

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie physiologie cellulaire

Option génétique et physiologie

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Master II

**Application de la cytogénétique conventionnelle et
moléculaire (Caryotype et FISH) dans la leucémie
myéloïde chronique**

Présenté par :

FERHAT Meriem El Batoul

MEZIANE Samia

Composition du jury :

Mme CHAKHMA. A M.A.A UB1Présidente

Mr MOHAMED SAID.RM.C.B UB1 Examineur

Mme TAOUSSI. S M.C.AEHS ELCC(CAC)Promotrice

Mme GUESSAIBYA.N M.C.B UB1 Co-promotrice

Année universitaire 2016/2017

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier profondément les membres du jury en particulier Mme FAOUSSIS pour sa confiance, son soutien, ces orientations et sa disponibilité tout au long de ce travail.

A Mme GUESSAIBYAN pour son étroite collaboration, sa patience et sa pédagogie dans la rédaction de ce mémoire.

A Mme BOUCHAKOR pour son implication et sa précieuse aide pendant notre stage.

A l'occasion de l'achèvement de ce travail, nous présentons aussi nos sincères remerciements aux personnes ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire, en particulier :

Mme CHAKHMA Pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury, ainsi que Mr MOHAMMED SAJD d'avoir accepté d'examiner et discuter notre travail, auxquelles nous présentons le témoignage de notre sincère gratitude et de notre profond estime.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements, à tous les enseignants du Département de BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE.

Notre gratitude est également à l'ensemble du personnel du laboratoire qui nous ont beaucoup aidé pendant notre stage avec leurs précieuses directives et leurs judicieux conseils.

Merci à tous...

Dédicaces

Je remercie ma mère qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Je remercie mon très cher père pour son soutien et ses encouragements tout au long de ma vie, Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Je ne pourrais finir ces remerciements sans penser à mon binôme SAMJA, pour son esprit calme et sa gentillesse, à tous mes amies et proches, en particulier AHLEM, ZINEB, JMENE qui ont su me soutenir dans mes moments difficiles.

Sans oublier bien sûr tous mes enseignants qui m'ont prêté aide et assistance tout au long de mes études.

Dédicaces

À MES CHERS PARENTS,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À MES FRÈRES ET MA SŒUR,

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant vous protège et vous garde.

À MES CHERS NEVEUX ET NIECES,

Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

À Mon BIGNOME,

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je te remercie pour ton soutien moral et tes belles surprises sucrées. Je te souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

À MES AMIS DE TOUJOURS,

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je vous porte. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

À tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer

À tous mes enseignants tout au long de mes études

À tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne chronique caractérisée par une prolifération importante de la lignée myéloïde sans blocage de maturation et par la présence d'un marqueur cytogénétique typique : le chromosome Philadelphie résultant de la translocation réciproque entre les deux bras longs des chromosomes 9(q34) et 22(q11) mettant en contact un oncogène (Abl) et le gène Bcr créant un gène de fusion Bcr-Abl qui est traduit en une protéine fonctionnelle à activité tyrosine kinase élevée directement responsable de la transformation leucémique .

Nous avons réalisé au laboratoire d'hématologie EHS ELCC Blida la mise en culture de cellules médullaires (pendant 24h) avec synchronisation, réalisation d'un choc hypotonique, fixation du culot cellulaire, étalement pour établir le caryotype en bandes R pour la mise en évidence du chromosome Philadelphie. Un autre étalement est réalisé simultanément pour l'examen de cytogénétique moléculaire (FISH) ; techniques d'hybridation in situ reposent sur la capacité des fragments d'ADN marqués par un ou plusieurs fluorochromes (sondes) de s'hybrider spécifiquement avec un ADN complémentaire. Les hybrides non spécifiques sont éliminées par lavage, les hybrides spécifiques sont révélés par immunofluorescence mettent ainsi en évidence les gènes hybrides Bcr-Abl. En dernier on a la biologie moléculaire quantitative PCR ultra (entièrement automatisé) qui est l'examen de référence pour l'évaluation de la réponse au traitement.

Pour la prise en charge d'une hyperleucocytose majeure à 153000/ μ l associée à une splénomégalie et une myélémie à 45% le diagnostic de la LMC en phase chronique est confirmé par des examens cytogénétiques (caryotype et FISH) le patient est mis sous inhibiteurs de tyrosine kinase de première génération (Imatinib 400mg/J). En évaluation de la réponse selon les critères de l'ELN à 3, 6 et 12 mois le patient était toujours en rémission hématologique et cytogénétique complète ainsi en réponse moléculaire majeure (RMM) à 0.024% en biologie moléculaire, cette réponse optimale illustre bien l'efficacité du traitement.

Mots clés: Leucémie Myéloïde Chronique, Caryotype, FISH, Chromosome Philadelphie, PCR, ITK.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic malignant hemopathy characterized by extensive proliferation of myeloid lineage with no maturation blocking and by the presence of a typical cytogenetic marker: the Philadelphia chromosome resulting from reciprocal translocation between the two long arms of chromosomes 9 (q34) and 22 (q11) contacting an oncogene (Abl) and the Bcr gene creating a Bcr-Abl fusion gene which is translated into a functional protein with high tyrosine kinase activity directly responsible for the leukemic transformation.

We performed in the EHS ELCC Blida hematology laboratory the culture of medullary cells (during 24h) with synchronization, hypotonic shock, cell pellet fixation, spreading to establish the karyotype in R bands for highlighting of the Philadelphia chromosome. Another spread is performed simultaneously for molecular cytogenetic examination (FISH); In situ hybridization techniques rely on the ability of DNA fragments labeled with one or more fluorochromes (probes) to hybridize specifically with complementary DNA. Non-specific hybrids are removed by washing, the specific hybrids are revealed by immunofluorescence thus highlight the Bcr-Abl hybrid genes. Lastly, we have the ultra quantitative (fully automated) PCR molecular biology, which is the reference examination for evaluating the response to treatment.

For the management of major leukocytosis at 153000/ μ l associated with splenomegaly and 45% myelemia, the diagnosis of chronic phase CML is confirmed by cytogenetic examinations (karyotype and FISH). First-generation tyrosine kinase (Imatinib 400mg / J) is prescribed for the treatment. In evaluation of the response according to the ELN criteria at 3, 6 and 12 months the patient was still in complete hematological and cytogenetic remission thus in major molecular response (MRM) at 0.024% in molecular biology, this optimal response is a good illustration of the efficiency of treatment.

Key words: Chronic myeloid leukemia, karyotype, FISH, Philadelphia chromosome, PCR, ITK.

(CML) هو الورم الخبيث الدموي المزمن يتميز انتشار كبير من النضج النخاعي دون عرقلة ومن وجود علامة الوراثة الخلوية النموذجية: كروموسوم فيلادلفيا الناجم عن الإنتقال المتبادل بين الذراعين الطويلين للكروموسومين 9 (Q34) 22 (Q11) عن طريق الاتصال الجين الورمي (ABL) والجين BCR. هذا الترتيب ينتج عنه اندماج جينات عند نقطة الاندماج المترجم الى بروتين مؤلف يدعى تيروزين كيناز دائمة النشاط مسؤولة عن الانتقال الى سلطان اللوكيميا.

أجرينا في المختبر الدم EHS ELCC البليدة زراعة خلايا نخاع العظام (لمدة 24) تجسيدا لصدمة ناقص التوتر، وتحديد الخلية بيليه، ونشر لتحديد نط الكروموسوم فيلادلفيا. يتم إجراء انتشار آخر في وقت واحد لفحص الخلايا الوراثة الخلوية (FISH). تقنيات التهجين في الموقع تعتمد على قدرة شطايا الحمض النووي المسمى مع واحد أو أكثر فلوروكروميس (تحقيقات) لتهجين خصيصا مع الحمض النووي التكميلي. تتم إزالة الهجينة غير محددة عن طريق الغسيل، يتم الكشف عن الهجينة محددة من قبل المناعي وبالتالي تسليط الضوء على الجينات الهجين. وأخيرا لدينا البيولوجيا الجزيئية PCR العديدة التي تعتبر الفحص المرجعي لتقييم الاستجابة

بعد تشخيص زيادة في عدد الكريات البيضاء المرتبطة بتضخم الطحال والميليميا 45 سرطان الدم النخاعي المزمن بدراسات الوراثة الخلوية (تنميط نووي وFISH) يتم وضع المريض تحت مثبتات الجيل الأول من التيروزين كيناز (إماتينيب 400مغ في اليوم). في تقييم الاستجابة باستخدام معايير ELN 3 6 12 شهر وكان المريض لا يزال في الدموية و الخلوية والجزيئية كاملة رئيسية (MMR) 0.024% في البيولوجيا الجزيئية، وتوضح الاستجابة المثلى لفعالية العلاج.

الدالة : سرطان الدم النخاعي المزمن, تقنية الوراثة الخلوية , تقنية التهجين , كروموزوم فلادلفيا , بروتين تيروزين كيناز , البيولوجيا الجزيئية.

Liste des figures

Figure 1: Position des centromères chez les humains.....	4
Figure 2: Représentation schématique du génome humain à différentes échelles.....	5
Figure 3 : Schéma de l'hématopoïèse chez l'homme.....	7
Figure 4 : Structure de la protéine ABL.....	12
Figure 5 : Structure de la protéine BCR.....	13
Figure 6 : Le gène Bcr-Abl et la protéine (210kDa).....	14
Figure 7: Variante protéiques Bcr-Abl.....	15
Figure 8 : Les voies de signalisations cellulaires.....	16
Figure 9: Exemple d'hémogramme d'un patient atteint de la leucémie myéloïde lchronique en phase chronique montrant une forte hyperleucocytose.....	17
Figure 10: Envahissement médullaire par la lignée granuleuse sur un frottis de myélogramme dans une LMC.....	17
Figure 11 : Représentation schématique de translocation réciproque entre deux chromosomes.....	18
Figure 12: Caryotype d'un patient atteint de leucémie Myéloïde Chronique.....	19
Figure 13: FISH, mise en évidence du signal de fusion Bcr-Abl (sonde Bcr en vert, sonde Abl en rouge, et fusion Bcr-Abl en jaune).....	20
Figure 14: Les étapes de Polymérase Chain Réaction.....	21
Figure 15: Définition de la réponse moléculaire optimale.....	22
Figure 16 : Mécanisme d'action de l'Imatinib sur BCR-ABL.....	24
Figure 17: Ponction de la moelle osseuse.....	26
Figure 18: Exemple de caryotype bande R chez un sujet atteint de LMC.....	30
Figure 19: Les sondes Bcr.....	31
Figure 20: La sonde Abl.....	31

Figure 21: Schéma explicative du dépôt de sondes et la fixation de la lamelle avec le rubber cément.....	33
Figure 22 : Hybridation des sondes au niveau des gènes cible.....	33
Figure 23 : Frottis sanguin.....	38
Figure 24 : Le caryotype (bandes R) du patient: 46 XY t(9 ;22) (q34 ; q11)	39
Figure 25: Résultats attendus lors de la lecture de la FISH.....	40
Figure 26 : Résultats de la FISH du patient.....	41

Liste des tableaux

Tableau I :Classification des hémopathies malignes.....	8
Tableau II : Incidence standardisée (population mondiale standard) de bases de données.....	10
Tableau III :Incidence annuelle et globale de la leucémie myéloïde chronique en Algérie durant la période : 2005 -2009.....	10
Tableau IV :Résultat de l'hémogramme du patient.....	37
Tableau V : Définition des réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires.....	43
Tableau VI : Tableau résumant les résultats de l'évaluation des réponses hématologique et cytogénétique de notre patient sur 24 mois.....	44
Tableau VII : Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase de première ligne.....	45

Liste d'Abréviations

Abl :Le gène Abelson

ARNm:acide ribonucléique messenger

Bcr: Breakpoint Cluster Region

Chromosome Ph :Chromosome Philadelphia

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

DAPI:4',6-Diamidino-2-Phénylindole

dNTP:DésoxyNucléotides TriPhosphates

EDTA :Acide Ethylène Diamine Tétracétique

FISH:Fluorescent in situ hybridization

GD:guanosine diphosphate

GTP:guanosine triphosphate

ITK:inhibiteur de tyrosine kinase

Kcl:Chlorure de potassium

LMC:Leucémie Myéloïde Chronique

NaCl :Chlorure de sodium

NaOH:Hydroxyde de sodium

PCR:Polymerase Chain Réaction

RCC : réponse cytogénétique complète

RMC :réponse moléculaire complète

RT-PCR:Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Réaction

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Partie bibliographique.....	2
1. La cytogénétique	3
1.1 Historique.....	3
1.2 Définition.....	3
1.2.1 La cytogénétique conventionnelle (classique).....	3
1.2.2 La Cytogénétique moléculaire (FISH).....	4
2. Physiologie du sang et du system hématopoïétique	6
2.1 Hématopoïèse.....	6
2.2 Leucémogènese.....	7
2.3 Classification des hémopathies.....	8
3. La leucémie myéloïde chronique (LMC).....	9
3.1 Définition.....	9
3.2 Historique.....	9
3.3 Epidémiologie.....	9
3.4 Circonstance de découverte.....	11
3.5 Phases de la leucémie myéloïde chronique.....	11
3.6 Physiopathologie.....	12
3.6.1 Chromosome Philadelphie.....	12
3.6.2 Gène Abl et sa protéine.....	12
3.6.3 Gène Bcr et sa protéine.....	13
3.6.4 Gène Bcr/Abl et la protéine de fusion.....	14
3.6.5 Voies de signalisations et conséquence cellulaire.....	15
4. Examens biologiques.....	16

4.1 Hémogramme.....	16
4.2 Myélogramme.....	17
4.3 Caryotype.....	18
4.4 FISH.....	19
4.5 Biologie moléculaire PCR.....	20
4.6 Autres examens.....	22
5 .Traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique.....	21
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	25
1. Matériels.....	26
1.1 Ponction de la moelle osseuse.....	26
2. Méthodes.....	27
2.1 La culture cellulaire.....	27
2.2 La cytogénétique conventionnelle.(Caryotype).....	28
2.3 La cytogénétique moléculaire.(FISH).....	30
2.4 La biologie moléculaire.(PCR).....	35
Chapitre III : Résultats et discussion.....	36
Conclusion.....	46
Annexe.....	47
Références bibliographiques.....	54

Introduction

L'ensemble des mécanismes qui assurent la fabrication et le renouvellement des différentes cellules sanguines s'appelle l'hématopoïèse. C'est l'un des processus biologiques les plus régulés et les plus stables. Néanmoins, il arrive que son fonctionnement soit altéré, menant à des anomalies sanguines. Les plus connues sont les leucémies. D'une façon générale, la leucémie signifie que les cellules du sang (ou de la moelle osseuse) sont devenues cancéreuses, et se multiplient anormalement. Elle est définie d'un point de vue clinique, en fonction de son caractère (chronique ou aigue) et du type de cellules impliqué (myéloïde, lymphoïde, ou monocytique).

(Adimy, 2006)

La leucémie myéloïde chronique est une affection myélo-proliférative monoclonale caractérisée par l'expansion des cellules hématologiques porteuses de l'aberration chromosomique connue sous le nom de «chromosome de Philadelphie».**(Demetri, 2009).**

La leucémie myéloïde chronique (LMC) constitue un modèle majeur en Onco-Hématologie avec plusieurs « premières » à son actif : Il s'agit en effet de la première affection dans laquelle un marqueur chromosomique spécifique a été détecté sous la forme de chromosome Philadelphie, par Peter Nowell et son étudiant en Thèse, David Hungerford.**(Nowell, 1960).**

La formation du chromosome de Philadelphie est due à une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 ((t:9;22) (q34;q11)) qui conduit à la formation d'un nouveau gène de fusion, le BCR-ABL, encodant une tyrosine-kinase active. Cette protéine de fusion dérégule la tyrosine kinase constitutive et est responsable de la genèse de la leucémie.**(Adimy, 2006).**

Des analyses de cytogénétique reposant sur le caryotype et l'hybridation fluorescente In situ (FISH) sont indispensables pour diagnostiquer la LMC, pour déterminer la phase de la maladie et aussi pour évaluer son pronostic afin de choisir le schéma thérapeutique adéquat au patient. Une thérapeutique ciblée contre l'activité tyrosine kinase de la protéine chimérique BCR-ABL, est rapidement devenue la thérapeutique standard en modifiant remarquablement son pronostic. **(Larson, 2008).**

L'objectif de notre étude est de réaliser différentes techniques cytogénétiques ; caryotype et Hybridation fluorescente in situ (FISH) et de biologie moléculaire (PCR), pour un patient atteint de la leucémie myéloïde chronique au sein du laboratoire de cytogénétique, service d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire(CHU) Frantz fanon, pour diagnostiquer la leucémie myéloïde chronique.

Chapitre I : Rappels Bibliographique

1. Cytogénétique :

1.1 Historique :

La cytogénétique pratiquement née avec le vingtième siècle est une discipline jeune. Les progrès les plus récents ont amené la transformation des méthodes, et l'élargissement des applications. La connaissance de l'organisation des chromosomes a permis de rendre compte des particularités et des variations de l'ADN constitutif. A l'heure actuelle, l'apport cytogénétique est devenu indispensable à plusieurs pathologies humaines. La découverte des bandes chromosomiques va améliorer considérablement les potentialités d'analyses et permet la reconnaissance plus aisée des anomalies chromosomiques. Actuellement la cytogénétique apparaît comme une science à part entière. Plusieurs spécialités se sont développées (**Springer, 1979**)

-) Etudes des anomalies chromosomiques constitutionnelles.
-) Dépistage anténatal des aberrations chromosomiques.
-) Analyse des anomalies chromosomiques acquises présentes dans les cancers et les leucémies ou consécutives à l'exposition aux radiations ionisantes, à des substances toxiques ou des agents mutagènes.
-) Localisation des gènes ou de segment d'ADN sur les chromosomes, ayant pour objectif d'établir une carte chromosomique du génome humain. (**Springer, 1979**)

1.2 Définition :

La cytogénétique est une science qui s'intéresse aux chromosomes. En général, la Cytogénétique a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de biologie moléculaire, afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques). (**Delabesse, 2003**)

1.2.1 La cytogénétique conventionnelle (classique) :

La cytogénétique classique ou caryotype est l'arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une prise de vue microscopique. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard, par paire et classés en fonction de :

-) La taille
-) La position des bandes après coloration
-) La position des centromères (**Rumpler, 2000**)

Dans l'espèce humaine normale, le nombre des chromosomes est de 46. Leur taille et leur forme sont variables. Il existe des chromosomes métacentriques (fig1, a), dont le centromère est en position médiane, des chromosomes sub-métacentriques (fig1, b), dont le centromère est plus près de l'une des extrémités que de l'autre (le chromosome possède alors des bras longs << q >> et des bras courts << p >>) et des chromosomes acrocentriques (fig, c), dont le centromère est à l'une des extrémités (ces chromosomes ne possèdent alors que des bras longs). **(Rumpler, 2000)**

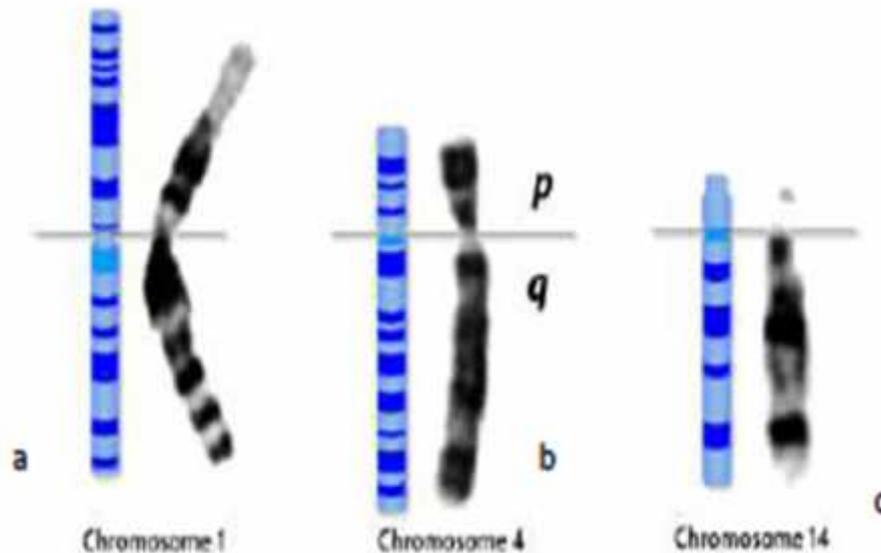


Figure 1 : position des centromères chez les humains **(Rumpler, 2000)**.

- a : chromosome 1 métacentrique.
- b : chromosome 4 Submétacentrique.
- c : chromosome 14 Acrocentrique.

Sur chaque chromosome, on définit différentes parties (régions) :

- Ces régions sont subdivisées en divers bandes.
- Ces bandes sont subdivisées en plusieurs sous-bandes, et ceci permet de nommer chaque portion du chromosome. **(Rumpler, 2000)**

1.2.2 La Cytogénétique moléculaire (FISH) :

1.2.2. a Principe général :

La cytogénétique moléculaire est une nouvelle approche morphologique qui utilise à la fois les outils de la biologie moléculaire et de la cytogénétique. La principale technique utilisée actuellement est l'hybridation in situ fluorescente (FISH) qui consiste en l'hybridation de sondes froides d'ADN sur des lames de préparations cytogénétiques de cellules métaphasiques ou inter-phasiques et sa révélation par fluorescence. Initialement utilisée pour localiser certaines séquences répétées de l'ADN sur des chromosomes métaphasiques, son champ d'application s'est

progressivement diversifié. Elle constitue actuellement un outil puissant et performant dans l'établissement de la carte du génome humain, l'analyse des processus tumoraux et le diagnostic chromosomique prénatal et post-natal (**Abdelmoula, 2000**).

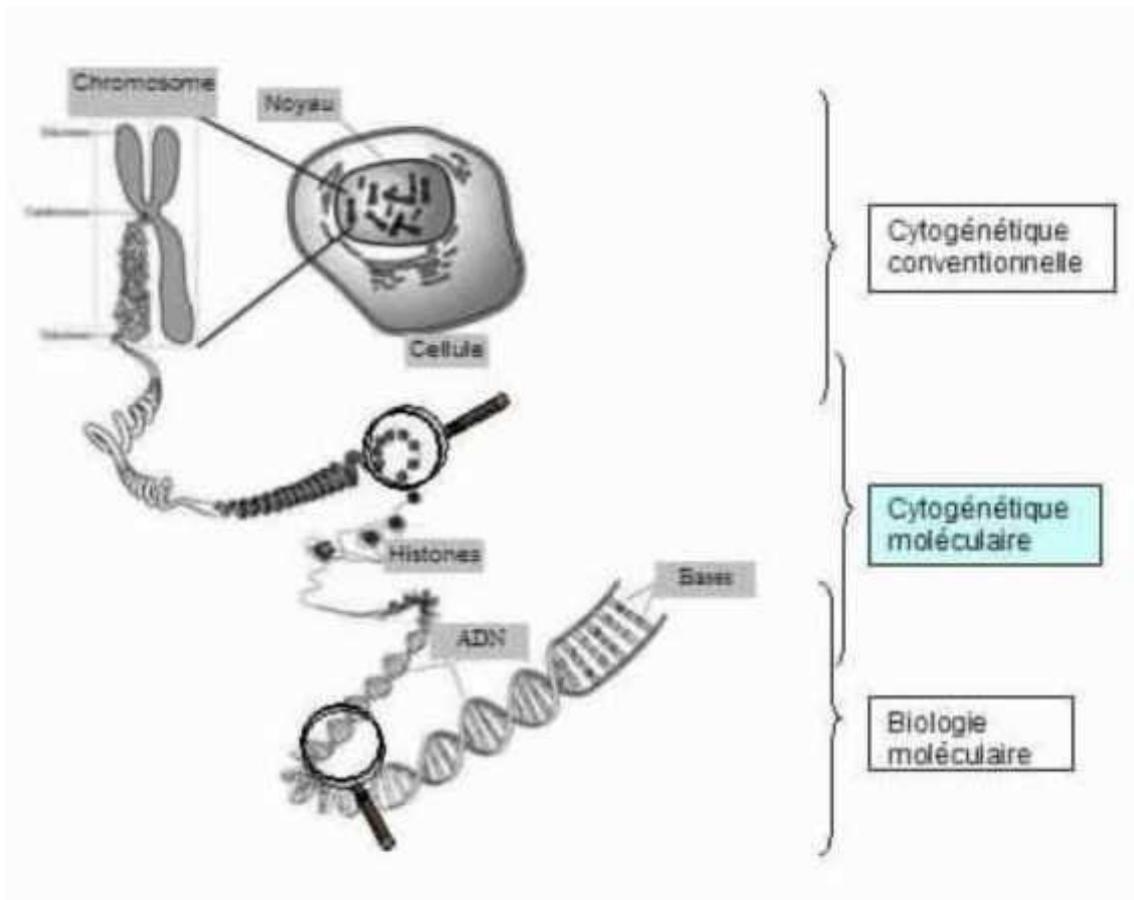


Figure 2 : Représentation schématique du génome humain à différentes échelles (**Abdelmoula, 2000**).

1.2.2.b Les sondes :

Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome. Pour la FISH on utilise des sondes spécifiques de régions chromosomiques ou des sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée. On distingue :

Les sondes composées de séquences spécifiques d'ADN répété. Elles sont de petite taille (moins de 1000 paires de bases ou 1 kilobase), mais s'hybrident sur des séquences spécifiques (centromères par exemple) répétées en tandem sur plusieurs centaines de kilobases. Elles génèrent des signaux ponctuels de forte intensité.

Les sondes composées de séquences uniques, on distingue les sondes spécifiques de loci et les sondes spécifiques d'un bras chromosomique ou d'un chromosome entier. (**Romana, 1994**)

1.2.2.c Le marquage :

C'est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le dUTP, couplé aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couplés à des fluorochromes. Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connues sont le Random-priming et la Nick-translation. (Charle,2009)

1.2.2.d Les fluorochromes :

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission. Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (exc 495nm – em 519nm) fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) (exc 495nm – em 519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red (exc 589nm – em 615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 (exc 650nm – em 670nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5.5 (exc 675nm – em 694nm) fluoresce dans le rouge(Miller,2010)

2. Physiologie du sang et du system hématopoïétique :

2.1 L'hématopoïèse :

L'hématopoïèse est définie comme étant un ensemble de mécanismes biologiques qui concourent à la production et à la régénération continue des cellules sanguines, très différenciées, et indispensables à la vie des organismes complexes multicellulaires. Elle assure une production importante de cellules sanguines, de l'ordre de 10¹³ cellules sanguines/jour (Orkin, 2008).

Ce processus physiologique régulé commence à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) possédant la capacité d'autorenouvellement et de multipotence leur permettant de générer toutes les lignées du système hématopoïétique. Au cours de cette différenciation pyramidale, les CSH perdent d'abord leur capacité d'autorenouvellement, et s'engagent vers des cellules

multipotentes, capables de donner des progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes, qui acquièrent leur potentiel de différenciation de lignée myéloïde ou lymphoïde, et finalement s'engagent, pour aboutir à la production des cellules fonctionnelles matures terminales (Dingli et al., 2007).

L'hématopoïèse comporte 4 compartiments (Figure 3) :

) Les cellules souches pluripotentes: cellules très primitives ayant un haut pouvoir de prolifération, capables d'autorenouvellement et de différenciation vers toutes les lignées hématopoïétiques.

) Les progéniteurs : cellules capables de proliférer sans s'autorenouveler, de se différencier. Ces cellules sont déjà engagées vers une seule lignée cellulaire: BFU-E (Burst-Forming Unit Erythroid) et CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) pour la lignée érythroblastique, BFU-Meg et CFU-Meg pour la lignée mégacaryoblastique, CFU-M pour la lignée granulo-monocytaire, progéniteurs B et T pour les lymphocytes B et T.

) Les précurseurs: cellules morphologiquement identifiables, correspondant à des cellules en cours de maturation avant leur passage dans la circulation sanguine.

) Les cellules matures: cellules fonctionnelles qui circulent dans le sang et maintiennent l'homéostasie.(Cavazzana-Calvo ,2004)

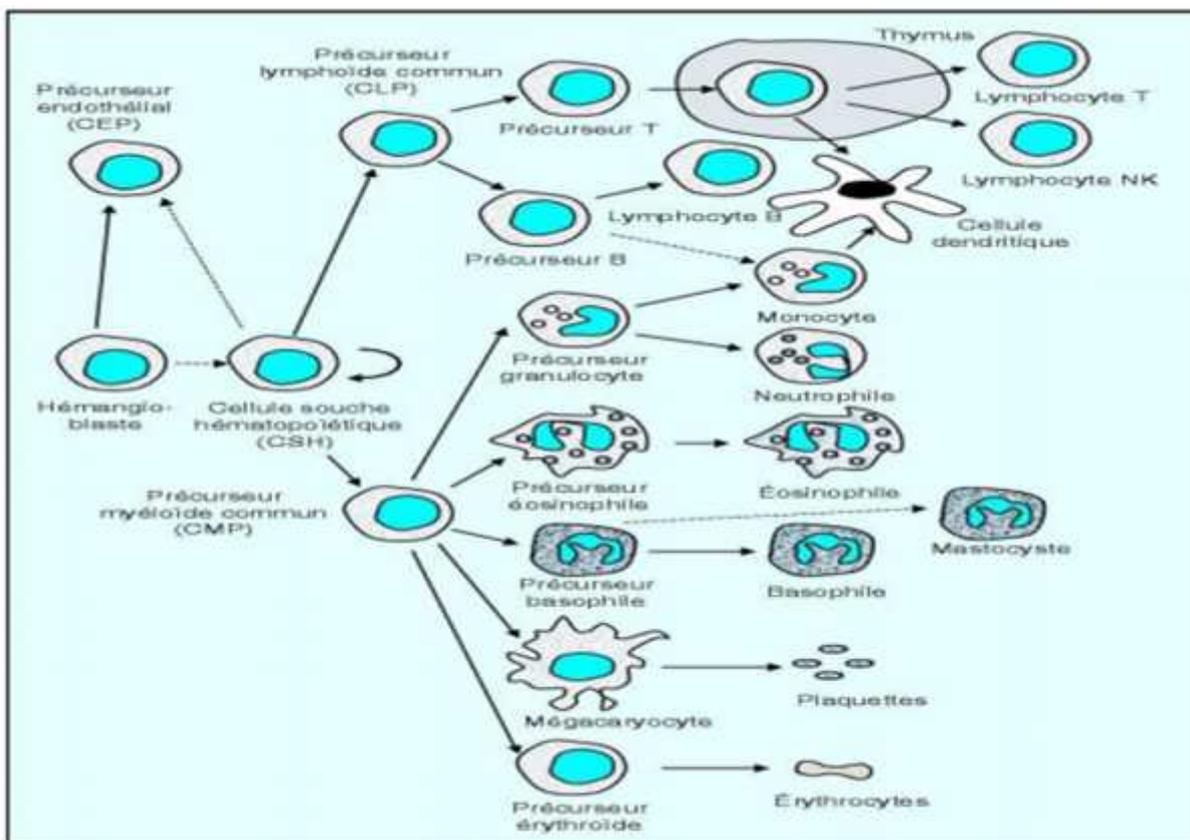


Figure 3:Schéma de l'hématopoïèse chez l'homme (Cavazzana-Calvo.,2004)

2. 2. La leucémogènese :

C'est l'ensemble des mécanismes responsable de la transformation des cellules normales en cellules leucémiques, elle est cliniquement et pathologiquement scindée en deux: leucémie aigüe et chronique. Elle est aussi scindée en fonction de l'origine des cellules tumorales: cellules lymphoïdes et cellules myéloïdes.

) La leucémie aigüe: caractérisée par une prolifération accrue et anarchique des cellules immatures du sang non fonctionnelles, ayant une histologie anormale. Un traitement rapide est requis immédiatement pour éviter la diffusion de ces cellules aux organes.

) La leucémie chronique: les cellules cancéreuses de ce type de leucémie sont plus matures, bien que toujours anormales et passant dans le sang, l'évolution se fait sur des mois voire sur des années (**Burke, 2008**).

2.3. Classification des hémopathies:

Les classifications des hémopathies se sont succédé depuis le début des années 1970 pour aboutir à une classification internationale consensuelle publiée en 2000 sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette nouvelle classification tient compte du tissu d'origine de la prolifération, lymphoïde ou myéloïde, puis des éléments cliniques, morphologiques, histologiques, génétiques et moléculaires pour définir chaque entité. (**Mehta et Hoftbrand, 2003**)

Tableau I: Classification des hémopathies malignes (**Mehta et Hoftbrand, 2003**)

	Aigüe	Chronique
Lymphoïde	Lymphoblastique aigüe (LLA) et sous types) Leucémies chronique (LLC) et variantes.) Lymphome non Hodgkinien (LNH).) Lymphome de Hodgkin (LH).) Myélome multiple et variantes.
Myéloïde	Leucémie myéloïde aigüe (LMA) et sous types) Leucémie myéloïde chronique (LMC) et variantes.) Myélodysplasie (MDS).) Affections myéloprolifératives.

3. La leucémie myéloïde chronique (LMC)

3.1 Définition :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif monoclonal dû à une atteinte de la cellule souche pluripotente. Elle est responsable de la prolifération maligne prédominante de la lignée granulocytaire et caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie ou de son transcrite moléculaire (**Ruffer, 2003**)

3.2 Historique :

Il y a près de 160 ans, Bennet, simultanément avec Virchow, avait observé une apparence blanchâtre du sang de deux patients. C'était les deux premiers cas de LMC. La caractérisation précise de cette hémopathie maligne a pris de nombreuses années. On doit à Nowel et Hungerford en 1960 la première description de l'anomalie cytogénétique au niveau du Chromosome 22 appelée chromosome Philadelphie (**Nowell, 1960**).

Il a fallu attendre encore 13 ans pour que Janet Rowley montre qu'il s'agissait en fait d'une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 (**Rowley, 1973**).

Puis, 10 ans de plus pour que Bartram et Groffen établissent que cette translocation équilibrée dite t(9;22) est responsable de la juxtaposition de deux gènes BCR et ABL Au niveau du bras long du chromosome 22 (**Bartram, 1983**) (**Groffen, 1984**).

3.3 Epidémiologie :

La LMC représente 7 à 15 % des leucémies de l'adulte, avec environ dix nouveaux cas par an pour un million d'habitants, soit 600 nouveaux cas par ans en France. Cette affection touche préférentiellement les hommes, avec un sex-ratio proche de deux, son incidence augmente avec l'âge pour atteindre trois cas par million d'habitants chez les sujets âgés (médiane de survenue entre 45 et 50 ans).

Les taux d'incidence varient de 0,6 à 2 cas pour 100000 habitants, et augmentant avec l'âge (**Rohrbacher et Hasford, 2009**).

Tableau II : Incidence standardisée (population mondiale standard) de bases de données (**Rohrbacher et Hasford, 2009**).

Registre	Période	Nombre de patients	Incidence
Etats unis (SEER- US)	2000-2005	4460	1,0
France	1985- 2006	906	0,8
Suisse (SCR)	1998-2000	260	0,7
Ecosse (SLR)	1999-2000	61	0,6
Angleterre (Sud) (TR)	1999-2000	180	0,8
Sarre (Allemagne) (CRS)	1998-2000	65	1,0

Dans la grande majorité des cas, aucune étiologie n'est retrouvée. Cependant, l'exposition à des radiations ionisantes pourrait jouer un rôle favorisant. Cette hypothèse, suggérée est liée à l'augmentation de l'incidence de la LMC chez les survivants de la bombe atomique d'Hiroshima (**Deininger et coll, 1998**).

En Algérie, une étude épidémiologique, faite entre 1994 et 2004 a montré un taux de prévalence est de 1,8/100.000 habitants. L'incidence est en progression puisqu'elle passe de 0,19/100.000 habitants en 1994 à 0,4/100.000 habitants en 2004. La répartition des nouveaux cas de LMC par année passe de 53 cas en 1994 à 130 cas en 2004, avec une moyenne de 88 nouveaux cas par année. Cette étude a aussi démontré une légère prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,12. L'âge moyen au diagnostic est de 44 ans après un an une autre étude a été faite entre 2005 et 2009 avec les variations des taux d'incidences selon le tableau IV(**Djouadi , 2009**).

TableauIII: Incidence annuelle et globale de la leucémie myéloïde chronique en Algérie durant la période : 2005 -2009 (**Djouadi-Lahlou, 2009**)

Année	Nombre de cas	Population en million	Taux d'incidence
2005	121	32,5	0,37
2006	150	33	0,45
2007	170	33,5	0,50
2008	182	33,7	0,54
2009	155	35,1	0,44
Total	778	33,5	0,46

3.4 Circonstances de découverte :

Le début est insidieux et difficile à préciser ; une symptomatologie non spécifique, asthénie, une pesanteur de l'hypochondre gauche amènent à la découverte d'une splénomégalie ; qui est l'augmentation du volume de la rate, elle est quasi constante dans le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique e, de volume modéré à très important, indolore, l'échographie abdominale en définit précisément la taille, plus au moins proportionnelle à l'hyperleucocytose(**Quitas-Cardama, 2009**).

- J) Assez souvent (40% des cas) la découverte est fortuite à l'occasion d'un examen systématique clinique ou biologique (l'hémogramme)
- J) Plus rarement, la maladie est découverte à l'occasion d'une complication : crise de goutte, infarctus splénique, thrombose veineuse, trouble visuels ou insuffisance respiratoire par leucostase.
- J) Exceptionnellement la maladie n'est découverte qu'au stade de transformation aiguë, la phase chronique étant passée inaperçue.(**Sebahoun, 2006**)

3.5 Les phases de la leucémie myéloïde chronique :

La leucémie myéloïde chronique évolue en trois phases : une première phase dite «chronique», pauci symptomatique, suivie d'une deuxième phase, caractérisée par une accélération de la maladie, et enfin une troisième phase, appelée « transformation aiguë », prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient (**Leguay, 2005**).

a. Phase chronique : Cette première phase d'installation progressive dure en moyenne 4 à 5 ans. Les signes cliniques sont souvent insidieux et de nombreux patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic, suspecté devant un hémogramme réalisé à titre systématique. (**Leguay, 2005**).

b. Phase d'accélération : Elle correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne. Elle peut cependant être quasi inexistante, la phase blastique étant alors « explosive ». (**Jabboure, 2012**).

c. Phase blastique : Elle survient avec un délai médian de 4 ans et se définit par la présence de plus de 20 % de blastes médullaires ou plus de 30 % de blastes et promyélocytes sanguins ou médullaires. Elle s'accompagne en général de douleurs osseuses, de sudation nocturne, et d'adénopathie et d'une instabilité génétique accrue. (**Borries, 2003**).

3.6 Physiopathologie de la LMC :

3.6.1 Le chromosome Ph :

Le chromosome Ph est un chromosome 22 raccourci, résultant d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 t(9,22). C'est une anomalie cytogénétique acquise présente dans 95% des cas de la LMC et constamment présente dans les cellules de ces patients. Cette translocation réalise un échange de matériels génétique entre les bras long des chromosomes 9 et 22, aboutissant à un gène de fusion Bcr-Abl qui constitue donc l'équivalent moléculaire du chromosome Philadelphie. Ce gène est fonctionnel, c'est-à-dire transcrit en un ARNm de 8.6kb qui lui-même code pour une protéine. (Breccia, 2011).

3.6.2 Gène Abl et sa protéine :

L'oncogène Abelson (c-Abl) est localisé sur le chromosome 9 en position 9q34, dont nom est dérivé de son homologue viral le gène Abelson (v-Abl) responsable d'une leucémie chez les souris. Il est exprimé dans une grande variété de types cellulaires, dont la lignés hématopoïétiques, la rate, le thymus, le testicule. Il existe deux variantes possibles pour le premier exon le majoritaire et Abl, et les ARNrns messagers produits mesurent respectivement 6 et 7 kb. (Costello , 1996).

Le gène Abl code pour une protéine tyrosine kinase de 145kDA (deux variétés exprimées en fonction de l'exon 1a ou 1b), sans fonction de récepteur. Elle est exprimée de façon ubiquitaire et retrouvée tant dans le noyau que dans le cytoplasme. (Deininger ,2000).

La structure de la protéine cellulaire Abl est hautement conservé (figure 4). Comme la plupart des protéines induisant un signal intra-cellulaire, la protéine Abl possède des domaines d'homologie SH (Src homology) semblables à ceux de la protéine Scr.

Le domaine SH3 est un régulateur négatif du domaine SH2, qui est pour sa part un régulateur positif du domaine SH1, support de l'activité tyrosine kinase de la protéine Abl. Dans la partie C-terminale de la protéine ; il existe une séquence de localisation nucléaire (NLS pour nuclear Localization Signal) ainsi que les domaines lui permettant de se fixer aux filaments d'actines de l'acide désoxyribonucléique (ADN)(Bhamidipati , 2013).

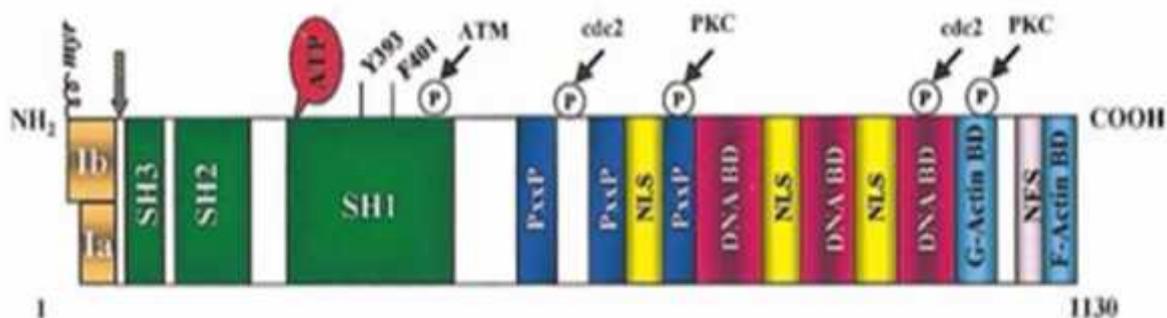


Figure 4 : Structure de la protéine ABL (Leguay , 2005)

Son action dépend de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique : dans le compartiment nucléaire, Abl joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire, alors que dans le cytoplasme la protéine Abl joue un rôle important dans la croissance de la prolifération cellulaire, participant à la translocation du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissances .(Leguay, 2005).

3.6.2 Gène Bcr et sa protéine :

Le gène Bcr, positionné sur le bras long du chromosome 22, s'étend sur 135kb et comprend 23 exons. Il permet la transcription de deux ARN messagers dont les poids moléculaire sont respectivement de 4.5 et 6.7kb, codant une protéine de 160 kDa. (Costello, 1996)

Les cassures chromosomiques de la LMC surviennent presque exclusivement dans une région de 5.8kb du gène Bcr, appelé région M-Bcr (major- breakpoint cluster region), en dehors des exons, et essentiellement entre les exons 3 et 4 ou bien 2 et 2, néanmoins des cassures sont possibles dans chacune des cinq zones définies dans M-Bcr. (Deininger, 2000)

Les fonctions biologiques normales de la protéine Bcr sont encore mal connues. Cette protéine de 160 kDa est exprimée de façon ubiquitaire. Elle est localisée dans le cytoplasme lorsque la cellule n'est pas en cycle et est exprimée de manière périchromosomique lors de la mitose, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire. (Leguay , 2005)

La protéine Bcr est constituée de plusieurs domaines (**Figure 5**). Dans la partie N-terminale, le domaine 1B constitue une région importante puisqu'il permet la dimérisation de la protéine Bcr-Abl conduisant à l'ouverture de l'activité tyrosine kinase. Le domaine 2B comprend deux sites de liaisons aux domaines SH2 comme ceux portés par la protéine Abl et la protéine Dbl (facteur d'échange guanosine triphosphate GTP/guanosine diphosphate GDT. La partie C-terminal de Bcr absente dans la protéine de fusion Bcr-Abl, a une fonction GAP (GTPase activating protein) pour les protéines G DE TYPE Rac (**Bhamidipati , 2013**)

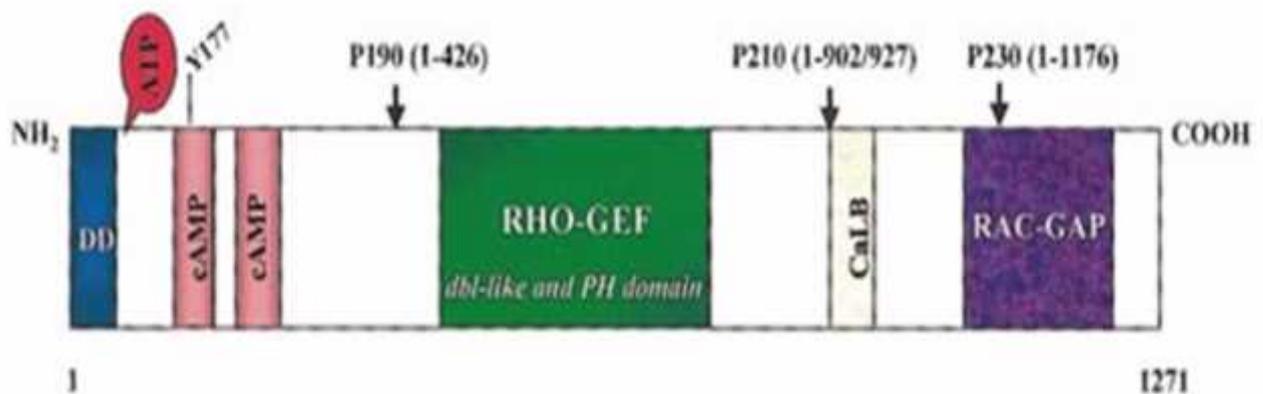


Figure 5 : Structure de la protéine BCR. (Bhamididipati., 2013).

3.6.4 Gène Bcr-Abl et protéine de fusion :

La translocation réciproque fusionne l'oncogène Abl avec la région Bcr donnant un gène hybride codant pour une protéine de 210kDa à activité tyrosine kinase (**figure 6**). Cette protéine joue un rôle majeur dans le développement de la leucémie par son action sur le cycle cellulaire. En effet, l'activité tyrosine kinase constitutive de la protéine Bcr-Abl est un élément essentiel de la fonction leucémogène de la protéine de fusion Bcr-Abl. Contrairement à la protéine Abl dont la fonction est étroitement régulée, la protéine Bcr-Abl interfère avec des processus cellulaires normaux comme la prolifération. L'adhérence et l'apoptose en activant des voies de transduction du signal de façon autonome. Elle comprend les trois domaines SH1, SH2, SH3 et tous les autres domaines d'Abl. Du côté Bcr, le motif de dimérisation est la partie la plus importante. Cette partie de Bcr conduit à la dimérisation de la protéine Bcr-Abl et son auto-activation par transphosphorylation. De plus, la perte de la partie N-terminal d'Abl supprime son auto-inhibition. Ces deux modifications protéiques expliquent l'activation permanente de la tyrosine kinase de Bcr-Abl.

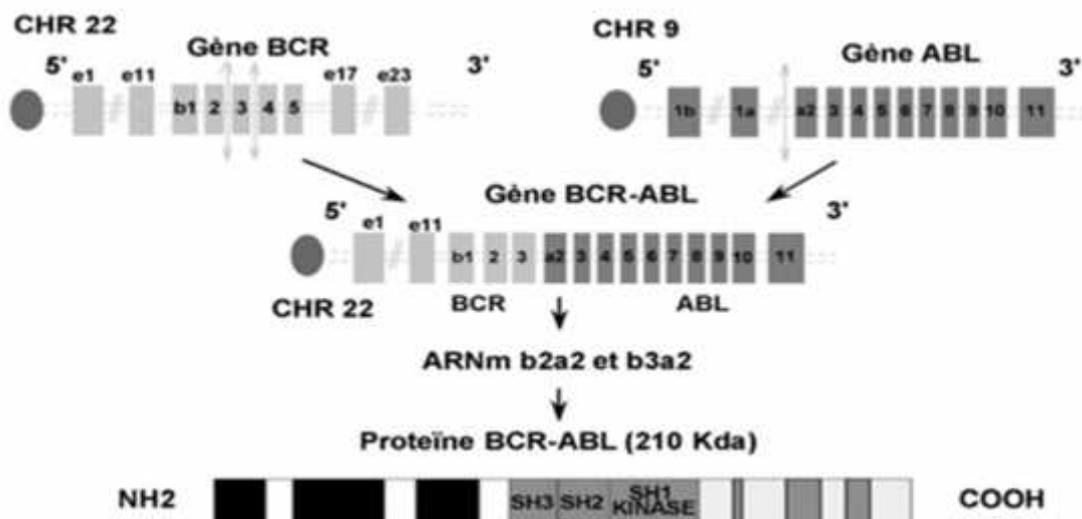


Figure 6 : Le gène Bcr-Abl et la protéine (210kDa) (Mahon , 2001)

Par ailleurs il existe d'autres variantes de la protéine de fusion qui sont en fonction de la régions de cassure du gène de fusion Bcr et responsables de différents types de transcrits (**figures 7**). En effet si la protéine 210kDa provient du gène de fusion Bcr-Abl lorsque la cassure de Bcr survient dans la région M-Bcr, une protéine de 190 kDa correspond quant à elle a une cassure dans la région m-bcr (minor-Bcr) et est retrouvée dans deux tiers des LAL et de très rare cas de leucémie myéloïde chronique (LMC). Sa variante est la protéine chimérique de 230kDa qui correspond à une cassure dans la μ -Bcr (micro BCR), entre les exons 19 et 20.(Costello, 1996) (Deininger, 2000) (Eclache , 2002)(Leguay , 2005)

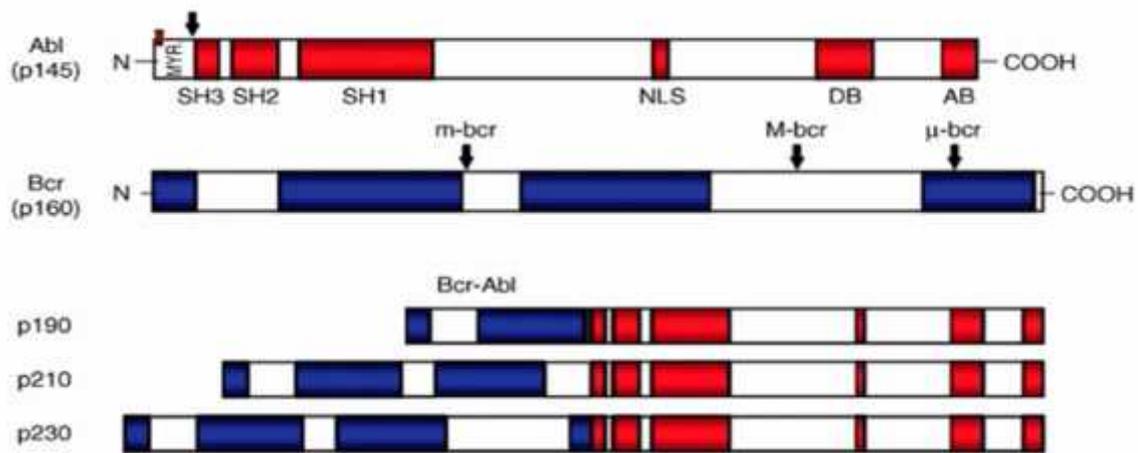


Figure 7 : Variante protéiques Bcr-Abl (Leguay , 2005)

3.6.5 Voies de signalisations et conséquences cellulaire :

De par sa forte activité tyrosine kinase, la protéine Bcr-Abl est capable de phosphoryler divers substrats impliqués dans plusieurs voies de transduction (**figure 8**) avec pour conséquences :

-)] L'activation des voies de Ras et JAK-STAT entraînant croissance et prolifération cellulaire.
-)] Le blocage de l'activité des caspases par activation de Bcl2 inhibant l'apoptose et induisant une accumulation des cellules leucémiques.
-)] La diminution de l'adhésion au stroma médullaire des cellules tumorales immatures, qui échappent au rôle essentiel des molécules d'adhésion comme les intégrines dans la régulation de l'hématopoïèse.
-)] Une dégradation via le protéasome des protéines Abi1 et Abi2, inhibiteurs physiologique de l'activité kinase d'Abl et une dégradation d'enzymes de réparation de l'ADN responsable d'une instabilité génomique à l'origine de la progression de la LMC vers une phase d'accélération ou d'acutisation. (**Leguay, 2005**).

Ainsi sur le plan cellulaire on assiste à des modifications au niveau de l'adhésion, du cycle cellulaire, de la réponse à l'apoptose des cellules leucémiques, conséquence directe ou indirecte du gène normal. La présence du gène Bcr-Abl conduit aussi à des altérations secondaires du génome. Cela fait le lien avec une caractérisation clinique de la maladie qui évolue inexorablement vers la transformation aigüe ou crise blastique. (**Mahon, 2001**).

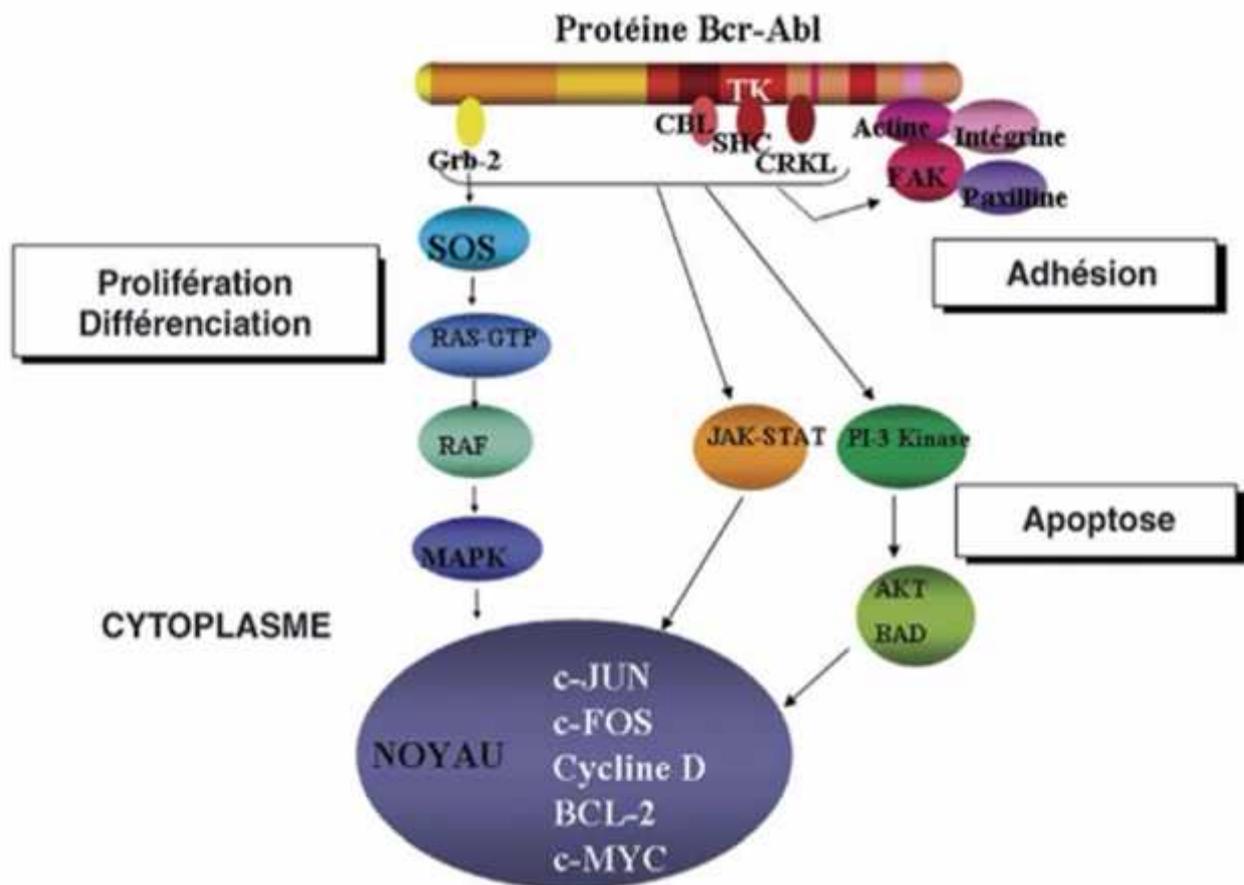


Figure 8 : Les voies de signalisations cellulaires(Leguay, 2005)

4. Examens biologique :

4.1 Hémogramme :

L'hémogramme désigné sous le terme de (Numération-Formule Sanguine) est l'examen biologique le plus prescrit dans la Leucémie myéloïde chronique .Il apporte des informations sur les cellules du sang contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme.

L'hémogramme constitue l'expression du résultat de :

- la numération des éléments cellulaires du sang circulant (hématies, leucocytes et plaquettes) accompagné de paramètres permettant de caractériser la population érythrocytaire (constantes érythrocytaires).
- la formule leucocytaire : détermination de la proportion des différents types de Leucocytes (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, Monocytes) et la détection d'autres cellules éventuellement (anormalement Rencontrées dans le sang)(Grady, 2005).

CITOLOGIE			
BREAK			
NUMERATION			
Leucocytes (+Erythroblastes)	258.03	10.9/1	(N: 4.0-10.0)
Erythrocytes	2.09	10.12/1	(N: 4.5-6.5)
Hémoglobine	6.6	g/dl	(N: 13.0-17.0)
Hématocrite	20.2	%	(N: 40-52)
V.G.M	96.7	10 ⁻¹⁵ l	(N: 82-98)
T.C.M.H	31.6	10 ⁻¹² g	(N: 27-32)
C.C.M.H	32.7	g/dl	(N: 32-36)
Plaquettes	856	10 ⁹ /l	(N: 150-400)
Volume plaquettaire moyen	10.7	10 ⁻¹⁵ l	
BREAKEND			
BREAK			
FORMULE LEUCOCYTAIRE			
Polynucléaires neutrophiles	57	%	soit 147.1 10.9/1
(N: 1.5-7.0)			
Polynucléaires éosinophiles	3	%	7.7 10.9/1
(N: 0-0.4)			
Polynucléaires basophiles	2	%	5.2 10.9/1
(N: 0-0.1)			
Lymphocytes	3	%	7.7 10.9/1
(N: 1.5-4.0)			
BREAKEND			
Erythroblastes	2	%	
Métamyélocytes neutrophiles	13	%	
Myélocytes	15	%	
Prémélocytes	1	%	
Blastes	4	%	
Morphologie			
Anisocytose			
Les granulocytes sont pauvres en grains			

Figure 9 :Exemple d'hémogramme d'un patient atteint de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique montrant une forte hyperleucocytose (Grady,2005).

4.2 Myélogramme :

Cet examen est réalisé par une ponction au niveau du sternum, ou au niveau de la crête iliaque, il est indispensable, non pas au diagnostic, mais il permet de définir le pourcentage de blastes, afin de déterminer le stade de leucémie myéloïde chronique et de réaliser le caryotype. Le myélogramme met en évidence l'hyperplasie du tissu myéloïde. C'est surtout la lignée granuleuse qui est hyperplasique (jusqu'à près de 95%) mais de façon harmonieuse et sans blastose significative inférieure à 5%. Les mégacaryocytes peuvent être hyperplasiques et des densifications de la réticuline est possible mais sans ostéo-myélofibrose (Sebahoun, 2005).

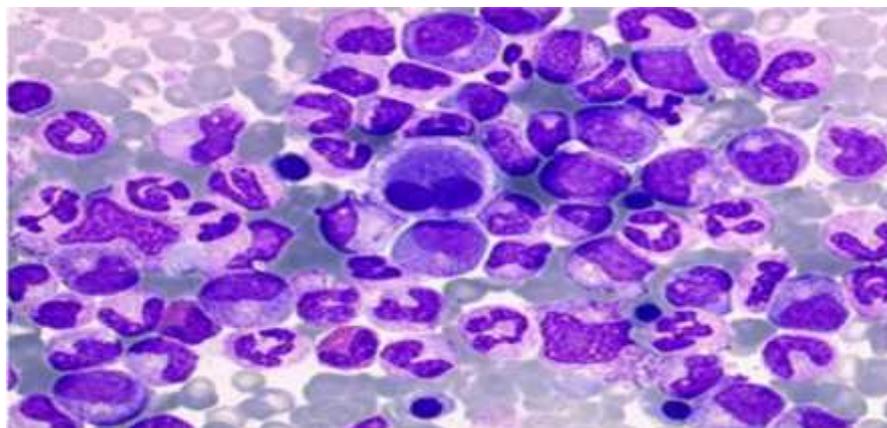


Figure 10 : Envahissement médullaire par la lignée granuleuse sur un frottis de myélogramme dans une LMC. (Sebahoun, 2005).

4.3 Le caryotype :

Les caryotypes sont réalisés dans le but de détecter des aberrations chromosomiques, dans la leucémie myéloïde chronique c'est une Translocation réciproque : Il s'agit d'un échange de matériel entre deux chromosomes nonhomologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués. (Goasguen, 2000)

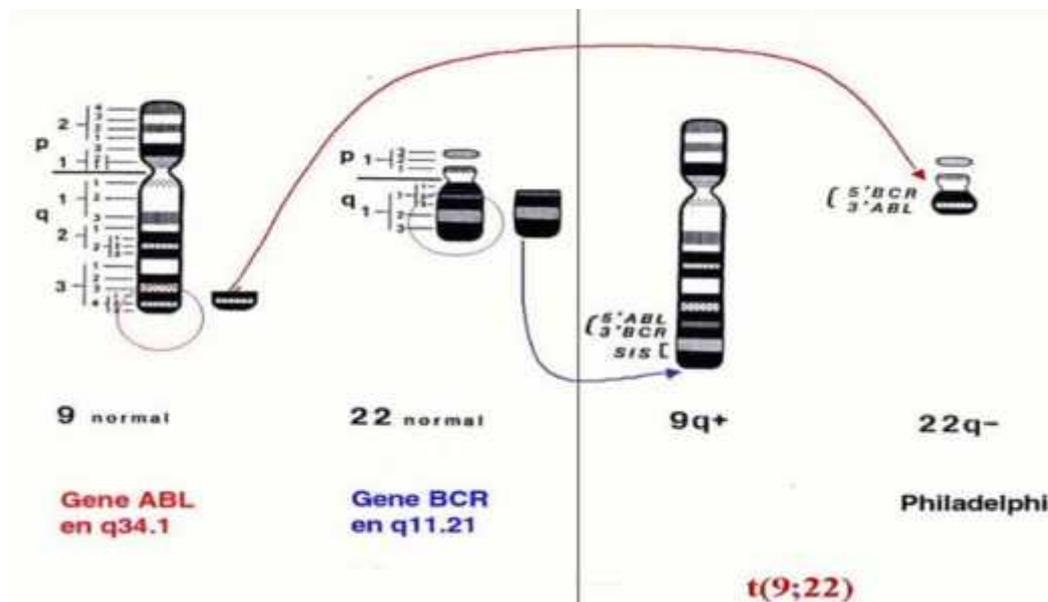


Figure 11 : Représentation schématique de translocation réciproque entre 2 chromosomes. (Goasguen, 2000)

Dans le cas d'une leucémie myéloïde chronique le caryotype permet de mettre en évidence le chromosome Philadelphie dans 95% des cas, et d'évaluer la réponse cytogénétique par la détermination du pourcentage de cellules résiduelles Ph1. Il permet aussi de détecter les anomalies cytogénétiques associées à la translocation (9 ; 22). Les translocations complexes (un peu moins de 10 % des cas) impliquent un ou plusieurs chromosomes en plus du chromosome 9 et du chromosome 22.(Cortes,2012).

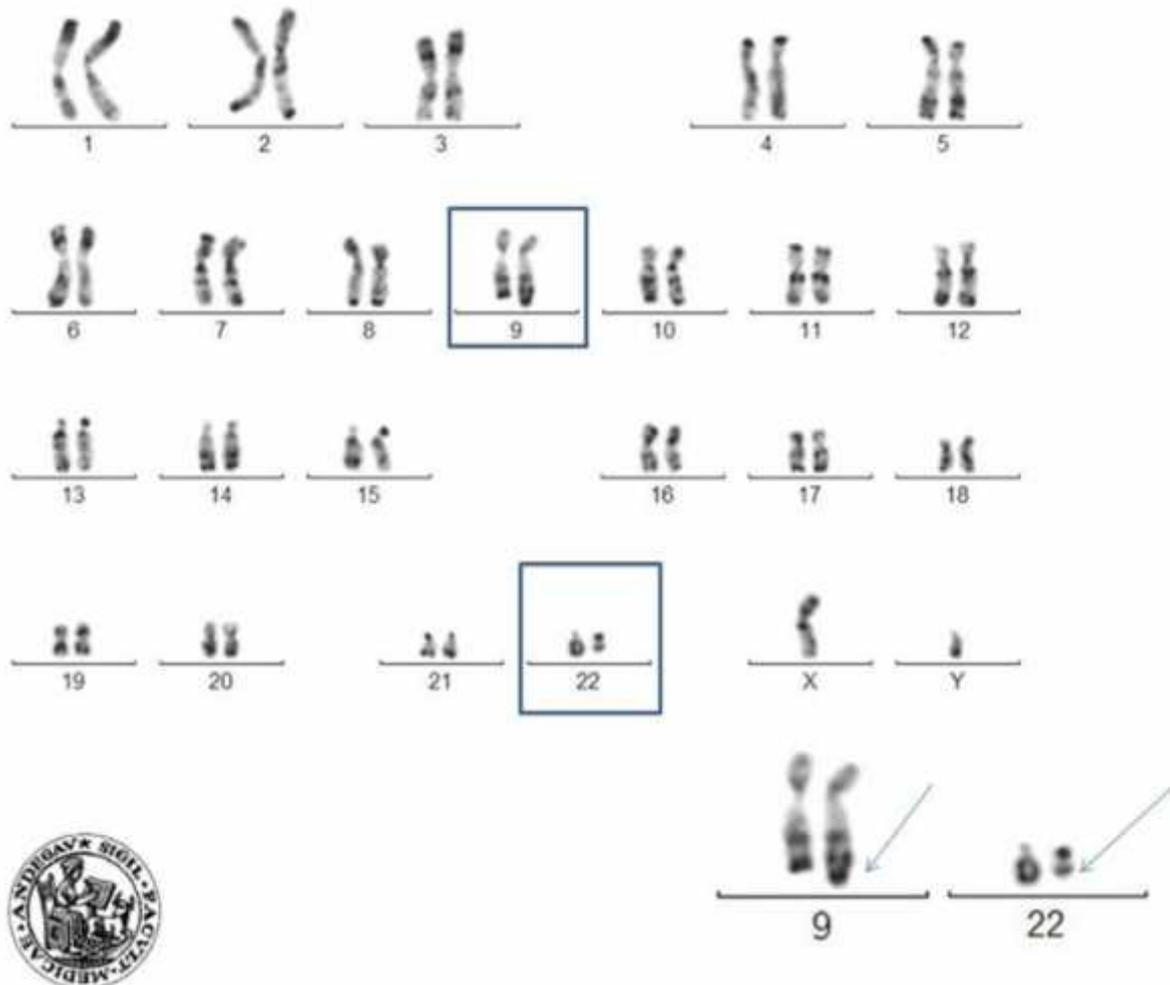


Figure n°12 : Caryotype d'un patient atteint de leucémie Myéloïde Chronique (Cortes,2012)

Le caryotype montre la translocation $t(9; 22)(q34; q11)$. La cassure et l'échange d'un chromosome 9 et d'un chromosome 22 aboutit à la formation d'un chromosome 9 plus long et d'un chromosome 22 plus court (= chromosome Philadelphie). Au niveau génique cette translocation met en contiguïté les gènes Bcr et Abl, forment une séquence chimérique codante pour une tyrosine kinase anormale (Bcr -Abl) à l'origine de la LMC (Corte, 2012).

4.4 La FISH :

La FISH est un examen ciblé qui ne visualise pas tout le génome, il met en évidence le signal de fusion BCR/ABL sur :

-) Noyaux (FISH inter-phasique)
-) Mitoses (FISH métaphasique) (Thomas, 2013)

En double coloration avec des sondes ADN spécifiques de Bcr et d'Abl, l'hybridation moléculaire permet de visualiser directement la fusion Bcr-Abl dans les métaphases et les noyaux interphasiques, la localisation des sondes Bcr et Abl dans les cellules Bcr-Abl positives se traduit par un seul signal de fusion.

L'avantage de cette technique est de détecter les remaniements Bcr-Abl sans chromosome Philadelphie et d'être plus sensible que le caryotype mais aussi d'observer un très grand nombre de cellules. Elle est aisément limitée et permet de visualiser que la région du génome complémentaire de la sonde utilisée et effectuée sur un prélèvement sanguin. En revanche, elle ne permet pas de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques additionnelles. Cependant, elle peut être utile pour rechercher une délétion du chromosome 9 reconnu comme un facteur pronostique péjoratif. (Thomas, 2013)

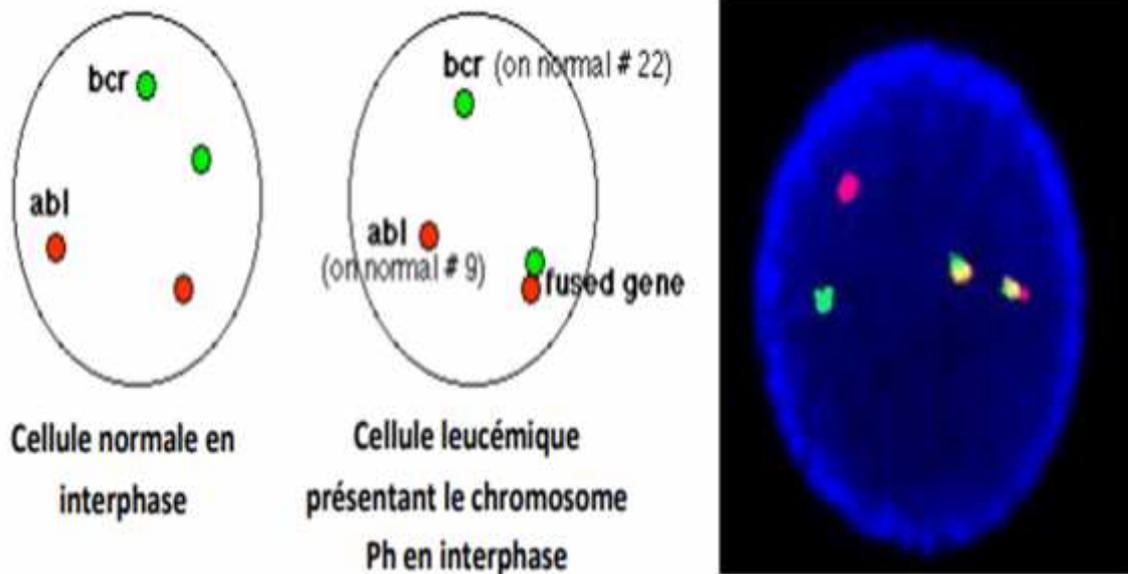


Figure 13 : FISH, mise en évidence du signal de fusion Bcr-Abl (sonde Bcr en vert, sonde Abl en rouge, et fusion Bcr-Abl en jaune) (Thomas, 2013)

La mise en évidence d'une telle translocation permet un diagnostic de certitude. Quand la maladie passe en phase accélérée, d'autres anomalies chromosomiques peuvent apparaître : trisomie 8, (3 chromosomes 8 au lieu de 2), duplication du chromosome Ph, c'est-à-dire 3 chromosomes 22 dont 1 normal et 2 Ph sur le caryotype d'une cellule. (Thomas, 2013)

4.5 La Biologie moléculaire :

Cette méthode de Biologie Moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtient pour ces travaux le prix Nobel de Chimie en 1993. Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante permet d'obtenir sans clonage une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN. (Messarah, 2011).

La réaction PCR (Polymérase Chain Réaction) permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication

d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant l'amplification est donc exponentielle. Chacune des trois étapes constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures. Les micros tubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable : un thermocycleur. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide et endure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).(Messarah ,2011).

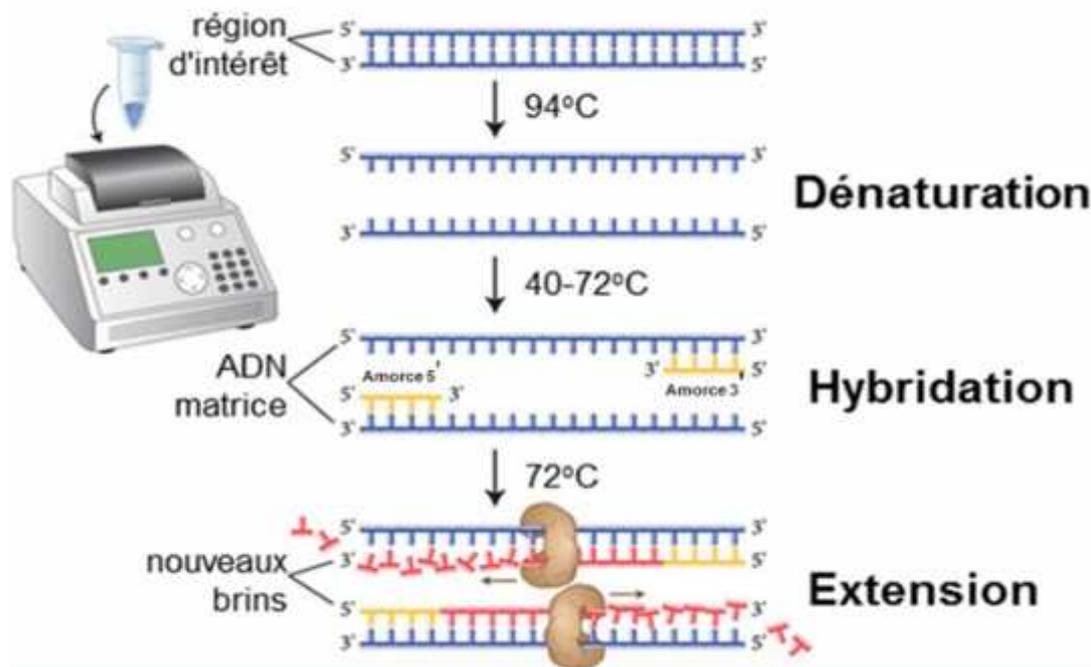


Figure 14 : Les étapes de Polymérase Chain Réaction (Messarah,2011).

Cet examen est aujourd'hui indispensable au diagnostic de la LMC. Elle met en évidence le transcrite de fusion Bcr-Abl dans les cellules médullaires ou plus facilement à partir d'un prélèvement sanguin (Leguay , 2005)

Les résultats sont exprimés en pourcentage de copies *BCR-ABL* par rapport à un gène de référence, généralement *ABL*. Par consensus général, le niveau du transcrite est fixé à 100 % au diagnostic (quel que soit le taux réellement mesuré). La réponse moléculaire majeure (RMM) est définie par une réduction de 3 logarithmes décimaux (soit $BCR-ABL < 0,1 \%$). Pour les transcrits m-BCR et M-BCR (e13a2 et e14a2), il existe un consensus pour les amorces à utiliser et les résultats sont standardisés : chaque laboratoire convertit son résultat sur une échelle internationale, par application d'un facteur de conversion qui lui est propre. Ainsi, les résultats sont comparables d'un laboratoire à un autre, ce qui facilite la prise en charge des patients et l'analyse des données dans les essais cliniques (Baccarani et al, 2013)

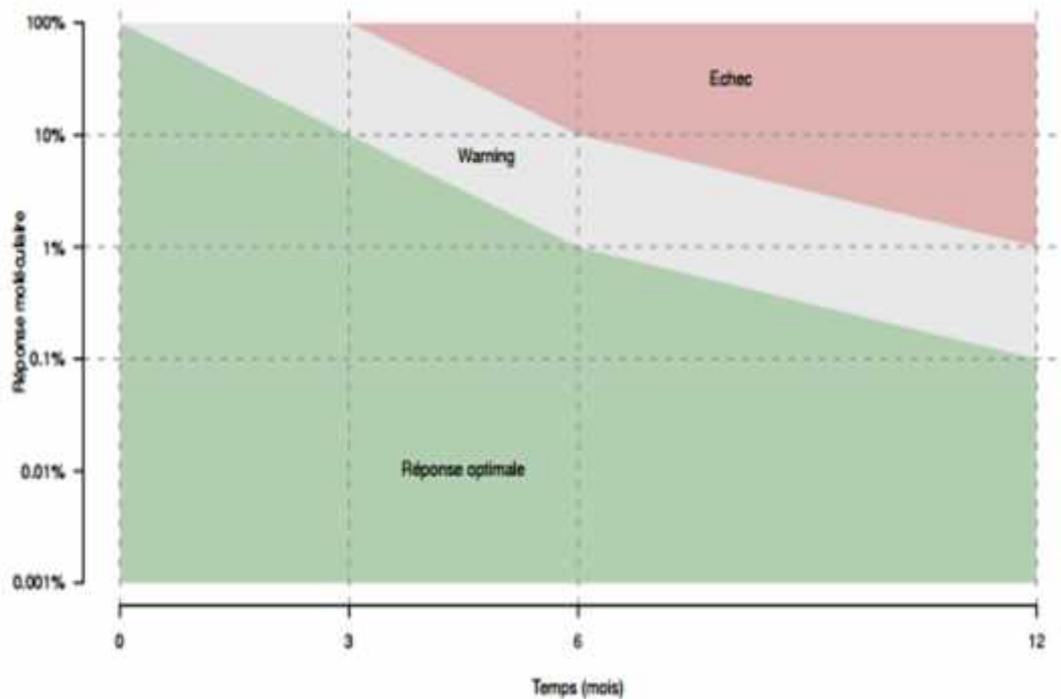


Figure15: Définition de la réponse moléculaire optimale (Baccarani et al. 2013).

Les patients avec un ratio BCRABL/ABL inférieur à 10%, 1% et 0,01% à 3, 6 et 12 mois respectivement, sont répondeurs optimaux (zone en vert). Les patients avec un ratio BCR-ABL/ABL supérieur à 10%, 1% à 6 et 12 mois respectivement, sont en échec (zone rouge). Entre ces deux limites, les patients sont en zone d'alarme (zone grise)(Baccarani et al. 2013).

4.6 Autre Examens biologiques :

-)] Le score des phosphatases alcalines leucocytaires est classiquement égal à zéro.
-)] La transcobalamines (1 surtout) et la vitamine B12 sont également élevés en rapport avec l'hyperleucocytose.
-)] L'uricémie et le taux de LDH sont généralement augmentés.
-)] Il existe une hyperhistaminémie, directement liée à l'augmentation des basophiles
-)] Des artéfacts liés à l'hyperleucocytose massive peuvent se voir ; fausse hypoglycémie ou hyperkaliémies (Pignon , 1997)(Sebahoun , 2006)

5. Traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique :

- **La chimiothérapie :**

Elle ne fait pas disparaître le Ph mais permet le contrôle de la masse leucémique en réduisant la leucocytose, elle améliore la qualité de vie. L'hydroxy urée (Hydréa) est le traitement le moins néfaste, qui aboutit à une rémission hématologique dans environ 70% des cas. Cependant, la rémission cytogénétique est très rare (**Verloes, 2007**)

- **L'Interféron alpha (IFN) :**

Chez l'humain, les IFN sont des molécules produites et sécrétées par les cellules en réponse à des infections virales ou à différents inducteurs synthétiques et biologiques. Les IFN-G 2a et 2b recombinants, utilisés aujourd'hui dans le traitement de la LMC sont des cytokines obtenues par génie génétique. Ils étaient utilisés en phase chronique chez les patients qui ne pouvaient pas bénéficier d'une greffe (**Guilhot, 2003**)

- **La greffe de moelle osseuse :**

Autogreffe :

On utilise des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour constituer le greffon. L'autogreffe à partir de cellules souches périphériques (CSP : CSH présentes dans le sang circulant) cette technique repose sur le fait que le patient possède des progénitures normaux (cellules Ph -) détectables qui vont être utilisés pour reconstituer sa moelle osseuse. (**Rousselot, 2003**)

Allogreffe :

la greffe de moelle osseuse allogénique ou bien de cellules souches hématopoïétiques est le seul traitement éradicateur de la LMC quel que soit le stade de la maladie. Grâce au conditionnement et à l'effet greffon versus leucémie, elle permet l'élimination des cellules leucémiques et la reconstitution d'une hématopoïèse normale. (**Rousselot, 2003**)

- **Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) :**

Les ITK ont révolutionné le traitement de la LMC et ce depuis le 15 janvier 2002 (date de commercialisation de GLIVEC®). Le mécanisme d'action du Mésylate d'imatinib : GLIVEC® repose sur la neutralisation de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de celle-ci. En effet, au sein du domaine catalytique d'ABL, il existe une poche constituée d'acides aminés dont certains sont impliqués dans les interactions avec l'ATP et d'autres se lient à l'imatinib empêchant ainsi la phosphorylation du substrat. Il en résulte une inhibition de l'autophosphorylation, une inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose (**Legbay, 2005**)

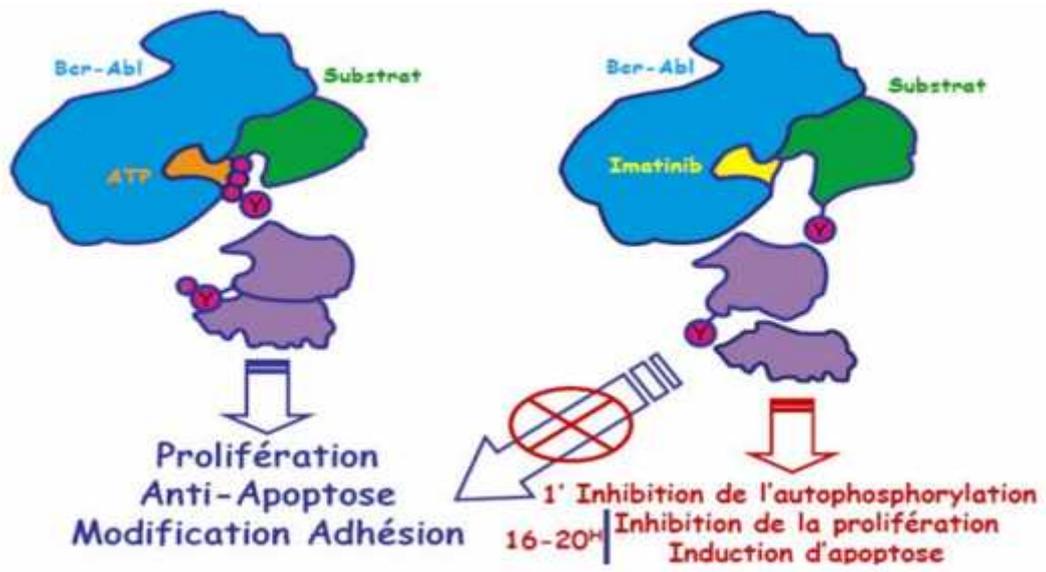


Figure 16 : Mécanisme d'action de l'imatinib sur BCR-ABL (Legbay , 2005)

Chapitre II : Matériels et méthodes.

Les techniques de cytogénétique que nous avons pratiquée pour cette étude sont celles du laboratoire d'hématologie du CHU Frantz fanon Blida où nous avons effectué notre stage de 6 mois. Dans le but de réalisé différents techniques de cytogénétique (caryotype & FISH) chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique Le protocole qui va suivre tiendra compte :

- De la recherche du chromosome Philadelphie, ainsi que du gène de fusion Bcr/Abl.
- D'étudier l'évolution de la pathologie chez un patient traité par des inhibiteurs de tyrosine kinase de première génération.

1. Matériels :

Le matériel biologique utilisé consiste en une ponction de la moelle osseuse (suc médullaire), ainsi qu'un prélèvement de sang périphérique.

1.1 Ponction de la moelle osseuse :

Il s'agit d'un prélèvement des cellules de la moelle osseuse, qui se fait habituellement à deux centimètres au-dessous du creux sternal (l'os situé aux milieux de la poitrine) ou plus rarement au niveau de la crête iliaque, ou l'os du bassin.

Le patient est couché sur le dos. On nettoie la peau qui entoure la région où une aiguille sera insérée avec une solution antiseptique (Bétadine). Ensuite on introduit le trocart avec des mouvements circulaire (jusqu'à effraction de la tablette osseuse externe) après fixation de la seringue sèche, on aspire le suc médullaire qui est étalé sur des lames en verre pour le frottis qui sont ensuite colorés puis examiné sous microscope optique. Le deuxième prélèvement se fait avec la seringue hépariné, ce dernier est transféré dans un tube conique, et sera acheminé au laboratoire d'hématologie pour des examens cytogénétiques.

La plaie est nettoyée avec la bétadine ensuite on pose un pansement sur la région et on applique une pression pendant quelques minutes.



Figure 17 : Ponction de la moelle osseuse (Cazivassilio, 2016)

2. Méthodes :

Plusieurs techniques ont été développées au cours de cette étude ; à savoir :

-) La technique du caryotype.
-) La FISH.
-) La PCR.

2.1 La culture cellulaire :

La culture cellulaire se fait de la même façon pour les deux examens cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH)

➤ Les réactifs indispensables à la réalisation d'une culture cellulaire sont :

-) Colchicine 10mg/ml ; elle bloque la mitose (la division cellulaire).
-) Kcl 0.065 M 2.8g dans 500ml d'eau distillé ; Il provoque le choc hypotonique pour disperser les chromosomes.
-) Fixateur (Carnoy I) 3V méthanol + 1V acide acétique Il fixe les chromosomes en les préparant à être étalés.
-) RPMI complet (RPIM 1640 + sérum de vœu + héparine + Glutamine + peni streptomycine.

2.1.1 Accumulation des cellules en métaphase :

- Après avoir effectué un prélèvement de la moelle osseuse, on procède à la numération pour le comptage de cellules nucléées, ensuite une quantité calculée de sang (20 millions de cellules par 1 ml de milieu de culture) est additionné à l'RPMI complet sous l'hôte.
- Les chromosomes sont visibles au stade de métaphase de la mitose, les cellules médullaires du patient vont être stimulés et mise en culture. L'opération se fait obligatoirement en milieux stériles.
- La culture cellulaire dure 24h à l'intérieur d'une étuve à CO², sous une température de 37°C dans un plateau en inox propre.

2.1.2 Blocage des cellules en mitose :

-) Cette étape consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Après 16h de culture on ajoute 60µl de colchicine sous l'hôte pour chaque flasque.
La colchicine est un agent bloquant du fuseau mitotique son équivalent synthétique la Colcémide qui empêche aussi la progression de la mitose vers l'anaphase donc les cellules sont ainsi bloquées en métaphase.
-) Après avoir bien mélangé le contenu des flasques, ces derniers sont remis dans l'étuve à 37°C pendant 20 à 30 minutes.

2.1.3 Choc hypotonique :

Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées ce qui permet l'éclatement des cellules et l'obtention d'une bonne dispersion des chromosomes.

)] On transvase les flaques dans des tubes coniques de 15ml, qui sont ensuite passés à la centrifugeuse à 1300tours/min pendant 8 minutes.

)] Après centrifugation on obtient un culot et un surnageant, on retire ce dernier pour laisser 1/3 de culot pour 2/3 de surnageant et on remet le culot en suspension en ajoutant du KCl.

)] On complète le tube jusqu'à 10cc de KCl et on agite avec la pipette pasteur par des mouvements d'aspiration et d'éjection contre la paroi du tube, le choc doit être à la fois mécanique et thermique.

)] Remise des tubes sans leurs bouchons dans l'étuve sèche à 37°C pendant 25minutes.

2.1.4 Fixation :

Cette étape a pour but de fixer les mitoses obtenues. Elle nécessite la préparation de la solution Carnoy I (le fixateur) : 3Volumes de méthanol + 1Volume d'acide acétique, en quantité suffisante pour deux ou trois fixations.

➤ **Préfixation :**

- Les tubes sont sortis de l'étuve,
- On rajoute 1 cc de fixateur et on homogénéise doucement,
- Mettre dans la centrifugeuse à 1300tours/Min pendant 8minutes.

➤ **Fixation 1:**

- On enlève le surnageant (1/3 culot, 2/3 surnageant), puis on rajoute 1cc de fixateur et on homogénéise doucement,
- On complète jusqu'à 8cc avec le fixateur et on homogénéise doucement puis on le place dans la centrifugeuse à 1300Tours/min pendant 8min.

On peut faire jusqu'à 3 fixations afin d'obtenir un culot blanc.

2.1.5 L'étalement sur lame:

On retire le surnageant et on remet le culot en suspension (la quantité de carnoy I sera plus au moins importante suivant l'épaisseur du culot)

L'étalement a une très grande importance pour la qualité des mitoses et des bandes chromosomiques. Il doit être réalisé sous des conditions de température et d'hygrométrie particulières. Généralement, la lame est étalée dans une pièce à température de 22°C (+/- 2°C) et à 45% (+/- 5) d'humidité minimum.

On identifie les lames avec le nom, prénom et date, avant de déposer une seule goutte pour la FISH, et deux gouttes séparées pour le caryotype, sur des lames humidifiées au préalable pour ce dernier seulement. On surveille l'étalement par le

phénomène d'irisation de la goutte qui diffuse sur la lame, puis on dépose la lame sur un papier sec et on laisse sécher à température ambiante.

2.2. Le protocole de cytogénétique conventionnelle caryotype (Bandes R) :

➤ Equipements nécessaires :

1. Lames de microscope.
2. Lamelles 24*24mm.
3. Chronomètre.
4. une pipette Pasteur.
5. l'humidificateur.
6. Bain marie à 90°C
7. Bac en porcelaine avec couvercle.
8. Microscope avec logiciel (exemple : métasystem ou cytovision)

➤ Réactifs nécessaires :

1. Tampon de dénaturation (NaH_2PO_4)
2. Giemsa
3. Tampon de coloration : ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$)
4. Eau distillée stérile.

2.2.1 Réhydratation : Après l'étalement de la culture cellulaire sur lame on laisse séché 45min avant de la réhydraté à l'eau distillé dans un bac à température ambiante pendant 5min.

2.2.2 Dénaturation : La dénaturation se fait dans un bac préchauffer à 87°C, dans un tampon phosphate NH_2PO_4 pendant 12min en moyenne (peut varier en fonction du climat)

2.2.3 Blocage de la dénaturation : Par refroidissement en la mettant dans un bac d'eau distillé à 18°C pendant 5 min.

2.2.4 Coloration : On procède à la préparation de colorant dans un bac avec 4cc de Giemsa, 4 cc de tampon de coloration ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$), complété avec de l'eau distillée, on met les lames dans le bac de colorant pendant 5 min, elles sont ensuite rincées avec de l'eau du robinet et séchées à température ambiante.

Remarque :

Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur longueur.

Afin reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise des techniques de marquage particulières ; le caryotype en bande R (Reverse) obtenu par dénaturation thermique, permet d'obtenir une coloration inhomogène des chromosomes

par le Giemsa, les bandes obtenues sont l'inverse de celles obtenues avec la trypsine, les bandes sombres correspondent aux séquences d'ADN riches en GC.

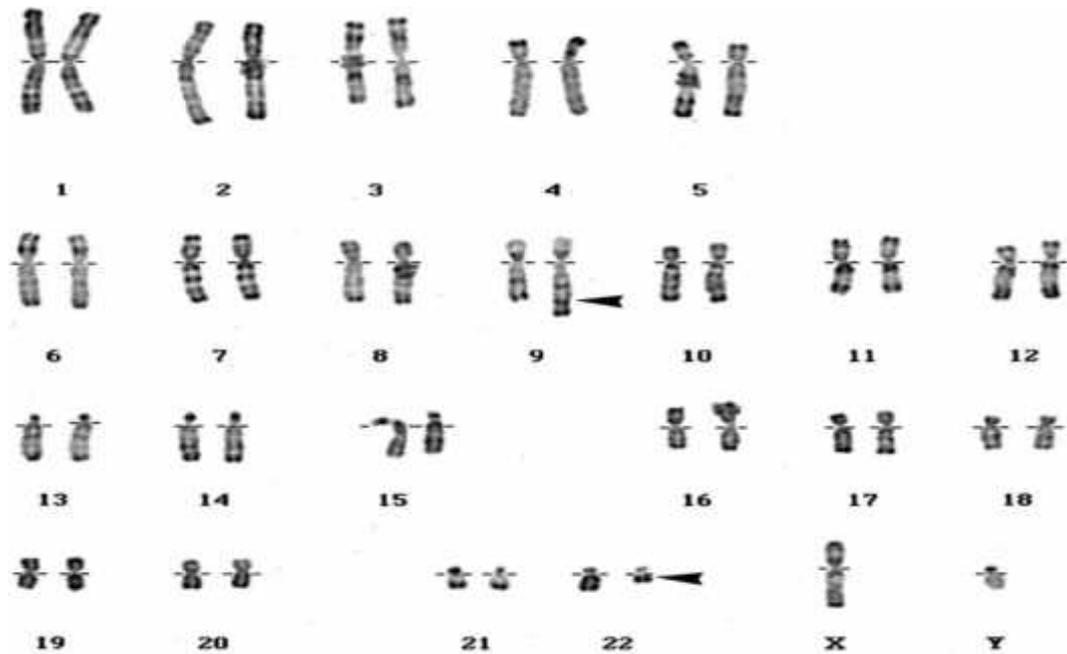


Figure 18 : Exemple de caryotype bande R chez un sujet atteint de LMC (Cortes ,2012)

2.2.5 Lecture du caryotype:

Après avoir séché les lames, on leur rajoute de l'huile d'immersion avant la lecture sous microscope. Il est nécessaire d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses. Ainsi les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante et leur indice centromérique et les bandes.

2.3 Protocole de la cytogénétique moléculaire FISH :

Le protocole de FISH que nous avons utilisé pour cette étude est celui pratiqué en routine au laboratoire de cytogénétique du CAC de l'hôpital Frantz fanon BLIDA, conforme au protocole Cytocell aquarius company.

La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques. L'ADN cible après fixation est traité par la chaleur et ssc, pour dénaturer la double hélice la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors de la même manière marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents. L'ADN est ensuite contre coloré avec le DAPI. Un microscope à fluorescence permet ainsi la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

➤ **Caractéristiques de la sonde :**(double fusion tricolore)

-) Sonde de la région ABL1 9q34. 11-q34. 12 en rouge.
-) Sonde de la région BCR 22q11. 22-q11. 23 en vert.
-) Sonde de la région ASS1 9q34. 11-q34.12 en bleu.

Le mélange de sondes BCR contient une sonde qui s'étend sur une région centromérique de 169kb du BCR et contient les gènes GNAZ et RAB36. Une seconde sonde couvre une région de 148kb qui est positionnée sur une région télomérique de 261kb du BCR. Les deux sondes sont marquées en vert et sont orientées de telle manière que les points de cassures de mBCR ou MBCR se traduisent par un signal de fusion.

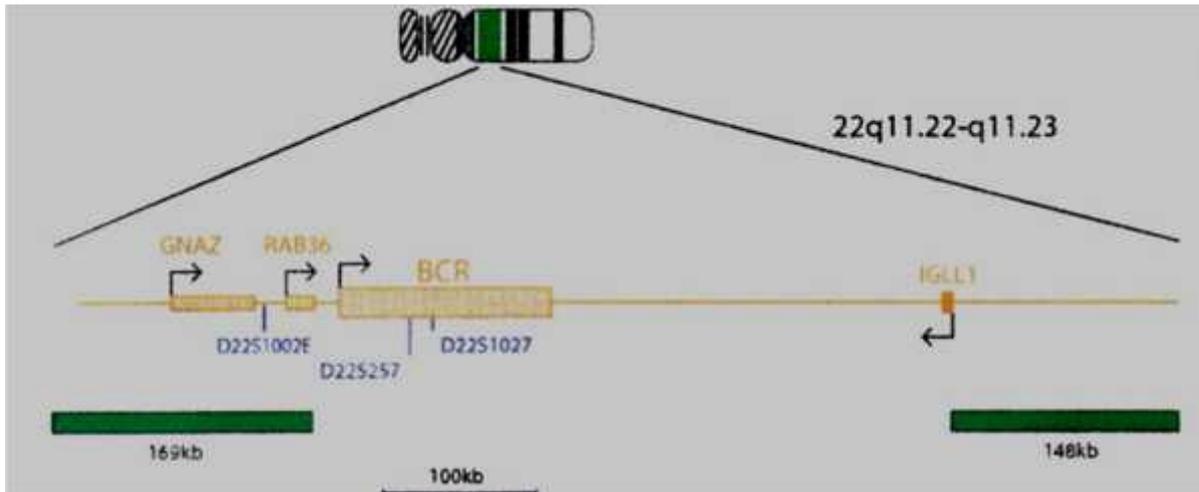


Figure 19 : Les sondes Bcr (Prospectus cytocell)

Pour ABL1, un contig de sondes couvre 346kb, depuis le centre des gènes FUBP3 jusqu'à un point situé à 64kb de la région télomérique des gènes ABL1, et il est marqué en rouge. Une sonde supplémentaire bleue couvre une région de 173kb et l'entièreté du gène ASSS1. La sonde ASS1 se trouve à 212kb de l'extrémité centromérique du gène ABL1.

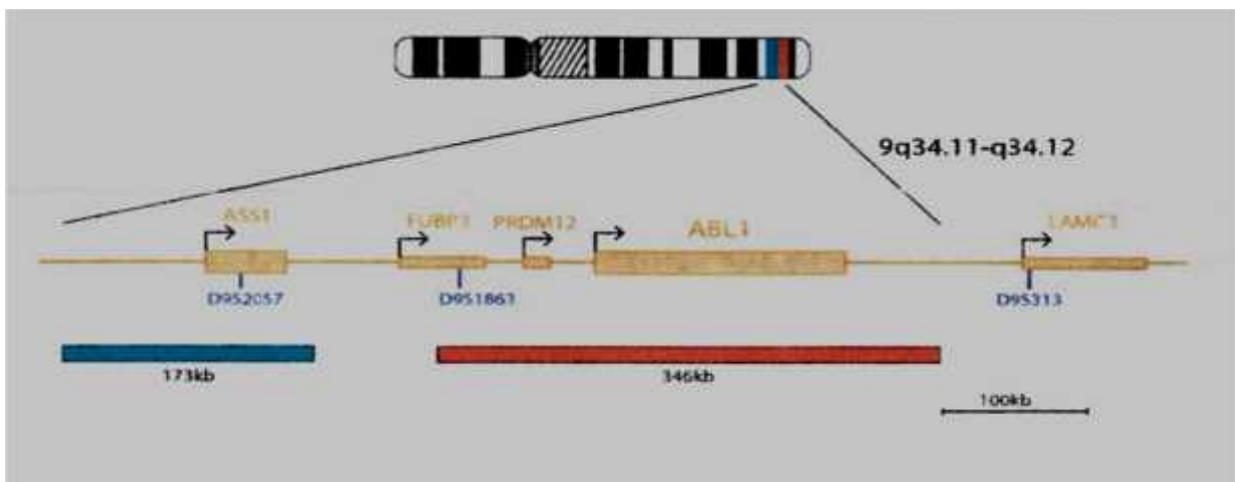


Figure 20 : La sonde Abl (Prospectus cytocell)

➤ **Conditionnement :**

- **Sonde :** 50ul par tube (5 tests), 100ul par tube (10 tests) ou 200ul par tubes (20 tests) conservé à (- 20°C)

Concentration de sonde ABL1, rouge : 24-30ng/test

Concentration de sonde BCR, vert : 108-135ng/test

Concentration de sonde ASS1, bleu : 304-380ng/test

La sonde est fournie prête à l'emploi dans le tampon d'hybridation (formide, sulfate de dextran, SSC).

- **Contre colorant :**

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0.125ug/ml DAPI (4.6-diamidino-2-phenylindole)

- **Avertissements et précautions :**

1. Porter des gants lors de la manipulation des ondes ADN et du contre-colorant DAPI.
2. La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec l'eau.
3. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec l'eau.
4. Toute matière dangereuse doit être éliminée selon la réglementation mise en vigueur dans notre institution pour l'élimination des déchets dangereux.
5. Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire.

- **Conservation et manipulation :**

Le kit Aquairus doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiqué sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière (chambre noire).

➤ **Réactifs nécessaire :**

- Tampon SSC.
- Tween-20.
- Ethanol. HCL pepsine.
- Formaldéhyde.
- 0,1 et 0,3 Igepal
- DAPI
- Les sondes

- **Préparation des échantillons :**

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire.

Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique (culture cellulaire).

- **Protocole :**(Toutes les étapes de cette techniques FISH sont réalisées à l'abri de la lumière)

2.3.1 Dénaturation et hybridation de l'ADN :

On retire la sonde du congélateur à -20°C et on la laisse préchauffer à température ambiante, en veillant à bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois. Après avoir préchauffer la sonde et la lame a échantillon sur une plaque chauffante à 37°C pendant 5 minutes.

On dépose $10\ \mu\text{l}$ de sondes sur les zones limitées où sont étalés les chromosomes en métaphase. Les dépôts sont recouverts par une lamelle qui est ensuite scellée sur la lame à l'aide de rubber cément.

La dénaturation de la sonde et de l'échantillon se fait simultanément en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C pendant 2 minutes dans le thermobrite.

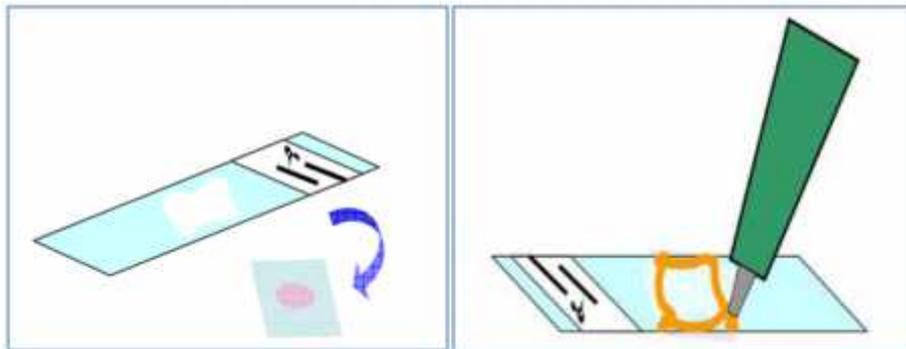


Figure 21 : Schéma explicatif du dépôt de sondes et la fixation de la lamelle avec le rubber cément

L'hybridation des sondes avec leurs séquences complémentaires au niveau de l'ADN est effectuée à 37°C dans un incubateur pendant 16 à 24 heure (hybridaseurthermoBrite).

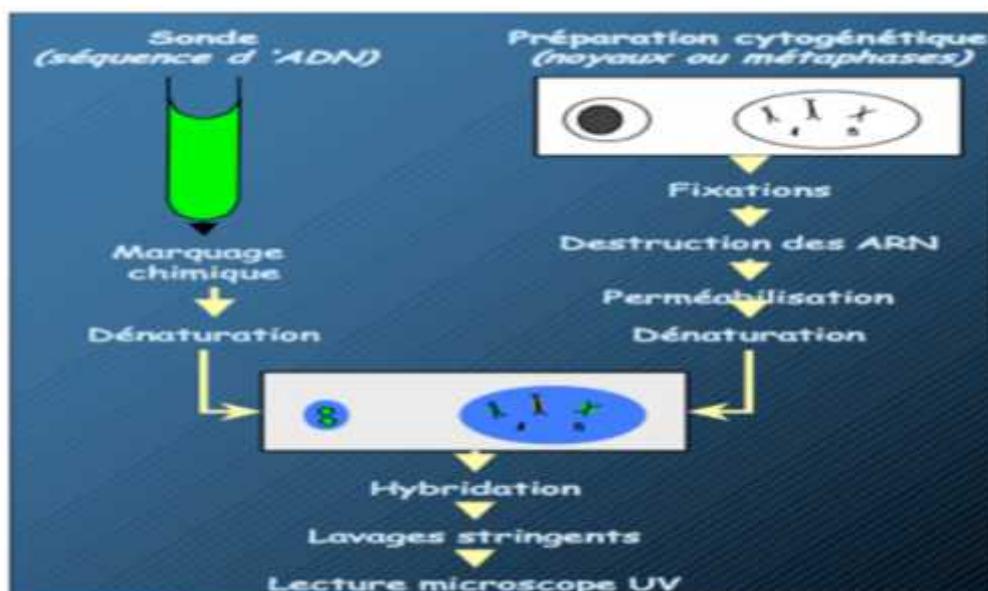


Figure 22 :Hybridation des sondes au niveau des gènes cible (Romana, 1994)

2.3.2 Lavages :

Afin d'éliminer les hybrides non spécifiques, les molécules de sondes non hybridées, les lamelles et les traces de rubber ciment ; les lames sont lavées dans deux solutions stringentes.

Le premier lavage s'effectue dans un tampon 0.4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/-1°C) pendant 2 minutes.

Puis le deuxième dans du tampon 0.1xSSC, 0.4% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 seconde sans agitation puis passage dans les alcools

Les lames sont ensuite séchées, et gardées à l'abri de la lumière.

2.3.3 Contre coloration DAPI:

Une fois les lames séchées, 10ul de DAPI est déposé sur la lame au niveau de la préparation cellulaire pour être ensuite recouvert d'une lamelle, déposée de façon incliné afin d'éviter les bulles d'air. Les lames ainsi préparées sont conservées à 4°C jusqu'à la lecture au microscope à épifluorescence.

2.3.4 Analyse microscopique :

La lecture s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence (Zeiss ®). Avec une lampe à mercure de 100-watts et d'objectifs plan apochromatiques *63 or *100. Le filtre triplet bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément.

Un fluorochrome est caractérisé par son spectre d'excitation et son spectre d'émission. La lecture s'effectue d'une part grâce à un rayonnement sélectionné par un filtre d'excitation spécifique du fluorochrome et d'autre part grâce au filtre d'émission spécifique du fluorochrome qui va permettre de visualiser la fluorescence émise. Pour chaque zone de lecture, nous observons entre 20 à 30 mitoses (tout dépend de la richesse des cellules).

- **Stabilité des lames :**

Les lames FISH sont analysables pendant plusieurs mois voire des années si elles sont conservées à l'obscurité et au-dessous de la température ambiante à (4°C)

- **Recommandations :**

1. Vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
2. L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bain-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
3. Les concentrations des lavages (stringence), pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une perte de signal.
4. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation : une hybridation non-spécifique.

2.4 Protocole de PCRultra : (Technique complètement automatisé)

Appareillage : Genexpert Modèle GX-II 1 module instrument avec PC-CEPHEID

Intègre et automatise le traitement d'échantillons, l'amplification d'acides nucléiques et la détection des séquences cibles dans des échantillons simples ou complexes par PCR en temps réel et par PCR après transcription inverse. Le système est composé d'un appareil, d'un ordinateur personnel, d'un lecteur de code-barres et d'un logiciel préinstallé pour effectuer des tests sur des échantillons prélevés et afficher les résultats. Le système requiert l'utilisation de cartouches jetables et à usage unique GeneXpert, cartouches qui contiennent les réactifs PCR pour effectuer une procédure PCR. La contamination croisée entre les échantillons est éliminée car les cartouches sont indépendantes.

Il fonctionne avec le logiciel de gestion ExiStation™ qui permet le contrôle de l'ensemble de l'opération de la préparation de l'échantillon jusqu'à l'analyse des données.

Equipements et réactifs nécessaire à la PCR :

- Protéinase K
- Réactif de lyse
- Ethanol
- Tampon de lavage
- Prélèvement sanguin dans un tube EDTA bien rempli
- Votrex
- Nouvelle cartouche Cepheid
- Un flacon de 50ml.

Protocole :

- Ajouter 100µl de protéinase K dans le flacon de 50ml
- Inverser le tube de sang EDTA 10 fois
- Ajouter 4ml de sang total au flacon. vortexer 10 secondes et incuber 1 minute
- Ajouter 2.5 ml réactif de lyse, vortexer 10 secondes, et incuber 5 minutes, puis un deuxième vortex durant 10 secondes ; incuber 5 minutes
- Transférer 1mL du lysat dans un nouveau flacon de 50 ml
- Ajouter 1.5 de tampon de lyse, vortexer 10Secondes, et incuber 10minutes
- Ajouter 2ml d'éthanol, puis vortexer 10 secondes
- Ajouter le tampon de lavage dans l'ouverture numéro 1 de la cassette
- Ajouter la totalité du lysat dans l'ouverture S
- Scanner le code-barres de la cartouche
- placer la cartouche dans le GX et le fermer la porte
- Lancer l'opération d'analyse qui va durer 2h.

Chapitre III :

Résultats et

discussion.

Notre étude porte sur la leucémie myéloïde chronique (LMC) qui est une maladie rare ; son incidence dans le monde est de 1 à 2 patients/100.000 ha par an, cette incidence est plus faible en Algérie où elle a été évaluée à 0,40/100.000 ha en 2004 (**Djouadi , 2009**).

Bien que la LMC soit une maladie rare, elle possède une signification historique considérable en hématologie car elle est la première hémopathie maligne où une anomalie cytogénétique acquise spécifique le chromosome Philadelphie (Ph) a été retrouvée(**Nowel ,1960**)

Pour illustrer notre étude, nous avons choisi un patient âgé de 51 ans qui a été suivi au service d'hématologie CAC Blida, depuis le 12 janvier 2012 pour prise en charge d'une hyperleucocytose avec une splénomégalie, qui a évoluée en une LMC.

Examens biologique du patient :

1. L'hémogramme:

Une grande proportion des patients pour lesquels un diagnostic de LMC en phase chronique est porté, l'anomalie de la formule sanguine est découverte sur un bilan de routine. Elle est caractérisée par une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, avec une myélémie initialement équilibrée, une basophilie et une éosinophilie, fréquemment associée à une thrombocytémie. Cliniquement, la splénomégalie est le signe le plus courant et évocateur(**Rodgers, 2012**).

L'hémogramme est l'élément clé du diagnostic, il consiste en une FNS qui permet l'étude quantitative des éléments figuré du sang, les résultats de notre patient sont résumé dans le tableau suivant :

-) GR : Globules Rouges (t/l) tetraparticule/litre
-) Hte : Hématocrite, (%)
-) Hb : Hémoglobine (g/dl)
-) VGM : Volume Globulaoire Moyen (Fl)
-) CCMH : Concentration moyenne en hémoglobine (%)
-) GB : Globules blancs (éléments/ul)
-) PN : polynucléaires neutrophiles (élément/ul)
-) L : lymphocytes (élément/ul)
-) Boso : Basophiles (%)
-) Plq : Plaquettes (éléments/ul)

Tableau VI : Résultat de l'hémogramme du patient.

GR	Hte	Hb	VGM	CCMH	GB	PN	L	Baso	PLq
2.78	25.8	08	92.8	31	153000	97870	23610	5	168000

L'hémogramme révèle une hyperleucocytose majeure à 153000/ μ l donc $> 100000 /\mu$ l, une anémie modérée à 08g/dl (donc <14 g/dl), normocytaire (VGM à 92.5 Fl) hypochrome (CCMH à 31% donc $< 32\%$) alors que le taux de plaquettes est normal à 168000/ μ l.

2. Frottis sanguin ;

C'est l'étude morphologique des éléments figurés du sang, dans la LMC il présente des mégacaryocytes en nombre normal ou augmenté, souvent de taille réduite et avec noyau peu segmenté, ainsi qu'une hyperplasie globale de la lignée granuleuse, tout stadièrement (Jabbour, 2012).

Le frottis sanguin a montré la présence de précurseurs de granuleux sans blocage de maturation de la moelle osseuse au niveau du sang périphérique qui sont définis par la myélémie.

Dans notre cas la myélémie était à 45% (donc $>20\%$)

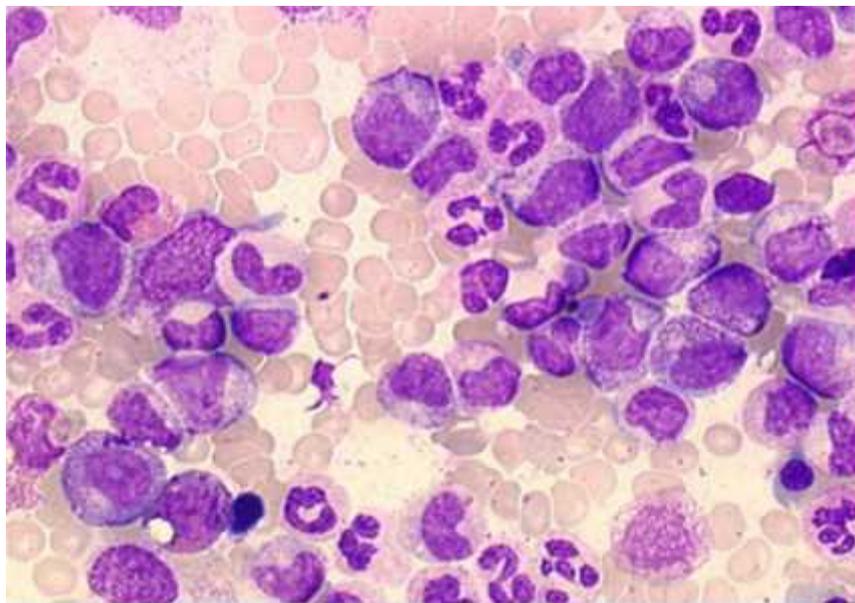


Figure 23 : Frottis sanguin.

Devant cette splénomégalie, l'hyperleucocytose majeure et la myélémie $>20\%$ nous évoquons le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC)

Pour confirmer le diagnostic un médullogramme qui est l'examen microscopique du suc médullaire est indiqué en vue d'un examen cytogénétique conventionnel (caryotype) ou cytogénétique moléculaire par FISH.

3. Résultat du médullogramme : il a montré une hyperplasie granuleuse à 88% et un taux de blastes à 1%, nécessaire au diagnostic afin de définir la phase de la maladie.

4. Les résultats de la cytogénétique classique (caryotype):

La cytogénétique conventionnelle permet le diagnostic dans 95% des cas de la LMC et le suivi des patients traités en corrélation avec l'évolution clinique. Elle présente en outre l'avantage de dépister des anomalies secondaires importantes pour le pronostic des malades tel que les anomalies cytogénétique additionnelles (trisomie 8 ou 19, duplication du Ph1, anomalies du 17,..) qui correspondent à une évolution clonale. (Dine, 2013)

Dans cet optique nous avons établi un caryotype (Bande R) qui a permis d'identifier la présence de la t(9 ;22) (q34 ; q11). Elle est caractérisée par la présence d'un bras long du chromosome 9 rallongé, et le chromosome 22 raccourci qui est le chromosome Philadelphie sur les 20 mitoses analysées.

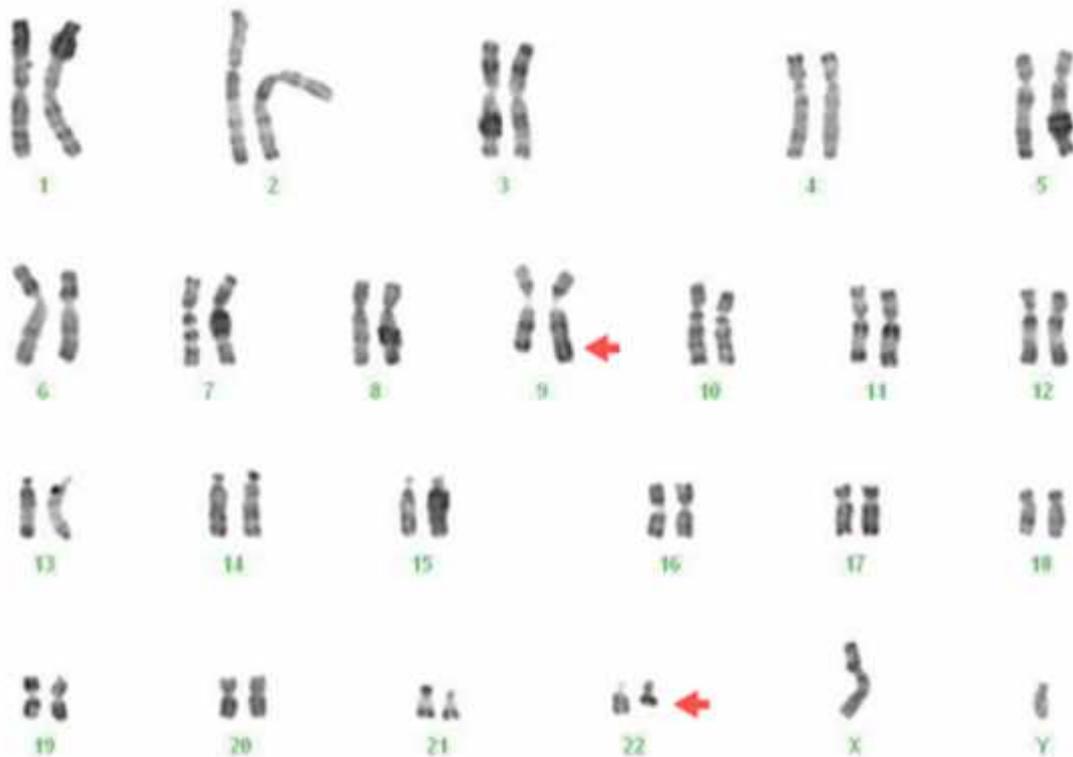


Figure 24 : Le caryotype (bandes R) du patient: 46 XY t(9 ;22) (q34 ; q11) .

5. Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH) :

La mise en évidence d'un gène hybride BCR-ABL par FISH confirmera alors le diagnostic de la LMC, donc cette technique présente comme avantage :

-) La détection des chromosomes Philadelphie «masqués» non visualisés par la cytogénétique conventionnelle.
-) Sa sensibilité est meilleure que la cytogénétique conventionnelle en particulier avec les sondes double fusion (**Francine, 2001**)

- **Résultats attendus :**

Dans une cellule normale, ces sondes apparaissent comme des points rouges/bleus et vert discrets, un pour chaque chromosome homologue (entraînant une conformation 2RB, 2V) En fonction du réarrangement, les cellules peuvent afficher l'un des motifs de signaux suivants :

1. Dans un cas $t(9 ;22)(q34 ;q11)$ classique (sans délétion) un signal rouge/vert (de fusion jaune) et un signal rouge/vert/bleu, en plus d'un signal rouge/bleu et d'un signal vert des chromosomes 9 et 22 normaux respectivement, doivent être observés (1RV, 1RVB , 1RB et 1V).
2. Chez un patient $t(9 ;22)(q34 ;q11)$ présentant une perte du 9q proximal, un signal rouge/vert (fusion de jaune) et un signal vert, en plus d'un signal rouge/bleu et un vert des chromosomes 9 et 22 normaux respectivement, doivent être observés (1RV, 2V et 1RB).
3. Chez un patient $t(9 ;22)(q34 ;q11)$ présentant une perte du 22q distal, un signal rouge/vert (de fusion jaune) et un signal rouge/bleu, en plus d'un signal rouge/bleu et d'un signal vert des chromosomes 9 et 22 normaux respectivement , doivent être observés (1RV, 1RB et 1V).
4. Chez un patient $t(9 ;22)(q34 ;q11)$ présentant une perte du 9q proximal et du 22q distal, un signal rouge/vert (de fusion jaune), en plus d'un signal rouge/bleu et d'un signal vert des chromosomes 9 et 22 normaux respectivement, doivent être observé (1R, 1RB et 1V).

La sonde ASS1 bleue peut différencier un signal provenant d'un chevauchement de signaux aléatoire d'un vrai signal de fusion BCR-ABL dans les cellules interphasiques. Le chevauchement de signaux aléatoires se traduit par la présence d'un signal bleu, alors que la vraie fusion entraîne la perte du signal bleu.

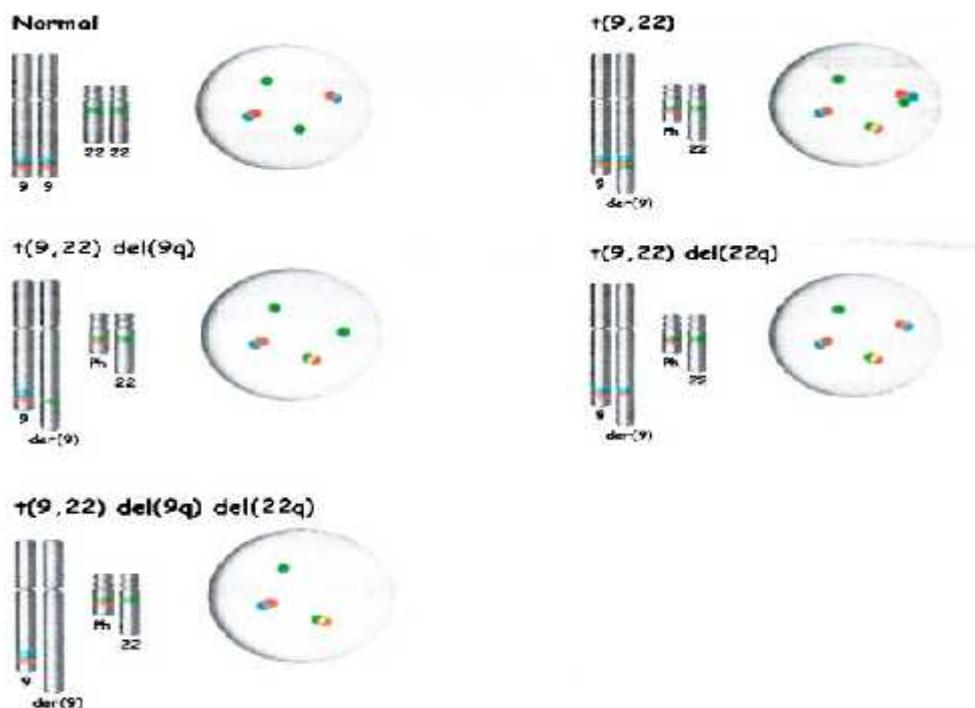


Figure 25: Résultats attendus lors de la lecture de la FISH(Prospectus cytozell)

Les résultats de la FISH de notre patient avec la sonde BCR-ABL dual colore dual fusion (Cytocell) a montré la présence du signal Bcr-Abl sur 100% des noyaux et des mitoses.

La sonde couvrant le gène ABL1 sur le chromosome 9 est marquée en rouge, celle couvrant le gène BCR sur le chromosome 22 est marquée en vert. On observe un signal rouge sur le chromosome 9, un signal vert sur le chromosome 22 et un signal de fusion sur le chromosome Philadelphie ou (der(22)) ou le 22 raccourci et sur le chromosome (der(9)). La fusion des gènes Bcr/Abl est mise en évidence par la technique FISH.

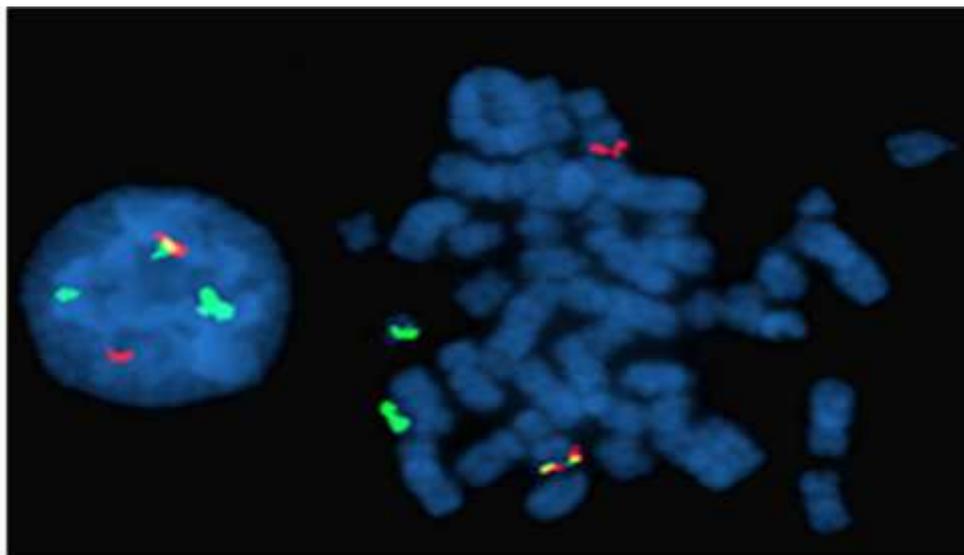


Figure 26 : Résultats de la FISH du patient.

6. La biologie moléculaire : Par la RT-PCR est un outil indispensable au diagnostic qualitatif pour connaître le type de transcrit Bcr/Abl et quantitatif, selon les recommandations de l'ELN, non fait chez notre patient.

Conclusion : Sur les critères cliniques et biologiques de notre patient, la présence :

-) D'une splénomégalie
-) D'une hyperleucocytose majeur 153000/ μ l
-) D'une myélémie harmonieuse > 20%
-) D'un taux de basophile à 5%
-) D'un taux de blastes < 5%
-) La cytogénétique : par la présence du chromosome Ph, et présence du signal Bcr/Abl en FISH.

On est devant un cas de leucémie myéloïde chronique en phase chronique.

Prise en charge thérapeutique :

Georges Daley et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle central de la protéine chimérique Bcr-Abelson et son activité tyrosine-kinase accrue avec les effets qui en découlent sur l'inhibition de l'apoptose, l'activation de la multiplication cellulaire et l'atténuation de l'adhérence des cellules leucémiques au stroma médullaire atténuée. Dès lors était reconnue la cible, la protéine Bcr-Abelson, qu'il fallait inhiber pour espérer avoir un authentique effet thérapeutique. La découverte des anti tyrosine kinase dont le chef de ligne est l'imatinib, première thérapeutique ciblée inhibant spécifiquement le site de fixation de l'ATP de la protéine Bcr-Abelson, a constitué une réelle révolution dans la prise en charge thérapeutique de cette hémopathie maligne (**Goldstien , 2003**). De ce fait dès la confirmation du diagnostic de la LMC, le patient a été mis sous inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de 1^{re} génération, qui est l'imatinib à la dose de 400 mg/j.

L'évaluation de la réponse :

Le suivi d'un patient sous ITK, outre l'évaluation clinique et hématologique, repose sur les analyses cytogénétiques et moléculaires. Les experts de l'European Leukemia Net (ELN) recommandent un examen cytogénétique à 3, 6 et 12 mois jusqu'à l'obtention d'une RCyC, et une analyse moléculaire tous les 3 mois jusqu'à l'obtention d'une RMM. En pratique à compter du diagnostic on a réalisé une analyse cytogénétique à 3 mois, 6 mois, puis tous les 6 mois jusqu'à réponse cytogénétique complète, ensuite tous les 12 mois (**Barccarani , 2013**)

Selon les résultats biologiques obtenus lors de ce suivi, l'ELN définit des critères de réponse optimale ou d'échec du traitement, orientant la stratégie thérapeutique (**tableau V**).

Tableau V : Définition des réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires (Cross , 2015) (Kantarjian , 2002)

Réponse hématologique	RHC	Réponse hématologique complète	Leucocytes < 9 G/L, formule normale, taux de plaquettes < 450 G/L Disparition des symptômes et signes cliniques de la maladie (notamment la splénomégalie)	
Réponses cytogénétiques	RCyC	Réponse cytogénétique complète	Ph1 0 %	
	RCyP	Réponse cytogénétique partielle	Ph1 [1 %–35 %]	
	RCyM	Réponse cytogénétique majeure	RCyC + RCyP, Ph1 < 35 %	
	RCym	Réponse cytogénétique mineure	Ph1 [36 %–65 %]	
		Réponse cytogénétique minime	Ph1 [66 %–95 %]	
		Pas de réponse cytogénétique	Ph1 > 95 %	
Réponses moléculaires	RMM	Réponse moléculaire majeure	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,1 \%$	
	RM ⁴	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,01 \%$ avec copies $ABL1 > 10\ 000$
			RQ-PCR négative	Copies $ABL1 [10\ 000-31\ 999]$
	RM ^{4.5}	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,0032 \%$ avec copies $ABL1 > 32\ 000$
			RQ-PCR négative	Copies $ABL1 [32\ 000-99\ 999]$
	RM ⁵	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,001 \%$ avec copies $ABL1 > 100\ 000$
			RQ-PCR négative	Copies $ABL1 > 100\ 000$

Evaluation de la réponse chez notre patient :

L'examen clinique, ayant montré une absence de splénomégalie.

L'hémogramme, montre une normalisation des globules blancs, et du taux de plaquettes.

Le frottis sanguin, absence de myélémie

La cytogénétique, le monitoring de la réponse cytogénétique a été fait par FISH et a montré une absence de signal Bcr-Abl sur les noyaux et 300 mitoses avec Rémission cytogénétique complète

L'évaluation de 3 à 24 mois le patient était toujours en rémission hématologique et cytogénétique complète.

Le tableau ci-dessous résume l'évaluation des réponses hématologiques et cytogénétiques de notre patient sous ITK de première génération « Imatinib » :

Tableau VI : Tableau résumant les résultats de l'évaluation des réponses hématologique et cytogénétique de notre patient sur 24 mois.

	3 mois	6 mois	12 mois	24 mois
Réponse hématologique	GB : 5100/ μ l Plq : 120000/ μ l Spl : 0 RHC	GB : 4990/ μ l Plq : 132000/ μ l Spl : 0 RHC	GB : 4500/ μ l Plq : 176000/ μ l Spl : 0 RHC	GB : 5200/ μ l Plq : 210000/ μ l Spl : 0 RHC
Réponse cytogénétique	Ph 0% RCyC	Ph 0% RCyC	Ph 0% RCyC	Ph 0% RCyC

Réponse moléculaire :

Dans le British Journal of Haematology l'équipe de Liverpool rapporte son expérience dans le suivi par quantification du transcrit Bcr-Abl, d'une cohorte de patients atteints de LMC traités par Imatinib. Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport Bcr-Abl/Abl en pourcentage. **(Wang , 2002)**

Des recommandations européennes sont régulièrement publiées par l'ELN afin de définir les réponses optimales au traitement par ITK en première et deuxième ligne en se basant sur les données cytologiques, cytogénétiques et moléculaires (tableau VII) **(Barccaran , 2013)**

Tableau VII : Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase de première ligne (**Baccarani, 2013**)

Durée du traitement	Réponse optimale	Alertes	Échec du traitement
3 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou $Ph1 \leq 35\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ ou $Ph1 35\% - 95\%$	Pas de RHC ou $Ph1 > 95\%$
6 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 1\%$ ou $Ph1 = 0$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 1\% - 10\%$ ou $Ph1 1\% - 35\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ ou $Ph1 > 35\%$
12 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,1\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 0,1\% - 1\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 1\%$ ou $Ph1 \geq 1\%$

- Si les valeurs Bcr-Abl sont inférieures à 10% après 3 mois de thérapie, cela signifie que la réponse du traitement est optimale. Le traitement doit être poursuivi et son succès contrôlé tous les 3 mois au moyen de la PCR.
- Si vos valeurs Bcr-Abl sont inférieurs à 0.1% après 12 mois de thérapie, il s'agit alors d'une rémission moléculaire majeure (MMR : Major Moléculaire Réponse). A partir de maintenant un contrôle par PCR tous les 3 à 6 mois suffit.
- Si vos valeurs Bcr-Abl sont inférieures à 0.01% au cours de la thérapie, il s'agit alors d'une rémission molécule profonde (**Baccarani, 2013**).

Dans notre cas avec une réponse hématologique et cytogénétique complète ainsi qu'une réponse moléculaire majeure (RMM) à 0.024% notre patient présente une réponse optimal a l'Imatinib qui a encore une fois prouvé son efficacité.

Conclusion

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie remarquable sur le plan oncogénétique, elle est caractérisée par la translocation t (9;22) (chromosome Philadelphie, Ph) qui est présente dans environ 95 % des cas de LMC. Ce remaniement chromosomique aboutit à la fusion de deux gènes, bcr et abl et à la synthèse d'ARN messagers et de protéines bcr-abl hybrides.

Le diagnostic de la LMC repose sur des méthodes cytogénétiques (caryotype, FISH) et moléculaires (PCR), qui sont incontournables dans le bilan des hémopathies à visée diagnostique, pronostique et le suivi thérapeutique. Les antis tyrosine kinase sont incontestablement un progrès thérapeutique majeur de la dernière décennie en hématologie. La LMC a vu son pronostic transformé par l'Imatinib ; un inhibiteur de la tyrosine-kinase activée en conséquence de la mutation responsable de la maladie. Les études successives ont permis invariablement de montrer sa grande efficacité en taux de réponse hématologique (près de 100 %), mais aussi cytogénétique. Mieux, il a conduit à développer des techniques de biologie moléculaire quantitative qui permettent d'évaluer sous traitement la maladie résiduelle, qui ont modifié la prise en charge de cette maladie. S'il n'est pas encore possible d'espérer une guérison par ce type de traitement, des études sont en cours pour tester des associations prometteuses (notamment avec interféron) pour améliorer encore le pronostic à long terme de la LMC.

ANNEXES

Le Kcl



Le RPMI complet



L'huile à immersion



Le DAPI



La protéinase k

La solution Carnoy I



La pipette pasteur

Les micropipettes



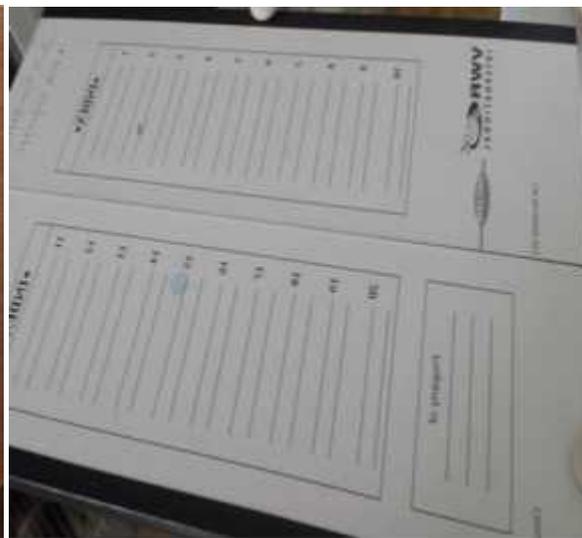
La plaque chauffante

Le trocart



Les Sondes BCR-ABL

Les Boites àFISH



La centrifugeuse

la micro-centrifugeuse



Les milieux d'alcool en 70% 85% 100% et le thermobrite



Le bain marie

Le vortex



L'étuve sèche L'étuve à CO²



L'appareil de la PCRultra La cartouche jetable de PCR



Le microscope optique La hôte



Matériels utilisé pour la ponction de la moelle osseuse :

- J Un plateau stérile à ponction
- J Des gants stériles
- J Des compresses stériles
- J Une seringue stérile hépariné (avec de l'héparine dilué 1/10) et une seringue sèche.
- J Un trocart (aiguille de gros calibre) avec un jeu d'étiquettes correspondant au patient.
- J Tube conique contenant RPMI complet (héparine, sérum de vœu, RPMI, ATB, acide aminé)
- J Matériel de désinfection cutanée (Bétadine dermique pour antisepsie).

Equipement nécessaire à la culture cellulaire :

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
2. Micropipette 1ul-200ul.
3. Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0.5ml)
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).
6. Jarres en plastique ou en verre.
7. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
8. Centrifugeuse de paillasse.
9. Lames de microscope.
10. Lamelles 24*24mm.
11. Chronomètre.
12. Incubateur à 37°C.
13. Colle Rubber cement

L'étalement du caryotype



Prospectus cytocell sonde Bcr-Abl

Instructions For Use

REF: LPH 038-S / LPH 038 / LPH 038-20

BCR/ABL Plus Translocation, Dual Fusion Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytoCELL.com

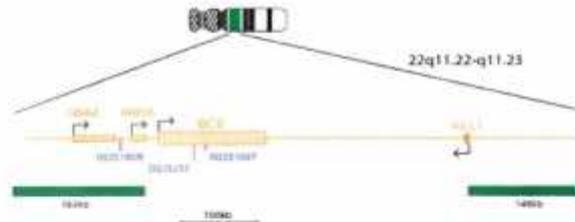
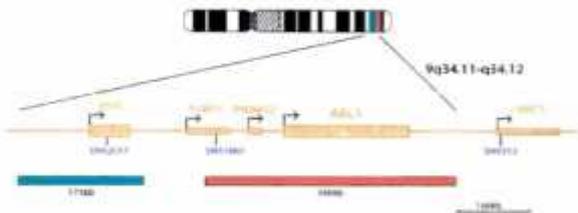
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential diagnostic tool in prenatal, haematological and pathological chromosomal analysis. Target DNA, after fixation and denaturation, is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed and the DNA is counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Probe Information

The presence of the Philadelphia chromosome (Ph) has important diagnostic and prognostic implications in a number of haematological disorders. The abnormality is characteristic of Chronic Myeloid Leukaemia (CML), found in around 90% of cases, but also represents a significant abnormality in 30% of adult and 2 to 10% of childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL) cases.^{1,2,3,4,5} This rearrangement is also seen in rare cases of Acute Myelogenous Leukaemia (AML).⁶ As a result of the Philadelphia translocation, t(9;22)(q34.12;q11.23), the ABL1 (Abelson) proto-oncogene and the BCR (Breakpoint Cluster Region) gene fuse, giving rise to the BCR/ABL1 fusion gene. The translocation between chromosomes 9 and 22 can be accompanied by loss of proximal sequences on the derivative chromosome 9. The deletion encompassing the ASS1 gene is associated with poor prognosis, though this may be partially abrogated by treatment with imatinib.⁷ Therefore, the establishment of the atypical patterns in the BCR/ABL1 translocation may have clinical diagnostic and prognostic implications.

Probe Specification

ABL1, 9q34.11-q34.12, Red
BCR, 22q11.22-q11.23, Green
ASS1, 9q34.11-q34.12, Blue



The BCR probe mix contains a probe, which extends 169kb centromeric to BCR and contains the genes GNAZ and RAB36. A second probe covers a 148kb region, which is positioned 261kb telomeric to BCR. Both are labelled in green and are orientated such that breakpoints in either mBCR or MBCR will result in a fusion signal. For ABL1 a probe contig covers 346kb from the middle of the FUBP3 gene to a point 64kb telomeric to ABL1 and it is labelled in red. There is an additional blue probe that covers a 173kb region and spans the whole ASS1 gene. The ASS1 probe is located 212kb from centromeric end of the ABL1 gene.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests), 100µl per vial (10 tests) or 200µl per vial (20 tests)

Amount of red ABL1 probe: 24-30ng/test

Amount of green BCR probe: 108-135ng/test

Amount of blue ASS1 probe: 304-380ng/test

The probes are provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate, SSC) and are ready to use.

Counterstain: 150µl per vial (15 tests) or 500µl per vial (50 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formaldehyde, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The Aquarius® kit should be stored at -20°C until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.

Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100-watt mercury lamp and plan apochromal objectives x63 or x100. The triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing the red and green fluorophores as well as counterstain simultaneously. The blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required).

Sample Preparation

The kit is designed for use on cultured peripheral blood cells or cultured bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative, that should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare air dried samples on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

(Note: Please ensure that exposure of the probe to laboratory lights is limited at all times).

Slide preparation

1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
2. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at room temperature (RT) without agitation.
3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 minutes at RT.
4. Allow to dry.

Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.

- Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to -20°C.
- Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
- Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

- Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

Hybridisation

- Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

Post-Hybridisation Washes

- Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
- Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
- Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
- Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.
- Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- View with a fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark at/or below RT.

Procedural Recommendations

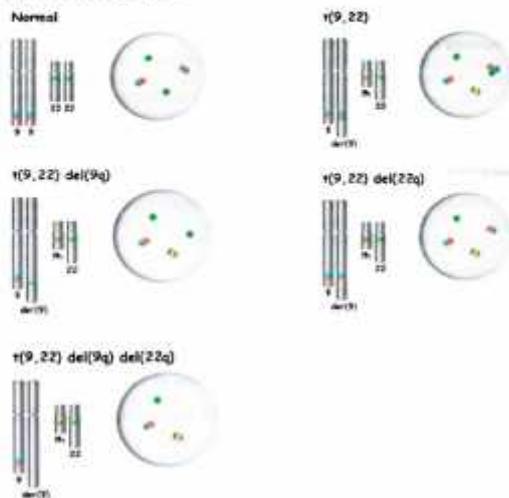
- Baking or ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCELL Ltd.
- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

In a normal cell these probes should appear as discrete red/blue and green spots, one for each homologue (resulting in a 2RB, 2G conformation). Depending on the rearrangement, cells can show one of the following signal patterns:

- In a classical t(9;22)(q34;q11) case (without deletion) one red/green (yellow fusion) and one red/green/blue signal in addition to one red/blue and one green signal of the normal chromosomes 9 and 22 respectively should be observed (1RG, 1RGB, 1RB and 1G).
- In a t(9;22)(q34;q11) patient with loss of proximal 9q one red/green (yellow fusion) and one green signal in addition to one red/blue and one green signal of the normal chromosomes 9 and 22 respectively should be observed (1RG, 2G and 1RB).
- In a t(9;22)(q34;q11) patient with loss of distal 22q one red/green (yellow fusion) and one red/blue signal in addition to one red/blue and one green signal of the normal chromosomes 9 and 22 respectively should be observed (1RG, 2RB and 1G).
- In a t(9;22)(q34;q11) patient with loss of proximal 9q and distal 22q one red/green (yellow fusion) signal in addition to one red/blue and one green signal of the normal chromosomes 9 and 22 respectively should be observed (1RG, 1RB and 1G).

The ASS1 probe in blue can differentiate random signal overlap from true BCR/ABL1 fusion in the interphase cells. The random signal overlap would result in the presence of the blue signal, while the true fusion would result in the absence of the blue signal.



Limitations

Reporting and interpretation of FISH results should be consistent with professional standards of practice and should take into consideration other clinical and diagnostic information. This kit is intended as an adjunct to other diagnostic laboratory tests and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Additional Information

For additional product information please contact the CytoCELL Technical Support Department.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.cytoCELL.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interfases d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil diagnostique essentiel lors de l'analyse des chromosomes en pédiatrie, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, le rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région ABL1 9q34.11-q34.12 en rouge
Sonde de la région BCR 22q11.22-q11.23 en vert
Sonde de la région ASS1 9q34.11-q34.12 en bleu

Le mélange de sondes BCR contient une sonde qui s'étend sur une région centromérique de 168kb du BCR et contient les gènes GNAZ et RAB35. Une seconde sonde couvre une région de 148kb qui est positionnée sur une région télomérique de 261kb du BCR. Les deux sondes sont marquées en vert et sont orientées de telle manière que les points de cassure de t(BCR) ou t(MBCR) se traduisent par un signal de fusion. Pour ABL1, un congé de sondes couvre 346kb depuis le centre du gène FUSP3 jusqu'à un point situé à 64kb de la région télomérique du gène ABL1, et il est marqué en rouge. Une sonde supplémentaire bleue couvre une région de 173kb et l'extrémité du gène ASS1. La sonde ASS1 se trouve à 212kb de l'extrémité centromérique du gène ABL1.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests), 100µl par tube (10 tests) ou 200µl par tube (20 tests)
Concentration de sonde ABL1, rouge: 24-30ng/test
Concentration de sonde BCR, vert: 108-135ng/test
Concentration de sonde ASS1, bleu: 304-380ng/test

La sonde est fournie prête-à-emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

Contre-colorant: 150µl par tube (15 tests) ou 500µl par tube (50 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

- Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- Le contre-colorant est la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

Le kit Aquarius® doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).
- Jarres en plastique ou en verre.
- Forceps.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.
- Incubateur à 37°C.
- Colle Rubber cement.

Microscope et filtres

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100-watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 or x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément.

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Protocole FISH

(Remarque : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire)

Préparation de la lame échantillon

- Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.
- Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation.
- Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.
- Laisser sécher.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

J Abdel moula, NB; Portnoi, MF; Vialard, F; Amouri, A; Van den Akker, J; Taillemite, JL ,2000.Les techniques de cytogénétiques moléculaires : principes et progrès.

J Adimy M, Crauste F, Halanay A., Neamtu M et Opris D. Stability of limit cycles in a pluripotent stem cell dynamics model. Chaos, Solitons and Fractals 27(4), 1091-1107 (2006) .

B

J Bardin C, Tafzi N, Declèves X, Huet E, Chast F. Pharmacocinétique des inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique. Rev Francoph Lab 2007 ; 395 : 31-35.

o Burke, V. P., and Startzell, J. M. (2008). The leukemias. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 20, 597-608.

C

J Calabretta, B., and Perrotti, D. (2004). The biology of CML blast crisis. Blood 103, 4010- 4022.

J Charles G. Mullighan, M.D. et al. : Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2009 January 29; 360(5): 470 480.

J Chomel .J.-C; Sorel. N; Mayeur-Rousse C; Turban A.G. (2009). Les syndromes myéloprolifératifs, Immuno-analyse et biologie spécialisée. 24, 69-85.

J Cortes J, Kantarjian H. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. Blood 2012 ; 120 : 1390-7.

D

J Deininger M. W; Bose S; Gora J. (1998). Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation Cancer Res. 58 : 421-9.

J Deininger, M. W., Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 96, 3343-3356.

J Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. Blood 112, 4793-4807.

J Djouadi K; Lahlou A. (2009). Revue Algérienne d'hématologie, approches épidémiologiques en Algérie, numéro 00.

E

J E. Delabesse ., V. Asnafi ., E. Macintyre ., 2003. Application à l'hématologie maligne des techniques de biologie moléculaire. Revue générale. 335–352.

F

J Fribourg, Lausanne, Berne (Suisse) ,2002. Anomalie de nombre ou de la structure des chromosomes, cours universitaires.

G

J Guilhot F, Roy L, Guilhot J, Millot F. Interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004 ; 18 : 584-603.

H

J Hantschel O., Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 : 5(1), 33-44.

I

J Irons, R. D., and Stillman, W. S. (1996). The process of leukemogenesis. *Environmental health perspectives* 104 Suppl 6, 1239-1246.

J

J Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 Update on diagnosis, monitoring, and management. *Am. J. Hematol.* 2012 : 87(11), 1038-1045.

J Jabbour E, Cortes J, O'Brien S, Giles F, Kantarjian H. New targeted therapies for chronic myelogenous leukemia : opportunities to overcome imatinib resistance. *Semin Hematol* 2007 ; 44 : 25-31.

L

J Labussière H, Hayette S, Tigaud I, Michallet M, Nicolini FE. Le traitement de la leucémie myéloïde chronique en 2007. *Bull Cancer* 2007 ; 94 : 863-869.

J Laneuville, P. (1995). Abl tyrosine protein kinase. *Seminars in immunology* 7, 255-266.

J Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001 : 61(6), 2343-2355.

J Legros L, Pagès G. Effet anti-angiogénique de l'imatinib mesilate (Glivec®) dans les leucémies myéloïdes chroniques. *Hématologie* 2004 ; 10 : 464-467.

J Leguay. T; Mahon F.X. (2005). Leucémie myéloïde chronique, EMC-Hématologie 2. 187-205.

J Leguay T., Mahon F.X. Chronic myelogenous leukaemia. EMC-Hématologie. 2005 : 2(3), 187-205.

J Leguay T, Mahon FX. Leucémie myéloïde chronique. *Hématologie* 2005 ; 13 : 187-205

M

J Maru, Y. (2001). Molecular biology of chronic myeloid leukemia. International journal of hematology 73, 308-322.

J McWhirter, J. R., Galasso, D. L., Wang, J. Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain -of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. Molecular and Cellular Biology 13, 7587-7595.

J Melo J.V., Deininger M.W. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. Hematol Oncol Clin N Am. 2004 : 18(3), 545-568.

J Melo, J. V. (1997). BCR-ABL gene variants. Baillieres Clin Haematol 10, 203-222.

J Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. : Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 2010; 86:749-64.

N

J Najman A; Verclay E; Potron G; Isnard F. (1994). Hématologie. Tome I. Ellipses, Paris.435-6.

P

J P. Rousselot, Critères et traitement des réponses insuffisantes à l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique. Hématologie, 12, 19-25 (2006).

R

J Rodgers R, Latif Z, Copland M. How I manage priapism in chronic myeloid leukaemia patients. Br J Haematol 2012 ; 158 : 155-64.

J Romana SP, Le Coniat M, Berger R. : t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 1994 Mar;9(3):186-91.

J Rousselot P. Compte rendu du congrès de l'European School of Hematology sur la leucémie myéloïde chronique. Hématol 2003 ; 9 : 513-515.

S

J Sebahoun G. Hématologie clinique et biologique. Arnette groupe liaisons SA, Rueil-Malmaison 2005 ; 578 pages.

J Springer Verlag HSU TC Human and mammalian cytogenetics New York. 1979 pp 1-2.

T

J Thelml H, (1985): Atlas d'hématologie pratique, Edition Masson, Paris, New York, Barcelone. Pages: 69, 81, 82, 83, 95.

J Thomas FEAUGAS, Quentin NICOLAS, Loghan VIAUD, 2013.La FISH.

J Treuil P. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. Act Pharm 2008 ; 474 : 25-30.

J Troussard X, Leporrier M, (1992) : Hyperlymphocytoses et syndromes mononucléosiques. In : Dreyfus B (ed). L'hématologie. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1992 : 829-36.

V

J Verloes A, Cavé H. La voie de signalisation de RAS et ses syndrômes. Arch péd 2007 ; 14 : 586-589.

J Von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., and Duyster, J. (2002). BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. Lancet 359, 487-491.

W

J Wetzler, M., Talpaz, M., Yee, G., Stass, S. A., Van Etten, R. A., Andreeff, M., Goodacre, A. M., Kleine, H. D., Mahadevia, R. K., and Kurzrock, R. (1995). Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 3488-3492.

Y

J Y. RUMPLER, 2000. Le caryotype humain et ses anomalies, page 77 - 85.