Rev. Fr. Histotechnol., 1996, **9**, n° 1, p. 9 à 15

# CONTENU EN ADN DES PLASMOCYTES AU COURS DU MYELOME MULTIPLE ETUDE PAR ANALYSE D'IMAGE

F. BERNARDI*, P. FIEVET*, M. ZANDECKI**

**Laboratoire - Centre hospitalier de DOUAI BP 740, 59507 DOUAI Cedex*
*** Laboratoire d'Hématologie - Hôpital CALMETTE 59037 LILLE Cedex*

## INTRODUCTION

Le myélome multiple est une maladie hématologique caractérisée par la prolifération maligne de plasmocytes dans la moelle osseuse. Cette affection présente un pic de fréquence situé entre 65 et 70 ans. La médiane de survie de 2,5 ans rend compte du caractère particulièrement grave de cette pathologie, justifiant les nombreuses investigations entreprises pour mieux en comprendre la genèse et l'évolution.

Le myélome multiple partage avec les tumeurs solides la difficulté de l'étude cytogénétique : la faible prolifération plasmocytaire fait que l'on ne retrouve une anomalie du caryotype que chez 50 % des patients. D'autres méthodes ont donc été développées pour définir l'existence ou non d'anomalie du contenu du noyau en ADN (ploïdie). Au cours du myélome multiple, cette mesure est habituellement réalisée par cytométrie de flux (CMF). La grande dispersion des résultats de la littérature (30 à 80 % d'aneuploïdie selon les séries) nous a amenés à utiliser une technique différente : l'analyse d'image (1).

Après avoir repris rapidement les principes de notre étude, nous allons comparer les résultats obtenus avec ceux de l'étude cytogénétique classique, et les résultats de la littérature.

## PATIENTS ETUDIES

Notre étude concerne 150 patients atteints de myélome multiple, (122 au diagnostic de la maladie et 28 en rechute) classés en 3 stades de gravité croissante selon la classification de DURIE et SALMON (stade I : 36 patients, stade II+III : 86 patients).

## MATERIEL ET METHODES

A chaque patient, nous avons prélevé 1 à 2 ml de moelle osseuse par ponction ster-

nale ou iliaque postérieure que nous avons recueillie dans un tube contenant de l'EDTA. Une partie du prélèvement a été utilisée pour l'étude cytogénétique, et l'autre pour l'étude du contenu en ADN.

**Le contenu en ADN**

Les cellules mononucléées, recueillies après isolement sur gradient de densité (MSL,Eurobio), sont centrifugées pendant 5 mn à 700 tours/mn (Shandon Cytospin 3) ; séchées à l'air durant 24h,elles sont ensuite fixées par les vapeurs de formol pendant 5 mn puis par une solution de paraformaldéhyde à 4 % pendant 10mn.

L'ADN du noyau des plasmocytes est coloré par la réaction de FEULGEN en utilisant la pararosaniline comme réactif de Schiff.

La mesure du contenu en ADN s'effectue à l'aide d'un analyseur d'image (Quantimet 600 S, LEICA). La lame est placée sur le microscope, et l'image des cellules est transmise à l'analyseur au moyen d'une caméra tri-CCD. L'image couleur est transformée en une image en noir et blanc (canal vert) : il est alors possible de mesurer pour chaque point de l'image 256 niveaux de gris différents (sensibilité maximale). On peut soit analyser toutes les cellules qui se présentent sur l'écran, soit désigner celles qui nous intéressent. L'appareil mesure la densité optique de chaque noyau, celle-ci étant linéairement proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire. Environ 150 plasmocytes sont mesurés et 30 lymphocytes sont choisis comme cellule de référence.

L'index d'ADN est calculé comme le rapport de la moyenne des densités optiques des noyaux des plasmocytes sur celle des noyaux des lymphocytes.

**Etude cytogénétique**

Parallèlement à l'étude du contenu en ADN, nous avons pu réaliser pour une partie des patients (141) un étude du caryotype médullaire. Cette étude a été réalisée selon les techniques standards : cultures de cellules médullaires non stimulées (RPMI - Sérum de veau foetal) et cultures de 6 jours en présence de cytokines (GM - CSF et Interleukine 6) dans du milieu de CHANG (CLINI-SCIENCES).

L'identification chromosomique après dénaturation par la chaleur (RHG) permet le classement des chromosomes suivant la nomenclature internationale (ISCN1991).

## RESULTATS

### CONTENU EN ADN

Une étude réalisée au préalable chez des sujets sains montre que les plasmocytes normaux ont un index d'ADN qui varie de 0,98 à 1,00. Donc un index d'ADN >1 définit une hyperdiploïdie, et un index d'ADN <0,98 définit un hypodiploïdie.

Nous retrouvons une aneuploïdie chez 106/122 patients (87 %) au diagnostic, et chez 86 % des patients en rechute (Tableau 1).

Si les résultats sont globalement comparables en terme de % de patients avec anomalies, la répartition de l'aneuploïdie varie avec le stade. On retrouve globalement 25 % des patients hypodiploïdes au diagnostic, mais ce nombre est de 33 % pour les patients au stade I (peu agressif) et de 22 % pour les patients au stade II et III (qui nécessitent un traitement)

A la rechute de la maladie, l'indice de l'hypodiploïdie est encore plus faible (11 %).

## ETUDE DU CARYOTYPE

Globalement 54,6 % des patients ont un caryotype anormal (Tableau 1).

Le pourcentage d'anomalies augmente en suivant les stades de gravité croissante de la maladie : 34 % au stade I,52 % aux stades II et III, et 81 % en rechute.

La plupart des anomalies constatées sont complexes, mêlant pertes et gains de chromosomes, anomalies structurales et présence de chromosomes marqueurs (chromosomes trop remaniés pour être identifiables).

Si l'on classe les caryotypes en fonction des anomalies numériques retrouvées, on constate que 60 % ont 47 à 70 chromosomes (hyperdiploïdie), 29 % ont 36 à 45 chromosomes (hypodiploïdie), et 11 % ont un mélange de chromosomes gagnés et perdus qui s'équilibre (pseudodiploïdie). Ces anomalies sont surtout des trisomies ou des tétrasomies des chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 19,21 ou la perte des chromosomes 8, 13, 14, X et Y.

Presque tous les patients ont également une anomalie structurale, les plus fréquentes se situant en 1p, 1q, 6q, 7p, 11q, 14q, 16p, 16q et 19q.

## COMPARAISON DES RESULTATS

On peut étudier la correspondance entre le contenu en ADN des plasmocytes et le nombre modal de chromosomes pour chaque patient, sous forme d'un graphe (figure 1). On remarque une bonne concordance des valeurs, mais celles-ci ne coïncident pas toujours et doivent être discutées.

## DISCUSSION

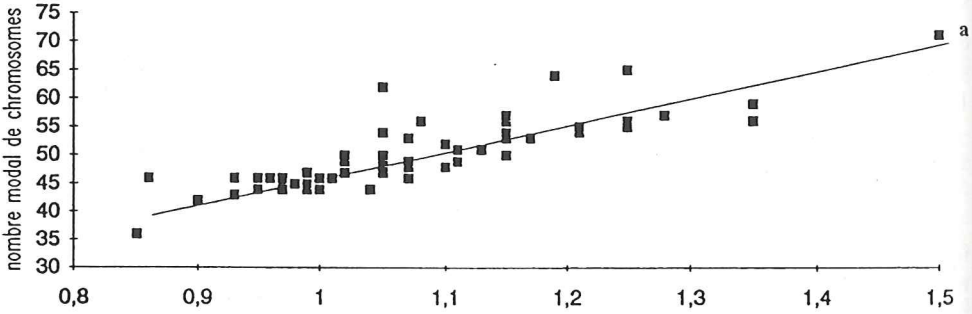
La mesure du contenu en ADN des plasmocytes au cours du myélome multiple est habituellement réalisée par cytométrie de flux (2, 3, 4, 5, 6, 7,8). L'analyse d'image permet une autre approche et présente deux avantages importants par rapport à la CMF. Tout d'abord l'opérateur voit les cellules et peut utiliser ses connaissances et son expérience en morphologie cellulaire pour les sélectionner. Par ailleurs, en raison du faible nombre de cellules nécessaire pour réaliser une mesure, les systèmes d'analyse d'image conviennent particulièrement bien à l'analyse de ploïdie des échantillons dont la quantité disponible est limitée (petits volumes, faibles plasmocytoses médullaires). La mesure de la ploïdie par CMF au cours du myélome multiple détecte une aneuploïdie chez un nombre très variable de patients : 31 à 83 % selon les séries. Ces discordances entre les différentes études en CMF seraient essentiellement dues à des artefacts techniques ou à des problèmes de standardisation (9). L'incidence globale d'aneuploïdie obtenue par analyse d'image chez nos patients dépasse les résultats les plus élevés rapportés dans la littérature avec CMF.

Alors que l'incidence d'hyperdiploïdie chez nos patients (61,5 %) est sensiblement identique à celle retrouvée en CMF dans les séries récentes (7) et en cytogénétique (10, 11), il existe une différence significative entre notre incidence d'hypodiploïdie (25 %) et celle obtenue lors de la plupart des études en CMF (de 0 à 8%). Cependant MORGAN a utilisé une approche multi-paramétrique de la CMF et trouve une incidence d'hypodiploïdie de 14 % (12). Nos résultats se rapprochent bien de ceux obtenus par cytogénétique (29 % dans notre série, et 18 à 30 % dans les séries de la littérature) (10). La plupart des patients défi-

| *Patients étudiés* | *Analyse d'image Index d'ADN* | | | | *Cytogénétique* |
|---|---|---|---|---|---|
| | diploïde | hypodiploïde | hyperdiploïde | aneuploïde | anomalies du caryotype |
| Tous patients | 13,1 % | 25,4 % | 61,5 % | 86,9 % | 54,6 % |
| Stade I | 11,1 % | 33,3 % | 55,6 % | 88,9 % | 34,3 % |
| Stade II + III | 14 % | 22,1 % | 63,9 % | 86 % | 52 % |
| Rechute | 14,3 % | 10,7 % | 75 % | 85,7 % | 81,5 % |

**Tableau 1**

*Valeur de la ploïdie en fonction du nombre modal de chromosomes*




**a : droite de correspondance théorique entre nb modal de chromosomes et ploïdie**

**Figure 1**

nis comme hypodiploïdes après l'étude cytogénétique ont perdu un faible nombre de chromosomes (1 à 3) : l'analyse d'image est sans doute plus sensible que la CMF pour détecter ces discrètes hypodiploïdies.

La figure 1 montre une bonne correspondance entre l'index d'ADN et le nombre modal de chromosomes défini par le caryotype. Il existe cependant des différences que l'on peut expliquer de la manière suivante : il faut tenir compte de la taille et donc de la masse des chromosomes impliqués qui est très différente selon les divers groupes dans le caryotype humain. Par exemple, les chromosomes 3, 5, 7, 9, 11,et 19 souvent impliqués comme anomalies cytogénétiques du myélome représentent respectivement 3,4 % , 3 %, 2,7 %, 2,4 %, 2,3 %, et 1,3 % de la masse totale d'ADN nucléaire. Le gain en ADN sera ainsi de 3,4 % s'il y a trisomie 3 alors qu'il ne sera que de 1,3 % s'il y a trisomie 19. Il faut ajouter à cette notion la présence fréquente de chromosomes marqueurs (inclassables) qui peuvent prendre plus ou moins d'importance dans la masse totale d'ADN du noyau.

Notre étude montre que 87 % des patients ont des plasmocytes aneuploïdes et seulement 55 % ont un caryotype anormal (tableau 1). Ceci s'explique par l'index de prolifération faible des plasmocytes et la difficulté d'obtention des métaphases nécessaires à l'étude cytogénétique conventionnelle. Dans la moelle du myélome, les plasmocytes sont mélangés aux cellules myéloïdes, qui ont un fort indice de prolifération. L'étude en cytogénétique moléculaire, (hybridation in situ fluorescente ou FISH) a permis de confirmer que chez la plupart de nos patients définis comme aneuploïdes par l'analyse d'image et dont la caryotype était apparemment normal, il existait bien une perte ou un gain de chromosomes (13).

L'étude du contenu en ADN par analyse d'image aussi bien que par CMF a également ses limites techniques : en effet, nous avons constaté que certains patients avaient une anomalie du caryotype mais avaient un contenu en ADN dans les limites des valeurs normales. Ces patients présentaient une ou plusieurs anomalies chromosomiques structurales équilibrées : les pertes et les gains de chromosomes s'équilibrant, le contenu global en ADN était apparemment inchangé.

Sur le plan clinique, le suivi de nos patients a permis de définir l'impact pronostique de la ploïdie au cours du myélome multiple : les patients hyperdiploïdes ont un meilleur pronostic, ce que confirment les études récentes de la littérature (7).

## CONCLUSION

L'analyse d'image est une méthode très sensible qui nous a permis de détecter une incidence élevée d'aneuploïdie au cours du myélome multiple (87 %), et ce quel que soit le stade de la maladie. La comparaison de nos résultats obtenus avec l'analyse cytogénétique montre la complémentarité des deux méthodes. Il existe une anomalie du contenu en ADN chez presque tous les patients, mais seule une partie d'entre-eux va visualiser cette anomalie au caryotype (50 %), car les plasmocytes tumoraux prolifèrent peu.

L'emploi de techniques de cytogénétique moléculaire (hybridation in situ fluorescente) confirme les résultats obtenus avec l'analyse d'image.

Le suivi clinique de nos patients nous a permis de constater que l'hyperdiploïdie est un facteur de bon pronostic.

**Remerciements :**
*Nos travaux ont reçu l'aide du Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le cancer.*

## BIBLIOGRAPHIE


1. ZANDECKI M., BERNARDI F., LAÔ J.L., FACON T., IZYDORCZYK V., BAUTERS F., COSSON A. Image analysis in mutiple myeloma at diagnosis : Correlation with cytogenetic study. Cancer Genet Cytogenet, 1994, 74, 115-119

2. LATREILLE J., BARLOGIE B., DOSIK G.,JOHNSTON D.A., DREWINKO B. ET ALEXANIAN R. Cellular DNA content as a marker of human myeloma. Blood, 1980, 55, 403-408.

3. BUNN P.A., KRASNOW S., MAKUCH R.W., SCHLAM M.L. ET SCHECHTER G.P. Flow cytometric analysis of DNA content of bone marrow cells in patients with plasma cell myeloma : clinical implications. Blood, 1982, 59, 528-535.

4. BARLOGIE B., ALEXANIAN R., GEHAN E.A., SMALLWOOD L., SMITH T.ET DREWINKO B. Marrow cytometry and prognosis in myeloma. Journal of Clinical Investigation, 1983, 72, 853-861

5. TAFURI A., MEYERS J., LEE B.J. ET ANDREEFF M. DNA and RNA flow cytometric study in multiple myeloma : clinical correlations. Cancer, 1991, 67, 449-454.

6. TIENHAARA A. ET PELLINIEMI T.T. flow cytometric DNA analysis and clinical correlations in multiple myeloma. American Journal of Clinical Pathology, 1992, 97, 322-330.

7. GARCIA-SANZ R., ORFAO A., GONZALEZ M., MORO M.J., HERNANDEZ J.M., ORTEGA F., BORREGO D., CARNERO M., CASANOVA F., JIMMENEZ R., PORTERO J.A ; ET SAN MIGUEL J.F. Hyperdiploidy identifies subgroup of multiple myeloma (MM) patients with good prognosis. Britsh Journal of haematology, 1995, 90, 106-112.

8. SAN MIGUEL J.F., GARCIA-SANZ R., GONZALEZ M. ET ORFAO A. Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. Clinical Haematology, 1995, 8, 735-759.

9. SHANKEY T.V., RAVINOVITCH P.S., BAGWELL B., BAUER K.D., DUQUE R.E., HEDLEY D.W., MAYALL B.H. ET WHEELESS L.L. Guidelines for implimentation of clinical DNA cytometry, Cytometry, 1993, 14, 472-477.

10. LAÏ J.L.,ZANDECKI M., MARY J.Y., BERNARDI F., IZYDORCZYK V., FLACTIF M., MOREL P., JOUET J.P., BAUTERS F. ET FACON T. Improved cytogenetics in multiple myeloma : a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. Blood, 1995, 85, 2490-2497.

11. ZANDECKI M., LAÏ J.L. ET FACON T. Multiple myeloma : nearly all patients are cytogenetically abnormal. Britsh Journal of Haematology 1996 (in press).

12. MORGAN R.J., GONCHOROFF N.J., KATZMANN J.A., WITZIG T.E., KYLE R.A. ET GREIPP P.R. Detection of hypodiplody using multi-parameter flow cytometric analysis : a pronostic indicator in multiple myeloma. American Journal of Hematology, 1989, 30, 195-200.

13. FLACTIF M., ZANDECKI M., LAÏ J .L., BERNARDI F., OBEIN V., BAUTERS F. ET FACON T. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. Leukemia, 1995, 9, 2109-2114.