Cours 1 – Cytogénétique et Cytogénomique Moléculaire des Tumeurs Solides

Introduction - Définitions

Cytogénétique : discipline qui permet d'étudier la structure, la fonction et les anomalies structurales et numériques des chromosomes

Germinale ou Constitutionnelle	Somatique ou Acquise
Pré natale : caryotype fœtal à partir de : • **Amniocentèse** (cellules du liquide amniotique) • **Choriocentèse** (cellules trophoblastiques, villosités choriales) • **Cordocentèse** (cellules issues du sang du cordon ; difficilement réalisable)	Onco hématologique pour l'étude des **leucémie** et des **lymphomes** : caryotypes médullaires, ganglionnaires et des tissus hématopoïétiques.
Post natale : 2 types de caryotypes possibles : • **Lymphocytaire** (le plus fréquent car le prélèvement sanguin est facilement réalisable) • **Tissulaire** (si le lymphocytaire n'est pas réalisable ; on utilise alors des fibroblastes cutanés dans le cadre d'un mort né par exemple (car il prolifèrent encore) ou dans le cadre du syndrome de Pallister-Killian (tétrasomie du bras court du chromosome 12) où les anomalies chromosomiques sont absentes dans la lignée sanguine)	Tumeurs solides bénignes ou malignes Ce sont les études **les plus fréquentes** *Rmq : les prélèvements pour l'étude des tumeurs solides peuvent venir de liquides pathologiques (ex : liquide pleural, ascite)*

Rmq : on peut avoir une anomalie constitutionnelle associée à une anomalie acquise (ex: les malades atteints d'une trisomie 21 sont plus aptes à contracter une leucémie à l'âge adulte)

Les Différentes Cytogénétiques

Cytogénétique conventionnelle ou classique : elle étudie le **caryotype seul** (**rare** car souvent accompagnée ou remplacée par des analyses moléculaires)

Cytogénétique moléculaire : étudie les anomalies quantitatives ou structurales de l'ADN constituant les **chromosomes** : **FISH**

Cytogénomique : étudie quantitativement le **génome** entier après extraction de l'ADN : **CGH « array »** (Hybridation Génomique Comparative sur micro réseaux) ou puces ADN

Biologie moléculaire : étudie les **anomalies fines** après extraction d'acides nucléiques ADN et ARN

Cytogénétique Conventionnelle

*Comment obtenir une préparation assez **riche en cellules** au stade de **métaphase** et permettant de **visualiser distinctement** les chromosomes métaphasiques, de les compter, de les classer et d'identifier la présence d'anomalies ?*

1 *Comment obtenir suffisamment de cellules au stade de métaphase ?*

On étudie au minimum 16-20 cellules si moins ce n'est pas représentatif de l'organisme (sauf dans certains cancers où c'est impossible d'en avoir autant)

Augmentation de la prolifération cellulaire : *2 méthodes possibles* :

- Culture cellulaire : nécessaire dans la majorité des cas mais ne l'est pas si les cellules prélevées sont en division cellulaire spontanée très importante (ex : leucémie ou cellules des villosités choriales) Nécessite *un support et un milieu approprié* ; Incubation à *37°C* pendant *quelques heures à quelques jours* ; garder absolument un environnement *stérile*.

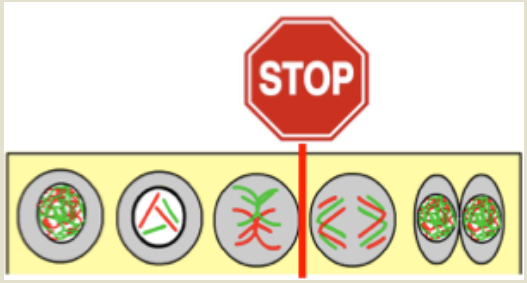
- Agents mitogènes : stimulation de cellules qui ne sont pas spontanément en division. Utilisation de la *phytohématoglutinine* (transforme les lymphocytes matures sous forme blastique) pour les caryotypes sanguins constitutionnels

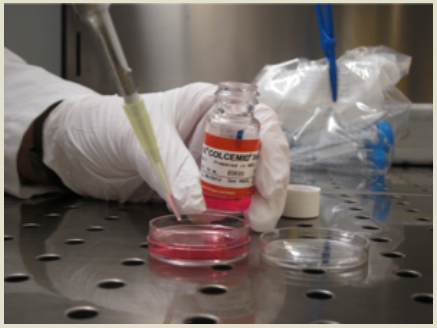
Obtention de cellules en stade de métaphase : *2 méthodes possibles :*

- Synchronisation du cycle cellulaire de l'ensemble des cellules étudiées (*quand on arrête le cycle en métaphase, elles sont toutes au même stade donc on a une plus grande quantité*)

- Blocage au stade de métaphase : utilisation de la **colchicine** Elle inhibe la polymérisation des micro tubules (tubuline) qui permettent la séparation des chromatides et le passage en anaphase. Il ne faut pas l'utiliser trop longtemps sinon ca devient toxique pour les cellules. On met donc le *colcemid* (dérivé de la colchicine) quand on juge qu'il y a assez de cellules en métaphase.







Notion historique : la colchicine était utilisée pour traiter la goutte. En 1937, Blakelee et Avery ont découvert son utilité pour bloquer les cellules au stade métaphasique.

Cytogénétique Conventionnelle

*Comment obtenir une préparation assez **riche en cellules** au stade de **métaphase** et permettant de **visualiser distinctement** les chromosomes métaphasiques, de les compter, de les classer et d'identifier la présence d'anomalies ?*

2 *Comment séparer les chromosomes assemblés sur la plaque équatoriale suffisamment pour les distinguer individuellement mais sans excès pour garder l'ensemble représentatif d'une cellule groupée dans une même zone ?*

Découverte du **choc hypotonique** : action d'une **solution saline hypotonique** sur les cellules avant leur fixation, pendant une durée et dans une température bien déterminées.

Etape critique

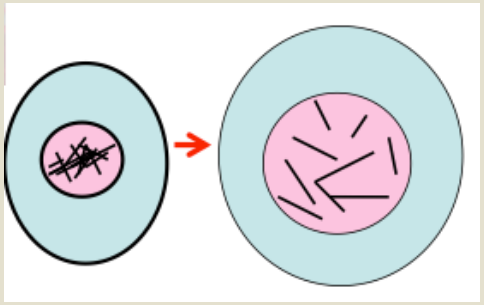
Les cellules se gorgent d'eau → séparation des chromosomes et fragilisation des membranes nucléaires et cytoplasmique (*conditions très précises de salinité et de température*)

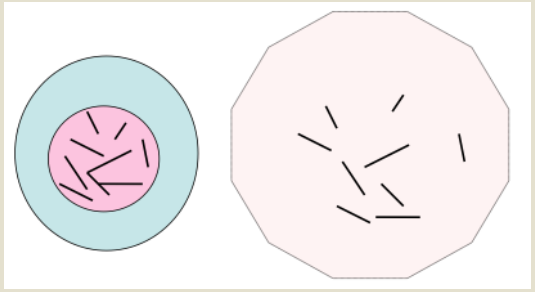
Etape de fixation

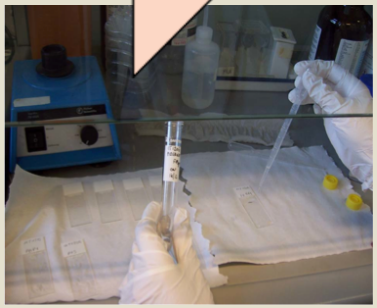
Utilisation d'un mélange fixateur qui permet la conservation à long terme et qui complète l'action du choc en permettant l'éclatement de la membrane et la dispersion ménagée des chromosomes lors de l'éclatement des préparations sur lames.

Etape d'étalement

Etape critique car très sensible au degré d'hygrométrie et de température







Notion historique : Cette découverte du choc hypotonique a largement contribué à la caractérisation du premier caryotype humain exact en 1956 par Tjio et Levan.

Cytogénétique Conventionnelle

*Comment obtenir une préparation assez **riche en cellules** au stade de **métaphase** et permettant de **visualiser distinctement** les chromosomes métaphasiques, de les compter, de les classer et d'identifier la présence d'anomalies ?*

3 *Reconnaître individuellement les chromosomes par des techniques de marquage sur bandes sur les chromatides et par coloration.*

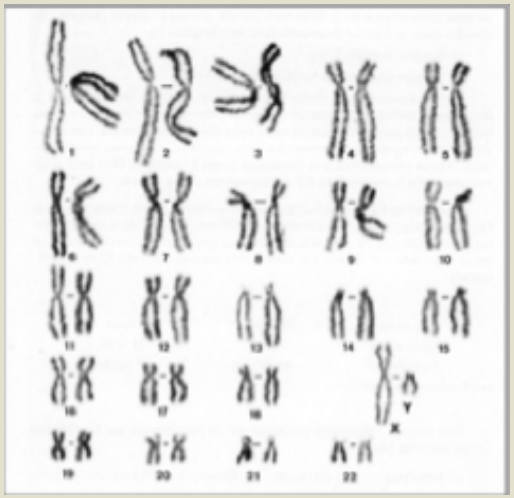
Coloration standard : coloration Giemsa (mélange de bleu de méthylène et d'éosine qui colore l'ADN)

Elle permet de compter les chromosomes, de les classer par taille et selon leur indice centromérique (position du centromère par rapport aux extrémités).

C'est un classification grossière qui permet de détecter des anomalies flagrantes de structure et de nombre (*incapable de détecter une anomalie ne modifiant pas la taille ni l'indice* centromérique). On distingue :

- Chromosomes **méta centriques** (*centromère central donc bras court aussi long que bras long*) : chromosome 1 par exemple
- Chromosomes **sub méta centriques** (*centromère proche du centre*) ou **sub télo centrique** (*proche des extrémités*) : chromosome 2 par exemple
- Chromosomes **acro centriques** (*quasiment pas de bras court*) : chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22





Cytogénétique Conventionnelle

*Comment obtenir une préparation assez **riche en cellules** au stade de **métaphase** et permettant de **visualiser distinctement** les chromosomes métaphasiques, de les compter, de les classer et d'identifier la présence d'anomalies ?*

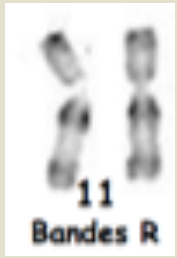
3 *Reconnaître individuellement les chromosomes par des techniques de marquage sur bandes sur les chromatides et par coloration.*
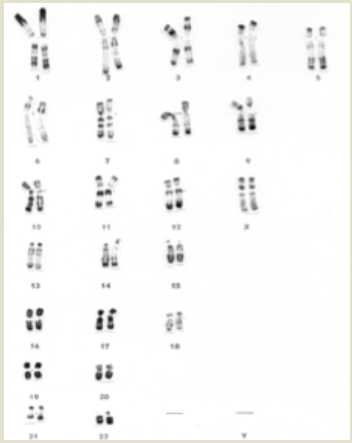
Technique de marquage par dénaturation de certaines protéines entourant l'ADN :

Bandes GTG (*les plus utilisées dans le monde*)	**Bandes RHG** (*les plus utilisées en France*)
Dénaturation de la chromatine par **action enzymatique** de la trypsine (T) Puis coloration standard au **Giemsa** (G)	Dénaturation de la chromatine par **action thermique** (H pour *Heat*) à 87°C avec une solution tampon phosphate pendant une durée limitée Puis coloration standard au **Giemsa** (G)
Les bandes G sombres sont riches en bases AT, pauvres en gènes, à réplication tardive et avec peu de points de cassure correspondant à des remaniements (*pas d'impact car pauvre en gène*)	Les bandes R sont les ***Reverse*** des bandes G donc les caractéristiques des bandes R sombres sont l'inverse de celle des bandes G sombres *Exemple : bandes riches en bases GC*
Possible de détecter et de localiser des remaniements qui affectent des segments chromatiques. Possible de réaliser des **idéogrammes** et une **nomenclature** précise	









Cytogénétique Conventionnelle

*Comment obtenir une préparation assez **riche en cellules** au stade de **métaphase** et permettant de **visualiser distinctement** les chromosomes métaphasiques, de les compter, de les classer et d'identifier la présence d'anomalies ?*

3 *Reconnaître individuellement les chromosomes par des techniques de marquage sur bandes sur les chromatides et par coloration.*

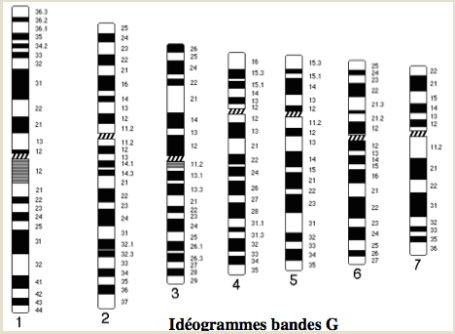
Autres techniques de marquage beaucoup moins utilisées : *pas important selon la prof*

- **Bandes CBG** : marquage de l'hétérochromatine centromérique et péri centromérique par du baryum puis coloration standard au Giemsa



- **Marquage NOR** : marquage des **organisateurs nucléaires** (bras court des chromosomes acro centriques) au nitrate d'argent. En effet : Ce sont des portions de taille très variable selon les individus (*pas d'impact génétique car elles codent pour les ARN ribosomiques*), donc afin d'assurer que ce poly morphisme ne soit pas pathologique on vérifie qu'il n'y ait pas d'euchromatine dans ces bras courts.





Exemple d'idéogramme à bandes G

Cytogénétique Tumorale

Notions Historiques :

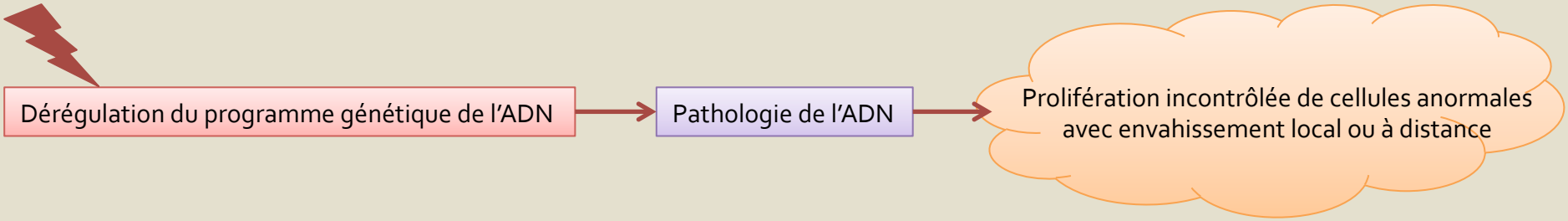
*18ème – 19ème : on comprend qu'il y a des **causes environnementales et héréditaires** au cancer et que les cellules tumorales ont des **anomalies chromosomiques** somatiques*
*19ème – 20ème : on comprend qu'il existe des **anomalies spécifiques** d'un type tumoral particulier : premiers pas de la cytogénétique somatique tumorale*
*20ème – 21ème : **évolution constante** de la cytogénétique tumorale : adaptation de ses indications et de son utilisation en fonction des **nouvelles méthodes moléculaires**.*

Rappel concernant les tumeurs solides :

Tumeur bénigne (ex : nævus)	Tumeur maligne (ex : mélanome)
Bien limitée ; Encapsulée	Mal limitée ; Non Encapsulée
Semblable au tissu d'origine (différenciée) Ø Destruction des tissus voisins ; vaisseaux normaux ; ¢ régulières	± Semblable au tissu d'origine (non différenciée) Envahissement des tissus voisins ; vaisseaux anormaux ; ¢ atypiques
Croissance lente ; Pas de récidive locale ; Pas de métastase	Croissance rapide ; Récidive et métastases possibles

Principaux types de tumeurs solides malignes :

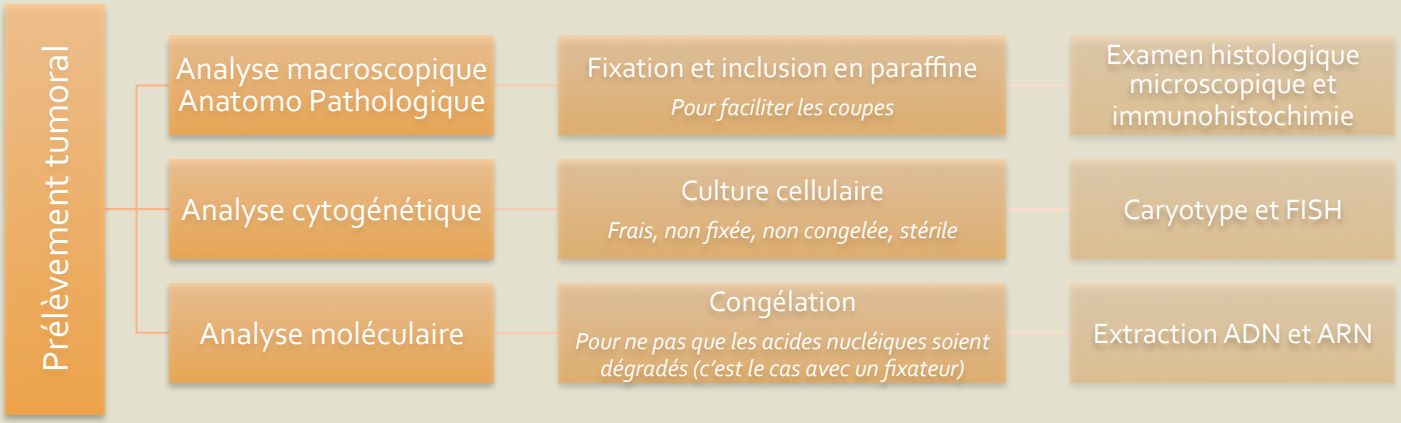
- Tumeurs épithéliales : *carcinome ou adénocarcinome si c'est glandulaire (ex: prostate)* → le plus fréquentes
- Tumeurs mésenchymateuses ou conjonctives : *sarcomes, tumeurs des tissus mous et de l'os* → les mieux étudiées en cytogénétique
- Tumeurs neuro-ectodermiques : *tumeurs cutanées, cérébrales et du tissu nerveux*
- Tumeurs placentaires et embryonnaires
- Tumeurs des séreuses



Cytogénétique Tumorale

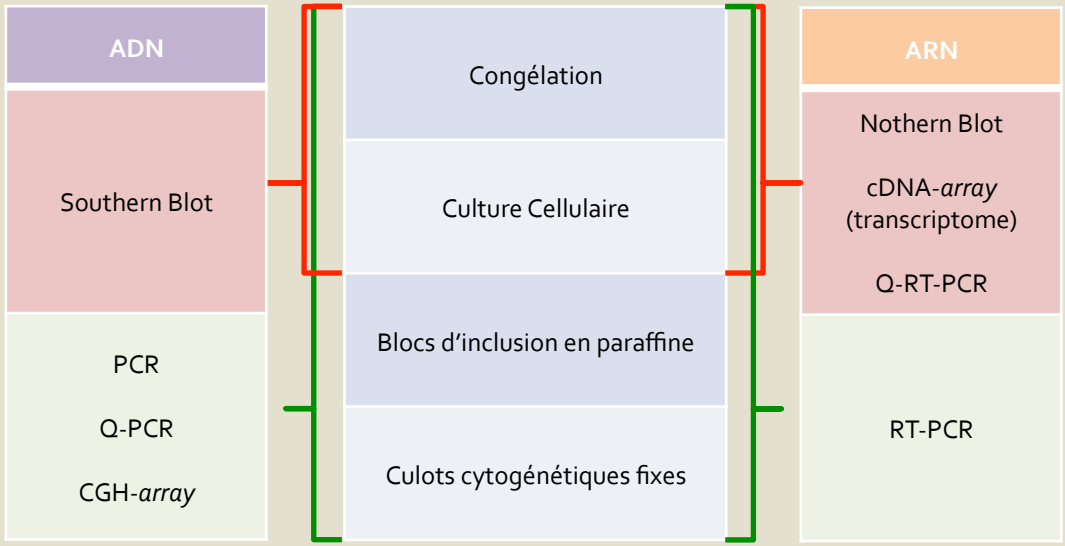
Tumeurs par anomalies chromosomiques acquises *Les plus fréquentes – Donc la majorité de tumeurs solides sont **sporadiques***	Tumeurs par anomalies chromosomiques héréditaires *Les facteurs génétiques de pré disposition sont présents dans slt 10% des cas*
Altération de l'ADN d'une cellule somatique sous l'influence de différents facteurs de l'environnement (radiations, virus, tabac, UV, amiante, mutagènes chimiques, etc.) Propagation de ces anomalies acquises aux ADN des cellules filles puis apparition d'autres anomalies lors de la division cellulaire → **addition d'anomalies**	Altération de l'ADN pré disposée (le plus souvent une mutation) présente dans l'ensemble des cellules de l'organisme ; héritée par l'un des parents (ou constitutionnelle de novo) et transmissible à la descendance.
Dérégulation cellulaire et prolifération +++ Formation d'une tumeur bénigne puis maligne	Cette anomalie initiale favorise l'apparition d'autres anomalies du génome dans d'autres cellules somatiques et donc la formation de tumeur
Analyse génomique des cellules tumorales : Prélèvement tumoral pour : - **Cytogénétique tumorale** : analyse chromosomique - **Cytogénétique moléculaire** (FISH ; CGH-*array*) - **Biologie moléculaire** (ADN, ARN)	Recherche du facteur de prédisposition : **analyse oncogénétique** Enquête génétique familiale (consultation oncogénétique, arbre généalogique) Prélèvement sanguin pour : - **Biologie moléculaire** (ADN, ARN) *Rarement : cytogénétique et cytogénétique moléculaire*

Principales méthodes classiques d'analyses de cellules tumorales :



Cytogénétique Tumorale

Exemples de méthodes moléculaires applicables selon les types d'échantillons tumoraux :



Méthodes de FISH métaphasique ou interphasique applicables selon le type d'échantillon tumoral :

- Si on veut faire une FISH sur **métaphase** alors on fait une **culture** cellulaire
- Si on veut faire une FISH sur **interphase** (nucléaire) on peut faire : une **culture** cellulaire, des **cryocoupes**, **fixation** de tissu puis **inclusion** en paraffine (pas avec du liquide de Bouin car dégrade trop l'ADN) ou encore des **appositions**.

Méthodes d'analyse du génome tumoral :

Méthode d'analyse globale *Donne un panorama général du génome*	**Méthode d'analyse ciblée** *Donne des Informations précises mais uniquement sur la question posée*
Caryotype : cytogénétique conventionnelle (*souvent complétée par FISH*) CGH conventionnelle (obsolète) ou sur biopuce (« array »)	FISH : cytogénétique moléculaire PCR et méthodes dérivées, séquençage *Southern et Northern Blot peu utilisés en routine actuellement*

Cytogénétique Tumorale

Obtention d'un caryotype tumoral : méthode d'analyse globale

Avantages :

- Panorama général du génome
- Détection d'anomalies équilibrées et non équilibrées

Inconvénients :

- Difficulté de réalisation
- Faible sensibilité

Remarque : Mitelman, Johansson et Mertens ont réalisé une base de donnée de tous les caryotypes anormaux et de tous les gènes de fusion associés pour chaque type de cancers. On remarque que sur ce tableau il y a plus de caryotypes anormaux pour les leucémies et les lymphomes, tout simplement à cause du fait que les analyses de ces cancers sont beaucoup plus facilement réalisables que pour les tumeurs solides ici notées.

	nombre de caryotypes anormaux décrits	nombre de gènes de fusion
leucémies et lymphomes	31 901	205
tumeurs mésenchymateuses	5011	38
tumeurs épithéliales (carcinomes)	6246	29

tumeurs solides

*Rappel : **différence de réalisation de caryotypes sanguins et médullaire** :*

- *Réalisation d'un **caryotype sanguin** constitutionnel dans le cadre d'un lymphome par exemple :*
  - *Prélèvement sanguin (facilement réalisable)*
  - *Incubation courte (1-3 jours) dans un milieu adapté : protocoles standardisés*
  - *Obtention rapide d'un grand nombre de cellules en métaphase → résolution chromosomique de qualité*
  - *Si anomalie chromosomique alors elle est simple sinon ce n'est pas compatible avec la vie (perte ou gain d'un seul chromosome)*

- *Réalisation d'un **caryotype médullaire** constitutionnel dans le cadre d'une leucémie par exemple :*
  - *Prélèvement de moelle (plus difficilement réalisable)*
  - *Incubation courte (1-3 jours) dans un milieu adapté : protocoles standardisés*
  - *Nombre de cellules en métaphase souvent suffisant pour l'analyse*

Cytogénétique Tumorale

Difficultés de l'analyse cytogénétique des tumeurs solides :

1 *Contraintes techniques de recueil et de transport du prélèvement :*

Deux conditions indispensables pour l'analyse cytogénétique :

- ✓ Cellules doivent être **vivantes** en stade de **métaphase** en **prolifération** spontanée ou en culture cellulaire
- ✓ Le prélèvement doit être **stérile** : éviter la prolifération bactérienne ou fongique qui inhibe la prolifération cellulaire et qui peut contaminer d'autres prélèvements (*attention car la culture se fait dans un environnement propice au développement bactérien : 37°C avec un milieu riche)*

Précautions lors du recueil :

Prélèvement recueillis au bloc opératoire. Aussitôt après exérèse il est mis en conditions aseptiques, non fixé, non congelé et déposé dans un tube stérile contenant un milieu de transport adapté

→

Précautions lors du transport :

Prélèvement acheminé rapidement (moins de 48 heures) au laboratoire à température ambiante.

→ Organisation et coût du transport

→

Précautions au laboratoire de cytogénétique :

Toutes les manipulations sont sous hotte à flux laminaire en salle de culture avec un matériel de culture stérile

2 *Difficultés de culture cellulaire in vivo :*

- **Petite taille** du prélèvement (biopsie, tumeurs adipeuses de taille trompeuse car faible cellularité)
- Présence de **cellules nécrosées** ou de **caillots sanguins**
- Absence de prolifération ou **prolifération très lente in vitro** (*alors que in vivo les ¢ tumorales peuvent proliférer grâce à un meilleur environnement*)
- **Croissance prédominante in vitro des fibroblastes** du stroma : obtention d'un caryotype normal non représentatif des cellules anormales

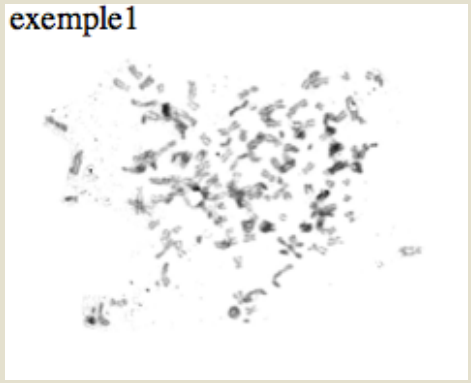
Cytogénétique Tumorale

Difficultés de l'analyse cytogénétique des tumeurs solides :

3 ***Difficultés d'interprétation du caryotype :***

Mauvaise morphologie chromosomique :

Mauvaise préparation ; cellules résistantes au choc hypotonique (ex : cellules tumorales avec des membranes plus résistantes)





Complexité des caryotypes :

Multiples anomalies numériques et structurales, polyploïdie, instabilité, poly clonalité, présence de « marqueurs » non identifiables (= chromosomes tellement remaniés qu'on ne peut pas les identifier juste par la cytogénétique)



