

BONNES PRATIQUES POUR LE DIAGNOSTIC CYTOGENETIQUE

DES MALADIES CASSANTES DE L'ADN

Révision Octobre 2018

Coordinatrice : Nathalie Auger (Gustave Roussy, Villejuif) nathalie.auger@gustaveroussy.fr

Comité de relecture : Marina Lafage, Wendy Cuccini

Participation à la réunion de travail du 19 septembre 2017 : Florence Amblard, Nathalie Auger, Nicolas Chatron, Wendy Cuccini, Marina Lafage, Alice Fievet, Jean Soulier

Ces recommandations ont été établies en 2012 par le Réseau Cytogénétique des Maladies Cassantes (CYMCA), développé au sein du Réseau INCa Maladies Cassantes de l'ADN. Cette révision a été entreprise en 2017 par un groupe d'experts impliqués dans le diagnostic de maladie de Fanconi

Elles concernent le diagnostic cytogénétique sur prélèvement sanguin :

- de la Maladie de Fanconi
- de l'Ataxie-Télangiectasie et du Syndrome de Nijmegen
- du Syndrome de Bloom

Compte tenu de la variété de la symptomatologie de ces pathologies, des demandes peuvent être faites par des cliniciens prescripteurs sur la base de signes évoquant une maladie cassante de l'ADN (en particulier, hypotrophie, microcéphalie, déficit immunitaire, taches cutanées, consanguinité, prédisposition à des tumeurs, réactions anormales à la chimio- ou radiothérapie...). L'HAS préconise également cette recherche devant un VACTERL avec hydrocéphalie en prénatal (en 2004), devant une aplasie médullaire (2009) ou une insuffisance médullaire du sujet jeune (2010), devant un PTI avec signes évocateurs.

En dehors des syndromes ci-dessus. Un accord préalable devra être demandé dans ce cas au cytogénéticien, afin de s'assurer de la justification et de la faisabilité de l'examen.

Ces recommandations ne décrivent que les particularités de la prise en charge cytogénétique en rapport avec la spécificité de chacune des pathologies. Le Guide de Bonnes Pratiques en Cytogénétique établi par l'ACLF, le GFCH et le GFCO s'applique pour tout ce qui concerne les agréments des praticiens et la réalisation générale des examens.

Généralités

Le diagnostic cytogénétique intervient en première ligne pour l'identification des maladies cassantes de l'ADN. En effet, la lourdeur actuelle des recherches de mutations empêche le diagnostic moléculaire initial de toutes les suspicions cliniques. Les tests cytogénétiques ne permettent pas le dépistage des hétérozygotes.

Cotation : en 2018, les codes qui permettaient d'appliquer un supplément au caryotype constitutionnel ont disparu de la nomenclature officielle

En sus de la cotation Caryotype constitutionnel, on peut appliquer B9105 pour forfait de sécurité pour échantillon sanguin

Il faut demander :

- un consentement majeur ou mineur) pour analyse des caractéristiques génétiques de l'individu
- des renseignements cliniques
- une NFS récente

Anémie de Fanconi

Technique

Prélèvement :

Jour de réception : lundi ou mardi (car culture de 72h avec ajout de Mitomycine C (MMC) 24h après la mise en culture)

Acheminement: à température ambiante le plus rapidement possible (maximum 48H).

5 à 10 ml de sang périphérique sur Héparine Lithium (Tubes vert foncé) soit 2 à 4 tubes selon le degré de lymphopénie et l'âge du patient (parfois nouveau-né.)

Le prélèvement d'un sujet témoin (sujet non apparenté qui n'a pas reçu de chimiothérapie ou de radiothérapie et qui ne souffre pas d'une virose) est facultatif (selon modalités du labo).

Mise en culture

Les examens sont faits à partir de cultures de sang périphérique, éventuellement de sang fœtal, sous stimulation par PHA.

Les lymphopénies sont fréquentes dans ce type de pathologie. Dans tous les cas, la disponibilité d'une NFS récente est impérative ; à défaut, la faire effectuer, si possible, à partir de l'échantillon transmis.

En l'absence de lymphopénie (lymphocytes supérieurs à 1,5 G/L) : on met de 0,5 à 0,8 ml de sang pour 5 à 10 ml de milieu de culture

En cas de lymphopénie, afin d'enrichir en lymphocytes sans mettre trop d'hématies en culture, on peut :

- Soit appliquer un abaque qui tient compte de l'hématocrite :
 - ajuster le volume mis en culture, si cela est permis par une anémie associée (nécessité de ne pas augmenter le volume des hématies au-delà de la normale); exemple : un hématocrite à 35% (par rapport à une normale de 45%) permettra d'augmenter le volumeensemencé dans la limite d'un facteur de $45/35 = 1,28$;
 - si l'hématocrite ou le nombre d'hématies ne permet pas d'augmenter le volumeensemencé, mettre en culture le volume de sang habituel dans deux tubes; leurs culots seront regroupés après la fixation;
- Soit enrichir en globules blancs sans enrichir en globules rouges : transvaser et centrifuger le prélèvement à 1200 tpm pendant 10 min pour recueillir uniquement la couche de globules blancs (GB) à l'interface entre le plasma et les globules rouges (GR), compter les GB et ensemencer dans au moins 2 flacons de 5 à 10 ml en mettant au maximum 1 million de cellules par ml (optimum 0,5 à 1 million par ml)

Milieu de culture

-soit milieu standard (RPMI ou TC199) supplémenté en SVF à 10% à 20% de sérum de veau fœtal (SVF) et PHA M

- soit milieu prêt à l'emploi pour caryotype constitutionnel.

La transformation sous PHA est parfois médiocre dans ces pathologies ; l'addition d'IL2 (20 U/ml de milieu) est recommandée si la lymphopénie est majeure.

2 flacons au minimum sont mis en culture, tous deux en présence de PHA.

- pour un tube, après 24 h, ajout de MMC à la concentration finale de $10^{-7}M$ (en pratique 30 ng à 33,4ng/ml) ou à défaut du DEB
- durée de culture totale: 72 h. La sortie de culture se fait selon la procédure en place au laboratoire.
- coloration standard au Giemsa.

Observation au microscope sans contraste de phase

NB1 : Plusieurs cultures avec plusieurs concentrations de MMC peuvent être réalisées sur le patient et ou le témoin.

NB2 : la MMC peut être aliquotée et congelée selon les habitudes du centre. Cela nécessite de vérifier sa stabilité.

Analyse :

Il est recommandé de commencer par l'analyse du caryotype constitutionnel standard (RHG et/ou GTG) réalisé sur la culture sans MMC pour évaluer les variants du caryotype et éliminer une anomalie chromosomique.

Recherches de cassures en coloration Giemsa :

- examen de 50 métaphases (sans sélection) par condition ; il est habituel de commencer la lecture par celle de la culture sous MMC ; celle de la culture normale ne sera faite qu'en cas de fragilité élevée sous MMC (>15% de métaphases avec cassures ou >1 cellule avec figure radiale).
- pour chaque métaphase, comptage du nombre de cassures (chromatidiennes et chromosomiques...- (image1), du nombre de figures radiales (2 cassures par figure), et signaler les autres figures anormales (pulvérisations, endomitoses...).

En référence à ISCN 2016, les lacunes (gaps) ne sont pas prises en compte.

Et établir :

- le nombre moyen de cassures par métaphase (>2 avec MMC est en faveur d'un Fanconi)
- le ratio du nombre moyen de cassures avec / sans MMC (>10 est nécessaire pour un Fanconi)
- le nombre de cassures par mitose avec cassure(s) (la présence de mitoses avec >5 cassures est très évocatrice de maladie de Fanconi)
- le nombre de mitoses présentant au moins une figure radiale (la présence d'images radiales est très évocatrice)
- du nombre d'endomitoses (idem)
- chez un patient avec cassures, compte du nombre de mitoses sans cassure (>20% évoque un mosaïcisme)

Résultat

Il devra mentionner, pour la culture sous MMC, ou pour les deux conditions en cas de fragilité élevée sous MMC :

- le nombre de métaphases analysées
- le nombre de métaphases avec cassures
- le nombre moyen de cassures par métaphase, en mentionnant les figures radiales incluses
- le nombre moyen de cassures par métaphase avec cassures en mentionnant les figures radiales incluses
- les autres figures anormales éventuellement observées.

Critères d'Interprétation

Sont très évocateurs, dans la culture sous MMC :

- un pourcentage de métaphases avec cassures (figures radiales incluses) >20%
- un nombre moyen de cassures par métaphase >2 (x10 par rapport à la culture sans MMC)
- un nombre moyen de cassures par métaphase avec cassures >4
- un pourcentage de métaphases avec figure radiale >10% (plusieurs figures /métaphase).

Conclusion

Si tous les critères sont remplis, le diagnostic cytogénétique de Maladie de Fanconi sera avancé.

En cas de résultats anormaux mais n'atteignant pas les seuils évocateurs, le résultat sera considéré comme « ambigu ». Dans de rares cas, en particulier chez le patient plus âgé, il peut s'agir d'une réversion génétique (mosaïcisme somatique).

En fonction du contexte clinique et de l'urgence, il sera proposé :

- Soit la répétition de l'examen,
- Soit un test fonctionnel FANCD2 (Test sur fibroblastes cutanés) d'Ubiquitination des protéines de la voie FANC réalisé dans le laboratoire d'hématologie de Paris Saint Louis (contact Pr J Soulier/ Dr N Vasquez) .

En cas de positivité, recommander la réalisation de tests fonctionnels et/ou moléculaires, un conseil génétique et hématologique et une enquête familiale.

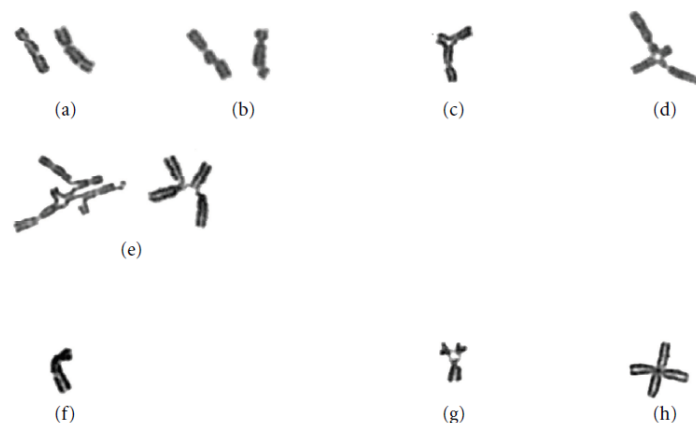


FIGURE 1: Examples of chromosomal aberrations typically observed in a MMC-induced chromosomal breakage assay to diagnose FA. (a) Chromatid gap (broken piece in place); (b) chromatid break (broken piece dislocated); (c) chromatid interchange figure ("triradial"); (d) chromatid interchange figure ("quadriradial"); (e) other chromatid interchange figures. In the eventual analysis, (a) and (b) are counted as one, (c) and (d) as two break events. The left figure in (e) is counted as 8 break events (5 centromeres plus 3 open breaks); the right figure is equivalent to a quadriradial as in (d) (2 break events), in which two break points remained disconnected. (f), (g), and (h), are examples of nonconvincing "aberrations" that should be ignored in the analysis. (f) A gap that is not 100% convincing and should be ignored. (g) An association of 3 acrocentric chromosomes showing "satellite association", not to be confused with a triradial, as in (c). (h) Two overlapping chromosomes, not to be confused with a true quadriradial, as in (d).

Références

1. Bonnes pratiques pour le diagnostic cytogénétique des maladies cassantes de l'ADN, 2012
2. Oostra AB, Nieuwint AW, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*. 2012;2012:238731.
3. Auerbach AD. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res*. 2009;668:4-10.
4. Soulier J, Leblanc T, Larghero J, Dastot H, Shimamura A, Guardiola P, Esperou H, Ferry C, Jubert C, Feugeas JP, Henri A, Toubert A, Socié G, Baruchel A, Sigaux F, D'Andrea AD, Gluckman E. Detection of somatic mosaicism and classification of Fanconi anemia patients by analysis of the FA/BRCA pathway. *Blood*. 2005;105:1329-36.
5. Alter BP, Kupfer G. Fanconi Anemia. 2002 [Updated 2012]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/>

ATAXIE-TELANGIECTASIE SYNDROME DE NIJMEGEN

Indication

L'indication de l'examen est justifiée par un minimum d'éléments cliniques évocateurs renseignés dans la demande. Pour les suspicions d'Ataxie-Télangiectasie, la demande devrait comprendre le résultat du dosage de l'alpha-foetoprotéine et des Immunoglobulines.

Technique

- mise en culture constitutionnelle standard, pendant 72 h sous PHA en fonction du protocole en cours au laboratoire.
- l'examen d'un témoin n'est pas nécessaire
- analyse en banding RHG et/ou GTG.

Analyse

Il est recommandé de commencer par l'analyse du caryotype constitutionnel standard (RHG et/ou GTG) pour évaluer les variants du caryotype et éliminer une anomalie chromosomique.

Puis examen des chromosomes 7 et 14 dans 50 métaphases ;

- comptage des métaphases avec translocation ou inversion des chromosomes 7 et 14, et description des remaniements
- en cas d'observation d'une seule cellule avec l'un de ces remaniements, poursuivre l'analyse jusqu'à 100 métaphases.

Il n'est pas fait de comptage de cassures (non spécifique).

Résultat

Il indiquera :

- le nombre de métaphases analysées
- le nombre et la description des métaphases présentant des remaniements des chromosomes 7 et/ou 14, selon ISCN en cours, dans les 50-100 métaphases examinées.

Les points de cassure correspondent à la localisation des gènes des récepteurs T : principalement, 7p14, 7q35, 14q11, et à celle du locus IGH (14q32).

Conclusion

Le diagnostic cytogénétique sera avancé devant l'observation de >2% de métaphases avec un remaniement caractéristique des chromosomes 7 et/ou 14.

En cas de résultat douteux ou positif, conseiller la recherche de mutation.

Références

1. Stern MH, Lipkowitz S, Aurias A, Griscelli C, Thomas G, Kirsch IR. Inversion of chromosome 7 in ataxia telangiectasia is generated by a

rearrangement between T-cell receptor beta and T-cell receptor gamma genes. *Blood*. 1989;74:2076-80.

2. Gatti R. Ataxia-Telangiectasia. 1999 Mar 19 [Updated 2010]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26468/>

SYNDROME DE BLOOM

Indication

L'indication de l'examen est justifiée par un minimum d'éléments cliniques évocateurs renseignés dans la demande.

Mise en culture

- mise en culture en présence de PHA et de bromodéoxyuridine (BrdU), 10 µg/ml, pendant 72 h.
- la mise en culture d'un témoin n'est pas nécessaire ;

Attention, le BrdU est sensible à la lumière, il faut protéger les cellules au maximum de la lumière même après étalement sur lame.

Technique FPG pour la mise en évidence des échanges de chromatides-soeurs (SCE).

Technique FPG (Fluorescence Plus Giemsa) Perry P and Wolff S (1974), Nature, 251, 156.

- coloration des lames en Bisbenzimidazole 33258 Hoechst 1 µg/ml dans l'eau déminéralisée, 10 min
- transférer les lames dans une solution de 2x SSC
- irradier sous une lampe à UV longs (365 nm) placée à <10 cm au-dessus des lames pendant 90 min,
- rincer rapidement à l'eau courante, puis à l'eau déminéralisée
- colorer au Giemsa à une concentration moitié de celle utilisée pour les colorations standard au laboratoire.

Analyse

- examen de 20 métaphases présentant des chromatides-sœurs différenciées sur toute leur longueur (ayant subi deux cycles d'incorporation de BrdU)
- comptage des SCE dans chaque métaphase.

Il n'est pas fait de comptage de cassures (non spécifique).

Résultat

Il indiquera :

- le nombre de métaphases effectivement analysées
- le nombre moyen de SCE par métaphase.

Conclusion

Le diagnostic sera avancé devant un nombre moyen de SCE/métaphase >50 (>10 fois la normale).

Un taux de ce niveau est pratiquement pathognomonique de Syndrome de Bloom.

Dans ce cas, il sera conseillé d'envoyer un prélèvement pour rechercher une mutation d'un gène entraînant une augmentation des SCE.

Références

1. Sanz MM, German J. Bloom's Syndrome. 2006 [Updated 2010]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1398/>
2. Dicken CH, Dewald G, Gordon H. Sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome. Arch Dermatol. 1978;114:755-60.