

Cytogénétique en Hématologie

Enjeux et méthodes d'étude

N. Cherfi , S. Taoussi , I. Djouabi, M.T Abad

Service Hématologie, Unité Cytogénétique
EHS ELCC, CAC Blida

□ Introduction :

Neuf cancers sur dix sont des maladies dont les cellules présentent des anomalies chromosomiques et/ou géniques acquises limitées aux cellules tumorales avec transmission des anomalies aux cellules filles.

Ces anomalies sont aujourd'hui mises en évidence par des techniques variées de cytogénétiques.

❑ Définition de la cytogénétique :

- La cytogénétique est l'étude des anomalies chromosomiques constitutionnelles et acquises.
- Ces anomalies peuvent être :
 - **De nombre** (plus ou moins de 46 chromosomes).
 - **De structure** (modification dans la succession de plusieurs loci).
 - **De réparation** (cassures chromosomiques).
- **La cytogénétique hématologique étudie les anomalies chromosomiques acquises dans les hémopathies malignes en utilisant des techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) et de cytogénétique moléculaire (FISH).**

□ Historique :

- **1880** : Première observation de chromosomes par Flemming.
- **1956** : Le nombre de chromosomes de l'espèce humaine a été établi à 46 par Tjio et Levan.
- **1959** : Jérôme Le Jeune et al ont décrit la première anomalie chromosomique trisomie 21.
- **1960** : Jacobs et Strong décrivent le syndrome de Klinefelter avec une formule XXY.
- Première nomenclature internationale pour la classification des chromosomes, basée sur leur taille et la position de leur centromère établie à Denver.
- Nowell et Hungerford décrivent la première anomalie chromosomique dans une affection maligne acquise, le chromosome Philadelphie, initialement décrit comme un 22 délété, dont Rowley a démontré par la suite qu'il était le résultat d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22 : t(9;22).

□ Intérêt de la cytogénétique en hématologie :

- **Diagnostic :**

La majorité des anomalies chromosomiques impliquées dans la pathogenèse des leucémies et des lymphomes sont clonales, récurrentes, non aléatoires et souvent spécifiques d'un type d'hémopathie maligne.

Il s'agit souvent de translocations équilibrées entraînant une recombinaison de deux gènes avec formation d'un "gène de fusion" codant pour une protéine chimérique à l'origine de la prolifération maligne comme dans la Leucémie myéloïde chronique (LMC) en montrant la présence du chromosome Philadelphie, résultat d'une translocation t(9 ; 22) et la production de la protéine chimérique bcr-abl.

- **Pronostic :**

- **Myélodysplasies (MDS)**

- **Leucémie lymphoïde chronique(LLC) , lymphome non hodgkin (LNH)**

- **Leucémie aigue lymphoblastique (LAL), leucémie aigue myéloblastique (LAM)**

□ Intérêt de la cytogénétique en hématologie :

- **Indication thérapeutique:**
 - LMC et anti tyrosines kinases
 - LAM3 et ATRA
 - LLC avec del P53 et GMO ou Ibrutinib.

- **Evaluation de la réponse thérapeutique :**

Détection de la maladie résiduelle en particuliers en cas de thérapie ciblée : la LMC constitue une référence pour suivre l'évolution du chromosome Philadelphie par des contrôles à 3, 6 et 12 mois.

❑ Indications du caryotype et de la FISH en hématologie I

➤ Leucémie myéloïde chronique :

t(9;22)(q34;q11.2) ; BCR-ABL1; recherche de variants.

➤ Syndromes myélodysplasiques : délétion isolée ou associée : del (5q), del (20q) , del (7q) , del P53.

➤ Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) : OMS 2016

- LAM avec t(8;21)(q22 ;q22) ; ETO-AML1
- LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16 ;16)(p13.1 ;q22) ; CBFMB-MYH11
- LAM avec t(15;17)(q22 ;q12) ; PML-RARA
- LAM avec t(9;11)(p11,q23) ;MLLT3-MLL
- LAM avec t(6;9)(p23 ;q34) ;DEK-NUP214
- LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ;RPN1-EVI1
- LAM7 avec t(1;22)(p13 ;q13) ; RBM15-MKL1
- Leucémies aiguës de lignée ambiguë
- LA avec t(9;22)(q34;q11.2) ; BCR-ABL1 positif
- LA avec réarrangement du gène MLL (11q23)

□ Indications du caryotype et de la FISH en hématologie II

➤ Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

- LAL-B avec t(9;22)(q34;q11.2) ; BCR-ABL1
- LAL-B avec t(v ;11q23) avec réarrangement de MLL
- LAL-B avec t(12 ;21)(p13 ;q22) ; TEL-AML1
- LAL-B avec hyperdiploïdie
- LAL-B avec hypodiploïdie
- LAL-B avec t(5;14)(q31 ;q32) ; IL3-IgH
- LAL-B avec t(1;19)(q23 ;p13.3) ; E2A-PBX1

➤ Leucémie lymphoïde chronique

- délétion (13q14q34)
- trisomie 12
- délétion 11q22.3 (del ATM)
- délétion 17p13 (del P53)
- délétion 6q21

□ Indications du caryotype et de la FISH en hématologie III

➤ Myélomes multiples:

- Délétion del (13q)
- t(4 ;14)
- t(14 ;16)
- t(14 ;20)
- t(11 ;14)
- Délétion p53
- Recherche d'hypodiploïdie
- Recherche d'hyperdiploïdie

➤ Lymphomes folliculaires : t(14 ;18)(q32;q21)

➤ Lymphomes du manteau : t(11 ;14)(q13;q32)

➤ Lymphomes de Burkitt : t(v ;8q24) avec réarrangement de C-MYC

□ Matériels et méthodes I

- **Techniques pratiquées au CAC Blida au sein du laboratoire du service hématologie à l'unité de cytogénétique depuis 2008.**

➤ **Matériels :**

- **Un incubateur pour culture cellulaire (5% de CO₂).**
- **Une hotte à flux laminaire (sécurité microbiologique, risque pathogène).**
- **Une hotte chimique pour manipulation de produits toxiques.**
- **Une centrifugeuse basse vitesse et une à micro-tubes.**
- **Un bain marie thermostaté 0 à 100° C.**
- **Deux réfrigérateurs 4°C.**
- **Congélateur -20°C.**
- **Un hygromètre pour la T° et l'humidité de la pièce du laboratoire**
- **Deux microscopes équipés d'un système d'acquisition et de traitement d'image avec imprimante, dont l'un permettant l'analyse en fluorescence. Ce système est doté d'un équipement assurant la conservation des documents (les logiciels d'acquisition sont à mettre à jour en fonction de leur évolution)**

□ **Matériels et méthodes II**

- **Des bac en porcelaine .**
- **Les plateaux en inox.**
- **Les haricots, les portes lames, les portoirs des tubes coniques 15 ml et 50 ml, minuteurs .**
- **Micropipettes à différents volumes de 5 microlitres jusqu'à 1000 microlitres**
- **Thermobrite : équipement pour dénaturation et hybridation pour FISH.**

➤ **Consommables :**

- **Les embouts .**
- **Les lames et lamelles .**
- **Les flasques de culture.**
- **Les eppendorfs .**
- **Les pipettes de transfert stériles .**
- **Les seringues.**
- **Compressees.**
- **Désinfectants.**

□ Matériels et méthodes III

Réactifs pour la culture et la sortie de culture cellulaire

- **RPMI complets** contient :
 - Un milieu RPMI 1640
 - Un sérum de veau fœtale
 - L glutamine-péni-strepto
 - Héparine.
- FRDU, thymidine ou synchro A et B;
Colchicine, KCL, Méthanol, Acide acétique,
IL2, DSP30 ou TPA, PHA.
- **Réactifs pour caryotype en bandes R :**
 - Tampon de dénaturation (NaH_2PO_4)
 - Giemsa
 - Tampon de coloration :
($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
 - Eau distillée stérile.
- **Réactifs pour la FISH :**
 - Tampon 20 SSC.
 - Tampon PBS (phosphate buffered saline).
 - Tween-20.
 - Ethanol.
 - HCL.
 - pepsine .
 - Formaldéhyde.
 - 0,1 et 0,3 Igepal
 - DAPI
 - Les sondes
 - Eau distillée stérile.

□ Matériels et méthodes IV

➤ Echantillons biologiques :

• Prélèvements :

Les échantillons de quantité et la qualité adéquate doivent être recueillis stérilement et acheminer dans un délai compatible avec la survie des cellules (le mieux le jours même) .

Les échantillons seront accompagnés d'une fiche de prescription.

➤ **Sang veineux** : 5 -10 ml dans un tube stérile hépariné.

➤ **Moelle osseuse** : aspiration recommandée (2 ml) dans une seringue stérile hépariné + tube conique de 15 ml contenant de RPMI complet

➤ **Liquide pleural** : prélèvement stérile en quantité suffisante (100 ml).

➤ **Suc Ganglionnaire** : après trituration d'un fragment ganglionnaire

Au minimum 1 cm³ de prélèvement, la trituration se fait sous hotte à flux laminaire de manière stérile en extemporanée avec étude de la viabilité cellulaire.

❑ **Matériels et méthodes V**

➤ **Méthodes de cultures cellulaires:**

- **Le Port des gants est obligatoire à chaque manipulation.**
- **Mettre le matériel souillé dans des poubelles prévues à cet effet .**
- Toute les mises en culture sont effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire.
- Calculer le nombre de cellules à mettre en culture (selon le type de culture) de la moelle osseuse ou du sang périphérique.
- Moelle (LA, LMC, MDS) : - 20.000 cellules/ml de milieu de culture.
- Sang (LLC, LNH Manteau, folliculaire; SLPC) :- 10000 cellules/ml de milieu de culture.
- Ganglion et liquide pleural : - 30.000 cellules/ml de milieu de culture.
- Quand le taux de cellules est supérieur à 100.000/ μ l: faire des dilutions.
- Dans les rares cas de moelle coagulée : faire un traitement par la trypsine.
- Mettre en culture le nombre de ml dans des flasques pour 10 ml RPMI complet, pour chaque flasque éditer le nom et prénom du patient, son numéro de dossier, la date du jour, la technique : soit 24 H synchro, soit 72 h ou 96 h IL2+DSP30.
- Positionner les flasques à l'étuve à CO₂ à 37°c, bouchon dévisse ¼ de tour , à plat sur un plateau en inox désinfecté.

❑ Matériels et méthodes VI

- **La sortie de culture** : 20 à 30 minutes (selon la technique) avant la sortie de culture, mettre la colchicine pour bloquer les mitoses en métaphase.
- **Choc hypotonique** : Réalisé avec le KCL, il sert à libérer les noyaux (pour les cellules en interphase) et chromosomes (cellules en métaphase).
- **La pré fixation et la fixation**: se fait avec la solution de carnoy (de l'acide acétique et du méthanol (1/3, 2/3) qui maintient la forme du noyau et fixe les mitoses.
- A la fin de ces étapes, on obtient un culot cellulaire clair qu'on doit conserver à +4 ou à -20 avant de procéder aux étalements cellulaires (FISH, ou Caryotype).
- Pour une bonne dilution du culot cellulaire : pour 1/3 de culot, mettre 2/3 de surnageant.
- Si le culot est trop dilué; on aura un étalement pauvre ; dans ce cas il faut le concentrer en enlevant l'excès du surnageant.
- Si le culot est trop dense on aura des mitoses chevauchées ce qui empêche de faire l'analyse du caryotype ; dans ce cas il faut le diluer avec du fixateur.

• **Matériels et méthodes VII**

➤ **Étalement I:**

- L'étalement est la réalisation de préparations chromosomiques sur des lames à partir de culots cellulaires fixés, soit pour FISH ou caryotype.
- L'étalement a une très grande importance pour la qualité des mitoses et des bandes chromosomiques.
- Pour un bon étalement il faut respecter les conditions de température (23 °C - 25°C) et un taux d'humidité de 30 à 40% pour avoir des mitoses bien éclatées et des noyaux bien séparés.
- L'humidité joue un rôle très important c à d :
 - Si taux d'humidité trop bas $\leq 30\%$: séchage trop rapide des lames; on aura des mitoses ramassées : dans ce cas on fait passer les lames sur lesquelles on va étalés sur un film de vapeur au-dessus du bain marie à 87°C pendant 4 à 5 secondes et déposer la suspension cellulaire sur ce film humide ; laisser sécher à l'air.

❑ Matériels et méthodes VIII

➤ Etallement II:

- Si taux d'humidité trop haut $\geq 55\%$: séchage lent des lames ; les chromosomes apparaissent noirs avec la présence de cytoplasme sur les mitoses ; il est préférable après étalement de placer les lames dans une étuve sèche ou une plaque chauffante à 37°C afin qu'elles sèchent rapidement .
- Actuellement il existe une enceinte pré-réglée à une température et une humidité fixe appelée Thermotron qui évite les aléas des changements de température et d'humidité dans l'air ambiant.
- Pour le caryotype : on étale : 5 à 6 lames par patient .
- Pour la FISH : le nombre de lames dépend du panel de sondes pour chaque pathologie.
- Sur chaque lame inscrire
 - Le nom-prénom du patient
 - La technique : sonde ou temps de dénaturation pour le caryotype.
 - La date du prélèvement .

❑ Matériels et méthodes IX

➤ Caryotype :

■ Principe :

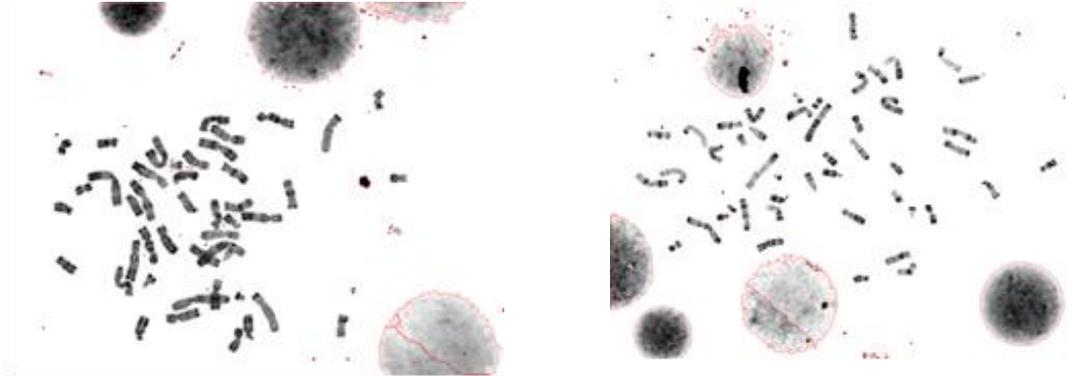
- Technique de marquage permettant de mettre en évidence des structures appelées bandes, sur les chromosomes.
- La technique des bandes R : correspond à un marquage de l' euchromatine (segments non variable), ainsi les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et claires.

■ Technique :

- La technique des bandes R (Reverse) consiste à faire un traitement thermique à 87 °c en milieu salin suivie d' une coloration au Giemsa .
- Le caryotype se fait en plusieurs étapes :
 - Etalements
 - Dénaturation
 - Coloration
 - Observation et analyse des mitoses au microscope.

Analyse du Caryotype :

- **Au diagnostic** : il est nécessaire d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses.



En cas d'anomalie non clonale, il est souhaitable de confirmer ou d'infirmer une éventuelle clonalité soit en analysant plus de mitoses ou de réaliser une étude en cytogénétique moléculaire (FISH)

- **Maladie résiduelle** : Pour la recherche d'une anomalie préalablement décelée, il est recommandé d'analyser au moins 30 mitoses ou de réaliser une analyse ciblée en cytogénétique moléculaire, d'emblée ou en complément d'une analyse conventionnelle de 20 mitoses qui n'a pas mis en évidence l'anomalie recherchée (exemple : suivi de LMC sous antityrosine kinase).

➤ **Caryotype :**

■ **Avantage de caryotype :**

Etudie tout le génome+++

Détecte les anomalies de nombre : polydiploïdie, hypodiploïdie et de structures : translocations ; délétions ; inversions; insertions; additions; ring; chromosome minute..

■ **Inconvénients de caryotype :** Ses principales limites sont :

- Sa résolution (au maximum 5 millions de paires de bases, 5Mb).
- La difficulté de caractériser certaines anomalies dites cryptiques.
- La nécessité d'obtenir des mitoses en nombre suffisant et de bonne qualité.
- Nécessité absolue d'avoir des réactifs de bonne qualité (respecter une référence s'il le faut) même l'eau distillée destinée à préparer des réactifs.
- La nécessité d'avoir un pourcentage d'humidités et un degré de température favorable à l'étalement dépendant du climat; parfois très difficile à réaliser.
- Le temps de la bonne dénaturation est variable selon le climat de 12 min à 14 min .
- Chronophage : Minimum un jour une fois la dénaturation faite pour saisir et analyser 20 mitoses pour un seul caryotype.

➤ **FISH : Hybridation in situ en fluorescence.**

- La technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) est une technique qui permet de révéler par fluorescence grâce à des sondes d'ADN des séquences complémentaires sur les chromosomes étudiés.
- Chaque analyse ne permet d'identifier que l'anomalie ciblée, les sondes utilisées font suite à de précédentes analyses (pathologie ou anomalie suspectée sur caryotype).
- **Technique :**
 - La FISH se fait dans une chambre noire (technique et lecture) .
 - **Les sondes FISH :** Il peut s'agir de sondes locus, de peintures chromosomiques ou de sondes centromériques ou télomériques.
- Les étapes de la FISH après étalement des lames :
 - Prétraitement des lames.
 - Application des sondes.
 - Dénaturation et incubation au Thermobrite (température ; humidité).
 - Lavage et contre coloration au DAPI.
 - La lecture au microscope à fluorescence.

➤ **FISH : Hybridation in situ en fluorescence.**

■ **Avantage :**

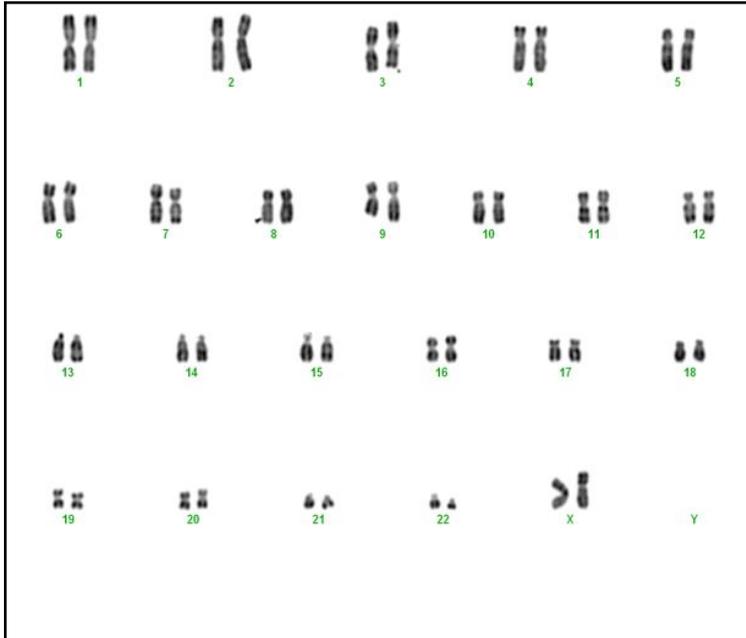
- Respectant la rigueur de la technique, elle est facile.
- Une technique qui répond à des problèmes de diagnostic et de pronostic précis
- Détection d'anomalies cryptiques : parfois l'observation des bandes chromosomiques au caryotype ne permet pas d'interpréter certains remaniements complexes ou non, la FISH permet d'affirmer ces anomalies suspectées. Exemple : $t(12.21)(p13;q21)$
- Les sondes peintures marquant la totalité d'un chromosome sont également très utiles pour caractériser des remaniements complexes.

■ **Inconvénients :**

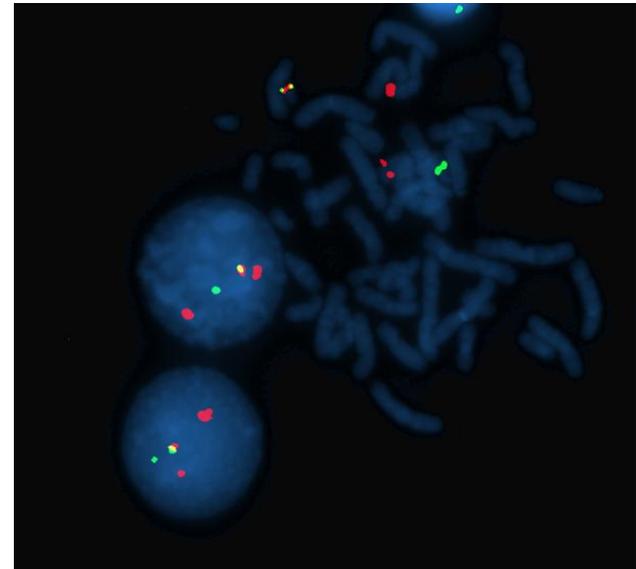
- Au Contraire du caryotype qui peut détecter plusieurs anomalies au même temps, la FISH est ciblée, ne détectant que l'anomalie recherchée.
- Utilisation de quelques réactifs potentiellement toxique ou cancérigène: formaldéhyde, DAPI.
- Le travail dans une chambre noire pour la manipulation et la lecture : structure adéquate.
- Technique couteuse (sondes commerciales).

Leucémie Myéloïde Chronique

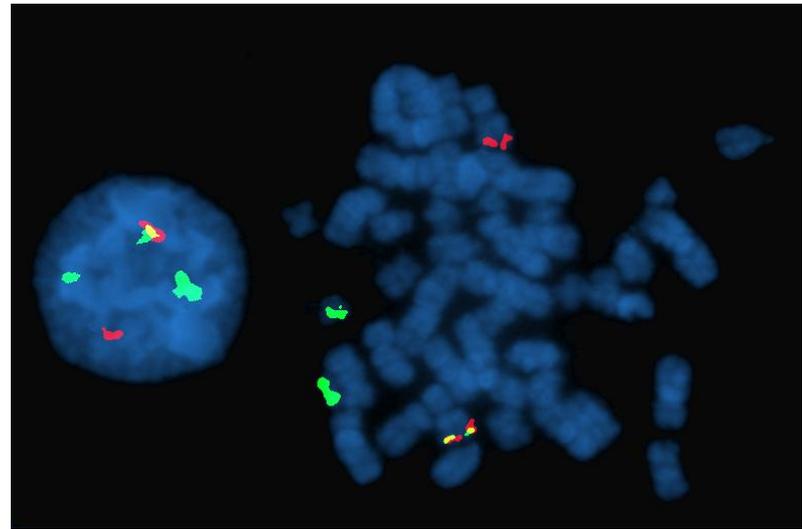
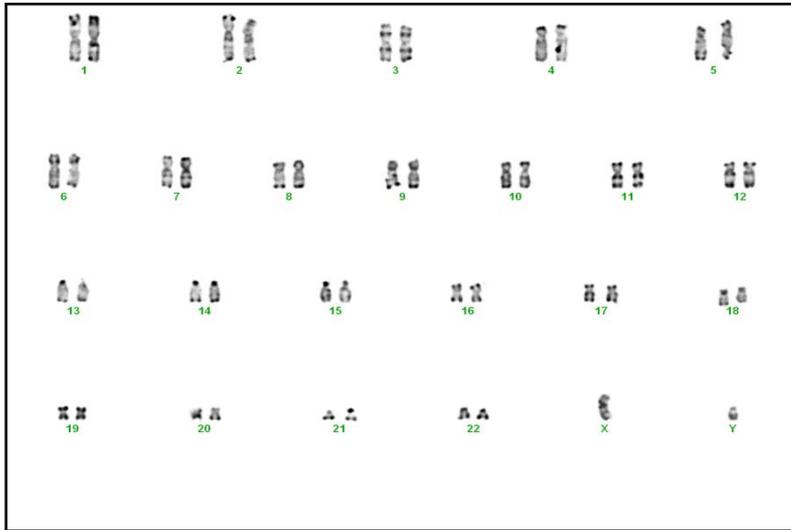
- Diagnostic par caryotype



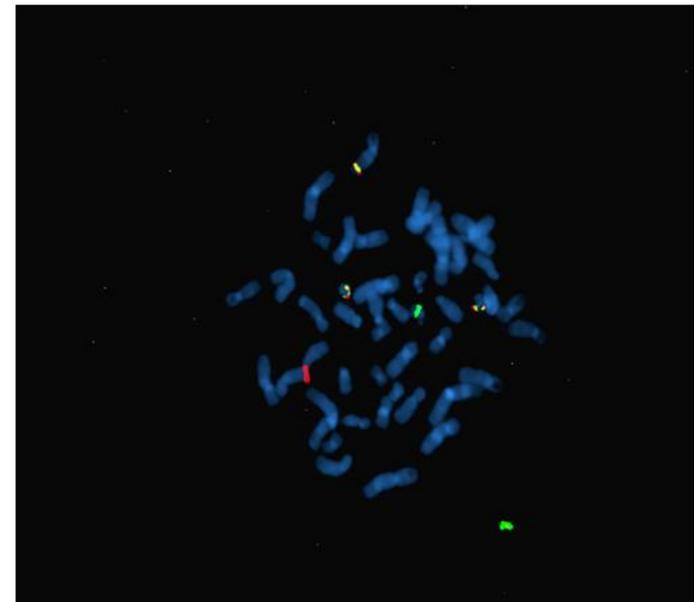
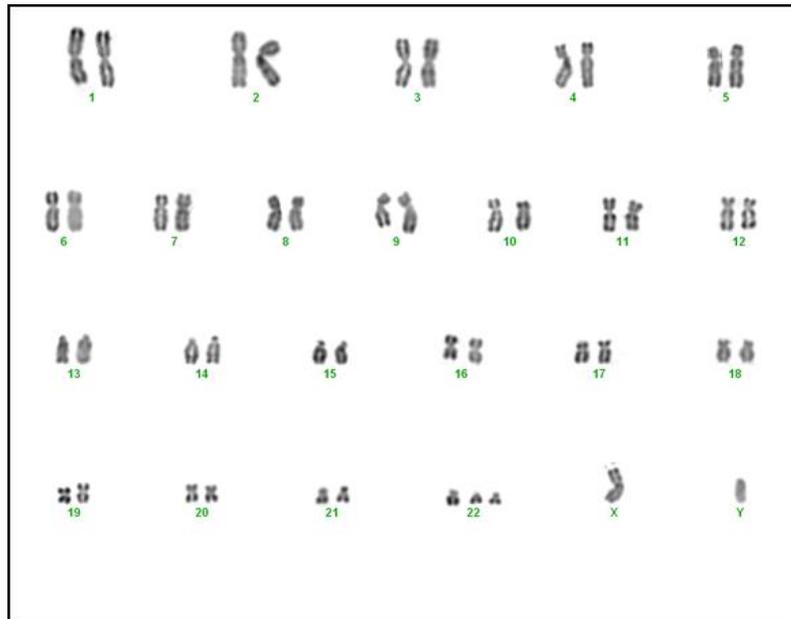
- Diagnostic par FISH



LMC : Absence du chromosome Philadelphie au caryotype Presence du signal bcr-abl en FISH

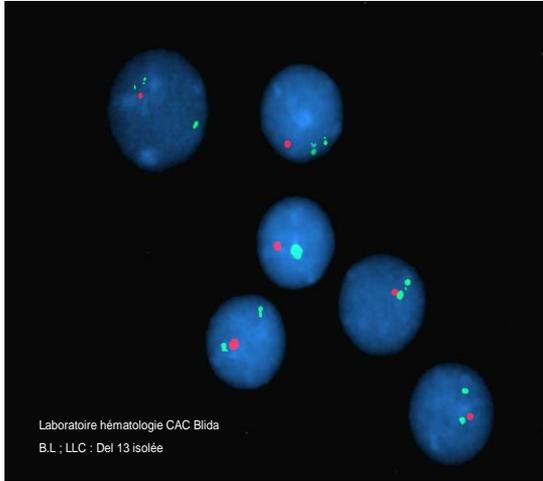


LMC: Cas de duplication du Ph1 (caryotype) et du bcr-abl (FISH)

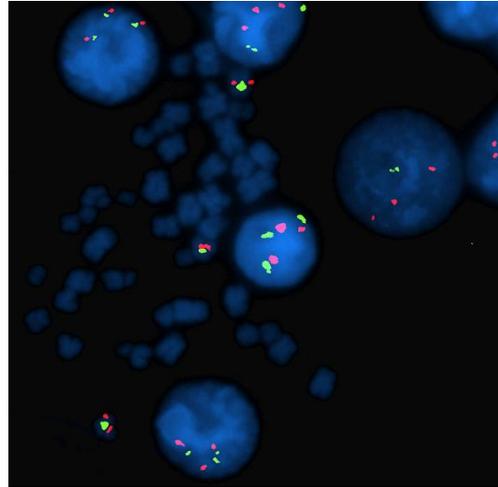


Leucémie Lymphoïde Chronique

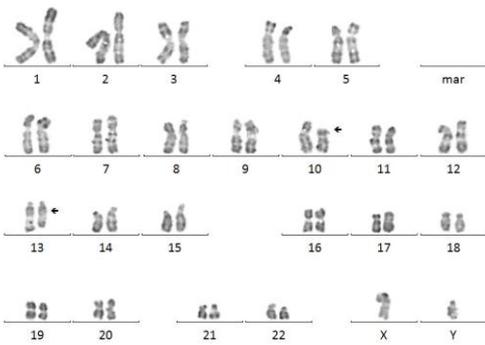
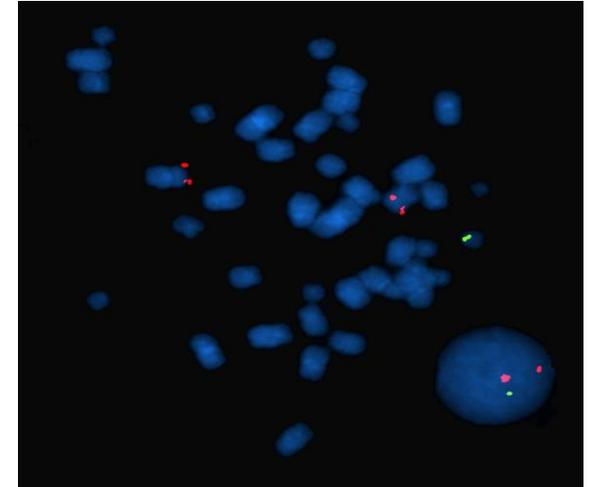
- del (13q14)



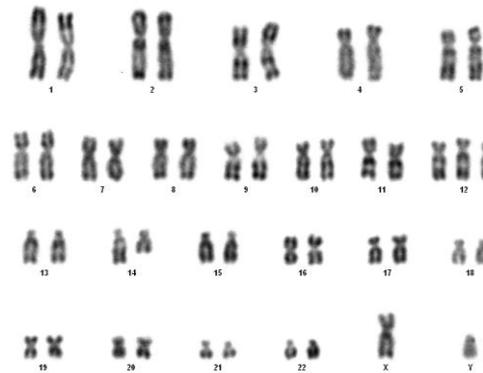
tri 12



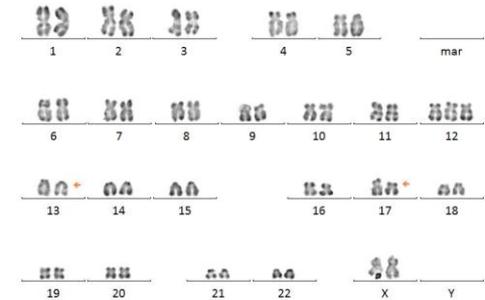
del 11q (ATM)



del 13q14



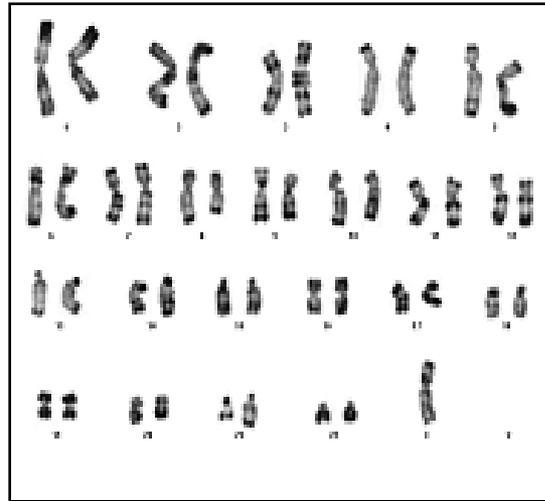
tri 12



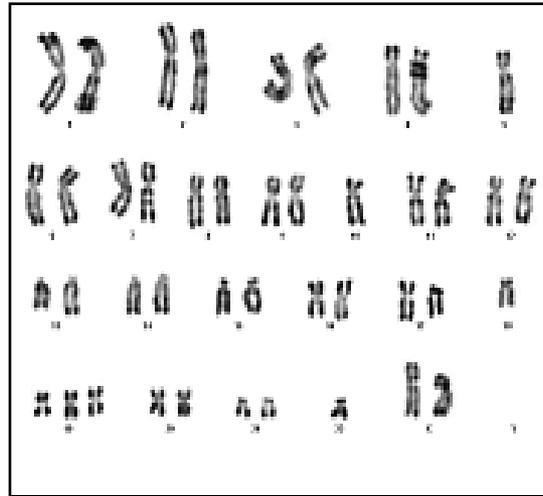
del 17p13 (P53)

Leucémie aigue myéloblastique

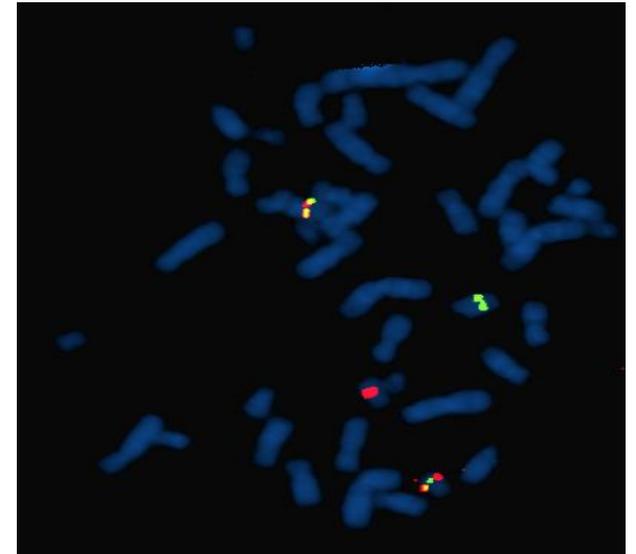
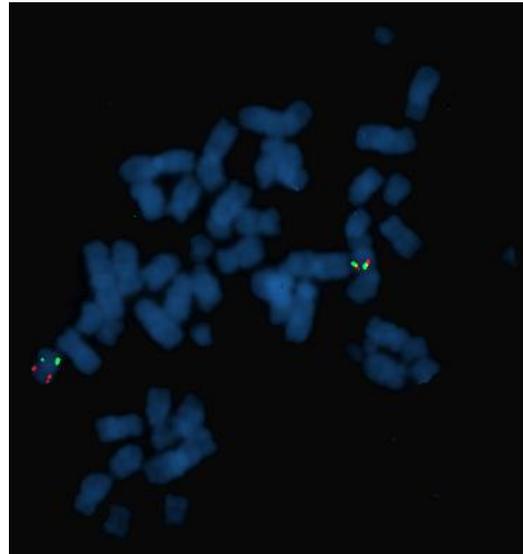
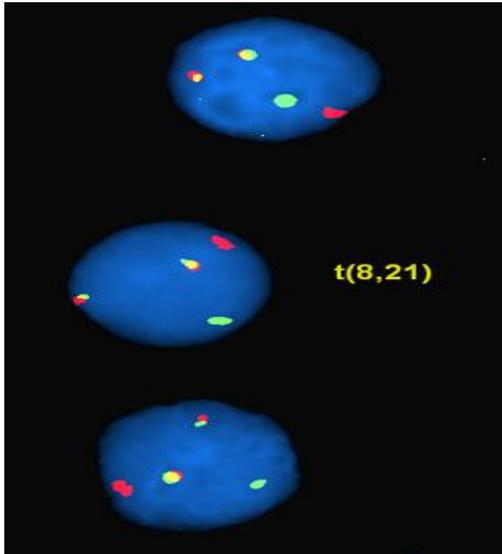
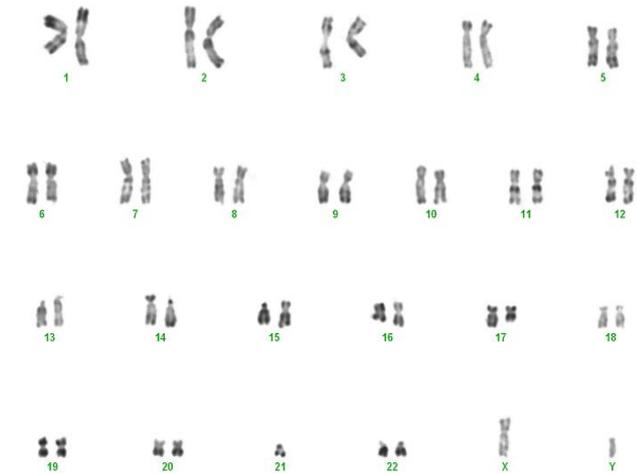
translocation (8;21)



Inversion (16), t (16; 16)

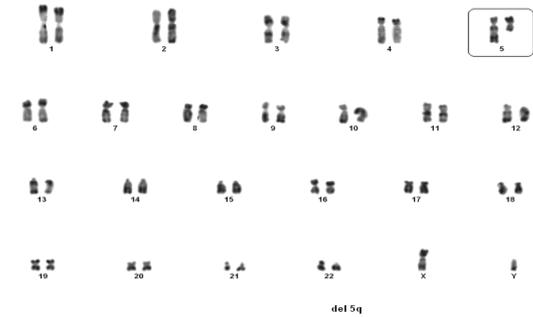
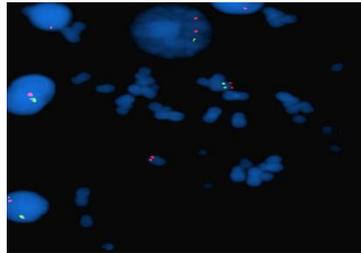


Translocation (15; 17)

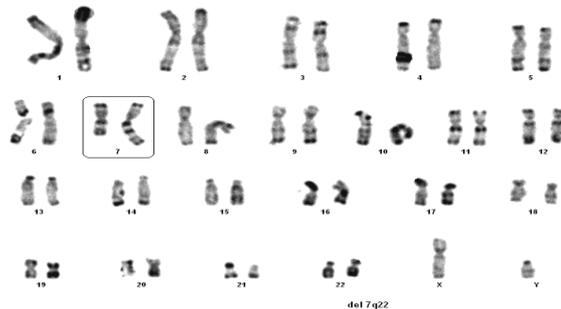


Syndromes myélodysplasiques

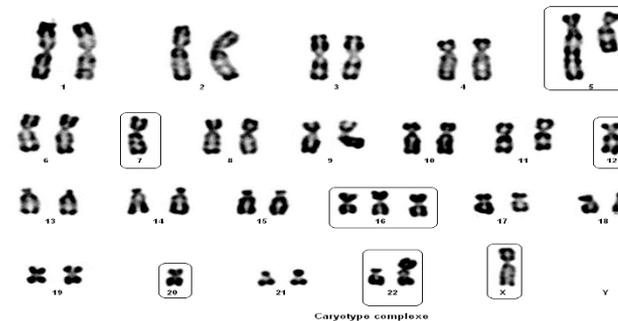
- **Diagnostic** : del 5q-



- **Pronostic** : del 20q



del 7q



Caryotype complexe

- **Conclusion**
- **Nous avons relevé le défi d'implanter et d'exploiter les techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH) pour optimiser la prise en charge es patients atteints d'hémopathie maligne.**
- **Trois techniques sont réalisées en routine dans notre laboratoire : le caryotype examen central, de manière complémentaire et plus sensible la FISH et dans certaines hémopathies la PCR.**