

Cytologie et cytogénétique des LAP et des LAM CBF

Les outils

➤ Cytologie:

- Coloration au May-Grunwald Giemsa: ~40 min

lames de sang et moëlle, indispensable pour classer une LAM
Def OMS : LAM si $\geq 20\%$ de blastes myéloïdes dans la moëlle

- Coloration des peroxydases: nature myéloïde des blastes, positive quand $>3\%$ de blastes peroxydes +

➤ Cytogénétique

- Le caryotype → étude globale du génome (résolution = qq Mb)
- La FISH (fluorescence in situ hybridization) → étude ciblée

Deux grandes classifications:

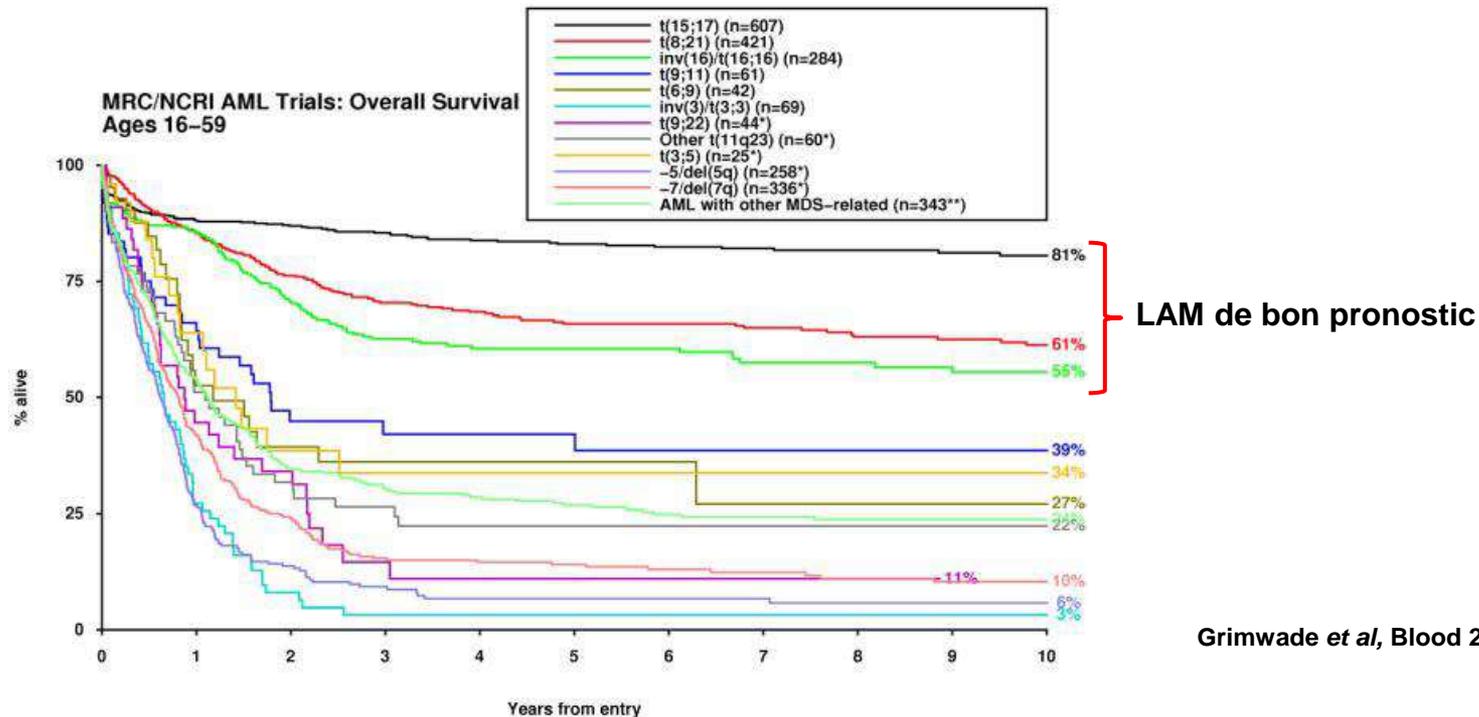
FAB (French-American-British) 1976: cytologie +++

OMS 2001, réactualisée en 2008: cytologie + génétique + atcd du patient
→ pronostic +++

Rappels de Cytogénétique

Place de la Cytogénétique Hématologique

- diagnostic (ex: LAP)
- classification OMS des hémopathies et des lymphomes
- pronostic → choix thérapeutique



- suivi (rémission, rechute, évaluation de la réponse au ttt)
- fondamental

Le Caryotype (1)

But

analyser les chromosomes visibles au stade métaphasique (mitose) à la recherche d'anomalies chromosomiques (nombre ou structure)

Conditions

cellules vivantes (délai de transport, pas de matériel fixé), nucléés, capable de se diviser spontanément (blastés) ou après stimulation par des mitogènes (lymphocytes).

Tissus

moelle osseuse +++

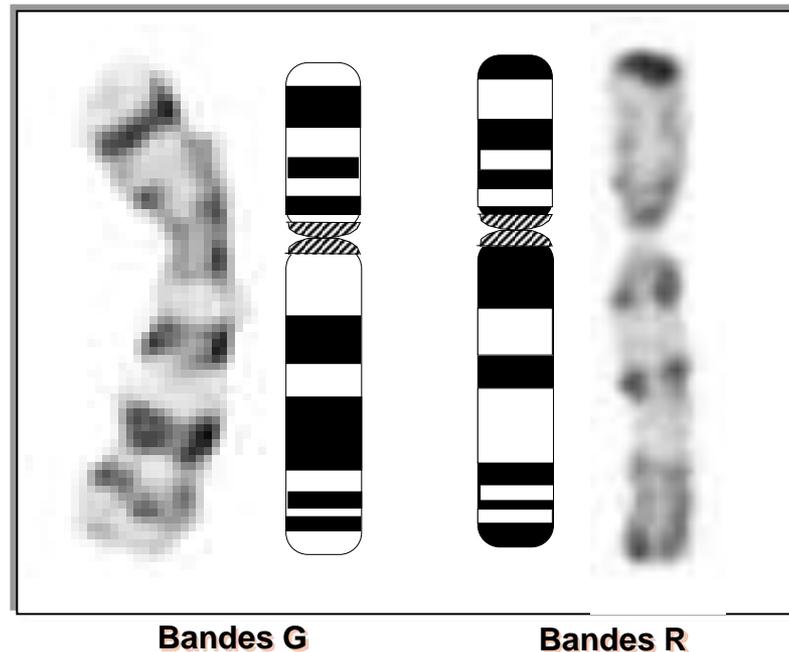
sang périphérique (myélémie, LLC +++)

ganglion, LCR, épanchements, tout tissu infiltré

Le Caryotype (2): les étapes

- 1 - CULTURE CELLULAIRE (24 à 72H)
- 2 - SORTIE DE CULTURE (3 heures)
- 3 - ETALEMENT SUR LAMES (J+1 sortie de culture)
- 4 - DENATURATION et COLORATION → BANDING R et/ou G

Chromosome 7



Le Caryotype (3): les étapes

5 - Lecture au photomicroscope

- Grossissement x100
- Caméra et logiciel dédiés → capture numérique des mitoses



X100, bandes G

Le Caryotype (4): les étapes

6 - Classement et analyse des mitoses

- **Principe du classement:**

- taille des chromosomes (1 → 22)

- indice centromérique:

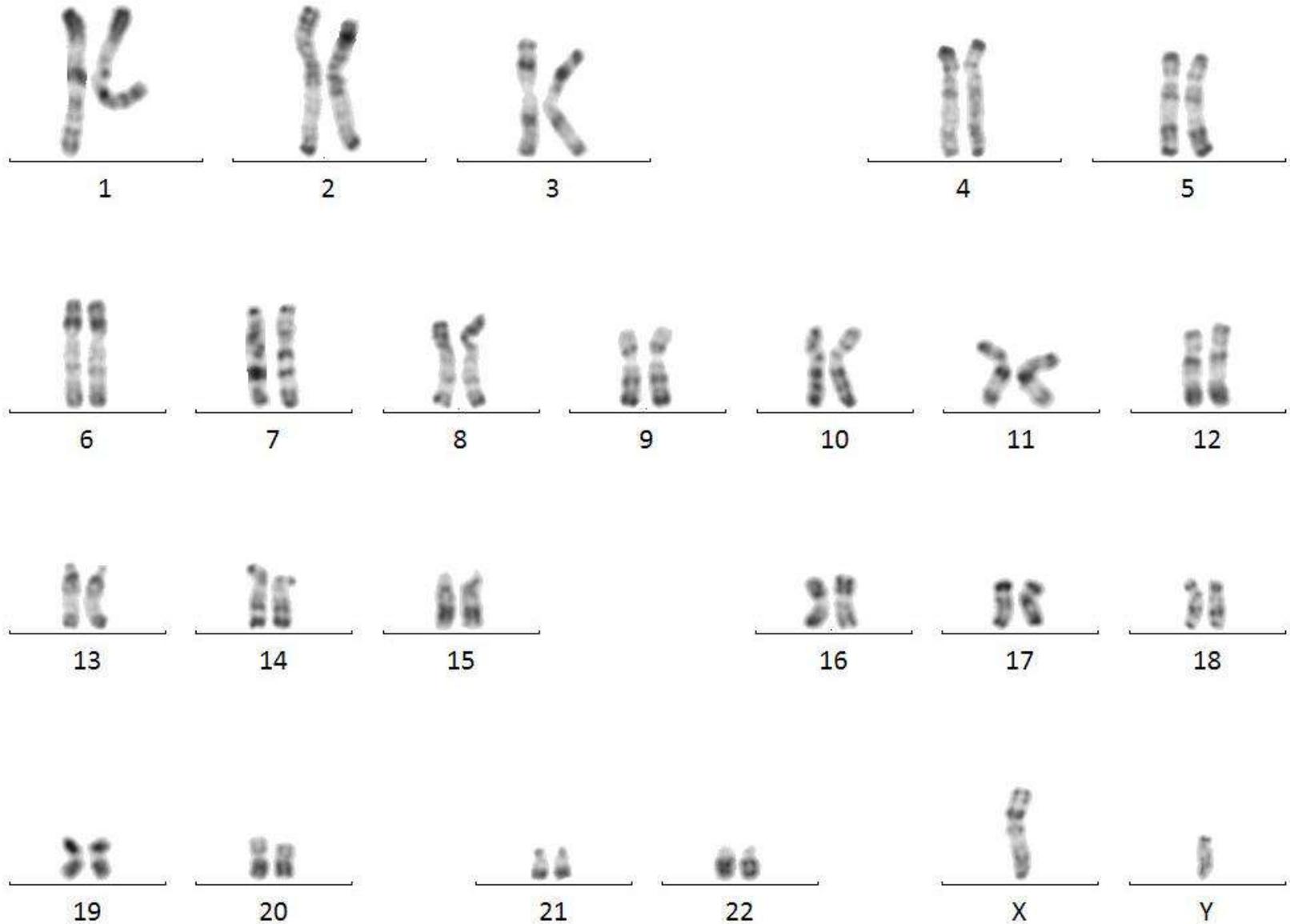
- taille du bras court (p) / taille du bras court (p) + long (q)

- bandes

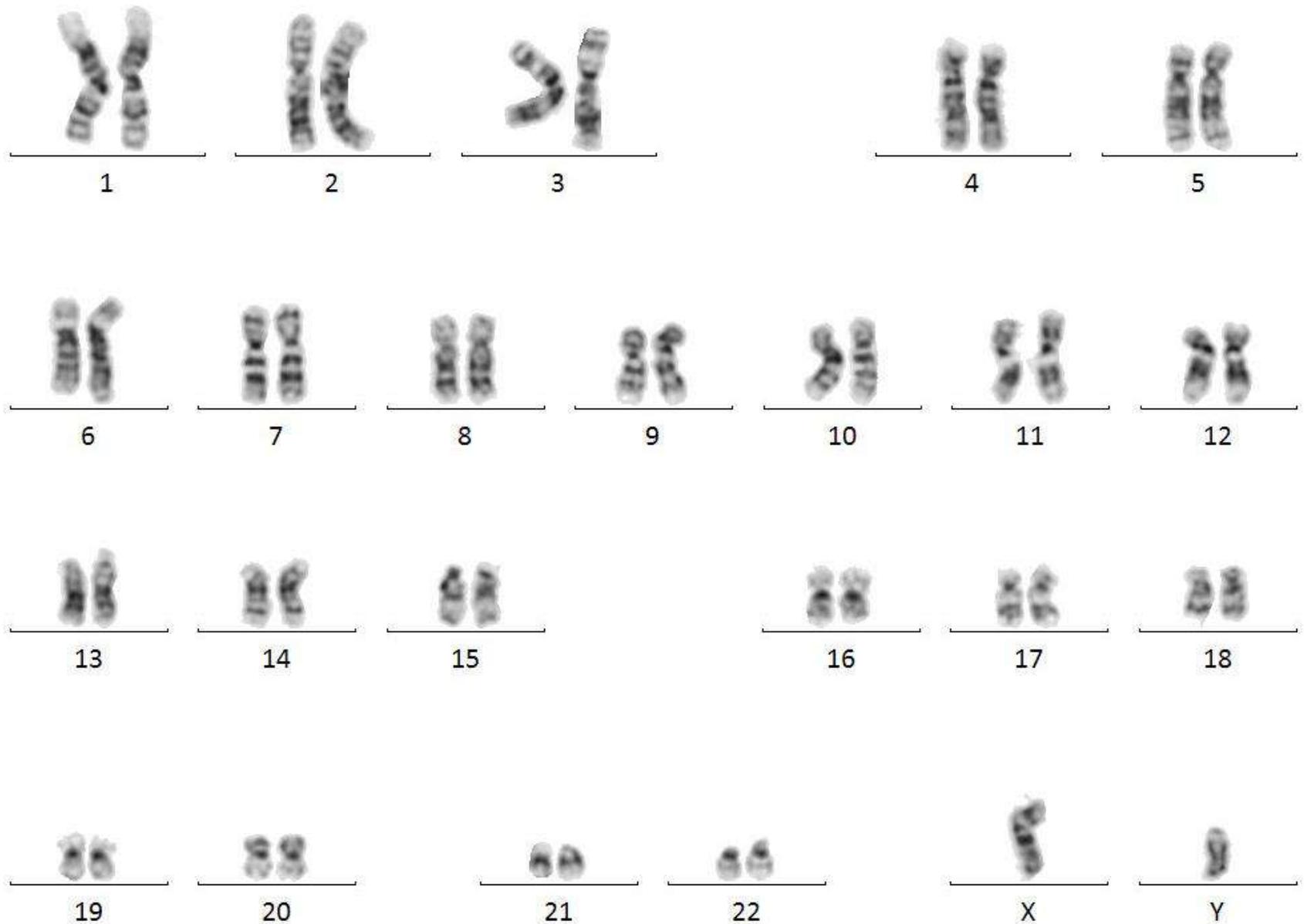
- **Un dossier:**

- au moins 20 mitoses comptées et classées

Caryotype bandes R : 46,XY



Caryotype bandes G : 46,XY



Le Caryotype (5): les étapes

7 - Analyse et synthèse du dossier

- mitoses supplémentaires (clone anormal minoritaire)
- techniques complémentaires (FISH +++)
- Concordance avec les autres données clinico-biologiques (cytologie, immunophénotypage....)
- conclusion du dossier =
 - formule chromosomique selon nomenclature internationale (ISCN 2013)
 - interprétation en clair pour le clinicien

→ 2~8 jours

La FISH (1)

La cytogénétique moléculaire ou FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) reposent sur deux principes :

- Les propriétés de l'ADN
 - Complémentarité des bases:
Adénosine (A) - Thymidine (T)
Guanosine (G) - Cytidine (C)
 - spécificité de la séquence
- La fluorescence
 - les molécules fluorescentes
 - le microscope à épifluorescence

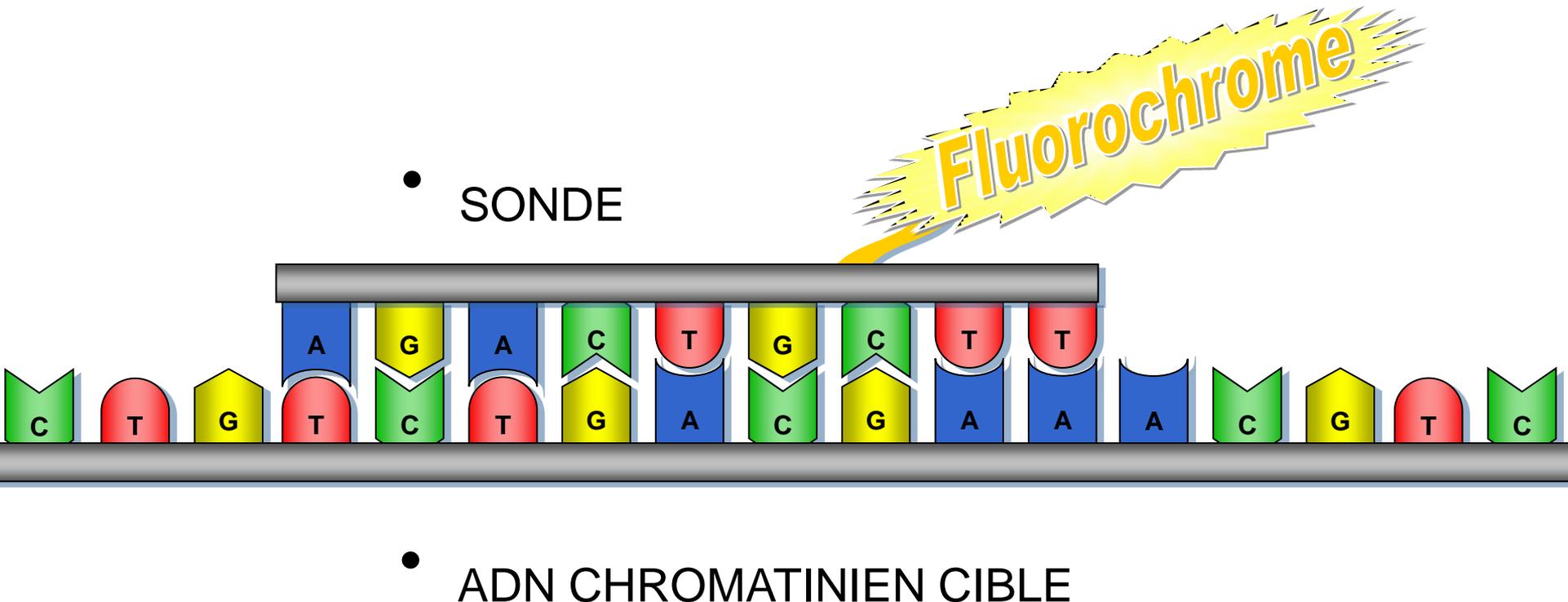
La FISH (2)

- L'ADN est sous la forme double brin (double hélice).
 - L'Hybridation *in situ* repose sur les propriétés de complémentarité de l'ADN
 - une **cible** simple brin = chromosomes, noyaux
 - une **sonde** = séquence d'ADN connue, simple brin
- **Hybridation spécifique de la séquence**

La FISH (3)

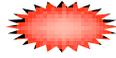
Principe de la FISH :

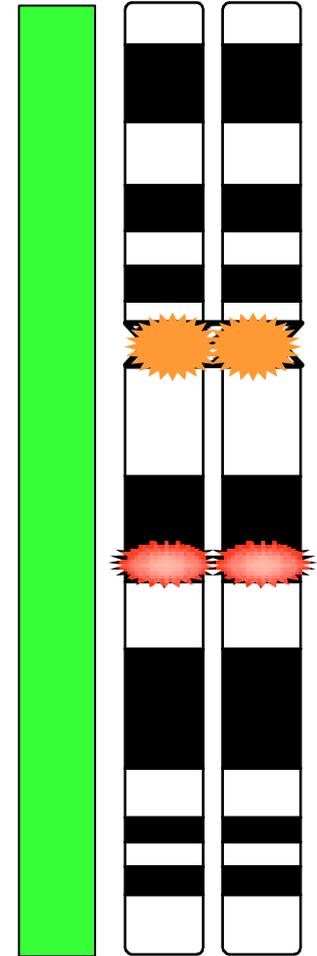
Un fragment d'ADN rendu fluorescent (la sonde), permet de repérer de façon spécifique la présence de sa cible dans l'ADN étudié.



La FISH (4)

Les différents types de sonde:

- Chromosome entier 
(peinture chromosomique)
- Séquences répétées
(centromères) 
- Séquences monocus
(gène) +++ 



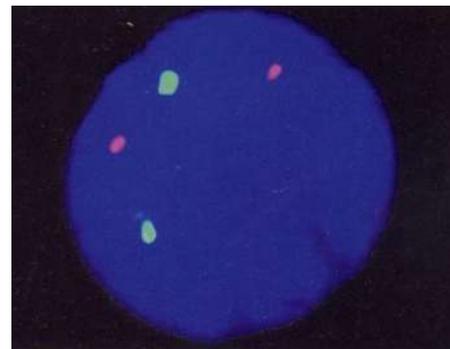
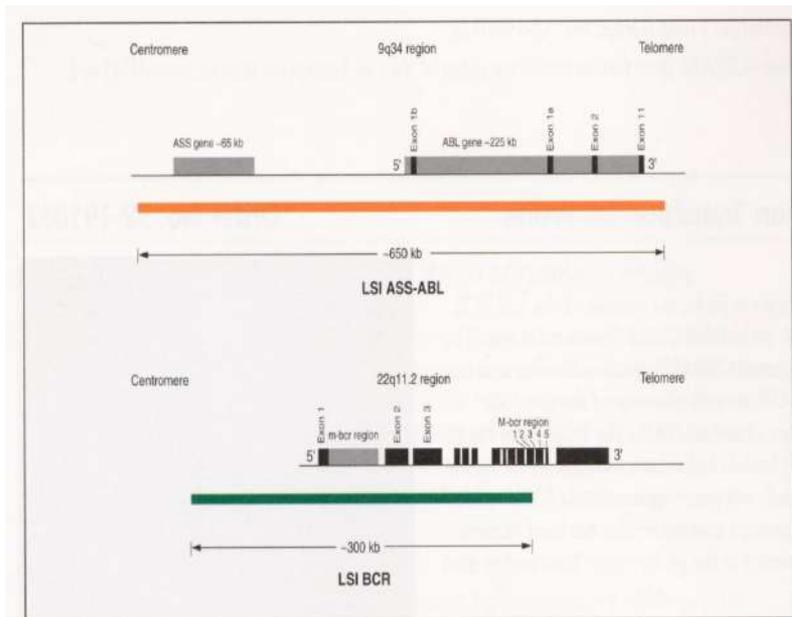
La FISH (5)

- 2 types de sonde monoclocus:
 - sonde de fusion: ex BCR/ABL1, RUNX1/RUNX1T1

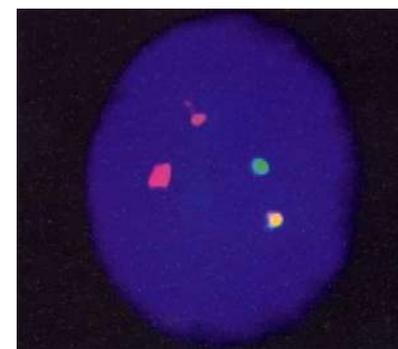
Un gène marqué en rouge, un gène marqué en vert.

En l'absence d'anomalie → 2 spots rouges et 2 spots verts.

Si translocation entraînant gène de fusion → 1 spot rouge, 1 spot vert, 1 ou 2 fusions (vert + rouge), +/- un extrasignal

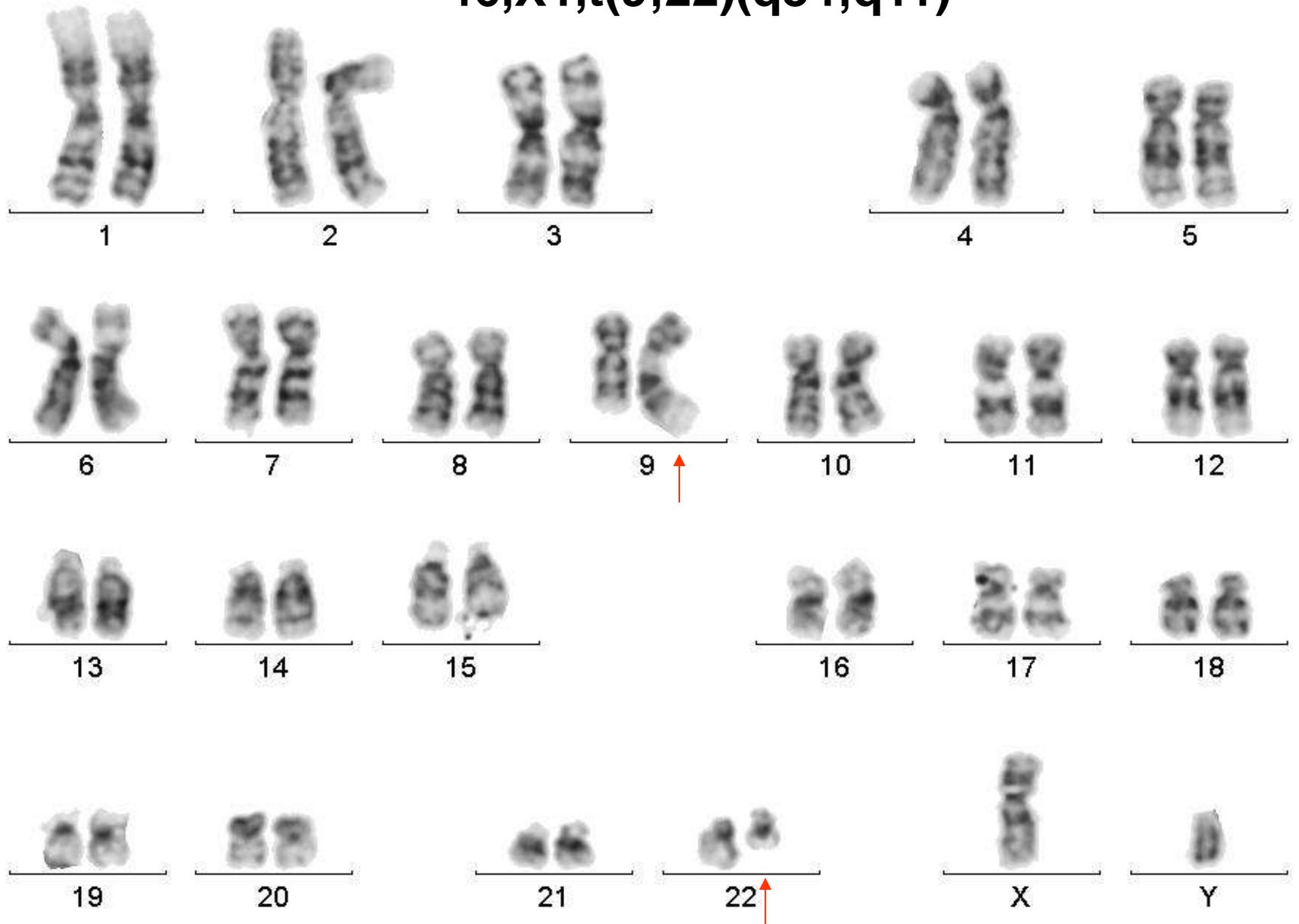


Noyau normal



Noyau avec translocation

46,XY,t(9;22)(q34;q11)



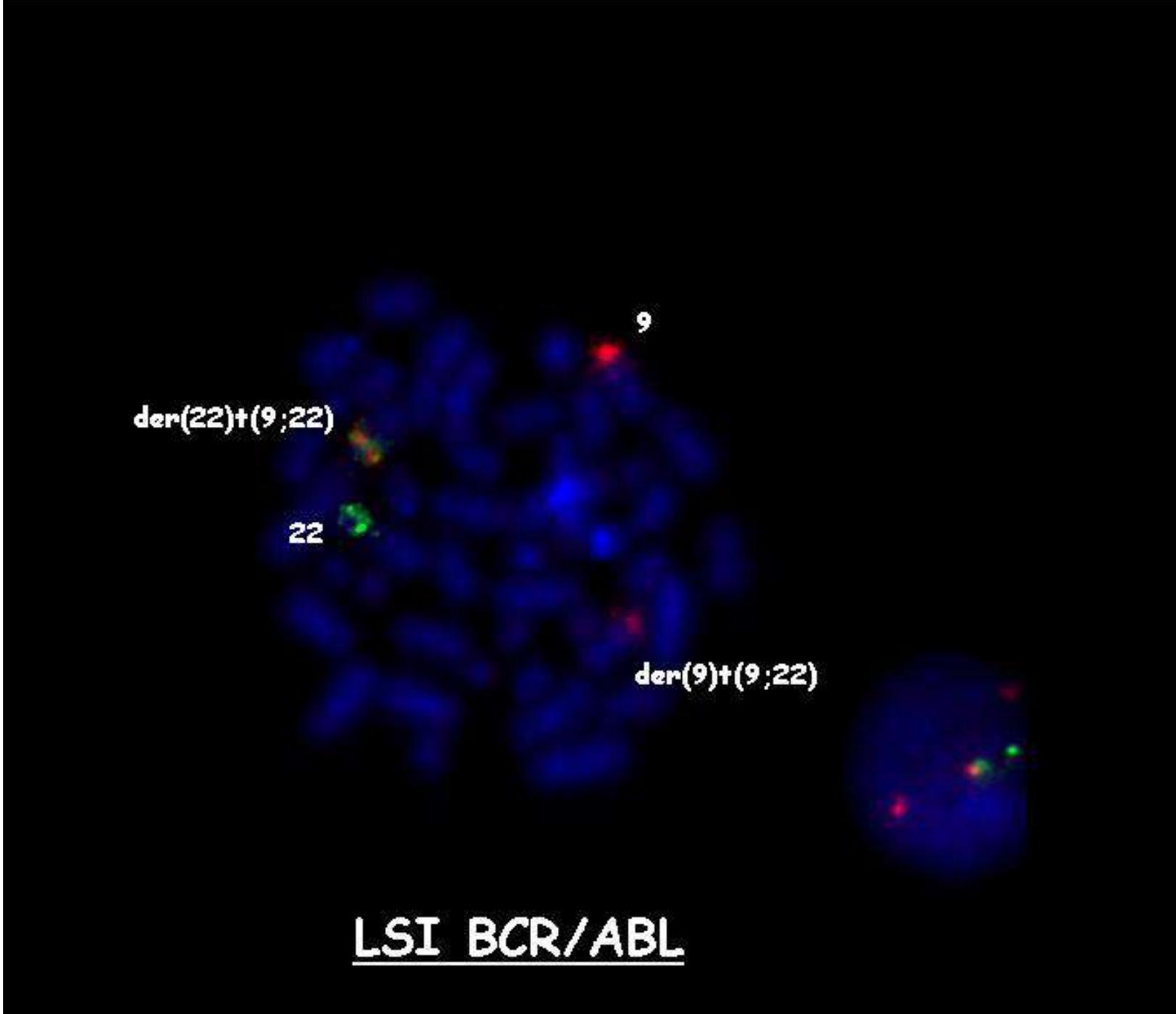
der(22)t(9;22)

9

22

der(9)t(9;22)

LSI BCR/ABL



La FISH (5)

- 2 types de sonde monolocus:

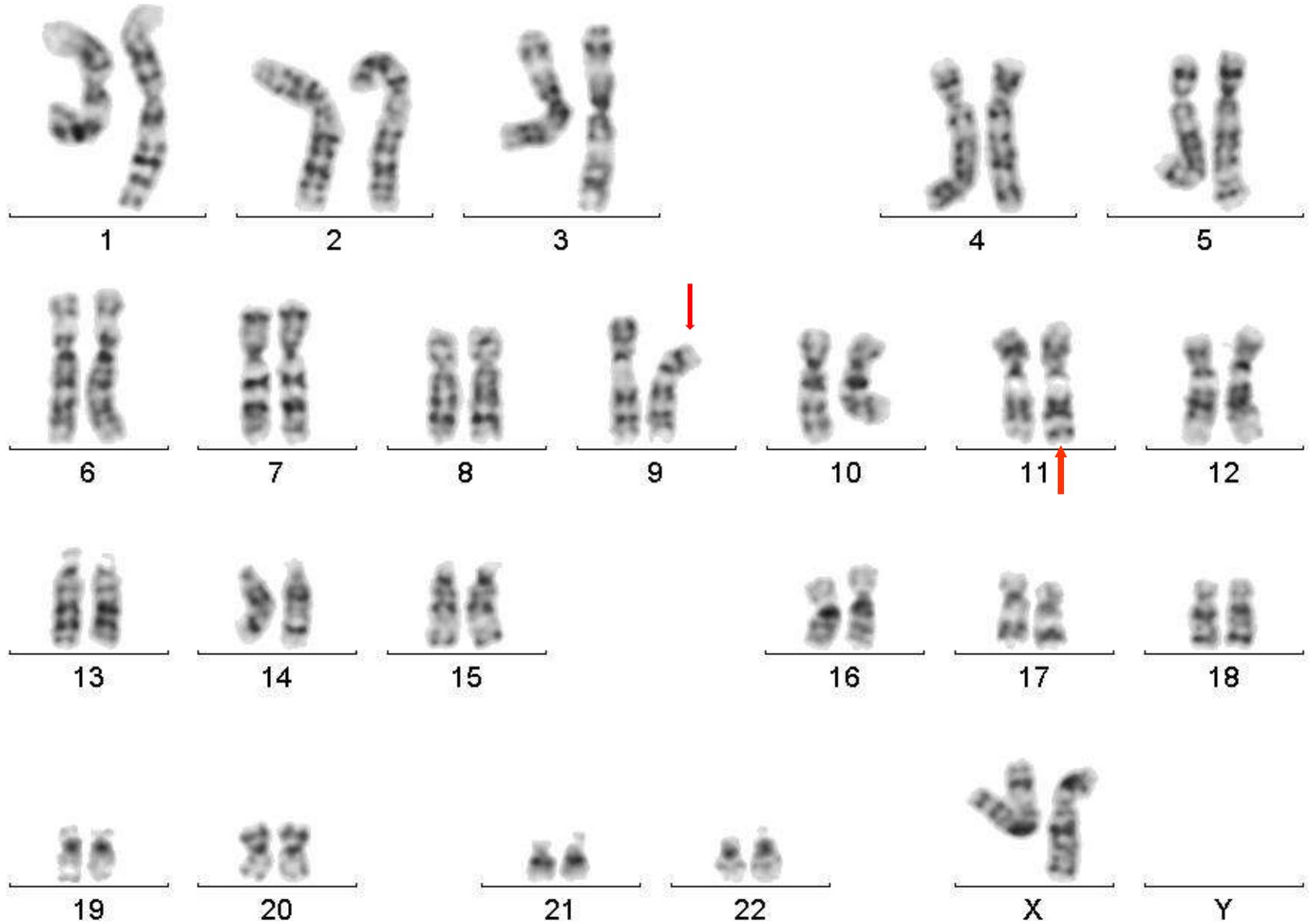
- sonde de séparation (break-apart): ex MLL

Partie 5' du gène marquée en vert, partie 3' du gène en rouge

En l'absence d'anomalie → 2 fusions (vert+rouge)

Si translocation entraînant un réarrangement du gène
→ 1 fusion (gène normal), un vert et un rouge séparés
correspondant au gène réarrangé

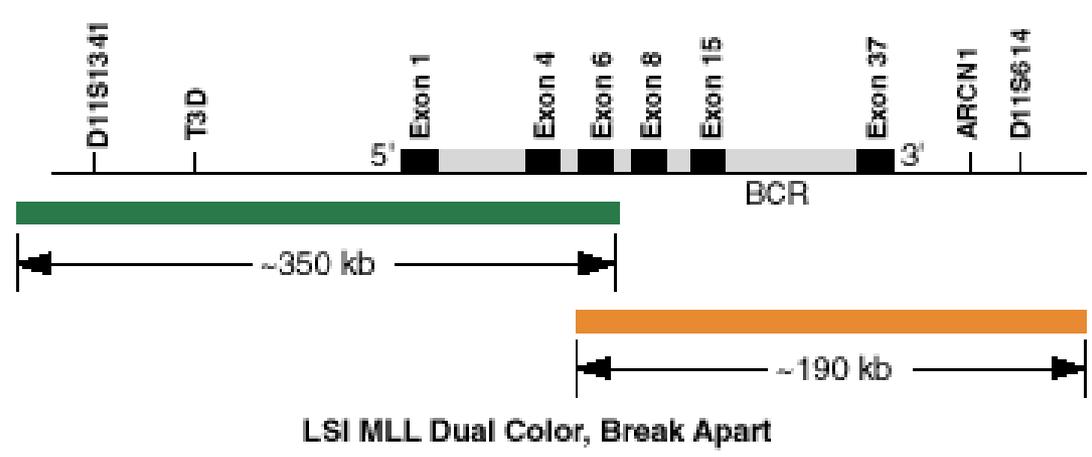
46,XX,t(9;11)(p23;q23)



Centromere

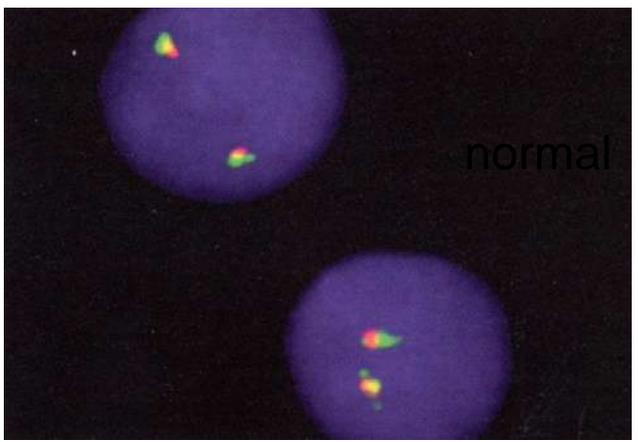
11q23 region

Telomere

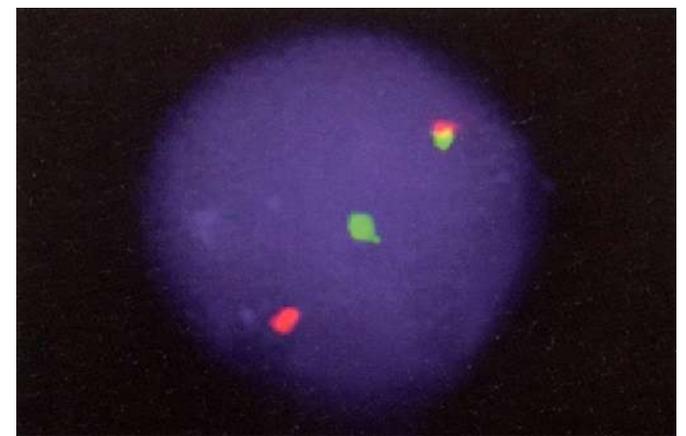


11q23 LSI MLL
 SpectrumGreen
 SpectrumOrange

Sonde spécifique du locus MLL



Noyaux normaux



Noyau avec translocation

MLL Vysis

der(11)

A fluorescence microscopy image of a karyotype. The chromosomes are stained blue. A specific derivative chromosome, der(11), is highlighted with a green signal. The label 'der(11)' is placed to the right of this chromosome.

der(9)

A fluorescence microscopy image of a karyotype. The chromosomes are stained blue. A specific derivative chromosome, der(9), is highlighted with a red signal. The label 'der(9)' is placed to the left of this chromosome.

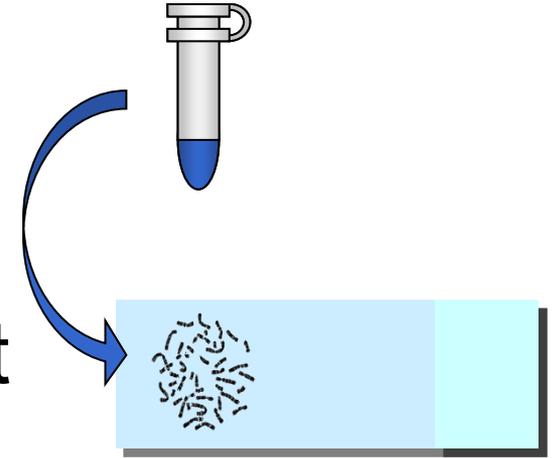
11

A fluorescence microscopy image of a karyotype. The chromosomes are stained blue. A normal chromosome 11 is highlighted with a blue signal. The label '11' is placed to the right of this chromosome.

MLL

A fluorescence microscopy image of a karyotype. The chromosomes are stained blue. The MLL gene location on chromosome 11 is indicated by a cluster of colored signals (green, red, and blue). The label 'MLL' is placed below the chromosome 11.

La FISH (6)



En pratique:

- Sélection d'une lame du patient
- Choix de la sonde
- Dénaturation des chromosomes (simple brin)
- Dénaturation de la sonde (simple brin)
- Dépôt de la sonde sur la lame
- Hybridation à 37°C durant 18 heures
- Lavage
- Contre-coloration au DAPI (chromosomes)
- Lecture et analyse

Comparaison caryotype/FISH

CARYOTYPE

- Long (2 à 4 jours)
- Vision globale du génome
- Mitoses indispensables
- Nombre de mitoses limité

FISH

- Rapide (24h) avec sonde commerciale
- Une sonde = une anomalie
- Mitoses et/ou noyaux
- Nombreux noyaux
- Coût +++

Complémentarité des 2 techniques

Quelles anomalies chromosomiques?

2 grandes catégories:

- Anomalie du nombre des chromosomes
 - Perte d'un chromosome = monosomie
ex: monosomie 7 dans les LAM et les SMD
 - Gain de chromosome = trisomie (3 copies), tétrasomie (4 copies)...
ex: trisomie 8 (LAM,SMD)
- Anomalie de structure
 - **Translocation +++**
ex: t(9;22) (LMC,LAL B), t(15;17)(LAM3)
 - Délétion: ex del(17p) dans les LLC
 - Inversion: inv(16) dans LAM4 éosino
 - Autres: marqueurs, double-minute.....

Conséquences des anomalies chromosomiques

Activation d'un ou de plusieurs gènes intervenant dans la prolifération et/ou la différenciation cellulaire

2 grands mécanismes:

- formation d'un gène de fusion qui sera transcrit (détectable en RT-PCR)
ex: $t(9;22) \rightarrow BCR/ABL$, $t(15;17) \rightarrow PML/RARA$
- dérégulation de l'expression d'un gène « normal »
ex: $t(8;14)$ des BURKITT
→ hyper-expression de c-MYC

CARACTERISTIQUES DES ANOMALIES DES LEUCEMIES AIGUES

- ACQUISES (\neq constitutionnelles)
- CLONALES
- PRIMAIRES :
récurrentes et spécifiques +++, leucémogénèse
- SECONDAIRES:
surajoutées à l'anomalie primaire,
aléatoires et non spécifiques (le plus souvent),
témoin de l'évolution naturelle de la leucémie

Fréquences des anomalies cytogénétiques dans les
LAM~60% dans les LAM

Classification OMS des LAM

Quatre grandes catégories:

- LAM avec anomalies génétiques récurrentes
- LAM avec « dysplasie multilignée »
- LAM secondaires aux traitements
- LAM sans autre spécificité (LAM NOS) = LAM non classables dans l'une des trois premières catégories → équivalent de la classification FAB

et - Sarcome myéloïde

- Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down (trisomie 21 constitutionnelle)
- « Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms »

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

~ 60% des LAM présentent des anomalies chromosomiques

- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes:

t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); CBF β -MYH11

t(15;17)(q24;q21); PML-RARA et variantes

t(9;11)(p22q23); MLLT3-MLL

t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

- Biologie moléculaire: 2 entités provisoires

LAM avec mutation de NPM1

LAM avec mutation de CEBP α

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes:

t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); CBF β -MYH11

t(15;17)(q24;q21); PML-RARA et variantes

t(9;11)(p22q23); MLLT3-MLL

t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

- Biologie moléculaire: 2 entités provisoires

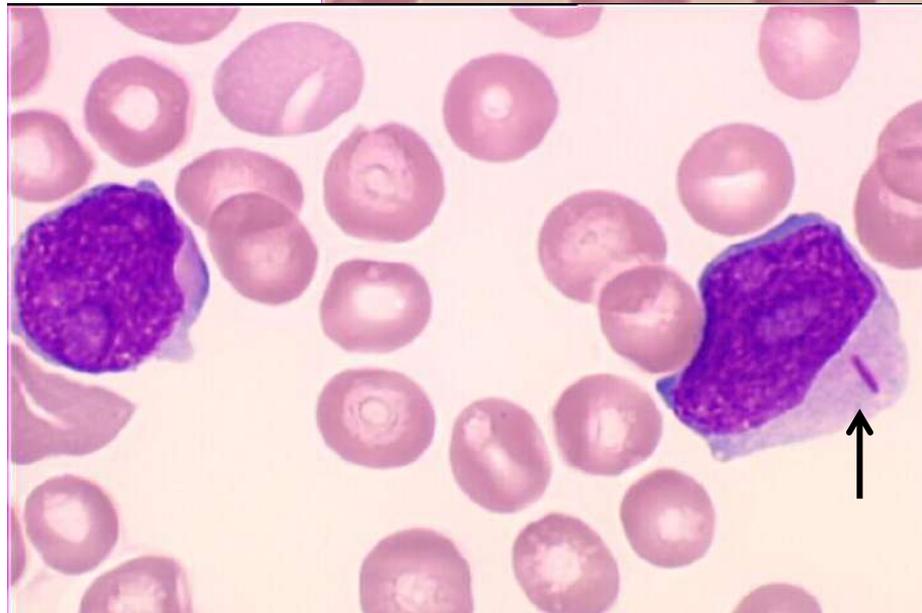
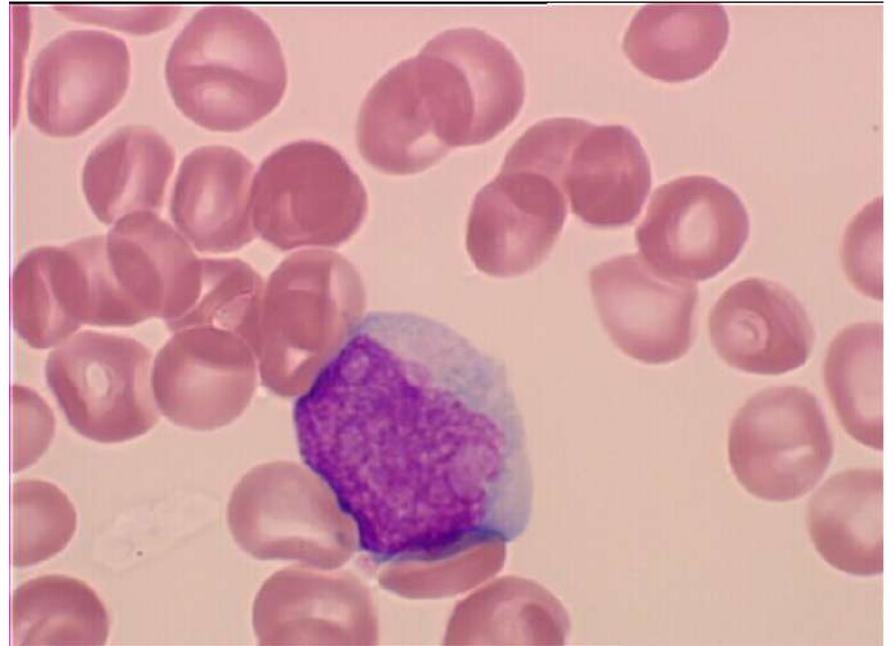
LAM avec mutation de NPM1

LAM avec mutation de CEBP α

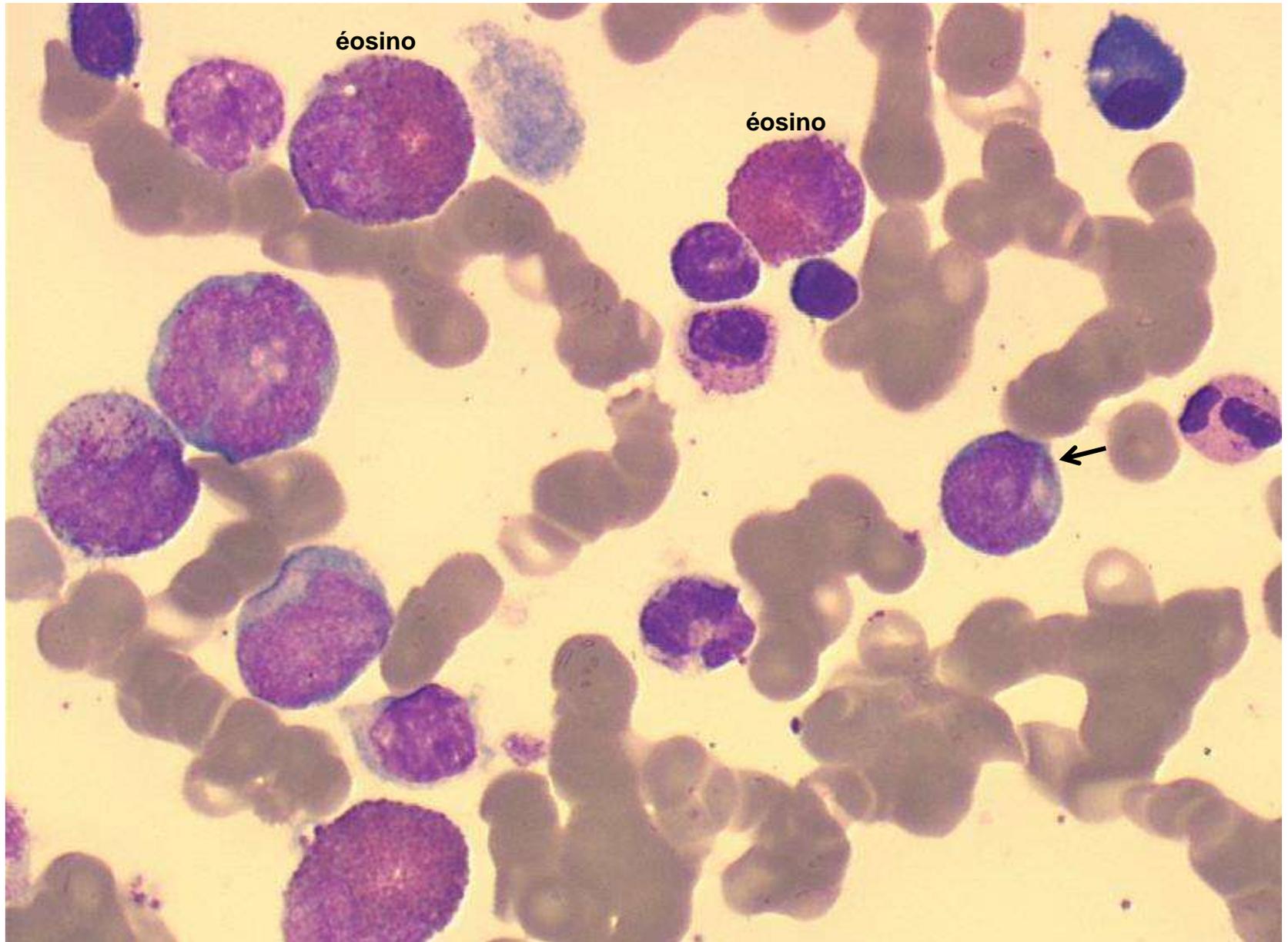
LAM avec translocation t(8;21)(q22;q22) RUNX1- RUNX1T1 (AML1-ETO)

- Fréquence: 5% des LAM et environ 10% des LAM2. Très rarement LAM1 ou LAM4.
- Cytologie: LAM 2 avec morphologie particulière
Blastes de grande taille à cytoplasme abondant avec un corps d'Auer unique et long, dysgranulopoïèse, présence de mastocytes et précurseurs éosinophiles augmentés.
- Immunophénotype:
co-expression d'un marqueur lymphoïde (CD19) et d'un marqueur marqueur myéloïde (CD13 ou CD33).

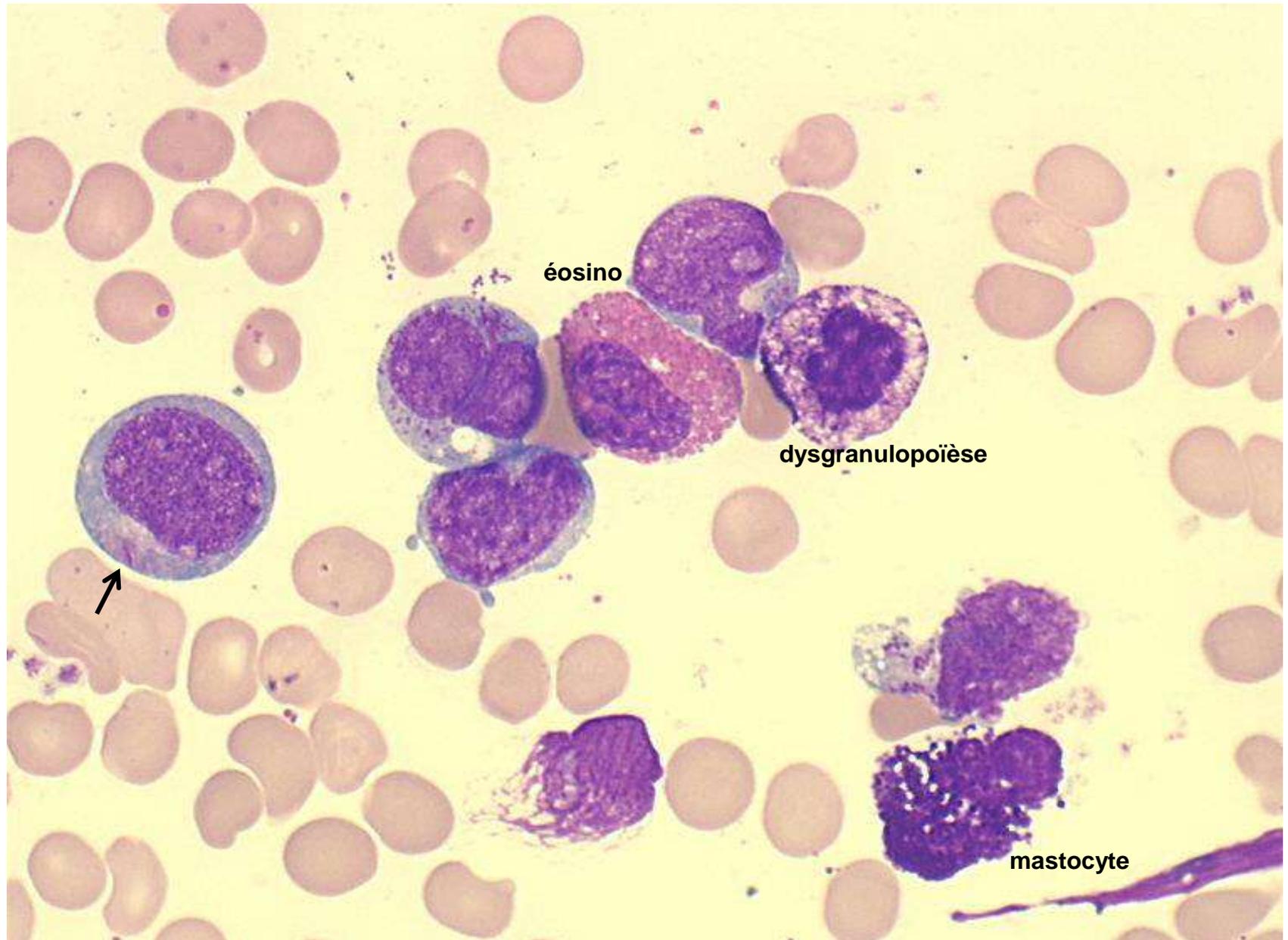
LAM 2 sang X 100



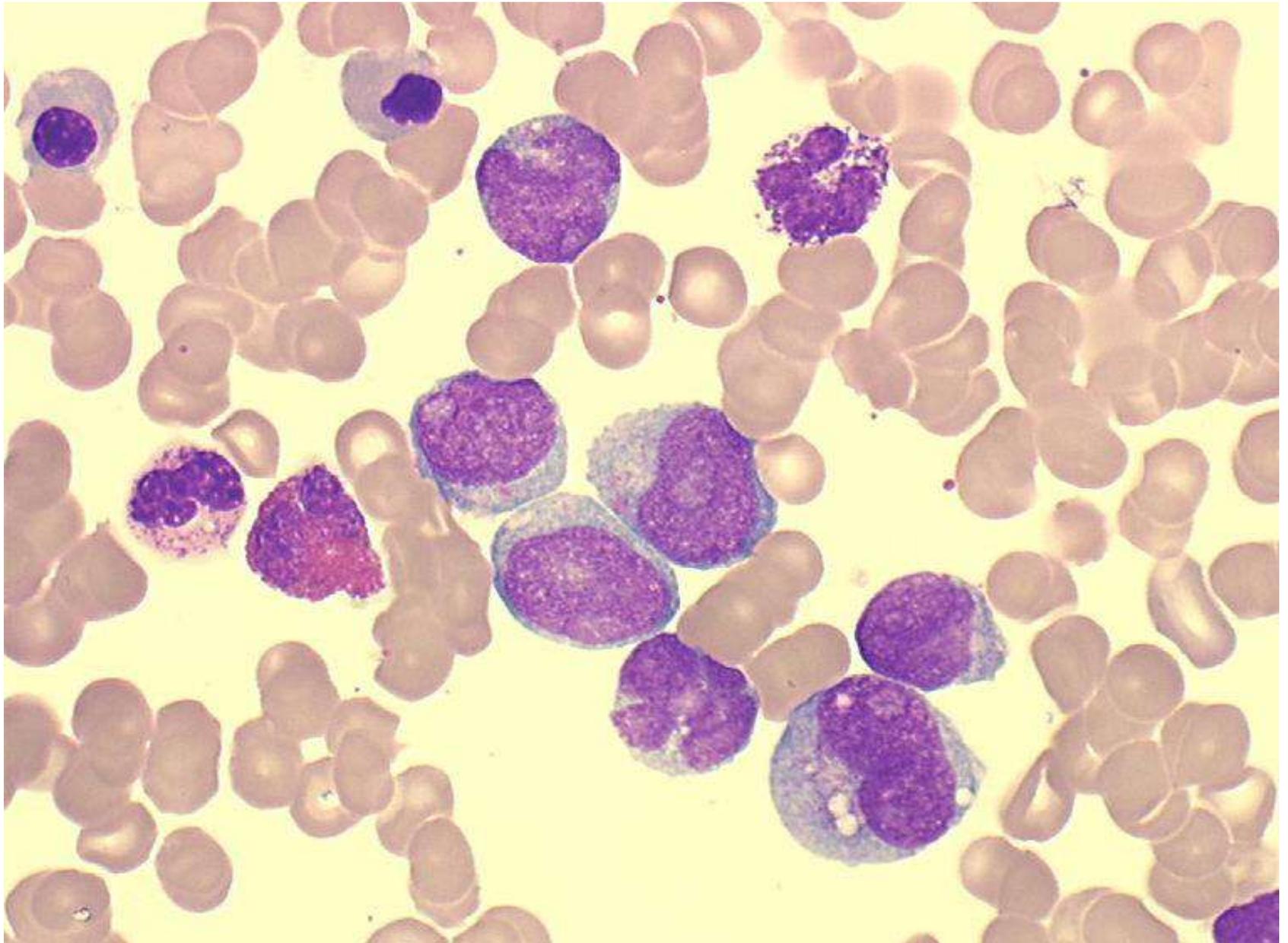
LAM 2 moelle X 50



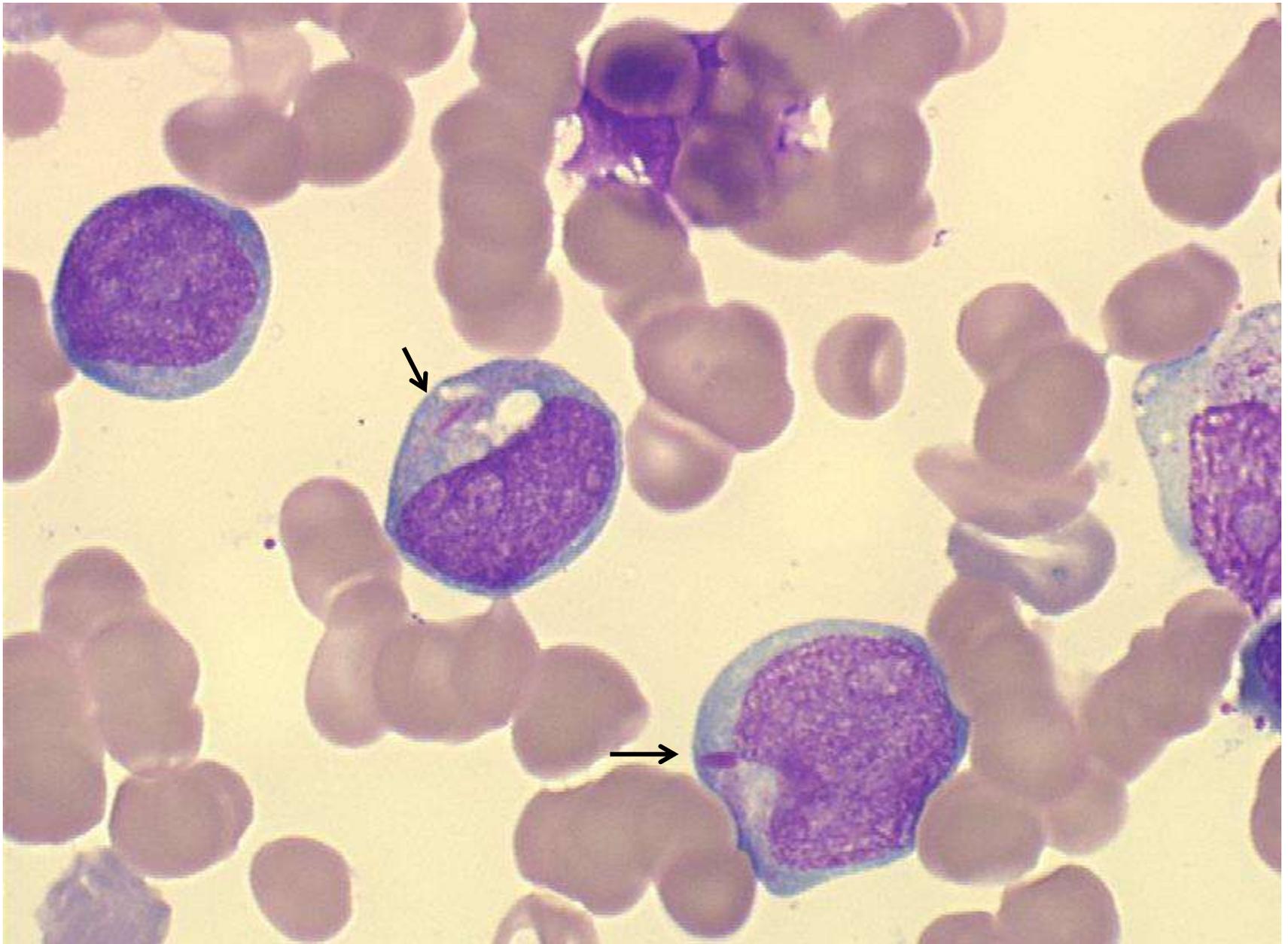
LAM 2 moelle X 50



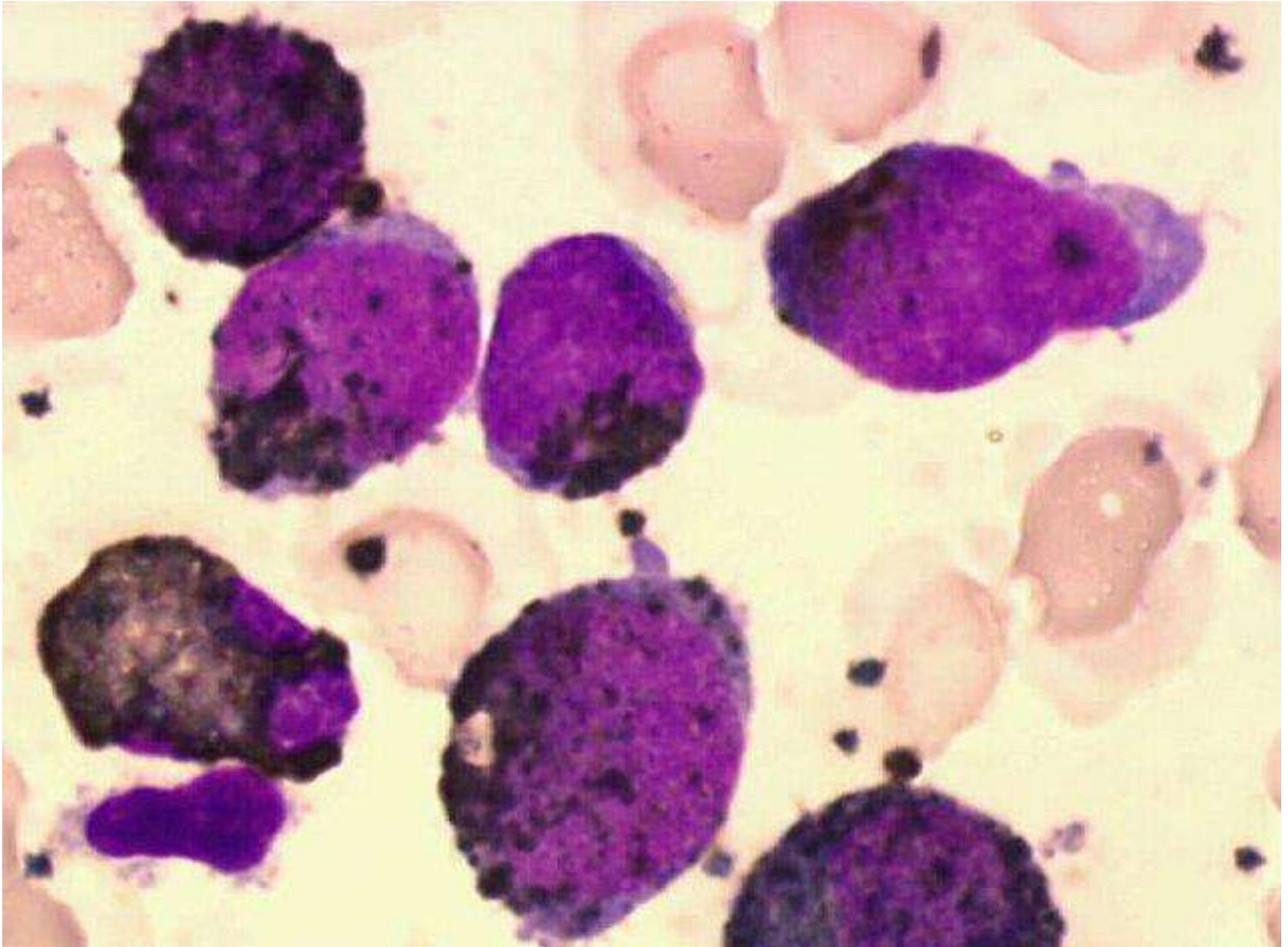
LAM 2 moelle X 50



LAM 2 moelle X 100



Moëlle x 100: coloration des peroxydases



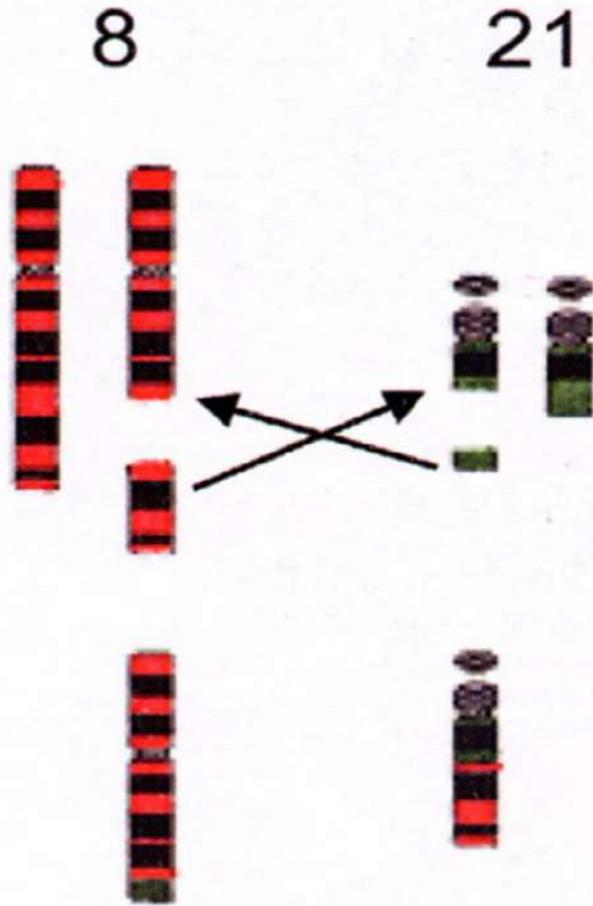
LAM avec translocation t(8;21)(q22;q22) RUNX1- RUNX1T1 (AML1/ETO)

- Gènes:

RUNX1 (AML1, CBF α) en 21q22 et RUNX1T1 (ETO) en 8q22

- translocation → gène chimérique → anomalie de la régulation des gènes cibles de RUNX1
- Mise en évidence de la translocation:
Caryotype +/- FISH indispensable au diagnostic
RT-PCR maladie résiduelle +++
- Anomalies secondaires fréquentes: del(9q), -X ou -Y
- LAM de bon pronostic

IDEOGRAMME t(8;21)

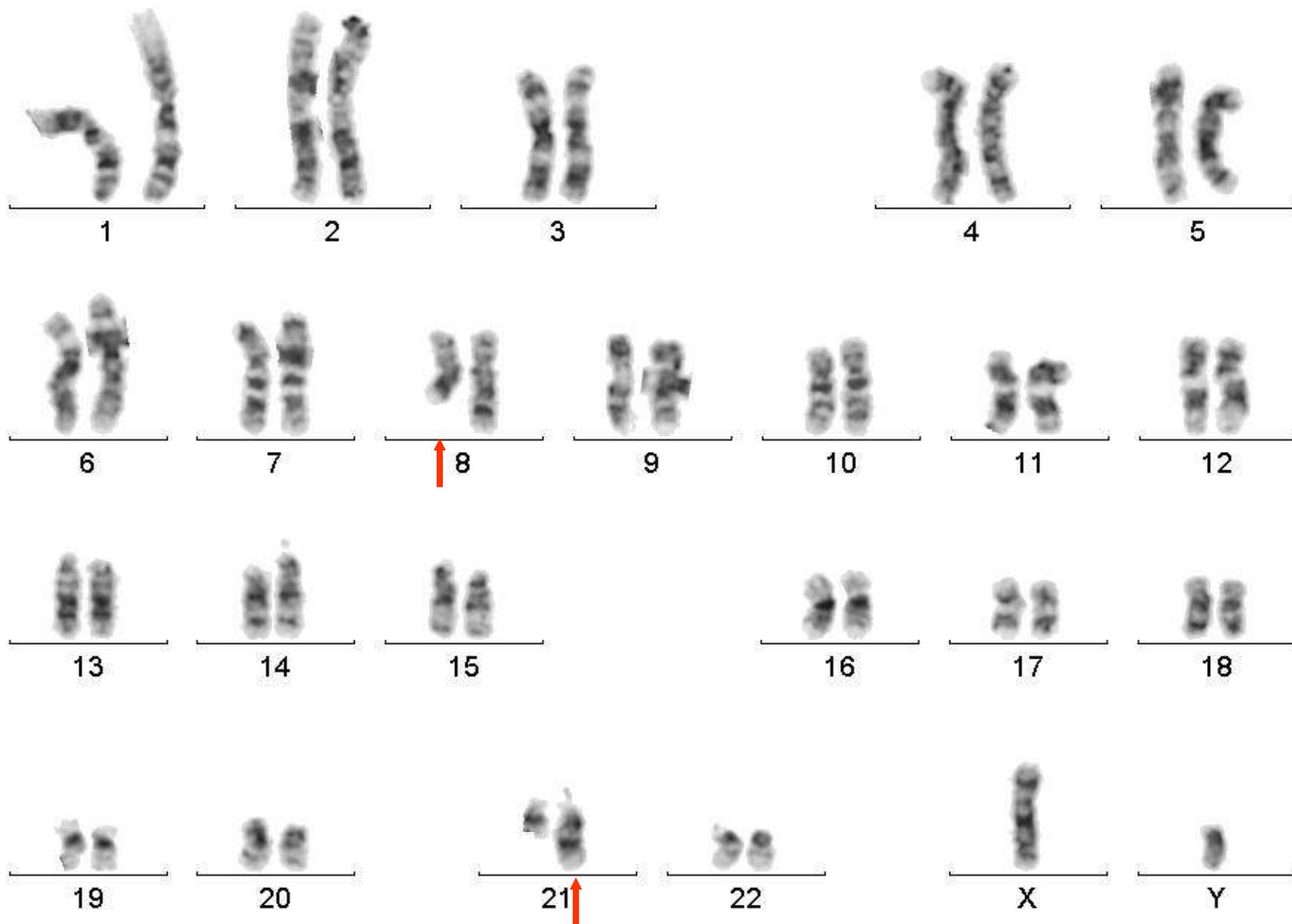


Conséquence:
fusion RUNX1- RUNX1T1
(AML1-ETO)

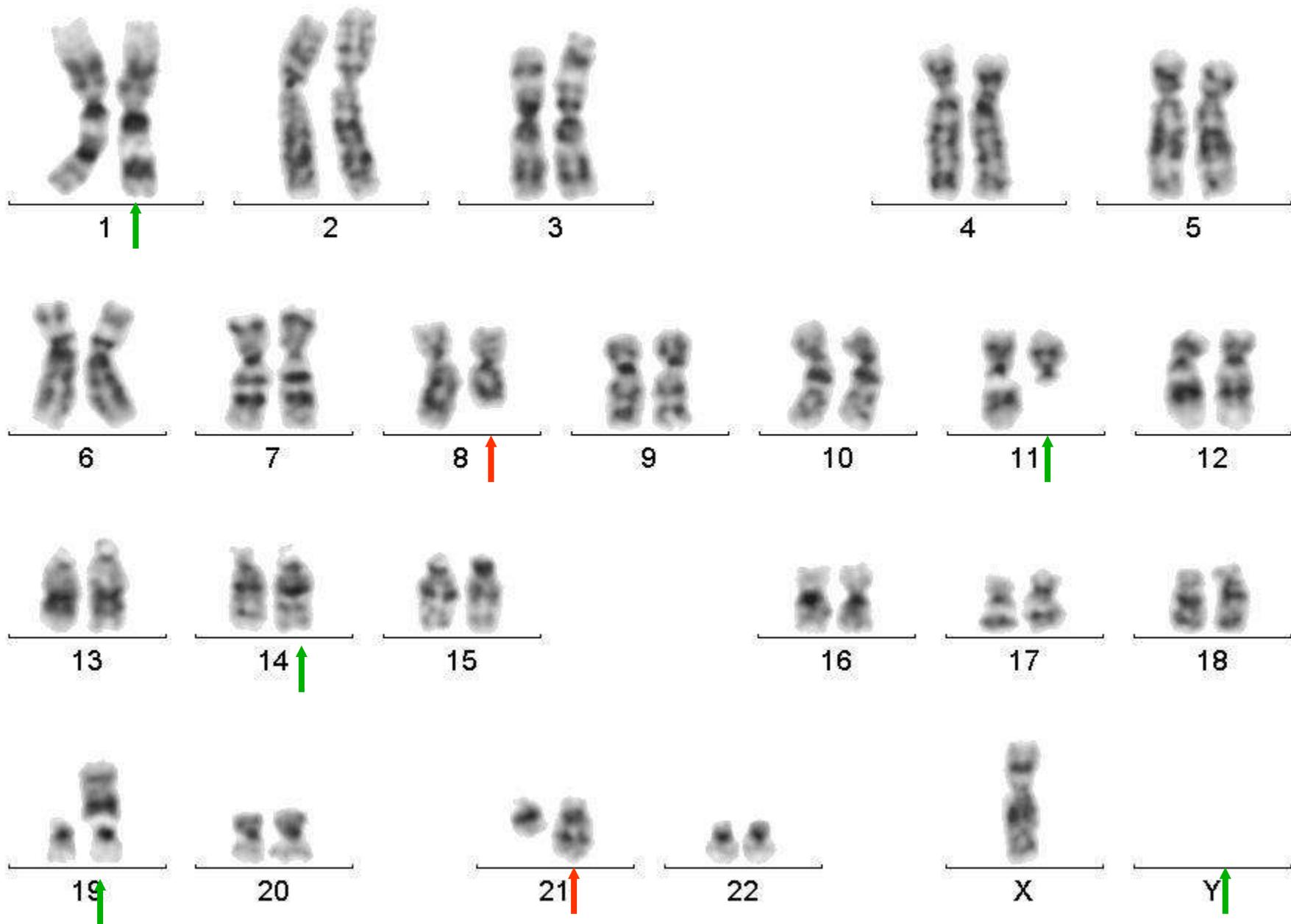
Chromosomes:
8q- et 21q+

t (8;21)(q22;q22)

46,XY,t(8;21)(q22;q22)



45,X,-Y,t(1;14;19;11)(q21;q11;p13;q11),t(8;21)(q22;q22)



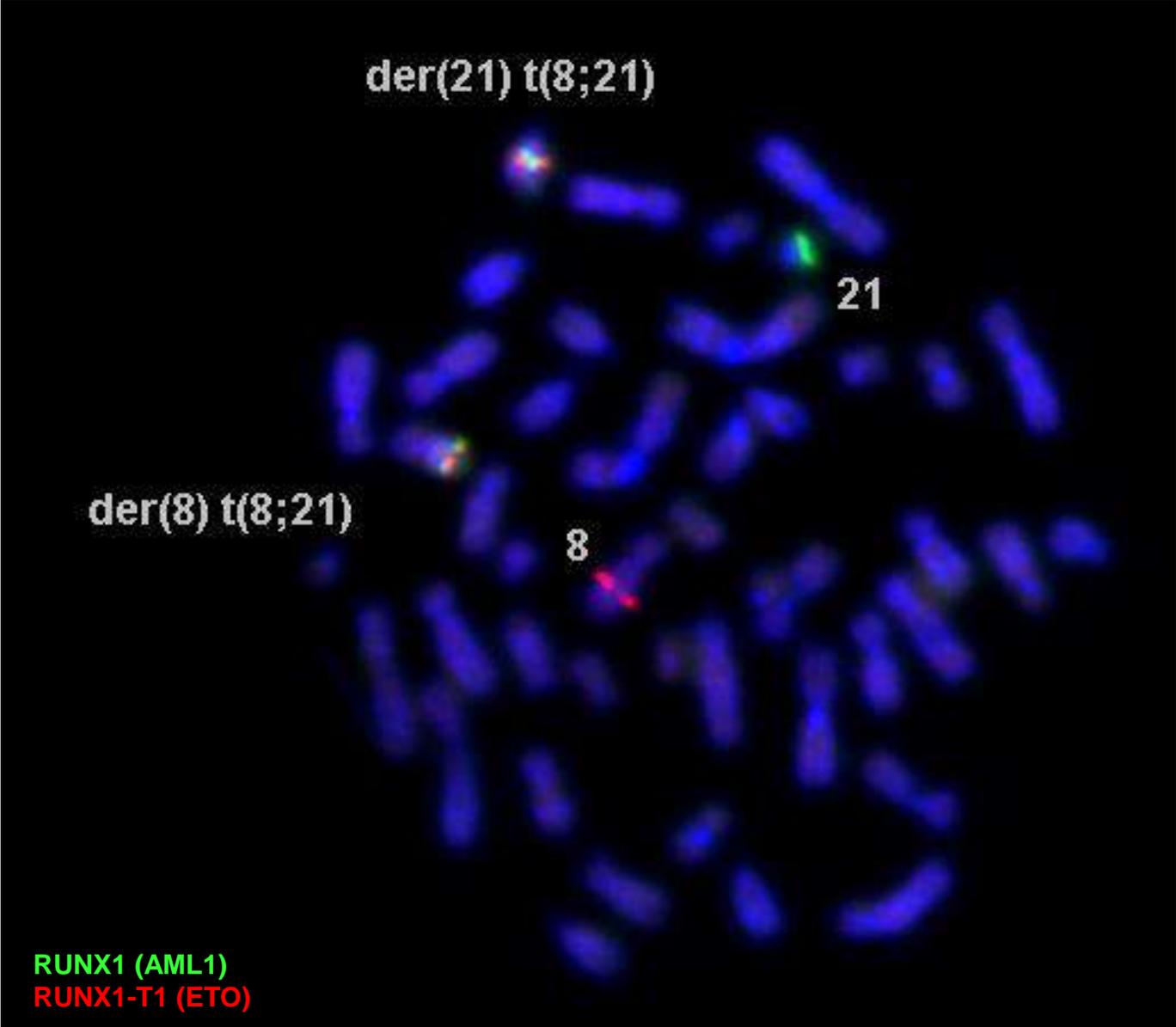
der(21) t(8;21)

21

der(8) t(8;21)

8

RUNX1 (AML1)
RUNX1-T1 (ETO)



LAM avec anomalies génétiques récurrentes

- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes:

t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); CBF β -MYH11

t(15;17)(q24;q21); PML-RARA et variantes

t(9;11)(p22q23); MLLT3-MLL

t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

- Biologie moléculaire: 2 entités provisoires

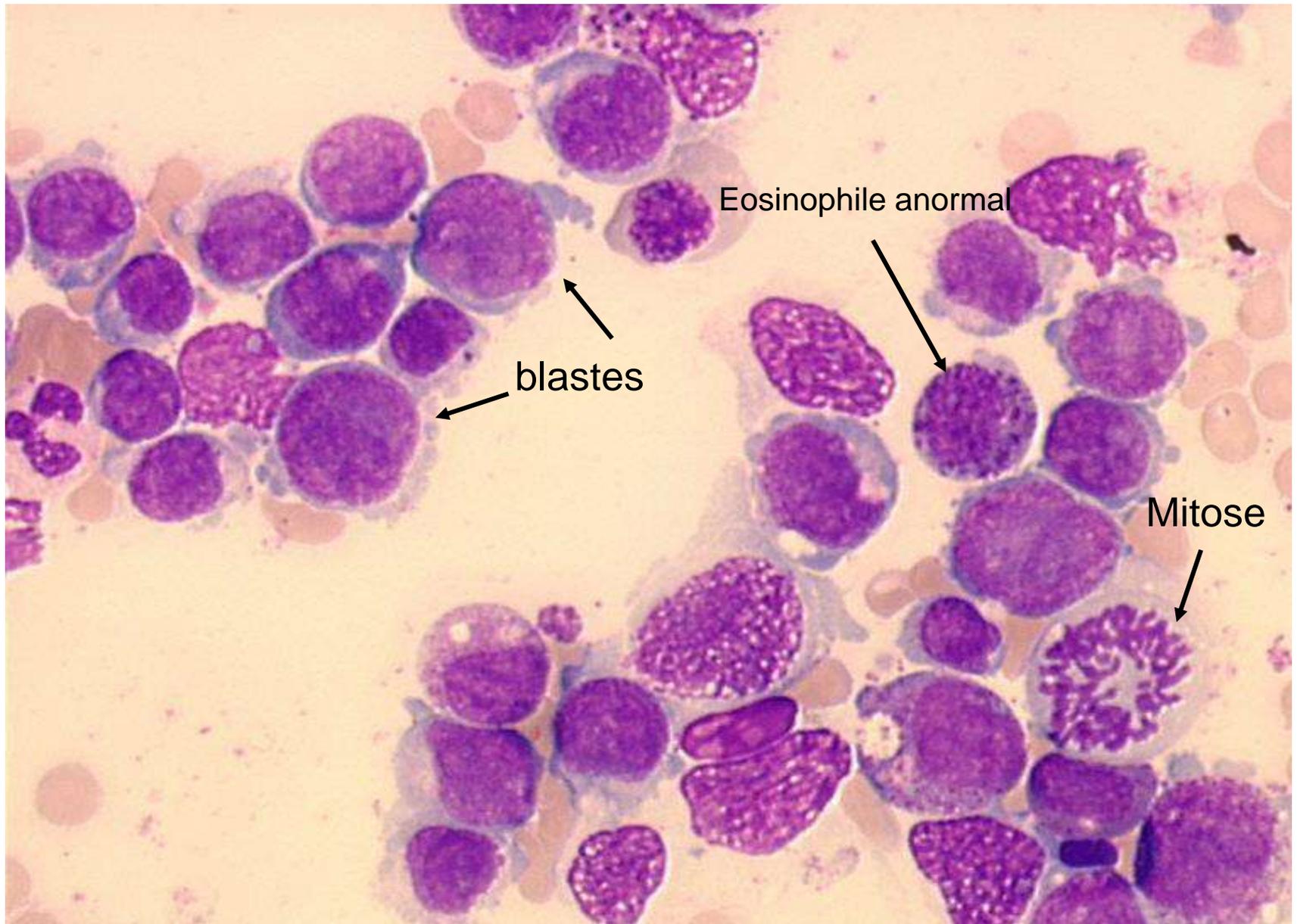
LAM avec mutation de NPM1

LAM avec mutation de CEBP α

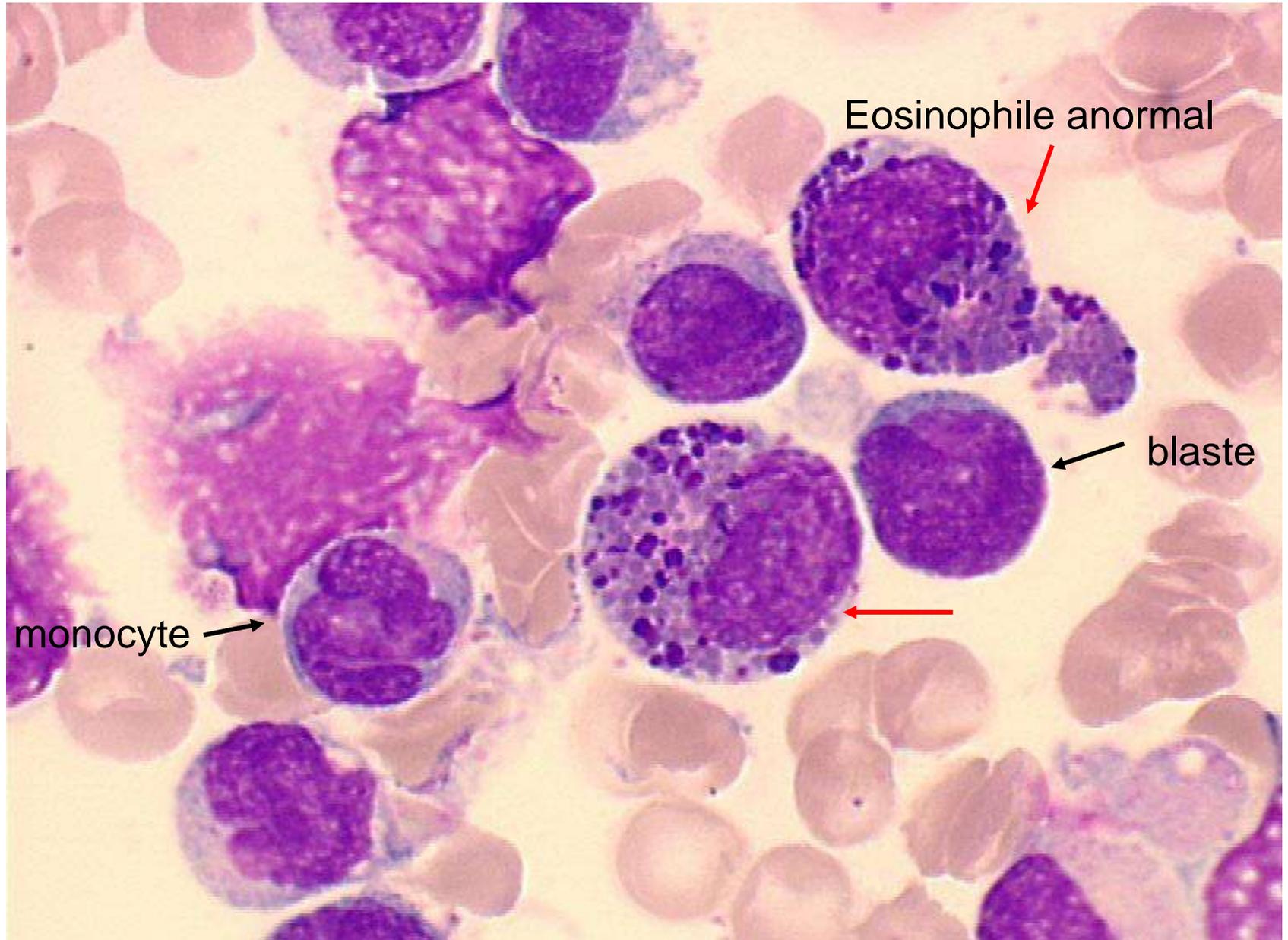
LAM avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p16;22) CBF β /MYH11

- Fréquence: 10 à 12% des LAM, 20 % des LAM 4 et surtout LAM4-éosino. Rarement dans LAM 5.
- Cytologie: LAM4-éosino +++
 - **LAM 4**: leucémie aigue myélo-monocytaire
sang > 5 10.9/l monocytes et promonocytes ou
moelle > 20% de monocytes
Leucémies souvent hyperleucocytaires
 - **LAM4-éosino**: LAM 4 avec présence de granuleux
éosinophiles immatures comportant de grosses granulations
violette foncées et d'éosinophiles avec un noyau pseudo-
Pelger.
- Cytochimie: peroxydases ++ (lignée granuleuse)
estérase + (monocytes)

LAM 4 eosino.(inv16): moelle X 50



M 4 eosino: moelle X 100



LAM avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p16;22) CBF β /MYH11

- Gènes:

MYH11 en 16p13 (chaîne lourde de la myosine du muscle lisse)

CBF β en 16q22 (sous unité bêta du Core Binding Factor)

Inversion \rightarrow gène chimère \rightarrow accumulation de multimères CBF β -MYH11/CBF β dans le noyau

- Mise en évidence :

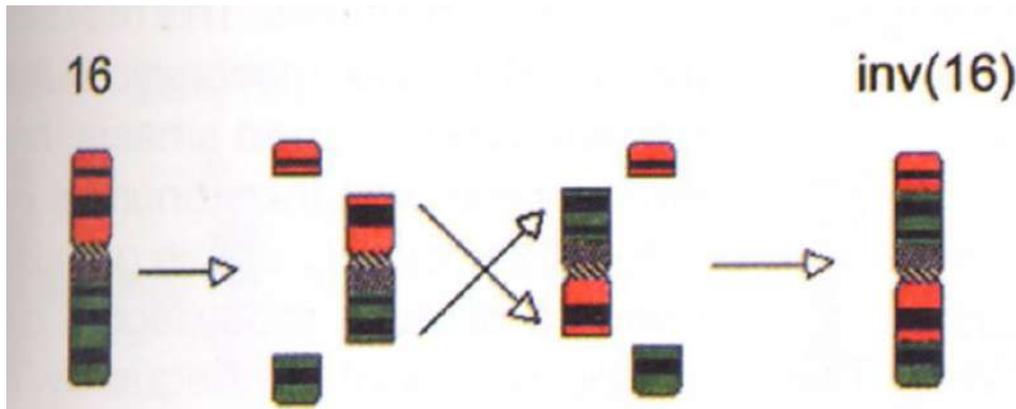
Difficile à voir au caryotype \rightarrow FISH +++

RT-PCR : plusieurs transcrits de fusion

- Anomalies secondaires: trisomie 22, del(7q)
- LAM de bon pronostic

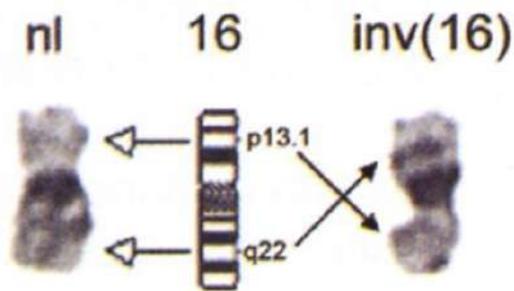
IDEOGRAMME

inv(16)(p13q22)

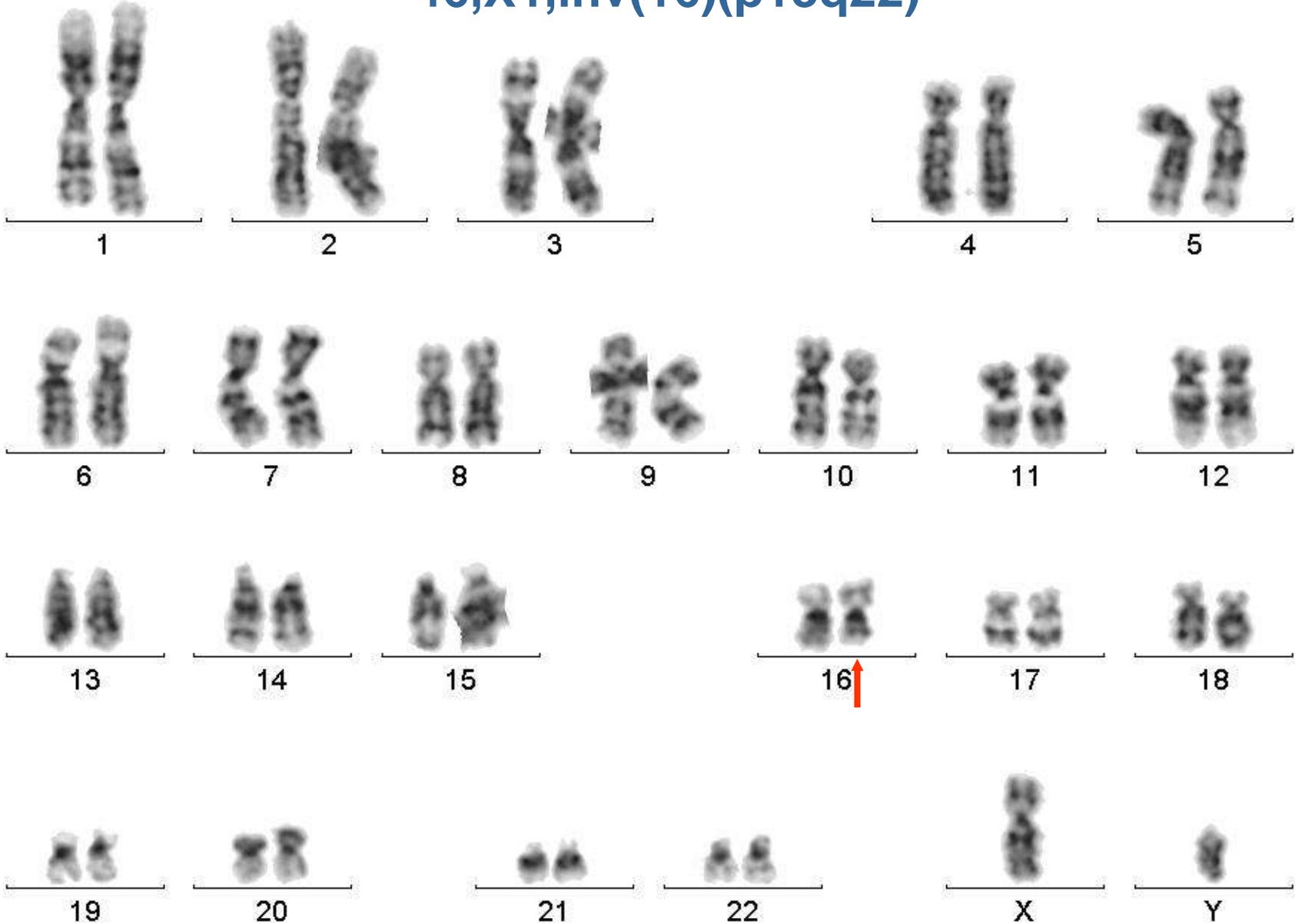


Conséquences:
fusion MYH11/CBF β

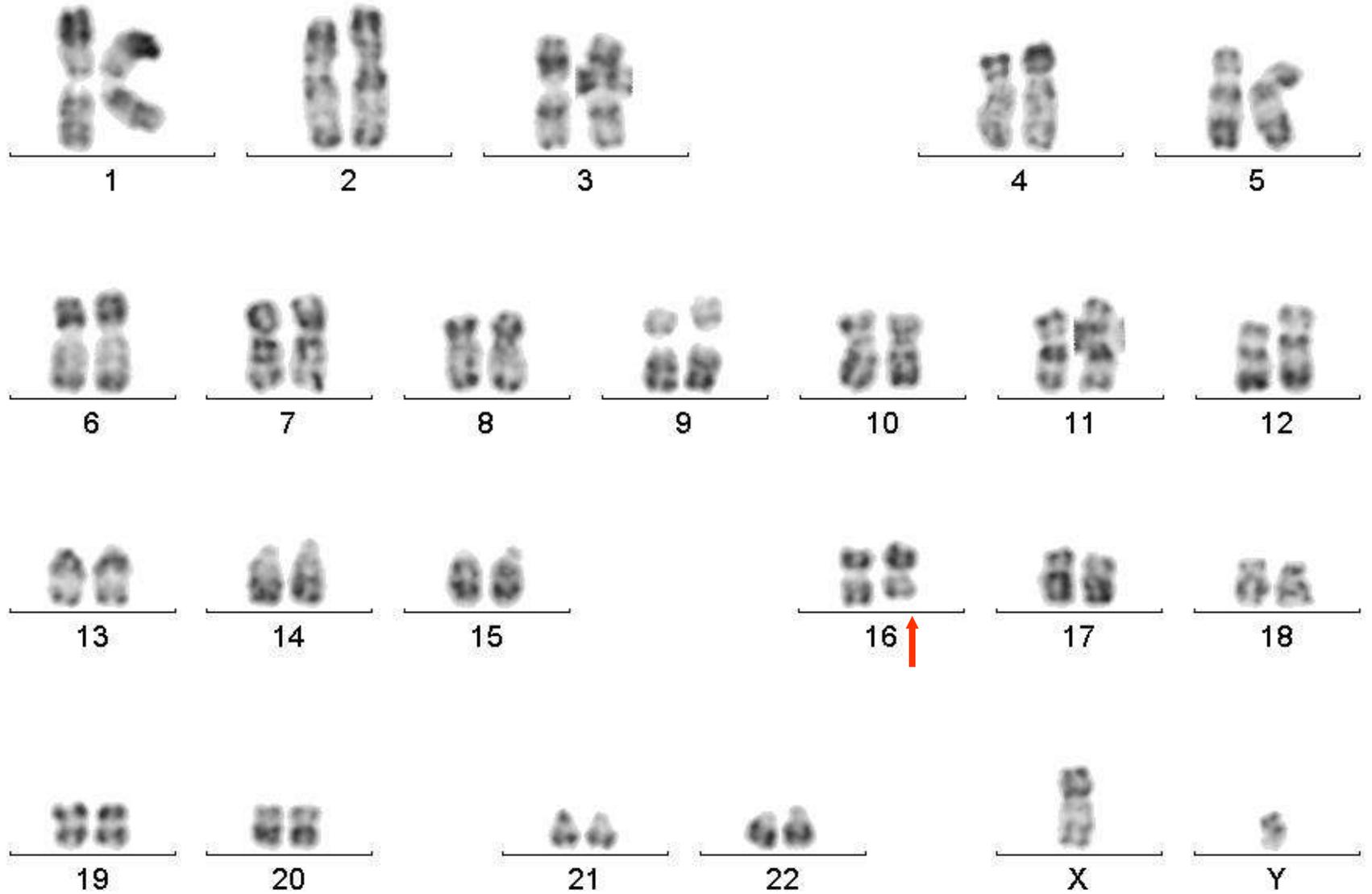
Chromosome peu modifié
→ visible surtout en
bandesG

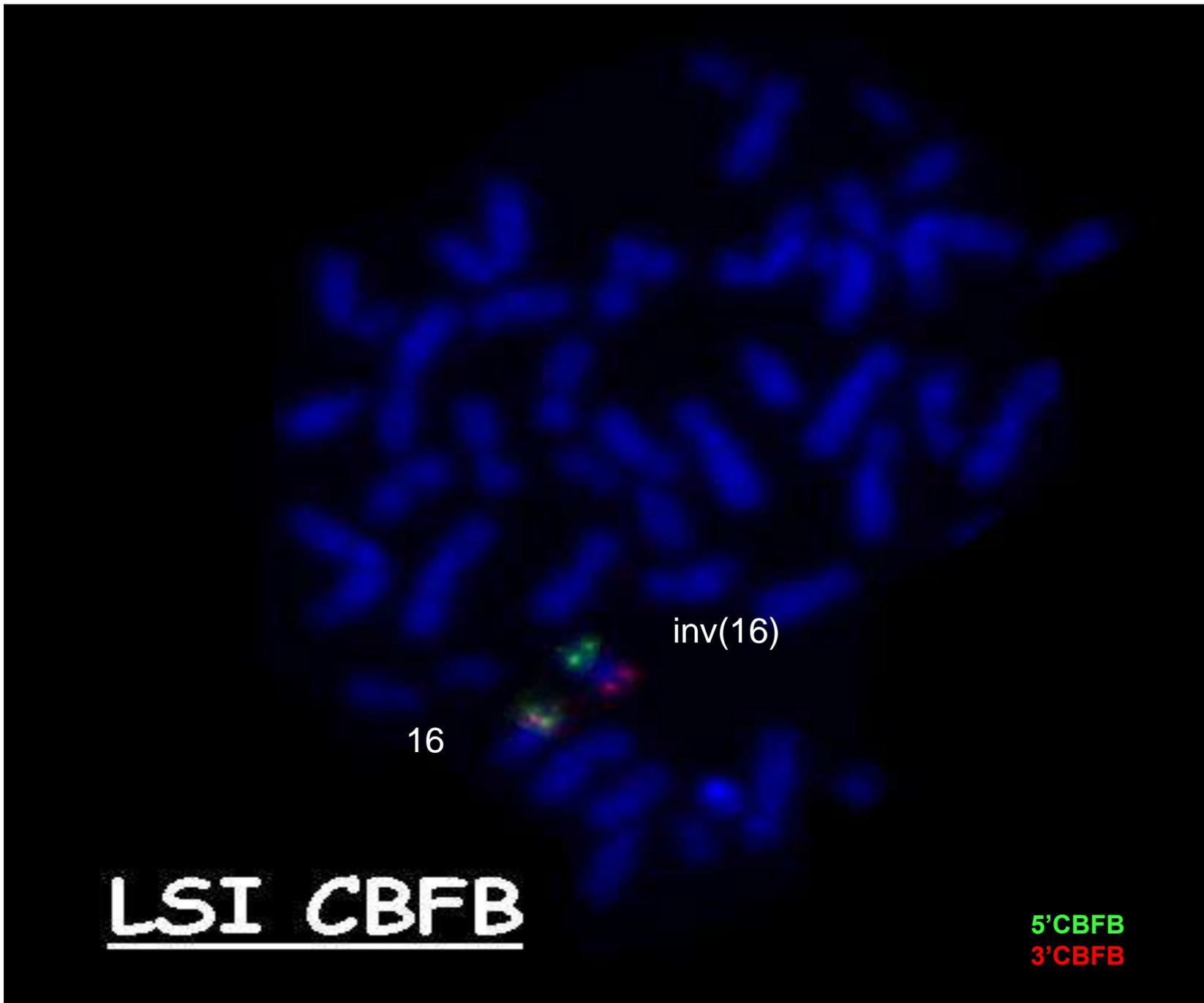


46,XY,inv(16)(p13q22)



46,XY,inv(16)(p13q22)





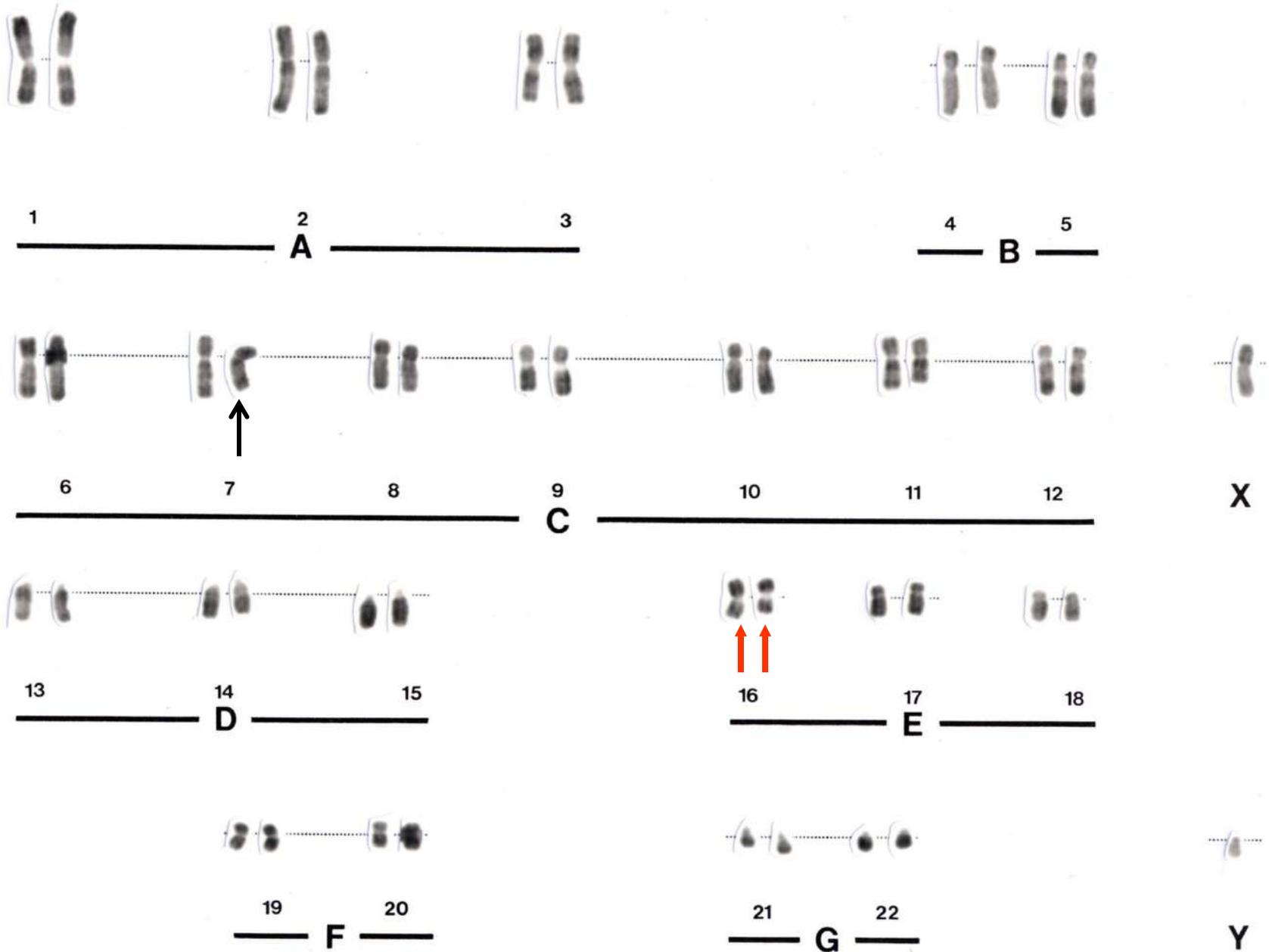
inv(16)

16

LSI CBFB

5'CBFB
3'CBFB

46,XY,del(7q),t(16;16)(p13;q22)



LAM avec anomalies génétiques récurrentes

- LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes:

t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1

inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); CBF β -MYH11

t(15;17)(q24;q21); PML-RARA et variantes

t(9;11)(p22q23); MLLT3-MLL

t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1

t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

- Biologie moléculaire: 2 entités provisoires

LAM avec mutation de NPM1

LAM avec mutation de CEBP α

LAP avec t(15;17)(q22;q21) PML/RARa et variants

5 ~8% des LAM

t(15;17): anomalie spécifique des LAM3 (LA promyélocytaires)
classiques ou variantes

- 92% des LAM3 ont une translocation classique
- 2% variant: t(11;17)(q23;q21)
t(5;17)(q32;q21)
t(11;17)(q13;q21)
t(17;17)(q11.2;q21)
- 2% translocation cryptique
- 4% insertion

LAP avec t(15;17)(q24;q21) PML/RARa et variants

Cytologie: LAM 3

- **Forme classique:**

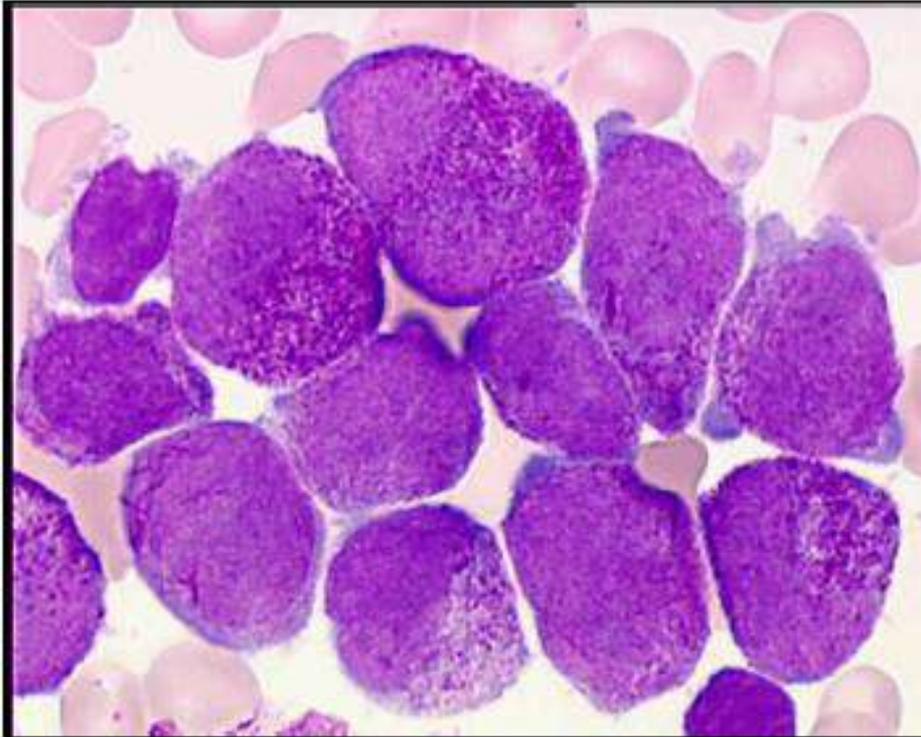
Promyélocytes anormaux avec présence de corps d'Auer en fagots dans certains d'entre eux.

Présence de grosses granulations cytoplasmiques rouges ou pourpres très foncées faisant disparaître le noyau souvent dystrophique (réniforme voir bilobé) +/- granulations plus fines tassées vers le noyau.

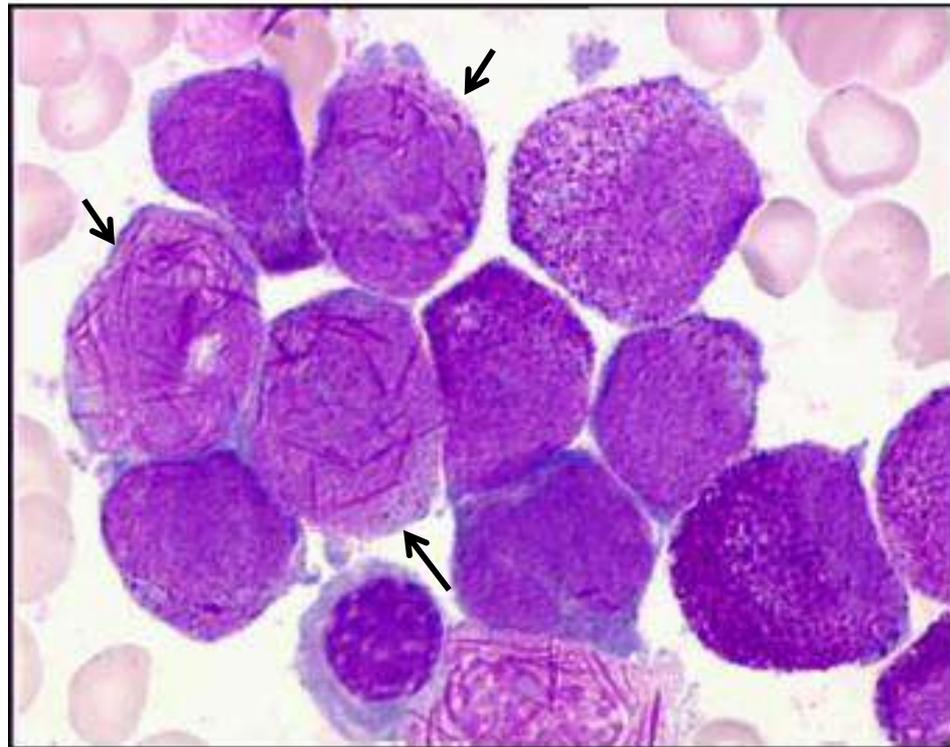
Leucémie habituellement leucopénique

- ### - **Forme variante:** cytoplasme peu granuleux et noyau bi ou multilobé → diagnostic différentiel avec leucémie monocytaire. Leucémie habituellement hyperleucocytaire.

LAM3 classique



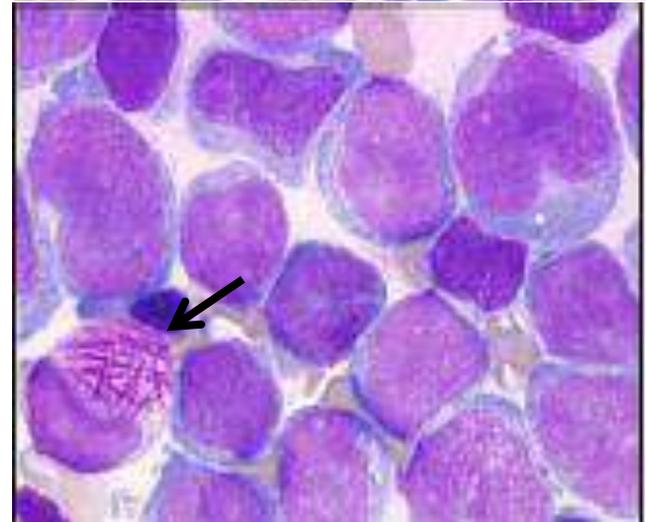
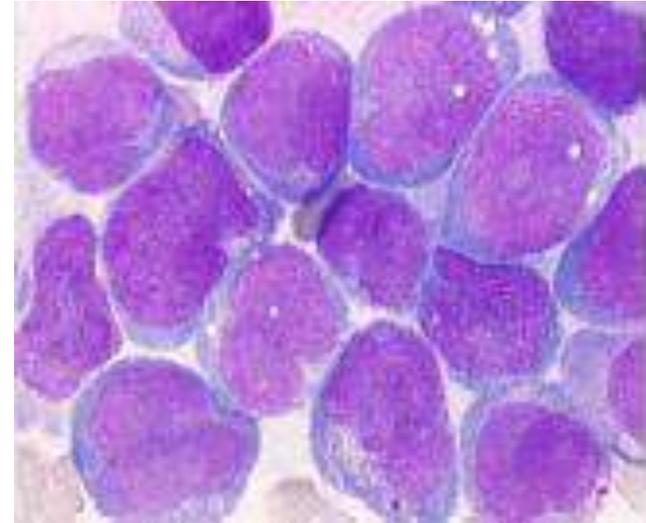
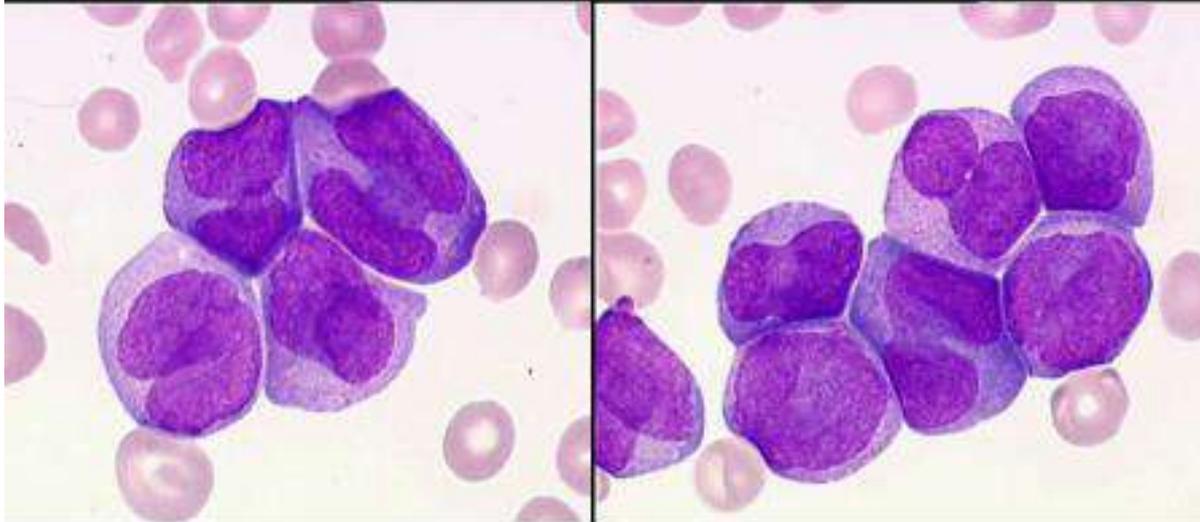
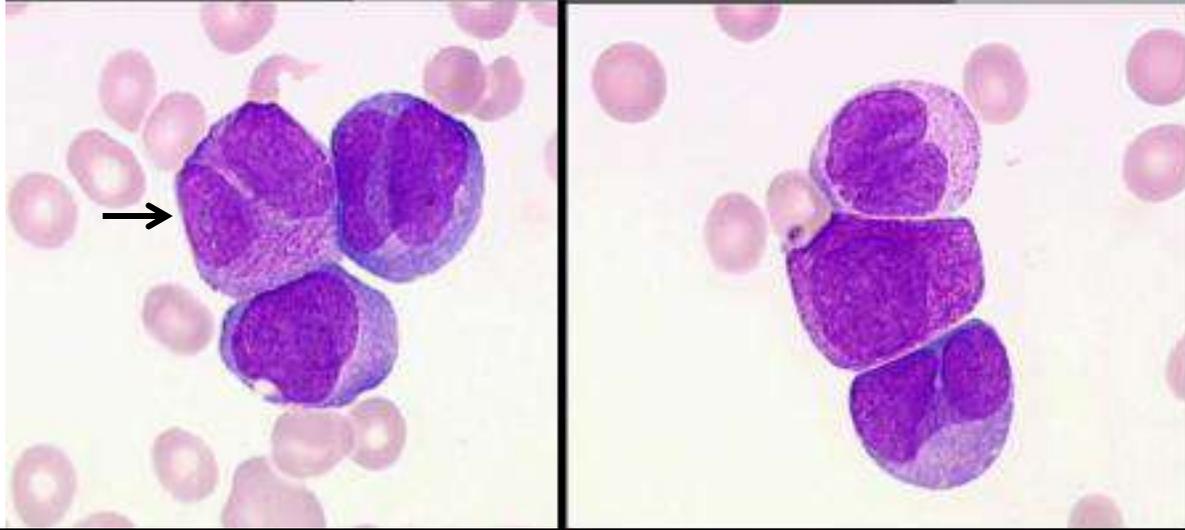
Promyélocytes anormaux avec nombreuses granulations masquant le noyau



Promyélocytes anormaux avec corps d'Auer en fagots

LAM3 variante

**Noyau bi ou trilobé, aspect en « ailes de papillon »,
rares blastes avec corps d'Auer en fagots**



Sang

moëlle

LAP avec t(15;17)(q24;q21) PML/RARa et variants

- Urgence diagnostique car risque de CIVD
- Immunophénotype: CD 34 et HLA-DR négatifs

- Gènes:

PML (promyelocytic leukemia) en 15q24

RARa (retinoid acid receptor alpha) en 17q21

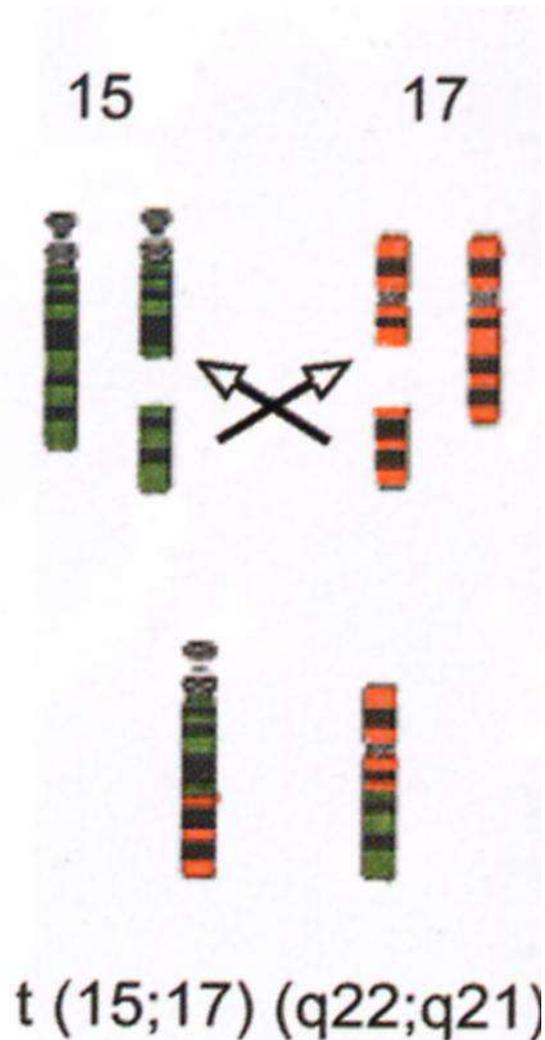
Le gène RARa est coupé dans le deuxième intron.

Le gène PML peut être coupé dans au moins 3 points différents: BCR1 (70%), BCR2 (51%), BCR3 (29%)

t(15;17) → gène chimère → récepteur RARa altéré

→ blocage au stade promyélocytaire de la différenciation de la voie granulocytaire. Pas d'effet sur la prolifération.

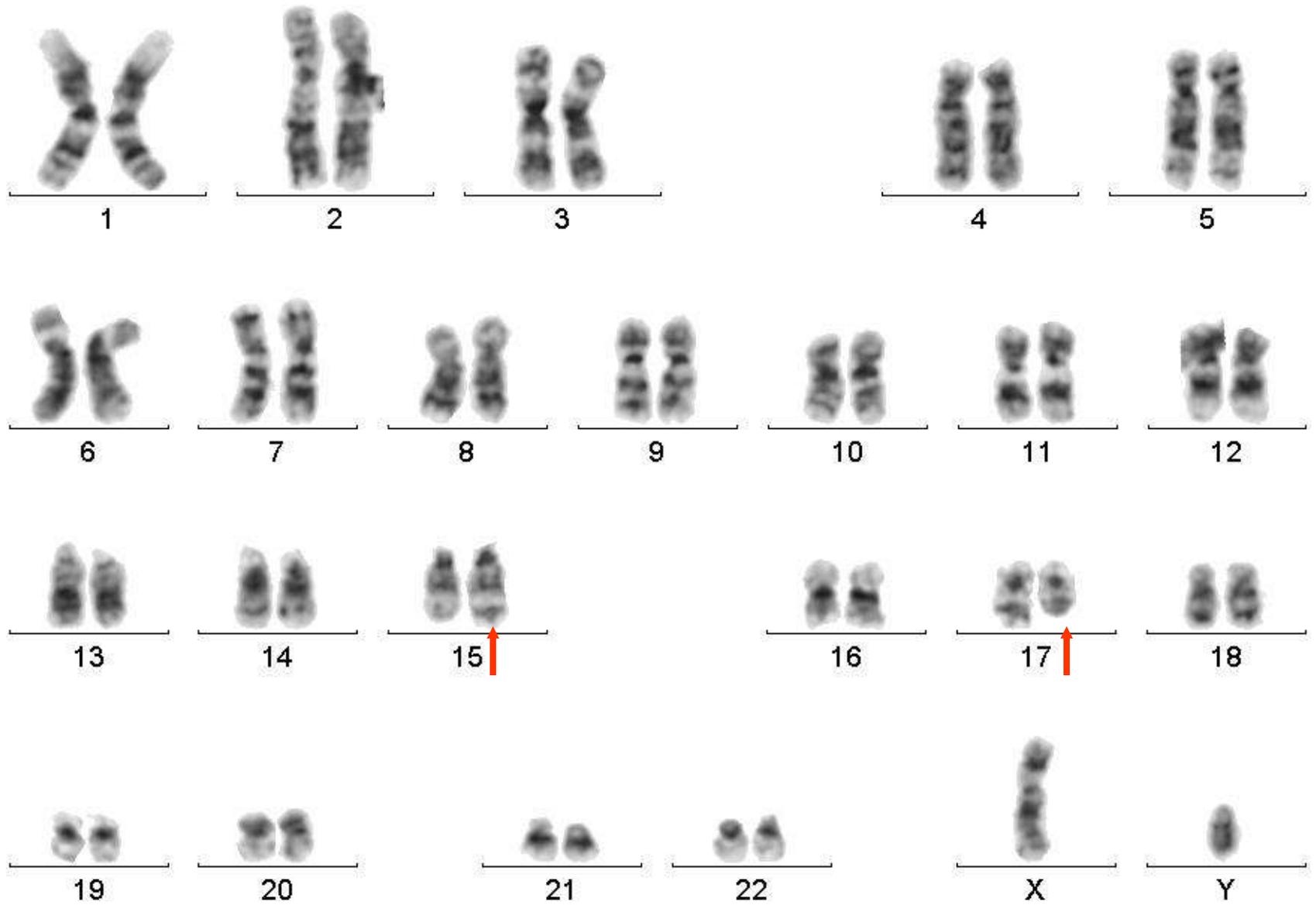
IDEOGRAMME t(15;17)



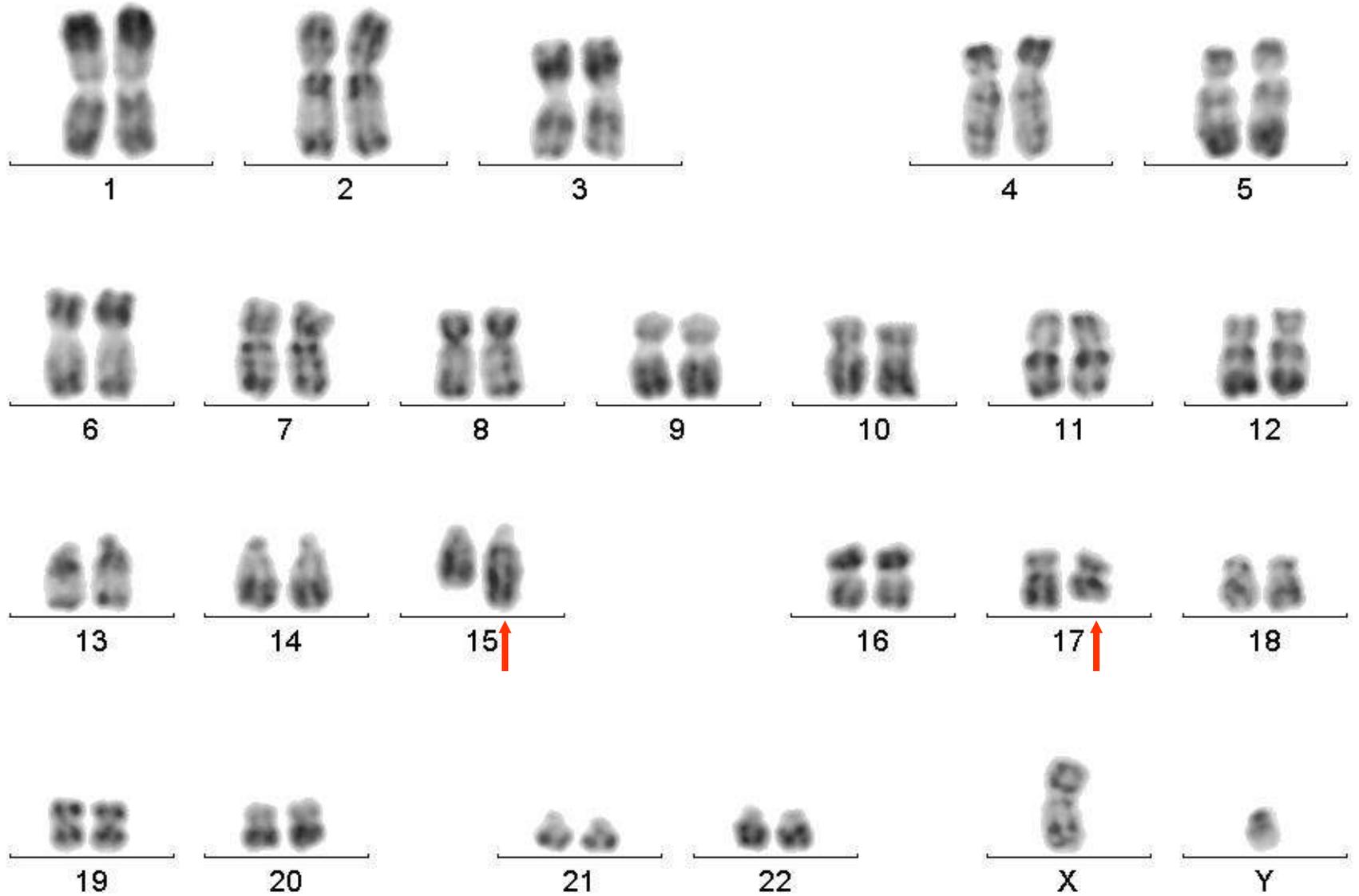
Conséquence:
Fusion PML/RARa

Chromosome: 15q+ et 17q-

46,XY,t(15;17)(q22;q21)



46,XY,t(15;17)(q22;q21)

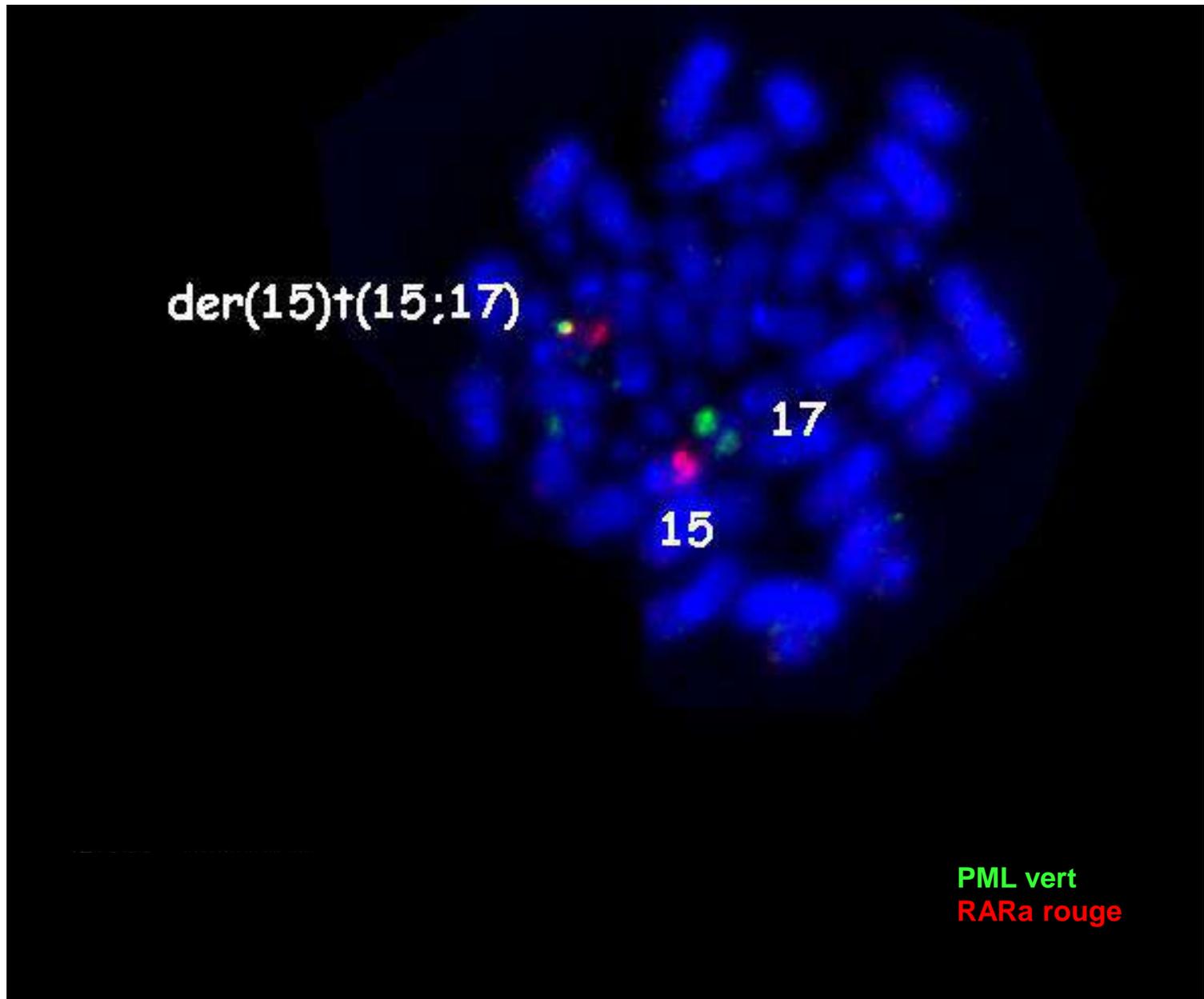


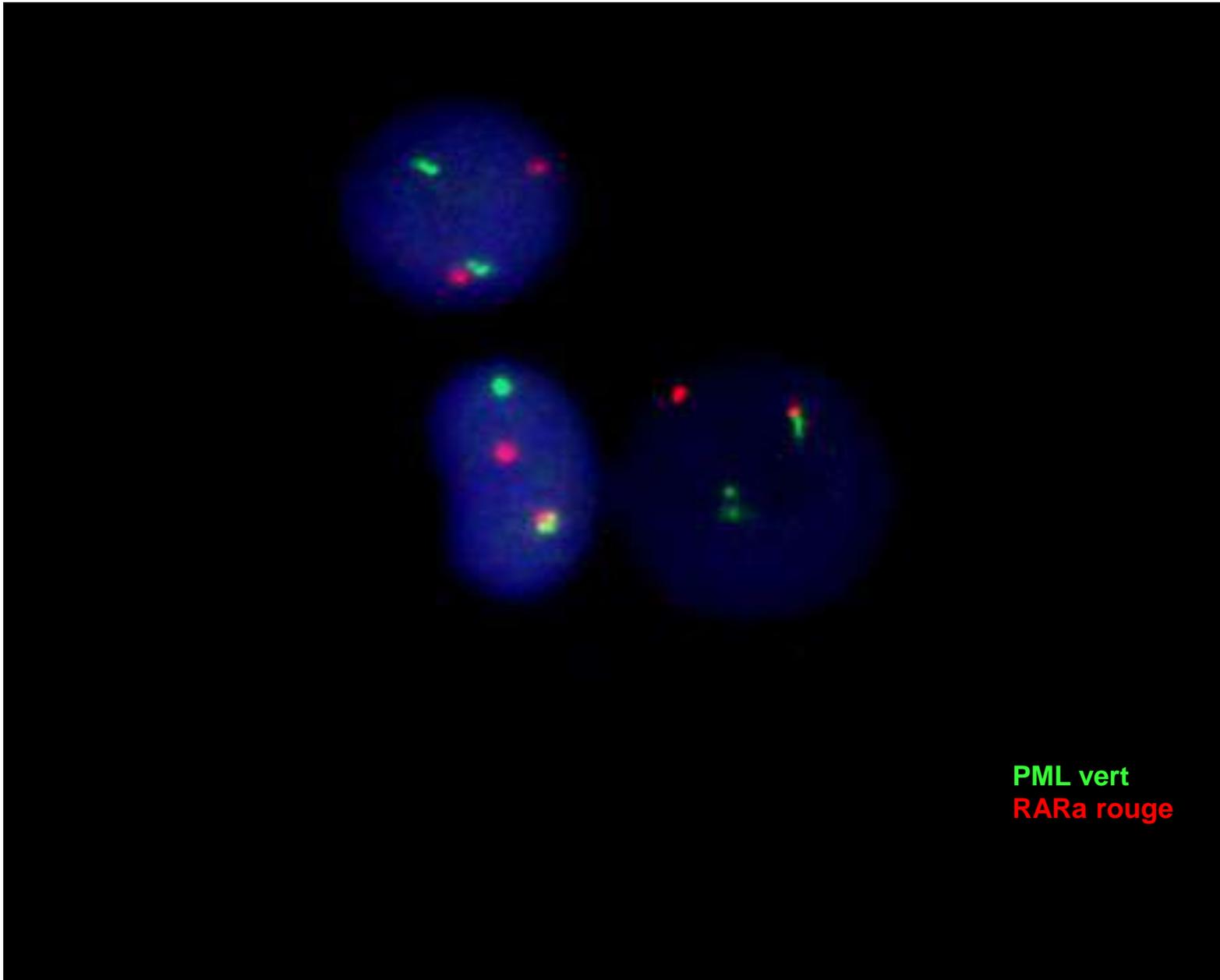
der(15)t(15;17)

17

15

PML vert
RARa rouge





PML vert
RARa rouge

LAP avec t(15;17)(q24;q21) PML/RARa et variants

- Mise en évidence:

Caryotype (10% d'échec), FISH, RT-PCR

- Il existe 4 variants:

t(11;17)(q23;q21) gène PLZF en 11q23

morphologie particulière: noyau rond, pas de corps d'Auer, forme hypergranulaire, cellules pseudo-Pelger
cette forme n'est pas sensible à l'ATRA

t(5;17)(q32;q21) gène NPM1 en 5q31

t(11;17)(q13;q21) gène NUMA en 11q13

t(17;17)(q11.2;q21) gène STAT5/JAK

- Anomalies secondaires: trisomie 8 (1/3 des cas)
- Bon pronostic.