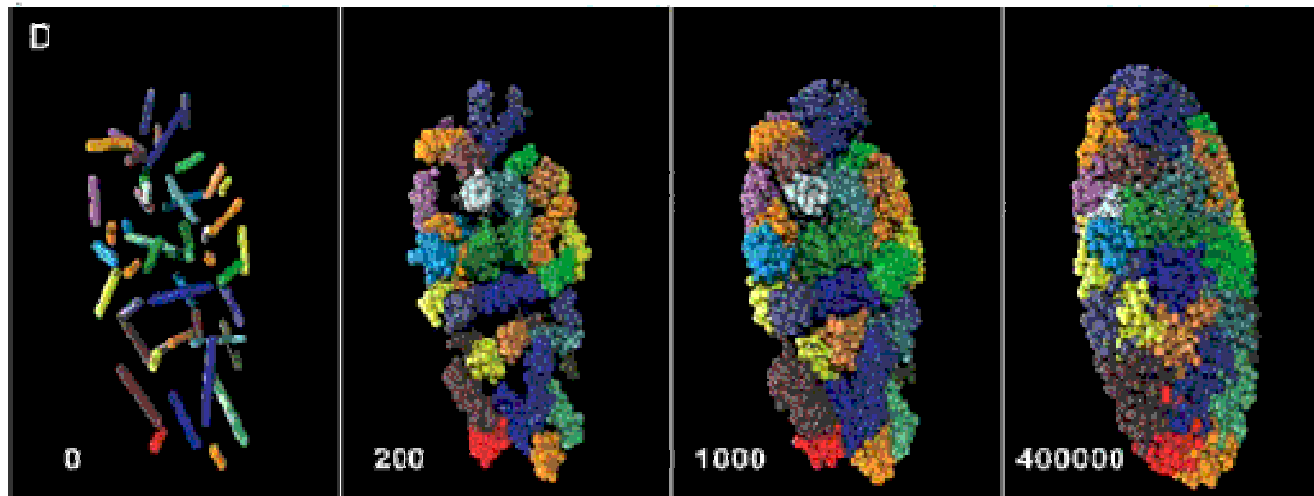




Etude de l'organisation spatiale du génome dans le noyau interphasique de cellules trisomiques 21



*Cytogénétique Médicale - CHU Estaing
Directeurs de Thèse : P.Vago/ L.Gouas*

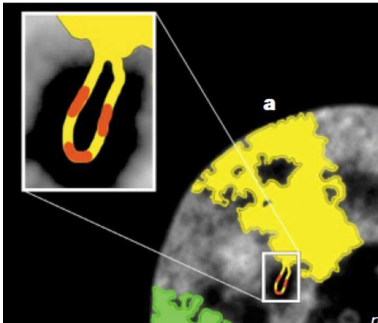
S.Kemeny

24/01/2014

Architecture nucléaire et régulation du génome

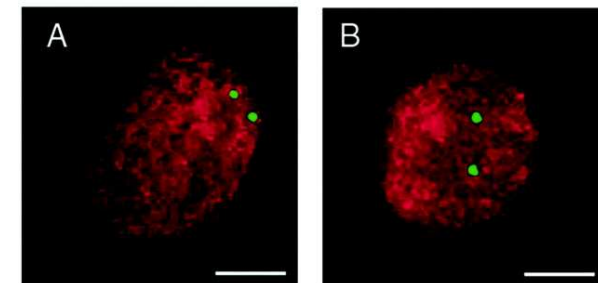
- Interphase : chaque chromosome occupe un espace du noyau → **Territoire chromosomique (TC)**
- Corrélation activité transcriptionnelle et disposition des gènes à l'intérieur du TC
 - Activité ↗ à la surface des TC → boucles

Simonis et al, 2006



Cremer et al, 2001

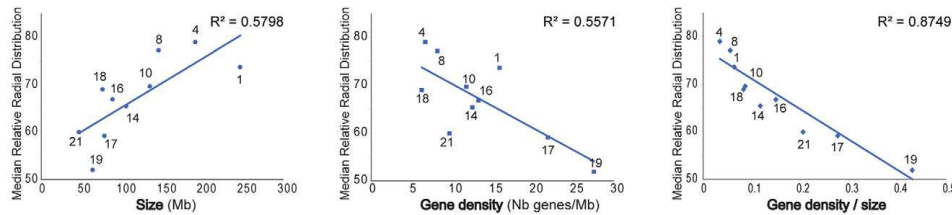
- Corrélation activité transcriptionnelle et disposition des gènes dans le noyau
 - Relocalisation vers l'intérieur du noyau



Kosak et al. 2002

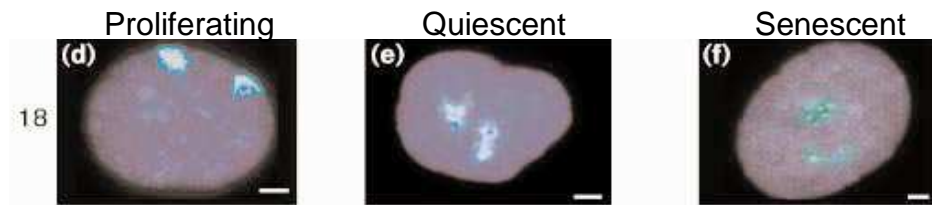
Distribution des TC

- Disposition radiale par rapport au centre du noyau
- Mécanisme ? :
 - Taille, densité en gènes, « densité en gènes / taille »



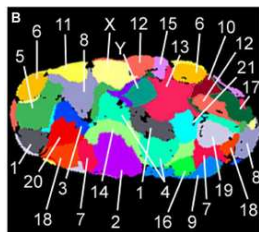
Heride et al, 2010

- Activité cellulaire



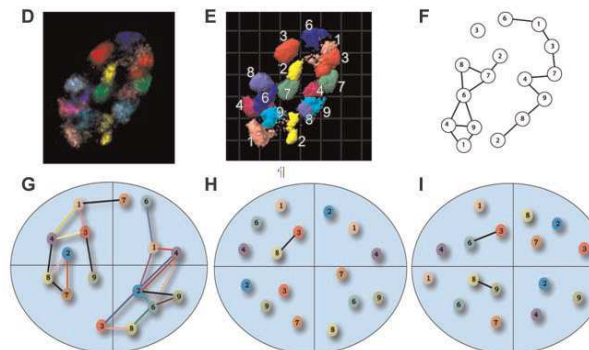
Bridger et al, 2000

- Proximité spatiale préférentielle ?



Bolzer et al, 2000

Pas d'association



78% association
TC1-TC4

52%
d'association
TC7-TC8

Zeist et al, 2009

Objectifs

Étude de l'organisation spatiale intranucléaire des chromosomes et des gènes dans le noyau des cellules en interphase dans le contexte de la trisomie 21

Trisomie 21

- Expressivité variable
- Traits dits « constants » :
 - déficience intellectuelle
 - hypotonie musculaire
 - laxité articulaire
 - dysmorphie
- Traits dits « inconstants » :
 - leucémie (+) / Incidence (-) des cancers mammaires
 - malformation cardiaque, digestive et ophtalmo
 - épilepsie
 - pathologies auto-immunes
 - Alzheimer
 - ...



Gènes impliqués dans la trisomie 21 ?

□ 1/ « Gene dosage effect »

→ Surexpression des gènes de la DCR

Mao et al, 2005

□ 2/ « Developmental instability hypothesis »

→ Dérégulation transcriptionnelle secondaire et globale de nombreux gènes **diploïdes** situés sur les autres chromosomes

Chung et al, 2005; Chou et al, 2008

Hypothèses

□ Hypothèse 1:

La présence d'un chromosome 21 surnuméraire modifie l'organisation spatiale des chromosomes dans le noyau interphasique

→ Disposition des TC

□ Hypothèse 2 :

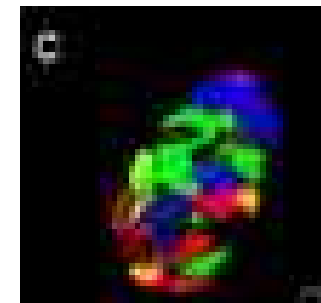
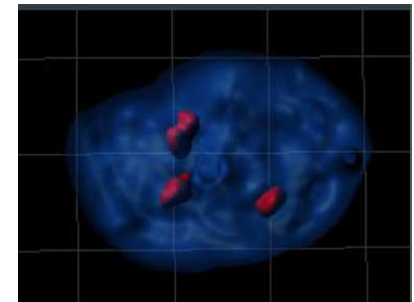
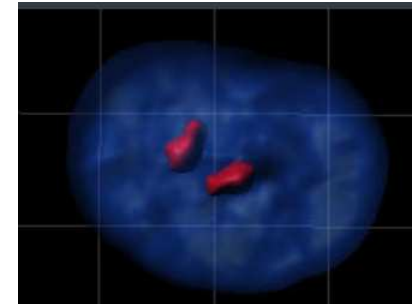
La présence d'un chromosome 21 surnuméraire entraîne une relocalisation intra-nucléaire de gènes

→ Disposition du gène *MEST* (7q32)

Hypothèse 1

La présence d'un chromosome 21 surnuméraire modifie l'organisation spatiale des chromosomes dans le noyau interphasique

- La présence d'un chromosome 21 surnuméraire entraîne t-elle une modification du volume nucléaire des cellules trisomiques ?
- Quelle est la position radiale des trois TC21 ?
- Quel est le positionnement des trois TC21 les uns par rapport aux autres ?
- La présence d'un chromosome 21 surnuméraire entraîne t-elle une modification de la position radiale des autres TC ?



Hypothèse 2

La présence d'un chromosome 21 entraîne une relocalisation intra-nucléaire de gènes

- La présence d'un chromosome 21 surnuméraire entraîne-t-elle une relocalisation spatiale du gène MEST ?
- Si la relocalisation spatiale de MEST est démontrée, celle-ci est-elle bien en rapport avec sa surexpression ?

Matériel

- Villosités choriales de cellules T21 / cellules diploïdes contrôles

- Deux études montrent une dérégulation de nombreux gènes dans ce type de cellules en cas de trisomie

Altug-Teber et al, 2007; Rozovski et al, 2007

- Nous disposons des cultures cellulaires cryoconservées de 10 cas T21 et 10 cas contrôles

- La disposition radiale des TC dans le noyau de ces cellules n'a jamais été explorée

Approche FISH-3D

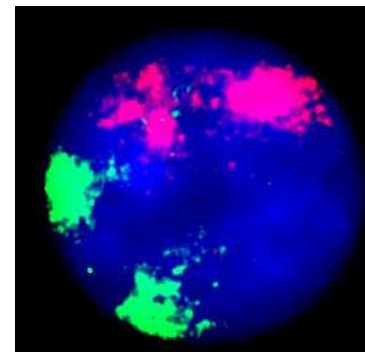
Etape 1
Culture cellulaire sur lamelle



Etape 2
Fixation cellulaire

Etape 3
FISH

- 1 - Perméabilisation cellulaire
- 2 – Dénaturation :
 - ADN génomique
 - Sondes de peinture chromosomique
- 3 – Hybridation des sondes
- 4 – Lavages
- 5 – Elimination des duplexes ARN/ADN



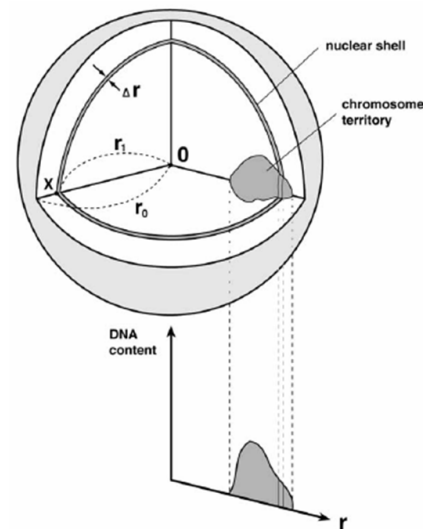
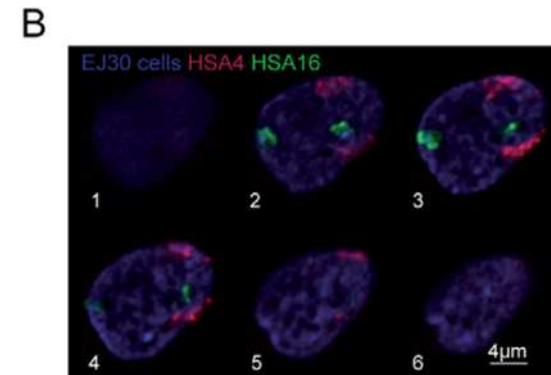
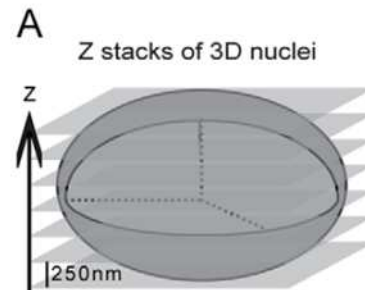
Cremer et al, 2008

Microscopie confocale

Etape 4
Microscopie confocale
1 – Acquisition images
2 – Traitement images

Etape 5
Mesures des distances intranucléaires

Etape 6
Analyses statistiques des données



Conclusion

- Présence d'un chromosome 21 supplémentaire
 - modification architecture intranucléaire
- Etude globale : TC
- Etude ciblée : gène *MEST*

→ Élément d'explication à la dérégulation transcriptionnelle globale en cas de T21

Merci de votre attention
