Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Pathologie Biologie 52 (2004) 248–250
PATHOLOGIE BIOLOGIE
www.elsevier.com/locate/patbio

Recommandations

Recommandations pour la prise en charge cytogénétique des leucémies aiguës myéloïdes établies par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH)

GFCH

Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH), Paris, France

Reçu le 15 mars 2004 ; accepté le 8 avril 2004

Disponible sur internet le 04 mai 2004

Participants : Christian Bastard, Laurence Baranger, Chrystelle Bilhou-Nabera, Christiane Charrin, Nicole Dastugue, Virginie Eclache, Marina Lafage-Pochitaloff, Jean Luc Lai, Dominique Leroux, Michel Lessard, Isabelle Lucquet, Francine Mugneret, Marie Pierre Pages, Christine Perot, Bruce Poppe, Isabelle Radford-Weiss, Frank Speleman, Pascaline Talmant, Christine Terre, Jacqueline Van Den Akker, Frank Viguie
Coordonnatrice : Nicole Dastugue

1. Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) forment un groupe hétérogène de leucémies aiguës caractérisées par une grande variété d'anomalies chromosomiques récurrentes, certaines étant étroitement corrélées avec les caractéristiques morphologiques et cliniques. Compte tenu de la corrélation morphologie–cytogénétique, la classification OMS (Ann Oncol 1999 ; 10 : 1419) a inclus la présence de certaines anomalies dans les critères d'identification de certaines entités : LAM avec t(8;21)(q22;q22)/*AML1-ETO*, leucémies aiguës promyélocytaires (M3) avec t(15;17)(q22;q12)/*PML-RARA* ou translocations variantes et alternatives, LAM avec composante monocytaire et éosinophiles anormaux avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22)/*CBFB-MYH11* et les LAM à composante monocytaire avec anomalies 11q23.

Le caryotype étant le facteur prédictif le plus fort de la réponse thérapeutique et du risque de rechute, tous les schémas thérapeutiques prennent en compte le caryotype au diagnostic de LAM. Les anomalies sont classées en trois catégories : bon risque, risque intermédiaire et haut risque. En dépit de certaines fluctuations selon les séries, les t(15;17), t(8;21) et inv(16) sont classiquement rattachées au groupe de bon risque tandis que les caryotypes complexes, les –5/del(5q), –7, anomalies 3q, t(6;9)(p23;q34) et t(9;22)(q34;q11) sont retrouvées dans le groupe de mauvais risque. Certaines anomalies, telles les trisomies 8, les del(7q) et les 11q23/*MLL*, ont été considérées tantôt comme de risque intermédiaire, tantôt comme de haut risque. Le groupe intermédiaire, principalement constitué des caryotypes normaux, contient aussi l'ensemble des autres anomalies.

Ces éléments font du caryotype un examen indispensable à la prise en charge thérapeutique de toutes les LAM. Les LAM3 bénéficient d'un protocole spécifique, tandis que pour les LAM non M3, les décisions thérapeutiques sont fondées sur la présence d'anomalies chromosomiques de bon risque ou de mauvais risque. Les recommandations du GFCH pour la prise en charge cytogénétique des LAM distinguent ainsi les LAM3 des LAM non M3, et pour ces dernières, accordent une place prépondérante à la détection des anomalies de bon risque et de haut risque.

2. Places respectives du caryotype et de la FISH au diagnostic de LAM

Le caryotype est indispensable à la prise en charge des LAM. Il doit être obtenu au diagnostic dans tous les cas. En cas d'échec, il convient de tout mettre en œuvre pour obtenir un 2^{e} prélèvement avant tout traitement. La cytogénétique conventionnelle permet en effet d'identifier, en un seul temps, la totalité des anomalies répertoriées dans les LAM, qu'elles soient isolées ou associées dans une même cellule. C'est cette vue d'ensemble du génome qui fait du caryotype un examen irremplaçable dans la prise en charge des LAM.

La FISH n'est indiquée, en complément du caryotype, que dans des situations particulières (développées ci-dessous). Les indications ci-dessous établies par le GFCH ont tenu compte de la fréquence de l'anomalie recherchée, de la corrélation avec l'aspect morphologique, du type de sondes disponibles (facilement accessibles pour tous les centres), de l'existence de formes cryptiques ou masquées et de la difficulté de détection de l'anomalie au caryotype.

Adresse e-mail : berger@necker.fr (GFCH).

© 2004 Elsevier SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.patbio.2004.04.006

3. Indications de la FISH

Les informations apportées par le caryotype et l'analyse morphologique déterminent les indications de la FISH.

3.1. La morphologie oriente vers une LA promyélocytaire (LAM3)

Lorsque le caryotype a permis d'identifier une t(15;17)(q22;q12-21) standard (92 % des cas) ou variante (2 %), le recours à la FISH n'est pas nécessaire.

Toute M3 sans t(15;17) au caryotype doit faire l'objet d'une exploration FISH à la recherche du gène de fusion *PML-RARA*. Le remaniement *PML-RARA* peut être cryptique (4 % des LAM3) car généré par insertion moléculaire indétectable par technique cytogénétique conventionnelle. Il peut aussi résulter d'un remaniement chromosomique complexe qui implique dans la plupart des cas un des deux points de cassure de la translocation, soit 15q22, soit 17q12-21. La FISH *PML-RARA* doit donc être pratiquée devant toute M3 sans t(15;17) ou M3 avec remaniement 15q22 ou 17q12–21 au caryotype, et également en cas d'échec du caryotype.

La recherche du gène de fusion *PML-RARA* par FISH, complémentaire du caryotype, n'est pas justifiée dans les LAM non promyélocytaires car *PML-RARA* n'est qu'exceptionnellement observé dans des prolifération non promyélocytaires.

Un faible pourcentage de M3 (ou LA morphologiquement proches des M3) est caractérisé par d'autres remaniements chromosomiques qui tous impliquent *RARA* : t(11;17)(q23;q21)/*PLZF-RARA* (0,8 %), t(5;17)(q35;q21)/*NPM-RARA* (0,2 %), t(11;17)(q13;q21)/*NuMA-RARA* (< 0,1 %) et *STAT5b-RARA* (< 0,1 %). Le meilleur outil de mise en évidence de ces anomalies est le caryotype.

3.1.1. Caryotype

Temps de culture recommandé pour technique cytogénétique conventionnelle : au moins une nuit.

3.1.2. Sondes FISH PML-RARA

Les sondes de grande taille (300 Kb) détectent bien le gène de fusion PML-RARA sur cellules interphasiques et métaphasiques mais détectent mal les insertions de petites tailles.

Les sondes de plus petites tailles (20 à 40 Kb) détectent bien le gène de fusion PML-RARA sur cellules métaphasiques, moins bien sur cellules interphasiques mais détectent mieux les insertions de petites tailles.

3.2. La morphologie n'oriente pas vers une LA promyélocytaire (LAM3)

Les recommandations du GFCH ont tenu compte de la place actuelle des anomalies chromosomiques dans les schémas thérapeutiques pour développer plus particulièrement les moyens à mettre en œuvre pour détecter les anomalies décisionnelles (anomalies de bon risque et de haut risque). La recherche systématique proposée pour MLL est optionnelle et a un objectif épidémiologique.

3.2.1. Les anomalies de bon pronostic : t(8;21)/inv(16)

Lorsque ces deux anomalies sont détectées par cytogénétique conventionnelle, aucun recours à la FISH n'est nécessaire.

La recherche systématique par FISH de t(8;21) et inv(16) n'est pas recommandée car ces deux anomalies sont détectables au caryotype et sont rarement cryptiques. En revanche, la FISH doit être ponctuellement pratiquée en cas de discordance entre le caryotype qui n'a pas identifié l'anomalie et un paramètre (morphologique ou cytogénétique) qui évoque fortement sa présence.

t(8;21) : il convient de rechercher le gène de fusion *AML1-ETO* lorsque l'aspect morphologique (M2 avec corps d'Auer et signes spécifiques de myélodysplasie) oriente vers une LAM/t(8;21). Plus rarement, la présence d'un remaniement impliquant 8q22 ou 21q22 peut révéler une t(8;21) masquée dans une translocation complexe.

inv(16)/t(16;16) : la recherche par FISH d'une inv(16) ou de son équivalent t(16;16) est obligatoire lorsque l'anomalie n'est pas observée sur le caryotype alors que la présentation morphologique est celle d'une LAM4 avec éosinophiles anormaux, ou lorsque une anomalie chromosomique est évocatrice de sa présence (soit remaniement chromosomique impliquant un des deux points de cassure 16p13 ou 16q22, soit trisomie 22 isolée, anomalie numérique associée de façon non aléatoire à l'inversion du 16). D'authentiques inv(16) cryptiques (générées par insertion) ont été identifiées mais restent exceptionnelles. En revanche, l'inv(16) est une anomalie difficile à détecter sur le caryotype et nécessite une bonne qualité de préparation chromosomique pour être identifiée. La FISH peut donc utilement compléter le caryotype lorsque la qualité ne permet pas l'identification formelle de l'anomalie. Cette FISH complémentaire éventuelle ne doit pas être limitée aux LAM4 car l'inv(16) est présente dans un pourcentage non négligeable de LAM sans composante monocytaire.

Ces deux anomalies doivent également être recherchées en cas d'échec du caryotype.

3.2.1.1. FISH t(8 ;21). Toutes les sondes locus-spécifiques commerciales disponibles détectent bien le remaniement AML1-ETO. Seules les insertions moléculaires de très petite taille (très peu de cas rapportés) nécessitent des sondes locus-spécifiques de petite taille pour être détectées.

3.2.1.2. FISH inv(16). Les sondes commerciales disponibles qui permettent la détection de l'anomalie à la fois sur cellules métaphasiques et interphasiques (soit par séparation des parties 3'et 5' du gène CBFB ; soit par séparation des parties 3'et 5' du gène MYH11) sont bien adaptées à la recherche de l'inv(16).

3.2.2. Les anomalies de mauvais pronostic

Les anomalies chromosomiques conférant un mauvais pronostic dans toutes les séries de LAM sont les caryotypes complexes (≥ 3 anomalies non apparentées), les monosomies 5 et les délétions partielles du bras long du chromosome 5 (–5/5q–), les monosomies 7 complètes (–7), les anomalies 3q

(impliquant 3q26 dans la majorité des cas), les t(6;9)(p23;q34) et les t(9;22)(q34;q11).

Aucune stratégie FISH n'est proposée pour détecter ces anomalies dont la détection repose entièrement sur technique de cytogénétique conventionnelle pour les raisons suivantes :

- le caryotype permet de visualiser l'ensemble des chromosomes et donc d'identifier l'ensemble des anomalies en un seul temps ;
- les échecs des techniques cytogénétiques conventionnelles sont rares dans les LAM ;
- les anomalies sont facilement identifiables au caryotype standard et sont exceptionnellement cryptiques ;
- aucun panel de sondes FISH ne peut remplacer la notion de complexité du caryotype qui repose sur les résultats du caryotype standard ;
- aucune sonde n'est disponible pour certaines anomalies ;
- une analyse FISH avec les sondes disponibles ne dispense pas du caryotype pour une interprétation correcte des résultats.

Le caryotype reste donc l'examen clé de la définition des critères de haut risque. Pour les rares échecs cytogénétiques n'ayant pas pu bénéficier d'un 2^{e} prélèvement avant tout traitement, la recherche sur noyaux interphasiques d'un –5/5q– et d'un –7 peut être proposée, en sachant que l'information ainsi obtenue sur les critères de haut risque est incomplète. La recherche d'une t(9 ;22) n'est pas proposée en raison de la très faible fréquence des LAM Ph-positives.

3.2.2.1. FISH 5. Sondes commerciales explorant les régions 5q31 (la plus fréquemment délétée) : la cohybridation d'une sonde explorant simultanément une autre région du chromosome 5 facilite l'interprétation des résultats

3.2.2.2. FISH 7. Sonde centromérique du 7 ; l'association à une analyse des régions 7q31 ou 7q22–7q35 facilite l'interprétation des résultats.

3.2.3. Les remaniements MLL

Il s'agit de la seule recherche systématique proposée dans le cadre des LAM non M3. Cette étude prospective pour les anomalies 11q23/*MLL* a pour objectif de contribuer à l'étude épidémiologique des anomalies impliquant MLL, en répertoriant l'ensemble des anomalies *MLL*, répertoire qui permettra à terme de déterminer l'impact pronostique propre à chaque remaniement.

Dans le cadre des LAM, la FISH MLL est optionnelle (mais recommandée) car les remaniements MLL ne sont pas à ce jour décisionnels. Chez l'enfant de moins de deux ans, cette recherche est obligatoire compte tenu de la fréquence élevée de remaniements MLL dans ce groupe d'âge et de leur impact pronostique défavorable.

Les remaniements 11q23 sont, dans la majorité des cas, des translocations impliquant *MLL*. Toutefois, certains d'entre eux sont *MLL*-négatif. Il importe donc de préciser pour les remaniements 11q23 si *MLL* est réarrangé, et pour les translocations *MLL*-positif, d'identifier le partenaire. Les différentes translocations 11q23/*MLL* sont identifiables par technique cytogénétique conventionnelle mais, alors que certaines sont aisément identifiables, d'autres nécessitent une très bonne qualité de préparation chromosomique pour être détectées. Le caryotype peut alors être utilement complété par technique FISH. En pratique, plusieurs stratégies sont envisageables pour détecter les réarrangements *MLL*.

La FISH interphasique avec une sonde double couleur (signaux *3'MLL* et *5'MLL* de couleur différente, colocalisés en 11q23 en situation normale et séparés en cas de réarrangement *MLL*) détecte tous les réarrangements *MLL* et peut être considérée comme ayant la même efficacité de détection que le Southern blot, le seul réarrangement *MLL* non détecté par la FISH étant la duplication en tandem *MLL*.

La FISH métaphasique permet d'identifier le partenaire dans les translocations. Le signal *3'MLL* est transloqué sur le partenaire sauf dans environ 10 % des translocations associées à une délétion *3'MLL*. Les peintures chromosomiques du 11 et du partenaire peuvent aussi contribuer à cette identification.

3.2.3.1. Sondes FISH. Les sondes commerciales disponibles qui permettent la détection de l'anomalie à la fois sur cellules métaphasiques et interphasiques (par séparation des parties 3'et 5' du gène MLL; sondes double couleur) sont bien adaptées à un criblage systématique.

Caryotype : toutes les LAM au diagnostic

Indications de la FISH : selon le caryotype et la morphologie

LAM (sauf M3)					LAM3	
Anomalie récurrente au caryotype t(8;21) inv(16)/t(16;16) t(11q23;V) t(6;9) t(9;22) t(3q;V) ou inv(3) t(8;16) t(16 ;21) t(7;11) t(1;22) t(3;5) –7 del(5q)	Caryotype normal ou autres anomalies que celles listées dans la 1re colonne (dans caryotype simple ou complexe)	Absence de t(8;21) au caryotype + Présence d'un remaniement 8q22 ou 21q22 ou + Morphologie évocatrice de t(8;21)	Absence d'inv(16) au caryotype + Présence d'un remaniement 16p13 ou 16q22 ou + trisomie 22 isolée ou + Morphologie évocatrice d'inv(16)	Echec du caryotype	t(15;17) ou t(V;15;17)	Caryotype normal ou Anomalie 15q22 ou 17q21 ou Autres anomalies ou Echec du caryotype
Pas d'indication de FISH[a]	FISH MLL[b]	FISH t(8;21) FISH MLL[b]	FISH inv(16) FISH MLL[b]	FISH t(8;21) FISH inv(16) FISH 5/7[c] FISH MLL[b]	Pas d'indication de FISH	FISH t(15;17)

[a] sauf FISH MLL en cas de 11q23

[b] optionnel (mais recommandé)

[c] FISH 5: sonde 5q31 (associée à sonde d'une autre région du 5) ; FISH 7 : centromère 7 (associé à sonde 7q31 ou 7q22-35)