F. Pedeutour

22 novembre 2012, suite du cours d'introduction du 15 novembre 2012

AMELIORATION DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE DES TUMEURS SOLIDES

I. Adaptation des techniques de culture cellulaire aux tumeurs solides

II. Méthodes complémentaires d'analyse du génome (cours n°3 et n°4) :

Hybridation in situ en fluorescence (FISH) : cours n°3

Hybridation génomique comparative (CGH) : cours n°4

I. Adaptation des techniques de culture cellulaire aux cellules de tumeurs solides

- Milieux de culture cellulaire appropriés (hormones, sels minéraux, protéines, vitamines…)
- Adaptation du type de mise en culture aux différents types de cellules tumorales
  - *Culture en suspension ou par sédimentation et adhésion au support (verre/plastique)
  - *Incubation courte (24/48h) ou culture de plusieurs jours…
- Utilisation de la collagénase pour dissociation cellulaire rapide et efficace (Limon et al., 1986)
- Arrêt rapide de la culture pour éviter « l'invasion » par les fibroblastes : utilisation de petites chambres de culture

Trouver un équilibre entre prolifération suffisante des cellules tumorales et prolifération minimale des fibroblastes

Deux types principaux de culture :

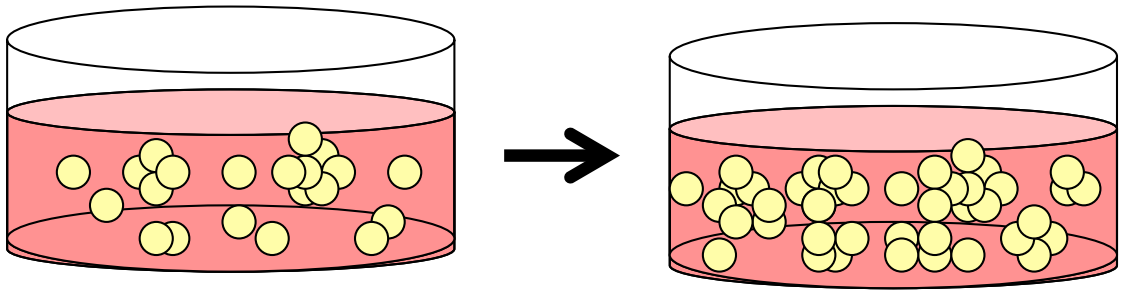
Culture de suspension cellulaire (lymphocytes, moelle osseuse, certains types de tumeurs solides comme les tumeurs à petites cellules rondes, neuroblastomes, PNET …)

Culture sur support : adhésion des cellules sur la paroi du flacon ou de la boîte de culture

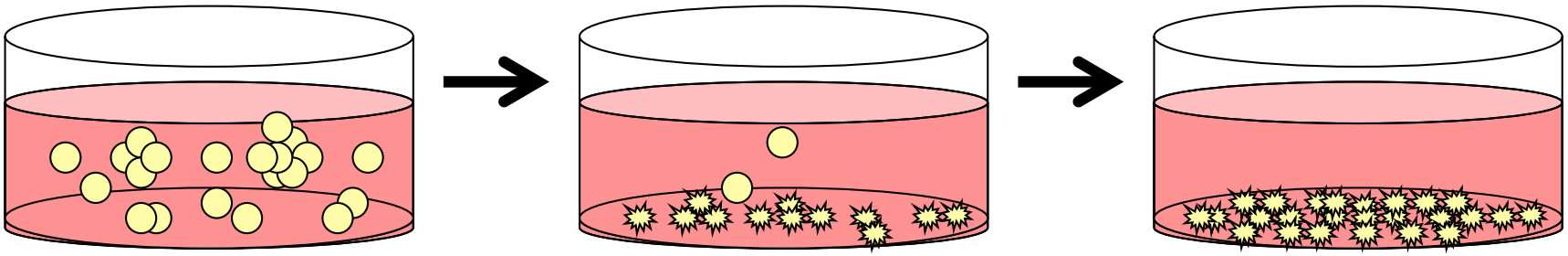
*culture clonale « in-situ »

*culture panmictique

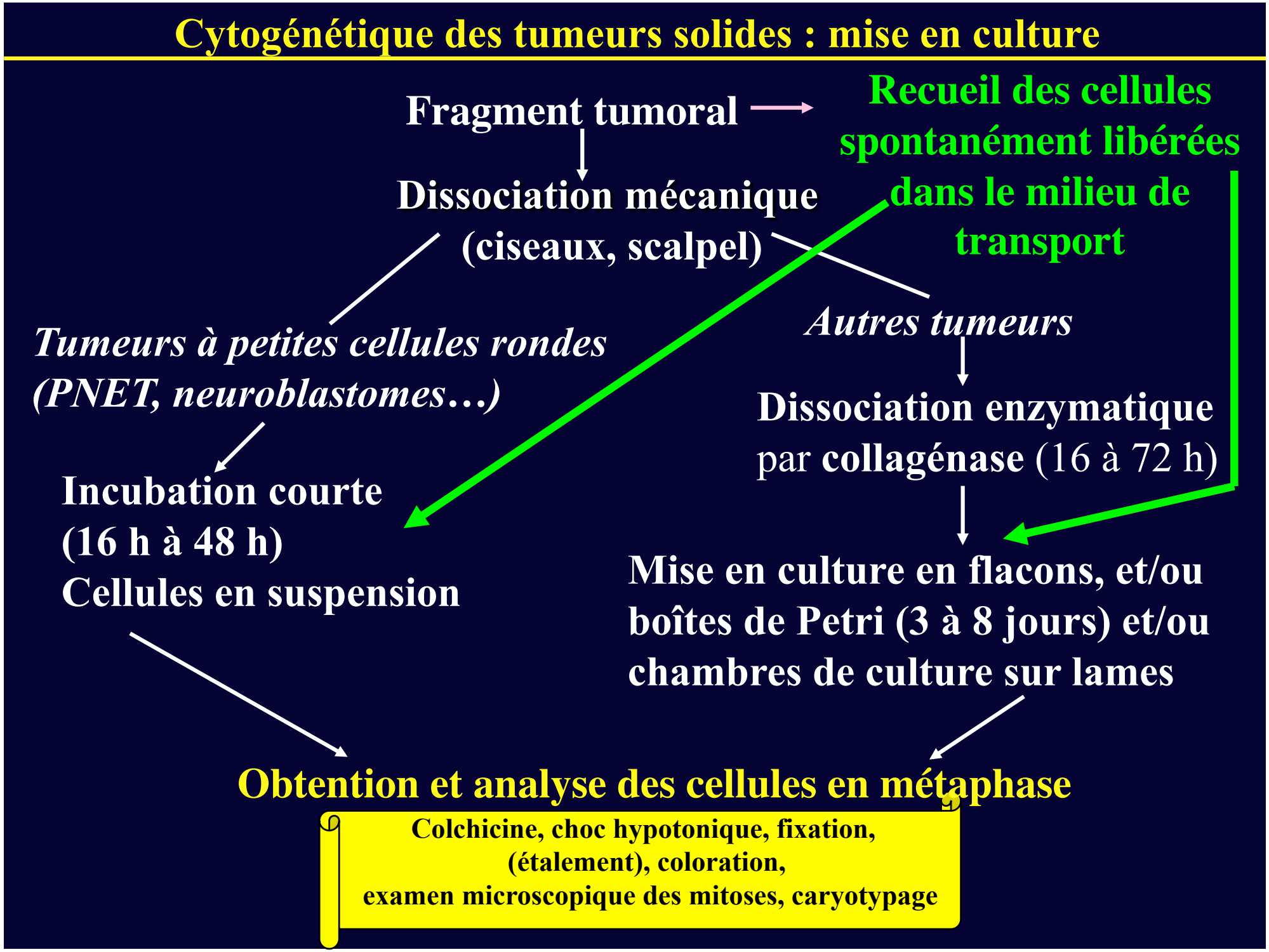
*** Culture en suspension et incubation courte (16-72h)**
(ex: tumeurs à petites cellules rondes, neuroblastomes, sarcomes d'Ewing…) :
Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension

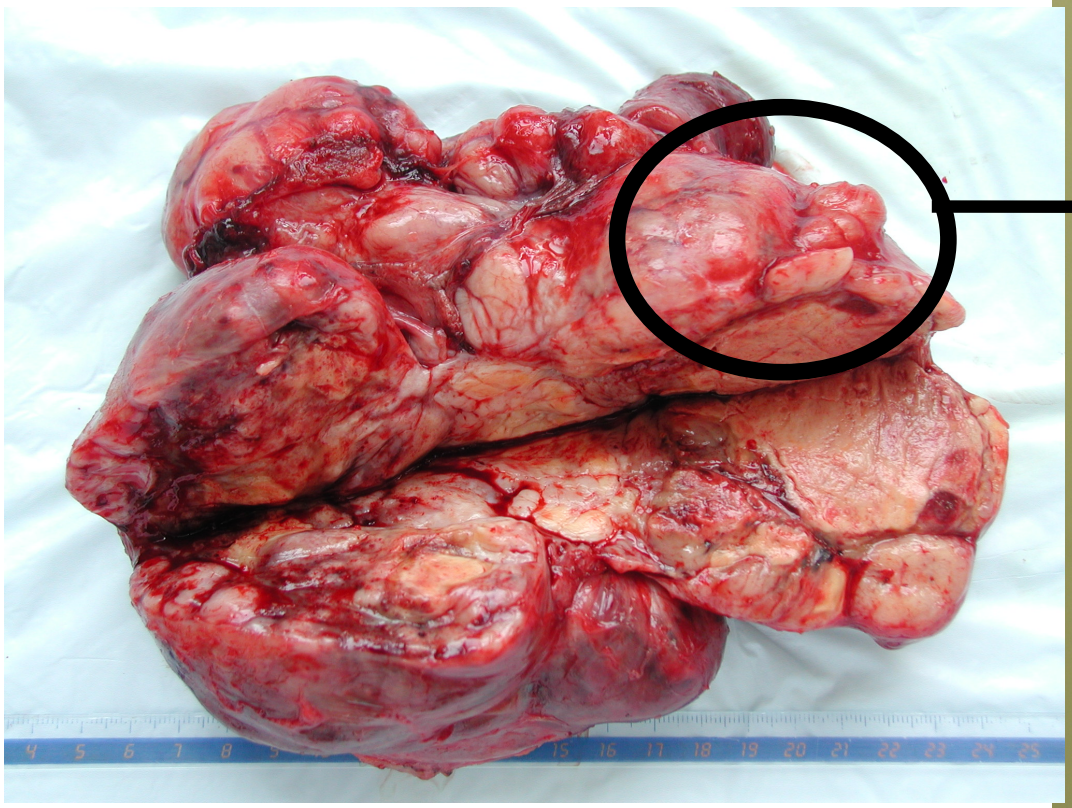


*** dissociation enzymatique puis culture sur support** :
adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture
Culture 3 à 8 jours ou plus

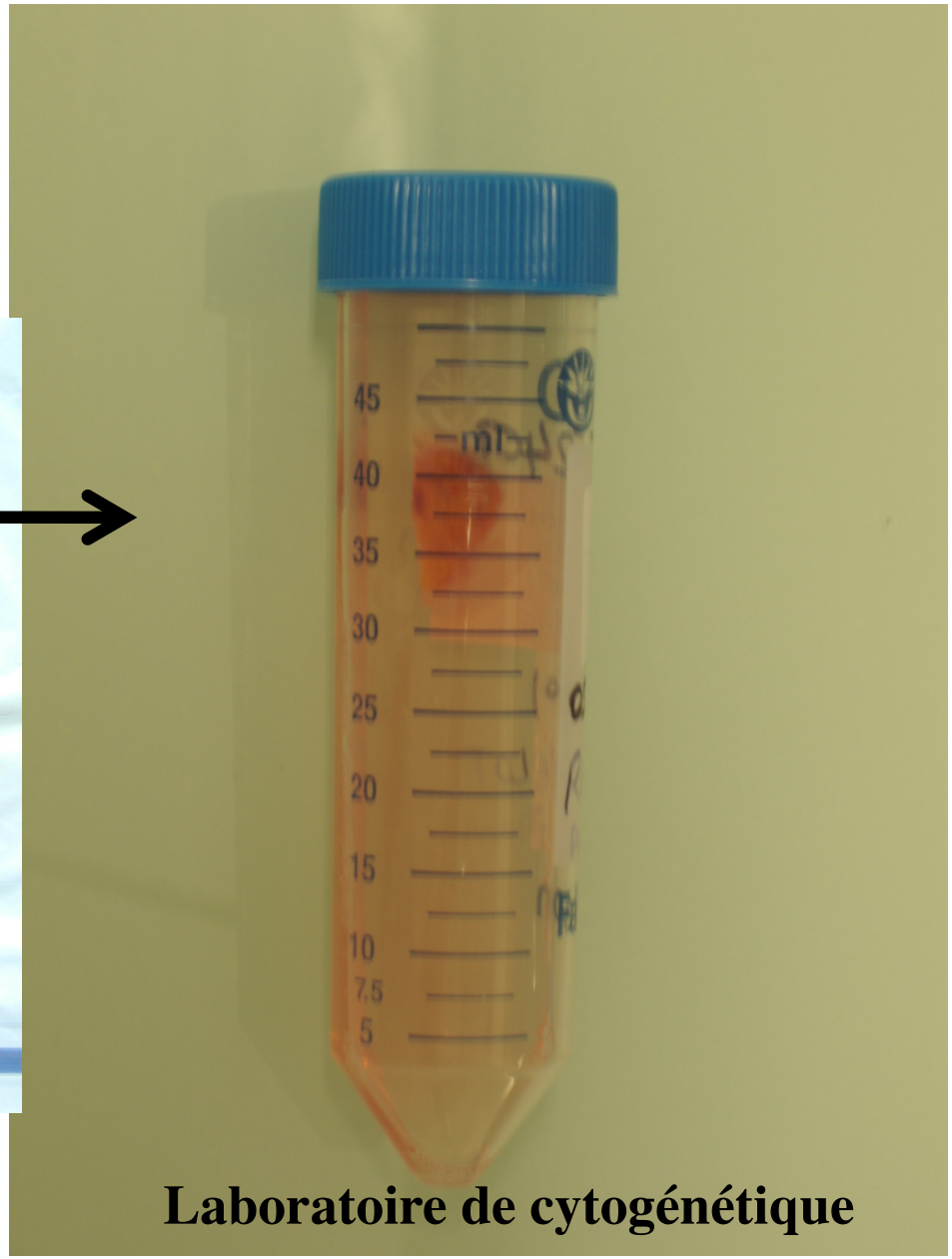


Cytogénétique des tumeurs solides : mise en culture





Laboratoire d'anatomie-pathologique



Laboratoire de cytogénétique

1. Recueil et transport d'un fragment tumoral dans un flacon à l'intérieur stérile et rempli de milieu de transport stérile (ex: RPMI)

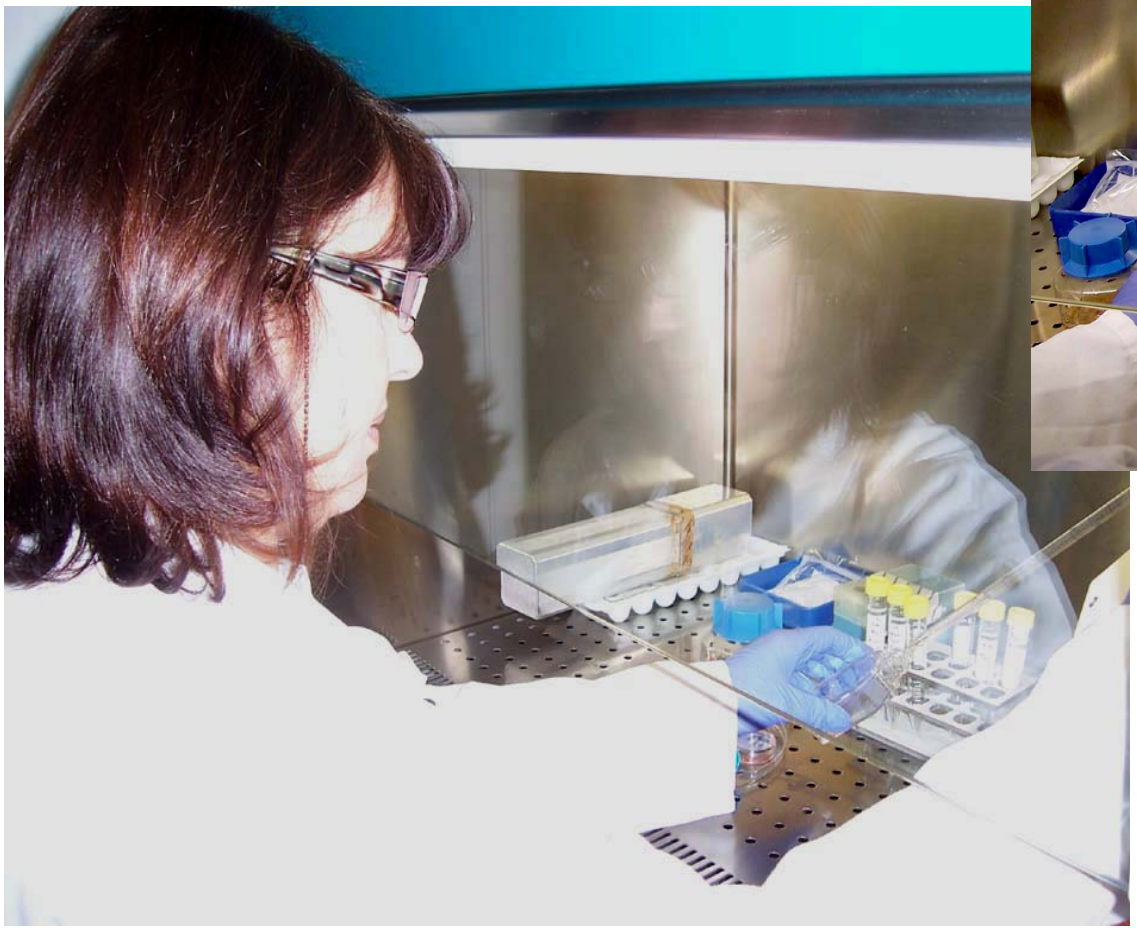
2. Arrivée du prélèvement au laboratoire :

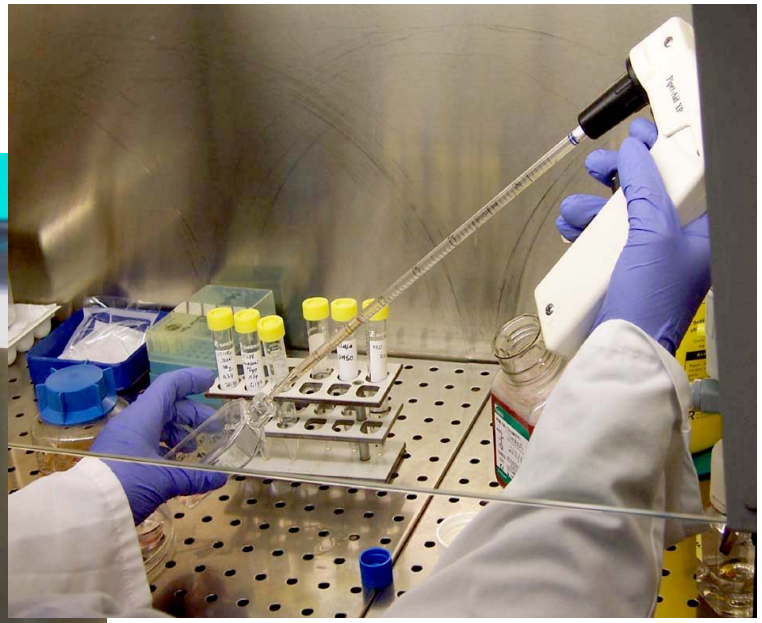
Enregistrer le prélèvement

N° d'identification,
date, informations
concernant le patient (nom,
date naissance…)
données
cliniques,
indication
…

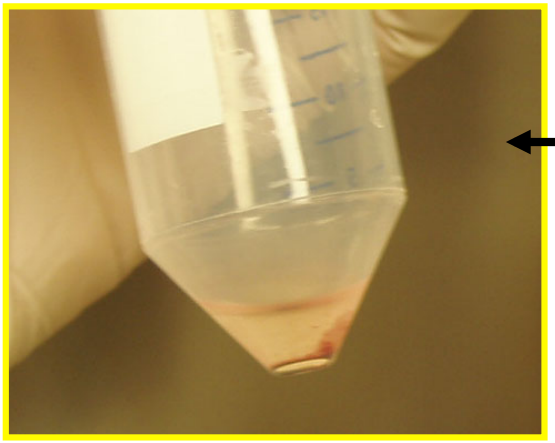
Noter l'aspect, la taille
de l'échantillon

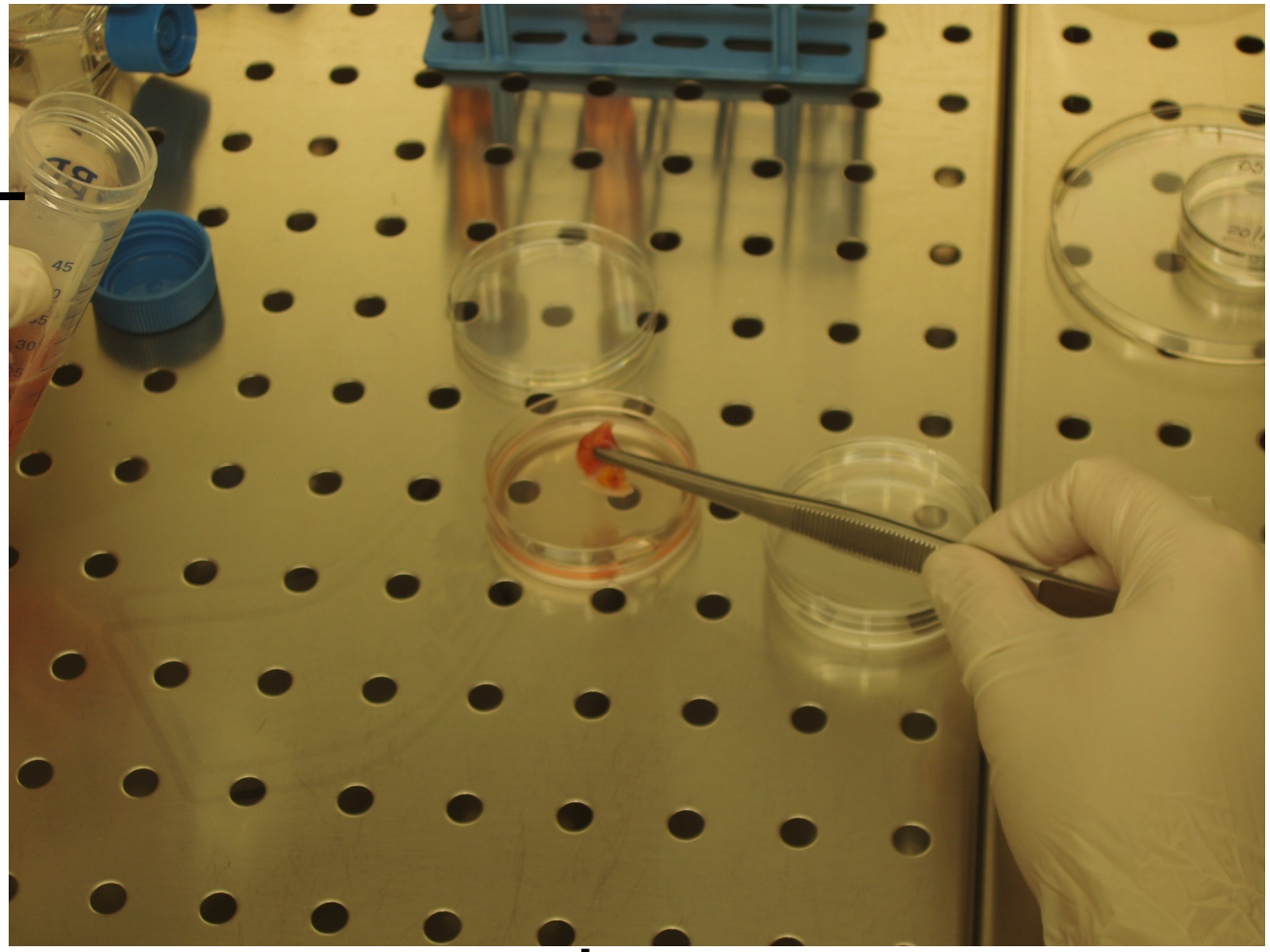
3. Mise en culture sous hotte à flux laminaire





4. Recueil du prélèvement pour dissociation et centrifugation du milieu de transport contenant parfois des cellules en suspension

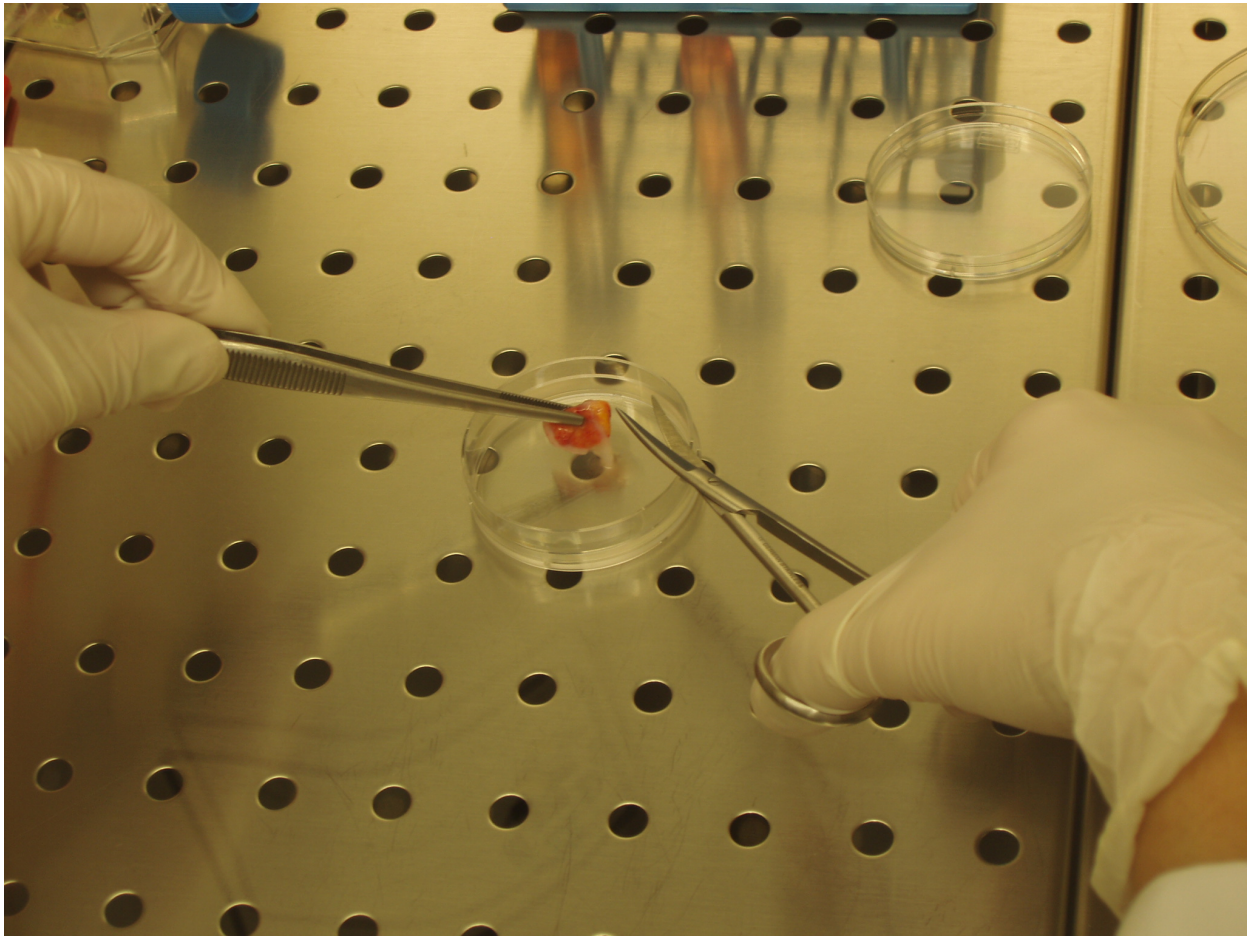




Mise en culture des cellules Surnageant dans le milieu de transport: *voir étape 8*

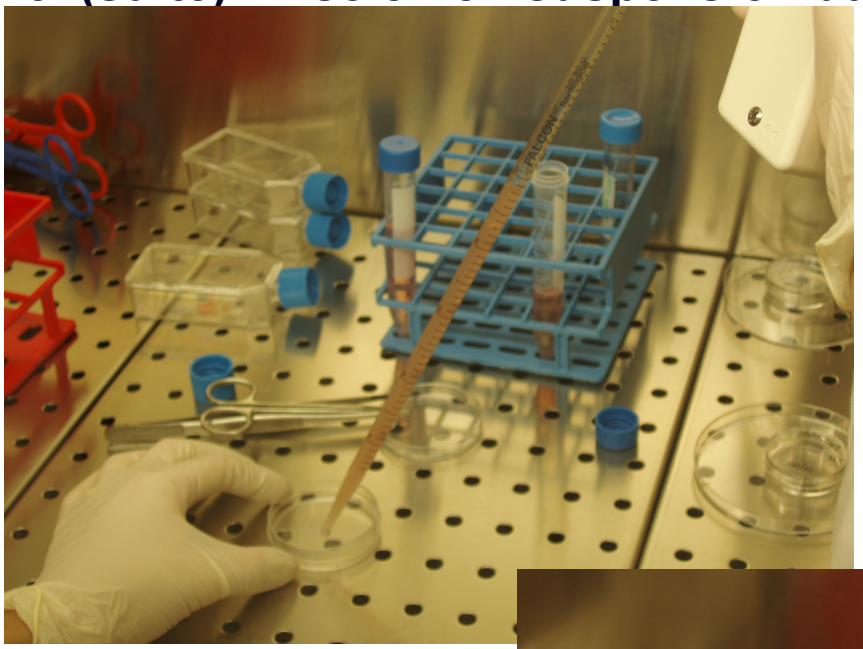
Mise en culture du fragment

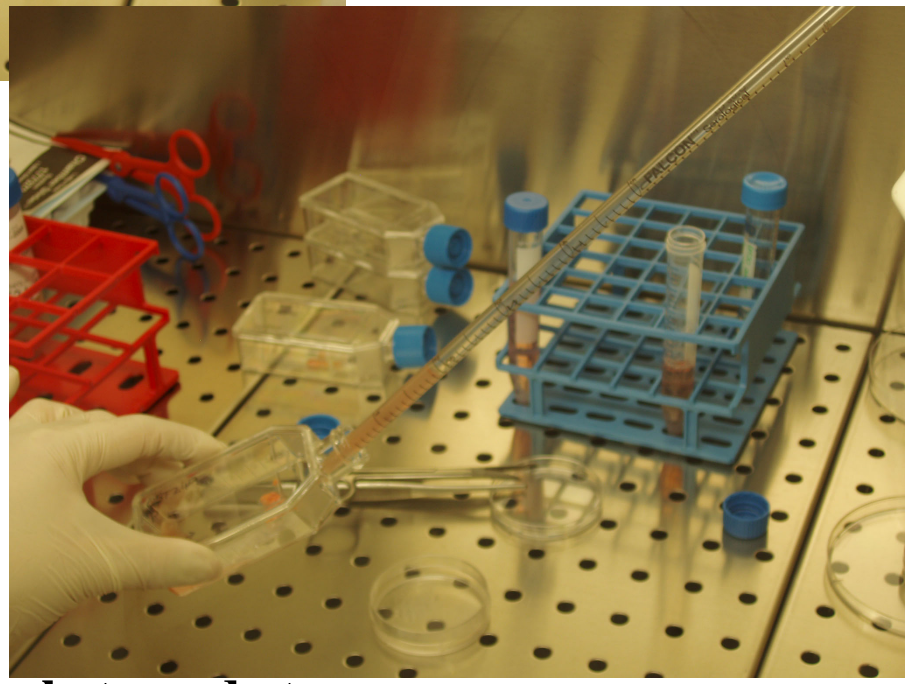
5. Dissociation mécanique du prélèvement (ciseau ou scalpel stérile)



Obtention de fragments les plus petits possibles

5. (suite) Mise en en suspension dans milieu de la dissociation cellulaire :



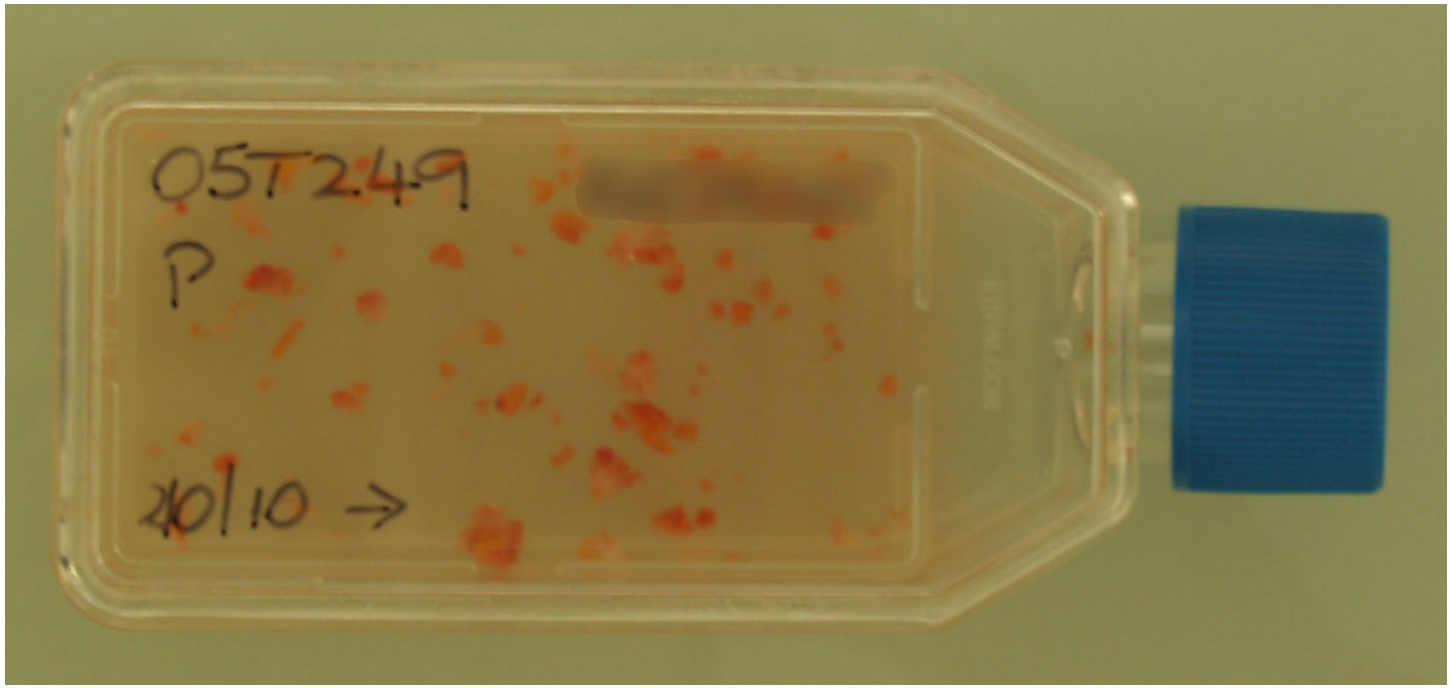


Puis 2 options selon le type de tumeur :

-incubation courte de la suspension cellulaire

-mise en culture sur support : dissociation enzymatique

6. **Dissociation enzymatique du prélèvement (solution de collagénase)**
   Limon et al., *Cancer Genet Cytogenet. 1986; 23(4):305-13*



Incubation 16 à 72 heures à 37°C
dans RPMI 1640+ 10% serum de veau fœtal+antibiotiques
+collagénase

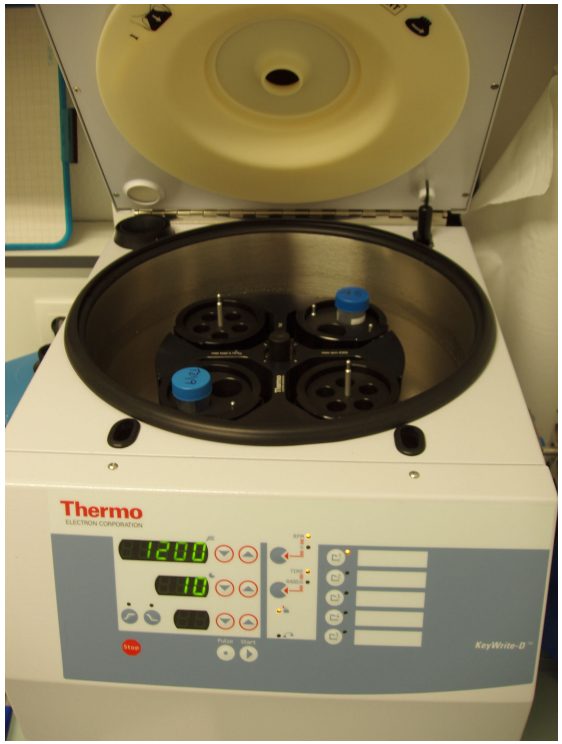
7. **Rinçage de la collagénase : centrifugation, élimination du surnageant et reprise du culot cellulaire avec du milieu de culture dans un flacon plat ou une boîte de Petri, ou une chambre sur lame, puis incubation dans l'incubateur 37°C+5% CO2 en atmosphère humide**

Incubateur 37°C, CO2 5%

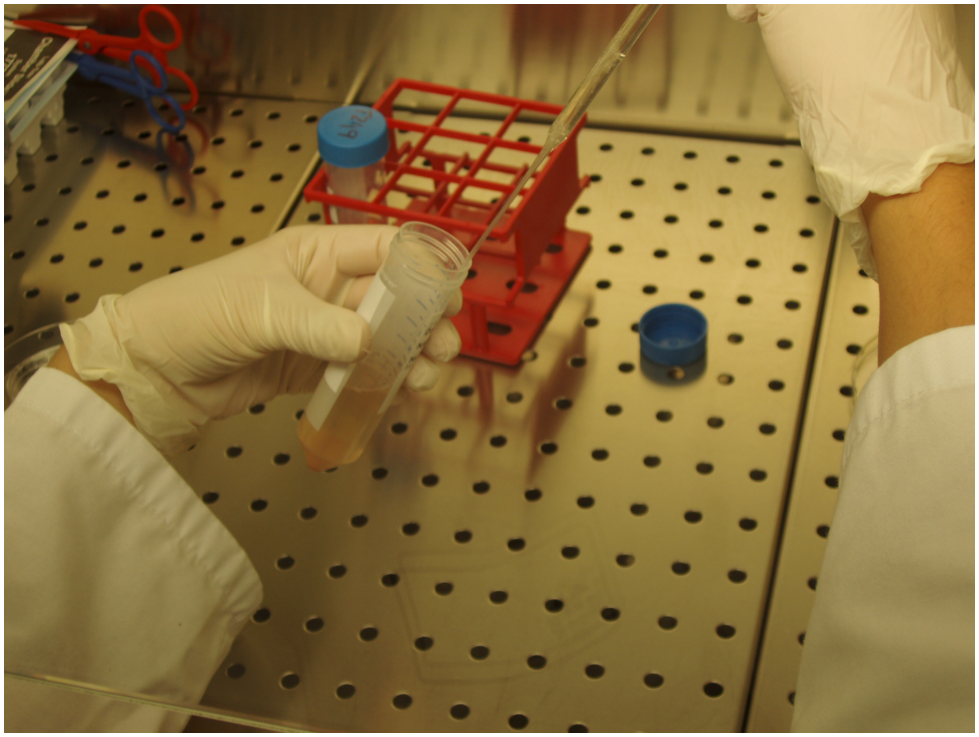


Les cellules en suspension vont sédimenter puis adhérer à la surface du flacon. Après quelques heures, elles commencent à se diviser et à proliférer

8. Récupération et ensemencement des cellules du <u>milieu de transport initial</u>

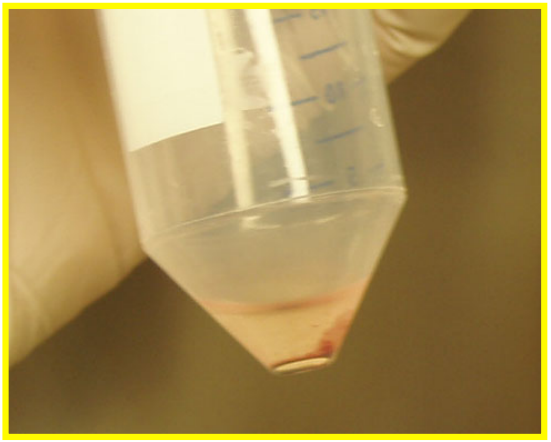


Centrifugation du tube contenant le milieu de transport (800 t/min; 10 min)

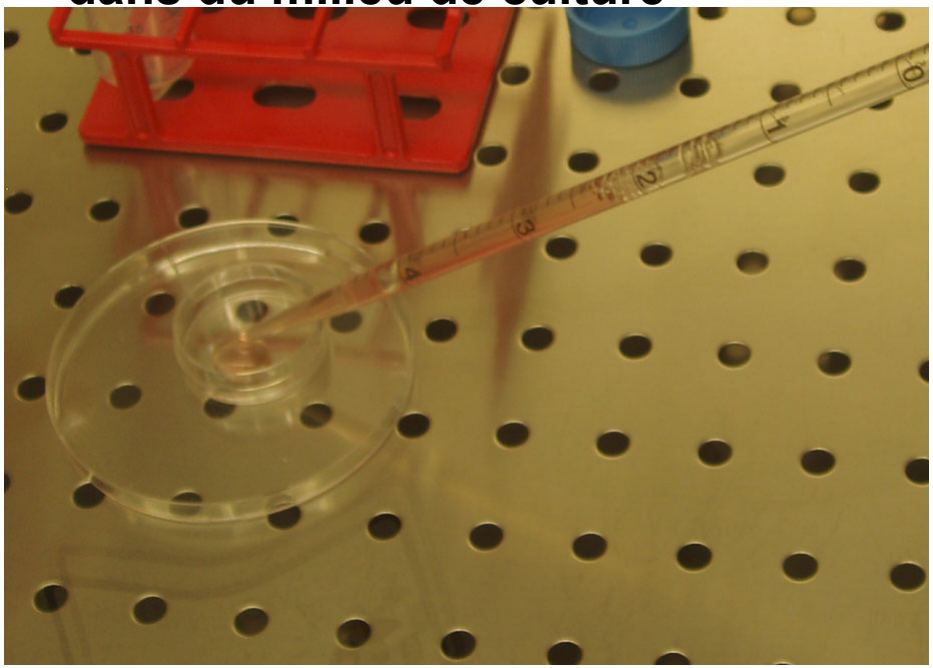


Aspiration et élimination du surnageant

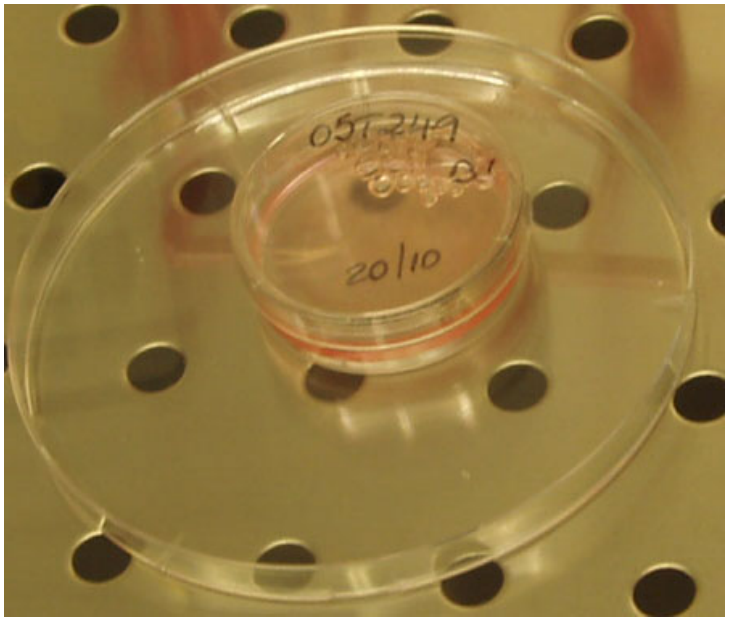
Obtention d'un culot cellulaire



Suspension du culot cellulaire dans du milieu de culture



Incubation à 37°C

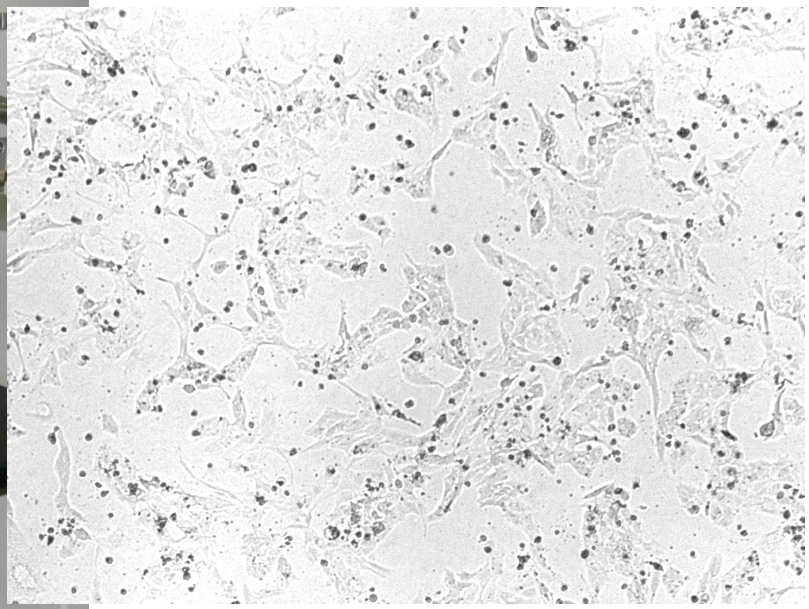


Etape importante :
dans certains cas, seule la culture des cellules récupérées de la centrifugation du milieu de transport permet l'obtention du caryotype tumoral

Les cellules en suspension vont sédimenter puis adhérer à la surface du flacon. Après quelques heures, elles commencent à se diviser et à proliférer : culture cellulaire et méthodes cytogénétiques

9. Surveillance quotidienne des cultures cellulaires à la loupe binoculaire



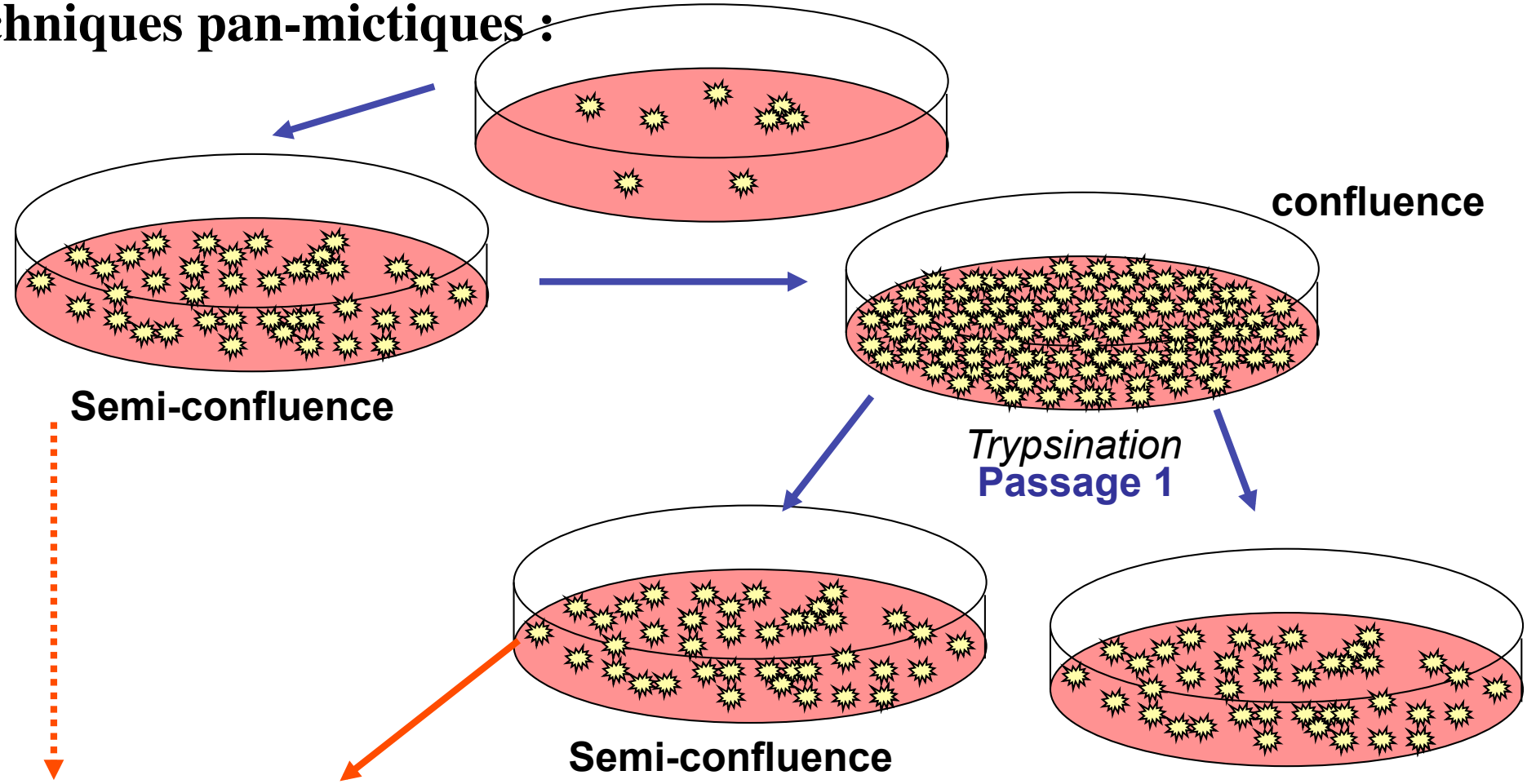


Estimation visuelle de la croissance cellulaire : atteinte de la phase exponentielle de croissance avec nombreuses cellules en mitoses

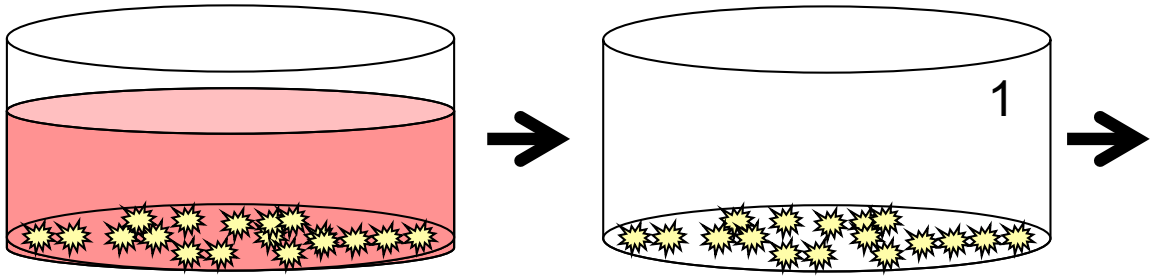
Prise de décision : récolte des métaphases et/ou établissement de sous-cultures

10. <u>Entretien des cultures :</u> changement de milieu, contrôle à la loupe binoculaire de la croissance cellulaire, établissement de sous-cultures,
Si mitoses: mise en œuvre des techniques de cytogénétique pour obtention du caryotype

***techniques pan-mictiques :**

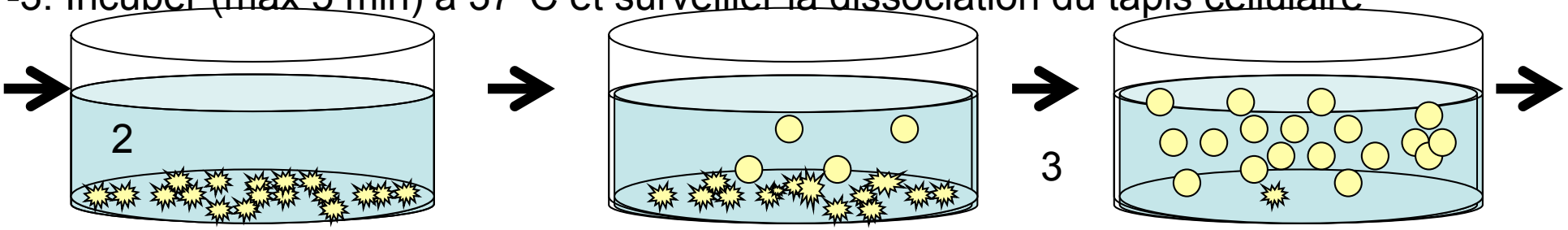


Trypsination (« passage ») : Utilisation d'une enzyme protéolytique (solution de trypsine) pour détacher
les cellules -i) les unes des autres
-ii) du support

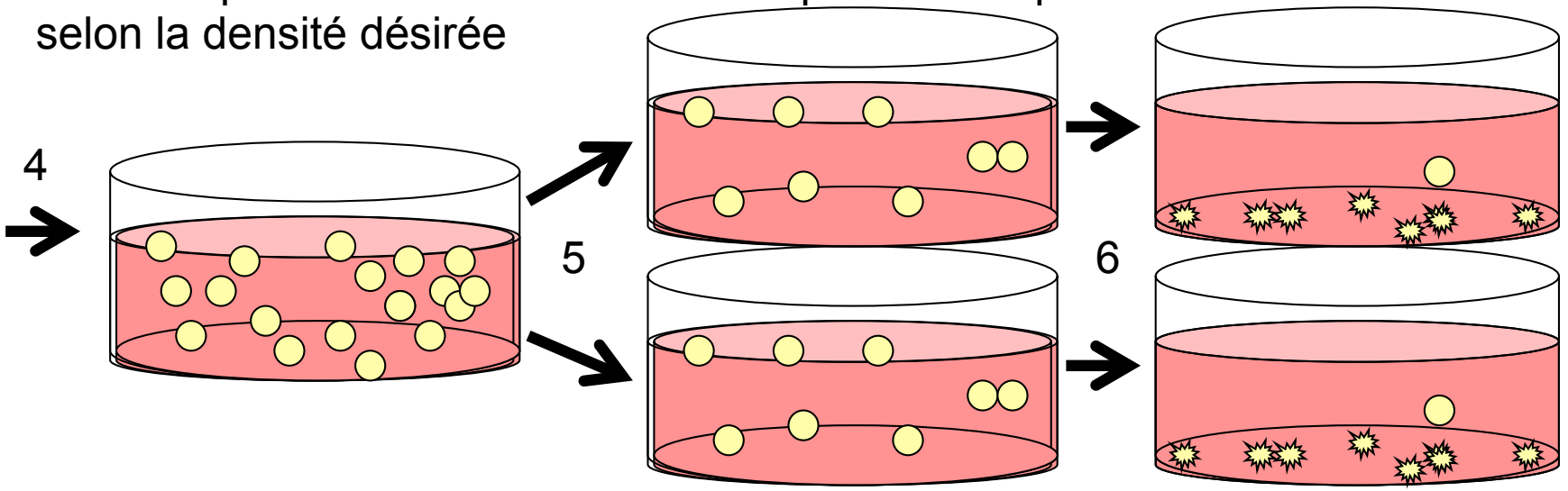


Mode opératoire :

-1. Aspirer le milieu surnageant,
et rincer rapidement avec une solution de trypsine (pour éliminer les traces de milieu)
-2. Laisser agir environ 0,5 ml à 1 ml de solution de trypsine sur la culture cellulaire
-3. Incuber (max 5 min) à 37°C et surveiller la dissociation du tapis cellulaire



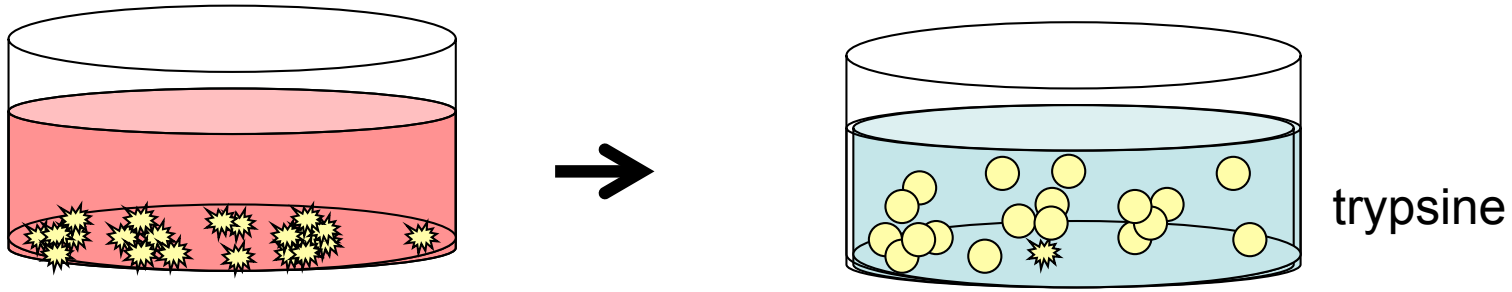
-4. Inactiver la trypsine par adjonction de milieu de culture (action du calcium)
-5. La suspension cellulaire est alors répartie dans plusieurs flacons ou boîtes de culture selon la densité désirée



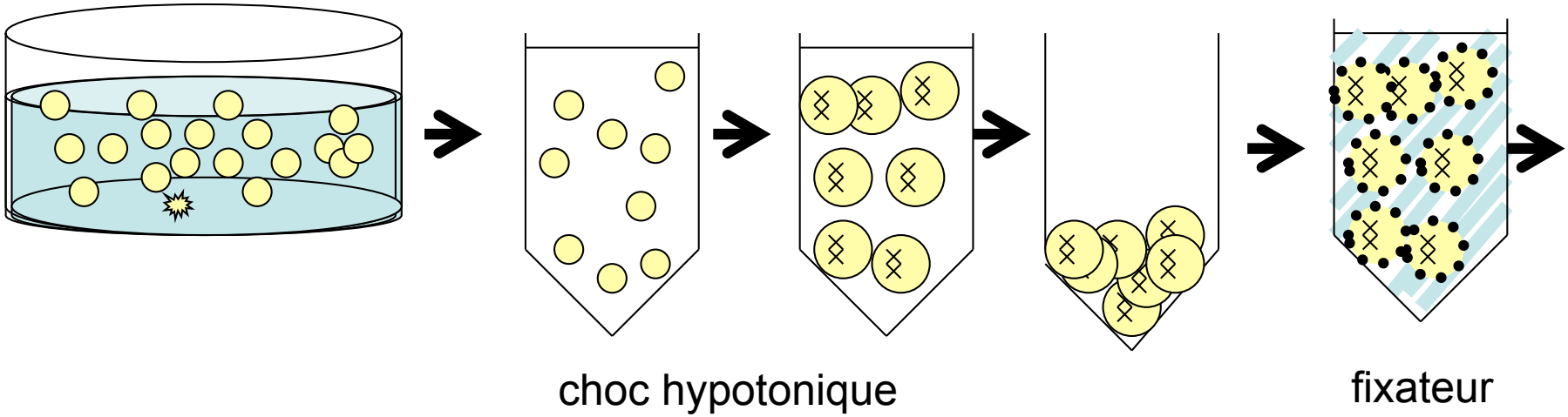
6. Cultures secon-daires moins denses que la culture primaire

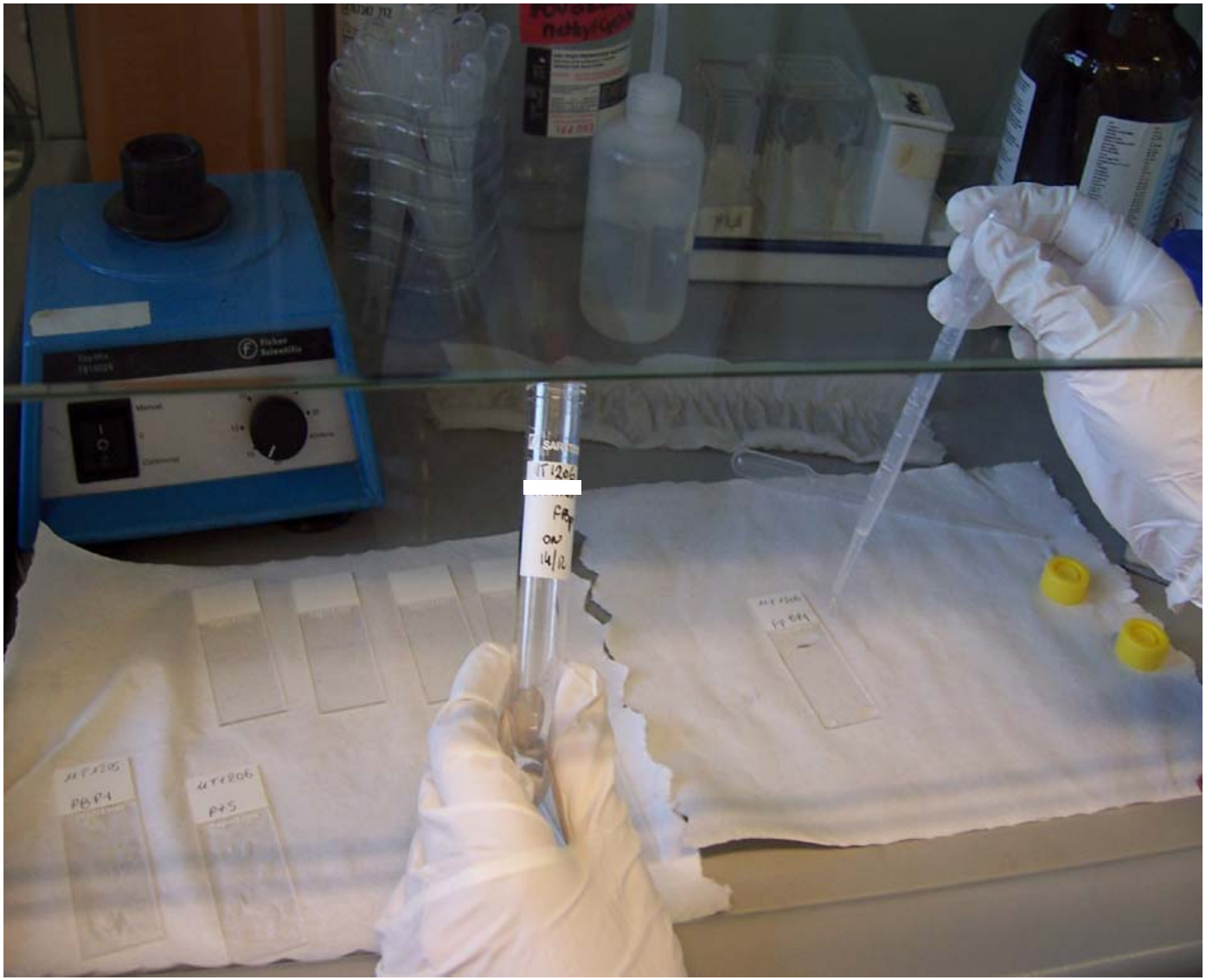
A. Mise en culture « panmictique » et obtention d'un caryotype

-Les cellules adhèrent au fond du flacon, prolifèrent en formant des clones.
A semi-confluence, elles sont soumises à l'action de colchicine (1h30 à 16h) puis de la trypsine



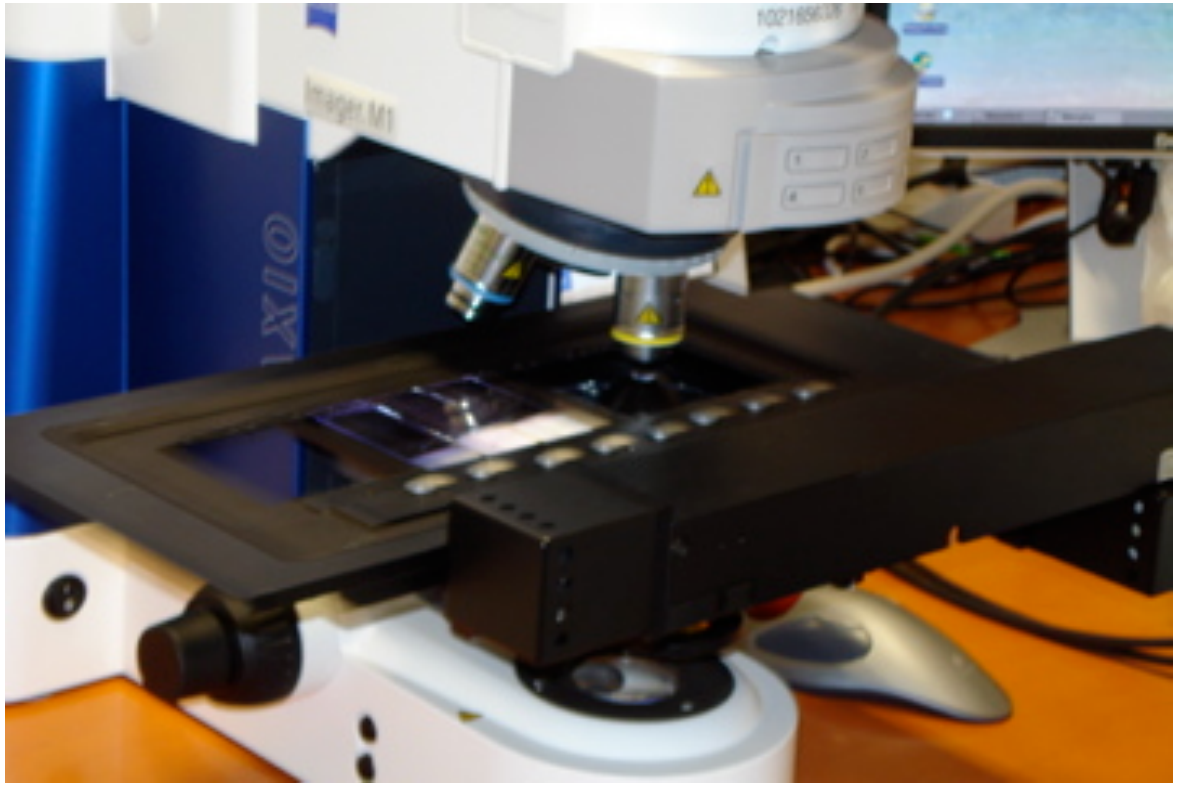
-Les cellules sont décollées par action de la trypsine et transvasées dans un tube à centrifuger puis soumises à l'action d'une solution hypotonique (« choc hypotonique ») puis de fixateur

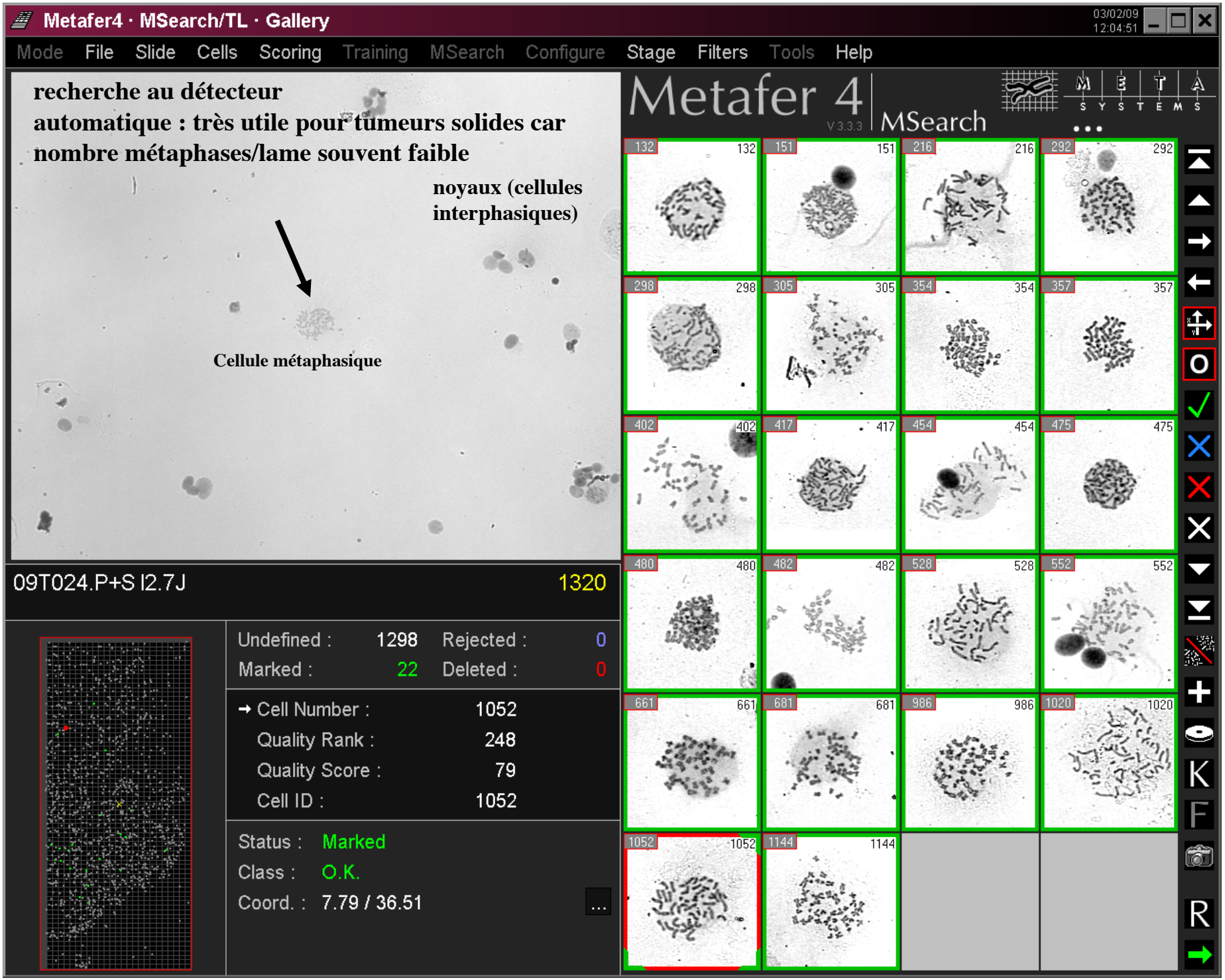




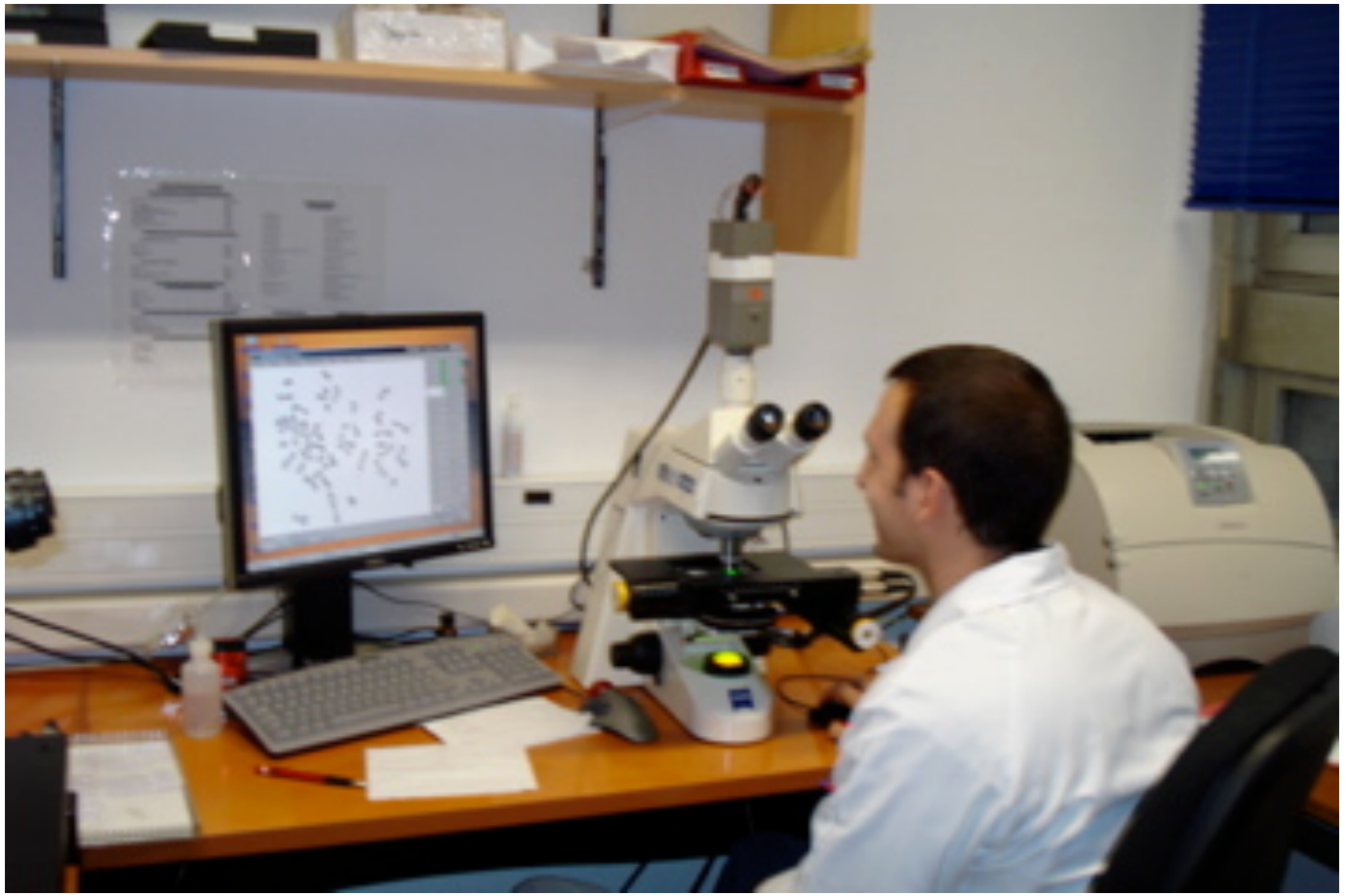
La suspension cellulaire fixée est étalée sur des lames

Les lames sont traitées par la chaleur ou par action enzymatique ou chimique pour pour dénaturer la chromatine puis colorées Giemsa, quinacrine…) afin de faire apparaître les bandes chromatidiennes (RHG, GTG, CBG…)
Les lames sont « criblées » : parcourues au microscope (objectif x10 ou x20) à l'oculaire par un opérateur, ou de plus en plus fréquemment à l'aide d'un détecteur automatique

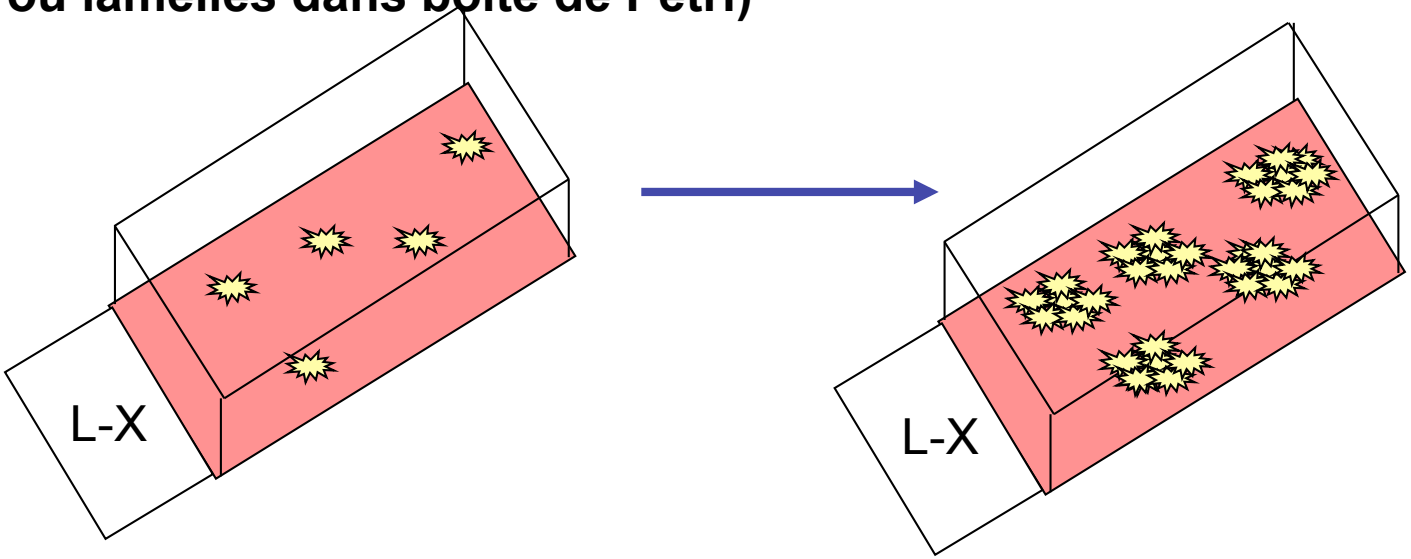



Metafer4 · MSearch/TL · Gallery
03/02/09
12:04:51
Mode File Slide Cells Scoring Training MSearch Configure Stage Filters Tools Help
recherche au détecteur
automatique : très utile pour tumeurs solides car
nombre métaphases/lame souvent faible
noyaux (cellules
interphasiques)
Cellule métaphasique
Metafer 4
V 3.3.3
MSearch
09T024.P+S I2.7J
1320
Undefined : 1298
Rejected : 0
Marked : 22
Deleted : 0
→ Cell Number : 1052
Quality Rank : 248
Quality Score : 79
Cell ID : 1052
Status : Marked
Class : O.K.
Coord. : 7.79 / 36.51

Une fois les métaphases repérées, elles sont observées avec un objectif de plus fort grossissement (x60 ou x100) et un certain nombre seront sélectionnées pour établissement d'un caryotype



•B. Technique d'arrêt chromosomique « in situ » (chambres de culture cellulaire sur lames ou lamelles dans boîte de Petri)



-72 heures : inspection visuelle de la culture à la loupe binoculaire et changement du milieu

-Dès que le nombre de clones et leur taille sont jugés suffisants , il est possible de procéder à la récolte des métaphases « *in situ* »

-ajout de colchicine de 1h30-jusqu'à une nuit
-aspiration et élimination du milieu surnageant
-remplissage de la chambre par solution hypotonique
-ajout de fixateur, aspiration, remplissage de la chambre par fixateur (x2)
-aspiration-élimination du fixateur, séchage
-décollement des parois plastifiées pour ne garder que la lame
-la lame est traitée pour dénaturation de la chromatine, colorée, séchée et examinée au microscope pour analyse du caryotype

Rapide et pratique ++++

En conclusion : caryotype des tumeurs solides

-Mise en culture adaptée aux caractéristiques du prélèvement (taille, type tumoral, nature adipeuse…)
-Personnel technique expérimenté, précautions
-Importance des données cliniques et anatomo-pathologiques
-Un cas particulier :
Doute diagnostique : lymphome ou tumeur solide???
Dans le doute, mettre en œuvre technique « lymphome »
(« grattage cellulaire pour récupération cellules lymphoïdes et incubation courte selon protocoles, et mise en culture du fragment solide par technique « tumeurs solides »)
-Congélation de cellules non cultivées si possible :
Cellules fixées (pour éventuel FISH interphasique)
Cellules vivantes en cryoconservateur (glycérol, DMSO…) pour éventuelle remise en culture (déclaration collection si conservation)

Culture primaire/lignée cellulaire

- **Culture primaire :**

culture à court terme (quelques jours, nombre réduit de passages) de cellules tumorales directement à partir du fragment d'exérèse

- **Lignée cellulaire :**

culture à long terme (plus de 50 passages) de cellules tumorales immortalisées spontanément ou après transfection (SV 40…)

Avantages : ***matériel cellulaire et génomique inépuisable***

Inconvénients :

Acquisition d'anomalies in vitro non représentatives

Risques d'erreurs de manipulation au cours du temps +++

Vérifications régulières indispensables des caractéristiques de départ et notamment du caryotype