soit les anomalies de nombre et les anomalies de structure

I.4.1. Les anomalies de nombre

Les anomalies de nombres, ou aneuploïdies, réfèrent à la perte ou au gain de chromosomes. Il peut s'agir de la perte ou du gain d'un seul chromosome, appelés respectivement monosomie et trisomie, ou du gain d'un ou plusieurs jeux complets de chromosomes, soit triploïdie ou polyploïdie respectivement. Les phénotypes résultants de telles anomalies dépendent des chromosomes atteints ainsi que de leur nombre.

I.4.2. Les anomalies de structure

Les anomalies de structure réfèrent à un défaut dans la structure normale d'un chromosome. Les principales anomalies de structures sont :

- La translocation : échange de matériel génétique entre deux chromosomes différents. Elle peut être équilibrée ou non, selon qu'il y ait perte ou non de matériel génétique.
- La délétion : perte de matériel génétique sur un chromosome.

- L'inversion : inversion de l'orientation d'un segment chromosomique sans qu'il y ait échange avec un autre chromosome.
- L'insertion : insertion de matériel génétique dans un nouvel endroit dans le génome. Ce peut être dans le même chromosome, ou dans un nouveau chromosome.
- La duplication : Partie de chromosome qui est dupliquée, résultant en plusieurs copies d'un même segment d'ADN.
- L'anneau : Chromosome circulaire qui a subi la fusion de ses extrémités.
- Le chromosome dicentrique : Chromosome qui possède deux centromères

Les anomalies de structures sont majoritairement accompagnées de symptômes plus ou moins graves. L'importance des symptômes dépend des gènes inclus dans l'anomalie, de la présence ou non d'aneuploïdies partielles (qui sont souvent plus symptomatiques) ainsi que de la quantité de cellules qui possèdent l'anomalie.

I.5. LES CENTROMÈRES ET LES KINÉTOCHORES

Lors de la formation d'un chromosome dicentrique, il est essentiel pour la cellule de bien gérer la présence des deux centromères. Pour bien comprendre l'enjeu, il est important de connaître ce qu'est un centromère ainsi que sa fonction.

I.5.1. Centromère

D'un point de vue cytogénétique, le centromère correspond à la constriction primaire présente sur chaque chromosome. C'est l'endroit, lors de la division cellulaire, où le kinétochore s'assemble et que les chromatides sœurs sont reliées entre elles jusqu'à l'anaphase.

D'un point de vue moléculaire, le centromère est un bloc d'ADN alpha-satellite de 200 kb à 5 Mb, retrouvé sur chacun des chromosomes. Cet ADN est constitué de monomères polymorphiques de 171 nucléotides répétés en tandem. Ces monomères forment une structure plus complexe, nommée « Higher order repeats » (HOR) (Figure I.9). L'ordre et la composition en monomères des HOR est spécifique pour chacun des chromosomes (Choo et al., 1991; Mitchell et al., 1985; Waye et Willard, 1987).

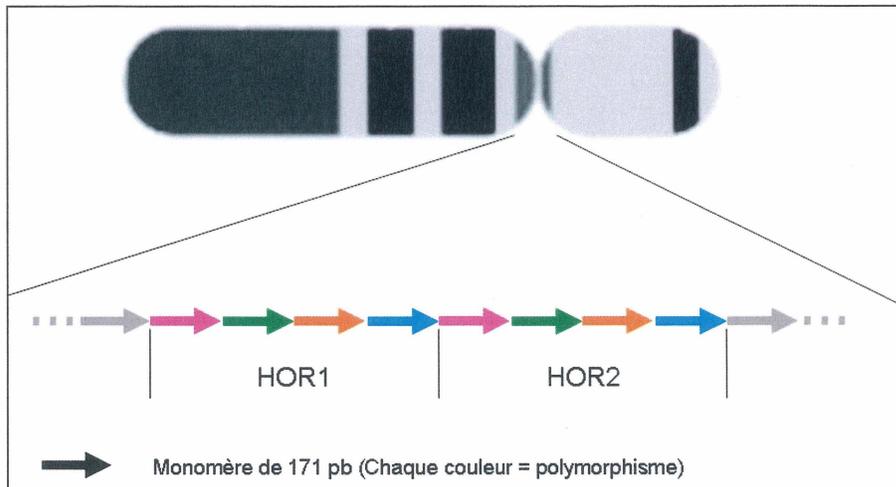


Figure I.9 Représentation schématique des HOR dans le centromère du chromosome Y.

Bien que cette séquence répétée d'ADN soit très importante, l'essentiel de la fonction du centromère lors des divisions cellulaires réside sur l'assemblage adéquat du complexe du kinetochoire. Une composante importante est retrouvée dans la séquence d'ADN centromérique, la boîte CENP-B (*CENP-B box*). Cette séquence de 17 pb est retrouvée dans l'ADN centromérique de tous les chromosomes, mis à part le chromosome Y. Plusieurs études montrent que la boîte CENP-B joue un rôle notable dans l'établissement mais non dans le maintien de centromères fonctionnels (Kouprina et al., 2003; Mejia et al., 2002; Okada et al., 2007). Elle permet à la protéine CENP-B d'être recrutée aux centromères et ainsi faciliter l'assemblage du kinetochoire.

I.5.2. Chromatine centromérique

Bien que la séquence d'ADN centromérique diffère grandement d'une espèce à l'autre, d'importantes similitudes dans l'organisation de la chromatine sont retrouvées chez tous les eucaryotes. La chromatine centromérique forme la base sur laquelle le kinétochore est assemblé lors de l'entrée en mitose. Dans la plupart des espèces étudiées, la chromatine centromérique est caractérisée par la présence d'un variant de l'histone H3. Chez l'humain, cette protéine se nomme CENP-A (Palmer et al., 1991). CENP-A remplace l'histone H3 dans de larges blocs de nucléosomes de la chromatine centromérique et est essentielle au recrutement et à l'assemblage des protéines du kinétochore (Goshima et al., 2003; Howman et al., 2000). Une étude menée sur des fibres de chromatine centromérique étirées a révélé que les blocs de nucléosomes contenant CENP-A sont intercalés à travers d'autres blocs contenant l'histone H3 (Blower et al., 2002; Sullivan et Karpen, 2004). Toutes les études concernant CENP-A placent cette protéine au tout début du mécanisme qui gouverne la formation et l'activité du kinétochore. Il a été montré que la chromatine contenant CENP-A possède une structure plus rigide et plus compacte que la chromatine conventionnelle (Black et al., 2004), explicable par le besoin de stabilité et de rigidité de sa structure lorsque les microtubules créeront la tension nécessaire à la ségrégation des chromosomes.

I.5.3. Kinétochore

Le kinétochore est une structure protéique complexe qui s'assemble sur les deux faces du centromère sur chaque chromosome. Ce complexe protéique, qui sert de lien entre les

chromosomes et les microtubules, est responsable de la ségrégation équitable des chromosomes dans les cellules filles lors de la division cellulaire.

En microscopie électronique, le kinétochore attaché aux microtubules forme une structure tri-lamellaire (Figure I.10).

- **Plaque externe** : Structure de 35 à 40 nm caractérisée par des fibres de 10 à 20 nm de diamètre, perpendiculaires au chromosome. Cette structure se situe la plus loin de l'ADN centromérique et contient les protéines motrices.
- **Plaque moyenne** : Structure transparente en microscopie électronique qui est parcourue par des fibres reliant la plaque externe et la plaque interne.
- **Plaque interne** : Structure mal définie, contenant un complexe protéique en étroite relation avec l'ADN centromérique.

Lorsque le kinétochore est libre, c'est-à-dire non attaché aux microtubules, une quatrième couche est visible, la corona qui irradie de la plaque externe. Elle est le site d'action des protéines motrices qui assurent le mouvement des chromosomes (Marc et Michel, 2006).

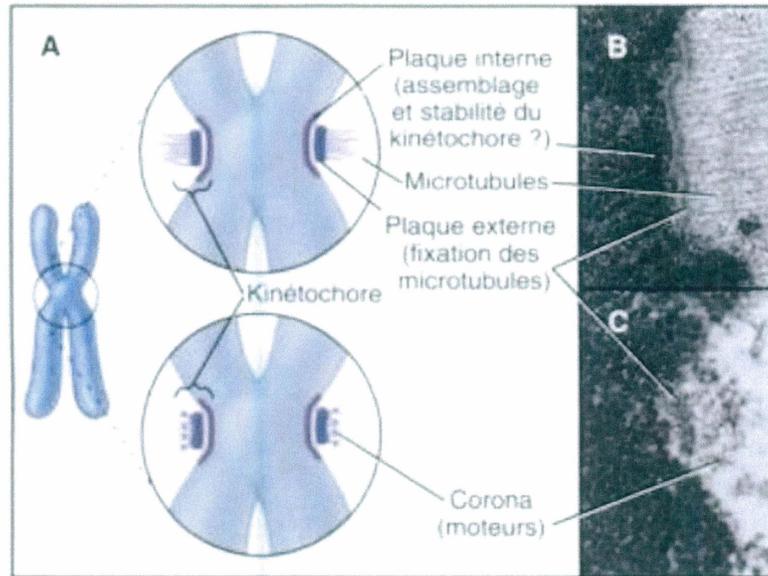


Figure I.10 Structure microscopique du kinétochore. (a)Schéma des principales couches du kinétochore. (b)Micrographie électronique d'une coupe mince d'un kinétochore lié aux microtubules. (c) Micrographie électronique d'une coupe mince d'un kinétochore libre. (Tiré de (Pollard et al., 2004))

I.5.3.1. Principales composantes

Les kinétochores sont des structures d'une importance capitale pour la survie cellulaire et l'intégrité du génome. À ce jour, une cinquantaine de protéines ont été identifiées dans le complexe du kinétochore (Figure I.11).

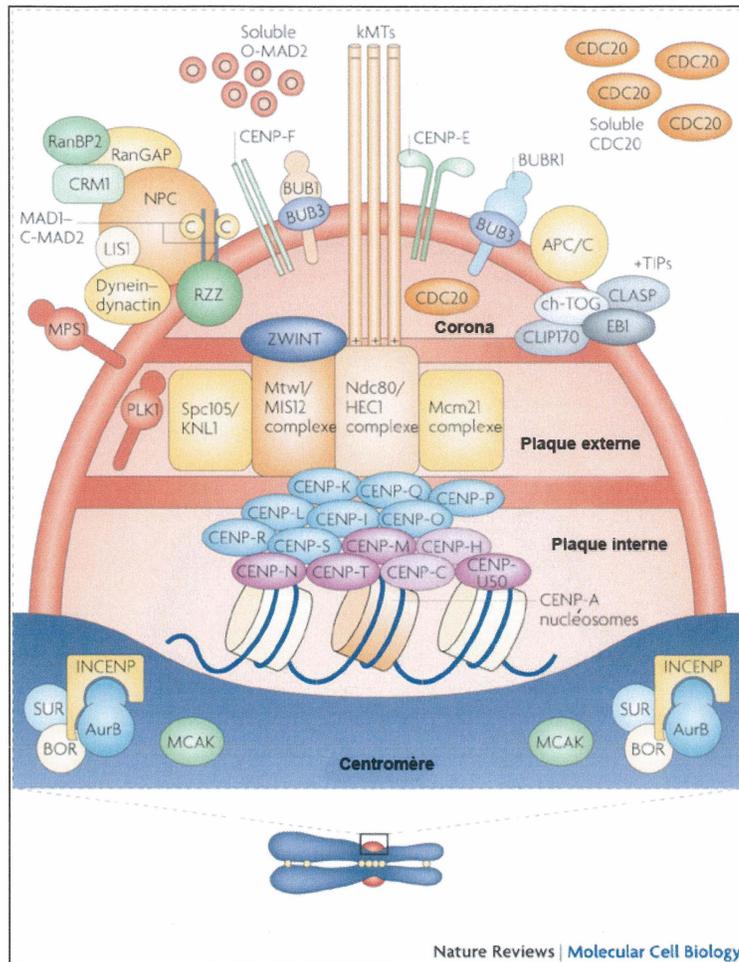


Figure I.11 Composantes protéiques du kinétochore. (Adapté de (Musacchio et Salmon, 2007))

I.5.3.1.1. Protéines motrices du kinétochore

Comme la fonction ultime des kinétochores est la ségrégation équitable des chromosomes lors des divisions cellulaires, elle implique nécessairement des protéines motrices qui assureront le mouvement des chromosomes. Chez l'humain, trois protéines motrices associées au kinétochores sont connues, soit la dynéine cytoplasmique, CENP-E et MCAK.

La dynéine cytoplasmique et CENP-E sont situées dans la corona des kinétochores (Cooke et al., 1997). CENP-E joue un rôle essentiel dans l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale (Schaar et al., 1997; Wood et al., 1997) tandis que la fonction principale de la dynéine n'est pas encore connue précisément. Par contre, certaines évidences montrent qu'elle pourrait être impliquée dans la séparation des chromatides sœurs, le mouvement des chromosomes à l'anaphase (Starr et al., 1998) et/ou l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale (Dujardin et al., 1998).

La protéine MCAK, quant à elle, est située tout près de l'ADN centromérique, sous la plaque interne du kinétochore. Cette protéine jouerait un rôle dans la régulation de la séparation des chromatides sœurs à l'anaphase (Maney et al., 1998). Plusieurs autres protéines motrices sont associées aux mécanismes régulant la ségrégation des chromosomes. Elles se situent au niveau des microtubules, des pôles et des chromosomes. Leur étroite régulation est essentielle au bon fonctionnement des divisions cellulaires.

I.5.3.1.2. Protéines associées à la plaque externe

La plaque externe du kinétochore est composée de plusieurs complexes protéiques, dont les complexes NDC80/HEC1, Mcm21 et Mtw1/MIS12. Ces complexes protéiques s'assemblent à la plaque externe du kinétochore lors de la mitose et forment la base sur laquelle les microtubules s'attachent (Cheeseman et al., 2006).

I.5.3.1.3. Protéines associées à la plaque interne

Plusieurs protéines sont associées à la plaque interne et certaines d'entre elles sont essentielles à la formation adéquate du kinétochore. C'est le cas notamment des protéines CENP-C, CENP-H, CENP-U50, CENP-M, CENP-N et CENP-T. Ces protéines font partie du complexe CENP-A-NAC (Nucleosome Associated Complex), qui s'associe aux nucléosomes contenant CENP-A. Ce complexe est essentiel au bon fonctionnement du kinétochore puisque sa perte entraîne un mauvais alignement des chromosomes et des erreurs de ségrégation chromosomique (Foltz et al., 2006).

Sur ce complexe CENP-A-NAC s'assemblent plusieurs autres protéines formant le complexe CAD (CENP-A-nucleosome Distal). Ces protéines (CENP-K, CENP-L, CENP-O, CENP-P, CENP-Q, CENP-R, CENP-S et CENP-I) ne s'associent pas directement aux nucléosomes contenant CENP-A, c'est-à-dire qu'elles sont recrutées aux nucléosomes par l'intermédiaire du complexe CENP-A-NAC. Elles sont aussi, essentielles à l'assemblage du kinétochore.

I.5.3.1.4. Protéines associées à l'ADN centromérique

Un complexe protéique est associé à l'ADN centromérique, le CPC (Chromosomal Passenger Complex). Il est constitué des protéines INCENP, Aurora B, Survivin et Borealin. Ces protéines sont présentes à divers endroits dans la cellule lors du cycle cellulaire, passant des bras chromosomiques, aux centromères et à la plaque équatoriale. Ce complexe joue un rôle crucial tout au long de la mitose, assurant l'assemblage du

fuseau mitotique, la régulation de l'interaction kinétochore/microtubule, l'alignement des chromosomes et la cytokinèse (Ruchaud et al., 2007).

Une dernière protéine est associée à l'ADN centromérique, CENP-B. Elle y est associée par la boîte CENP-B, présente dans l'ADN alpha-satellite de tous les chromosomes, sauf le chromosome Y. L'inactivation du gène de CENP-B chez la souris montre que cette protéine n'est pas essentielle à l'activité fonctionnelle du kinétochore ni à la ségrégation des chromosomes (Earnshaw et al., 1989; Hudson et al., 1998; Masumoto et al., 2004). Une étude récente suggère que CENP-B pourrait jouer un rôle important dans la modulation de la structure de la chromatine centromérique. Selon eux, CENP-B pourrait soit favoriser la formation du kinétochore en recrutant CENP-A aux nucléosomes centromériques, soit promouvoir la perte de la fonction centromérique en favorisant la formation d'hétérochromatine dans la région centromérique par la tri-méthylation de l'histone 3 sur la lysine 9 (H3K9Me3) (Okada et al., 2007). Ainsi, CENP-B assurerait l'équilibre des divers états de la chromatine favorisant soit la formation ou l'inactivation des kinétochores.

I.5.4. Centromères, activité du kinétochore et divisions cellulaires

Le kinétochore se forme lors de la prophase de la mitose et reste présent jusqu'à la fin de la division cellulaire. Lors de la mitose, le kinétochore intervient dans (1) la capture des microtubules et l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale; (2) la correction des mauvais attachements des microtubules; (3) le point de contrôle qui s'assure que tous

les chromosomes sont correctement orientés; (4) l'établissement d'une tension intracentromérique qui favorise la poursuite du cycle cellulaire vers l'anaphase (Maiato et al., 2004).

- (1) Lors de la prométaphase de la mitose, le fuseau mitotique apparaît et les microtubules s'attachent à chacun des chromosomes par la plaque externe de leurs kinétochores. Chaque kinétochore peut lier jusqu'à 20 microtubules. Les chromosomes sont ensuite alignés sur la plaque équatoriale.
- (2) Lors de l'attachement des microtubules aux kinétochores, il peut survenir des erreurs. En effet, les microtubules peuvent ne pas s'attacher au bon kinétochore et ainsi compromettre la ségrégation adéquate des chromosomes (Figure I.12). Ainsi, certaines protéines du kinétochore, notamment le complexe CPC, ont pour fonction de vérifier l'attachement des microtubules et de le corriger si nécessaire (Ruchaud et al., 2007).

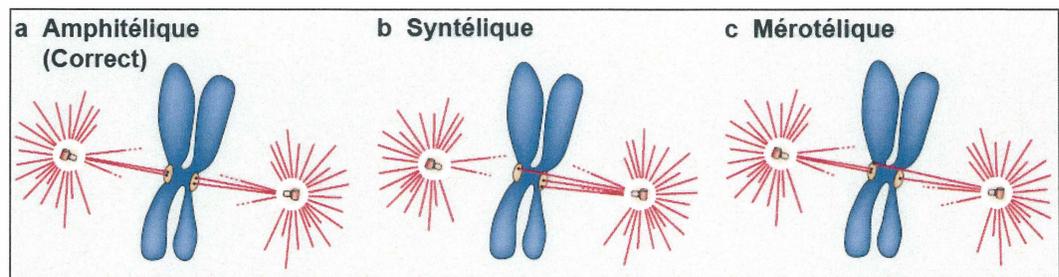


Figure I.12 Schéma représentant l'attachement des microtubules aux kinétochores. (a) Attachement amphitélétique. (b) Attachement syntélétique. (c) Attachement mérotélétique. (Adapté de Ruchaud et al., 2007)

- (3) Afin que le processus de division cellulaire se déroule sans erreurs, il existe un point de contrôle qui dirige la progression vers l'anaphase. En effet, il s'assure que les chromosomes soient alignés correctement, que les microtubules soient attachés aux kinétochores de façon amphitélique sur chacun des chromosomes et que la tension intracentromérique soit suffisante (Maiato et al., 2004). Ce point de contrôle est assuré par plusieurs protéines présentes dans la corona du kinétochore (Figure I.11)
- (4) Comme le résultat final de la division cellulaire est la séparation des chromatides sœurs dans deux cellules filles, il est essentiel que les forces nécessaires au déplacement des chromosomes soient suffisantes. Ainsi, plusieurs protéines du kinétochore sont impliquées dans le mouvement des chromosomes, telles les protéines motrices (CENP-E, dynéine cytoplasmique et MCAK).

Finalement, lorsque toutes les conditions à la poursuite de la mitose sont remplies, le point de contrôle qui inhibait la poursuite du processus est relâché. Les protéines qui assuraient la cohésion des chromatides sœurs aux centromères sont hydrolysées et les microtubules peuvent subir une dépolymérisation au niveau de leur extrémité positive, entraînant un raccourcissement de ceux-ci et permettant aux chromosomes d'être attirés vers leur pôle respectif.

I.5.5. Activité du kinétochore et chromosomes dicentriques

La progression adéquate de la phase M du cycle cellulaire dépend essentiellement de la formation d'un kinétochore sur chacune des chromatides sœurs. Cependant, dans le cas des chromosomes dicentriques, les deux centromères sont capables de former un kinétochore. Ces chromosomes peuvent devenir problématiques pour la cellule lors des divisions cellulaires. En effet, une ségrégation normale ne peut se produire que lorsque les microtubules émanant d'un même pôle se lient à chacun des kinétochores d'une même chromatide sœur. Ainsi, le chromosome dicentrique sera distribué dans chacune des cellules filles (Figure I.13a).

Par contre, si les microtubules d'un pôle se lient indépendamment aux kinétochores d'un même centromère et que ceux font de même pour l'autre centromère, le chromosome dicentrique sera attiré par les deux pôles, demeurant sur la plaque équatoriale. Il peut en résulter soit la perte du chromosome par « anaphase lag », soit la cassure du chromosome qui sera séparé dans les deux cellules filles (Figure I.13b). Après plusieurs cycles de divisions cellulaires avec un chromosome dicentrique instable, plusieurs populations cellulaires peuvent être créées, donnant ainsi un mosaïcisme dans les différents tissus.

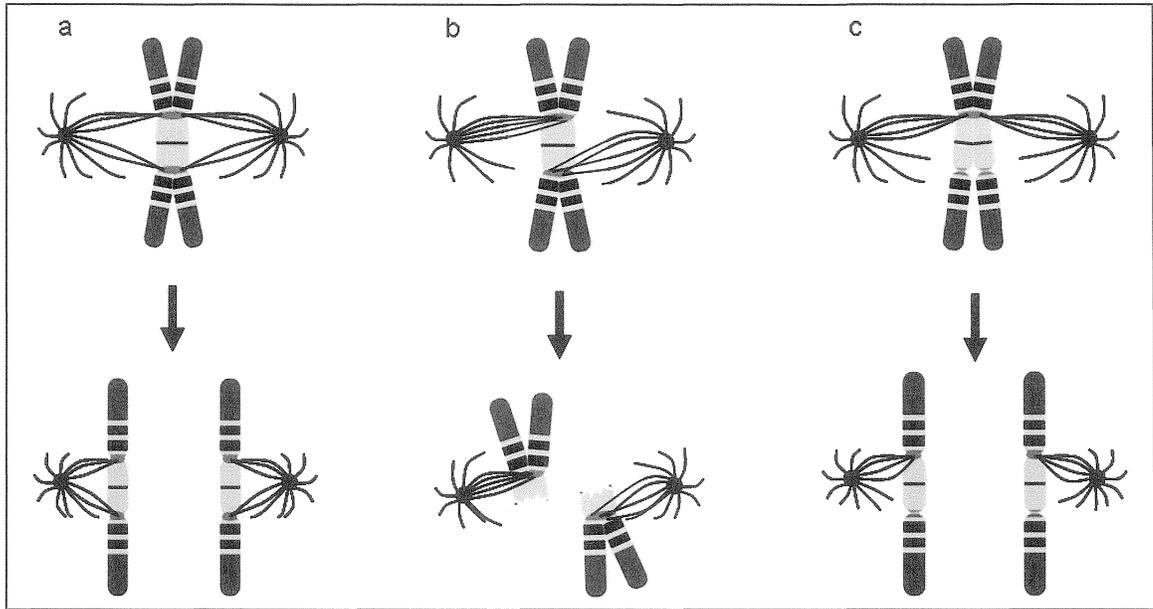


Figure I.13 Chromosome dicentrique et division cellulaire. (a) Attachement correct des microtubules à chacun des kinétochores donnant une bonne ségrégation des chromosomes. (b) Attachement problématique des microtubules à chacun des kinétochores donnant la perte ou une cassure du chromosome dicentrique. (c) Attachement des microtubules au kinétochore actif d'un chromosome dicentrique ayant subi l'inactivation de l'autre kinétochore. Il en résulte la ségrégation correcte du chromosome dicentrique.

Pour outrepasser les problèmes de divisions cellulaires dans les cellules possédant un chromosome dicentrique, il existe un mécanisme qui inactive un kinétochore (Therman et al., 1974). Ainsi, le chromosome dicentrique ayant un kinétochore inactivé, appelé pseudodicentrique, se comportera comme un chromosome monocentrique lors des divisions cellulaires (Figure I.13c). Il existe quelques marqueurs d'inactivation du kinétochore tels que l'absence des protéines essentielles du kinétochore comme CENP-A, CENP-C et CENP-E (Earnshaw et al., 1989; Fisher et al., 1997; Sullivan et Schwartz,

1995; Sullivan et Willard, 1998). De plus, du point de vue cytogénétique, un chromosome pseudodicentrique ne possèdera qu'une constriction primaire; le centromère incapable de former le kinétochore ne sera pas en constriction.

Bien que les étapes de ce mécanisme d'inactivation ne soient pas connues, certaines évidences suggèrent qu'il s'agit d'un processus épigénétique. Malgré leur contenu en ADN centromérique identique, les centromères capables et incapables de former le kinétochore ont une structure chromatinienne différente. En effet, la protéine CENP-A est absente des nucléosomes des centromères non-fonctionnels (Earnshaw et al., 1989). De plus, la chromatine des centromères incapables de former le kinétochore possède des marqueurs d'hétérochromatine, tel que la tri-méthylation de la lysine 9 sur l'histone H3 H3K9Me3. Il a récemment été proposé par l'équipe de Vagnarelli que la protéine CENP-B pouvait être impliquée dans l'inactivation des kinétochore par son habileté à ajouter la marque H3K9Me3 dans la chromatine centromérique (Okada et al., 2007; Vagnarelli et al., 2008). Ainsi, il devient intéressant d'étudier les chromosomes Y dicentriques puisque ceux-ci ne possèdent pas la boîte CENP-B dans leur ADN centromérique et ne sont pas capable de lier la protéine CENP-B.

I.6. JUSTIFICATIONS DE NOTRE ÉTUDE

Toute anomalie chromosomique a un intérêt diagnostique quant au devenir du patient qui la porte. Dans le cas des chromosomes Y dicentriques, aucune corrélation phénotype//génotype n'a encore été réalisée. Ainsi, il est important de caractériser précisément ces chromosomes, leur point de cassure et leur niveau de mosaïcisme, ainsi que de documenter les symptômes qui s'y rattachent.

Maintenant que le processus d'inactivation centromérique est connu et qu'il est plus facile à visualiser, il devient intéressant d'essayer de corréler le taux d'inactivation des centromères avec les mosaïques chromosomiques dans les tissus et les symptômes du patient qui porte l'anomalie. Ce nouveau paramètre pourra peut-être expliquer pourquoi les patients porteurs d'un chromosome Y dicentrique possèdent des phénotypes très diversifiés et non prévisibles.

Finalement, comme le chromosome Y ne possède pas de boîte CENP-B et ne lie pas la protéine CENP-B et qu'il a été proposé que cette protéine soit impliquée dans le processus d'inactivation, il est intéressant d'étudier si les chromosomes dicentriques présents chez nos deux patients avaient subi une inactivation partielle de leurs kinétochores.

I.7. OBJECTIFS

- 1) Caractériser précisément les chromosomes dicentriques des deux patients en :
 - a) Identifiant les chromosomes Y dicentriques à l'aide des techniques de cytogénétique classique (Caryotype en bandes G, Marquage en bandes C) et de la technique FISH (avec la sondes CEP Y).
 - b) Vérifiant le niveau de mosaïcisme dans différents tissus chez les deux patients en utilisant la technique FISH sur noyaux interphasiques.
 - c) Caractérisant la structure et le point de cassure des chromosomes Y dicentriques à l'aide de la technique FISH utilisant des sondes commerciales (LSI SRY, TelVysion Xp/Yp et Xq/Yq, Sat III) et des sondes maison (BAC RP11-257F2, RP11-349O6, RP11-1151M7 et RP11-1023O4).

- 2) Étudier l'état d'activation des kinétochores des chromosomes Y dicentriques à l'aide de la technique d'immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre la protéine CENP-C sur des chromosomes en métaphase.

- 3) Vérifier la présence de la protéine CENP-B dans les kinétochores des chromosomes Y dicentriques à l'aide de la technique d'immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre cette protéine sur des chromosomes en métaphase.

CHAPITRE 1

1.1. AVANT PROPOS

CENP-B does not act in *cis* to inactivate kinetochores in two Cases of Isodicentric Yq Chromosomes

Marie-Chantal GRÉGOIRE, Rachel LAFRAMBOISE, Jean-Luc ARDILOUZE, Nathalie MOORE, Mélanie BEAULIEU-BERGERON, Nicole LEMIEUX & Régen DROUIN

L'article ci-joint a été soumis à la revue *Chromosoma* le 25 janvier 2009. Nous attendons la réponse de la revue concernant l'acceptation de l'article.

J'ai entièrement rédigé cet article et j'ai réalisé toutes les expériences qui y sont mentionnées. J'ai aussi réalisé toutes les figures qui sont présentes dans l'article. Cet article ne sera utilisé dans aucune autre thèse ou mémoire.

Tous les co-auteurs ont donné leur autorisation pour que j'intègre cet article dans mon mémoire de maîtrise.

1.2. RÉSUMÉ

Les centromeres et les kinetochores sont essentiels à la segregation équitable des chromosomes au cours de la division cellulaire. Suite à certains réarrangements chromosomiques, un chromosome dicentrique peut être créé. Dans la plupart des cas, une mosaïque chromosomique est créée puisque de tels chromosomes sont instables lors des divisions cellulaires. Pour remédier à ce problème, la cellule a développé un mécanisme pour inactiver un des kinétochores et permettre la ségrégation adéquate des chromosomes lors de la mitose et de la méiose. Une récente revue a suggéré que la protéine CENP-B pourrait être impliquée dans l'inactivation des kinétochores des chromosomes dicentriques par sa capacité à ajouter une tri-méthylation sur la lysine 9 de l'histone (H3K9Me3). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une caractérisation cytogénétique et moléculaire de deux chromosomes Y dicentriques (idic(Y)(p11.3)) présents chez deux sujets humains mâles phénotypiquement très différents. Utilisant la technique d'immunofluorescence pour visualiser les protéines CENP-B et CENP-C, nous avons observé que l'inactivation d'un kinétochore d'un chromosome idic(Y)(p11.3) peut avoir lieu en l'absence de CENP-B. Ainsi, CENP-B n'agit pas directement en *cis* pour inactiver un des kinetochores dans les deux cas de chromosome idic(Y)(p11.3).

1.3 ARTICLE

CENP-B does not act in *cis* to inactivate kinetochores in two cases of isodicentric Yq chromosomes

**Marie-Chantal GRÉGOIRE¹, Rachel LAFRAMBOISE², Jean-Luc ARDILOUZE³,
Nathalie MOORE⁴, Mélanie BEAULIEU-BERGERON^{5,6,7}, Nicole LEMIEUX^{5,6,7} &
Régen DROUIN^{1,*}**

- ¹ Division of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada
- ² Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Centre hospitalier universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Québec, QC, Canada
- ³ Division of Endocrinology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada
- ⁴ Hôpital Brôme-Missisquoi – Perkins, Cowansville, QC, Canada
- ⁵ Department of Pathology and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.
- ⁶ Department of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada
- ⁷ Research Centre, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada

Keywords: Isodicentric Y chromosome; kinetochore; centromeric protein; centromere; chromosome segregation; mosaicism; fluorescence in situ hybridization; immunohistochemistry

*** To whom correspondence should be addressed:**

Dr. Régen Drouin
Division of Genetics
Department of Pediatrics,
Faculty of Medicine and Health Sciences,
Université de Sherbrooke
3001, 12th Avenue North
Sherbrooke

ABSTRACT

Centromeres and kinetochores are fundamental for proper chromosome segregation during cell division. In some chromosomal rearrangements, a dicentric chromosome can be created. Such chromosomes are unstable through cell divisions, which may lead to mosaicism. To overcome this problem, the cell evolved a mechanism for inactivating one of the kinetochores and allowing the correct segregation of chromosomes during mitosis and meiosis. A recent review suggests that CENP-B may be implicated in kinetochore inactivation in dicentric chromosomes through a post-modification of histone H3 (H3K9Me3). To test this hypothesis, we undertook a cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Yq (idic(Y)(p11.3)) chromosomes from two phenotypically quite different human males. Using immunofluorescence to visualize CENP-B and CENP-C, we found that kinetochore inactivation can occur in idic(Y)(p11.3) chromosomes in the absence of CENP-B. Therefore, CENP-B does not act in *cis* to inactivate one of the kinetochores in two cases of idic(Y)(p11.3) chromosome.

INTRODUCTION

Centromeres are essential for the correct segregation of chromosomes during mitosis and meiosis. Cytogenetically, centromeres are defined by the primary constriction present on every chromosome. At the molecular level, centromeres are defined by alpha satellite DNA arrays which direct kinetochore assembly. The kinetochore is a proteinaceous structure that associates with centromeric DNA and interacts with spindle microtubules in order to segregate chromosomes correctly (Cheeseman and Desai 2008). The human centromeric alpha-satellite DNA is composed of tandem repeats of 170-bp divergent monomers organized into higher-order repeats specific to each chromosome (Mitchell et al. 1985; Choo et al. 1991). Kinetochore proteins assemble on this DNA sequence to ensure its correct function, such as adequate spindle attachment, chromosomal alignment on the equatorial plate, mitotic checkpoint and chromosome movement through anaphase. The first human kinetochore proteins identified were CENP-A, CENP-B and CENP-C (for “CENtrome re Proteins”) (Earnshaw and Rothfield 1985). Currently, approximately 80 kinetochore proteins have been identified in humans (Cheeseman and Desai 2008). In this article, we have focused only on CENP-A, -B and -C.

CENP-A is a histone H3 variant involved in the specific chromatin organization of centromeric alpha-satellite DNA and is essential for the correct building of the kinetochore (Howman et al. 2000; Palmer et al. 1987; Palmer et al. 1991). In the centromeric chromatin structure, CENP-A replaces histone H3 on large clusters of

nucleosomes. These clusters are interspersed with blocks of nucleosomes containing H3 with di-methylated lysine 4 (H3 Lys4-diMe) (Blower et al. 2002; Sullivan and Karpen 2004). This distinct pattern of nucleosomes is characteristic of functional centromeric chromatin and is essential for correct kinetochore assembly and function.

Regarding CENP-B, studies showed that it may facilitate the packaging of alpha-satellite arrays by binding centromeric alpha-satellite DNA through a specific 17-bp DNA sequence called the CENP-B box (Masumoto et al. 1989; Muro et al. 1992; Pluta et al. 1992; Yoda et al. 1992). This protein is not present on the Y chromosome centromere: the Y chromosome centromeric alpha-satellite DNA does not contain any CENP-B box (Tyler-Smith and Brown 1987). Moreover, CENP-B does not seem to be essential for centromeric function since CENP-B knockout mice are viable (Masumoto et al. 1989; Earnshaw et al. 1989; Hudson et al. 1998). Moreover, a recent study suggests that CENP-B may play a dualistic role in modulating chromatin structure in centromeric satellite DNA (Okada et al. 2007). According to Okada et al, CENP-B can either promote kinetochore formation by recruiting CENP-A to the centromeric DNA, or promote loss of centromere function by inducing heterochromatinization of the centromere through trimethylation of Lysine 9 of histone H3 (H3K9Me3).

CENP-C, like CENP-A, is essential for the proper function of the kinetochore as it is required for its correct assembly (Tomkiel et al. 1994; Fukagawa et al. 1999). Because CENP-C is found only in active kinetochores, it has been used as a marker for kinetochore activity (Sullivan and Schwartz 1995). Kalitsis and colleagues showed that CENP-C is an essential component for proper mitotic cell division since disruption of the CENP-C gene

in the mouse leads to early embryonic death (Kalitsis et al. 1998). It was also shown *in vitro* that CENP-C has a self-association activity (Sugimoto et al. 1997; Yang et al. 1996). Moreover, CENP-C can bind DNA *in vivo*, preferentially at specific centromeric alpha-satellite domains (Politi et al. 2002).

Given the essential role of centromeres and kinetochores in the correct segregation of chromosomes through mitosis and meiosis, the emergence of chromosomes with two centromeres would be expected to have deleterious consequences. In fact, an isolocal break on both sister chromatids followed by an end-to-end fusion may occur on chromosomes at relatively low frequencies, leading to the formation of dicentric chromosomes. The presence of two centromeres and kinetochore complexes makes dicentric chromosomes unstable during mitosis. Indeed if both kinetochores from the same sister chromatid are pulled from a different pole by spindle microtubules during mitosis, the dicentric chromosome may break or be lost through anaphase lag. After several cycles of breakage and loss, several cell populations presenting different karyotypes would be created, resulting in mosaicism. Interestingly, this mitotic instability occurs more frequently when centromeres are widely separated from each other (Koshland et al. 1987). To overcome this instability, cells have evolved a mechanism to inactivate one of the two kinetochores on the dicentric chromosome. This leads to functionally monocentric chromosomes, called pseudodicentric chromosomes, which are stable through mitosis and meiosis (Therman et al. 1974). To this day, the mechanism of kinetochore inactivation is not entirely understood, but some markers of inactivation have been posited. Cytogenetically, inactivated centromeres do not show any constriction. At the molecular level, some kinetochore proteins, such as CENP-A and CENP-C, are absent

from inactivated kinetochore (Earnshaw et al. 1989; Sullivan and Schwartz 1995; Fisher et al. 1997; Sullivan and Willard 1998). Kinetochore inactivation is therefore an important cellular process, which requires detailed characterization.

Vagnarelli and colleagues recently proposed that CENP-B may be involved in kinetochore inactivation on dicentric chromosomes (Vagnarelli et al. 2008). It is thought to depend on the ability of CENP-B to induce heterochromatinization of the centromere through the tri-methylation of Lysine 9 of Histone H3 (H3K9Me3). To investigate this hypothesis, we studied two cases of isodicentric Yq (idic(Y)(p11.3)) chromosomes in order to see if inactivation took place, even though there is no CENP-B protein in the kinetochore structure or CENP-B box in the centromere of the Y chromosome.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The clinical features of the subjects are summarized in Table 1. Blood samples from their fathers were not available for karyotype analysis.

Table 1: Clinical features of the subjects

	Subject #1	Subject #2
Birth	31 ^{1/7} weeks of gestation Weight : 750 g Severe IUGR ^a Respiratory distress, oliguria Hyperbilirubinemia, neutropenia Thrombocytopenia Subependymal hemorrhage	40 ^{3/7} weeks of gestation Pregnancy without any complications Weight : 3 650 g APGAR 9 at 5 minutes Normal vaginal delivery without any problems
Other genetic disorder	Type 1 neurofibromatosis (*6791insA:2264X)	None
Physical examination	Hypertelorism, long eyelashes, Lisch nodules, large ears, numerous café-au-lait spots, bilateral genu valgum, depressed metatarsal arch	Phenotypically normal male Appropriately virilized Small height (160 cm)
Internal examination	Conductive left hypoacusis Horseshoe kidney, retarded bone age Growth retardation	Normal
Sexual phenotype	Gonadal dysgenesis, cryptorchidism Bilateral gynecomastia, normal penis Hypoplastic scrotum, small testis (~1 cm) with normal consistency Fertility unknown (subject too young)	Normal male external genitalia Infertility (azoospermia)
Hormonal function	Low testosterone (<0.1 nmol/L) High DHEA ^a (3.2 µmol/L) High androstenedione (2.4 nmol/L)	Normal testosterone Normal extensive endocrine biological testing
Cognitive function	Learning difficulties Language delay ADHD ^a	Normal

^a IUGR: intrauterine growth retardation, DHEA: dehydroepiandrosterone, ADHD: attention-deficit hyperactivity disorder

Cytogenetic studies

All cultures were done according to conventional cytogenetic protocols as described previously by Drouin and colleagues (Drouin et al. 1988). Skin fibroblasts were obtained from a skin biopsy, cultured in DMEM containing 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin and streptomycin, harvested and fixed. Buccal epithelial cells were collected by scraping the buccal mucosa. Cells were kept in 1X phosphate-buffered saline (PBS), washed in HBSS, swollen in hypotonic solution (KCl 0.4%) and fixed. G-banding was performed on fibroblasts preparation as previously described (Seabright 1971; Sumner 1972); both G- and C-banding analyses were performed on lymphocyte preparations.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH was performed with the following Vysis® commercial probes (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois) according to manufacturer's instructions: alpha-satellite centromeric probes for the X and Y chromosome [CEP X (DYZ1) SpectrumAqua, CEP Y (DYZ3) SpectrumOrange], subtelomeric probes for the short and long arms of the X and Y chromosomes [TelVysion Xp/Yp SpectrumGreen and TelVysion Xq/Yq SpectrumOrange], and a probe specific to the region in Yp11.3 containing the *SRY* gene [LSI SRY SpectrumOrange]. Two hundred interphasic nuclei were analysed for each tissue to evaluate the extent of mosaicism. BAC clones RP11-257F2, RP11-349O6, RP11-1151M7 and RP11-1023O4 (Yp11.2) (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), kindly provided by Dr. Nicole Lemieux, were used to verify the integrity of the short arm.

Immunofluorescence

To assess the inactivation of kinetochores on both idic(Y)(p11.3) chromosomes, we performed immunofluorescence using Abcam® (Cambridge, Massachusetts) CENP-C and CENP-B antibodies (see Table 2). Briefly, cells were harvested, fixed and spread on positively charged slides. After drying, they were placed rapidly in 1X PBS for 30 to 60 minutes at room temperature (RT). Antigen retrieval was done by heating slides at 98°C in [10 mM Tris- 1 mM EDTA- 0.05% Tween] solution for 10 minutes. Cells were then incubated in blocking buffer (1X PBS pH 7.5, 3% powdered skimmed milk, 0.25% Triton X-100) for 30 min at RT in a humidified chamber. Primary antibodies and secondary antibodies were diluted in blocking buffer (See Table 2) and 50 µL of the solution were deposited on the slide under a coverslip. Slides were incubated overnight in a humidified chamber at 4°C for primary antibodies and for 60 minutes in a humidified chamber at 37°C for secondary antibodies, respectively. After incubation, slides were washed 3 x 15 minutes in 1X PBS under gentle agitation.

Table 2. Primary and secondary Antibody Conditions for Immunofluorescence

	Primary Antibody			Secondary Antibody			
	Company	Dilution	Conditions	Company/Antibody	Conjugates	Dilution	Conditions
CENP-C	Abcam (ab33034)	1/15	Overnight, 4°C	Jackson ImmunoResearch/ Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Fluorescein, FITC	1/200	60 min, 37°C
CENP-B	Abcam (ab25734)	1/50	Overnight, 4°C		Rhodamine, TRITC	1/200	60 min, 37°C

Analysis and microscopy

FISH and immunofluorescence slides were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) at ~10 ng/mL in 1X PBS and mounted with p-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) at 1mg/mL in glycerol. Slides were analyzed using an Olympus BX61 microscope. Photographs of nuclei and metaphases were taken using a CCD camera and analyzed with MetaSystems Isis 2 software.

RESULTS

1) *Karyotypes*. After analysing at least 30 GTG-banded metaphases for each subject, we found two cytogenetically different populations of cells in each subject: one population containing 45 chromosomes (45,X), and a second containing 46 chromosomes with a long abnormal Y chromosome (Fig. 1a). After CBG-banding, this abnormal chromosome appeared to be dicentric, with two centromeres and two copies of the long arm of the Y chromosome (Fig. 1b). The breakpoint occurred in the short arm (Fig. 1b).

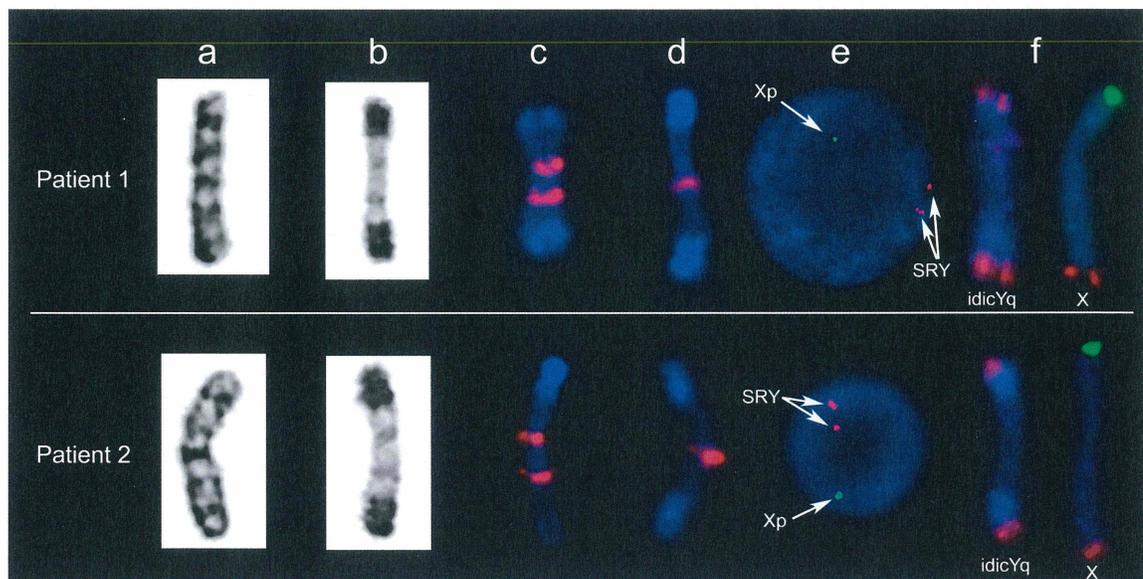


Fig. 1 Cytogenetic characterization of the dicentric Y chromosomes for both subjects. (a) GTG-banding (b) CBG-banding, and FISH results using (c) the CEP Y (DYZ3) (d) the LSI SRY probe (e) the LSI SRY and TelVysion XpYp probes and (f) the TelVysion Xp/Yp and TelVysion Xq/Yq probes. Chromosomes and nuclei are stained with DAPI

2) Characterization of the dicentric chromosomes. Further investigation of the structure of the dicentric chromosomes by FISH confirmed the isodicentric nature of both abnormal Y chromosomes, as two symmetrical hybridization signals of the Y centromere probes were observed on each (Fig. 1c). FISH using the LSI SRY probe suggested that the breakpoint was distal to this gene, as there was one strong signal in the middle of the dicentric Y chromosomes (Fig. 1d), but two separate signals in interphase nuclei of both subjects (Fig. 1e). Hybridization with subtelomeric probes specific to the short (TelVysion Xp/Yp) and long arms (TelVysion Xq/Yq) of the X and Y chromosomes confirmed that the breakpoint in both subjects was located between the *SRY* gene and the Yp subtelomeres, in Yp11.3 (Fig. 1f and 2a). To assess the symmetry of both idic(Y)(p11.3) chromosomes, we performed FISH with BAC probes located between the *SRY* gene and the Y centromere. Microscopic analysis revealed that all probes hybridized in their proper location and in a symmetrical pattern on both idic(Y)(p11.3) chromosomes (data not shown), thus confirming the lack of further rearrangements in the short arms. Therefore, depending on the exact location of the breakpoints, the centromeres in the idic(Y)(p11.3) chromosomes were separated by 17.2 to 21.8 Mb (Fig. 2b).

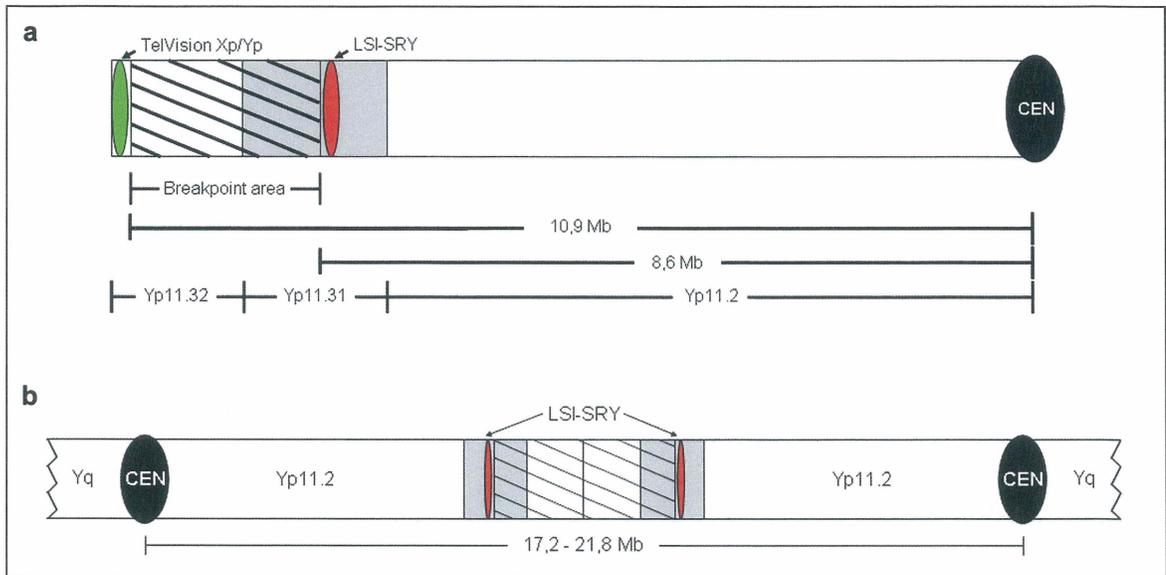


Fig. 2 Schematic representation of the immunofluorescent staining of the short arm of (a) a normal Y chromosome with the LSI SRY and TelVysion Xp/Yp probes. The breakpoint is located between 8.6 Mb to 10.9 Mb from the centromere (CEN), in Yp11.31 or Yp11.32; (b) the idic(Y)(p11.3) chromosomes. Depending on the exact location of the breakpoint, the distance between the two centromeres ranges from 17.2 Mb to 21.8Mb

3) Mosaicism. In order to study the stability of the idic(Y)(p11.3) chromosome and to evaluate the extent of mosaicism, we performed FISH in other tissues with the CEP X (DXZ1), as well as with TelVysion Xp/Yp and TelVysion Xq/Yq subtelomeric probes to discriminate between normal and dicentric Y chromosomes. Two hundred (200) interphase nuclei were analyzed for each tissue. These analyses were repeated on a new blood sample, received three years later, for subject #1. Results are summarized in Table 3. The subjects showed different levels of mosaicism in each tissue analyzed. Epithelial oral cells from subject #1 were not available for FISH analysis.

Table 3. Levels of mosaicism in interphase cells of different tissues analyzed using TelVysion Xp/Yp, TelVysion Xq/Yq and CEP X (DXZ1) probes.

		Karyotype and Percentage of cells				
		45,X	46,X,idic(Y) (p11.3)	47,X,idic(Y) (p11.3)x2	47,XY,idic(Y) (p11.3)	47,XYY
Subject #1	Lymphoblasts	21%	70%	2%	5%	2%
	Fibroblasts	42%	57%	1%	--	--
Subject #2	Lymphoblasts	75%	25%	--	--	--
	Fibroblasts	46%	44%	10%	--	--
	Epithelial oral cells	45%	55%	--	--	--

4) Kinetochores activation. To investigate the activation state of kinetochores, we first performed an immunofluorescence analysis on spread chromosomes against CENP-C, known to be present only at active kinetochores. Both subjects exhibited a similar pattern of signals, with a majority of their cells having both kinetochores active (functionally dicentric) on the idic(Y)(p11.3) chromosome, whereas the remaining cells had functionally monocentric idic(Y)(p11.3) chromosomes (Fig. 3).

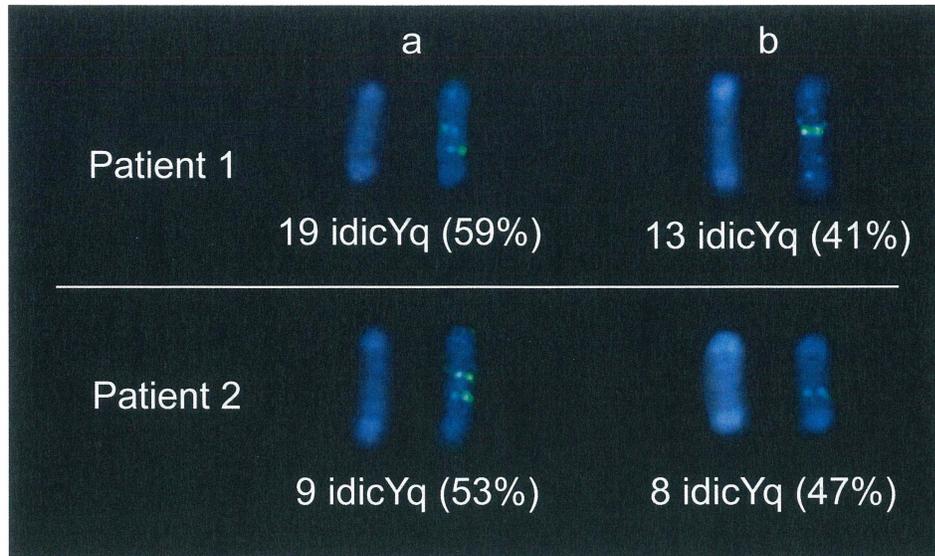


Fig. 3 DAPI staining (left) with immunofluorescence against CENP-C (right) revealing the presence of (a) functionally dicentric and (b) functionally monocentric *idic(Y)(p11.3)* chromosomes in both subjects

Second, we performed immunofluorescence analyses of CENP-B. Analysis of at least 30 metaphases for each subject revealed that CENP-B is never present either in the centromeres or in the kinetochores of either *idic(Y)(p11.3)* chromosome (fig. 4). The CENP-B protein was clearly present at the centromeres of all other chromosomes (red signals, fig. 4). Subject #2 exhibited the same immunofluorescence pattern for the CENP-B protein (data not shown).

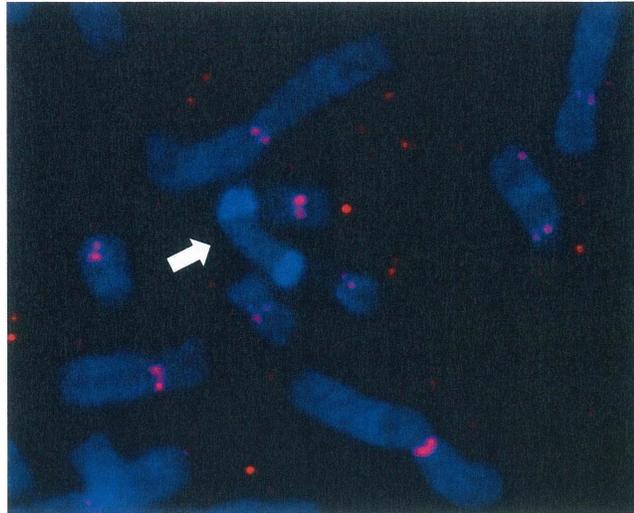


Fig. 4 *Immunofluorescence against CENP-B on metaphase spreads from subject #1 showing no hybridization on the idic(Y)(p11.3) chromosome (white arrow). Chromosomes were stained with DAPI*

DISCUSSION

The kinetochore inactivation process is a mechanism developed by cells to overcome the presence of two centromeres on one chromosome, but the exact mechanism is not completely understood. It is well accepted that the inactivation process is an epigenetic event regulated by some kinetochore proteins (Nakano et al. 2008). It was recently proposed that CENP-B might be involved in kinetochore inactivation on dicentric chromosomes through its ability to generate post-modification of Lysine 9 of histone H3 (H3K9Me3) (Okada et al. 2007; Vagnarelli et al. 2008).

We characterized, cytogenetically and molecularly, two cases of idic(Y)(p11.3) chromosomes derived from two phenotypically quite different human males. From a technical standpoint, we were able to perform immunofluorescence staining on Carnoy-fixed chromosomes. To our knowledge, this paper reports the first analysis of the kinetochore inactivation pattern using CENP-C and the investigation of the presence of CENP-B on the inactivated kinetochores in dicentric Y chromosomes. Our results indicate that, in both subjects, a majority of cells had functionally dicentric idic(Y)(p11.3) chromosomes. As for the remaining cells with a functionally monocentric idic(Y)(p11.3) chromosomes, we demonstrated that CENP-B was never present on the idic(Y)(p11.3) chromosomes, although one of the kinetochores was inactivated. However, although the subjects had very similar patterns of centromere inactivation (Fig. 3), they had very different proportions of 45,X cells in various tissues (Table 3). Furthermore, subject #1 had two additional cell lines which contained structurally normal Y chromosomes. Thus,

factors other than kinetochore inactivation may play a role in the stability of idic(Y)(p11.3) chromosomes during cell divisions.

Although chromosomal rearrangements resulting in dicentric chromosomes are very rare, this anomaly is the most common structural aberration involving the Y-chromosome. To our knowledge, more than 80 subjects with isodicentric Yq chromosomes have been reported in the literature. Although our two subjects had approximately the same breakpoint, they were phenotypically very different. Subject #1 is the first subject reported with a combination of idic(Y)(p11.3) chromosome and NF1. If we leave all those clinical features known to be associated with NF1, all the other anomalies can be attributed to his idic(Y)(p11.3) chromosome, including bilateral gynecomastia, horseshoe kidney, gonadal dysgenesis, hypogonadism, hypoplastic scrotum and small testis. One may wonder if the NF1 mutation contributed to the Y chromosome rearrangement. Subject #2 is azoospermic. All the clinical manifestations reported here in our subjects are consistent with those reported for other published cases (Abdelmoula and Amouri 2005; Hsu 1994; Tuck-Muller et al. 1995).

The kinetochore activation pattern was almost the same in both subjects. Only the level of mosaicism in various tissues varied one from the other. This suggests that not only the structure of the derivative chromosome is important for the clinical phenotype, but also the level of mosaicism in different tissues. A similar association between the level of mosaicism and discordant sexual phenotypes in monozygotic twins with idic(Y)(p11.3) chromosomes has been reported twice (Fujimoto et al. 1991; Nonomura et al. 2002). These case reports showed that the mosaicism level in each tissue is probably

the most important factor in the determination of sexual phenotype for subjects with an $\text{idic}(Y)(p11.3)$ chromosome. It should be interesting to examine the relationship between the kinetochore inactivation patterns with the phenotype.

Kinetochore inactivation is known to occur in dicentric chromosomes with widely separated centromeres. It seems that this phenomenon ensures the stability of dicentric chromosomes during mitosis and meiosis (Therman et al. 1986; Sullivan and Willard 1998). However, we have shown that dicentric Yq chromosomes can stay functionally dicentric when the centromeres are more than 15 Mb apart. This observation is consistent with the work of Sullivan and Willard, who obtained and monitored stable isodicentric X ($\text{idic}(X)$) chromosomes bearing two active kinetochores (Sullivan and Willard 1998). The kinetochore inactivation process is thought to occur rapidly after the chromosome rearrangement and is transmitted through cell divisions (Drets and Therman 1983; Therman et al. 1986; Wandall 1995). The mosaicism level in one of our subjects was the same three years after the first FISH analysis (data not shown), indicating stability of the $\text{idic}(Y)(p11.3)$ chromosome. This stability of functionally dicentric chromosomes may be explained by the dominance of one centromere. If one centromere is more efficient in building the kinetochore and interacting with the microtubules, only this kinetochore will be pulled by the spindle microtubules, resulting in stability (Wandall 1994). Alternatively, the mitotic stability of functionally dicentric chromosomes may be explained by a high degree of coordination between both active kinetochores, ensuring that both kinetochores are pulled toward the same spindle pole. However, this might only occur in cases where both centromeres are in close proximity (Sullivan and Willard 1998).

There is strong evidence indicating that kinetochore inactivation depends upon an epigenetic mechanism (reviewed by Vagnarelli et al. 2008). Because both active and inactive centromeres are comprised of the same DNA sequences, and autosomal dicentric chromosomes still bind CENP-B proteins, it was hypothesized that inactivation might be caused by modifications of the chromatin structure (Earnshaw and Migeon 1985). Recently, Nakano and colleagues showed elegantly that centromere and kinetochore functions are regulated by the centromeric chromatin structure (Nakano et al. 2008). Using human artificial chromosomes, they manipulated the chromatin structure to induce heterochromatin experimentally within the centromere. They showed that heterochromatinization of the centromeric chromatin is incompatible with kinetochore activity and that a dynamic balance between centromeric chromatin and heterochromatin is essential for kinetochore activity. As shown by Okada and colleagues, CENP-B promotes silencing of chromatin through a post-modification of histone H3 (H3K9me3) (Okada et al. 2007). A recent review (Vagnarelli et al. 2008) proposed that CENP-B may be involved in inactivation of kinetochores on dicentric chromosomes. Although this may be true for the centromeres of dicentric autosomal chromosomes, it does not seem to be the case for dicentric Y chromosomes. Our results are in agreement with the literature, as there is no CENP-B box in the α -satellite DNA on the Y chromosome (Earnshaw et al. 1989; Tyler-Smith and Brown 1987) and that no CENP-B protein is bound to the Y centromere (Earnshaw et al. 1989).

Our findings suggest that CENP-B is probably not involved in the kinetochore inactivation mechanism of idic(Y)(p11.3) chromosomes. More precisely, CENP-B does not act in *cis* to inactivate the idic(Y)(p11.3) kinetochore. However, as CENP-B is present

on the other chromosomes found in the cell and CENP-B may be involved in *idic(Y)(p11.3)* kinetochore inactivation, it is probably through an indirect pathway (*trans* inactivation). According to our observations, the inactivation of one kinetochore in cases of *idic(Y)(p11.3)* chromosomes could rely on another unidentified mechanism, possibly uniquely related to the Y chromosome. However, the mechanisms that modulate kinetochore inactivation and maintenance in human dicentric chromosomes remain poorly understood. Further studies are needed, especially to better understand the role of kinetochore proteins. It would be important to investigate the kinetochore inactivation pattern in all dicentric chromosome cases. Given that a genotype/phenotype correlation for subjects with dicentric Yq chromosomes has not yet been established, it is important to investigate each case using cytogenetic and molecular techniques.

To conclude, the investigation of these two cases of dicentric Y chromosomes showed that CENP-B is not directly implicated in the kinetochore inactivation process of *idic(Y)(p11.3)* chromosomes and that this inactivation is maintained by an epigenetic mechanism in the absence of CENP-B. Our data raise a question about the importance of the epigenetic state of the Y chromosome on the phenotype of subjects with dicentric Y chromosomes, in addition to the levels of tissue mosaicism. An epigenetic study would provide a better understanding of the various phenotypes encountered of patients with a similar chromosomal anomaly, and therefore result in more confident genetic counseling.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Jean-François Millau, Dr. Joe T.R. Clarke and Mr. Frédéric Leduc for their suggestions, constructive criticisms, enriching discussions and editing during the preparation of this article. This work was partly funded by the CHUS and by the Canada Research Chairs Program. J.-L.A. holds a CIHR (Canadian Institutes for Health Research) scholarship and R.D. holds the Canada Research Chair in “Genetics, Mutagenesis and Cancer”. Analysis and fluorescence microscopy were performed at the Cell Imaging Facility located in the Division of Genetics of the Department of Pediatrics of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke. The facility is funded by grants from the Canadian Foundation for Innovation and from the Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel of the CHUS.

REFERENCES

- Abdelmoula NB and Amouri A (2005) Dicentric Y chromosome. *Ann Biol Clin (Paris)* 63(4):363-375
- Blower MD, Sullivan BA, Karpen GH (2002) Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2(3):319-330
- Cheeseman IM and Desai A (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1):33-46
- Choo KH, Vissel B, Nagy A, Earle E, Kalitsis P (1991) A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res* 19(6):1179-1182
- Drets ME and Therman E (1983) Human telomeric 6; 19 translocation chromosome with a tendency to break at the fusion point. *Chromosoma* 88(2):139-144
- Drouin R, Lemieux N, Richer CL (1988) High-resolution R-banding at the 1250-band level. 1. Technical considerations on cell synchronization and R-banding (RHG and RBG). *Cytobios* 56(225):107-125
- Earnshaw WC and Migeon BR (1985) Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* 92(4):290-296
- Earnshaw WC, Ratrie H, 3rd, Stetten G (1989) Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma* 98(1):1-12
- Earnshaw WC and Rothfield N (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91(3-4):313-321
- Fisher AM, Al-Gazali L, Pramathan T, Quaife R, Cockwell AE, Barber JC, Earnshaw WC, Axelman J, Migeon BR, Tyler-Smith C (1997) Centromeric inactivation in a dicentric human Y;21 translocation chromosome. *Chromosoma* 106(4):199-206

- Fujimoto A, Boelter WD, Sparkes RS, Lin MS, Battersby K (1991) Monozygotic twins of discordant sex both with 45,X/46,X,idic(Y) mosaicism. *Am J Med Genet* 41(2):239-245
- Fukagawa T, Pendon C, Morris J, Brown W (1999) CENP-C is necessary but not sufficient to induce formation of a functional centromere. *EMBO J* 18(15):4196-4209
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3):1148-1153
- Hsu LY (1994) Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Med Genet* 53(2):108-140
- Hudson DF, Fowler KJ, Earle E, Saffery R, Kalitsis P, Trowell H, Hill J, Wreford NG, de Kretser DM, Cancilla MR, Howman E, Hii L, Cutts SM, Irvine DV, Choo KH (1998) Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J Cell Biol* 141(2):309-319
- Kalitsis P, Fowler KJ, Earle E, Hill J, Choo KH (1998) Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3):1136-1141
- Koshland D, Rutledge L, Fitzgerald-Hayes M, Hartwell LH (1987) A genetic analysis of dicentric minichromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 48(5):801-812
- Masumoto H, Masukata H, Muro Y, Nozaki N, Okazaki T (1989) A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109(5):1963-1973
- Mitchell AR, Gosden JR, Miller DA (1985) A cloned sequence, p82H, of the alphoid repeated DNA family found at the centromeres of all human chromosomes. *Chromosoma* 92(5):369-377
- Muro Y, Masumoto H, Yoda K, Nozaki N, Ohashi M, Okazaki T (1992) Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J Cell Biol* 116(3):585-596

- Nakano M, Cardinale S, Noskov VN, Gassmann R, Vagnarelli P, Kandels-Lewis S, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H (2008) Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell* 14(4):507-522
- Nonomura K, Kakizaki H, Fukuzawa N, Fujieda K, Harada N, Niikawa N, Koyanagi T (2002) Monozygotic twins with discordant sexual phenotypes due to different ratios of mosaicism of 47,X,idic(Y),idic(Y)/46,X, idic(Y)/45,X. *Endocr J* 49(4):497-501
- Okada T, Ohzeki J, Nakano M, Yoda K, Brinkley WR, Larionov V, Masumoto H (2007) CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell* 131(7):1287-1300
- Palmer DK, O'Day K, Trong HL, Charbonneau H, Margolis RL (1991) Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9):3734-3738
- Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* 104(4):805-815
- Pluta AF, Saitoh N, Goldberg I, Earnshaw WC (1992) Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *J Cell Biol* 116(5):1081-1093
- Politi V, Perini G, Trazzi S, Pliss A, Raska I, Earnshaw WC, Della Valle G (2002) CENP-C binds the alpha-satellite DNA in vivo at specific centromere domains. *J Cell Sci* 115(Pt 11):2317-2327
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2(7731):971-972
- Sugimoto K, Furukawa K, Kusumi K, Himeno M (1997) The distribution of binding sites for centromere protein B (CENP-B) is partly conserved among diverged higher order repeating units of human chromosome 6-specific alphoid DNA. *Chromosome Res* 5(6):395-405
- Sullivan BA and Karpen GH (2004) Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 11(11):1076-1083

- Sullivan BA and Schwartz S (1995) Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Hum Mol Genet* 4(12):2189-2197
- Sullivan BA and Willard HF (1998) Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres. *Nat Genet* 20(3):227-228
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75(1):304-306
- Therman E, Sarto GE, Patau K (1974) Apparently isodicentric but functionally monocentric X chromosome in man. *Am J Hum Genet* 26(1):83-92
- Therman E, Trunca C, Kuhn EM, Sarto GE (1986) Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere. *Hum Genet* 72(3):191-195
- Tomkiel J, Cooke CA, Saitoh H, Bernat RL, Earnshaw WC (1994) CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *J Cell Biol* 125(3):531-545
- Tuck-Muller CM, Chen H, Martinez JE, Shen CC, Li S, Kusyk C, Batista DA, Bhatnagar YM, Dowling E, Wertelecki W (1995) Isodicentric Y chromosome: cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. *Hum Genet* 96(1):119-129
- Tyler-Smith C and Brown WR (1987) Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. *J Mol Biol* 195(3):457-470
- Vagnarelli P, Ribeiro SA, Earnshaw WC (2008) Centromeres: old tales and new tools. *FEBS Lett* 582(14):1950-1959
- Wandall A (1995) Clonal origin of partially inactivated centromeres in a stable dicentric chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 69(3-4):193-195
- Wandall A (1994) A stable dicentric chromosome: both centromeres develop kinetochores and attach to the spindle in monocentric and dicentric configuration. *Chromosoma* 103(1):56-62
- Yang CH, Tomkiel J, Saitoh H, Johnson DH, Earnshaw WC (1996) Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol Cell Biol* 16(7):3576-3586

Yoda K, Kitagawa K, Masumoto H, Muro Y, Okazaki T (1992) A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *J Cell Biol* 119(6):1413-1427

DISCUSSION GÉNÉRALE

3.1. LES CHROMOSOMES Y DICENTRIQUES

3.1.1. Mécanisme de formation des chromosomes Y dicentriques

Les chromosomes idic sont formés lorsqu'il y a cassure simultanée des chromatides sœurs à un même locus. Les extrémités cassées fusionnent en U, formant un chromosome idic et un fragment acentrique. Le fragment acentrique, ne possédant pas de centromère, sera perdu lors de la division cellulaire subséquente. Il y a ainsi perte du matériel génétique contenu dans ces fragments perdus (Figure 3.1). Les idicYp sont formés lorsque la cassure se produit dans le bras long tandis que les idicYq surviennent lorsqu'il y a cassure dans le bras court. Dans cette étude, nous avons analysé des idicYq provenant de deux patients différents.

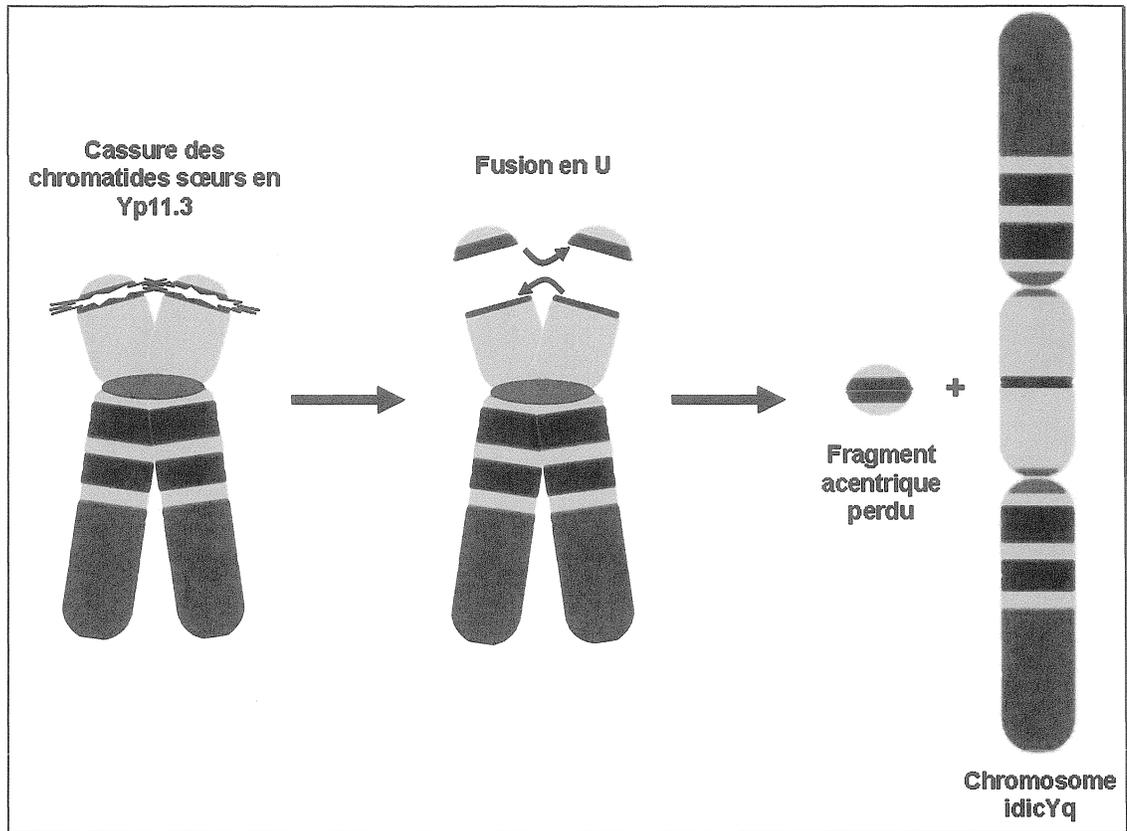


Figure 3.1 Schéma du mécanisme de formation d'un isodicentrique du bras long du chromosome Y.

3.1.2. Isodicentrique du bras long du chromosome Y

Morphologiquement, un chromosome idicYq est formé par deux bras longs entiers du chromosome Y, de deux centromères du chromosome Y et de deux segments symétriques provenant du bras court. Parmi les dicentriques du chromosome Y, ce sont les idicYq qui sont les plus rares. Ils représentent environ 30% de tous les cas de chromosomes Y dicentriques. Jusqu'à ce jour, 81 cas d'idicYq ont été répertoriés dans la littérature (Tableau I).

Tableau I. Revue de littérature de tous les chromosomes idicYq depuis 1965

Caryotype	Phénotype	Référence
Non-disponible	Non-disponible	(Yunis, 1965)
Non-disponible	Non-disponible	(McIlree et al., 1966)
Non-disponible	Non-disponible	(Ferrier et al., 1968)
Non-disponible	Non-disponible	(Boschetti et al., 1968)
Non-disponible	Non-disponible	(Jalbert et al., 1969)
Non-disponible	Non-disponible	(Jacobs, 1969)
45,X[18]/46,X,dic(Yq)[27]/47,X,dic(Yq)x2[2]	Féminin	(Angell et al., 1970)
45,X[19]/46,X,dic(Yq)[10]/47,X,dic(Yq)x2[2]	Féminin	(Angell et al., 1970)
Sang: 45,X[11]/46,X,dic(Yq)[53]/46,XY[2]/47,X,dic(Yq)x2[2]/47,XY,dic(Yq)[1] Peau: 45,X[50]/46,X,dic(Yq)[18]	Ambigu	(Ying et Ives, 1971)
Non-disponible	Non-disponible	(Lucas et Dewhurst, 1972)
46,X,dic(Yq)	Féminin	(Armendares et al., 1972)
45,X/46,X,dic(Yq)	Féminin	(Cohen et al., 1973)
45,X/46,X,dic(Yq)	Féminin	(Frey et al., 1975)
45,X/46,X,dic(Yq)	Masculin	(Hayek et Yunis, 1975)
Non-disponible	Non-disponible	(Stolecke et al., 1976)
45,X/46,X,dic(Y)(p11)/46,X,del(dic Y)/47,X,dic(Y),dic(Y)/ 47,X,dic(Y),del(dic Y)/47,X,del(dic Y),del(dic Y)	Masculin	(Buchanan et al., 1976)

Caryotype	Phénotype	Référence
45,X/46,X,dic(Yq)	Masculin	(Tuncbilek et al., 1976)
45,X/46,X,dic(Yq)	Ambigu	(Armandares et al., 1977)
45,X/46,X,dic(Y)(p11)	Masculin	(Giraud et al., 1977)
45,X/46,X,dic(Y)(p11)/47,X,dic(Y),dic(Y)/47,XY,dic(Y)/48,XYY,dic(Y)	Féminin	(Giraud et al., 1977)
45,X/46,X,dic(Y)(p11)	Masculin	(Giraud et al., 1977)
Sang: 45,X/46,X,idic(Y)(p11)/47,XYY (75/20/5%) Peau: 45,X	Ambigu	(Roubin et al., 1977)
Non-disponible	Non-disponible	(Fryns et al., 1978)
Non-disponible	Non-disponible	(Fass et al., 1978)
45,X/46,X,idic(Yq)/47,X,i(Yq),i(Yq)/47,XYY	Masculin	(Alexander et al., 1978)
45,X/46,X,idic(Yq)	Féminin	(King et Cook, 1978)
46,X,idic(Yq)/47,X,idic(Yq),idic(Yq)	Féminin	(Schmid et D'Apuzzo, 1978)
45,X/46,X,dic(Y)(p11)/46,XX/47,XX,dic(Y)(p11)	Féminin	(de Chieri et Hirschhorn, 1979)
45,X/46,X,dic(Yq)	Masculin	(Hermier et al., 1979)
45,X/46,X,idic(Y)(p11.3)	Féminin	(Daniel et al., 1980)
Non-disponible	Non-disponible	(Plauchu et al., 1981)
45,X[74]/46,X,dic(Yq)[69]/47,X,dic(Yq)x2[4]/46,XY[1]	Ambigu	(Ponzio et al., 1981)
Non-disponible, aucun Y normal	Féminin (Turner)	(Magenis et Donlon, 1982)
46,X,idic(Yq)	Masculin	(Ataya et al., 1983)

Caryotype	Phénotype	Référence
45,X/46,XY/46,X,dic(Y)(p11)/47,XY,dic(Y)(p11)	Féminin	(Sloan et al., 1984)
45,X/46,X,idic(Yq)/46,XY/46,X,i(Yp)/47,XYY/47,XY,idic(Yq)	Ambigu	(Magenis et al., 1985)
45,X/46,X,idic(Yq)47,X,idic(Yq),idic(Yq)	Féminin	(Magenis et al., 1985)
46,X,dic(Y)(p11.2)	Féminin	(Muller et al., 1986)
46,X,dic(Yq)	Féminin	(Kovaleva et Iakovlev, 1986)
45,X/46,XY/46,X,del(Yq)/46,X,monoc(Yq)/46,X,dic(Yq)/47,XY,dic(Yq)/47,X,monoc(Yq)x2	Masculin	(Fryns et al., 1987)
45,X/46,XY/46,X,del(Yq)/46,X,monoc(Yq)/46,X,dic(Yq)/47,X,del(Yq),del(Yq)/47,XY,monoc(Yq)/47,X,monoc(Yq)/47,XYYdic(Yq)	Masculin	(Fryns et al., 1987)
45,X/46,X,idic(Yq)	Ambigu	(Stalvey et al., 1988)
45,X/46,X,idic(Y)(p11)	Ambigu	(Weckworth et al., 1988)
45,X/46,X,idic(Y)(p11)	Féminin	(Weckworth et al., 1988)
45,X/46,dic(Yq)	Masculin	(Dennis et al., 1990)
46,X,i(Yq)/45,X/46,XY/47,XYY/47,XY,i(Yq)/47,Xi(Yq),i(Yq)	Masculin	(Haaf et Schmid, 1990)
45,X/46,X,dic(Yq)	Masculin	(Micic et al., 1990)
45,X/46,X,idic(Y)(p11)	Féminin (Jumelle MZ)	(Fujimoto et al., 1991)
45,X/46,X,idic(Y)(p11)	Masculin (Jumeau MZ)	(Fujimoto et al., 1991)
45,X/46,X,dic(Yq)	Féminin	(Seifer et al., 1991)
45,X/46,X,psu dic(Y)(p11.32)	Masculin	(Savary et al., 1992)

Caryotype	Phénotype	Référence
45,X/46,X,dic(Y)(p11.32)	Ambigu	(Tuck-Muller et al., 1995)
45,X[29]/46,X,idic(Y)(p11.3)?? [129]	Féminin	(Shankman et al., 1995)
45,X[59]/46,X,idic(Yq)[41]	Féminin	(Bergendi et al., 1997)
45,X[29]/46,X,idic(Y)(p11.2)[77]/ 47,X,idic(Y)(p11.2)x2[1]/46,XY[1]/47,XY,idic(Y)(p11.2)[2]	Féminin	(Kohn et al., 1997)
45,X[30]/46,X,idic(Y)(p11.3)[70]	Féminin	(Quilter et al., 1998)
45,X[88]/46,X,idic(Y)(p11.2)[10]/47,X,idic(Y)(p11.2)x2[1]/46,XY[1]	Masculin	(Kelly et al., 1998)
45,X[53]/46,X,idic(Y)(p11.2)[14]/47,X,idic(Y)(p11.2)x2[1]/46,XY[1]	Féminin	(Kelly et al., 1998)
45,X/46,X,dic(Yq)	Masculin	(Teraoka et al., 1998)
45,X/46,X,dic(Yq)	Masculin	(Teraoka et al., 1998)
45,X/46,X,dic(Yq)	Féminin	(Teraoka et al., 1998)
45,X/46,X,dic(Yq)	Féminin	(Teraoka et al., 1998)
45,X[76]/46,X,idic(Y)(p11)[24]	Féminin	(Robinson et al., 1999)
45,X[90]/46,X,psu dic(Y)(p11.3)[10]	Féminin	(Robinson et al., 1999)
45,X[43]/46,X,idic(Y)(p11.3)[57]	Féminin	(Robinson et al., 1999)
45,X[20]/46,X,idic(Y)(p11)[80]	Féminin	(Gole et al., 2000)
45,X[10]/46,X,r(Y)(p11.2q11.23)[17]/47,X,idic(Y)(p11.2)x2[3]	Féminin	(Dundar et al., 2001)
45,X[128]/46,X,+idic(Y)(p11.32)[65]/47,XY,+idic(Y)(p11.32)[2]/ 47,X,+2idic(Y)(p11.32)[1]	Féminin	(Stankiewicz et al., 2001)
45,X,inv(5)(p14q11.2)[94]/47,X,idic(Y)(p11.3)x2, inv(5)[6]	Féminin	(Quilter et al., 2002)

Caryotype	Phénotype	Référence
45,X,inv(9)(p11q12)[30]/46,X,indic(Y)(p11.3),inv(9)[70]	Non-disponible	(Hernando et al., 2002)
45,X/46,X,indic(Y)(q11.2)/47,X,indic(Y)(q11.2)x2 (58,4/38,0/3,6%)	Féminin (Jumelle MZ)	(Nonomura et al., 2002)
47,X,indic(Y)(q11.2)x2/46,X,indic(Y)(q11.2)/ 45,X (62,4/31,4/6,0%)	Masculin (Jumeau MZ)	(Nonomura et al., 2002)
46,X,r(Y)/45,X/46,X,dic r(Y) (74/18/8%)	Masculin	(Blanco et al., 2003)
Sang:45,X[42]/46,X,indic(Y)(q11)[18] Gonades: 45,X	Masculin	(Marrocco et al., 2003)
Sang: 46,X,indic(Y)(p11.32)/46,XY/Other (51,7/45,6/2,7%) Bouche: 46,X,indic(Y)(p11.32)/46,XY/45,X/other (62,8/25,7/6,6/4,9%)	Masculin	(Codina-Pascual et al., 2004)
45,X/46,X,indic(Y)(q11)/46,XY (71/26/3%)	Masculin	(Valetto et al., 2004)
45,X[35]/46,X,dic(Y)(p11.32)[65]	Masculin	(Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005)
Amniocytes: 45,X[8]/46,X,indic(Y)(p11.32)[2] Sang: 45,X[27]/46,X,indic(Y)(p11.32)[1]	Masculin	(Marcus-Soekarman et al., 2005)
45,X[50]/46,X,indic(Y)(p11.32)[40]/47,X,+2indic(Y)(p11.32)[4]/47,XY[6]	Ambigu	(Aktas et al., 2006)
Sang: 46,X,indic(Y)(p11.2-11.3)[134]/45,X[40] Peau: 45,X[19]/46,X,indic(Y)(p11.2-11.3)[1]	Féminin	(DesGroseilliers et al., 2006)
45,X/46,X,del(Y)(p11.32)/46,X,indic(Y)(p11.32)/47,XX,del(Y)(p11.32)/ 47,X,2del(Y)(p11.32)/47,X,del(Y)(p11.32),indic(Y)(p11.32)/ 47,XX,indic(Y)(p11.32)/47,X,2indic(Y)(p11.32)	Féminin	(Fernandez et Pasaro, 2006)

3.1.3. Point de cassure

La localisation précise du point de cassure est très importante puisqu'elle détermine le matériel génétique qui sera perdu et dupliqué. Dans les idicYq, la plupart des points de cassure se situent dans la région pseudo-autosomique 1 (PAR1). Cette région est la région d'homologie entre les chromosomes X et Y et est le lieu habituel de la recombinaison homologue entre ces deux chromosomes au cours de la méiose.

3.1.4. Phénotype

Les individus ayant un chromosome idicYq présentent des phénotypes très variés, allant d'un homme normal, avec ou sans infertilité, à une femme avec ou sans stigmatisme turnérien, en passant par divers états de dysgénésie gonadique et d'ambiguïté sexuelle. Tel que présenté dans le tableau 1, 43% des patients sont de phénotype féminin, contre 31% de phénotype masculin, 10% ont un phénotype ambigu et 16% des cas ont des données manquantes quant au phénotype. Plus spécifiquement, les phénotypes et symptômes peuvent être très variables. En plus des différences dans le déterminisme sexuel des patients porteurs d'idicYq, les patients peuvent être atteints de retard mental, être de petite taille, avoir une dysgénésie gonadique et être plus susceptible d'avoir un gonadoblastome. La diversité des symptômes peut s'expliquer par 3 facteurs :

- La localisation du point de cassure

La localisation exacte du point de cassure est d'une grande importance, surtout pour les chromosomes idicYq. En effet, comme ces chromosomes ont leur point de

cassure situé dans le bras court, il peut impliquer le gène du déterminisme sexuel masculin, soit SRY. Le gène SRY est situé au niveau de la sous-bande Yp11.31 et est l'un des premiers acteurs lors de la détermination du sexe masculin. De ce fait, si le point de cassure est situé entre le centromère et le gène SRY, le fragment acentrique résultant contiendra le gène SRY et sera perdu. Ainsi, il en résultera fort probablement un phénotype féminin. À l'opposé, si le point de cassure est situé entre le gène SRY et le télomère, le chromosome idicYq possédera 2 copies du gène SRY et le sexe phénotypique sera probablement masculin.

- Le moment où l'anomalie a eu lieu

Le moment précis où l'anomalie se forme peut se traduire par des phénotypes différents. En effet, si le réarrangement se forme lors de la spermatogenèse, avant la fécondation, l'embryon résultant aura l'anomalie dans toutes ses cellules. Ainsi, le mécanisme du déterminisme sexuel masculin, si le gène SRY est présent, pourra être perturbé. Par contre, si l'anomalie se produit après la fécondation dans une cellule de l'embryon, ce ne sera pas tous les tissus qui porteront l'anomalie. Plus l'anomalie se crée tardivement par rapport à la fécondation, moins de tissus seront atteints. Ainsi, les chances de voir le processus du déterminisme sexuel masculin être complété sont augmentées.

- Le mosaïcisme

Les chromosomes dicentriques ont tendance à être instables au cours des divisions cellulaires. Ils subissent souvent des cassures et peuvent même être perdus par retard de ségrégation ou « anaphase lag ». Dans le cas des patients porteurs de

chromosomes idicYq, ils se révèlent souvent être à l'état de mosaïque chromosomique. En effet, la plupart de ces patients portent une population cellulaire 45,X. Si l'anomalie s'est produite au stade post-zygotique, il en résultera une population cellulaire 46,XY. Enfin, plusieurs remaniements et cassures peuvent survenir, donnant ainsi des caryotypes plus complexes, avec des populations cellulaires à plusieurs idicYq, avec ou sans chromosomes Y normaux. En 1994, Hsu a réalisé une étude sur les patients porteurs de chromosomes Y dicentriques à l'état de mosaïque chromosomique avec une population cellulaire 45,X. Il a conclu que le niveau de la population cellulaire 45,X était plus influente sur le déterminisme et le développement sexuel que la présence de matériel génétique du chromosome Y (Hsu, 1994).

Malgré ces explications, aucune corrélation phénotype/génotype ne peut être réalisée chez ces patients. En effet, chaque cas est unique et toutes les tentatives pour établir une corrélation phénotype/génotype ont échoué. Étant donné que le processus du déterminisme sexuel lors de l'embryogénèse n'est pas encore compris en entier, et ce même chez des patients dits normaux, il est difficile d'expliquer les mécanismes qui interviennent dans la détermination du sexe phénotypique et le développement des gonades chez les patients porteurs de chromosomes idicYq.

3.2. CARACTÉRISATION DES idic(Y)(p11.3) CHEZ LES DEUX PATIENTS ET SYMPTÔMES ASSOCIÉS

La caractérisation des chromosomes Y dicentriques de nos patients a été réalisée à l'aide des techniques de cytogénétique classique et moléculaire. Après l'analyse des résultats de chacune des techniques réalisées, nous avons pu conclure que les deux patients possédaient un chromosome idic(Y)(p11.3) de structure très semblable. En effet, à l'aide des différentes sondes utilisées lors de la technique FISH, nous avons conclu que le point de cassure se situait dans la bande Yp11.3 pour les deux patients. Bien qu'une étude plus précise du point de cassure par séquençage aurait été très intéressante, elle n'était pas réalisable. En effet, la présence de chromosomes Y normaux chez le patient 1 aurait contaminé les résultats de séquençage de la zone autour du point de cassure. Une tentative de purification des clones contenant l'idic(Y)(p11.3) a été réalisée, mais je n'ai jamais réussi à obtenir un taux de cellules contenant l'idic(Y)(p11.3) assez élevé.

3.2.1. Mosaïcisme et symptômes

Bien que les deux patients possèdent le même point de cassure, les niveaux de mosaïcisme dans les différents tissus analysés étaient très différents d'un patient à l'autre. Dans les lymphocytes du patient 1, plus de 75% des cellules analysées possédaient au moins un idic(Y)(p11.3) tandis que les lymphocytes du patient 2 n'en contiennent que dans 25% des cellules. Par contre, ces niveaux divergents de mosaïcisme ne peuvent expliquer à eux seuls la différence flagrante des symptômes des deux patients. Bien que le patient 1 soit atteint de neurofibromatose de type 1, si nous soustrayons les symptômes associés à cette maladie, les

symptômes possiblement associés à son $\text{idic}(Y)(p11.3)$ sont une gynécomastie bilatérale, un rein en fer à cheval, une dysgénésie gonadique, un hypogonadisme, un scrotum hypoplasique et de petits testicules. Par opposition, bien que le patient 2 ait moins d' $\text{idic}(Y)(p11.3)$, il ne montre pas de symptômes importants, mis à part une azoospermie. Ces divergences dans le phénotype clinique sont en accord avec la littérature et, bien que quelques tentatives aient été faites, aucune corrélation phénotype/génotype n'a été réalisée (Bouayed Abdelmoula et Amouri, 2005; Hsu, 1994; Tuck-Muller et al., 1995)

3.2.2. Point de cassure et symptômes

La divergence dans le phénotype clinique des patients ayant un $\text{idic}(Y)(p11.3)$ peut en partie être expliquée par le point de cassure. En général, le point de cassures est situé dans une région commune dite *hot-spot*, plus susceptible aux phénomènes de cassure et recollement. Cette région est localisée dans la PAR1, lieu habituel de recombinaison homologue des chromosomes sexuels (Quilter et al., 2002; Robinson et al., 1999). La localisation précise du point de cassure détermine les séquences génomiques qui seront dupliquées ou perdues. Quelques gènes importants pour sont situés dans ou près de la PAR1 (Quintana-Murci et al., 2001). En effet, le gène SHOX, situé dans la région pseudo-autosomique, est un gène déterminant la taille de l'individu. De plus, le gène du déterminisme sexuel SRY est situé tout près de la région pseudo-autosomique. Ainsi, sa présence dans le chromosome Y réarrangé aura une influence sur le sexe phénotypique du patient. Cependant, deux études ont été publiées montrant des jumeaux monozygotes possédant le même chromosome Y dicentrique avec des sexes phénotypiques différents (Fujimoto et al., 1991; Nonomura et al., 2002). En effet, chacun des jumeaux possédaient

un idicYq ayant conservé le gène SRY, mais un était de sexe masculin et l'autre de sexe féminin. Ainsi, le gène SRY est un bon indice quant au devenir phénotypique d'un patient avec un idicYq, mais pas suffisant pour l'affirmer avec certitude. Le point de cassure reste un élément important à connaître pour les chromosomes réarrangés, mais il n'est pas suffisant pour comprendre les symptômes des patients porteurs d'idicYq.

3.2.3. Inactivation de kinétochore et symptômes

À ce jour, l'état d'activation des kinétochores dans les idic(Y)(p11.3) n'avait pas été étudié par la technique d'immunofluorescence. En effet, à notre connaissance, nous sommes les seuls à avoir réalisé une telle étude. Par cette technique, nous avons montré que 59% et 53% des idic(Y)(p11.3) des patients 1 et 2 respectivement étaient fonctionnellement dicentriques, c'est-à-dire comportait deux kinétochores actifs. Malgré ces taux semblables, les deux patients présentent des symptômes totalement différents. Cependant, avec une cohorte de seulement deux patients, nous ne pouvons rien conclure quand à la relation existant entre le patron d'inactivation des kinétochores et les symptômes des patients. Ainsi, il serait intéressant qu'à l'avenir, les chromosomes dicentriques ne soient pas seulement investigués structurellement, mais aussi investigués selon leur état d'activation des kinétochores.

3.3. INACTIVATION DES KINÉTOCHORES

3.3.1. Distance entre les centromères

Le processus d'inactivation des kinétochores a été instauré dans la cellule pour stabiliser les chromosomes dicentriques lors des divisions cellulaires (Therman et al., 1986). Par contre, ce ne sont pas tous les chromosomes dicentriques qui subissent une inactivation partielle de leurs kinétochores. En effet, dans notre étude, seulement 40% des chromosomes dicentriques ont un kinétochore inactif (Fig.3). Le processus par lequel les chromosomes fonctionnellement dicentriques restent stables au cours des divisions cellulaires n'est pas encore connu. Il est proposé que les microtubules émanant du même pôle se synchronisent entre eux pour s'attacher aux kinétochores de la même chromatide sœur (Figure I.13a) (Sullivan et Willard, 1998).

D'une façon générale, il est établi que plus les centromères sont rapprochés l'un de l'autre sur un chromosome dicentrique, plus le chromosome restera fonctionnellement dicentrique. En d'autres mots, les chromosomes dicentriques avec leurs centromères éloignés sont plus propices à subir l'inactivation d'un de leur kinétochore. Ce principe a été prouvé par l'étude de chromosomes X isodicentriques ayant des centromères à différentes distances l'un de l'autre (Sullivan et Willard, 1998). Les auteurs ont montré que des chromosomes dicentriques ayant des centromères éloignés de 12 Mb peuvent rester fonctionnellement dicentriques et être stable dans les divisions cellulaires. Bien que certains de ces chromosomes montraient un retard de ségrégation lors de mitoses, cette situation semblait être rétablie avant la fin de l'anaphase puisqu'ils n'ont mis aucune instabilité

chromosomique en évidence. Par contre, le chromosome dicentrique possédant des centromères éloignés de 24 Mb possédait un kinétochore inactivé dans 100% des cas.

Dans notre étude, nous avons montré que la distance entre les centromères des $\text{idic}(Y)(p11.3)$ allait de 17.2 Mb à 21.8 Mb, dépendant la localisation exacte du point de cassure (Fig.2). Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Sullivan et Willard, étant donné que nos deux $\text{idic}(Y)(p11.3)$ montrent les deux patrons d'activité centromérique. Nous pouvons donc conclure que la théorie selon laquelle les centromères éloignés sont plus susceptibles à subir l'inactivation d'un de leur kinétochore est exacte.

3.3.2. Stabilité mitotique et mosaïcisme

Lors de l'étude, nous avons eu la chance d'avoir différents prélèvements, répartis dans le temps. De ce fait, nous avons pu vérifier l'évolution du niveau de mosaïcisme sur plusieurs mois. Nous pouvons donc affirmer que les $\text{idic}(Y)(p11.3)$ sont stables à travers les mitoses puisque les niveaux de mosaïcisme ne changeaient pas d'un prélèvement à l'autre. Ainsi, l'instabilité des chromosomes dicentriques et l'établissement des différentes populations cellulaires semblent avoir eu lieu tout juste après la formation de ces chromosomes. En effet, il est probable que les différentes populations cellulaires soient créées dans les mitoses suivant la formation du chromosome dicentrique. Par la suite, le chromosome est stabilisé et est transmis correctement d'une division cellulaire à l'autre.

Le premier mécanisme de stabilisation des $\text{idic}(Y)(p11.3)$ est l'inactivation d'un kinétochore. Ainsi, le chromosome devient fonctionnellement monocentrique

(pseudodicentrique) et est transmis correctement aux cellules filles. Cet état d'inactivation est conservé et transmis tout au long des divisions cellulaires. Par contre, certains chromosomes restent fonctionnellement dicentriques et sont capables de former le kinétochore à chacun de leur centromère. La stabilité apparente de ces chromosomes nous amènent à penser qu'un mécanisme, impliquant peut être le complexe CPC, régulerait l'attachement amphitélique des microtubules (Figure I.12), même chez les chromosomes dicentriques (Sullivan et Willard, 1998). Une autre hypothèse expliquant la stabilité des chromosomes fonctionnellement dicentriques serait la dominance d'un des centromères. En effet, si un des centromères est plus susceptible d'assembler correctement le kinétochore, ce sera seulement celui-ci qui captera les microtubules et agira à titre de centromère fonctionnel (Wandall, 1994). Il serait donc intéressant de visualiser les cellules contenant un chromosome dicentrique au stade anaphasique soit en microscopie électronique, soit en utilisant l'immunofluorescence contre les microtubules et les kinétochores actifs pour voir si les deux centromères ont assemblés un kinétochore fonctionnel capable de lier les microtubules.

3.3.3. La protéine CENP-B et l'inactivation des kinétochores

Plusieurs évidences montrent que l'inactivation des kinétochores est un processus épigénétique. Une élégante étude réalisée par l'équipe de Nakano a montré que la fonction des centromères et l'activité des kinétochores est régulée par la structure chromatinienne (Nakano et al., 2008). En effet, ils ont démontré que la présence d'hétérochromatine au niveau des centromères est incompatible avec l'assemblage d'un kinétochore actif. Ils ont

ainsi proposé que l'équilibre entre les états de chromatine centromérique et d'hétérochromatine est essentielle à l'établissement de kinétochores fonctionnels.

Une autre étude a montré que la protéine CENP-B pouvait induire l'hétérochromatinisation de la chromatine par la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (Okada et al., 2007). Ainsi, il a été proposé que cette protéine pouvait jouer un rôle dans le processus d'inactivation des kinétochores (Vagnarelli et al., 2008). À l'aide de nos idic(Y)(p11.3), nous avons montré que la protéine CENP-B n'était pas présente aux centromères de ces chromosomes, qu'ils aient ou non subi l'inactivation d'un de leur kinétochore. Par contre, tous les autres chromosomes montraient un signal fluorescent au niveau de leur centromère. L'absence de la protéine CENP-B aux centromères des chromosomes Y n'est pas étonnante puisque ceux-ci ne contiennent pas la séquence capable de lier cette protéine. Ainsi, le processus d'inactivation des kinétochores des chromosomes Y dicentriques pourrait soit impliquer un nouveau mécanisme ne dépendant pas de CENP-B, soit impliquer la protéine CENP-B, mais de façon indirecte, c'est-à-dire non-liée à l'ADN centromérique. Elle pourrait agir par une interaction protéine/protéine ou être impliquée plus en amont dans le processus d'inactivation. Peut-être existe-t-il aussi un mécanisme présent uniquement pour le chromosome Y, puisque celui-ci a un ADN centromérique légèrement différent des autres chromosomes. Plusieurs questions restent encore en suspens concernant l'inactivation des kinétochores.

CONCLUSIONS

Lors de cette étude, nous avons caractérisé deux isodicentriques du bras long du chromosome Y. En utilisant les techniques classiques de la cytogénétique et les techniques de cytogénétique moléculaire, nous avons montré que chaque patient était porteur d'un idic(Y)(p11.3) en mosaïque. En effet, chaque patient portait une population de cellules 45,X ainsi que certaines autres populations incluant ou non un idic(Y)(p11.3). Les chromosomes dicentriques avaient une structure semblable, avec un point de cassures en position distale du gène SRY, dans la bande chromosomique Yp11.3. La distance entre les centromères se situe entre 17.2Mb et 21.3 Mb, dépendant de la localisation exacte du point de cassure.

En utilisant la technique d'immunofluorescence contre la protéine CENP-C, nous avons montré qu'approximativement 60% des chromosomes dicentriques de chaque patient possédaient deux kinétochores actifs. Ce résultat était quelque peu étonnant puisque les centromères sont éloignés l'un de l'autre. Cependant, ces chromosomes semblent stables puisque les niveaux de mosaïcisme sont restés stables chez les deux patients et lors des cultures cellulaires.

Finalement, la présence de la protéine CENP-B a été investiguée par immunofluorescence. Nous avons montré qu'elle était absente des centromères des chromosomes Y dicentriques, peu importe qu'ils aient subi ou non l'inactivation d'un kinétochore. Tous les autres

centromères montraient un signal fluorescent à leur centromère. Ainsi, nous avons proposé que la protéine CENP-B n'agit pas directement dans l'inactivation des kinétochores des chromosomes Y dicentriques.

Plusieurs études restent encore à faire concernant l'activité des kinétochores et le processus d'inactivation. De plus, il serait intéressant de vérifier l'état d'activation des kinétochores de tous les nouveaux cas de chromosomes Y dicentriques. Ainsi, il serait peut-être plus facile de comprendre la variabilité phénotypique des patients avec les mêmes anomalies chromosomiques.

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier sincèrement mon directeur de recherche pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir soutenue dans les moments les plus difficiles. J'ai eu la chance d'avoir ma formation dans le plus diversifié et le plus complet des laboratoires de cytogénétique.

Je remercie aussi sincèrement tous les membres de l'équipe de recherche, Seemi Ayub, Ahmed Ehmadi, Sandrine Lacoste, Claire-Marie Legendre, Aimé Ntwarti, Isabelle Paradis, Josiann Perron et Oumar Samassekou, pour leurs discussions, scientifiques ou non, leur support et leur amitié. Je remercie particulièrement Macoura Gadji pour son accueil et son enseignement lors de mon stage de fin de baccalauréat, qui s'avéra être le début de ma formation en cytogénétique. Je remercie également Nathalie Bastien, assistante de recherche, pour toutes les questions auxquelles elle a gentiment répondu et pour toutes les formations qui m'ont appris les bases du travail en laboratoire.

Je remercie également l'équipe de la clinique pour leur aide dans ma formation de base en cytogénétique et pour leur collaboration. Avec eux, j'ai eu de belles discussions et des conseils quant à mes expériences. J'ai développé un très grand respect pour le métier de technologiste médical.

Finally, I thank my family and friends for their support throughout my master's studies. I experienced a very difficult trial in my first year of graduate studies and without them, I would not have had the courage to continue. Thank you for your patience, your listening and your encouragements.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelmoula, N.B. et Amouri, A. (2005). Dicentric Y chromosome. *Annales de Biologie Clinique*, vol. 63, n° 4, p. 363-375.
- Aktas, D., Alikasifoglu, M., Gonc, N., Senocak, M.E. et Tuncbilek, E. (2006). Isodicentric Y (p11.32) chromosome in an infant with mixed gonadal dysgenesis. *European journal of medical genetics*, vol. 49, n° 2, p. 141-149.
- Alexander, D.S., Soudek, D. et Laraya, P. (1978). Unstable dicentric iso(Yq) chromosome in a pseudohermaphrodite. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 1, n° 3, p. 265-269.
- Angell, R., Giannelli, F. et Polani, P.E. (1970). Three dicentric Y chromosomes. *Annals of Human Genetics*, vol. 34, n° 1, p. 39-50.
- Armandares, S., Salamanca, F., Cos, J. et Chavarria, C. (1977). 45,X/46,X,dic(Yq) mosaicism and mixed gonadal dysgenesis. Case report and review of the literature. *Annales de Genetique*, vol. 20, n° 4, p. 269-272.
- Armandares, S., Buentello, L., Salamanca, F. et Cantu-Garza, J.M. (1972). A dicentric Y chromosome without evidence of sex chromosomal mosaicism, 46,XYqdic, in a patient with features of Turner's syndrome. *Journal of medical genetics*, vol. 9, n° 1, p. 96-100.
- Ataya, K.M., Dudin, G. et Mroueh, A. (1983). Dicentric i(Yq) chromosome and azoospermia. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 14, n° 3, p. 583-590.
- Ball, P. (2003). Portrait of a molecule. *Nature*, vol. 421, n° 6921, p. 421-422.

- Bergendi, E., Plochl, E., Vlasak, I., Rittinger, O. et Muss, W. (1997). A Turner-like phenotype in a girl with an isodicentric fluorescent Y chromosome mosaicism. *Klinische Padiatrie*, vol. 209, n° 3, p. 133-136.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., Jr et Cleveland, D.W. (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature*, vol. 430, n° 6999, p. 578-582.
- Blanco, J., Farreras, A., Egozcue, J. et Vidal, F. (2003). Meiotic behavior of the sex chromosomes in a 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) patient whose semen was assessed by fluorescence in situ hybridization. *Fertility and sterility*, vol. 79, n° 4, p. 913-918.
- Bloom, S.E. et Goodpasture, C. (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Human genetics*, vol. 34, n° 2, p. 199-206.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A. et Karpen, G.H. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Developmental cell*, vol. 2, n° 3, p. 319-330.
- Boschetti, R., Gilbertas, A., Noel, B. et Quack, B. (1968). Male pseudohermaphroditism and mosaicism 45,X-46,XYdic-46,XXq-. *Annales de Genetique*, vol. 11, n° 1, p. 62-65.
- Bouayed Abdelmoula, N. et Amouri, A. (2005). Dicentric Y chromosomes. First part: cytogenetic and molecular aspects. *Annales de Biologie Clinique*, vol. 63, n° 3, p. 263-278.
- Buchanan, P.D., Wyandt, H.E., D'Ercole, A.J., Rao, K.W. et Hartsell, M.L. (1976). A mitotically unstable human dicentric Y chromosome in a male pseudohermaphrodite. *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 17, n° 1, p. 42-50.
- Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U. et Zech, L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Experimental cell research*, vol. 49, n° 1, p. 219-222.

- Caspersson, T., Zech, L. et Modest, E.J. (1970). Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 170, n° 959, p. 762.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M. et Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*, vol. 127, n° 5, p. 983-997.
- Cheeseman, I.M. et Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 9, n° 1, p. 33-46.
- Choo, K.H., Vissel, B., Nagy, A., Earle, E. et Kalitsis, P. (1991). A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic acids research*, vol. 19, n° 6, p. 1179-1182.
- Chudoba, I., Plesch, A., Lorch, T., Lemke, J., Claussen, U. et Senger, G. (1999). High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 84, n° 3-4, p. 156-160.
- Cinti, C., Stuppia, L. et Maraldi, N.M. (2002). Combined use of PRINS and FISH in the study of the dystrophin gene. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 107, n° 2, p. 115-118.
- Codina-Pascual, M., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Starke, H., Liehr, T., Gutierrez-Mateo, C., Sanchez-Garcia, J.F., Arango, O., Egozcue, J. et Benet, J. (2004). FISH characterization of a dicentric Yq (p11.32) isochromosome in an azoospermic male. *American journal of medical genetics.Part A*, vol. 127, n° 3, p. 302-306.
- Cohen, M.M., MacGillivray, M.H., Capraro, V.J. et Aceto, T.A. (1973). Human dicentric Y chromosomes. Case report and review of the literature. *Journal of medical genetics*, vol. 10, n° 1, p. 74-79.
- Comings, D.E., Avelino, E., Okada, T.A. et Wyandt, H.E. (1973). The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Experimental cell research*, vol. 77, n° 1, p. 469-483.

- Cooke, C.A., Schaar, B., Yen, T.J. et Earnshaw, W.C. (1997). Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma*, vol. 106, n° 7, p. 446-455.
- Daniel, A., Lyons, N., Casey, J.H. et Gras, L. (1980). Two dicentric Y isochromosomes, one without and the Yqh heterochromatic segment: review of the Y isochromosomes. *Human genetics*, vol. 54, n° 1, p. 31-39.
- de Chieri, P.R. et Hirschhorn, K. (1979). Dicentric Y-chromosome mosaicism in a girl with clitoral hypertrophy. *Human genetics*, vol. 52, n° 1, p. 149-152.
- Dennis, N., Cockwell, A., Clarke, H. et Crolla, J. (1990). Three males with structural abnormalities of the Y chromosome. *Journal of medical genetics*, vol. 17, p. 648.
- DesGroseilliers, M., Beaulieu Bergeron, M., Brochu, P., Lemyre, E. et Lemieux, N. (2006). Phenotypic variability in isodicentric Y patients: study of nine cases. *Clinical genetics*, vol. 70, n° 2, p. 145-150.
- Drets, M.E. et Therman, E. (1983). Human telomeric 6; 19 translocation chromosome with a tendency to break at the fusion point. *Chromosoma*, vol. 88, n° 2, p. 139-144.
- Drouin, R., Holmquist, G.P. et Richer, C.L. (1994). High-resolution replication bands compared with morphologic G- and R-bands. *Advances in Human Genetics*, vol. 22, p. 47-115.
- Drouin, R., Lemieux, N. et Richer, C.L. (1988). High-resolution R-banding at the 1250-band level. 1. Technical considerations on cell synchronization and R-banding (RHG and RBG). *Cytobios*, vol. 56, n° 225, p. 107-125.
- Drouin, R., Lemieux, N. et Richer, C.L. (1990). Analysis of DNA replication during S-phase by means of dynamic chromosome banding at high resolution. *Chromosoma*, vol. 99, n° 4, p. 273-280.

- Dujardin, D., Wacker, U.I., Moreau, A., Schroer, T.A., Rickard, J.E. et De Mey, J.R. (1998). Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *The Journal of cell biology*, vol. 141, n° 4, p. 849-862.
- Dundar, M., Lowther, G., Acar, H., Kurtoglu, S., Demiryilmaz, F. et Kucukaydin, M. (2001). A case of ambiguous genitalia presenting with a 45,X/46,Xr(Y)(p11.2;q11.23)/47,X, idic(Y)(p11.2), idic(Y)(p11.2) karyotype. *Annales de Genetique*, vol. 44, n° 1, p. 5-8.
- Earnshaw, W.C. et Migeon, B.R. (1985). Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma*, vol. 92, n° 4, p. 290-296.
- Earnshaw, W.C., Ratrie, H., 3rd et Stetten, G. (1989). Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma*, vol. 98, n° 1, p. 1-12.
- Earnshaw, W.C. et Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, vol. 91, n° 3-4, p. 313-321.
- Fass, B., Kaplan, S., Lippe, B. et Sparkes, R.S. (1978). Inconsistent expression of both centromeres of a dicentric Y chromosome in a child with ambiguous external genitalia. *Journal of medical genetics*, vol. 15, n° 3, p. 232-236.
- Fernandez, R. et Pasaro, E. (2006). Molecular analysis of an idic(Y)(qter -->p11.32::p11.32-->qter) chromosome from a female patient with a complex karyotype. *Genetics and molecular research : GMR*, vol. 5, n° 2, p. 399-406.
- Ferrier, P.E., Ferrier, S.A. et Bill, A.H., Jr (1968). A male pseudohermaphrodite with a dicentric Y chromosome. Autoradiographic study. *Humangenetik*, vol. 6, n° 2, p. 131-141.

- Fisher, A.M., Al-Gazali, L., Pramathan, T., Quaife, R., Cockwell, A.E., Barber, J.C., Earnshaw, W.C., Axelman, J., Migeon, B.R. et Tyler-Smith, C. (1997). Centromeric inactivation in a dicentric human Y;21 translocation chromosome. *Chromosoma*, vol. 106, n° 4, p. 199-206.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., 3rd et Cleveland, D.W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nature cell biology*, vol. 8, n° 5, p. 458-469.
- Ford, C.E. et Hamerton, J.L. (1956). A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain technology*, vol. 31, n° 6, p. 247-251.
- Frey, R.O., Buhler, E.M., Buhler, U.K. et Stalder, G.R. (1975). 45,X/46,SYq dic-Sexchromosome mosaic. *Humangenetik*, vol. 27, n° 2, p. 81-90.
- Fryns, J.P., Cassiman, J.J. et Van den Berghe, H. (1978). Unusual in vivo rearrangements of the Y chromosome with mitotic instability in vitro. *Human genetics*, vol. 44, n° 3, p. 349-355.
- Fryns, J.P., Kleczkowska, A., Lemmens, P. et Van den Berghe, H. (1987). Unusual in vivo rearrangements of the Y-chromosome in two males. *Clinical genetics*, vol. 31, n° 3, p. 132-136.
- Fujimoto, A., Boelter, W.D., Sparkes, R.S., Lin, M.S. et Battersby, K. (1991). Monozygotic twins of discordant sex both with 45,X/46,X, idic(Y) mosaicism. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 41, n° 2, p. 239-245.
- Fukagawa, T., Pendon, C., Morris, J. et Brown, W. (1999). CENP-C is necessary but not sufficient to induce formation of a functional centromere. *The EMBO journal*, vol. 18, n° 15, p. 4196-4209.
- Giraud, F., Mattei, J.F., Lucas, C. et Mattei, M.G. (1977). Four new cases of Dicentric Y chromosomes. *Human genetics*, vol. 36, n° 3, p. 249-260.

- Gole, L.A., Anandakumar, C., Yang, R., Chan, J., Wong, Y.C. et Bongso, A. (2000). Discrepancy between cytogenetic and FISH results on an amniotic fluid sample of 45,X/46,X,idic(Y)(p11). *Fetal diagnosis and therapy*, vol. 15, n° 4, p. 212-215.
- Goshima, G., Kiyomitsu, T., Yoda, K. et Yanagida, M. (2003). Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *The Journal of cell biology*, vol. 160, n° 1, p. 25-39.
- Haaf, T. et Schmid, M. (1990). Y isochromosome associated with a mosaic karyotype and inactivation of the centromere. *Human genetics*, vol. 85, n° 5, p. 486-490.
- Hayek, A. et Yunis, E. (1975). Dicentric Y chromosome in mixed gonadal dysgenesis. *Journal of medical genetics*, vol. 12, n° 2, p. 210-212.
- Hermier, M., Philippe, N. et Francois, R. (1979). A 45 X/46 X dic (Yq) puberal male without genital ambiguity. Critical study of the peculiarities of his phenotype. *Archives Francaises de Pediatrie*, vol. 36, n° 2, p. 162-172.
- Hernando, C., Carrera, M., Ribas, I., Parear, N., Baraibar, R., Egocue, J. et Fuster, C. (2002). Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis. *Prenatal diagnosis*, vol. 22, n° 9, p. 802-805.
- Holmquist, G. (1979). The mechanism of C-binding: depurination and beta-elimination. *Chromosoma*, vol. 72, n° 2, p. 203-224.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P. et Choo, K.H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, n° 3, p. 1148-1153.
- Hsu, L.Y. (1994). Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 53, n° 2, p. 108-140.

- Hudson, D.F., Fowler, K.J., Earle, E., Saffery, R., Kalitsis, P., Trowell, H., Hill, J., Wreford, N.G., de Kretser, D.M., Cancilla, M.R., Howman, E., Hii, L., Cutts, S.M., Irvine, D.V. et Choo, K.H. (1998). Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *The Journal of cell biology*, vol. 141, n° 2, p. 309-319.
- Jacobs, P.A. (1969). Structural abnormalities of the sex chromosomes. *British medical bulletin*, vol. 25, n° 1, p. 94-98.
- Jalbert, P., Convert, A., Mouriquand, C. et Malka, J. (1969). A case of dicentric Y in a male pseudohermaphrodite with complex gonosomal mosaicism. *Annales de Genetique*, vol. 12, n° 4, p. 253-258.
- Kadandale, J.S., Wachtel, S.S., Tunca, Y., Martens, P.R., Wilroy, R.S. et Tharapel, A.T. (2002). Deletion of RBM and DAZ in azoospermia: evaluation by PRINS. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 107, n° 2, p. 105-108.
- Kalitsis, P., Fowler, K.J., Earle, E., Hill, J. et Choo, K.H. (1998). Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, n° 3, p. 1136-1141.
- Kelly, T.E., Franko, J.B., Rogol, A. et Golden, W.L. (1998). Discordant phenotypes and 45,X/46,X,idic(Y). *Journal of medical genetics*, vol. 35, n° 10, p. 862-864.
- King, C.R. et Cook, D.M. (1978). Bilateral gonadoblastoma in a phenotypic female with 45,X/46,X, dicentric iso Y [45,X/46,X,idic(Yq)] mosaicism. *Birth defects original article series*, vol. 14, n° 6C, p. 109-122.
- Koch, J.E., Kolvraa, S., Petersen, K.B., Gregersen, N. et Bolund, L. (1989). Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, vol. 98, n° 4, p. 259-265.

- Kohn, B., Kleyman, S.M., Conte, R.A., Macera, M.J., Glassberg, K. et Verma, R.S. (1997). Characterization of an isodicentric Y-chromosome for the long arm in a newborn with mixed gonadal dysgenesis. *Annales de Genetique*, vol. 40, n° 1, p. 10-13.
- Koshland, D., Rutledge, L., Fitzgerald-Hayes, M. et Hartwell, L.H. (1987). A genetic analysis of dicentric minichromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, vol. 48, n° 5, p. 801-812.
- Kouprina, N., Ebersole, T., Koriabine, M., Pak, E., Rogozin, I.B., Katoh, M., Oshimura, M., Ogi, K., Peredelchuk, M., Solomon, G., Brown, W., Barrett, J.C. et Larionov, V. (2003). Cloning of human centromeres by transformation-associated recombination in yeast and generation of functional human artificial chromosomes. *Nucleic acids research*, vol. 31, n° 3, p. 922-934.
- Kovaleva, N.V. et Iakovlev, A.V. (1986). Characteristics of the morphology and mitotic condensation of human Y chromosomes with structural rearrangements. *Tsitologiya*, vol. 28, n° 12, p. 1322-1328.
- Lejeune, J., Gautier, M. et Turpin, R. (1959). Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, vol. 248, n° 11, p. 1721-1722.
- Lucas, M. et Dewhurst, C.J. (1972). Y chromosome fluorescence in phenotypic females. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth*, vol. 79, n° 6, p. 498-503.
- Magenis, E. et Donlon, T. (1982). Nonfluorescent Y chromosomes. Cytologic evidence of origin. *Human genetics*, vol. 60, n° 2, p. 133-138.
- Magenis, R., Brown, M., Donlon, T., Olson, S., Sheehy, R. et Tomar, D. (1985). Structural aberrations of the Y chromosome, including the nonfluorescent Y: cytologic origin and consequences. In Sandberg, A., *Progress and topics in cytogenetics* (p. 537-574). New York, Alan R. Liss. Inc.

- Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E.D. et Earnshaw, W.C. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *Journal of cell science*, vol. 117, n° Pt 23, p. 5461-5477.
- Maney, T., Hunter, A.W., Wagenbach, M. et Wordeman, L. (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *The Journal of cell biology*, vol. 142, n° 3, p. 787-801.
- Marc, M. et Michel, L. (2006). *Biologie cellulaire*. 10 édition, Paris, Elsevier Masson, 618 p.
- Marcus-Soekarman, D., Hamers, G., Mulder, A.L., Offermans, J., Offermans, J., Engelen, J., van Lent-Albrechts, J.C., Robben, S.G., de Muinck Keizer-Schrama, S., Wolffenbuttel, K.P., Looijenga, L.H., Oosterhuis, J.W., Schrandt-Stumpel, C. et Nijhuis, J. (2005). Sonographic genital ambiguity in a fetus due to a mosaic 45,X/46,X,idic(Y)(qter-p11.32::p11.32-qter) karyotype. *Prenatal diagnosis*, vol. 25, n° 4, p. 279-282.
- Marrocco, G., Poscente, M., Majore, S., De Bernardo, C., Rinaldi, R., Del Porto, G., Storniello, G. et Grammatico, P. (2003). Clinical management and molecular cytogenetic characterization in a 45,X/46,X,idic(Yp) patient with severe hypospadias. *Journal of pediatric surgery*, vol. 38, n° 8, p. 1258-1262.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N. et Okazaki, T. (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *The Journal of cell biology*, vol. 109, n° 5, p. 1963-1973.
- Masumoto, H., Nakano, M. et Ohzeki, J. (2004). The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, vol. 12, n° 6, p. 543-556.

- McIlree, M.E., Price, W.H., Brown, W.M., Tulloch, W.S., Newsam, J.E. et Maclean, N. (1966). Chromosome studies on testicular cells from 50 subfertile men. *Lancet*, vol. 2, n° 7454, p. 69-71.
- Mejia, J.E., Alazami, A., Willmott, A., Marschall, P., Levy, E., Earnshaw, W.C. et Larin, Z. (2002). Efficiency of de novo centromere formation in human artificial chromosomes. *Genomics*, vol. 79, n° 3, p. 297-304.
- Micic, M., Micic, S., Babic, M. et Diklic, V. (1990). Phenotype of two males with abnormal Y chromosomes. *Clinical genetics*, vol. 37, n° 5, p. 321-326.
- Mitchell, A.R., Gosden, J.R. et Miller, D.A. (1985). A cloned sequence, p82H, of the alphoid repeated DNA family found at the centromeres of all human chromosomes. *Chromosoma*, vol. 92, n° 5, p. 369-377.
- Muller, U., Donlon, T., Schmid, M., Fitch, N., Richer, C.L., Lalande, M. et Latt, S.A. (1986). Deletion mapping of the testis determining locus with DNA probes in 46,XX males and in 46,XY and 46,X,dic(Y) females. *Nucleic acids research*, vol. 14, n° 16, p. 6489-6505.
- Muro, Y., Masumoto, H., Yoda, K., Nozaki, N., Ohashi, M. et Okazaki, T. (1992). Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *The Journal of cell biology*, vol. 116, n° 3, p. 585-596.
- Musacchio, A. et Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 8, n° 5, p. 379-393.
- Nakano, M., Cardinale, S., Noskov, V.N., Gassmann, R., Vagnarelli, P., Kandels-Lewis, S., Larionov, V., Earnshaw, W.C. et Masumoto, H. (2008). Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Developmental cell*, vol. 14, n° 4, p. 507-522.
- Nonomura, K., Kakizaki, H., Fukuzawa, N., Fujieda, K., Harada, N., Niikawa, N. et Koyanagi, T. (2002). Monozygotic twins with discordant sexual phenotypes due to

- different ratios of mosaicism of 47,X,idic(Y),idic(Y)/46,X, idic(Y)/45,X. *Endocrine journal*, vol. 49, n° 4, p. 497-501.
- Nowell, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer research*, vol. 20, p. 462-466.
- Nowell, P.C. et Hungerford, D.A. (1960). A minute chromosome in Human chronic granulocytic leukaemia. *Science*, vol. 132, p. 1497.
- Okada, T., Ohzeki, J., Nakano, M., Yoda, K., Brinkley, W.R., Larionov, V. et Masumoto, H. (2007). CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context. *Cell*, vol. 131, n° 7, p. 1287-1300.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H. et Margolis, R.L. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, n° 9, p. 3734-3738.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S. et Margolis, R.L. (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *The Journal of cell biology*, vol. 104, n° 4, p. 805-815.
- Pardue, M.L. et Gall, J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 64, n° 2, p. 600-604.
- Pinkel, D., Straume, T. et Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, n° 9, p. 2934-2938.
- Plauchu, H., Magnin, G., Laurent, C., Combet, A., Drapier, E., Dumont, M., Rochet, Y. et Robert, J.M. (1981). Gonadic dysgenesis and dicentric chromosome Y. A report of two cases, one of which had a gonadoblastoma (author's transl). *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction*, vol. 10, n° 8, p. 839-844.

- Pluta, A.F., Saitoh, N., Goldberg, I. et Earnshaw, W.C. (1992). Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *The Journal of cell biology*, vol. 116, n° 5, p. 1081-1093.
- Politi, V., Perini, G., Trazzi, S., Pliss, A., Raska, I., Earnshaw, W.C. et Della Valle, G. (2002). CENP-C binds the alpha-satellite DNA in vivo at specific centromere domains. *Journal of cell science*, vol. 115, n° Pt 11, p. 2317-2327.
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C. et Housset, C. (2004). *Biologie Cellulaire*. Elsevier Masson, 854 p.
- Ponzio, G., DeMarchi, M., Carbonara, A., Godano, A. et Massara, F. (1981). Dicentric Y chromosome in a patient with gonadal dysgenesis and seminoma. *Human genetics*, vol. 58, n° 3, p. 282-284.
- Quilter, C.R., Nathwani, N., Conway, G.S., Stanhope, R., Ralph, D., Bahadur, G., Serhal, P., Taylor, K. et Delhanty, J.D. (2002). A comparative study between infertile males and patients with Turner syndrome to determine the influence of sex chromosome mosaicism and the breakpoints of structurally abnormal Y chromosomes on phenotypic sex. *Journal of medical genetics*, vol. 39, n° 12, p. e80.
- Quilter, C.R., Taylor, K., Conway, G.S., Nathwani, N. et Delhanty, J.D. (1998). Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Annals of Human Genetics*, vol. 62, n° Pt 2, p. 99-106.
- Quintana-Murci, L., Krausz, C. et McElreavey, K. (2001). The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic science international*, vol. 118, n° 2-3, p. 169-181.
- Richer, C.L., Murer-Orlando, M. et Drouin, R. (1983). R-banding of human chromosomes by heat denaturation and Giemsa staining after amethopterin-synchronization. *Canadian journal of genetics and cytology. Journal canadien de genetique et de cytologie*, vol. 25, n° 3, p. 261-269.

- Robinson, D.O., Dalton, P., Jacobs, P.A., Mosse, K., Power, M.M., Skuse, D.H. et Crolla, J.A. (1999). A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome. *Journal of medical genetics*, vol. 36, n° 4, p. 279-284.
- Roubin, M., de Grouchy, J., Chauveau, P., Rappaport, R. et Pellerin, D. (1977). Dicentric Y chromosome in a male pseudohermaphrodite 45,X/46,X, dic (Y)/47, XYY. *Annales de Genetique*, vol. 20, n° 3, p. 185-189.
- Ruchaud, S., Carmena, M. et Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 8, n° 10, p. 798-812.
- Savary, J.B., Vasseur, F., Flactif, M., Willatt, L., Lefebvre, J., Ferguson-Smith, M.A. et Deminatti, M.M. (1992). Cytogenetic and molecular investigations of an abnormal Y chromosome: evidence for a pseudo-dicentric (Yq) isochromosome. *Annales de Genetique*, vol. 35, n° 3, p. 134-139.
- Schaar, B.T., Chan, G.K., Maddox, P., Salmon, E.D. et Yen, T.J. (1997). CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *The Journal of cell biology*, vol. 139, n° 6, p. 1373-1382.
- Schmid, W. et D'Apuzzo, V. (1978). Centromere inactivation in a case of Turner variant with two dicentric iso-long arm Y chromosomes. *Human genetics*, vol. 41, n° 2, p. 217-223.
- Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, vol. 2, n° 7731, p. 971-972.
- Seifer, D.B., Meyers-Seifer, C.H., Lavy, G., Genel, M., DeCherney, A.H. et Yang-Feng, T.L. (1991). Laparoscopic adnexectomy in a prepubertal Turner mosaic female with isodicentric Y. *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 6, n° 4, p. 566-567.

- Shaffer, L.G. et N. Tommerup (2005). *ISCN 2005 : An International System for human Cytogenetic Nomenclature*. Karger, 130 p.
- Shankman, S., Spurdle, A.B., Morris, D., Rosendorff, J., Marques, I., Bernstein, R. et Ramsay, M. (1995). Presence of Y chromosome sequences and their effect on the phenotype of six patients with Y chromosome anomalies. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 55, n° 3, p. 269-275.
- Sloan, M.S., Rosenberg, S.M. et Brown, J.A. (1984). Primary amenorrhea and virilization in a true hermaphrodite with a rare dicentric Y chromosome. *Obstetrics and gynecology*, vol. 64, n° 3 Suppl, p. 64S-67S.
- Stalvey, J.R., Erickson, R.P., Dasouki, M., Glover, T. et Shokir, M. (1988). Clarification of chromosomal abnormalities associated with sexual ambiguity by studies with Y-chromosomal DNA sequences. *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 47, n° 3, p. 140-143.
- Stankiewicz, P., Helias-Rodzewicz, Z., Jakubow-Durska, K., Bocian, E., Obersztyn, E., Rappold, G.A. et Mazurczak, T. (2001). Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 101, n° 1, p. 20-25.
- Starr, D.A., Williams, B.C., Hays, T.S. et Goldberg, M.L. (1998). ZW10 helps recruit dynactin and dynein to the kinetochore. *The Journal of cell biology*, vol. 142, n° 3, p. 763-774.
- Stolecke, H., Pfeiffer, R., Hienz, H., Strohmenger, P. et Bier, L. (1976). *Diagnosis and therapy in a child with intersexual genitals and chromosomal mosaic (45, X-46, XYIQ, DIC)*. *Zeitschrift für Kinderchirurgie und Grenzgebiete*, vol. 18, n° 1, p. 90-96.
- Sugimoto, K., Furukawa, K., Kusumi, K. et Himeno, M. (1997). The distribution of binding sites for centromere protein B (CENP-B) is partly conserved among diverged higher order repeating units of human chromosome 6-specific alphoid DNA. *Chromosome*

research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology, vol. 5, n° 6, p. 395-405.

- Sullivan, B.A. et Karpen, G.H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nature structural & molecular biology*, vol. 11, n° 11, p. 1076-1083.
- Sullivan, B.A. et Schwartz, S. (1995). Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres. *Human molecular genetics*, vol. 4, n° 12, p. 2189-2197.
- Sullivan, B.A. et Willard, H.F. (1998). Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres. *Nature genetics*, vol. 20, n° 3, p. 227-228.
- Sumner, A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, vol. 75, n° 1, p. 304-306.
- Teraoka, M., Narahara, K., Yokoyama, Y., Tsuji, K., Kikkawa, K., Ito, S., Koyama, K. et Seino, Y. (1998). 45,X/46,X,idic(Yq) mosaicism: clinical, cytogenetic, and molecular studies in four individuals. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 78, n° 5, p. 424-428.
- Tharapel, A.T., Kadandale, J.S., Martens, P.R., Wachtel, S.S. et Wilroy, R.S., Jr (2002). Prader Willi/Angelman and DiGeorge/velocardiofacial syndrome deletions: diagnosis by primed in situ labeling (PRINS). *American Journal of Medical Genetics*, vol. 107, n° 2, p. 119-122.
- Therman, E., Sarto, G.E. et Patau, K. (1974). Apparently isodicentric but functionally monocentric X chromosome in man. *American Journal of Human Genetics*, vol. 26, n° 1, p. 83-92.
- Therman, E., Trunca, C., Kuhn, E.M. et Sarto, G.E. (1986). Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere. *Human genetics*, vol. 72, n° 3, p. 191-195.

- Tjio, J.-. et Levan, A. (1956). The chromosome number of man. *Hereditas*, vol. 42, p. 1-6.
- Tomkiel, J., Cooke, C.A., Saitoh, H., Bernat, R.L. et Earnshaw, W.C. (1994). CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *The Journal of cell biology*, vol. 125, n° 3, p. 531-545.
- Tuck-Muller, C.M., Chen, H., Martinez, J.E., Shen, C.C., Li, S., Kusyk, C., Batista, D.A., Bhatnagar, Y.M., Dowling, E. et Wertelecki, W. (1995). Isodicentric Y chromosome: cytogenetic, molecular and clinical studies and review of the literature. *Human genetics*, vol. 96, n° 1, p. 119-129.
- Tuncbilek, E., Halicioglu, C., Bobrow, M. et Ustay, K. (1976). 45,XO/46,XYg dic mosaicism in a patient with ambiguous genitalia. *Clinical genetics*, vol. 9, n° 3, p. 365-370.
- Tyler-Smith, C. et Brown, W.R. (1987). Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. *Journal of Molecular Biology*, vol. 195, n° 3, p. 457-470.
- Vagnarelli, P., Ribeiro, S.A. et Earnshaw, W.C. (2008). Centromeres: old tales and new tools. *FEBS letters*, vol. 582, n° 14, p. 1950-1959.
- Valetto, A., Bertini, V., Rapalini, E., Baldinotti, F., Di Martino, D. et Simi, P. (2004). Molecular and cytogenetic characterization of a structural rearrangement of the Y chromosome in an azoospermic man. *Fertility and sterility*, vol. 81, n° 5, p. 1388-1390.
- Waldeyer, W. (1888). Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch.Mikr.Anat.*, vol. 32, p. 1-122.
- Wandall, A. (1994). A stable dicentric chromosome: both centromeres develop kinetochores and attach to the spindle in monocentric and dicentric configuration. *Chromosoma*, vol. 103, n° 1, p. 56-62.

- Wandall, A. (1995). Clonal origin of partially inactivated centromeres in a stable dicentric chromosome. *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 69, n° 3-4, p. 193-195.
- Waye, J.S. et Willard, H.F. (1987). Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: a survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic acids research*, vol. 15, n° 18, p. 7549-7569.
- Weckworth, P.F., Johnson, H.W., Pantzar, J.T., Coleman, G.U., Masterson, J.S., McGillivray, B. et Tze, W.J. (1988). Dicentric Y chromosome and mixed dysgenesis. *The Journal of urology*, vol. 139, n° 1, p. 91-94.
- Wood, K.W., Sakowicz, R., Goldstein, L.S. et Cleveland, D.W. (1997). CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*, vol. 91, n° 3, p. 357-366.
- Yang, C.H., Tomkiel, J., Saitoh, H., Johnson, D.H. et Earnshaw, W.C. (1996). Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Molecular and cellular biology*, vol. 16, n° 7, p. 3576-3586.
- Ying, K.L. et Ives, E.J. (1971). Mitotic behavior of a human dicentric Y chromosome. *Cytogenetics*, vol. 10, n° 3, p. 208-218.
- Yoda, K., Kitagawa, K., Masumoto, H., Muro, Y. et Okazaki, T. (1992). A human centromere protein, CENP-B, has a DNA binding domain containing four potential alpha helices at the NH2 terminus, which is separable from dimerizing activity. *The Journal of cell biology*, vol. 119, n° 6, p. 1413-1427.
- Yunis, J. (1965). *Human chromosome methodology*. New-York, Academic,

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : CENP-B does not act in
cis to inactivate kinetochore in two cases of isodicentric Yq chromosomes

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Marie-Chantal Grégoire

inscrit(e) au programme de Maîtrise en Biochimie

de la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature

Date :

7/01/09

Nom Dre Nicole Lemieux

Coordonnées Laboratoire de cytogénétique moléculaire, Département de pathologie
et biologie cellulaire, Université de Montréal, Québec, Canada

Signature

Date :

07/04/09

Nom Mélanie Beaulieu Bergeron

Coordonnées Laboratoire de cytogénétique moléculaire, Département de pathologie
et biologie cellulaire, Université de Montréal, Québec, Canada

Signature

Date :

Nom

Coordonnées

Signature

Date :

Nom

Coordonnées

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteur(e)s, co-auteur(e)s de l'article intitulé : CENP-B

DOES NOT ACT IN CIS TO INACTIVATE KINETOCHORE
IN TWO CASES OF ISODICENTRIC Y9 CHROMOSOMES

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : MARIE-CHANTAL GRÉGOIRE

inscrit(e) au programme de BIOCHIMIE (MAÎTRISE)

de la Faculté de MÉDECINE ET SCIENCES DE LA SANTÉ de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature _____ Date : 19 Dec 2008

Nom DR. RÉGEN DROUIN

Coordonnées DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE, FACULTÉ DE
MÉDECINE ET DES SCIENCES DE LA SANTÉ, U. DE SHERBROOKE

Signature Rachel Laframboise Date : 19 déc 2008

Nom DRE RACHEL LAFRAMBOISE

Coordonnées SERVICE DE GÉNÉTIQUE MÉDICALE, DÉPT. DE PÉDIATRIE,
CHUQ, PAVILLON CHUL 2705, QUÉBEC, Q.C., CANADA.
BLVD LAURIER

Signature _____ Date : 19/12/2008

Nom DR JEAN-LUC ARDILLOUZE

Coordonnées SERVICE D'ENDOCRINOLOGIE, DÉPARTEMENT DE
MÉDECINE, FMSS, UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Signature _____ Date : 09/1/06

Nom DRE NATHALIE MOORE

Coordonnées Hôpital Sainte-Justine Leclerc
Québecville Qué

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).