

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Année Universitaire 2024/2025.

Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSB d'Oran)

Département des Classes Préparatoire

Polycopie Pédagogique

Matière :

**Travaux pratiques
de génétique**

Filière : Sciences Biologiques

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Réalisé par :

Dr. LADLI Meriem

Matière enseignée pendant les Années Universitaires :

2023/2024

2024/2025

Table des matières

Préambule	4
Consignes de sécurité au laboratoire	6
TP 1 : Extraction d'ADN	8
Introduction.....	8
1. L'ADN, support universel de l'information génétique	8
2. Pourquoi extraire l'ADN ?	9
3. Principe général de l'extraction de l'ADN	9
4. Sources biologiques pour l'extraction de l'ADN	10
5. Objectifs pédagogiques.....	11
TP1 (a) : extraction d'ADN à partir de muscle de poisson	12
Matériel et produits.....	12
Appareils.....	12
Réactifs et solutions.....	12
Protocole expérimental	13
Rôle des produits et des étapes	14
Résultats attendus	14
TP1 (b) : Extraction d'ADN à partir de sang (technique salting out)	17
Objectifs.....	17
Matériel nécessaire	17
Réactifs	17
Matériel de laboratoire	17
Protocole expérimental	18
Rôle des composants et des étapes :	19
Résultats attendus	20
TP3 : Réalisation d'un caryotype humain	22
Introduction.....	22
Objectifs du TP :.....	23
Partie 1 (théorique)	24
Partie 2 (pratique).....	26
TP4 – Étude du crossing-over chez <i>Sordaria macrospora</i>	31
Objectifs.....	33
Matériel et réactifs	33
Protocole expérimental	33
Résultats attendus	34
Remarques pédagogiques (explication des étapes)	36

TP5 : Détection du corpuscule de Barr dans un frottis buccal	38
Introduction.....	38
Objectifs pédagogiques	39
Matériel et produits nécessaires	39
Protocole expérimental	40
Rôle des étapes et produits.....	41
Résultats attendus	42
Références bibliographiques	43

Préambule

Ce recueil de travaux pratiques s'inscrit dans le cadre du module de génétique destiné aux étudiants de deuxième année du premier cycle. Ces TP ont été conçus pour accompagner les enseignements théoriques et permettre aux étudiants de découvrir et maîtriser les techniques expérimentales fondamentales en génétique.

À travers ces séances, les étudiants seront amenés à manipuler et observer divers aspects de la génétique moléculaire, cellulaire et chromosomique. Ils aborderont notamment l'extraction d'ADN, l'étude du caryotype, la recombinaison génétique, ainsi que l'analyse du corpuscule de Barr.

Prérequis

Pour tirer pleinement profit de ces séances de travaux pratiques, les étudiants doivent avoir acquis un certain nombre de notions théoriques, notamment :

- Les bases de la biologie cellulaire (structure de la cellule, cycle cellulaire, mitose, méiose),
- Les concepts fondamentaux de la génétique classique (gènes, allèles, dominance, hérédité mendélienne),
- La structure et la fonction de l'ADN, ainsi que les mécanismes de transcription et de traduction,
- Les principes de la cytogénétique, en particulier la structure des chromosomes et la notion de caryotype.

Une familiarité préalable avec le maniement du microscope optique, les règles d'asepsie en laboratoire et l'utilisation de verrerie et micropipettes est également souhaitée.

Contenu et objectifs

Chaque TP comprend :

- Une introduction présentant les concepts clés,
- Les objectifs pédagogiques,
- Le matériel et les réactifs nécessaires,
- Le protocole détaillé à suivre,
- Les résultats attendus,
- Des remarques pédagogiques permettant de mieux comprendre chaque étape.

Ce document vise à développer chez les étudiants leur capacité d'analyse, leur rigueur expérimentale, ainsi que leur compréhension des mécanismes génétiques fondamentaux.

Consignes de travail

Il est vivement recommandé de préparer chaque séance en lisant attentivement le protocole, puis de rédiger un compte rendu complet à la fin de chaque TP. Ce compte rendu devra contenir

- Une introduction,
- Le but du TP,
- Le matériel utilisé,
- La méthode suivie,
- Les résultats obtenus (accompagnés de schémas, photos ou tableaux si nécessaire),
- Une conclusion personnelle qui analyse les résultats et leur portée.

Cette démarche vise à renforcer l'acquisition des connaissances et à encourager une réflexion critique autour des expériences réalisées.

Consignes de sécurité au laboratoire

Le respect des règles de sécurité est indispensable lors de toute activité en laboratoire. Ces consignes visent à protéger les étudiants, le personnel, le matériel et l'environnement. Elles doivent être strictement appliquées avant, pendant et après chaque séance de travaux pratiques.

1. Tenue et comportement

- Porter obligatoirement une blouse de laboratoire propre et fermée.
- Attacher les cheveux longs, éviter les bijoux ou vêtements amples.
- Ne jamais manger, boire ou mâcher du chewing-gum dans le laboratoire.
- Garder une attitude sérieuse et concentrée tout au long de la séance.
- Ne pas courir ou se bousculer.

2. Hygiène et protection individuelle

- Porter des gants jetables et des lunettes de protection si nécessaire (produits chimiques, sang, etc.).
- Se laver les mains soigneusement avant et après la manipulation.
- Ne jamais porter les mains au visage pendant la manipulation.

3. Utilisation du matériel

- N'utiliser que le matériel autorisé et conformément aux instructions du protocole.
- Manipuler avec précaution les objets fragiles (lames, tubes, verrerie...).
- Ne jamais pipeter à la bouche.
- Signaler immédiatement tout matériel cassé ou défectueux.

4. Gestion des produits et déchets

- Lire attentivement les étiquettes et fiches de sécurité des produits utilisés.
- Utiliser les produits chimiques avec modération et prudence.
- Éliminer les déchets biologiques ou chimiques dans les contenants appropriés.
- Ne jamais jeter de produits dans l'évier sans autorisation.

5. En cas d'incident ou d'accident

- Signaler immédiatement tout accident, coupure, brûlure, projection ou malaise à l'enseignant responsable.
- En cas de projection oculaire ou cutanée, rincer abondamment à l'eau claire pendant au moins 10 minutes.
- Connaître l'emplacement des sorties de secours, de la douche de sécurité, de l'extincteur et de la trousse de premiers secours.

TP 1 : Extraction d'ADN

Introduction

1. L'ADN, support universel de l'information génétique

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule biologique essentielle, présente chez tous les êtres vivants ainsi que chez certains virus. Il constitue le support chimique de l'information génétique, c'est-à-dire les instructions nécessaires à la fabrication des protéines et au fonctionnement des cellules.

Sur le plan structurel, l'ADN est formé de deux brins enroulés en double hélice. Chaque brin est un polymère de nucléotides, eux-mêmes composés de trois éléments :

- un groupe phosphate,
- un sucre désoxyribose,
- une base azotée (adénine [A], thymine [T], cytosine [C] ou guanine [G]).

L'appariement spécifique entre les bases (A avec T, C avec G) permet à l'ADN de se répliquer fidèlement et de transmettre l'information génétique d'une cellule à une autre, ou d'une génération à la suivante. (Nimbkar & Bhatt, 2022)

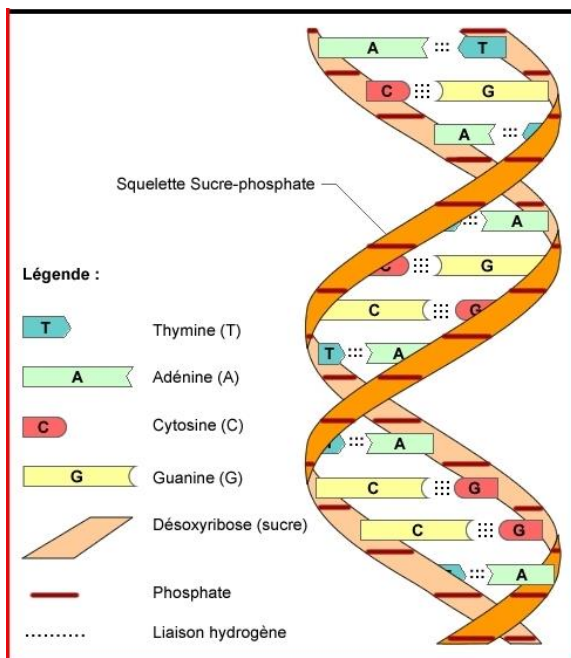


Figure : Structure de la double hélice d'ADN.

Schéma de l'ADN formé de deux brins antiparallèles enroulés en hélice. Les nucléotides s'associent par paires complémentaires : A avec T, C avec G. Les brins sont reliés par des liaisons hydrogène et forment une structure stable portant l'information génétique

2. Pourquoi extraire l'ADN ?

L'extraction de l'ADN est une étape incontournable dans de nombreuses disciplines :

- Biologie moléculaire : PCR, clonage, séquençage.
- Médecine : diagnostic de maladies génétiques, suivi thérapeutique, médecine personnalisée.
- Criminologie : identification génétique en médecine légale.
- Agronomie : sélection variétale, transgénèse, analyse phylogénétique.
- Recherche fondamentale : études de l'expression génique, de la régulation, de l'évolution...

L'objectif est d'obtenir un ADN pur et intact, libre des autres composants cellulaires (protéines, lipides, ARN), afin de pouvoir l'analyser ou l'amplifier. (Gahlon, 2020).

3. Principe général de l'extraction de l'ADN

Quelle que soit la source biologique utilisée, l'extraction d'ADN repose sur quatre étapes principales :

a) Lyse cellulaire

Elle permet de rompre les membranes cellulaires et nucléaires pour libérer le contenu cellulaire, en particulier l'ADN. On utilise souvent :

- des détergents (ex : SDS) pour dissoudre les lipides membranaires,
- des enzymes protéolytiques (ex : Protéinase K) pour digérer les protéines.

b) Élimination des contaminants

Les protéines et autres débris sont éliminés par :

- des solutions salines concentrées (NaCl) qui les précipitent,

- parfois des solvants organiques (phénol/chloroforme) dans des protocoles plus avancés.

c) Précipitation de l'ADN

L'ADN est précipité par l'ajout d'un alcool froid (éthanol ou isopropanol), ce qui diminue sa solubilité et le rend visible sous forme de filaments blancs.

d) Purification et mise en solution

L'ADN est lavé, séché, puis remis en solution dans un tampon adapté (souvent TE : Tris-EDTA) pour être conservé ou utilisé.

4. Sources biologiques pour l'extraction de l'ADN

L'ADN peut être extrait à partir d'une grande variété de matériaux biologiques :

Source	Exemples	Avantages
Tissus animaux	Muscle de poisson, foie, organes	Riche en cellules, facile à manipuler
Sang	Humain ou animal	Facile à collecter, riche en leucocytes
Salive, cellules buccales	Écouvillons buccaux	Méthode non invasive
Végétaux	Feuilles, graines	Intéressant pour les études phylogénétiques
Micro-organismes	Bactéries, levures	Faciles à cultiver en laboratoire

Dans ce polycopié, nous aborderons l'extraction d'ADN à partir de deux sources animales :

- le **muscle de poisson** et le **sang humain**.

Dans le tissu musculaire de poisson, l'ADN est contenu dans les noyaux des cellules musculaires. Le tissu est solide et nécessite une lyse efficace pour libérer l'ADN, ainsi que l'élimination des protéines et autres composants cellulaires. (Lopera-Barrero et al., 2008).

Dans le sang humain, l'ADN est principalement contenu dans les leucocytes (globules blancs), tandis que les globules rouges (GR), très nombreux, sont dépourvus de noyau (donc pas d'ADN). Ainsi, il est nécessaire de séparer et éliminer les GR pour isoler uniquement les leucocytes riches en ADN. (Ashok, Dogra, & Prakash, 2023).

5. Objectifs pédagogiques

Ces travaux pratiques visent à :

- comprendre les principes physico-chimiques de l'extraction de l'ADN ;
- manipuler des techniques de base (lyse, centrifugation, précipitation, resuspension) ;
- observer l'ADN extrait de manière macroscopique ;
- prendre conscience des conditions expérimentales (température, temps, concentration des réactifs) qui influencent le rendement et la qualité de l'ADN.

TP1 (a) : extraction d'ADN à partir de muscle de poisson

Matériel et produits

Matériel de laboratoire

- Gants en latex
- Mortier et pilon
- Scalpel

Tubes à essai

- Tubes Eppendorf (1,5 mL)
- Tube Falcon (15 ou 50 mL)
- Bécher
- Entonnoir
- Papier filtre (ou compresse stérile/filtre à café)
- Éprouvette graduée
- Micropipettes (100, 200, 1000 μ L) + cônes stériles
- Portoirs pour Eppendorf et tubes à essai
- Pissette
- Balance de précision

Appareils

- Vortex
- Bain-marie ou étuve à 65 °C
- Centrifugeuse réfrigérée (capable de 10 000 g)

Réactifs et solutions

- Tissu musculaire de poisson (env. 50 mg)
- Tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 ; 0,4 M NaCl)
- SDS 20 % (Sodium Dodécyl Sulfate)
- Protéinase K (20 mg/mL)
- NaCl 6 M
- Isopropanol (froid)
- Éthanol 70 % (froid)
- Tampon TE (10 mM Tris-HCl ; 0,1 mM EDTA, pH 8,0)

- Eau distillée
- NaOH (pour ajustement de pH si besoin)

Protocole expérimental

Étape 1 : Préparation de l'échantillon

1. Peser 50 mg de muscle de poisson à l'aide de la balance de précision.
2. Émincer finement le tissu avec un scalpel, puis broyer dans un mortier propre.

Étape 2 : Lyse cellulaire et digestion enzymatique

3. Transférer l'échantillon broyé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL.
4. Ajouter dans ce tube :
 - 400 µL de tampon de lyse (Tris-HCl / NaCl),
 - 40 µL de SDS 20 %,
 - 10 µL de protéinase K (20 mg/mL).
5. Vortexer quelques secondes pour homogénéiser.
6. Incuber à 65 °C pendant 1 heure (bain-marie ou étuve).

Cette étape permet la désintégration des membranes cellulaires et nucléaires et la digestion des protéines associées à l'ADN.

Étape 3 : Précipitation des protéines et débris

7. Ajouter 300 µL de NaCl 6 M.
8. Vortexer fortement pendant 30 secondes.
9. Centrifuger à 10 000 g pendant 30 minutes à 4 °C.

Le culot contient les protéines et débris cellulaires.

Étape 4 : Précipitation de l'ADN

10. Transférer la phase aqueuse (supernatant) dans un nouveau tube Eppendorf propre.
11. Ajouter un volume égal d'isopropanol froid.
12. Agiter doucement par retournement ou vortex rapide.
13. Incuber à -20 °C pendant 1 heure pour précipiter l'ADN.

Étape 5 : Observation

14. Centrifuger à 10 000 g pendant 20 minutes à 4 °C.
15. Un culot blanc, filamenteux et visqueux apparaît : c'est la méduse d'ADN.

Rôle des produits et des étapes

Composant ou étape	Rôle
Tampon Tris-HCl (pH 8,0)	Maintien d'un pH stable optimal pour l'activité de la protéinase K et la conservation de l'ADN.
NaCl (0,4 M / 6 M)	Stabilise l'ADN chargé négativement ; précipite les protéines et facilite la séparation des phases.
SDS (20 %)	Détergent qui lyse les membranes cellulaires et nucléaires en solubilisant les lipides.
Protéinase K	Enzyme qui dégrade les protéines (histones, enzymes, membranes) et inhibe les nucléases.
Incubation à 65 °C	Température optimale pour l'action de la protéinase K et la dénaturation des protéines.
Centrifugation	Permet de séparer les débris cellulaires et protéines du surnageant contenant l'ADN.
Isopropanol froid	Précipite l'ADN en diminuant sa solubilité dans l'eau (effet hydrophobe + neutralisation des charges).
Incubation à -20 °C	Favorise la précipitation complète de l'ADN.
Éthanol 70 % froid	Sert à laver l'ADN précipité, en éliminant les sels et impuretés résiduelles.
Aspect de « méduse »	Visualisation concrète de l'ADN : filamenteux, blanchâtre, gélatineux.

Résultats attendus

- Observation visuelle d'un précipité blanc gélatineux, filamenteux et adhérent à la paroi du tube : l'ADN.
- Sa forme filamenteuse permet de confirmer une extraction réussie.
- En cas d'échec, il est important de vérifier la qualité du broyage, la température d'incubation, la présence de SDS et de protéinase K, ou encore la propreté des tubes.

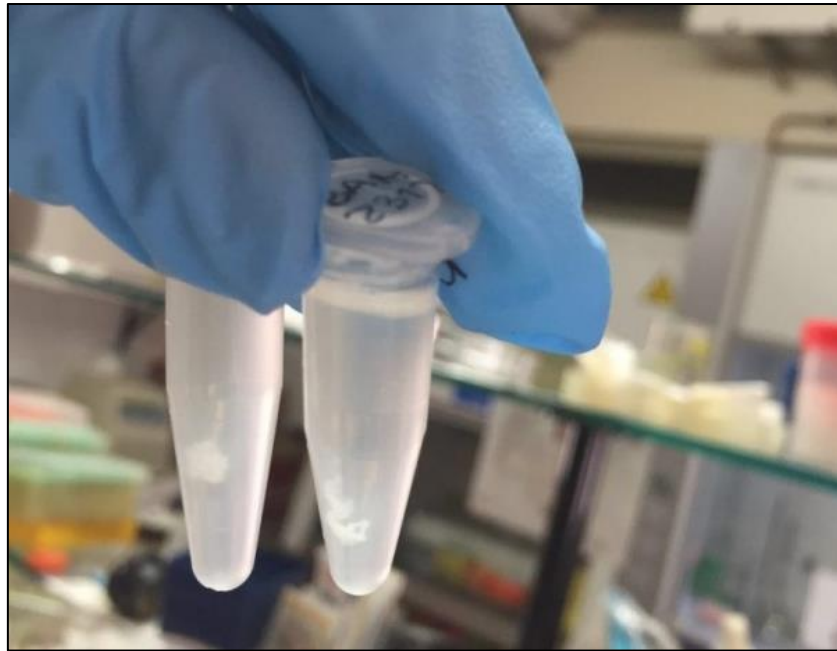


Figure 2 : Méduse d'ADN visible à l'œil nu après extraction à partir de muscle de poisson.

Exercices de compréhension

Exercice 1 – Questions à choix multiple (QCM)

1. Lors de l'extraction d'ADN, l'étape de lyse cellulaire a pour but :
 - A. De colorer l'ADN
 - B. De dégrader les protéines
 - C. De libérer l'ADN contenu dans les cellules
 - D. D'identifier le type de cellule

► **Bonne réponse : C**

2. Pourquoi ajoute-t-on du sel (NaCl) dans le tampon d'extraction ?
 - A. Pour colorer l'ADN
 - B. Pour favoriser l'interaction entre l'ADN et l'éthanol
 - C. Pour empêcher la précipitation de l'ADN
 - D. Pour digérer les membranes

► **Bonne réponse : B**

3. Quelle est la fonction de l'éthanol froid dans cette expérience ?
 - A. Dissoudre l'ADN
 - B. Précipiter l'ADN
 - C. Colorer l'ADN
 - D. Rendre l'ADN plus fluide

► **Bonne réponse : B**

Exercice 2 – Vrai ou Faux

1. L'ADN est visible à l'œil nu après précipitation.

► **Réponse : Vrai**

2. Le savon sert uniquement à rendre la solution homogène.

► **Réponse : Faux** (il permet de casser les membranes lipidiques)

3. On peut extraire l'ADN uniquement à partir de cellules végétales.

► **Réponse : Faux** (aussi cellules animales, bactériennes...)

TP1 (b) : Extraction d'ADN à partir de sang (technique salting out)

Objectifs

- Extraire l'ADN à partir des leucocytes (globules blancs) présents dans le sang.
- Comprendre les étapes spécifiques de purification de l'ADN à partir d'un liquide biologique.
- Observer la précipitation macroscopique de l'ADN sous forme de "méduse".

Matériel nécessaire

Réactifs

- Tampon TE 10/10 (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 10 mM ; pH 8)
- Protéinase K (20 mg/mL)
- Solution de lyse des globules blancs (contenant SDS et NaCl)
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Éthanol absolu froid
- NaOH (si nécessaire pour la resuspension)

Matériel de laboratoire

- Centrifugeuse
- Bain-marie réglé à 37°C
- Tubes Falcon de 50 mL
- Tubes à essai
- Micropipettes (100 µL, 200 µL, 1000 µL) avec cônes jetables
- Microtubes (Eppendorf) de 1,5 mL
- Balance de précision
- Étuvé (optionnel)
- Gants en latex, masque, blouse de laboratoire
- Pissette
- Portoirs pour tubes à essai et microtubes
- Glace

Protocole expérimental

Partie 1 : Isolement des globules blancs

1. Décongeler 5 à 10 mL de sang à 37°C dans un bain-marie.
2. Compléter le tube jusqu'à 25 mL avec le tampon TE 10/10.
3. Agiter doucement puis placer le tube sur glace pendant 30 minutes.
4. Centrifuger à 3000 tours par minute (rpm) pendant 15 minutes.
5. Éliminer délicatement le surnageant (globules rouges lysés).
6. Ajouter 15 mL de tampon TE 10/10, resuspendre doucement le culot.
7. Compléter à 25 mL avec le tampon TE 10/10, remettre sur glace pendant 15 minutes.
8. Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes.
9. Répéter les étapes 5 à 8 jusqu'à obtenir un culot blanc (leucocytes).

Partie 2 : Lyse cellulaire et digestion

10. Ajouter 1 mL de solution de lyse au culot de leucocytes.
11. Ajouter 25 µL de protéinase K (20 mg/mL).
12. Homogénéiser doucement.
13. Incuber à 37°C pendant 1 heure dans un bain-marie sous agitation douce.

Partie 3 : Précipitation de l'ADN

14. Ajouter 1 mL de NaCl, agiter vigoureusement.
15. Centrifuger à 4000 rpm pendant 15 minutes.
16. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube.
17. Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid.
18. Mélanger doucement en retournant le tube pour observer la formation de la "méduse" d'ADN.

Rôle des composants et des étapes :

Composant ou étape	Rôle technique	Explication pédagogique
Décongélation du sang à 37°C	Ramener le sang congelé à température physiologique pour permettre les réactions enzymatiques.	Une décongélation douce préserve l'intégrité des cellules et la qualité de l'ADN.
Dilution dans tampon TE (Tris-EDTA)	Maintien d'un pH stable et protection de l'ADN contre la dégradation enzymatique.	Le tampon TE stabilise l'ADN et empêche son hydrolyse durant les lavages et centrifugations.
Centrifugation à 3000 tours/min	Séparation des cellules en fonction de leur densité pour isoler les leucocytes (culot blanc).	Les globules rouges, sans noyau, restent en suspension ou sont éliminés, ce qui permet d'enrichir en leucocytes.
Lavages répétés au tampon TE	Élimination progressive des globules rouges et autres impuretés.	Permet d'obtenir un culot blanchâtre, riche en leucocytes contenant l'ADN.
Lyse cellulaire avec SDS + protéinase K	Rupture des membranes cellulaires et digestion des protéines pour libérer l'ADN.	Le SDS solubilise les membranes ; la protéinase K digère les protéines pour libérer un ADN pur.
Incubation à 37°C (1h ou overnight selon protocole)	Favorise l'action enzymatique pour une digestion optimale des protéines.	Une incubation adaptée assure un bon rendement d'extraction.
Ajout de NaCl + centrifugation	Précipitation des débris cellulaires et purification de l'ADN dans le surnageant.	Le NaCl favorise la séparation des protéines insolubles et de l'ADN soluble.
Précipitation à l'éthanol absolu froid	Précipitation de l'ADN par réduction de sa solubilité.	L'ADN forme une « méduse » visible, signe de bonne extraction.

Résultats attendus

- Apparition visible de filaments blancs d'ADN dans l'éthanol (méduse).
- ADN précipité au fond ou suspendu dans le tube.

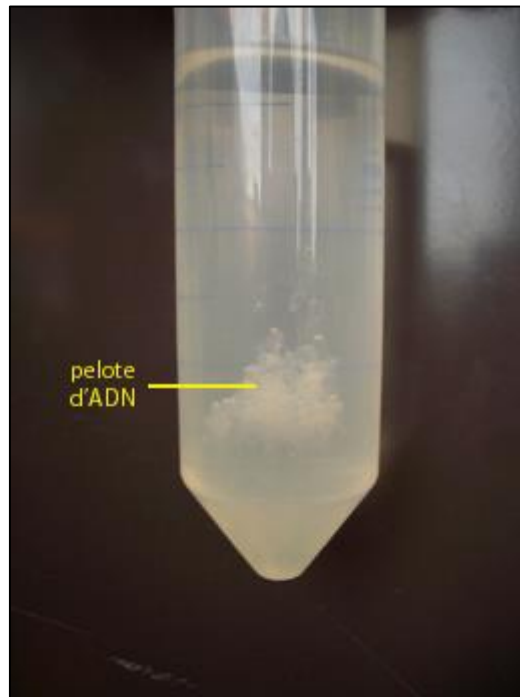


Figure 3 : Méduse d'ADN visible à l'œil nu après extraction à partir de sang humain.

Exercices :

Exercice 1

Associez chaque **étape du protocole** à son **objectif ou réactif utilisé**.

Étapes du protocole	Objectif ou produit utilisé
1. Lyse cellulaire	A. Précipiter l'ADN
2. Digestion des protéines	B. Éthanol ou isopropanol
3. Précipitation de l'ADN	C. SDS ou détergent
4. Purification	D. Protéinase K

Réponses :

- 1 → C
- 2 → D
- 3 → B
- 4 → (purification → lavage à l'éthanol 70 %, centrifugation, élimination des contaminants)

2. Exercice lacunaire (texte à trous)

Complétez le texte suivant avec les mots : *éthanol, globules blancs, SDS, protéinase K, centrifugation*.

L'ADN est extrait à partir des _____ car ce sont les seules cellules nucléées du sang. Une solution contenant du _____ est utilisée pour casser les membranes cellulaires. Ensuite, la _____ permet de digérer les protéines. Après ces étapes, l'ADN est précipité en ajoutant de l'_____, puis récupéré par _____.

Réponses :

- globules blancs
- SDS
- protéinase K
- éthanol
- centrifugation

TP3 : Réalisation d'un caryotype humain

Introduction

Le caryotype est une technique cytogénétique fondamentale qui permet d'étudier les chromosomes d'un individu. Les chromosomes sont des structures porteuses de l'information génétique, composées d'ADN et de protéines, qui deviennent visibles au microscope optique uniquement lorsqu'ils sont très condensés, notamment pendant la métaphase de la mitose, phase du cycle cellulaire où la cellule est en pleine division. (Kaisermann, 2019).

La technique du caryotype repose sur l'observation microscopique des chromosomes colorés après une étape de fixation et de coloration spécifique (souvent avec le colorant Giemsa). (Ozkan & Lacerda, 2023).

Cette coloration met en évidence un patron caractéristique de bandes sombres et claires sur les chromosomes, permettant d'évaluer plusieurs paramètres essentiels :

- Le nombre total de chromosomes, qui doit être normal (46 chromosomes chez l'humain) ;
- La taille des chromosomes, pour détecter des variations anormales ;
- La forme et la structure, incluant la position du centromère, qui permet d'identifier chaque chromosome et de révéler d'éventuelles anomalies structurelles telles que délétions, duplications, inversions ou translocations.

Le caryotype est un outil diagnostique majeur en génétique médicale. Il est utilisé pour :

- L'analyse prénatale, afin de dépister les anomalies chromosomiques chez le fœtus (comme la trisomie 21) ;
- L'exploration des troubles de la fertilité, en détectant des anomalies chromosomiques pouvant affecter la reproduction ;
- Le diagnostic des hématopathies, telles que certaines leucémies associées à des anomalies chromosomiques spécifiques ;
- L'investigation des troubles du développement, liés à des anomalies génétiques.

Pour réaliser un caryotype, on privilégie l'utilisation de cellules à division active, telles que les lymphocytes du sang périphérique. Ces cellules sont cultivées en laboratoire dans un

milieu nutritif, puis bloquées en métaphase à l'aide d'un agent spécifique (par exemple la colcémide) qui empêche la progression de la mitose au stade où les chromosomes sont les plus condensés et donc facilement observables. Ensuite, les chromosomes sont fixés, étalés sur des lames et colorés avant observation au microscope optique. (Wyandt, Wilson & Tonk, 2017).

Ainsi, le caryotype fournit une représentation visuelle et structurée du génome chromosomique, essentielle pour la détection des anomalies qui peuvent expliquer des pathologies génétiques ou cliniques.

Ce TP est divisé en deux parties :

1. Une partie théorique

Elle a pour objectif de familiariser les étudiants avec l'ensemble du protocole de culture cellulaire des lymphocytes sanguins. Bien que les étapes de culture soient détaillées à des fins pédagogiques, **elles ne seront pas réalisées en séance** : les cultures sont préparées à l'avance par un laboratoire hospitalier agréé.

2. Une partie pratique

Les étudiants prennent en charge les étapes à partir de la **fixation des cellules**. Ils effectueront les manipulations suivantes :

- fixation,
- étalement des cellules sur lame,
- coloration (par exemple au Giemsa),
- observation au microscope,
- analyse et **classification des chromosomes** pour établir un caryotype.

Objectifs du TP :

- Comprendre les principes de la culture cellulaire appliquée à l'étude cytogénétique.
- Connaître les différentes étapes nécessaires à l'obtention de cellules en métaphase pour l'analyse chromosomique.
- Observer les chromosomes au microscope optique après coloration.
- Savoir établir un caryotype en classant les chromosomes selon leur taille, la position du centromère et le motif de bandes.

- Identifier d'éventuelles anomalies chromosomiques visibles (trisomie, monosomie, anomalies de structure).

Partie 1 (théorique)

Matériel et réactifs

Milieux de culture et compléments :

- RPMI 1640 (1X)
- Sérum foetal bovin (inactivé)
- Phytohémagglutinine (formes M et P)
- L-Glutamine (solution concentrée)
- Pénicilline/streptomycine (antibiotiques)
- Héparine (anticoagulant)

Solutions et réactifs chimiques :

- Acide acétique glacial
- Colcémide (inhibiteur de la mitose)
- KCl (solution hypotonique)
- Carnoy (mélange méthanol / acide acétique)
- Colorant Giemsa (coloration des chromosomes)

Matériel de laboratoire :

- Bain-marie (température contrôlée)
- Étuve (incubateur)
- Centrifugeuse réfrigérée
- Vortex

- Lames et lamelles pour microscope
- Pipettes Pasteur
- Micropipettes (différentes tailles)
- Tubes à essais
- Bêchers
- Éprouvettes

Équipements de protection individuelle :

- Masques
- Gants latex

Protocole :

1. Préparation du milieu de culture :

- Le milieu est composé de RPMI, sérum, phytohémagglutinine (agent mitogène stimulant la division des lymphocytes), glutamine (source d'énergie), antibiotiques, héparine (anticoagulant).

2. Mise en culture :

- Sang prélevé dans un tube hépariné.
- Ajout de 800 µl de sang à 5 ml de milieu.
- Incubation à 37°C pendant 72 h avec agitation douce régulière.

3. Blocage en métaphase :

- Ajout de colcémide 2 h avant la fin de culture. La colcémide inhibe les fuseaux mitotiques, arrêtant les cellules en métaphase.

4. Traitement hypotonique :

- Ajout de KCl pour faire gonfler les cellules, facilitant l'éclatement des noyaux et la dispersion des chromosomes.

Rôle des produits et étapes

Étape / Réactif	Rôle pédagogique
Phytohémagglutinine	Stimule la division des lymphocytes en activant leur cycle cellulaire.
Colcémide	Bloque les cellules en métaphase pour obtenir les chromosomes condensés.
KCl hypotonique	Fait gonfler les cellules pour favoriser l'éclatement et la dispersion.
Carnoy (méthanol/acide ac.)	Fixe les cellules et les chromosomes en les déshydratant.
Giemsa	Colore les bandes chromosomiques pour permettre le classement.
Centrifugation	Permet de récupérer les cellules et de séparer les surnageants.

Partie 2 (pratique)

Matériel et produits :

- Fixateur de Carnoy (méthanol : acide acétique, 3:1)
- Colorant Giemsa
- Lames de caryotype (normal, trisomie 21, Turner, Klinefelter, Cri du chat)
- Microscope optique
- Huile à immersion
- Papier essuie-tout

- Papier Joseph
- Gants, masques
- Pipettes Pasteur
- Bain-marie, vortex

Protocole :

1. Fixation des cellules :

Les cellules obtenues après traitement hypotonique sont centrifugées puis resuspendues dans le fixateur de Carnoy (3 volumes de méthanol pour 1 volume d'acide acétique). Ce fixateur permet de :

- Déshydrater les cellules,
- Précipiter les protéines,
- Fixer les chromosomes tout en conservant leur morphologie.

Plusieurs lavages avec le fixateur peuvent être nécessaires pour obtenir une préparation propre.

2. Étalement sur lame :

Une goutte de la suspension cellulaire est déposée sur une lame propre, à une hauteur de 20 à 30 cm, puis étalée en soufflant légèrement pour favoriser l'éclatement des cellules et la bonne dispersion des chromosomes. Le séchage rapide est crucial pour une bonne qualité d'étalement.

3. Coloration :

Les lames sont ensuite colorées avec le Giemsa, qui permet de visualiser les bandes chromosomiques caractéristiques. Cette étape est essentielle pour l'appariement et la classification des chromosomes.

4. Observation microscopique :

- Observer d'abord la lame au faible grossissement (X10), puis passer à un grossissement plus fort (X40), et enfin utiliser l'objectif à immersion (X100) pour examiner les métaphases.

- Rechercher des cellules en métaphase bien étalées, présentant des chromosomes distincts.
- Identifier les paires homologues selon la taille, la position du centromère et le motif de bandes.
- Établir un caryotype et rechercher des anomalies éventuelles (trisomie, monosomie, délétion, etc.).

Résultats attendus :

- Préparations bien colorées, avec des chromosomes visibles et bien étalés.
- Observation de cellules en métaphase, permettant :
 - La réalisation d'un caryotype humain complet (46 chromosomes : 22 paires autosomiques + 1 paire sexuelle).
 - L'identification de syndromes chromosomiques :
 - Trisomie 21 : 3 chromosomes 21.
 - Syndrome de Turner (XO) : absence d'un chromosome sexuel.
 - Syndrome de Klinefelter (XXY) : présence d'un chromosome X surnuméraire.
 - Syndrome du cri du chat : délétion partielle du bras court du chromosome 5 (5p-), caractérisé par une voix aiguë chez le nourrisson, un retard mental et un visage particulier.

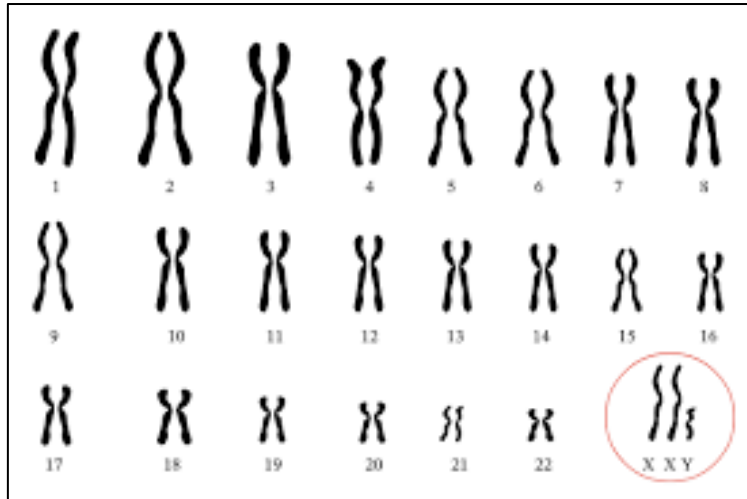


Figure 4 : Caryotype humain présentant le syndrome de Klinefelter (47,XXY).
 Ce caryotype montre la présence d'un chromosome X supplémentaire chez un individu de sexe masculin, caractéristique du syndrome de Klinefelter. On observe 47 chromosomes au total, avec 22 paires autosomiques et une paire sexuelle XXY.

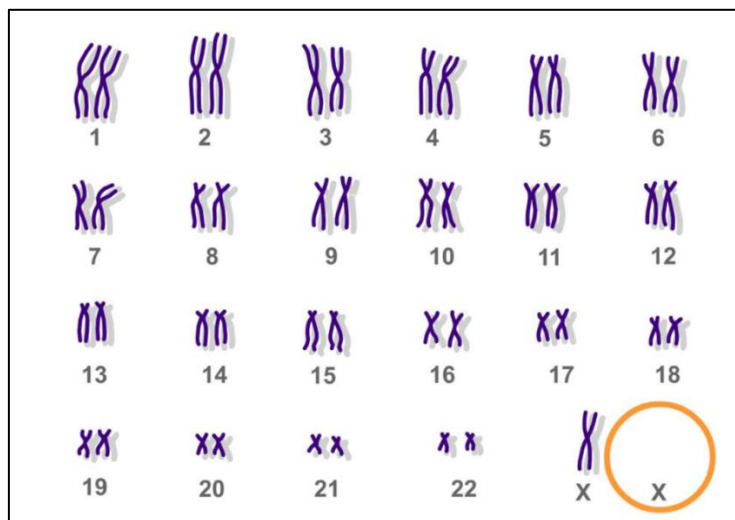


Figure 5 : Caryotype humain présentant le syndrome de Turner (45,XO).
 Ce caryotype montre l'absence d'un chromosome sexuel chez un individu de sexe féminin, caractéristique du syndrome de Turner. On observe un total de 45 chromosomes, avec 22 paires autosomiques et un seul chromosome sexuel X.

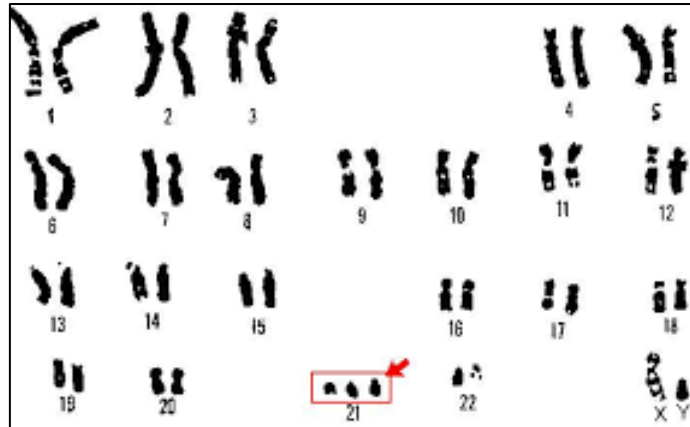


Figure 6 : Caryotype d'un homme présentant une trisomie 21 (syndrome de Down).

Ce caryotype montre la présence de trois copies du chromosome 21 au lieu de deux, caractéristique de la trisomie 21. Le total chromosomique est de 47 chromosomes, incluant 22 paires autosomiques et une paire sexuelle normale.

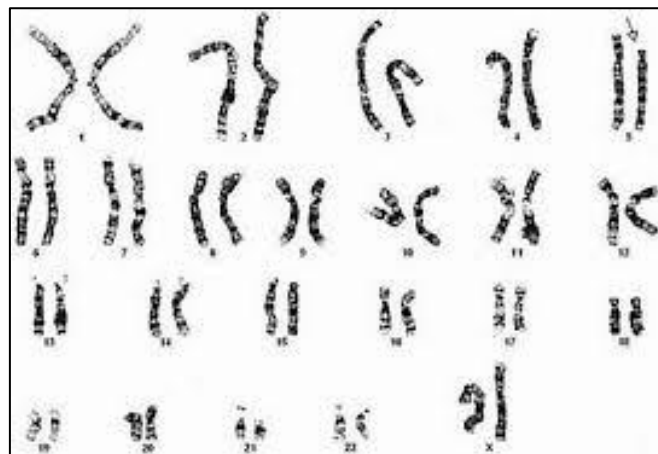


Figure 7: Caryotype humain illustrant le syndrome du cri du chat.

Ce caryotype révèle une délétion partielle sur le bras court du chromosome 5 (5p-), caractéristique du syndrome du cri du chat. Cette anomalie chromosomique est responsable des manifestations cliniques associées à ce syndrome.

TP4 – Étude du crossing-over chez *Sordaria macrospora*

Le *crossing-over*, ou enjambement chromosomique, est un phénomène fondamental de la méiose, observé au cours de la prophase I. Il s'agit d'un échange réciproque de segments entre chromatides non sœurs de chromosomes homologues. Ce mécanisme contribue à la recombinaison génétique, c'est-à-dire à la redistribution des allèles parentaux, et constitue l'une des principales sources de variabilité génétique chez les organismes sexués. (Teichert, Nowrousian, Pöggeler, & Kück, 2014).

L'étude du *crossing-over* permet de mieux comprendre comment les gènes se transmettent d'une génération à l'autre, et comment la diversité génétique est assurée, même entre individus issus des mêmes parents. Ce processus est également à la base de la cartographie génétique, en permettant d'estimer les distances entre gènes situés sur un même chromosome. (Zickler & Espagne, 2016).

Chez certains organismes fongiques comme *Sordaria macrospora*, un champignon ascomycète, il est possible d'observer directement les produits de la méiose grâce à une structure appelée asque. L'asque est une cellule spécialisée qui contient huit spores haploïdes, appelées ascospores, disposées en ligne. Cette disposition ordonnée résulte d'un enchaînement précis d'événements cellulaires :

1. Fusion de deux hyphes haploïdes issues de deux souches génétiquement différentes (par exemple, une souche noire de type sauvage et une souche blanche mutante), formant une cellule transitoirement diploïde.
2. Méiose en deux divisions successives :
 - La première division méiotique sépare les chromosomes homologues.
 - La deuxième division méiotique sépare les chromatides sœurs.
3. À l'issue de la méiose, une mitose post-méiotique donne naissance à huit noyaux haploïdes, qui se différencient chacun en une spore.

La structure linéaire des ascospores dans l'asque reflète fidèlement la ségrégation des chromosomes pendant la méiose. En analysant la distribution des couleurs dans les asques, on peut détecter la présence ou l'absence de crossing-over au niveau du locus qui détermine la couleur des spores :

- Un motif 4:4 (quatre spores noires suivies de quatre spores blanches) indique une absence de recombinaison.
- Des motifs 2:2:2:2 ou 2:4:2 sont des signatures caractéristiques d'un événement de recombinaison.

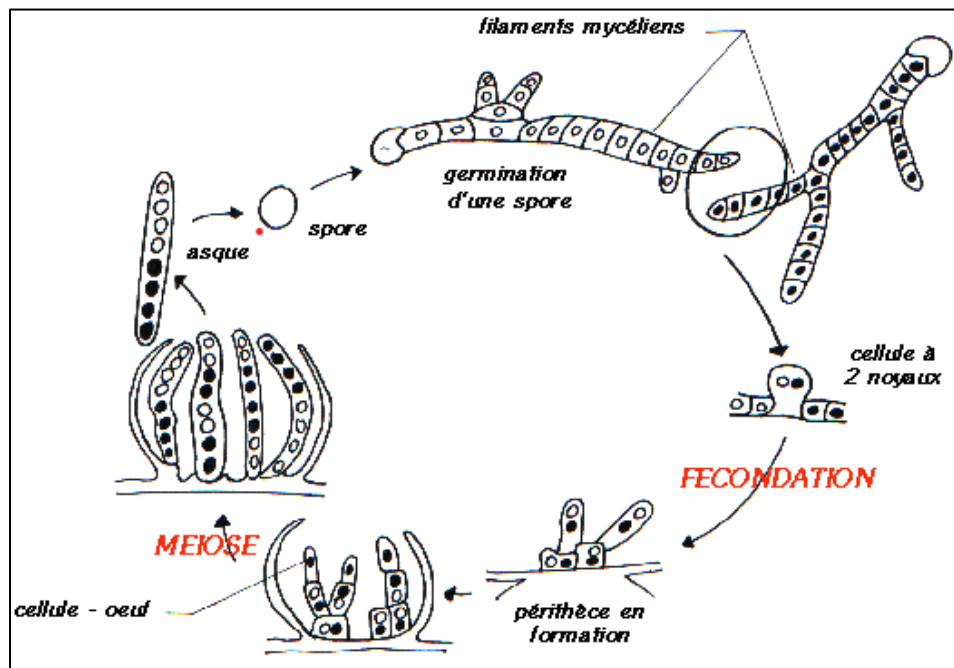


Figure 8 : Cycle de reproduction de *Sordaria macrospora*.

Schéma représentant le cycle de vie de *Sordaria macrospora*, champignon ascomycète. Il illustre les principales étapes : la formation des spores haploïdes, la germination, la croissance du mycélium, la plasmogamie, la caryogamie, puis la méiose et la sporulation au sein des asques. Ce cycle met en évidence les phases haploïde et diploïde ainsi que la recombinaison génétique au cours de la méiose.

Ce TP propose de reproduire cette expérience génétique de manière simple et visuelle. À partir d'un croisement entre deux souches de *Sordaria macrospora*, les étudiants observeront les asques au microscope et analyseront la répartition des spores pour déterminer s'il y a eu recombinaison. Ce travail permet d'illustrer concrètement les concepts de méiose, de ségrégation génique et de recombinaison, souvent abstraits pour les étudiants, et de les relier à des **observations expérimentales réelles**.

Objectifs

- Comprendre le principe du crossing-over pendant la méiose.
- Observer des asques de *Sordaria* pour mettre en évidence des recombinaisons génétiques.
- Interpréter les résultats pour estimer la fréquence de crossing-over.

Matériel et réactifs

- Tomates pourries (source de spores)
- Milieu de culture (gélosé) en boîte de Pétri
- Boîtes de Pétriensemencées avec les deux souches (*Sordaria* noire et blanche)
- Pipettes Pasteur
- Lames et lamelles
- Aiguille de dissection ou cure-dents stériles
- Microscope optique
- Gants, blouse, masque

Protocole expérimental

1. Préparation des cultures

- Prélever les spores de *Sordaria* sur des tomates pourries (ou autre substrat naturel).
- Ensemencer deux souches (noire et blanche) sur des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif.
- Incuber les boîtes à température ambiante pendant plusieurs jours jusqu'à l'apparition d'un **croisement** des deux mycéliums (zone de fusion au centre de la boîte).

2. Récolte des asques

- Identifier la **zone de croisement** entre les deux souches.
- À l'aide d'un cure-dents ou d'une pipette Pasteur, prélever un petit morceau de mycélium à ce niveau.

- Écraser doucement l'échantillon entre lame et lamelle avec une goutte d'eau distillée pour libérer les asques.

3. Observation microscopique

- Observer les lames au microscope optique (grossissement X40 puis X100).
- Rechercher les **asques contenant 8 spores disposées en ligne**.
- Dessiner les différents types d'asques observés.

Résultats attendus

On peut observer deux types principaux d'asques :

- **Asques de type parental** (non recombinés) : 4 spores noires + 4 spores blanches côte à côte (4:4).
- **Asques de type recombinant** (crossing-over) : disposition alternée des spores, par exemple 2 noires - 2 blanches - 2 noires - 2 blanches (2:2:2:2) ou 2 blanches - 4 noires - 2 blanches (2:4:2).

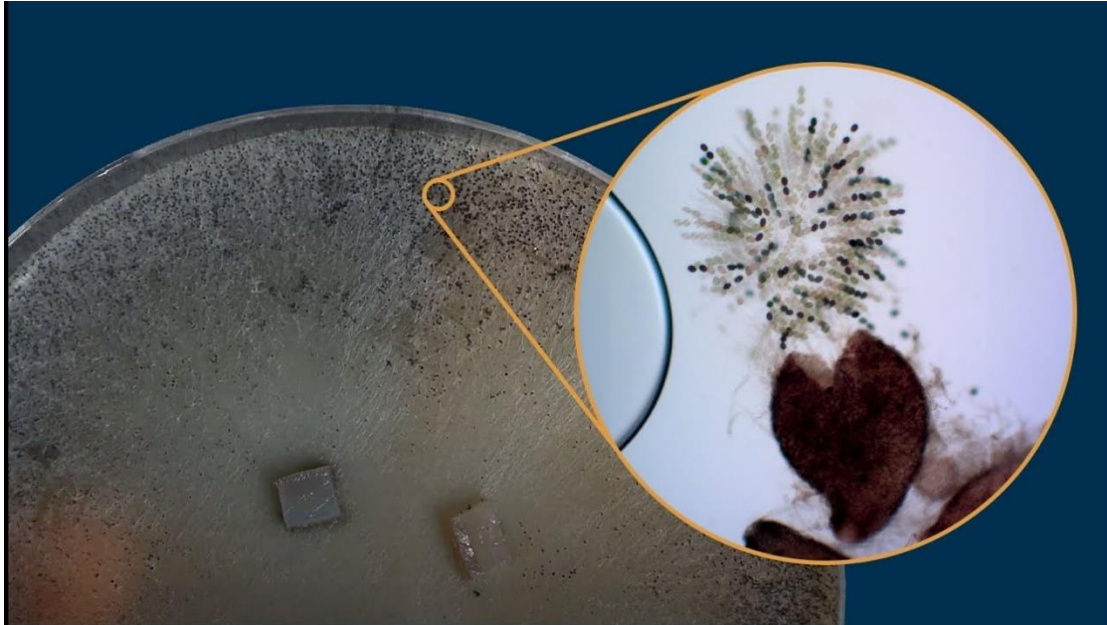


Figure 9 : Asques de *Sordaria macrospora* montrant le crossing-over.
Disposition des spores dans les asques parentaux et recombinés, illustrant la recombinaison génétique pendant la méiose.

Explication des étapes

Étape / Composant	Rôle pédagogique
Souches noire et blanche	Permettent de suivre la transmission d'un allèle spécifique (mutation visible).
Zone de croisement (fusion des mycéliums)	Zone où a lieu la reproduction sexuée, indispensable pour obtenir les asques.
Observation au microscope	Met en évidence la ségrégation des spores, reflet direct des événements de recombinaison pendant la méiose.
Disposition des spores dans l'asque	Permet de différencier les événements de crossing-over des transmissions mendéliennes simples.
Calcul de la fréquence de recombinaison	Application pratique des lois de la génétique : relie observation microscopique à un phénomène moléculaire.

Exercices de compréhension

Exercice 1 : Question ouverte

Expliquez pourquoi l'étude des asques de *Sordaria macrospora* est particulièrement utile pour étudier les événements de crossing-over.

Éléments :

- Organisation linéaire des spores → reflet direct de la ségrégation des chromosomes.
- Produits de méiose non mélangés → possibilité de détecter les recombinaisons.
- Utilisation de marqueurs visibles (couleur) → identification simple des types parentaux et recombinants.

Exercice 2

Problème :

Un groupe observe presque uniquement des asques de type 4:4. Ils concluent que *Sordaria* ne subit pas de recombinaison.

Questions :

1. Quelle erreur d'interprétation peuvent-ils avoir faite ?
2. Proposez deux explications expérimentales possibles à ce résultat.

Réponses attendues :

1. Le crossing-over a bien lieu, mais il n'est pas détecté si l'échantillon est trop petit ou si le gène est très proche du centromère.
2. Problèmes possibles :
 - Contamination ou mauvaise inoculation (pas de croisement réel).
 - Erreur de comptage ou échantillon trop petit.
 - Conditions de culture non optimales.

TP5 : Détection du corpuscule de Barr dans un frottis buccal

Introduction

Le corpuscule de Barr, aussi appelé chromatine sexuelle, est une structure observable dans le noyau de certaines cellules somatiques chez les femelles de mammifères. Il s'agit d'un chromosome X inactivé, qui se condense en hétérochromatine dense pendant l'interphase. Chez les femmes, qui possèdent deux chromosomes X, l'un des deux est aléatoirement inactivé très tôt au cours du développement embryonnaire afin de compenser la double dose d'expression des gènes liés à l'X par rapport aux hommes (mécanisme appelé compensation de dosage). Ce processus d'inactivation, connu sous le nom de lyonisation, aboutit à la formation d'un corpuscule de Barr visible en microscopie optique sous forme d'une masse dense, généralement située à la périphérie du noyau. (Loda et al., 2022).

Chez les hommes, qui ne possèdent qu'un seul chromosome X (XY), il n'y a pas d'inactivation : aucun corpuscule de Barr n'est donc présent. L'observation ou non de cette structure permet donc de déterminer le sexe chromosomique d'un individu. (Miller, 2006).

Ce test cytologique simple est réalisé à partir de cellules prélevées par frottis buccal. La coloration appropriée permet de visualiser les noyaux des cellules et d'identifier la présence ou non de cette chromatine sexuelle. Cette technique est utilisée en biologie cellulaire, en médecine légale, en génétique médicale (détection de certaines anomalies comme le syndrome de Klinefelter ou de Turner), ou encore dans les études de détermination du sexe. (Furlan & Galupa, 2022).

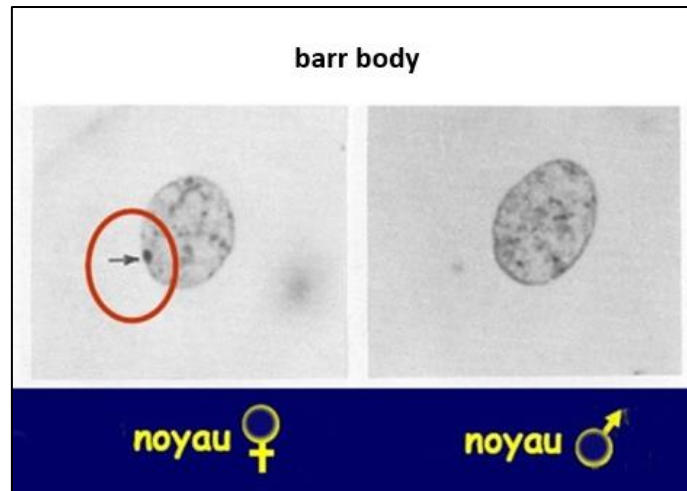


Figure 10 : Noyaux cellulaires masculins et féminins – Visualisation du corpuscule de Barr.
Le noyau féminin présente un corpuscule de Barr (chromosome X inactif) visible en périphérie, absent dans le noyau masculin.

Objectifs pédagogiques

- Observer la présence ou l'absence du corpuscule de Barr dans les cellules buccales.
- Comprendre le mécanisme de l'inactivation du chromosome X chez les mammifères.
- Relier une observation cytologique à une information génétique et au sexe chromosomique.
- Appliquer une technique de cytologie simple : frottis, fixation, coloration, observation microscopique.

Matériel et produits nécessaires

- Coton-tige ou spatule buccale stérile
- Lames de microscope propres
- Colorant de type bleu de méthylène ou Giemsa
- Éthanol à 70 % (fixation)
- Eau distillée
- Papier absorbant

- Microscope optique
- Gants, blouses, masques
- Compte-gouttes ou pipette Pasteur
- Boîte de Pétri ou récipient pour immersion des lames

Protocole expérimental

1. Prélèvement des cellules buccales

- Demander à l'étudiant(e) de se rincer la bouche à l'eau claire.
- Frotter délicatement la face interne de la joue avec un coton-tige ou une spatule stérile.
- Étaler le prélèvement sur une lame de microscope propre, en frottant doucement en mouvement circulaire.

2. Fixation des cellules

- Laisser sécher la lame à l'air libre quelques minutes.
- Fixer les cellules en versant quelques gouttes d'éthanol à 70 % pendant 5 minutes.
- Retirer l'éthanol et laisser sécher.

3. Coloration

- Appliquer le colorant (bleu de méthylène ou Giemsa dilué) sur la lame pendant 5 à 10 minutes.
- Rincer doucement à l'eau distillée pour enlever l'excès de colorant.
- Laisser sécher complètement la lame.

4. Observation au microscope

- Observer au microscope optique avec un objectif X40 puis X100 à immersion.

- Rechercher dans les noyaux des cellules la présence éventuelle d'une **petite masse dense**, arrondie ou en forme de bâtonnet, accolée à la membrane nucléaire : il s'agit du corpuscule de Barr.

Rôle des étapes et produits

Étape	Objectif / But	Remarques pédagogiques
Prélèvement buccal	Obtenir des cellules épithéliales contenant des noyaux	Le prélèvement doit être doux mais suffisant pour décoller les cellules
Étalement sur lame	Préparer une couche fine de cellules à observer	Étaler en couche régulière pour éviter les amas
Séchage à l'air libre	Fixer légèrement les cellules avant fixation chimique	Permet une meilleure adhésion des cellules à la lame
Fixation à l'éthanol 70 %	Conserver la morphologie cellulaire et perméabiliser la membrane	Fixation douce pour ne pas altérer les structures nucléaires
Coloration	Mettre en évidence les noyaux et la chromatine sexuelle	Respecter la durée de coloration
Rinçage et séchage	Éliminer l'excès de colorant	Séchage complet nécessaire avant observation
Observation microscopique	Identifier le corpuscule de Barr	Chercher une masse dense accolée à la membrane nucléaire dans certaines cellules

Résultats attendus

- **Femmes (XX)** : On observe un corpuscule de Barr dans une proportion significative des cellules (environ 20–30 % selon la qualité du frottis).
- **Hommes (XY)** : Aucun corpuscule de Barr n'est visible.
- Les cellules doivent présenter des noyaux nets, bien colorés. Le corpuscule de Barr apparaît comme une **tache sombre dense** à la périphérie du noyau.

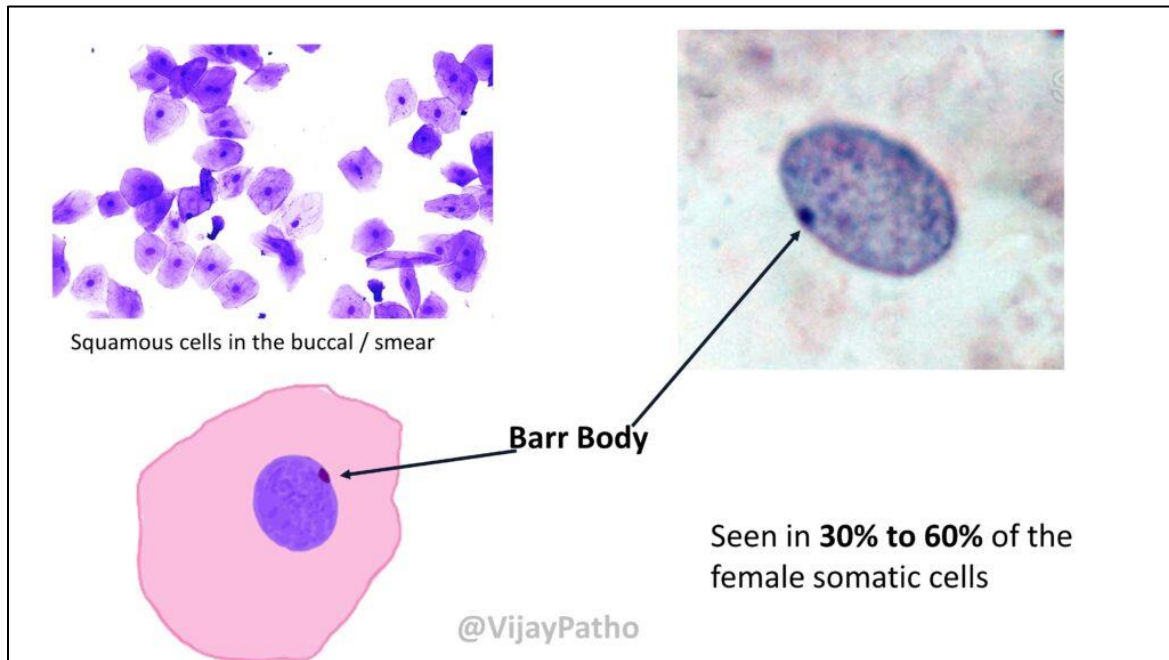


Figure 12 : Noyau de cellule féminine coloré au Giemsa – Visualisation du corpuscule de Barr.

Le corpuscule de Barr apparaît sous forme d'une petite masse dense en périphérie du noyau, témoignant de l'inactivation d'un des deux chromosomes X.

Exercice

Répondez par vrai ou faux

- Le corpuscule de Barr est visible dans toutes les cellules humaines.
► Faux (seulement chez les femelles XX)
- Un homme XXY peut présenter un corpuscule de Barr.
► Vrai
- Le corpuscule de Barr est toujours situé au centre du noyau.
► Faux (souvent en périphérie)
- Le corpuscule de Barr est formé par un chromosome Y.
► Faux (chromosome X)

Références bibliographiques

- Ashok, K., Dogra, A., & Prakash, A. (2023). An effective and rapid method of DNA extraction protocol from samples of human blood. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 12(1), 187–191. <https://doi.org/10.5530/ajbls.2023.12.25>.
- Chacon-Cortes, D., & Irving, M. (2020). *Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives*. *Biology of Sampling and Methods*, 12, 1–10.
- Furlan, G., & Galupa, R. (2022). Mechanisms of choice in X-chromosome inactivation. *Cells*, 11(3), 535. <https://doi.org/10.3390/cells11030535>
- Gahlon, H. L. (2020). Topics for teaching: DNA chemistry – A brief history and practical applications in DNA extraction. *Chimia*, 74(11), 907–908. <https://doi.org/10.2533/chimia.2020.907>.
- Kaisermann, J. (2019). *Organisation des chromosomes humains* (Éd. Cambridge Stanford Books). Livre numérique.
- Loda, A., Collombet, S., & Heard, E. (2022). Gene regulation in time and space during X-chromosome inactivation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(4), 231–249. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00434-8>.
- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Lopes, T. d. S. (2008). Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 77–86.
- Miller, F. A. (2006). ‘Your true and proper gender’: The Barr body as a good enough science of sex. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 37(3), 424–447.
- Nimbkar, P. H., & Bhatt, V. D. (2022). A review on touch DNA collection, extraction, amplification, analysis and determination of phenotype. *Forensic Science International*, 336, 111352. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111352>
- Ozkan, E., & Lacerda, M. P. (2023). *Genetics, cytogenetic testing and conventional karyotype*. In StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557836/>
- Teichert, I., Nowrousian, M., Pöggeler, S., & Kück, U. (2014). The filamentous fungus *Sordaria macrospora* as a genetic model to study fruiting body development. In *Advances in Genetics* (Vol. 87, pp. 199–244). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800263-2.00004-4>
- Wyandt, H. E., Wilson, G. N., & Tonk, V. S. (2017). *Human chromosome variation: Heteromorphism, polymorphism and pathogenesis* (490 p.). Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3036-9>
- Zickler, D., & Espagne, E. (2016). *Sordaria*, a model system to uncover links between meiotic pairing and recombination. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 54, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.02.012>

