Cytogénétique et cytogénomique moléculaire des tumeurs solides

F. Pedeutour

Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides
Faculté de Médecine de Nice

florence.pedeutour@unice.fr

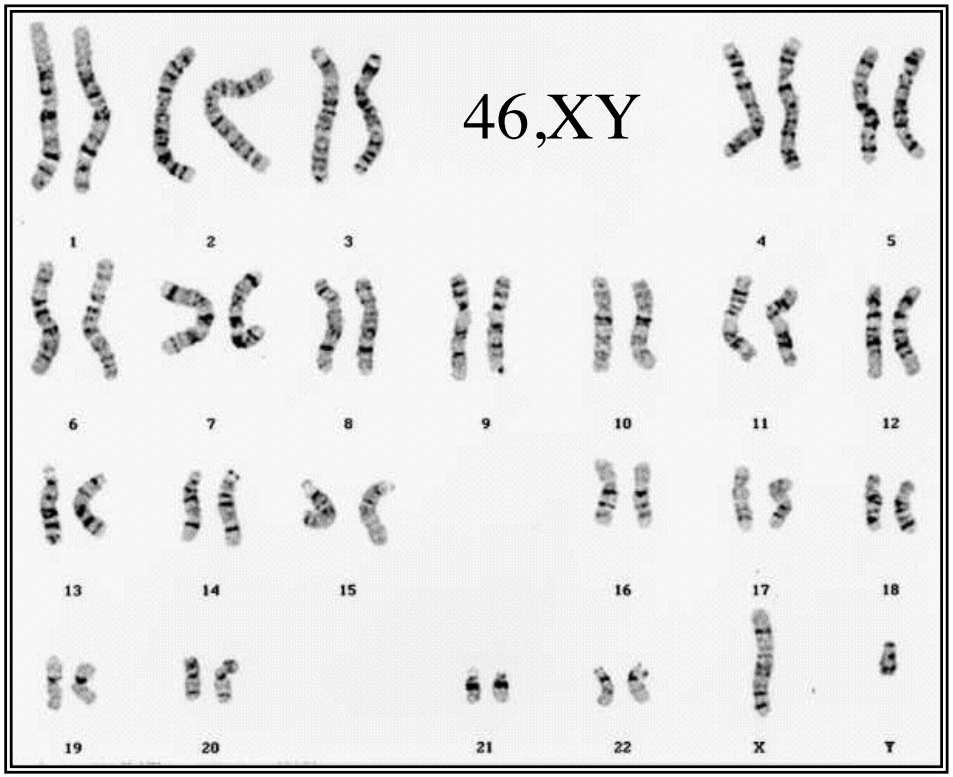
UE 4, 15 novembre 2012

Remerciements à E. Chevret et B. Quilichini pour m'avoir communiqué ceraines des illustrations

Cytogénétique : définition

La cytogénétique est la discipline qui permet d'étudier

- **la structure**
- **la fonction**
- **les anomalies structurales et numériques des chromosomes**



Marquage : bandes GTG

Outil : le caryotype

Cytogénétique humaine : applications cliniques

On distingue :

•la cytogénétique germinale, ou « constitutionnelle »

-prénatale, à partir de :

Amniocentèse (cellules du liquide amniotique)

Choriocentèse (cellules trophoblastiques, villosités choriales)

Cordocentèse (sang de cordon)

-postnatale

Caryotypes lymphocytaires

Caryotypes tissulaires (exemple : fibroblastes cutanés)

•la cytogénétique somatique ou cytogénétique des anomalies chromosomiques « acquises » = cytogénétique tumorale

Onco-hématologie : caryotypes moelle osseuse, ganglions tissus hématopoiétiques

Tumeurs solides (l'étude de tumeurs solides pouvant parfois s'effectuer à partir de liquides pathologiques)

Cytogénétique conventionnelle, cytogénomique moléculaire, cytogénomique et biologie moléculaire

Caryotype seul : cytogénétique « conventionnelle » ou « classique »

Depuis une dizaine d'années, le caryotype est rarement employé seul dans les recherches d'anomalies chromosomiques : il est très souvent complété et parfois remplacé par des analyses « moléculaires »

Cytogénétique « moléculaire » : étudie les anomalies quantitatives ou structurales de l'ADN constituant les chromosomes : hybridation in situ en fluorescence « FISH » (cf cours n° 3)

Cytogénomique : profils quantitatifs d'un génome entier après extraction d'ADN : hybridation génomique comparative sur microréseaux ou « puces ADN » : CGH-array (cf cours n°4)

Biologie moléculaire : étude d'anomalies « fines » après extraction d'acides nucléiques, ADN ou ARN

Cytogénétique conventionnelle

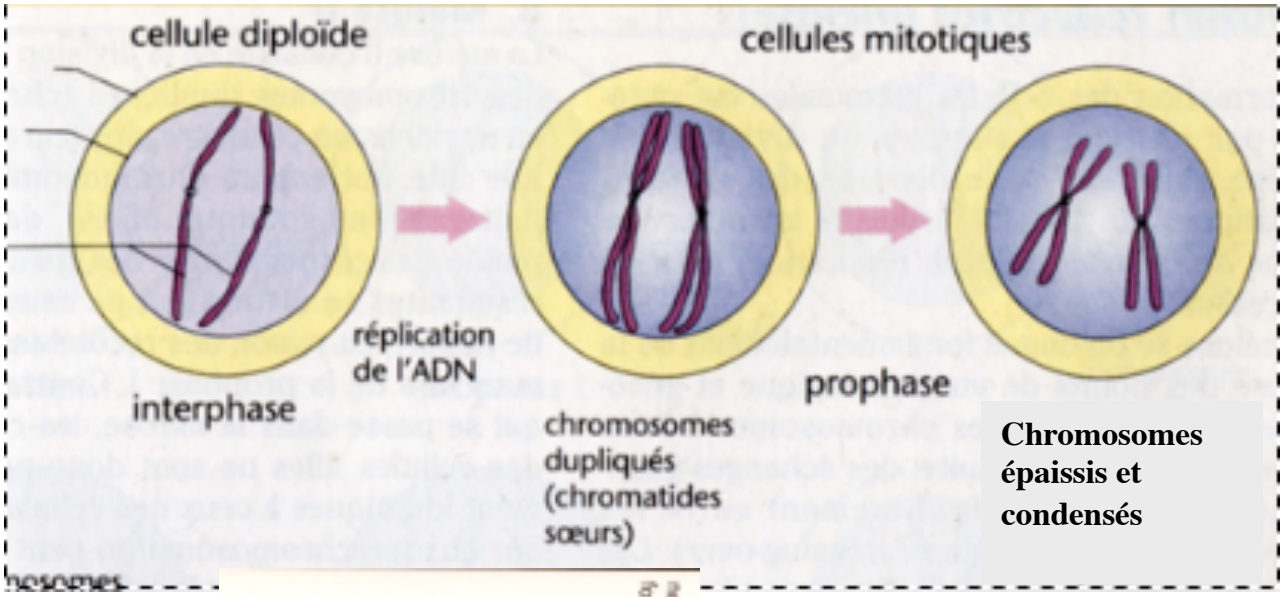
Caryotype

Nécessite des cellules vivantes, en phase proliférative au stade de métaphase

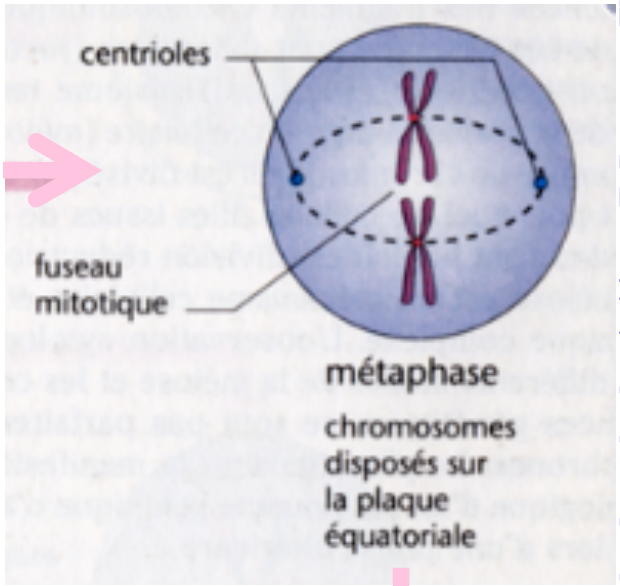
Métaphase : une des étapes de la mitose
Mitose : une des étapes du cycle cellulaires

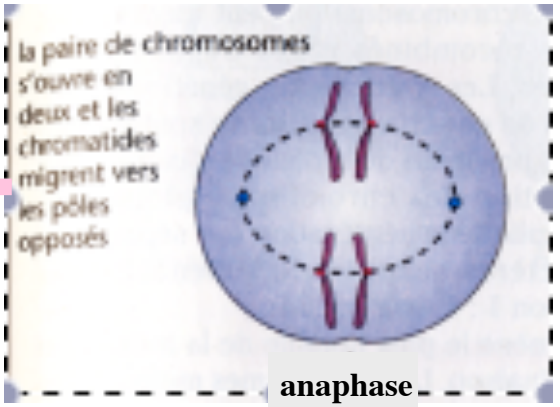
Cytogénétique conventionnelle

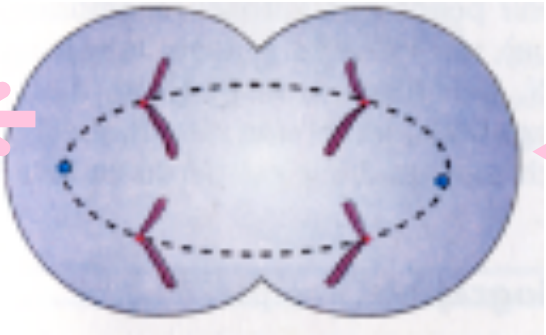
Rappel : les étapes de la mitose

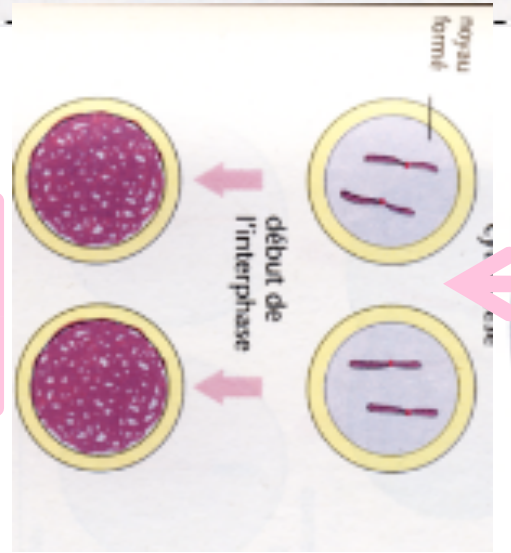


métaphase







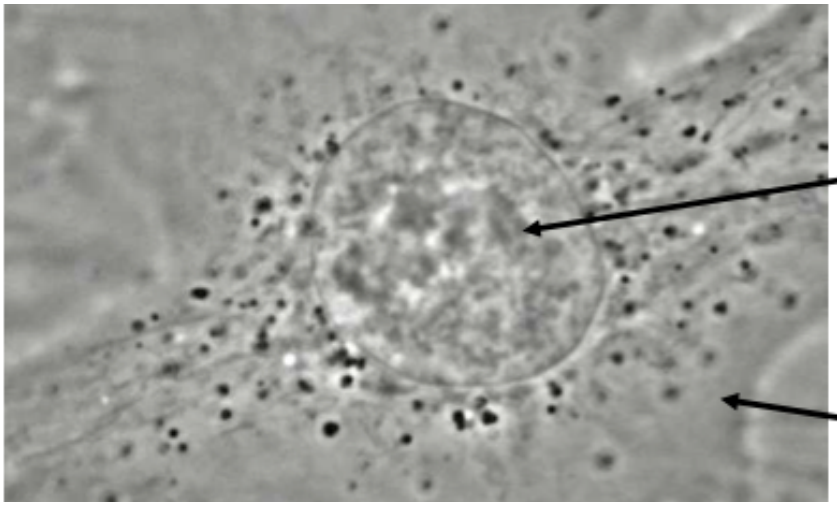


nouveau cycle

ou

phase quiescente

D'après Atlas de poche de génétique, E. Passarge, Flammarion

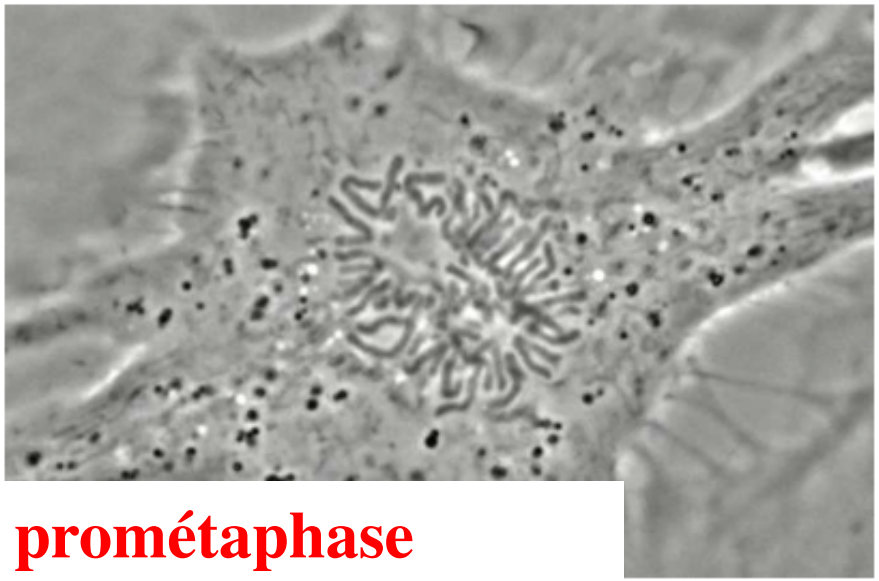


Noyau

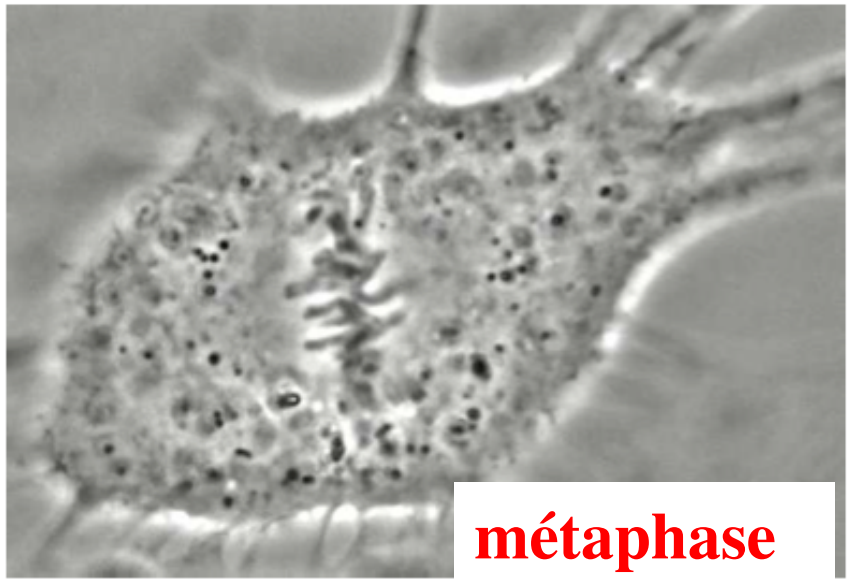
Chromatine
= ADN + Protéines

Cellule

Interphase : chromosomes non visibles



prométaphase



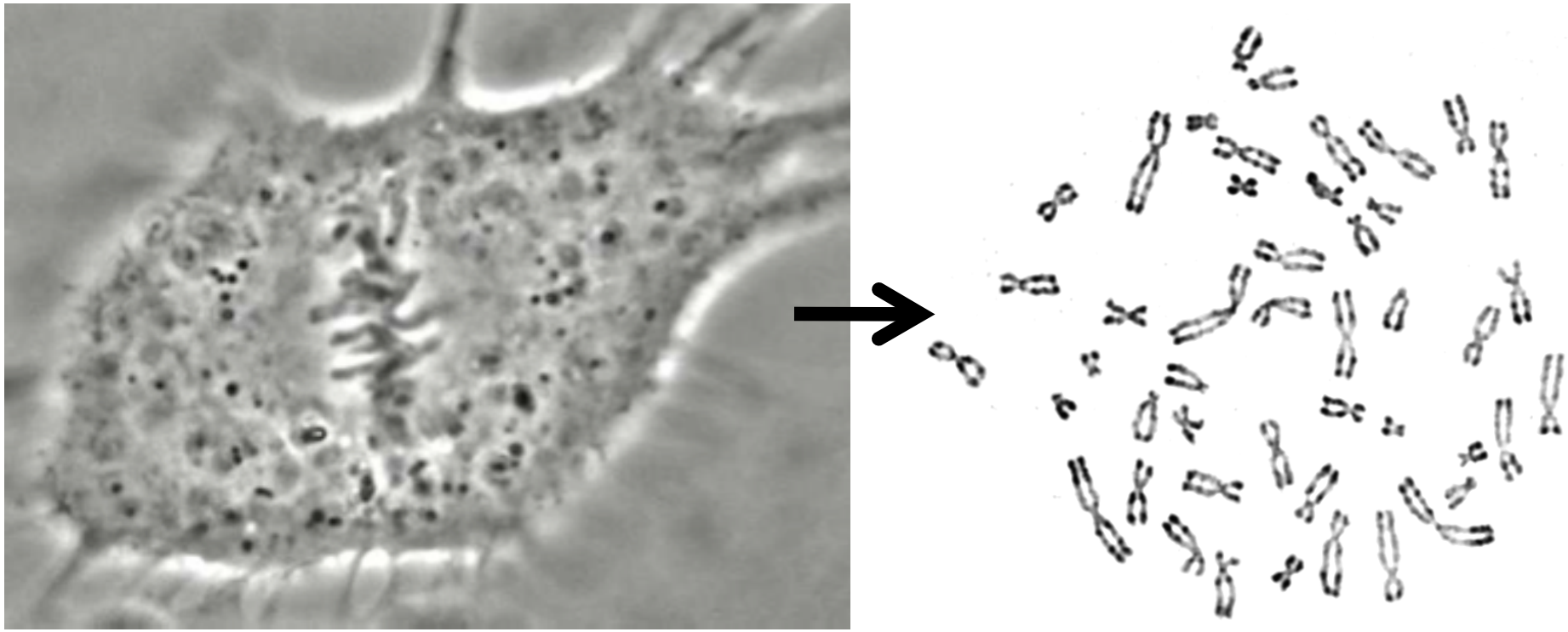
métaphase

Chromosomes visibles

Images Gorbsky laboratoire 2005

Remerciements : E. Chevret, Bordeaux

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



1. **Obtenir suffisamment de cellules en métaphases**

2. **Séparer les chromosomes assemblés sur la plaque équatoriale**

   suffisamment pour les distinguer individuellement…
   …mais sans excès pour garder l'ensemble représentatif d'une cellule groupé dans une même zone
   (si possible même champ microscopique à fort grossissement)

3. **Les reconnaître individuellement par des techniques de marquage de bandes sur les chromatides et de coloration**

1. Obtenir suffisamment de cellules en métaphases : plusieurs moyens, que l'on peut associer

Culture cellulaire

Action d'agents mitogènes : stimulation des cellules qui ne sont pas spontanément en division

Synchronisation du cycle cellulaire de l'ensemble des cellules du prélèvement

Blocage au stade métaphasique de toutes les cellules arrivant en mitose pendant une durée donnée

Obtenir suffisamment de cellules en métaphases :

Culture cellulaire

Rarement : examen « direct » **: sans incubation ou culture cellulaire, si division cellulaire spontanée très importante (exemple : cytotrophoblaste)**

Majorité des cas : culture cellulaire nécessaire

Culture cellulaire sur support
(tissus normaux ou néoplasiques)
1ers essais multiplication cellulaire in vitro :
1907, Harrisson

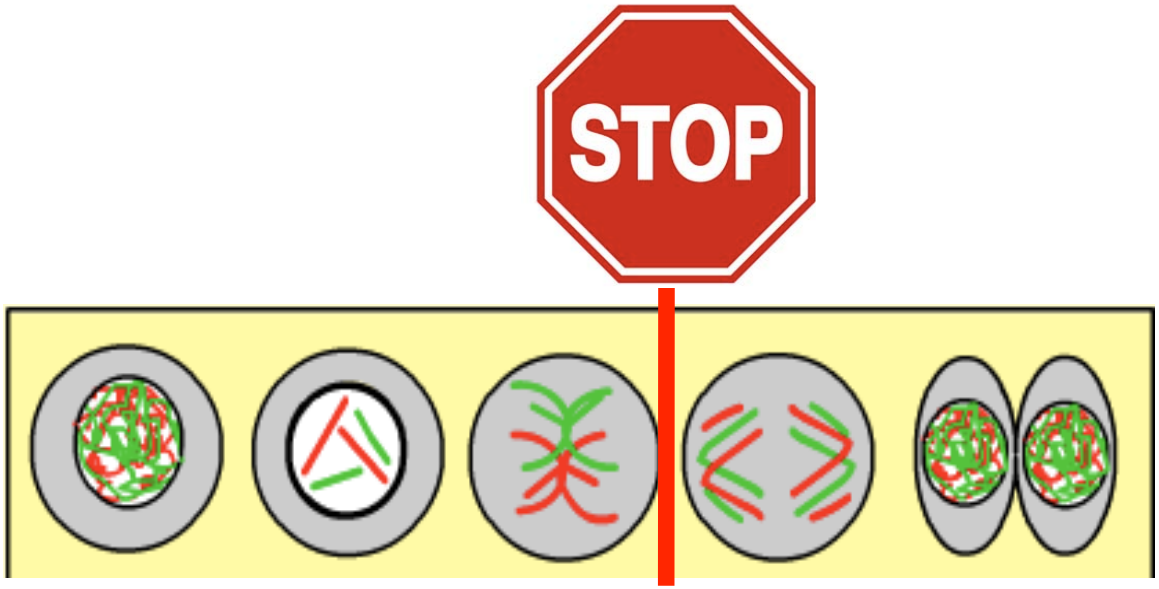
Incubation courte (quelques heures à 3 jours) de cellules en suspension (cellules médullaires, sanguines…)

Action d'agents mitogènes

Exemple : Phytohématoglutinine : lectine issue du haricot pour stimulation des lymphocytes sanguins

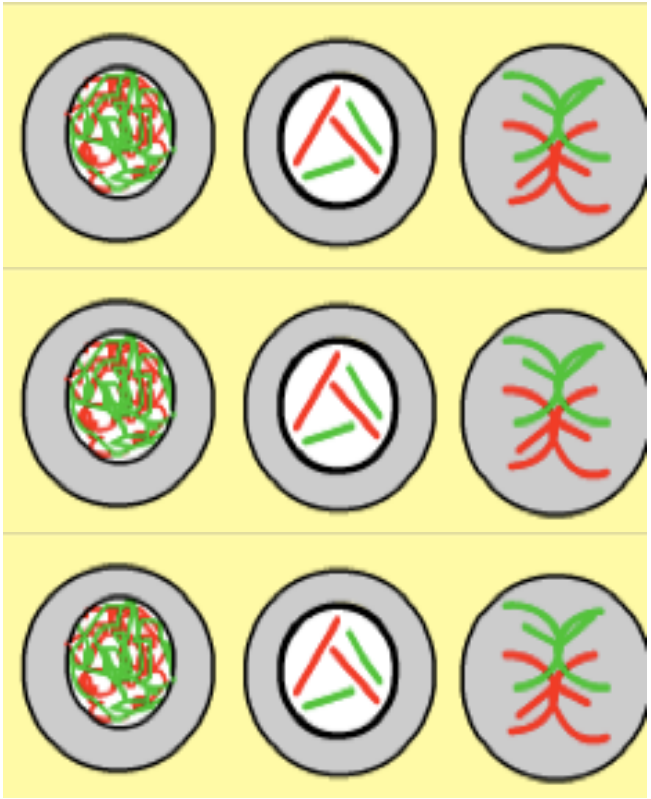
Obtenir suffisamment de cellules en métaphases

Blocage des cellules au stade métaphasique



http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Mitose/img-anim/mitose-anim.htm

Obtenir suffisamment
de cellules
en métaphases
Blocage des cellules
au stade métaphasique

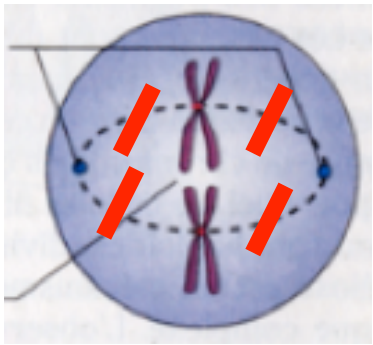


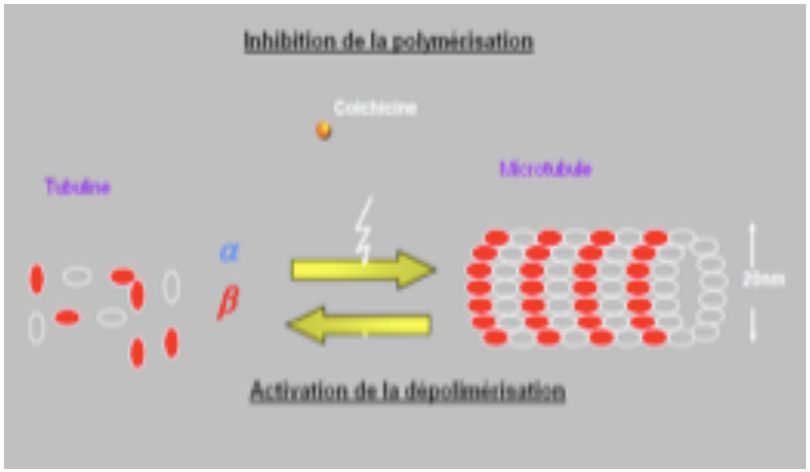


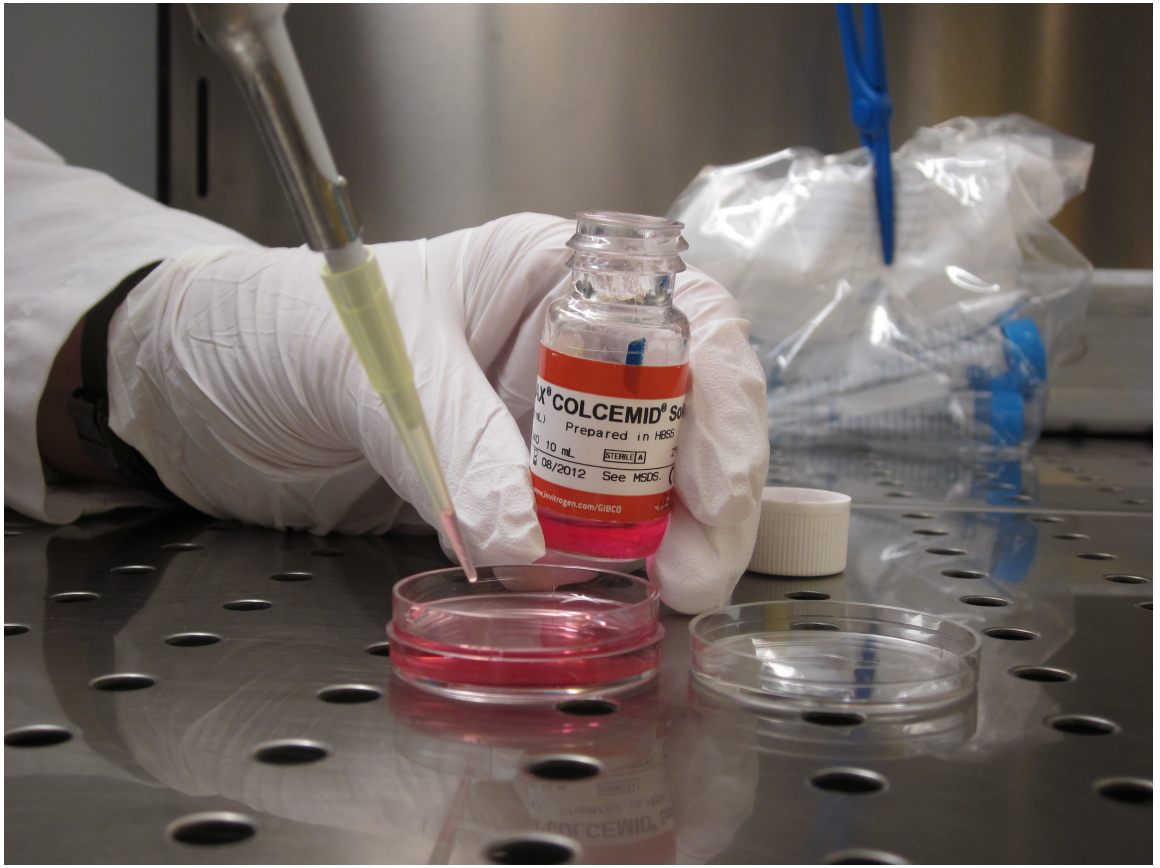
1937, Blakeslee et Avery (botanistes) :
découverte du rôle de la colchicine



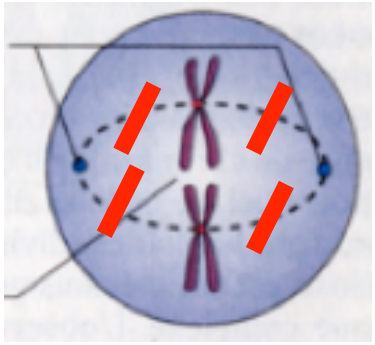








Colchicine (Colcemid)



Inhibe la polymérisation des microtubules (tubuline)
Blocage du cycle cellulaire au stade métaphasique
Ajout de colchichine (pendant une à plusieurs heures) dans la culture cellulaire :
enrichissement en cellules au stade métaphasique, d'ou obtention d'un nombre suffisant d'images métaphasiques à analyser

1. Obtenir suffisamment de cellules en métaphases

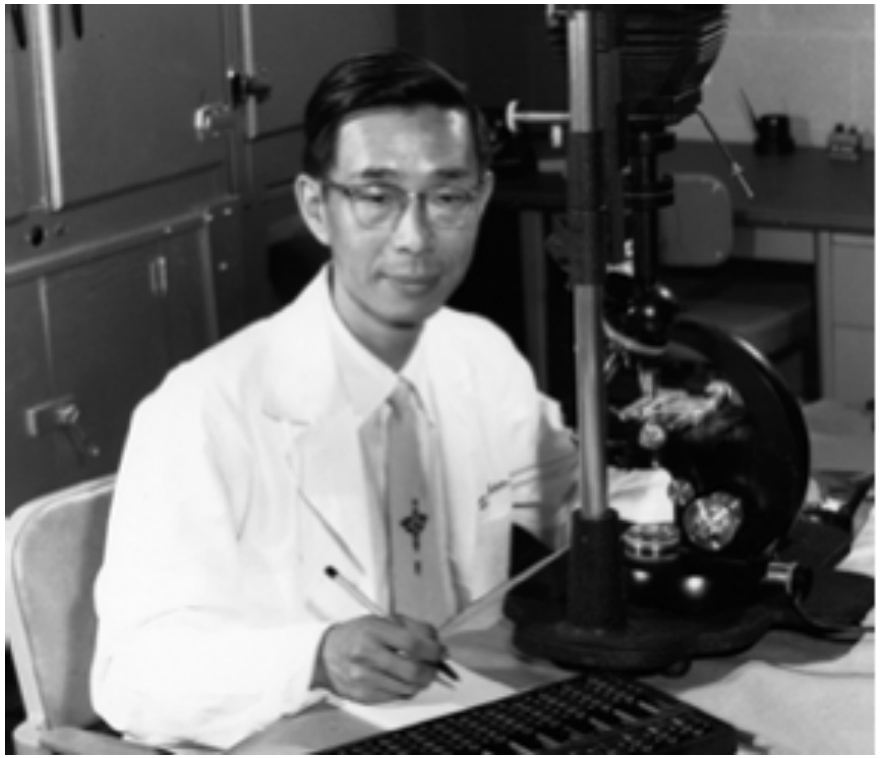
2. **Séparer les chromosomes assemblés sur la plaque équatoriale**

   suffisamment pour les distinguer individuellement…
   …mais sans excès pour garder l'ensemble représentatif d'une cellule groupé dans une même zone
   (si possible même champ microscopique à fort grossissement)

3. Les reconnaître individuellement par des techniques de marquage de bandes sur les chromatides et de coloration

Séparer les chromosomes assemblés sur la plaque équatoriale

-suffisamment pour les distinguer individuellement
-sans excès pour les garder représentatif d'une cellule



1952, Hsu : découverte du « choc » hypotonique

Action d'une solution saline hypotonique sur les cellules avant leur fixation

Cette découverte a largement contribué à la caractérisation du premier caryotype humain exact en 1956 par Tjio et Levan

Des débuts de la cytogénétique jusqu'à 1956,
le nombre de chromosomes du génome humain était estimé à 48

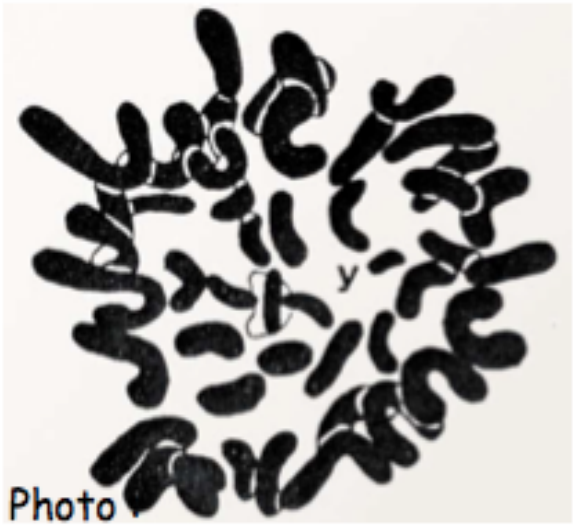


Photo
Gartier Nature Review; 2006

Dessin en chambre claire de Painter

1923

En 1956, découverte du nombre exact : 46

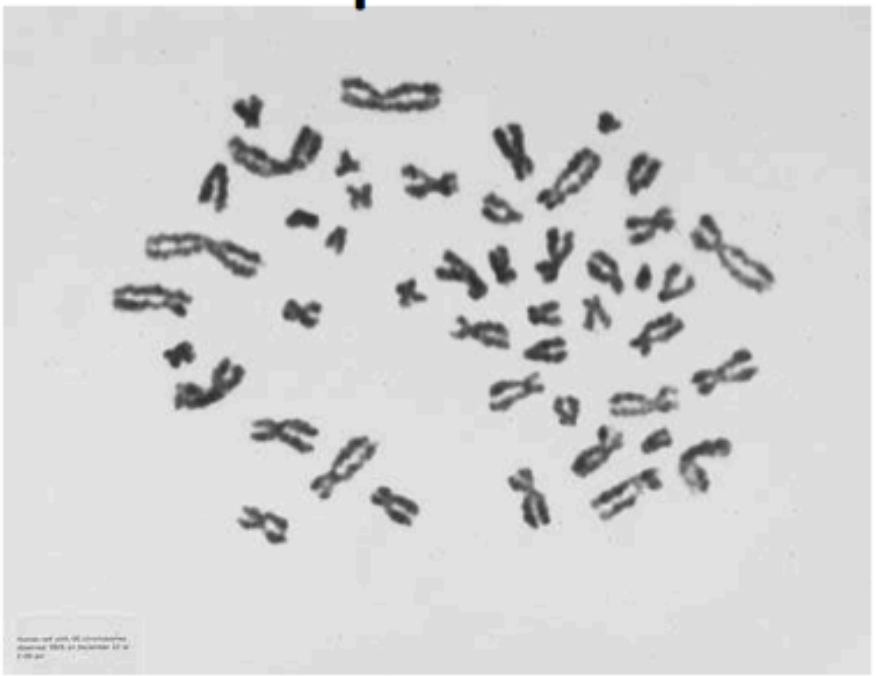


Joe-Hin Tjio



Albert Levan

1 des 265 métaphases observées et comptées



Métaphase humaine normale 46,XY

Photos : Harper Hum Genet; 2006

Remerciements : E. Chevret, université Bordeaux

Etape de « choc » hypotonique : après action de la colchicine, incubation des cellules en présence d'une solution saline hypotonique



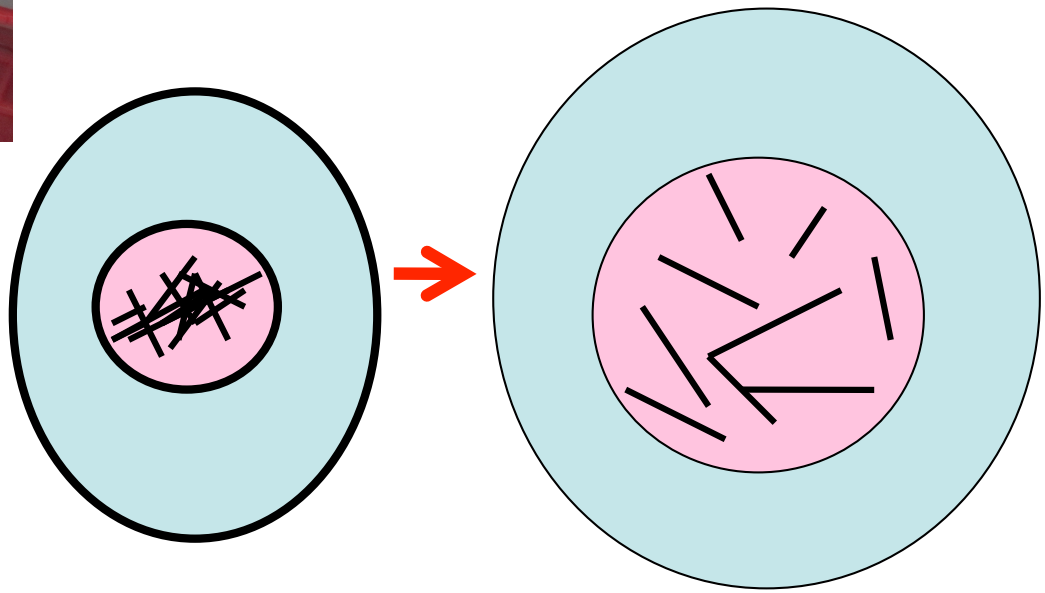
Etape de « choc » hypotonique : après action de la colchicine, incubation des cellules en présence d'une solution saline hypotonique



Etape critique

Conditions très précises de salinité et de température, de durée d'action

Les cellules se gorgent d'eau



Séparation des chromosomes
Fragilisation des membranes nucléaires et cytoplasmiques

Etape de fixation : après action de la solution hypotonique

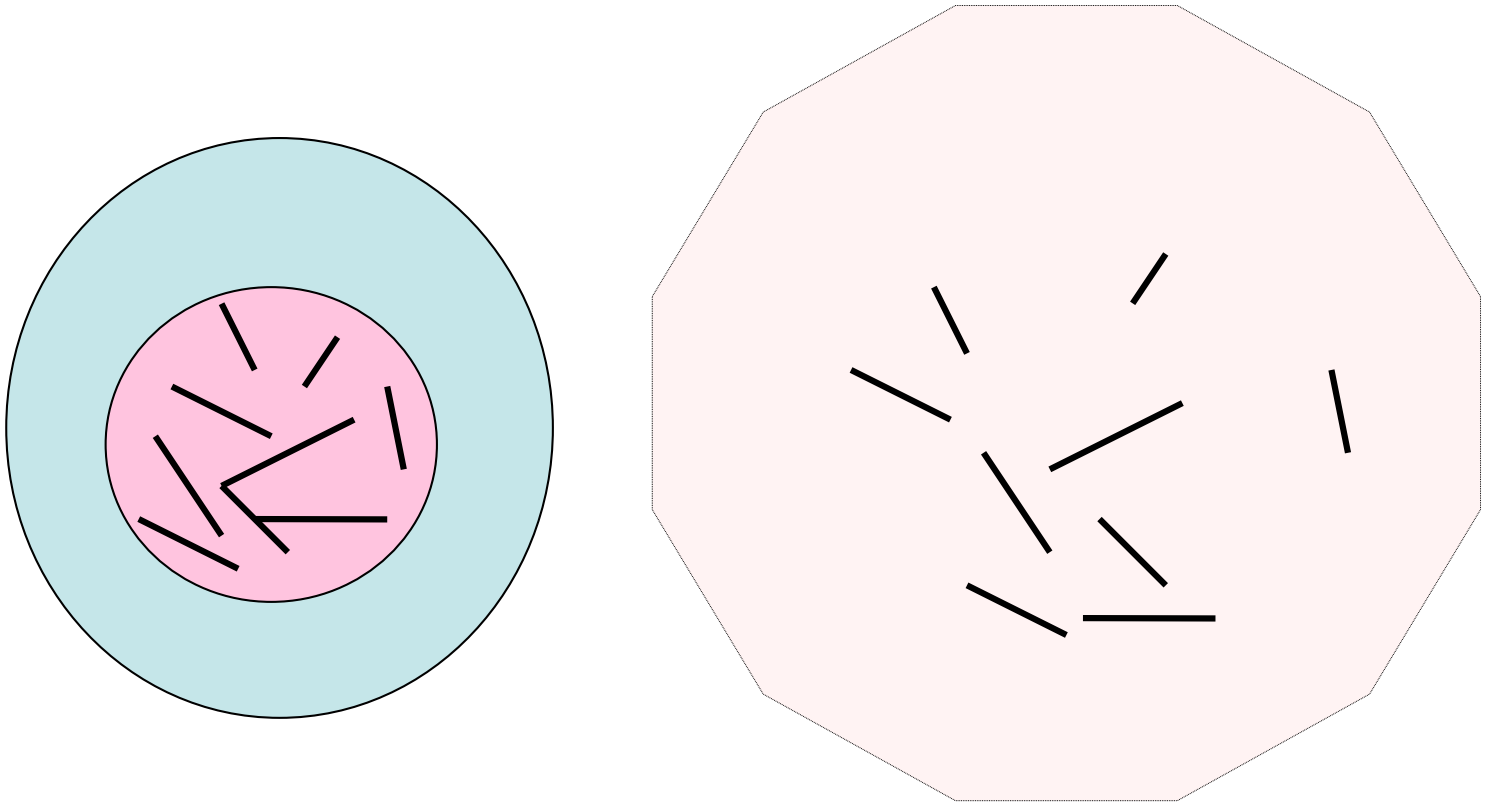


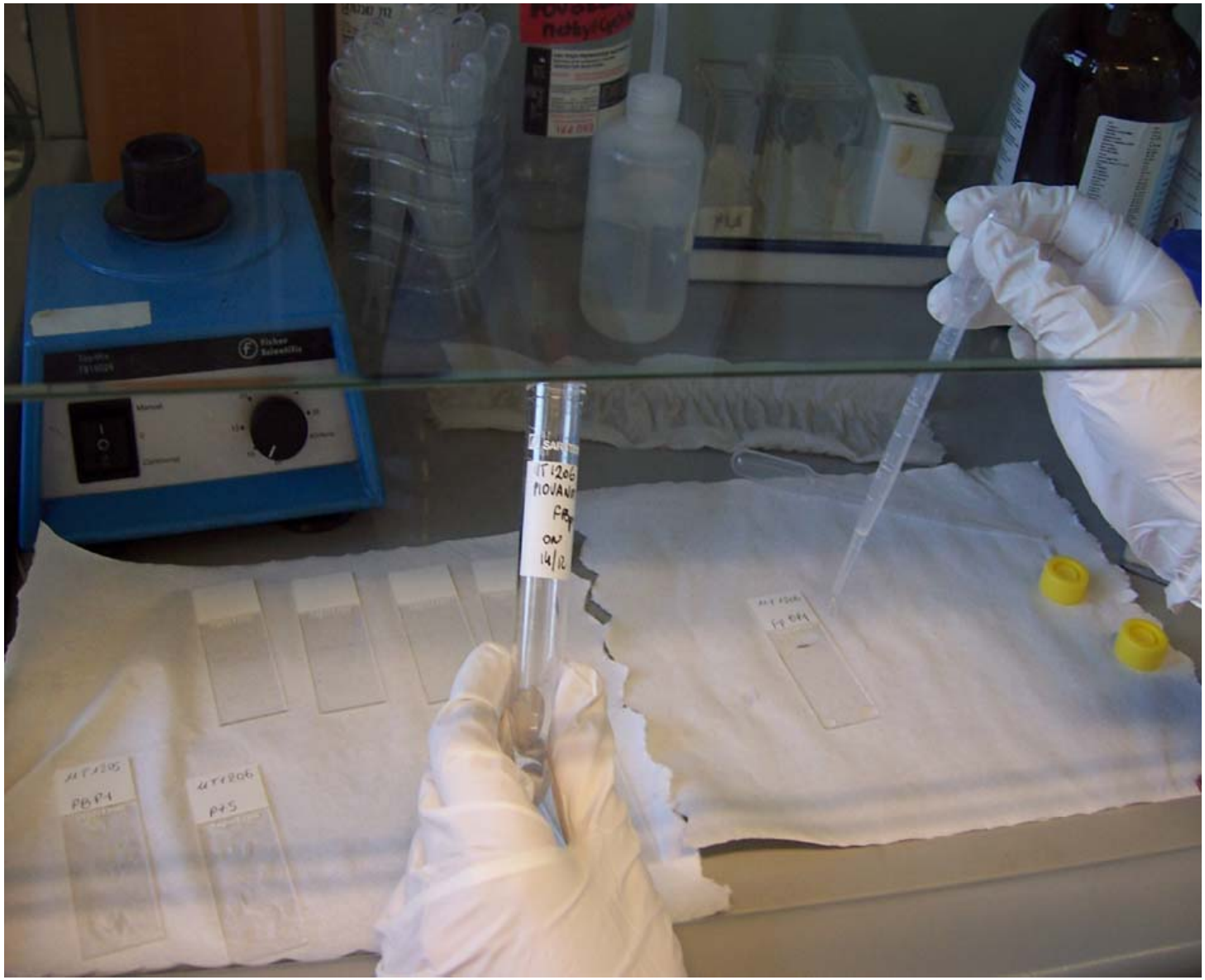
Fixateur :
3 volumes
de méthanol
pour
1 volume
acide
acétique 1N

Etape de fixation : après action de la solution hypotonique

-Complète l'action du choc hypotonique, permet l'éclatement des membranes et la dispersion ménagée des chromosomes lors de l'étalement des préparations sur des lames

-Permet la conservation à long terme des préparations





Etalement des préparations fixées sur des lames
Étape critique, sensible au degré d'hygrométrie, à la température

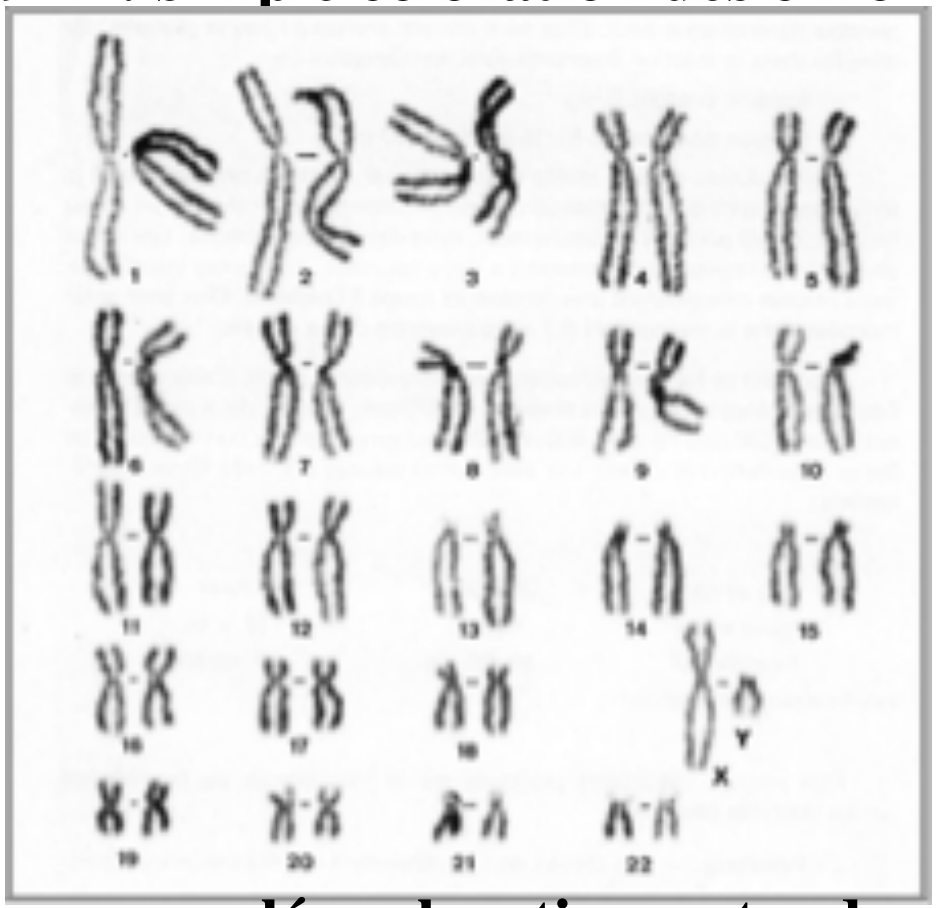
1. **Obtenir suffisamment de cellules en métaphases**

2. **Séparer les chromosomes assemblés sur la plaque équatoriale**

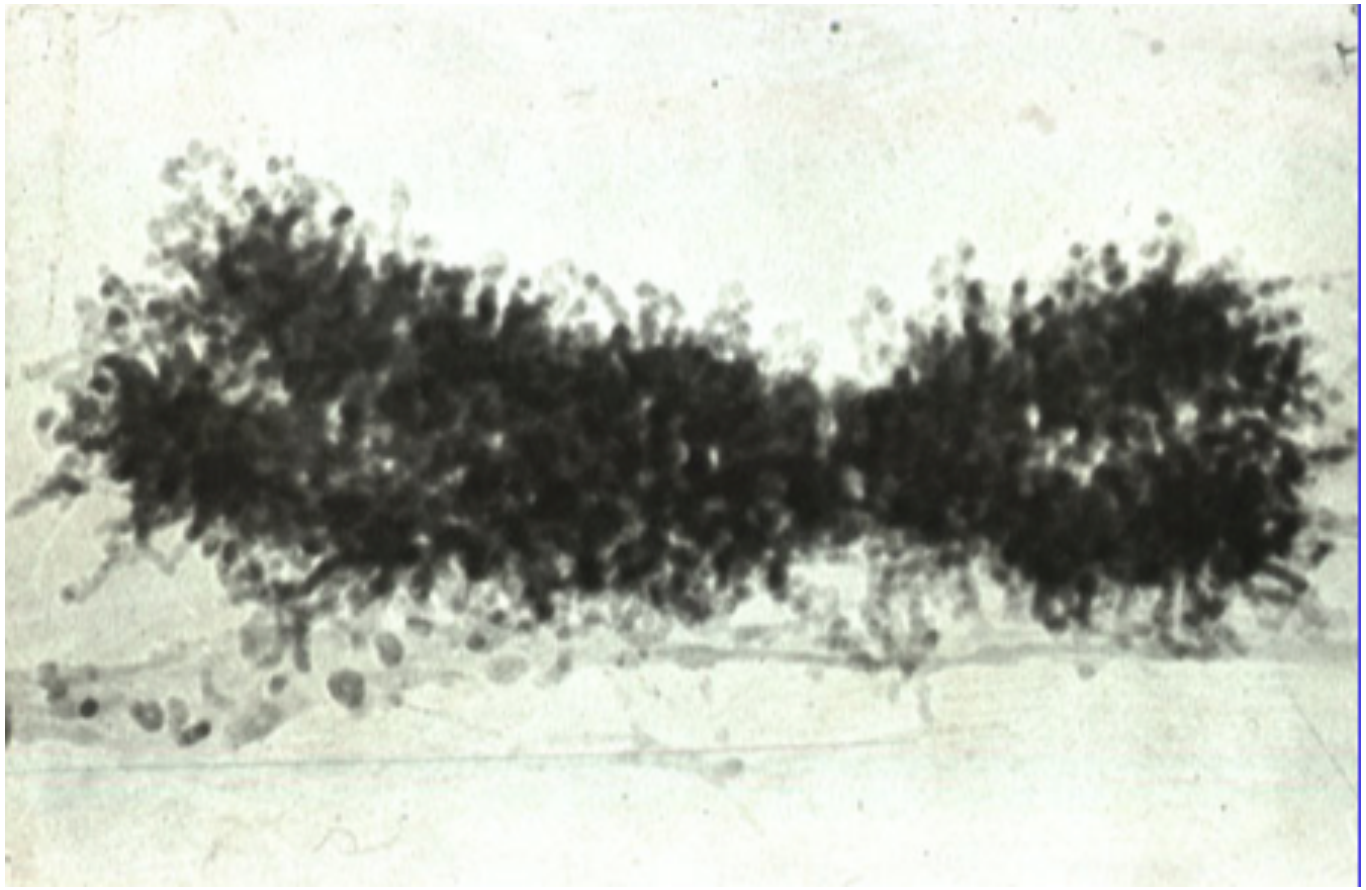
   suffisamment pour les distinguer individuellement…
   …mais sans excès pour garder l'ensemble représentatif d'une cellule groupé dans une même zone
   (si possible même champ microscopique à fort grossissement)

3. Les reconnaître individuellement par des techniques de marquage de bandes sur les chromatides et de coloration

Jusqu'à 1972 : simple coloration des chromosomes



Coloration Giemsa, appelée coloration « standard » :
permet de compter les chromosome, de les classer par taille
et selon leur « indice centromérique », mais classification grossière
(exemple : chromosomes 4 et 5, chromosomes 13, 14, 15…)
Incapacité à détecter certaines anomalies ne modifiant pas la taille
ni l'indice centromérique (ex : inversions paracentriques)



Chromosome : ensemble complexe d'ADN et d'un assemblage de protéines formant la chromatine

Bandes « G »

« Dénaturation » de la chromatine par action enzymatique de la trypsine « T »

Coloration par le colorant Giemsa

Bandes GTG
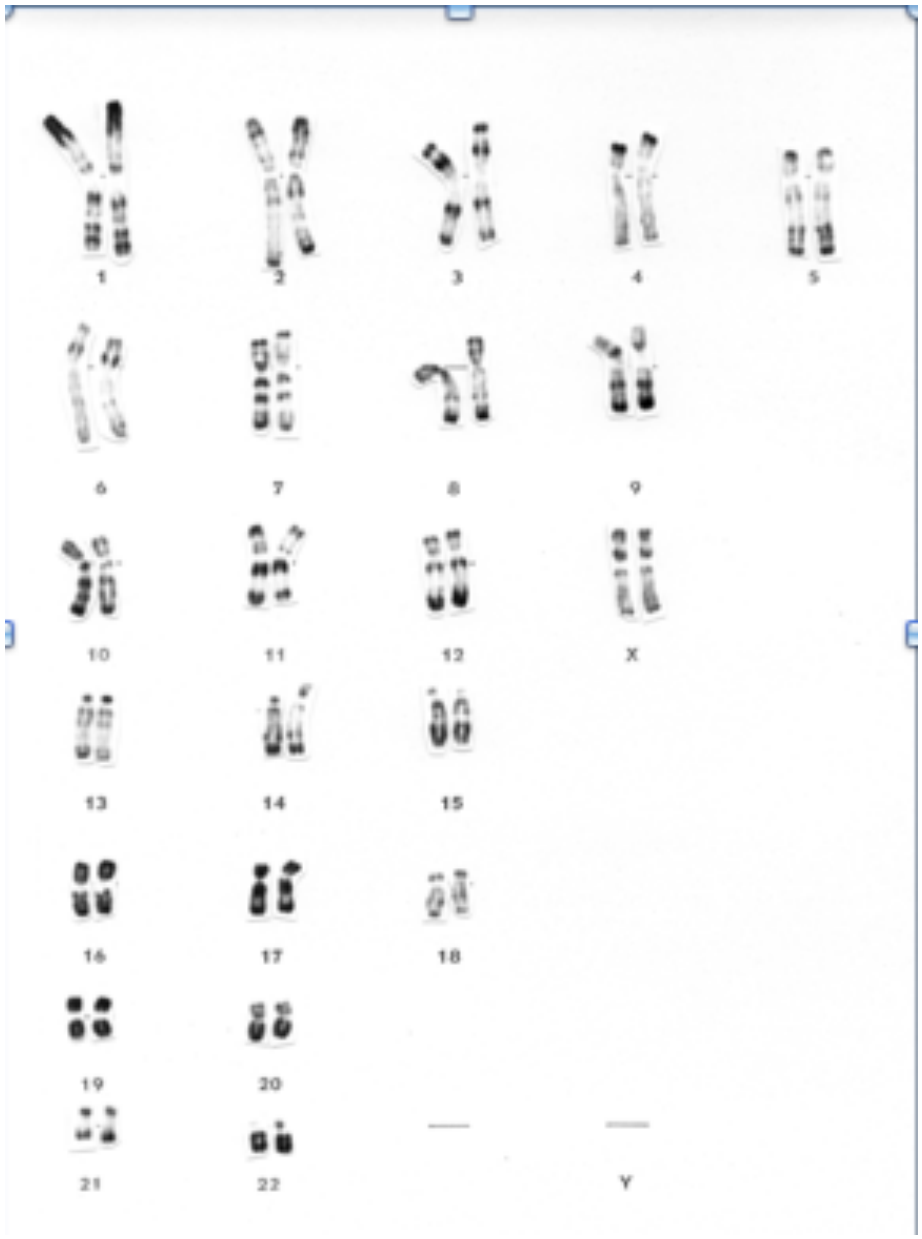


Bandes « R» = « *reverse* » des bandes G (Dutrillaux et Couturier)

« Dénaturation » de la chromatine par action thermique

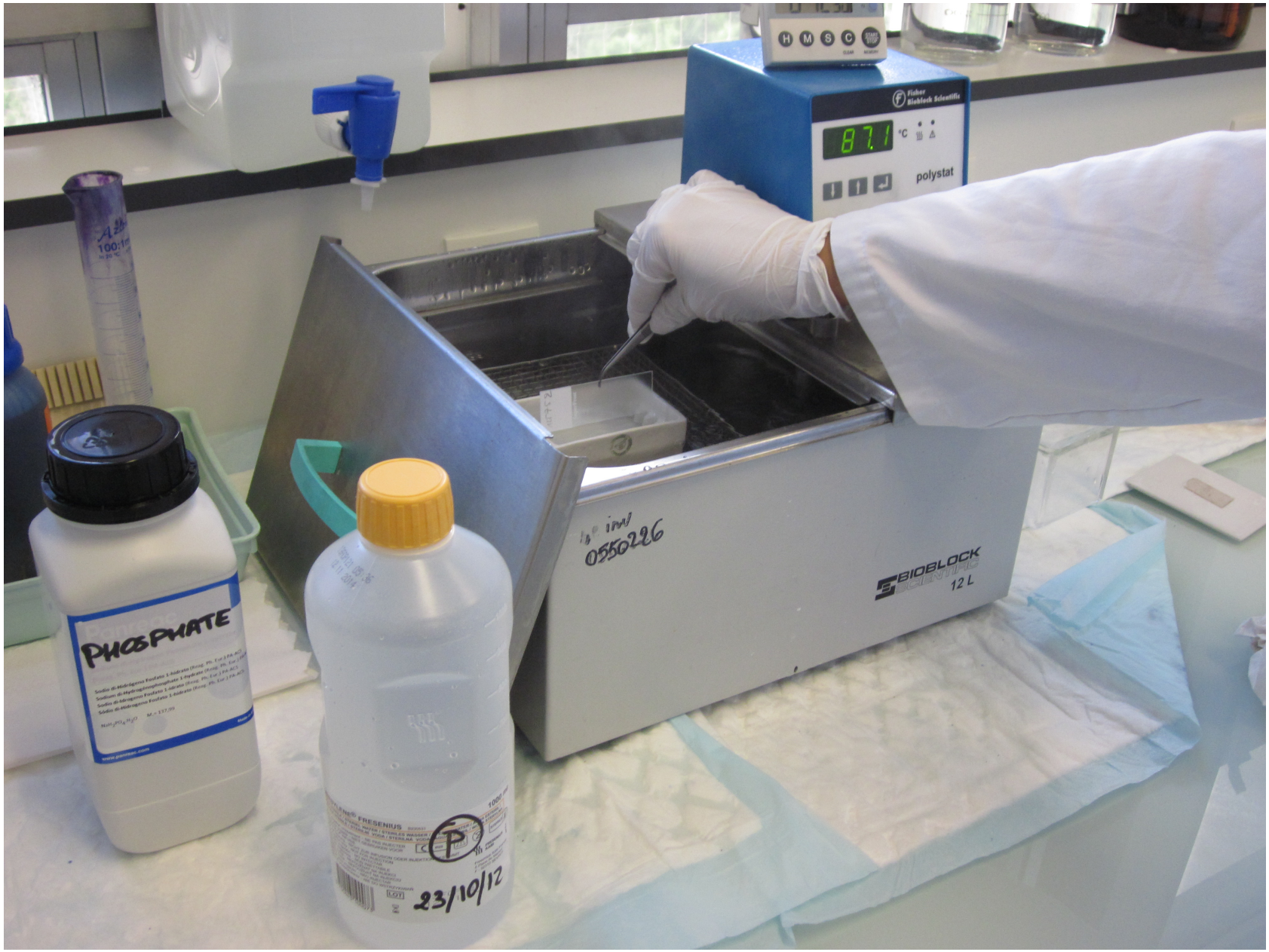
« H » (*heat*)

Coloration par le colorant Giemsa



Bandes RHG

Dénaturation thermique pour bandes R, lames chauffées à 87°C dans une solution tampon phosphate



Coloration par solution de Giemsa



Bandes G sombres

- Riches en AT
- Pauvres en gènes
- Réplication tardive
- Peu de point de cassures correspondant à des remaniements



11

Bandes G

Bandes R sombres

- Riches en GC
- Riches en gènes
- Réplication précoce
- Contient la plupart des points de cassures correspondant à des remaniements



11

Bandes R

Autres techniques d'utilisation moins fréquente, complémentaires

exemple



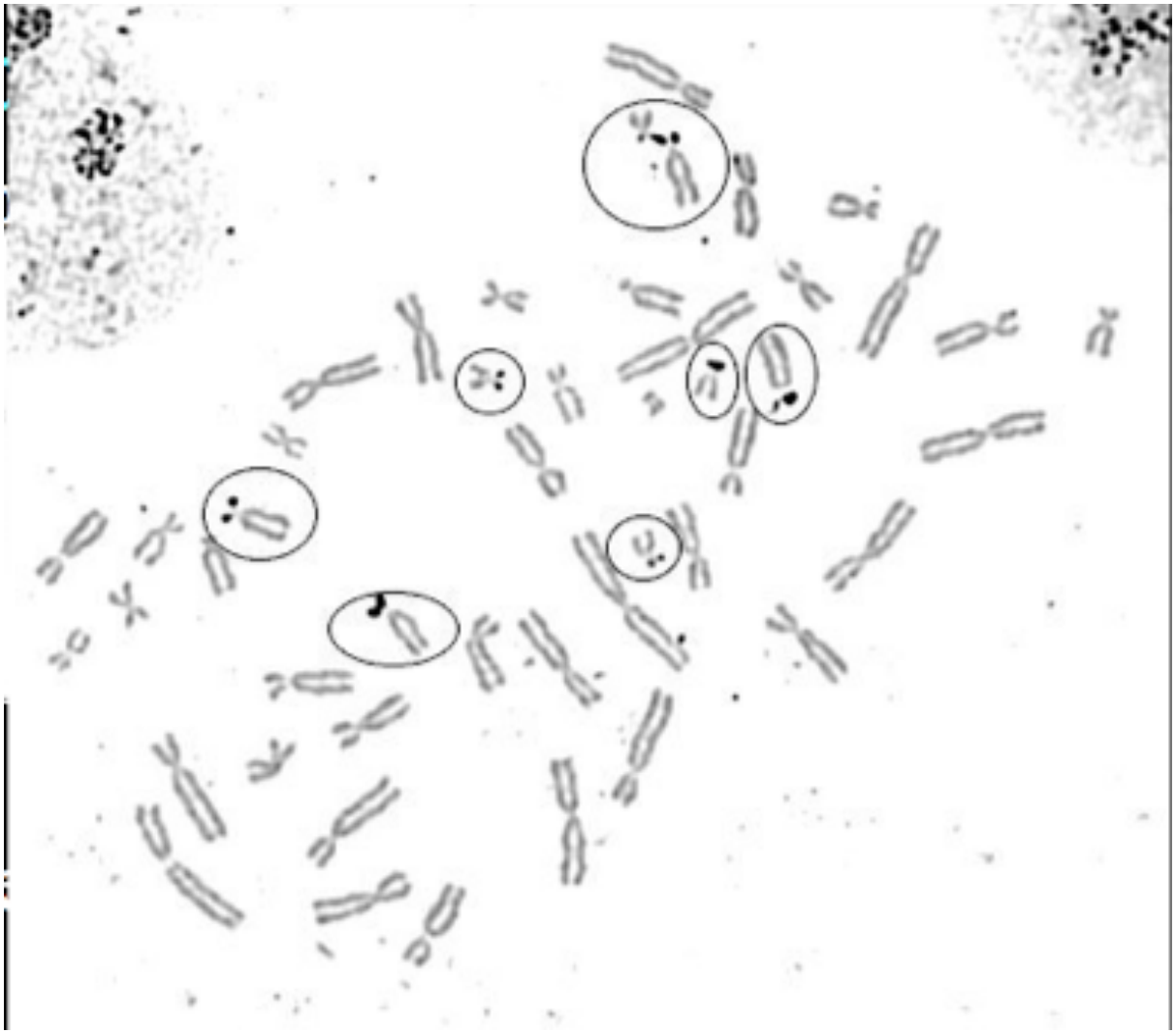
Bandes CBG
Marquage de l'hétérochromatine centromérique et péricentromérique



Autres techniques
d'utilisation moins fréquente,
complémentaires

exemple

Marquage NOR
« organisateurs
nucléolaires »



Conséquences du marquage en bandes des chromosomes

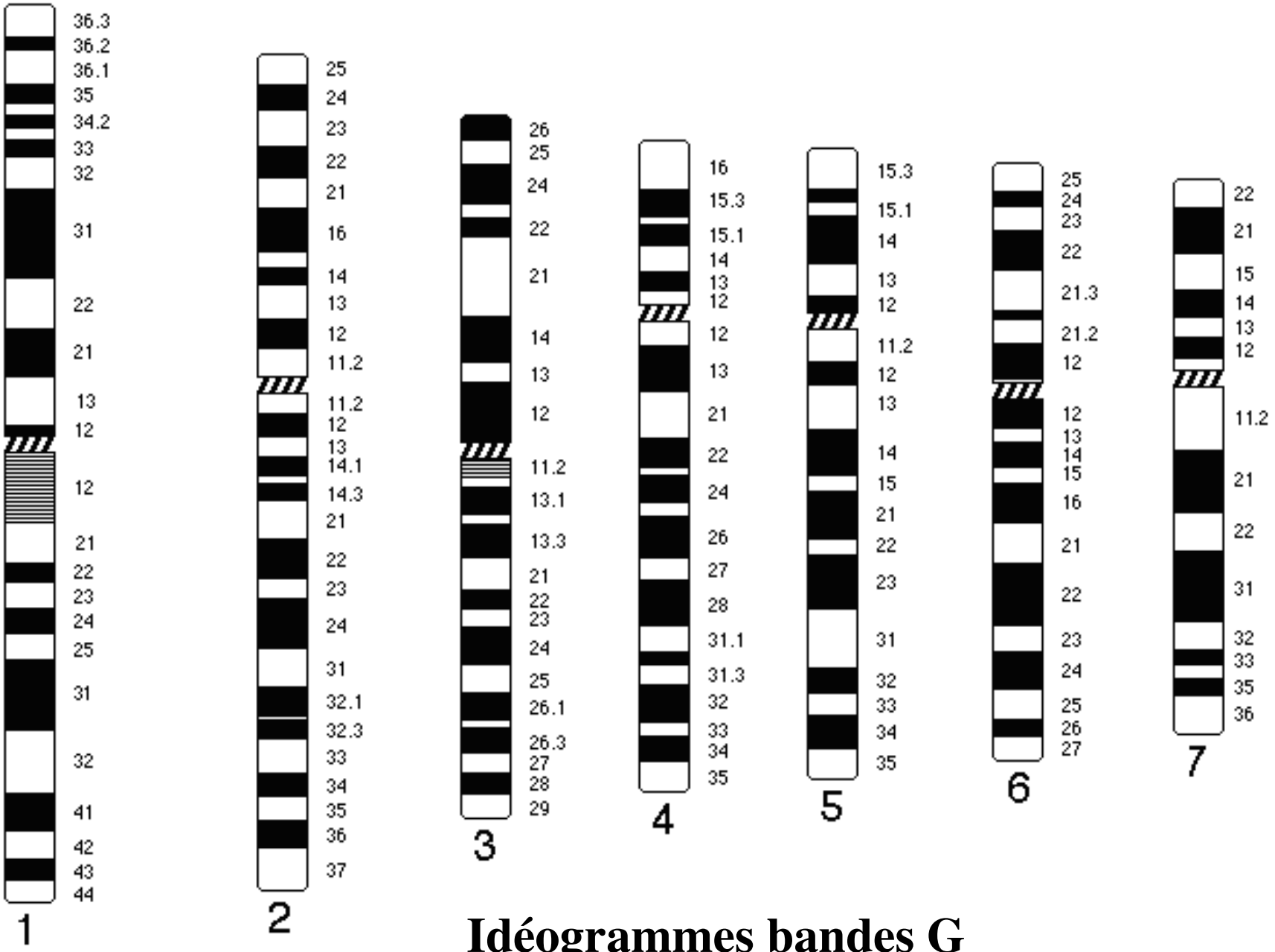
- ✓la position
- ✓la succession
- ✓la dimension
- ✓et l'intensité

de chaque bande sont caractéristiques de chaque chromatide

⇒possible de détecter des remaniements qui affectent des segments chromosomiques

⇒possible de localiser précisément des remaniements chromosomiques

⇒possible d'établir des idéogrammes et une nomenclature



Idéogrammes bandes G
(nomenclature : cf cours n°3)

GENETIQUE ET CYTOGENETIQUE TUMORALE
BREF HISTORIQUE

18ème-19ème siècle

-1775, Pott : cancers du scrotum chez les enfants ramoneurs : rôle cancérigène de la suie des cheminées

-Rome antique … puis 1866, Broca : familles avec cancers du sein sur plusieurs générations

-1890, von Hansemann : mitoses multipolaires dans les cellules cancéreuses

-1914, Boveri : modifications chromosomiques dans les cellules cancéreuses

Cancer : rôle de l'environnement, de l'hérédité, des anomalies chromosomiques somatiques

GENETIQUE ET CYTOGENETIQUE TUMORALE
BREF HISTORIQUE

Les premiers pas de la cytogénétique somatique tumorale

-1956, Levan : Premiers caryotypes tumoraux
-1959, Nowell et Hungerford : Chromosome "Philadelphie" et leucémie myéloïde chronique
-1967, Zang et Singer : perte d'un chromosome « G » dans les méningiomes
-1983, Turc-Carel/Aurias : anomalie chromosome 22 et sarcome d'Ewing

…il existe des anomalies spécifiques d'un type tumoral…

GENETIQUE ET CYTOGENETIQUE TUMORALE
BREF HISTORIQUE

-années 70-80 : Oncogènes, Gènes supresseurs de tumeurs, Nombreuses découverte d'anomalies chromosomiques spécifiques Caractérisation de gènes de prédisposition aux cancers
-années 90 : Progrès techniques : FISH, RT-PCR, CGH
-années 2000 : Puces à ADN « *micro-arrays* », transcriptome, cellules souches, micro-ARN, méthylome, séquençage haut débit
-2008 : AMM cibles thérapeutiques moléculaires

Evolution constante de la cytogénétique tumorale :
adaptation de ses indications et de son utilisation
en fonction des nouvelles méthodes moléculaires

RAPPELS/DEFINITIONS

Tumeurs solides

/

Tumeurs « liquides » hématologiques

RAPPELS/DEFINITIONS

Tumeurs solides malignes

/

Tumeurs solides bénignes

Tumeur bénigne	Tumeur maligne
Bien limitée Encapsulée	Mal limitée Non Encapsulée
Semblable au tissu d'origine (différencié) Pas de destruction des tissus voisins Cellules régulières Vaisseaux normaux	+/- semblable au tissu d'origine Envahissement des tissus voisins Cellules atypiques Vaisseaux anormaux
Croissance lente Pas de récidive locale Pas de métastase	Croissance rapide Récidive possible Métastase possible

RAPPELS/DEFINITIONS

*Principaux types de tumeurs solides malignes

*Tumeurs épithéliales : carcinomes
(epithelium glandulaire : adénocarcinome)
les 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, des tissus nerveux

*Tumeurs placentaires et embryonnaires

*Tumeurs des séreuses

CANCER : MALADIE DE LA CELLULE

Cause : dérégulation du programme génétique cellulaire

↓

PATHOLOGIE DE L'ADN

Conséquence : prolifération incontrôlée de cellules anormales avec envahissement local ou à distance

TUMEURS ET ANOMALIES CHROMOSOMIQUES ACQUISES

La majorité des cancers sont sporadiques (non héréditaires, somatiques)

Cause : altérations de l'ADN d'une cellule somatique sous l'influence de différents facteurs (radiations, virus, tabac, UV, amiante, mutagènes chimiques…)

Propagation de ces anomalies acquises de l'ADN aux cellules filles lors de la division cellulaire puis apparition d'autres anomalies

Conséquences : dérégulation cellulaire, prolifération +++ , Formation d'une tumeur

Tumeurs malignes : perte de différenciation, invasion tumorale métastatique

↓

Etude des anomalies génétiques ACQUISES ou SOMATIQUES

Analyse « GENOMIQUE » des cellules tumorales :

ADN, ARN (biologie moléculaire) ou chromosomes (cytogénétique tumorale)

FACTEURS GENETIQUES DE PREDISPOSITION

Moins de 10% des cancers sont héréditaires :

***Cause : présence d'une altération de l'ADN (en général une mutation) dans toutes les cellules d'un individu**

***Altération souvent héritée d'un des parents,**

(ou : constitutionnelle de novo)

et transmissible à la descendance

*** Conséquences : la présence de cette anomalie initiale favorise l'apparition dans une ou plusieurs cellules somatiques d'autres anomalies du génome et la formation de cancers : facteur de prédisposition au cancer**

Anomalie initiale : GERMINALE ou CONSTITUTIONNELLE

Recherche du facteur de prédisposition :

analyse ONCOGENETIQUE :

enquête génétique familiale (consultation oncogénétique, arbre généalogique) et recherche de mutation ADN et plus rarement d'anomalie chromosomique à partir d'un prélèvement sanguin

APPORT DE LA GENETIQUE/GENOMIQUE EN PATHOLOGIE TUMORALE

Anomalies somatiques acquises

Prélèvement tumoral

Cytogénétique

Cytogénétique moléculaire (FISH; CGH-array)

Biologie moléculaire (ADN, ARN)

Pathologie moléculaire

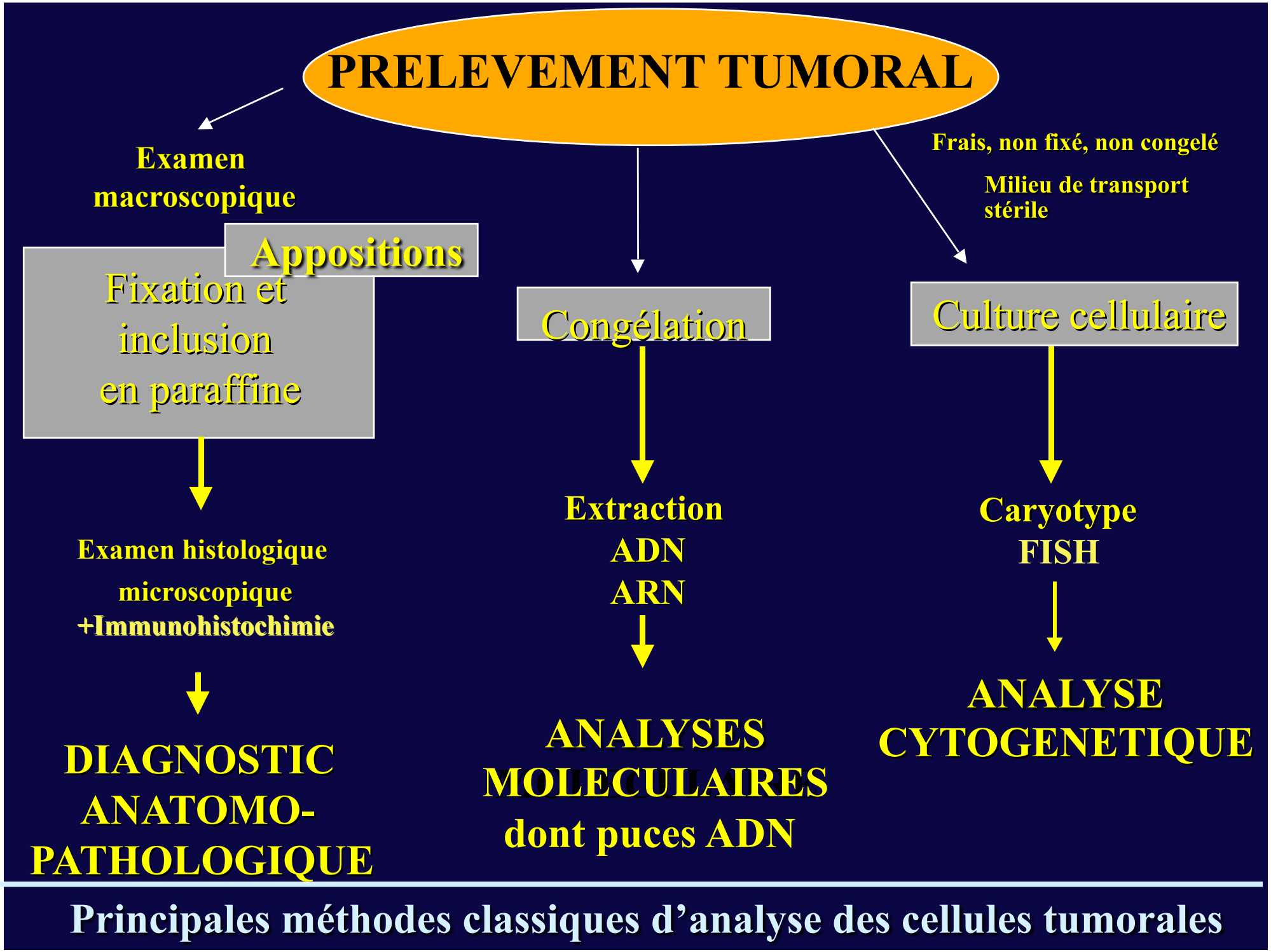
Facteurs de prédisposition

Prélèvement sanguin

(parfois : autre)

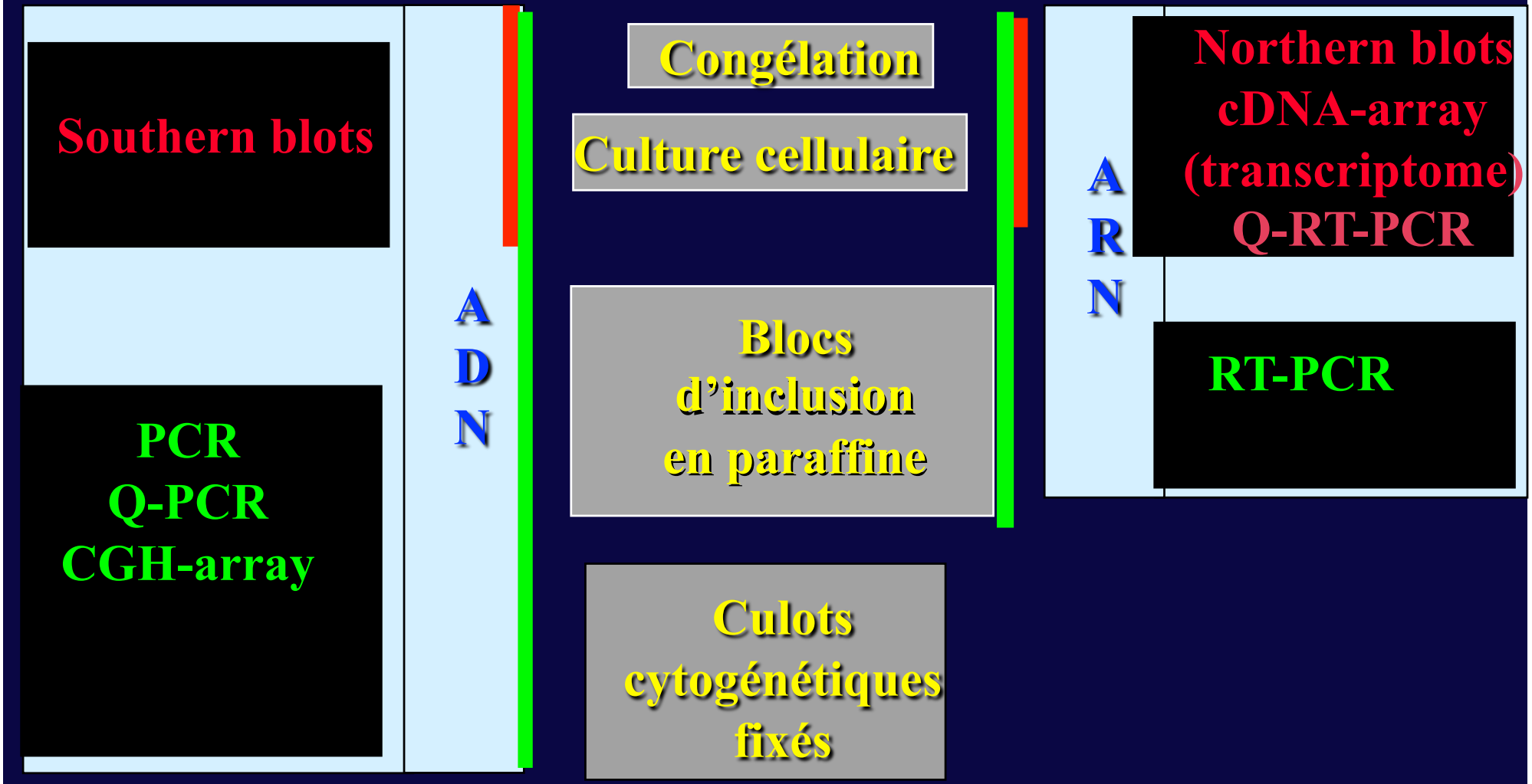
Biologie moléculaire (extraction ADN, recherche mutation)

Rarement : Cytogénétique Ou cytogénétique moléculaire

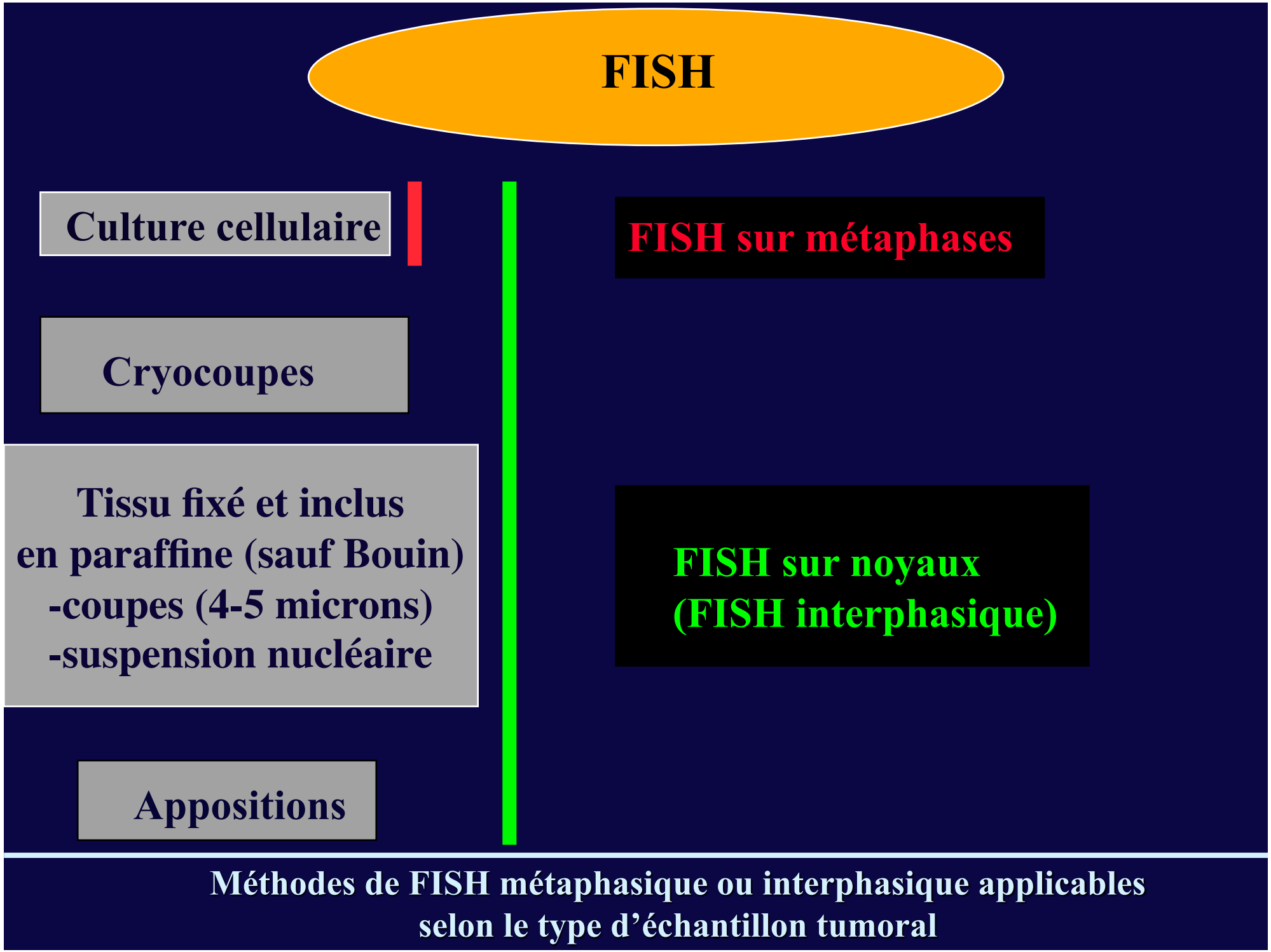


Principales méthodes classiques d'analyse des cellules tumorales

ANALYSES MOLECULAIRES



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



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

ANALYSE DU GENOME TUMORAL

Méthodes d'analyse globales

Panorama général du génome

*Caryotype : cytogénétique conventionnelle souvent complétée par FISH

*Hybridation génomique comparative « CGH »

-conventionnelle (obsolète)

-sur biopuces (« *arrays* »)(peut être très sensible)

Méthodes d'analyse ciblées

Apportent des informations précises, mais uniquement sur la question posée

FISH : cytogénétique moléculaire

(Southern et northern « blots » : peu utilisés en routine actuellement)

PCR et méthodes dérivées, séquençage

ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES

Obtention d'un caryotype tumoral

Caryotype tumoral : méthode d'analyse globale

+ : panorama général du génome

+ : détection d'anomalies équilibrées et non équilibrées

-: difficultés de réalisation

- : faible sensibilité

Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosomes aberrations in cancer

Mitelman F, Johansson B, and Mertens F, Nature Genetics, 36: 331-334, 2004

	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

DIFFICULTES

DE

L'ANALYSE

CYTOGENETIQUE

DES TUMEURS SOLIDES

DIFFICULTES DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES

I. Contraintes techniques de recueil et transport du prélèvement
II. Difficultés de culture cellulaire *in vitro*
III. Difficultés d'interprétation du caryotype

Rappels et comparaisons :

*réalisation d'un caryotype sanguin constitutionnel

*Prélèvement sanguin
*Incubation courte (24 à 96 h) ; protocoles standardisés
*Obtention rapide d'un grand nombre de cellules en métaphase
*Résolution chromosomique de qualité
*Si anomalies chromosomiques :
anomalies simples (= perte ou gain d'un seul chromosome; remaniements structuraux impliquant très rarement plus de deux chromosomes).

*réalisation d'un caryotype médullaire (ex : leucémie)

*Prélèvement de moelle
*Incubation courte (jusqu'à 96 h) ; protocoles standardisés
*Nombre de cellules en métaphase souvent suffisant pour analyse

DIFFICULTES DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES

I. Contraintes techniques de recueil et transport du prélèvement

II. Difficultés de culture cellulaire *in vitro*

III. Difficultés d'interprétation du caryotype

TUMEURS ET ANOMALIES CHROMOSOMIQUES ACQUISES

DEUX CONDITIONS INDISPENSABLES POUR L'ANALYSE CYTOGENETIQUE (OBTENTION D'UN CARYOTYPE)

***Cellules vivantes :**

Caryotype : obtenu à partir de cellules au stade de métaphase (une des phases l'étape de mitose du cycle cellulaire)

Nécessité de cellules vivantes, en prolifération spontanée ou après culture cellulaire

***Prélèvement stérile : éviter la prolifération bactérienne ou fongique qui inhibe la prolifération cellulaire**

CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES : DIFFICULTES

I. Contraintes techniques de recueil et transport d'une tumeur solide pour analyse cytogénétique

*Prélèvement recueilli au bloc opératoire

Aussitôt après l'exérèse, en conditions aseptiques

Non fixé, non congelé

Déposé dans un tube stérile contenant un milieu de transport adapté (ex: RPMI)

→ *Organiser le recueil à l'avance*

*Taille suffisante du prélèvement

*Prélèvement acheminé rapidement au laboratoire à température ambiante

→ *Organisation et coût du transport*

Eviter absolument la contamination bactérienne ou fongique

La culture cellulaire s'effectue dans un incubateur à 37°C en milieu de culture riche, propice au développement bactérien

La contamination bactérienne ou fongique du prélèvement empêche la prolifération cellulaire (échec du caryotype) et risque d'entraîner la contamination d'autres prélèvements dans l'incubateur

→ **Précautions drastiques**

Précautions lors du recueil et partage du prélèvement :

*Matériel stérile à usage unique
*Prélèvement au bloc opératoire ou dans salle de prélèvement en conditions aseptiques
*Prélèvement immédiatement déposé dans le flacon de recueil avec milieu de transport stérile
*Utilisation de bistouri ou pinces stériles pour partage du prélèvement

Précautions au laboratoire de cytogénétique :

Toutes les manipulations sous hotte à flux laminaire en salle de culture, avec matériel de culture stérile.

DIFFICULTES DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES

I. Contraintes techniques de recueil et transport du prélèvement

II. Difficultés de culture cellulaire *in vitro*

III. Difficultés d'interprétation du caryotype

II. Causes des difficultés de culture cellulaire

Petite taille du prélèvement (biopsies, tumeurs adipeuses de taille trompeuse car faible cellularité)

Présence de cellules nécrosées, de caillots sanguins

Absence de prolifération ou prolifération très lente *in vitro* (*in vivo* : rôle des facteurs de croissance, de la vascularisation, du stroma péri-tumoral…)

Croissance prédominante *in vitro* des fibroblastes du stroma : obtention d'un caryotype normal non représentatif des cellules tumorales

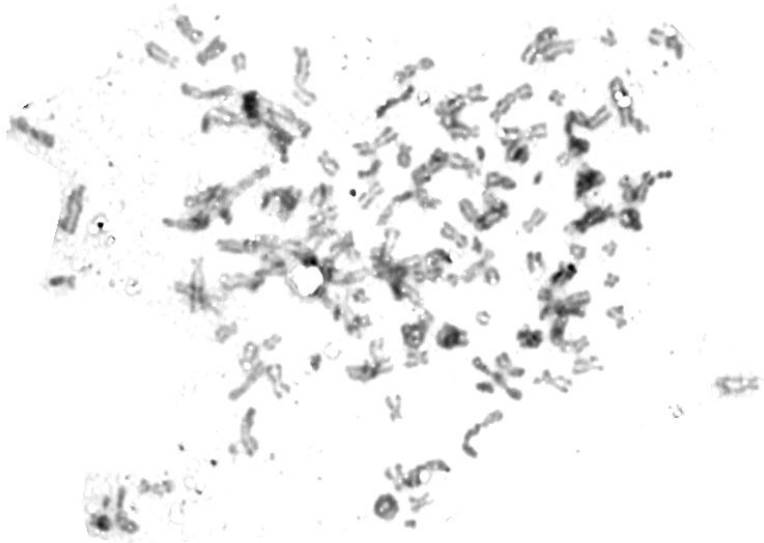
DIFFICULTES DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES

I. Contraintes techniques de recueil et transport du prélèvement
II. Difficultés de culture cellulaire *in vitro*
III. Difficultés d'interprétation du caryotype

III. Difficultés d'interprétation des caryotypes

1) Mauvaise morphologie chromosomique

exemple1

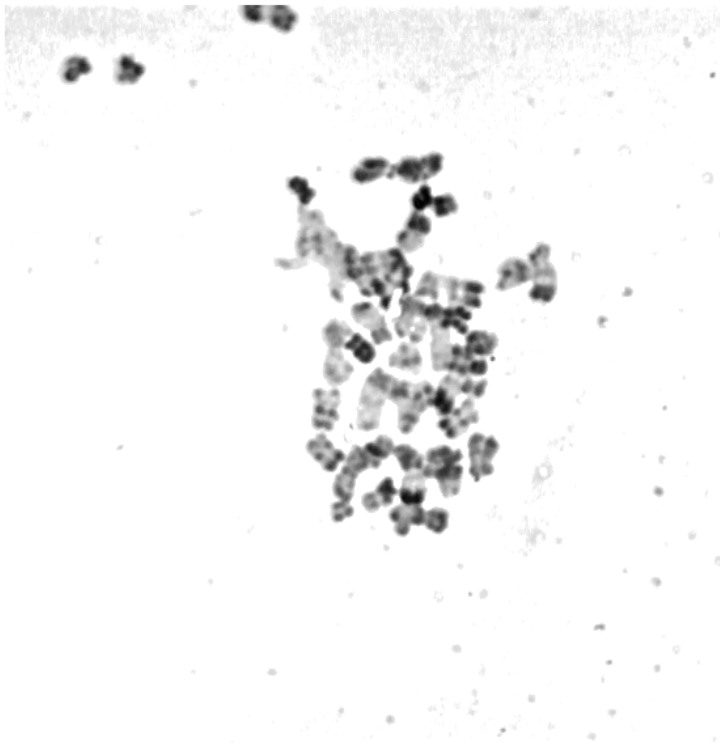


exemple 2



III. Difficultés d'interprétation des caryotypes

1) Mauvaise morphologie chromosomique



Exemple 3

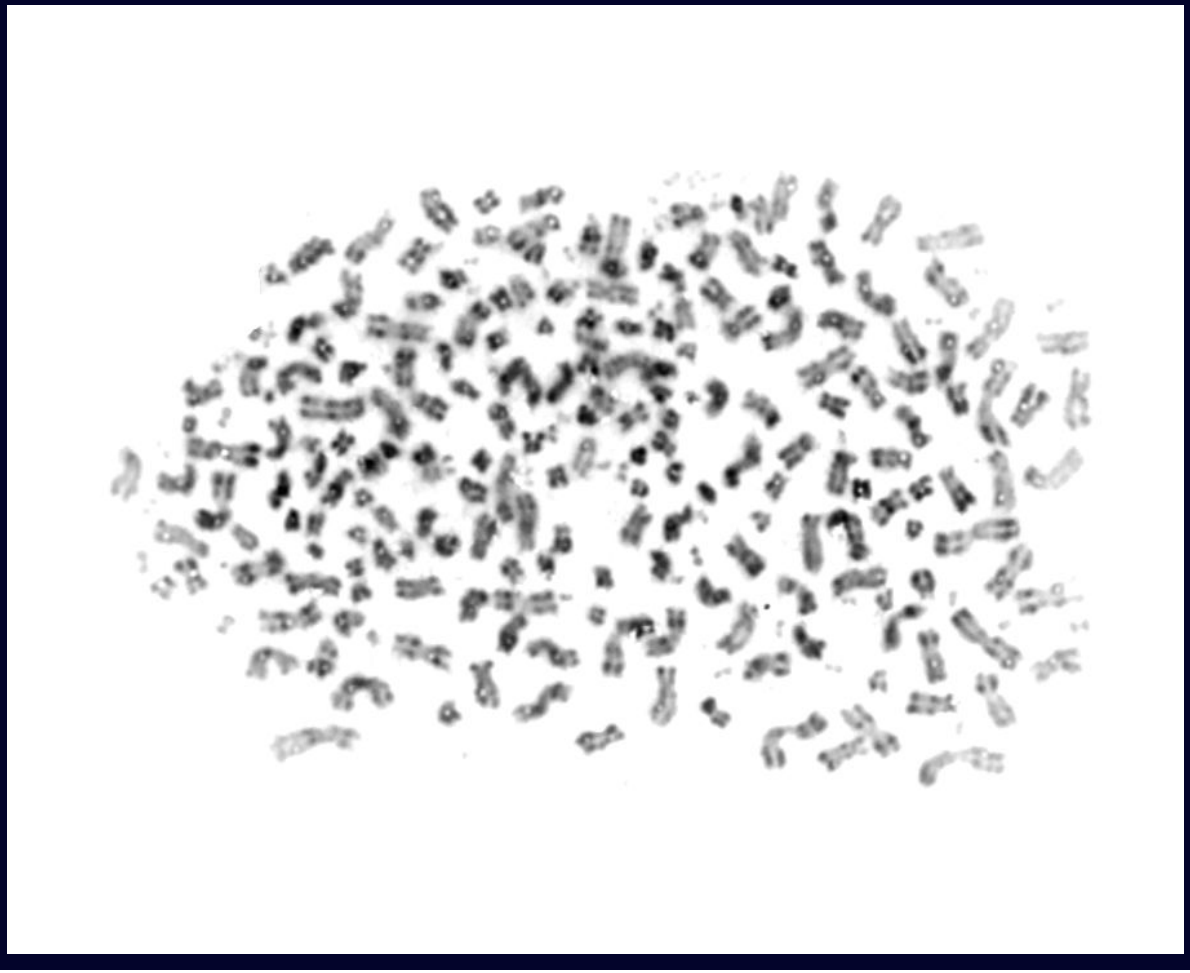


Exemple 4

III. Difficultés d'interprétation des caryotypes

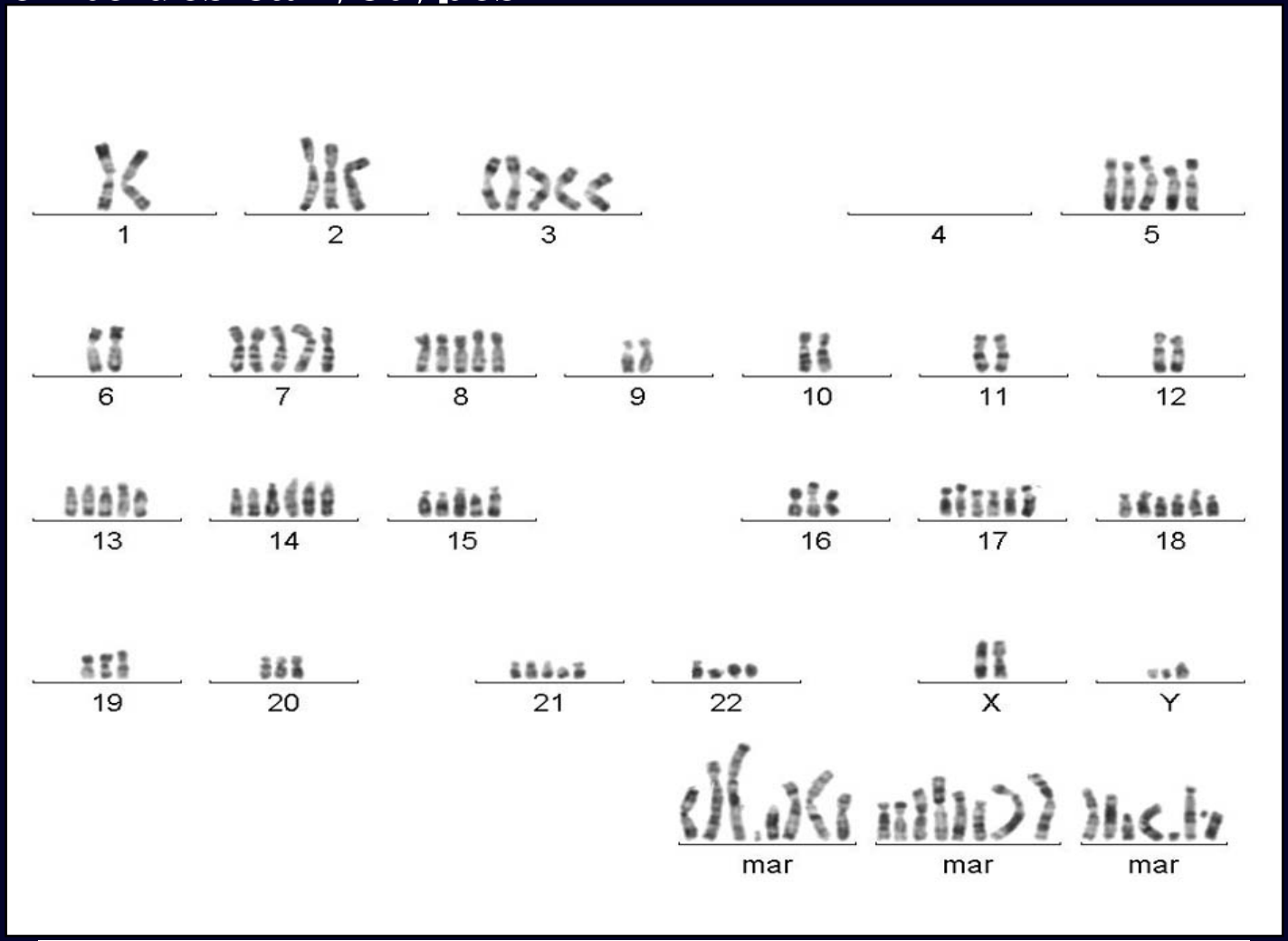
2) Complexité des caryotypes

Multiples anomalies numériques et structurales, polyploïdie, instabilité, polyclonalité



III. Difficultés d'interprétation des caryotypes

2) Complexité des caryotypes



Génome complexe dans un ostéosarcome

Présence de chromosomes « marqueurs » non identifiables