Onco-hématologie, cytogénétique acquise

Historique cytogénétique :

1960 : K philadelphie observé dans leucémie myéloide chronique. On savait bloquer les c en métaphase, mais pas dénaturer les K pour faire apparaître les bandes. On les triait seulement par leur taille et la position des centromères : difficile pour certains K.
Ensuite on a progressé et avec les bandes on a caractérisé la translocation 9-22.
1975 : réunion cytologistes qui ont mis au point des classifications communes internationales. Certaines anomalies sont caractéristiques d'une maladie.
1976 : caractérisation 1er oncogène.
1980s : apparition FISH → territoires chromosomique spés : points de cassure. Myc sur 8q24 ac translocations… Techniques clonage… notions gène cible, fusion, translocation.
Donc caryotypes systématiques pour les hémopathies.
Années 80-90 : caractérisation de bcp de maladies selon profil cytogénétique, protocoles d'essais thérapeutiques
90s-maintenant : FISH et mise en évidence anomalies cryptiques (t(12 ;21) ds leucémies lymphoblastiques de l'enfant), démembrement cytoG conventionnelle et moléculaire → Classification cytogénétique. Etude des fréquences anomalies. Evaluation fine de la valeur pronostique d'une anomalie +++, avec bon ou mauvais pronostic pour prendre les mesures thérapeutiques adéquates (greffe moelle osseuse, sang de cordon…)

Leucémies aigues myéloides ou myéloblastiques (LAM)

Rappel : Dans l'hématopoïèse, une cellule souche se differencie en cellule progenitice de la lignée myéloide, ou lymphoide, puis en précurseurs, etc…
Une leucémie aigue est un blocage de la prolifération/diférenciation des cellules à un certain niveau de leur évolution : beaucoup de LAM différentes, caractérisées par une grande variété d'anomalies chromosomiques récurentes.

Sur 100 LAM, 50-60% ont des anomalies. Certaines de ces anomalies sont spécifiques de certaines morphologies (cytologies) → classification OMS.
Le caryotype est le plus fort facteur prédictif de la réponse au ttt et de la rechute, il est indispensable à la prise en charge d'une LAM avant tout ttt.
Attitude thérapeutique des LAM est fonction d'anomalies Kiques ou géniques de « bon » ou « mauvais » pronostic, on attend d'avoir les résultats avant de traiter. La FISH peut être utile, mais elle nécessite de savoir un minimum ce qu'on cherche, les sondes étant spécifiques.

➢ Anomalies de nombre :

Monosomies, trisomies, hypo/hyperdiploidies (entre 46 et 58, puis on passe à une hypotriploidie, on compte par multiples de 23)… On voit de tout en cancérologie. **Le plus souvent plus une cellule acquiert des anomalies, plus elle sera agressive.** L'avantage en hémato, c'est que le délai enre l'apparition des anomalies et la manifestation clinique est faible : le sang va partout et il est indispensable à tous les organes, donc on verra moins d'anomalies que dans les tumeurs solides.
Pour confirmer il faut deux mitoses anormales pour les anomalies en plus, et 3 caryotypes anormaux pour les anomalies de perte.

➢ Anomalies de structure :

Translocations, inversions, délétions, gènes de fusion, an anneaux, réarrangements chromosomiques complexes (K marqueurs)… Il faut deux caryotypes anormaux pour confirmer.

Les cellules peuvent disparaitre en cas de guérison, réapparaitre en cas de rechute, développer de nouvelles anomalies… Il faut faire en sorte de ne pas passer à côté d'une pathologie donnée, en se basant aussi sur les données cliniques (plutôt lymphoide ? myéloide ?), respecter des temps de culture, et analyser au moins 20 mitoses normales pour affirmer un caryotype normal. En hémato on est confronté à des clones et des sous-clones avec de nombreuses anomalies.

On va donc définir 3 groupes de LAM en fonction des caryotypes (pronostic bon, intermédiaire, mauvais). On considère les caryotypes normaux comme intermédiaires.

Dans les caryotypes anormaux on différenciera les simples (2 anomalies max) et les complexes (plus de 3, 4 ou 5 anomalies). On a aussi des caryotypes monosomaux, où on a au moins deux pertes d'autosomes, ou un K entier qui a disparu associé à des anomalies de structures. Très mauvais.
Une seule situation où le caryotype complexe n'est pas de mauvais pronostic, c'est quand il est associé à une anomalie de bon pronostic.
Dans les LAM, place majeure pour les translocations (300+), beaucoup clonées. On a donc beaucoup plus d'anomalies chromosomiques que de phénotypes leucémiques. : 8 types de LAM et pourtant 300 translocations chromosomiques qui vont pouvoir aboutir à une même cytologie. Différents gènes de fusions activent les mêmes voies de transduction du signal ou d'activation de la transcription.
On en déduit la classification fonctionnelle des translocations, très utile pour la recherche sur les thérapies ciblées, car plus facile d'agir sur la fonction des différentes protéines de fusion que sur la multitude de protéines de fusion elles-mêmes.
Les cibles préférées des translocations dans les LAM sont les facteurs de transcriptions liés à l'hématopoïèse → blocage de la maturation.

➢ Classement des translocations suivant les voies de signalisations.

- **CBF (Core Binding Factor) :**

Hétérodimère, 1 su CBFα et 1 su CBFβ. Rôle majeur dans l'hématopoïèse normale → indispensable activation facteurs de transcription IL3, GMCSF, MCSF.
Dans t(8 ;21) on a AML1, son autre nom est CBFα. Dans inv(16) il s'agit de CBFβ.
Cibles translocations = une su du CBF. → gènes de fusion → production d'inhibiteurs dominants négatifs de la transcription des gènes cibles de CBF, càd les facteurs de transcription de l'hématopoïèse.
Donc activité de répression de la transcription, par recrutement d'un complexe nucléaire co-répresseur Ncor–Histone déacétylase. → AML1-ETO dans t(8 ;21) recrute ce complexe et l'ensemble inhibe les promoteurs du CBF normal → blocage différenciation.

- **Gènes de la famille HOX :**

Gènes de l'hématopoïèse exprimés dans les progéniteurs précoces et pas pendant la différenciation.
Translocations fréquentes et nombreuses **: fusion d'un gène HOX avec promoteur d'un autre gène → activation permanente de HOX alors qu'il n'est pas censé être exprimé → blocage diff°.**

- **Nucléoporines :**

Protéines de structure du pore nucléaire. Ici aussi, beaucoup de translocations…
D'abord myélodysplasie puis LAM quand associée avec d'autres anomalies (fusion avec HOX).

- **Modulateurs de l'expression génique :**

Nombreuses. Impliquent des molécules co-activatrices de la transcription (CBP, p300) à activité histone acétyl transférase. ADN = cible, donc activité histone nécessaire.
→ **Gène MLL à activité DNA binding et méthyl transférase :** réarrangé avec plus d'une trentaine de partenaires → **dérégulation de l'expression des gènes de la famille HOX.**
Présent sur 11q23 : **MAUVAIS PRONOSTIC**
6% des LAM à caryotype anormal. Impliqué dans plus de 40 translocations dont t(9 ;11) (0,7% des LAM). Il est réarrangé dans les leucémies secondaires à une chimio (inhibiteurs topoisomérase 2).
Anomalies difficiles à voir, détection en bandes R → FISH.

➢ Anomalies de bon pronostic dans les LAM :

- **T(8 ;21)**

7% leucémies, adulte jeune, très reconnaissable au caryotype. Souvent associée à d'autres anomalies Kiques come la pete d'un K sexuel ou une délétion du bras long de K9.
Exemple du caryotype 45X –X, -9, t(8 ;21)
Il s'agit donc d'un caryotype complexe, et on peut penser à un mauvais pronostic, mais non ! les anomalies en plus n'influent pas sur le rôle majeur de bon pronostic de t(8 ;21).
Cette translocation peut aussi être masquée dans un réarrangement complexe qui va impliquer soit K8q22 ou K21q22. Genre une translocation 8 ;15 peut cacher une translocation 8 ;21 à l'intérieur, ça ne se voit pas forcément sur le caryotype.
Csq moléculaire : gène de fusion AML1-ETO (ETO = eight twenty-one).
C'est une translocation clonée, ce qui est utile ca des fois on ne la voit pas (cryptique), donc on peut faire soit de la FISH, soit de la PCR pour la trouver.
Autre intêret quelle soit clonée, c'est **l'étude de la maladie résiduelle :**
Après ttt d'induction (chimio) qui détruit toutes les cellules myéloïdes actives, en mitose donc, et pas les cellules quiescentes → le patient est en aplasie. Au bout de qques semaines l'hématopoïèse reprend normalement, on fait alors un myélogramme pour observer le taux de myéloblastes : si < 3% il y a une bonne réponse au ttt. On enchaîne alors avec des ttts de consolidation et on le surveille.
C'est là qu'on évalue la maladie résiduelle régulièrement. Si on a une **diminution de 3 Log de la quantité de cellules cancéreuses par rapport au moment du diagnostic on aura un excellent pronostic.**

- **Inversion du 16 ou inv(16) :**

5% LAM. Difficile à voir, et mieux visibles sur bandes G plutôt que R.
Association caractéristique avec la trisomie 22.
Peut-être masquée dans des remaniements complexes ou cryptiques → FISH ou PCR avec sondes ou amorces spés du **gène de fusion CBFβ-MYH11.**
Cytologie très particulière : prolifération de cellules éosinophiliques anormales.

- **LAM3 ou leucémie promyélocytaire, avec translocation (15 ;17)**

Gène de fusion PML-RARA. **K15 PML= promyeloid leukemia et K17 RARA= chaîne α acide rétinoïque.** 1ère leucémie à recevoir une thérapie ciblée : poudre d'acide trans-rétinoïque avec un peu d'arsenic, on évite ainsi la chimio.

La leucémogénèse des LAM ont donc pour cible l'appareil transcriptionnel des cellules hématopoïétiques CBF, HOX, RARα… Cet appareil est assisté par des facteurs de co-transcription qui peuvent être aussi la cible des translocations.
Les traitements ont donc pour objectif de rétablir l'activation des gènes de l'hématopoïèse réprimés, où inversement de réprimer la suractivation des gènes atteints.

➢ Anomalies de mauvais pronostic :

Généralement, plus le caryotype est complexe (anomalies), plus le pronostic est mauvais.
Monosomie 5 ou 7 et délétions partielles de leur bras long (5q- ou 7q-).
Anomalies impliquant EVI1 en 3q26 → t(3 ;3) ; inv(3)…

➢ Anomalies de pronostic intérmédiaire :

Toutes les anomalies sauf celles de bon pronostic et de mauvais pronostic, mais aussi les caryotypes normaux !
On retrouve un caryotype normal dans presque la moitié des LAM. Ici on doit donc utiliser des techniques de biomol pour étudier les anomalies génétiques.

- **Mutation de l'exon 12 du gène NPM1 :**

Mutation la plus fréquente dans les LAM à caryotype normal. **Bon pronostic.**

- **Mutation FLT3 :**

FT cellules hématopoïétiques immatures. **Duplication en tandem de FLT3 → FLT3-ITD → mauvais pronostic. Cellules leucémiques très aggressives**, difficiles à traiter. Développement des inhibiteurs de FLT3.

Il y en a d'autres, et les progrès de la biomol avec les nouvelles techniques de séquençage et l'amélioration de la PCR en font découvrir de plus en plus, voire un peu trop car on est submergé d'infos dont on ne sait pas forcément quoi faire.

Il faut aussi penser aux disomies uniparentales : 2 allèles d'un gène sont en fait 2 copies de l'allèle d'un seul parent → si l'allèle est muté, alors il peut s'activer. On les recherche en constistuant un caryotype moléculaire par SNP-array.

On doit retenir que la cyogénétique est très utile en hémato pour le diagnostic, le pronostic, et l'orientation dans le traitement. Pour les LAM le ttt est dirigé non pas sur la translocation directement mais sur la voie de signalisation qu'elle implique, et les transllocations concernent principalement des molécules capables d'interagir avec l'ADN (activité histone, DNA-binding..) et il est important de bien définir l'anomalie car selon le pronostic on aura pas la même attitude thérapeutique.

Pronostic bon	*Pronostic intermédiaire*	*Pronostic mauvais*
t(8 ;21) → AML1-ETO	Caryotypes normaux :	Caryotypes complexes
inv(16) → CBFβ-MYH11	- Mutation NPM1 ;	Monosomies 5 ou 7
t(15 ;17) → PML-RARA	- Mutation FLT3	(5q-) ou (7q-)
	Autres	t(3 ;3), inv(3)

Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Accumulation de lymphocytes matures par immortalisation des lignées lymphocytaires, ils ont un faible index mitotique → restent bloqués en G0.
Au début, très difficile à classer, puis on a cherché des caractéristiques génétiques, morphologiques et immunologiques (clusters de différenciation).
Contrairement aux LAM où les translocations sont principalement impliquées, les LLC sont surtout dues à des délétions.

➢ Anomalies :

Mauvais pronostic : **Perte du bras cours de K17 (17p-) qui code pour la protéine p53**, perte du bras long de K11 (11q-),
Pronostic intermédiaire : trisomies 12,
Bon pronostic : délétion bras long K13 (13q-).

On retrouve des caryotypes compexes et hétérogènes et ici aussi, plus le caryotype est complexe, plus le pronostic est mauvais.
La délétion de 17q est extrêmement grave, donc lorsqu'on diagnostique une LLC on doit obligatoirement faire une FISH pour étudier p53 avant le ttt, et on doit aussi la faire dans le suivi du patient.

Caryotype = Gold Standard en 2013 pour le diagnostic des hémopathies.
Obligatoire pour le bilan diagnostique (prise en charge LAM, LAL, SMD, etc…). Il doit être réalisé avant ttt sur le tissu le plus adapté à la maladie. La mise en culture cellulaire doit être adaptée et correctement effectuée (contrôles des labos).
Les techniques de biologie moléculaire permettent de suivre la maladie résiduelle et de détecter les mutations au diagnostic ou en rechute.
La FISH est un outil complémentaire. Elle ne peut pas répondre à toutes les questions mais peut être décisive, surtout dans les LLC.

Dsl pour la qualité douteuse de cette fiche, pas de diapos, pas d'illustrations… Elle est moche mais j'espère qu'elle fera l'affaire… Bon courage à tous !