

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 et physiologie cellulaire

Laboratoire des Biotechnologies, Environnement et Santé

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique et Physiologie

Application de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire (caryotype et FISH) dans la leucémie aigue myéloblastique avec maturation

Réalisé par :

HAOUARI Rahma

Devant le jury composé de :

Mme BENZAOUZ.F	MCB USDB1	Présidente
Mme GUESSAIBYA.N	MCB USDB1	Examinatrice
Mme TAOUSSIS	MCA EHS ELCC (CAC)	Promotrice
Mme ROUAKI.F	MCB USDB1	Co-promotrice

Promotion : 2017/2018

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du jury pour leur disponibilité à évaluer notre travail.

Je remercie en particulier la Professeur S. TAOUSSI, qui m'a accueilli au sein du laboratoire de cytogénétique du CAC Blida, pour sa disponibilité, ses orientations et sa patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené. Je n'oublie pas de remercier Mr le Professeur M.T ABAD pour ses précieux conseils et pour toute l'aide qu'il m'a apportée.

Je voudrais témoigner toute ma gratitude et mon profond respect à Mme F. ROUAKI maître de conférences de classe B, pour sa confiance, son soutien, ses rigoureux et judicieux conseils qu'elle m'a prodigués pour que je puisse élaborer ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury :

Mme F. BENAZZOZ maître de conférences de classe B, Pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.

Mme N. GUESSAIBYA maître de conférences de classe B, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire de cytogénétique du CAC Blida pour leur disponibilité tout au long de mon stage.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants du département de Biologie et Physiologie Cellulaire, ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes très 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.

Votre encouragement et votre soutien source de force pour persévérer et prospérer dans la vie.

Puisse Dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mes tendres sœurs et leurs adorables enfants ;

Pour leur amour, leur présence et leur soutien moral qui a été d'une très grande aide pour moi, que Dieu nous garde unies pour la vie.

A mon fiancé ;

Merci pour ton aide et ta disponibilité dans les moments les plus difficiles, Dieu te garde pour moi.

A ma très chère tante ;

Merci pour ton soutien, ta générosité et d'être toujours là pour nous.

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

Résumé

Les leucémies aigues myéloblastiques (LAM) correspondent à un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, caractérisées par la prolifération anormale et excessive de cellules hématopoïétiques immatures dans la moelle osseuse. Ces dernières, appelées leucoblastes sont bloquées à un stade précoce de leur différenciation entraînant un dysfonctionnement de l'hématopoïèse. Il existe plusieurs sous types de LAM, dont le sous type Leucémie Aigue Myéloblastique avec maturation (LAM2) fera l'objet du présent travail.

L'objectif de ce travail était d'étudier cinq patients atteints de LAM2 en utilisant des techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) en bandes R et d'Hybridation fluorescente *in situ* (FISH) après avoir diagnostiqué cytologiquement ces cas.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que tous ces patients ont présenté une hyperleucocytose, une anémie et une thrombopénie ; l'examen du caryotype a révélé la présence d'une t(8;21)(q22;q22) dans tous les cas; l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) a montré pour ces cinq cas, la présence d'un signal RUNX1/RUNX1T1 (AML1/ETO) sur la quasi-totalité des mitoses et des noyaux analysés.

Mots clés : LAM2, caryotype, FISH, t(8;21)(q22;q22).

ABSTRACT

Acute myeloblastic leukemia (AML) is a heterogeneous group of hematological malignancies, characterized by abnormal and excessive proliferation of immature hematopoietic cells in the bone marrow. The latter, called leucoblasts are blocked at an early stage of their differentiation causing a dysfunction of hematopoiesis. There are several sub-types of AML, of which the subtype Myeloblastic acute leukemia with maturation (AML2) will be the subject of the present work.

The aim of this work was to study five patients with AML2 using conventional cytogenetic (karyotype) and fluorescent in situ hybridization (FISH) techniques after cytological diagnosis of these cases.

The results obtained in this study showed that all these patients had hyperleukocytosis, anemia and thrombocytopenia; examination of the karyotype revealed the presence of t(8;21)(q22;q22) in all cases; In these five cases, fluorescent in situ hybridization (FISH) showed the presence of a RUNX1/ RUNX1T1 signal (AML1 / ETO) on almost all the mitoses and nuclei analyzed.

Key words: LAM2, karyotype, FISH, t(8;21)(q22;q22).

الملخص

اللوكيميا النخاعية الحادة (AML) هي مجموعة غير متجانسة من الأورام الدموية الخبيثة التي تتميز بالانتشار الغير الطبيعي والمفرط للخلايا الدموية الغير الناضجة المتواجدة في النخاع العظم. هذه الأخيرة تسمى (leucoblasts) وتتوقف في مرحلة مبكرة من تمايزها مما تسبب خلل في الخلايا الجذعية. هناك عدة أنواع فرعية من AML بما في ذلك نوع اللوكيميا النخاعية الحادة مع النضج (AML2).

الهدف من هذا العمل هو دراسة 5 مرضى يعانون من AML2 باستخدام التقنيات الوراثة الخلوية التقليدية (karyotype) و التهجين الموضعي المتألق (FISH) (Fluorescent *in situ* hybridization) بعد التشخيص الخلوي لهذه الحالات.

النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة أظهرت أن جميع هؤلاء المرضى فرط في عدد الكريات البيضاء، فقر الدم ونقص الصفائح الدموية. كشف فحص النمط النووي عن وجود (q22;q22)(t(8;21) في جميع الحالات.

كما اظهر التهجين الموضعي المتألق (FISH) عن وجود إشارة RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) في جميع الانقسامات والنوايا التي تم تحليلها.

الكلمات الدالة : AML2، النمط النووي، التهجين الموضعي المتألق FISH ، (q22;q22)(t(8;21)

Liste des figures :

Figure 1: Structure du chromosome métaphasique	5
Figure 2 : Structure du chromosome métacentrique	6
Figure 3: Structure du chromosome submetacentrique	6
Figure 4: Structure du chromosome acrocentrique	6
Figure 5: Représentation schématique des différents compartiments du système Hématopoïétique	8
Figure 6: Modèle de leucémogénese à deux (02) évènements.....	10
Figure 7: Myéloblaste avec maturation.	13
Figure 8: Représentation schématique du gène de fusion RUNX1-RUNX1T1, des protéines sauvages RUNX1T1 et RUNX1 et de la chimère de fusion RUNX1-RUNX1T1.....	16
Figure 9: Recrutement répresseur par AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1).	17
Figure 10: principe de la technique d'hybridation in situ en fluorescence avec des sondes froides (FISH).	29
Figure 11: Le caryotype (bandes R) du patient 1 : 45 X, -X, t (8 ; 21) (q22 ; q22).	36
Figure 12: Le caryotype (bandes R) du patient 2 : 45 X, -X, t (8 ;21) (q22 ; q22).	Erreur !
Signet non défini.	
Figure 13: Le caryotype (bandes R) du patient 3: 45 X,-Y, t (8 ; 21) (q22 ; q22).	37
Figure 14: Le caryotype (bandes R) du patient 4 : 46 XY, t(8 ; 21)(q22 ; q22),del 9q12q13.	38
Figure 15: Le caryotype (bandes R) du patient: 45X, -Y, t(8 ;21) (q22; q22).	38
Figure 16: Résultat de la FISH du patient 1.....	40
Figure 17: Résultat de la FISH du patient 2.....	40
Figure 18: Résultat de la FISH du patient 3.....	41
Figure 19: Résultat de la FISH du patient 4.....	41
Figure 20: Résultat de la FISH du patient 5.....	42

Liste des tableaux :

Tableau I : Classification FAB et OMS des leucémies aiguës myéloïdes.	12
Tableau II : Incidence annuelle des LAM en Algérie.....	14
Tableau III : Répartition des différents types de LAM en Algérie selon la classification FAB.	15
Tableau VI : Résultats des hémogrammes des patients étudiés.	34

Liste des Abréviations :

AML1 : Acute Myéloid Leukemia 1 protein.

CBF : Core Binding Factor.

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique.

ETO : Eigth Twenty One.

FAB : French- American-British.

FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization.

LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique.

LAM2 : Leucémie Aigue Myéloblastique avec maturation.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium.

RUNX1: Runt related transcription factor1.

RUNX1T1: Runt related transcription factor 1; translocated to, 1(cyclin Drelated).

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Rappels bibliographiques.....	3
I.1. La Cytogénétique.....	4
I.1.1. Définition.....	4
I.1.2. Cytogénétique conventionnelle (caryotype).....	4
I.1.3. Cytogénétique moléculaire.....	4
I.1.4. Morphologie du chromosome métaphasique.....	5
I.2. Sang et hématopoïèse.....	7
I.2.1. Tissu sanguin.....	7
I.2.2. Hématopoïèse.....	7
I.2.3. Leucémogénese.....	9
I.2.4. Anomalies moléculaires dans la leucémogénese.....	9
I.3. Leucémies Aigues Myéloblastiques.....	11
I.3.1. Définition.....	11
I.3.2. Classification des Leucémies Aigues Myéloblastiques.....	11
I.4. Leucémie Aigue Myéloblastique avec maturation.....	13
I.4.1. Epidémiologie des LAM.....	13
I.4.2. Les leucémies Aigues Myéloblastiques du groupe Core Binding Factor.....	15
I.4.3. Physiopathologie des LAM avec t(8;21)(q22;q22).....	15
I.4.3.1. Le gène RUNX1.....	16
I.4.3.2. Le gène RUNX1T1.....	17
I.4.4. Aspects cliniques des LAM.....	18
I.4.5. Examens biologiques.....	18
I.4.5.1. L'hémogramme.....	18
I.4.5.2. Myélogramme.....	19

I.4.5.3. Immunophénotypage.....	19
I.4.5.4. Cytogénétique et biologie moléculaire.....	19
I.4.6. Traitement.....	20
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	23
II.1. Matériel.....	24
II.1.1. Matériel biologiques.....	24
II.1.1.1. Echantillonnage	24
II.1.1.2. Prélèvement de l'échantillon : Ponction de la moelle osseuse.....	24
II.1.2. Matériel non biologiques.....	24
II.2. Méthodes.....	24
II.2.1. La culture cellulaire.....	24
II.2.1.1. Mise en culture.....	25
II.2.1.2. Blocage des cellules en mitose.....	25
II.2.1.3. Sortie de culture.....	26
II.2.2. L'étalement cellulaire sur lame.....	27
II.2.3. Protocole de la cytogénétique conventionnelle caryotype (Bandes R).....	28
II.2.4. Protocole de la cytogénétique moléculaire (FISH).....	29
Chapitre III : Résultats et discussion.....	34
III.1. Résultats et discussion des hémogrammes.....	35
III.2. Examen de la cytogénétique conventionnelle (caryotype).....	37
III.3. Examen de la cytogénétique moléculaire (FISH).....	40
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	46
Annexes.....	52

Introduction

Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes ou myéloblastiques (LAM) sont des hémopathies malignes liées à la prolifération et à l'arrêt de la différenciation des précurseurs médullaires des lignées granuleuses, monocytaires, érythroïdes ou plaquettaires au stade de « blastes ». Il en résulte une accumulation de ces blastes dans la moelle, le sang et éventuellement dans d'autres organes (McKenzie, 2005).

Les LAM sont répartis selon la classification du French-American-British (FAB) en huit catégories distinctes ; de LAM0 à LAM7. Cette classification est basée essentiellement sur la cytomorphologie (Bennett et al, 1976).

Une nouvelle classification basée sur des critères morphologiques, immunophénotypiques, cliniques et génétiques a été proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette dernière, est maintenant la référence en matière de classification des cancers hématologiques (Arber et al., 2016).

La t(8 ;21)(q22 ;q22) est généralement associée à la leucémie aigue myéloblastique avec maturation (LAM2) (représente 10% des LAM2); elle est caractérisée par la présence d'une translocation réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 8 (en q22) et 21 (en q22). Cette translocation résulte de la fusion du gène ETO (RUNX1T1) sur le bras long du chromosome 8 et du gène AML1 (RUNX1) sur le bras long du chromosome 21 (Rowley, 1973).

Le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des LAM font aujourd'hui une large place aux techniques cytogénétiques : cytogénétique conventionnelle (caryotype) en bandes R et cytogénétique moléculaire (FISH) et celles de la biologie moléculaire en complément de techniques usuelles tels que l'hémogramme, le myélogramme et la cytochimie (Mbensa et al., 1993).

C'est dans ce contexte que s'insère notre étude qui a pour objectif la caractérisation génétique de la leucémie aigue myéloblastique avec maturation (LAM2) chez cinq patients. Nous avons utilisé des techniques cytogénétiques, caryotype et hybridation fluorescente *in*

situ, qui ont été réalisées après avoir effectué un hémogramme et un myélogramme après suspicion d'une LAM pour confirmer ce diagnostic.

Pour cela la présente étude portera d'abord sur une recherche bibliographique suivie d'une étude pratique illustrant les cinq cas de LAM2.

Chapitre I : Rappels Bibliographiques.

I.1. La Cytogénétique :

I.1.1. Définition :

La cytogénétique étudie la structure des chromosomes, elle a pour objectif de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques d'étude des chromosomes, conventionnelles (caryotype) ou moléculaires (Hybridation *in situ*). Plusieurs anomalies sont décrites : de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques) (Delabesse, 2003).

I.1.2. Cytogénétique conventionnelle (caryotype) :

Le caryotype étudie l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une prise de vue microscopique optique. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard, par paire et classés en fonction de leur taille, de la position des bandes après coloration et de la position des centromères (Rumpler, 2000).

I.1.3. Cytogénétique moléculaire :

La toute première technique de cytogénétique moléculaire est représentée par l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Elle repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN (Romana et Malan, 2010).

La FISH a été mise au point au cours des années 1980, grâce à l'utilisation de sondes moléculaires associées à des fluorochromes. L'hybridation sur chromosomes métaphasiques permet par exemple, de détecter des anomalies de structure, notamment les translocations, soit en décorant un ou plusieurs chromosomes entiers avec des sondes spécifiques de ces chromosomes (chromosomes painting) soit en utilisant des sondes moléculaires correspondant à des gènes ou à des séquences d'ADN dont la localisation sur le chromosome est connue. On peut ainsi définir entre quels marqueurs moléculaires sont situés les points de cassure chromosomique et par conséquent les localiser, par référence à des cartes chromosomiques connues (Berger, 1998).

I.1.4. Morphologie du chromosome métacentrique :

Le chromosome métaphasique est visualisé lors de la métaphase de la mitose, meilleur moment d'analyse des chromosomes où la condensation de la chromatine est maximale. La constriction centromérique est un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court (par convention situé au-dessus du Centromère) et un bras long (en-dessous du Centromère). Les extrémités des bras chromosomiques sont appelées télomères (figure1) (Saitoh et Laemmli, 1994).

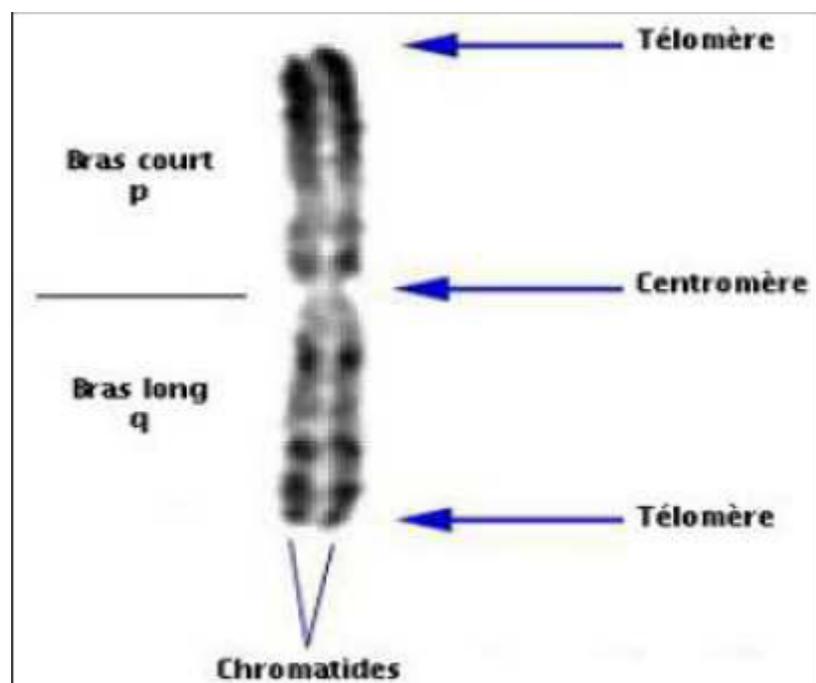


Figure 1: Structure du chromosome métacentrique : chromosome 1 en bandes R (Saitoh et Laemmli, 1994).

En fonction de la taille respective des bras courts et longs, on reconnaît trois groupes morphologiques de chromosomes :

- **Les chromosomes métacentriques :** dont les bras courts et longs sont de taille semblable (figure 2). L'index centromérique (rapport de la taille du bras court sur la taille du bras court + la taille du bras long ($p/p+q$)) est autour de 0,5. Exemples : chromosomes 1, 2, 3, 16, 19, 20, X.



Figure 2 : Structure du chromosome métacentrique (Saitoh et Laemmli, 1994).

- **Les chromosomes submétacentriques** : dont les bras courts sont franchement plus courts que les bras longs (figure 3). L'index centromérique est très inférieur à 0,5. Exemples : chromosomes 4, 5, 6 à 12, 17, 18, Y.



Figure 3: Structure du chromosome submétacentrique (Saitoh et Laemmli, 1994).

- **Les chromosomes acrocentriques** : dont le bras court est peu ou pas visible (figure 4). L'index centromérique est proche de 0. Exemple : chromosomes 13, 14, 15, 21, 22.



Figure 4: Structure du chromosome acrocentrique (Saitoh et Laemmli, 1994).

I.2. Sang et hématopoïèse :

I.2.1. Tissu sanguin :

L'organisme humain adulte contient environ cinq litres de sang qui circule tout en assurant la constance du milieu intérieur (pH, hydratation, température), il apporte à tous les tissus des éléments nutritifs (l'oxygène et les nutriments) et de défenses dont ils ont besoin et évacue le CO₂ et les déchets. Les éléments figurés du sang sont soit de véritables cellules, les leucocytes, qui sont en transit dans le sang et leurs fonctions ne se développent totalement que dans les tissus conjonctifs, soit des éléments dépourvus de noyaux les hématies et les plaquettes. Ces éléments anucléés, comportant uniquement des structures cytoplasmiques sont spécifiques du sang et ne sortent des vaisseaux qu'en cas d'hémorragies (Dadoune, 1990).

I.2.2. Hématopoïèse :

L'hématopoïèse - du grec haimatos « du sang » et poiesis « création » - caractérise l'ensemble des mécanismes de divisions multiples et de différenciations progressives qui concourent, tout au long de la vie d'un individu, à la production continue et régulée des cellules sanguines matures fonctionnelles (les érythrocytes, hématies ou globules rouges), les plaquettes et les leucocytes ou globules blancs à partir d'une cellule souche commune totipotente : Le système hématopoïétique permet ainsi de générer des cellules qui donneront naissance à toutes les lignées de cellules sanguines. Schématiquement, les cellules sanguines sont classées en deux catégories : les cellules lymphoïdes (lymphocytes B, T et Natural killer) et les cellules myéloïdes (érythrocytes, mégacaryocytes, granulocytes) (Akashi et *al.*, 2000).

Toutes les cellules sanguines trouvent leurs origines dans la moelle osseuse, siège exclusif de l'hématopoïèse chez l'adulte, à partir d'une cellule ancestrale appelée Cellule Souche Hématopoïétique (CSH) ou Colony Forming Unit in the spleen (CFUs) qui donne naissance, par conditionnements et différenciations spécifiques à tous les éléments figurés du sang, processus qui sont régulés par le microenvironnement médullaire, des actions intercellulaires, et des facteurs de croissance et cytokines (Lacombe, 2006).

L'hématopoïèse comporte 4 compartiments (Cavazzan *et al.*, 2004) :

- Les cellules souches pluripotentes (Figure5): cellules très primitives ayant un haut pouvoir de prolifération, capables d'auto renouvellement et de différenciation vers toutes les lignées hématopoïétiques.
- Les progéniteurs (Figure5): cellules capables de proliférer sans s'auto renouveler et de se différencier. Ces cellules sont déjà engagées vers une seule lignée cellulaire : Burst-Forming Unit Erythroid (BFU-E) et Colony Forming Unit Erythroid (CFU-E) 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 (Figure5) : ceux sont les seules cellules de la moelle osseuse morphologiquement identifiables, correspondant à des cellules en cours de maturation avant leur passage dans la circulation sanguine.
- Les cellules matures (Figure5): cellules fonctionnelles qui circulent dans le sang et maintiennent l'homéostasie.

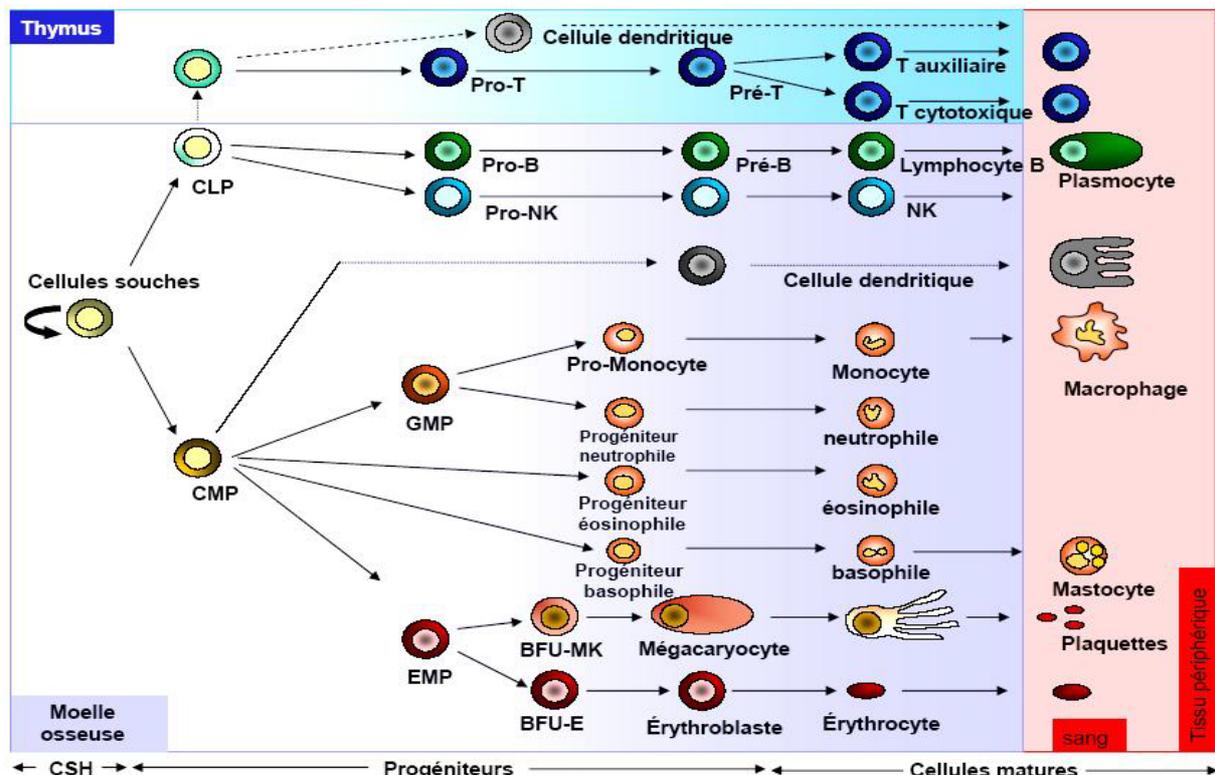


Figure 5: Représentation schématique des différents compartiments du système Hématopoïétique (Lacombe, 2006).

CLP : Cellules Lymphoïdes Précurseurs

CMP : Cellules Myéloïdes Précurseurs

NK : Natural Killer

GMP : Progéniteurs granulo-monocytaire commun

EMP : Erythroid megakaryocyte progenitor

BFU-E : Burst-Forming Unit Erythroid

BFU-MK : Burst-Forming Unit Megakaryocyte

I.2.3. Leucémogénese :

La leucémie est une hémopathie maligne monoclonale qui dérive d'une cellule souche de la moelle osseuse. C'est un cancer du sang avec dérégulation d'une cellule souche ayant subi une perte de capacité de différenciation normale ainsi qu'une perte progressive d'une maturation normale et le développement d'un phénotype malin, indifférencié. La leucémogénese est un ensemble de processus hématopoïétiques aberrants prenant origine dans les cellules souches leucémiques (CSL) ou de progéniteurs engagés, ayant accumulé des mutations, des changements épigénétiques et/ou une expression sélective de gènes. Ces altérations permettent à la cellule de maintenir ou de réacquérir la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération clonale indéfinie. Elle se développe en parallèle de l'hématopoïèse normale, en conservant des caractéristiques comparables à cette dernière. Cependant, le type de leucémie aiguë est ainsi déterminé par l'origine de la lignée cellulaire dont provient le clone et par le degré de différenciation atteint au moment de la transformation maligne (Irons et Stillman, 1996).

I.2.4. Anomalies moléculaires dans la leucémogénese :

Les Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des hémopathies hétérogènes sur le plan génétique. Les événements oncogéniques acquis par la cellule initiatrice sont classiquement divisés en deux catégories : les anomalies de classe 1, et celles de classe 2 (figure 6). Les premières confèrent un avantage prolifératif aux cellules. Elles regroupent par exemple les mutations activatrices de récepteurs à activité tyrosine kinase. Les anomalies de

classe 2 induisent un blocage de différenciation et une capacité d'auto-renouvellement (Gilliland et Griffin, 2002).

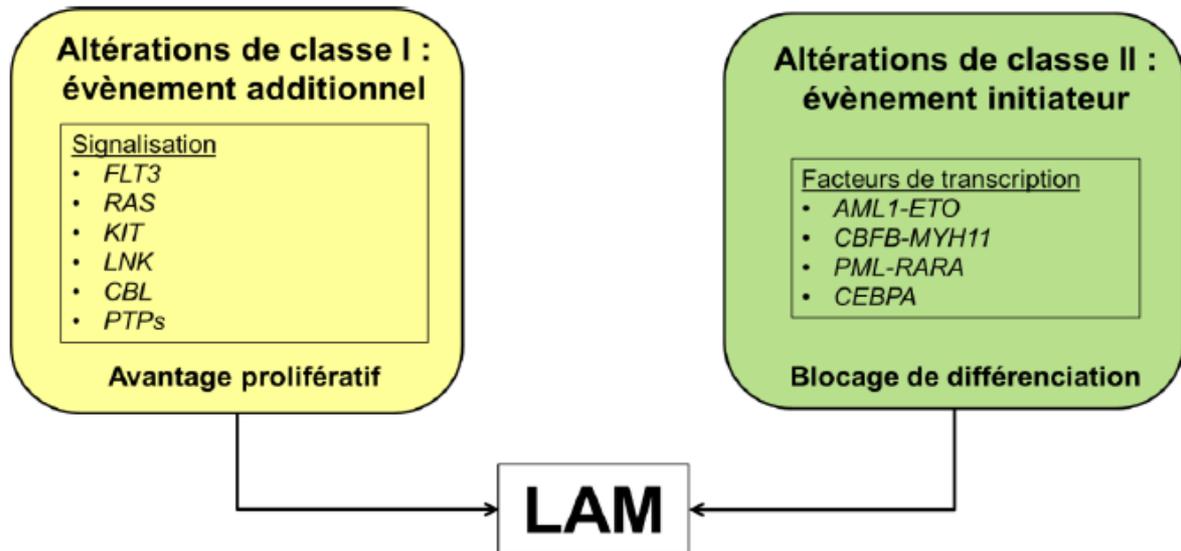


Figure 6: Modèle de leucémogénèse à deux (02) évènements (Gilliland et Griffin, 2002).

FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3

RAS : RAt Sarcoma viral oncogene

KIT : V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

CBL : Casitas B-cell Lymphoma

PTPs : Protéine Tyrosine Phosphatase

AML1/ETO : Acute Myeloid Leukemia 1/Eighth Twenty One

CBFB-MYH11: Core Binding Factor B-Myosin heavy chain 11, smooth muscle

PML-RARA : Pro Myelocytic Leukaemia- Retinoic Acid Receptor α

CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein

I.3. Leucémies Aigues Myéloblastiques :

I.3.1. Définition :

Les LAM constituent un ensemble de proliférations clonales aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes (hématopoïétiques et non hématopoïétiques), de précurseurs hématopoïétiques, les leucoblastes (ou blastes), de nature myéloïde (lignées granuleuses et monocytaires) avec blocage à un stade précoce de leur différenciation (Prebet et *al.*, 2012).

I.3.2. Classification des Leucémies Aigues Myéloblastiques :

Les LAM ont longtemps été classées uniquement sur leurs aspects morphologiques définis par la classification du French- American-British (FAB) toujours utile en routine clinique (Bennett et *al.*, 1976).

La caractérisation d'anomalies cytogénétiques et moléculaires (mutations) récurrentes a amené l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) à proposer une nouvelle classification (OMS) (Tableau I) intégrant ces anomalies cytogénétiques et moléculaires (Vardiman, 2008 ; Arber et *al.*, 2016).

Classification FAB	Classification OMS
<p>M0 : Différenciation minimale.</p> <p>M1 : Différenciation myéloïde sans maturation.</p> <p>M2 : Différenciation myéloïde avec maturation.</p> <p>M3 : Leucémie promyélocytaire.</p> <p>M4 : Leucémie myélomonocytaire.</p> <p>M4E0 : Leucémie myélomonocytaire avec éosinophilies pathologique.</p> <p>M5 : Leucémie monocytaire avec ou sans maturation</p> <p>M6 : érythroleucémie</p> <p>M7 : Leucémie mégacaryoblastique</p>	<p>LAM avec translocation cytogénétique récurrentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • LAM avec t (8 ; 21) • LAM promyélocytaire avec t (15 ; 17) • LAM avec inv (16) et éosinophilies pathologiques • LAM avec anomalies 11q23 (MLL) <p>LAM avec dysplasie multilinéaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Avec antécédents de syndrome myélodisplasique (SMD) • Sans antécédents de SMD <p>LAM avec dysplasie liée aux traitements (cytotoxique)</p> <ul style="list-style-type: none"> • LAM sans autre catégorisation • Différenciation myéloïde sans maturation • Différenciation myéloïde avec maturation • Leucémie méylomonocytaire • Leucémie monocytaire • Erythroleucémie • Leucémie mégacaryoblastique • Leucémie a basophiles • Panmyélose aigue avec fibrose

Tableau I : Classification FAB et OMS des leucémies aiguës myéloïdes (Bennett et *al.*, 1976 ; Vardiman, 2008 ; Arber et *al.*, 2016).

I.4. Leucémie Aigue Myéloblastique avec maturation :

Il existe dans ce type de leucémie aigue myéloblastique, une maturation granuleuse souvent anormale avec hypo segmentation des noyaux des polynucléaires et hypo granularité des granuleux. Les corps d'Auer sont habituellement présents (figure 7). Une forme particulière, avec des blastes de grande taille renfermant de nombreux corps d'Auer et des granulations azurophiles, est retrouvée dans 30% des leucémies aigues myéloblastiques avec maturation (LAM2). Elle s'accompagne en général d'une translocation t(8;21) au caryotype et/ou par Polymerase Chain Reaction (PCR) de bon pronostic, dont le transcrit de fusion AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) peut être suivi en biologie moléculaire pour évaluer la maladie résiduelle sous traitement (Tamburini et Varet, 2012).

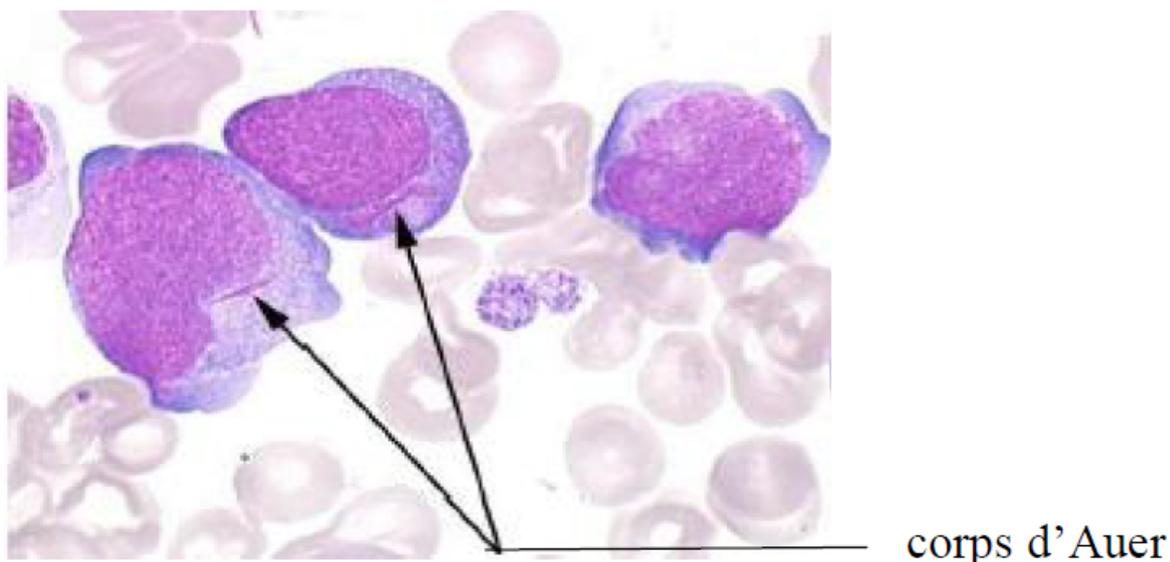


Figure 7: Myéloblaste avec maturation (Anonyme, 2014).

I.4.1. Epidémiologie des LAM :

En Algérie, parmi les hémopathies malignes, les LAM ont une incidence globale de 0,53 pour 100 000 habitants (tableau II), on a pu observer un doublement entre 1995 et 2005, avec une incidence qui passe de 0,33 à 0,67 (Benakli et *al.*,2009).

Année	Nombre	Population	Incidence
1995	94	28074000	0,33482938
1996	110	28602000	0,38458849
1997	99	29152000	0,33959934
1998	139	29726000	0,46760412
1999	138	30321000	0,45513011
2000	204	30417249	0,67067209
2001	170	30871734	0,55066554
2002	218	31332033	0,69577356
2003	204	31795720	0,64159579
2004	187	32261568	0,57963705
2005	221	32728378	0,67525497
Total	1784		0,53321367

Tableau II: Incidence annuelle des LAM en Algérie (Benakli et *al.*, 2009).

La répartition des LAM en fonction de la classification FAB (Tableau III), basée sur l'aspect morphologique, cytochimique et immunologique, montre que le type LAM2 représente un tiers de l'ensemble des LAM (Benakli et *al.*, 2009).

Type	Nombre de cas	Pourcentage
M0	22	1,1
M1	308	16,4
M2	639	34
M3	159	8,4
M4	222	11,8
M5	296	15,7
M6	60	3,1
M7	19	1
Indéterminé	152	8

Tableau III: Répartition des différents types de LAM en Algérie selon la classification FAB (Benakli et al., 2009).

I.4.2. Les leucémies Aigues Myéloblastiques du groupe Core Binding Factor :

Les LAM du groupe Core Binding Factor (CBF) font partie du sous-groupe des LAM avec Cytogénétique récurrente selon la classification diagnostique de l’OMS et contiennent deux (02) entités clinico-biologiques définies par un réarrangement chromosomique équilibré intéressant les gènes des deux (02) sous-unités du facteur de transcription CBF (Vardiman et al., 2009).

Ce facteur de transcription le CBF est impliqué dans l’hématopoïèse normale et notamment la granulopoïèse normale. Ces deux (02) sous-entités sont donc définies par leur réarrangement chromosomique : la LAM avec t(8;21)(q22;q22) responsable de la formation du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1* et la LAM avec inversion péricentrique du chromosome 16 (Mrozek et al., 2001).

I.4.3 Physiopathologie des LAM avec t(8;21)(q22;q22) :

La présence au cours d’une LAM d’une translocation réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 8 (en q22) et 21 (en q22), détectée par caryotype conventionnel a été décrite pour la 1ère fois en 1973 (Rowley, 1973).

Cette translocation est responsable de la fusion des gènes *RUNX1T1* (anciennement appelé *ETO* ou *MTG8*) et *RUNX1* (anciennement appelé *AML1* ou *CBF α* ou *PEBP2 α B*). La fusion de ces gènes est à l'origine de la synthèse d'un transcrit puis d'une protéine de fusion *RUNX1-RUNX1T1* spécifique (figure 8) de ce sous-type de LAM (Erickson et al., 1992).

I.4.3.1. Le gène *RUNX1* :

Le gène *RUNX1*, un gène de 260 kilobases, situé sur le bras long du chromosome 21, appartient à la famille *RUNX* composée de 3 membres (*RUNX1*, *RUNX2*, *RUNX3*). Trois isoformes de la protéine *RUNX1* (*RUNX1a*, *RUNX1b* et *RUNX1c*) ont été décrites qui possèdent toutes un domaine de liaison à l'ADN (domaine RHD, analogue au domaine Runt de la drosophile) et vont former un hétérodimère avec *CBF β* pour se lier à l'ADN et jouer leur rôle de facteur de transcription. Il peut agir comme un activateur ou un répresseur selon ses interactions moléculaires (Wang et al., 1996).

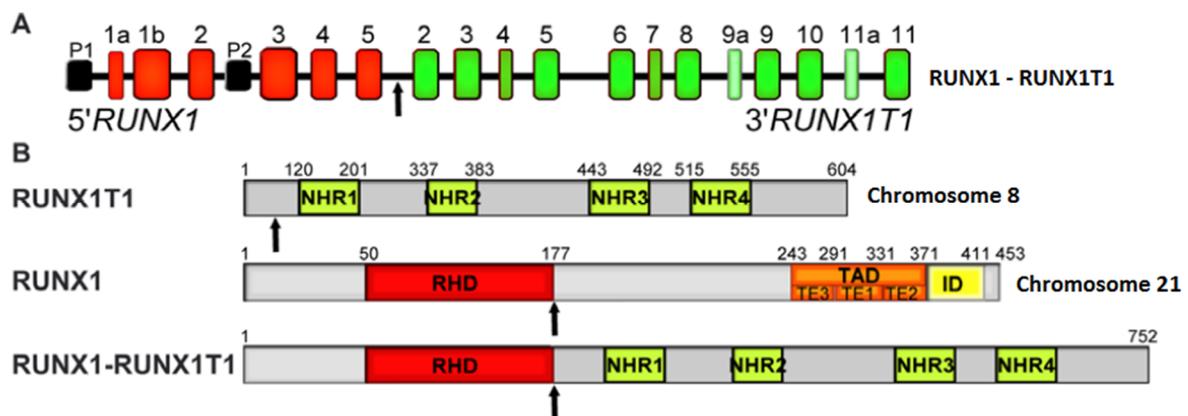


Figure 8: Représentation schématique du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, des protéines sauvages *RUNX1T1* et *RUNX1* et de la chimère de fusion *RUNX1-RUNX1T1* (Giguère, 2012).

Représentation schématique du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, montrant la fusion entre l'exon 5 de *RUNX1* (rouge) et l'exon 2 de *RUNX1T1* (vert).

Une flèche indique le point de cassure des deux gènes.

Représentation schématique des protéines sauvages *RUNX1* et *RUNX1T1* et de la protéine de fusion *RUNX1-RUNX1T1* avec son domaine RHD « Runt homology domain » et ses quatre domaines « Nervy homology domain » (NHR1 à NHR4).

Les flèches indiquent la position des points de cassure.

La protéine RUNX1 joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse puisque les souris invalidées pour le gène *RUNX1* décèdent in utero sans développement de l'hématopoïèse (Okuda et al., 1996).

I.4.3.2 Le gène RUNX1T1 :

Le gène *RUNX1T1*, situé sur le bras long du chromosome 8, possède 13 exons et peut donner 4 isoformes différentes de protéines après épissage. La protéine RUNX1T1 appartient à la famille ETO (qui contient 3 membres) et possède 4 domaines NHR (Nervy Homology Region) essentiels pour permettre l'interaction avec différentes protéines (dont les autres protéines de la famille ETO, les histones déacétylases, le corépresseur mSin3A) mais pas de site de liaison à l'ADN (figure 9). La protéine RUNX1T1 joue un rôle important dans le développement du système nerveux mais pas dans l'hématopoïèse (Lam et Zhang, 2012).

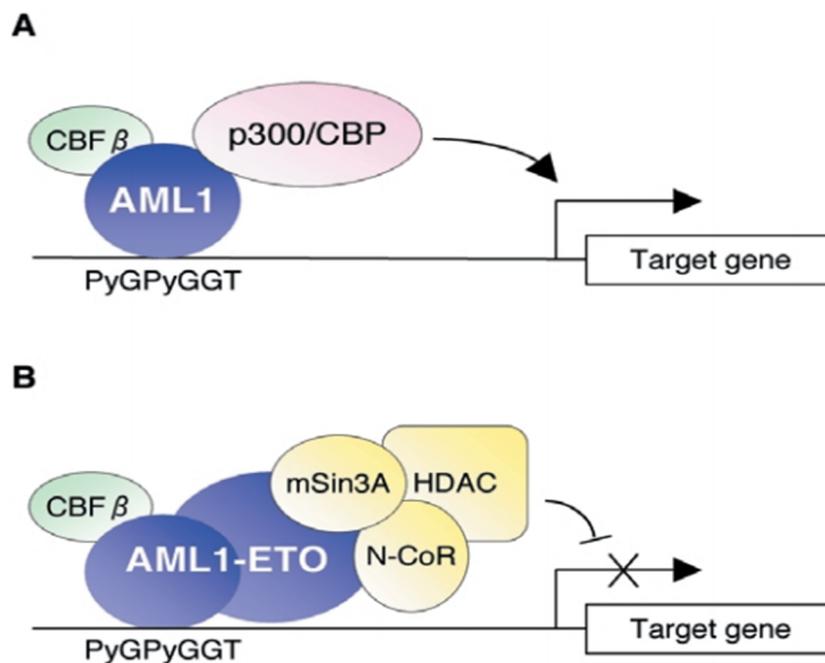


Figure 9: Recrutement répresseur par AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) (Kurokawa et Hirai, 2003).

En conséquence de la t(8;21)(q22;q22), AML1 est coupé entre le domaine Runt et le domaine de trans-activation. Bien que AML1 natif active l'expression des gènes cibles (A), AML1/ETO interfère via la liaison d'AML1 à l'ADN et recrute des complexes

transcriptionnels qui contiennent N-CoR, mSin3A et HDAC (B). Ces complexes répriment l'expression de gènes normalement régulés par le complexe AML1 natif (Kurokawa et Hirai, 2003).

Les LAM avec t(8;21) présentent également des caractéristiques cytogénétiques particulières puisque des anomalies chromosomiques additionnelles sont observées dans 70 à 80% des cas. Elles sont essentiellement représentées par la perte d'un chromosome sexuel (perte du chromosome Y chez près de la moitié des hommes, perte d'un chromosome X chez 20% des femmes), et la présence d'une délétion du bras long du chromosome 9 (del(9q), 15 à 20% des cas) (Sakurai et al., 1974 ; Schoch et al., 1996 ; Marucci et al., 2005 ; Appelbaum et al., 2006).

I.4.4. Aspects cliniques des LAM :

Les signes cliniques des LAM sont non spécifiques et traduisent deux évènements physiopathologiques : la prolifération de cellules malignes et l'insuffisance sanguine consécutive à l'insuffisance médullaire.

Le tableau clinique typique montre :

- Des signes d'insuffisance médullaire : anémie arégénérative, leucopénie, thrombopénie.
- Des signes de prolifération tumorale : adénopathies, splénomégalie, douleurs osseuses.

I.4.5. Examens biologiques :

I.4.5.1. L'hémogramme :

L'hémogramme est le premier examen d'orientation du diagnostic. La numération formule sanguine est toujours anormale avec au premier plan une anémie arégénérative, une thrombopénie parfois sévère est fréquemment observée. La leucocytose est variable allant de la leucopénie (GB < 4G/l) à l'hyperleucocytose parfois majeure (GB > 100G/l) (Altounian, 2014).

I.4.5.2. Myélogramme :

Le Myélogramme est l'examen clé du diagnostic et de la classification. Il permet de faire l'examen cytologique de la moelle osseuse dans le but de confirmer le diagnostic de la leucémie, en montrant une moelle riche avec diminution voire disparition des lignées hématopoïétiques normales. La leucémie aigue myéloblastique est définie selon l'OMS 2008 par une infiltration blastique supérieure à 20% (Swerdlow et *al.*, 2008).

I.4.5.3. Immunophénotypage :

La cytométrie en flux est la technique de choix pour la réalisation de l'immunophénotypage des leucémies aiguës. Il permet de repérer les cellules anormales, de déterminer leur lignée d'origine, d'analyser leur degré d'hétérogénéité et d'en déterminer les caractéristiques phénotypiques (Jouault, 2002).

L'immunophénotype des blastes de LAM avec t(8;21) retrouve une expression forte des antigènes CD34 et HLA-DR ainsi qu'une expression aberrante du CD19 dans environ 80 % des cas. L'expression de CD56 a été rapportée comme associée à un pronostic défavorable (Kita et *al.*, 1992).

I.4.5.4. Cytogénétiques et biologie moléculaire :

Les techniques cytogénétiques conventionnelles (caryotype) ou la Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) et la biologie moléculaire sont respectivement utilisées pour la détection des translocations chromosomiques et les mutations ponctuelles.

Ce sont aussi des outils importants pour le diagnostic et la détermination du pronostic, l'orientation thérapeutique ciblée et l'évaluation de la maladie résiduelle après traitement spécifique (Imber, 2002).

Les examens cytogénétiques des leucoblastes permettent de démontrer des anomalies chromosomiques numériques ou structurales acquises chez plus de la moitié des patients présentant une LAM de novo.

Dans les LAM, les anomalies cytogénétiques peuvent être classées en trois groupes. Le premier groupe représente 10 à 15% des patients, habituellement moins de 60 ans, et comprend des anomalies chromosomiques avec un pronostic favorable dont les plus fréquentes sont représentées par des translocations t(8,21) , t(15,17), t(16,16) ,une inversion du chromosome 16 et des anomalies du 11q23. Les anomalies du deuxième groupe, de

pronostic moins favorable comprennent des monosomies et des translocations et délétions des chromosomes 5 et 7. Le troisième groupe avec un pronostic intermédiaire est un groupe représenté par 50-60% des patients atteints de LAM qui ont des caryotypes normaux et toutes les autres aberrations.

L'étude moléculaire des mutations acquises dans les LAM renforce l'évaluation du pronostic, ainsi les mutations FLT3 sont de très mauvais pronostic : Le gène FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3) est localisé en 13q12. Des mutations du gène FLT3 sont présentes dans 25 à 30 % des cas de LAM. Elles peuvent être de deux types. Dans plus de 80 % des cas (35 à 45 % des LAM à caryotype normal), il s'agit d'une duplication interne en tandem (FLT3-ITD) au niveau des exons 14 et 15 codant pour la région juxta-membranaire du récepteur. Le second type de mutations correspond à des mutations non-sens (FLT3-TKD) (tyrosine kinase domaine) au niveau des codons D835 et I836 de la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase (Renneville et *al.*, 2008).

I.4.6. Traitement :

Le traitement de première ligne des LAM2 reste la chimiothérapie (l'utilisation d'aracytine à fortes doses).

- **Traitement de première ligne :**

Comme dans les autres LAM, les chimiothérapies d'induction reposent essentiellement sur l'association d'une anthracycline et de cytarabine. Les taux de rémission complète sont supérieurs à ceux observés en général dans les LAM, allant de 87 % à 98 %. Bien qu'aucune démonstration formelle n'ait été apportée, il semble que le risque de rechute diminue après l'administration de fortes doses de cytarabine en consolidation, voire dès l'induction. De façon plus claire, il apparaît que ces LAM ne bénéficient dans leur schéma de consolidation ni d'une allogreffe, ni d'une autogreffe en première rémission complète (Byrd et *al.*, 2004).

- **Traitement de la rechute :**

A la rechute, fréquemment plus tardive que dans les autres LAM, les taux de deuxième rémission complète restent satisfaisants (Schlenk et *al.*, 2004).

L'anticorps monoclonal anti-CD33 qui suscite déjà l'intérêt dans la leucémie aigue promyélocytaire, pourrait se révéler intéressant dans les leucémies à CBF (Marcucci et *al.*, 2005).

PARTIE PRATIQUE

Chapitre II : Matériel et méthodes.

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'hématologie de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé En Lutte Contre le Cancer (l'EHS ELCC), Hôpital Frantz Fanon Blida, durant la période de Mars à Juin 2018.

Cette étude avait pour objectif de faire ressortir les caractéristiques de leucémies aiguës myéloblastiques avec maturation (LAM2) et présentant une translocation (8;21)(q22;q22), en utilisant différentes techniques cytogénétiques : caryotype et FISH.

Le protocole qui va suivre tiendra compte de :

- la recherche de la t(8;21)(q22;q22),
- et de la recherche du gène de fusion AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1).

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologiques :

Le matériel biologique utilisé consiste en des ponctions de moelle osseuse (suc médullaire).

II.1.1.1. Echantillonnage :

Une ponction de moelle osseuse a été réalisée chez cinq (05) patients admis à l'Etablissement Hospitalier Spécialisé En Lutte Contre le Cancer (l'EHS ELCC), Hôpital Frantz Fanon Blida, pour une prise en charge d'une LAM2.

II.1.1.2. Prélèvement de l'échantillon : Ponction de la moelle osseuse

Le prélèvement des cellules de la moelle osseuse, se fait à environ deux centimètres au-dessous du creux sternal ou plus rarement au niveau de la crête iliaque. Après désinfection de la peau, le médecin applique un patch anesthésique au niveau de la zone de prélèvement; à l'aide d'un trocart, il pique au niveau de cette zone et aspire une petite quantité de moelle osseuse (environ un ml). Le point de ponction sera comprimé et soigné par pansement. Un premier prélèvement de suc médullaire est étalé sur des lames en verre pour le frottis qui seront examinées sous microscope optique. Le deuxième prélèvement se fait avec une seringue héparinée, transféré dans un tube conique qui contient un milieu de culture Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), et sera rapidement acheminé au laboratoire pour les examens cytogénétiques.

II.1.1. Matériel non biologiques :(Annexe1)

Les cinq (05) patients étudiés sont présentés comme ceci :

- **Patient 1** : est une jeune femme âgée de 33 ans de la wilaya de Blida.
- **Patient 2** : est une femme âgée de 66 ans de la wilaya de Djelfa.
- **Patient 3** : est un homme de 38 ans de la wilaya de Blida.
- **Patient 4** : est un homme âgé de 35 ans de la wilaya de Chleff.
- **Patient 5** : est un jeune homme de 18 ans de la wilaya de Laghouat.

II.2. Méthodes :

Deux techniques ont été développées au cours de cette étude : le caryotype et la FISH.

II.2.1. La culture cellulaire :

Une même culture cellulaire est réalisée pour les deux examens cytogénétiques : le caryotype et la FISH, en respectant certaines conditions à savoir :

- ✓ une mise en culture stérile sous hotte à flux laminaire,
- ✓ la culture doit être réalisée dans des flasques dévissés à 1/4 de tour, positionnés à plat dans un plateau en inox nettoyé à l'alcool,
- ✓ toute centrifugation doit se faire avec tubes fermés.

II.2.1.1. Mise en culture :

- procéder d'abord à une numération cellulaire pour le comptage de cellules nucléées, ensuite une quantité calculée de sang (20 millions de cellules / ml de milieu de culture) est additionnée au RPMI complet sous hôte,
- la durée de la culture cellulaire est de 24 h à 37°C sur un plateau en inox dans une étuve à CO₂,
- réaliser une synchronisation :
 - A 16h le jour même de la culture, pour cela ajouter 100µl de la solution synchro A (Annexe1),

- Ajouter 100 μ l de la solution synchro B le lendemain à 8h,

- remettre à l'étuve à CO₂ pendant 6h, puis procéder à un blocage des cellules en mitose.

II.2.1.2. Blocage des cellules en mitose :

Principe :

Le blocage des cellules en mitose est une étape qui consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division, la Colchicine ou son équivalent synthétique la Colcémide, qui empêche la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique. La mitose est donc bloquée au stade de métaphase (Ford et Hamerton, 1956).

Mode opératoire :

- après 16 h de culture, ajouter 60 μ l de colchicine pour chaque flasque,
- après avoir bien mélangé le contenu des flasques, ces derniers sont remis dans l'étuve à 37°C pendant 20 à 30 minutes.

II.2.1.3. Sortie de culture :

A. Choc hypotonique (dispersion des chromosomes) :

Principe :

Cette étape, indispensable à l'obtention d'un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmiques et nucléaires sont fragilisées ce qui permet l'éclatement des cellules et l'obtention d'une bonne dispersion des chromosomes (Ford et Hamerton, 1956).

Mode opératoire :

- transvaser les flasques dans des tubes coniques de 15 ml (préalablement étiquetés sur le prélèvement : nom, prénom du patient, date de culture), et centrifuger à 1300 tours/min pendant 8 min,
- retirer une certaine quantité de surnageant de telle manière à ne laisser que 2/3 pour 1/3 de culot,

- rajouter progressivement 2 ml de KCl en homogénéisant doucement le culot cellulaire,
- compléter le tube jusqu'à 12 ml de la solution de KCl 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,
- incuber les tubes sans leurs bouchons dans l'étuve sèche à 37°C pendant 25 min.

B. Fixation :

Cette étape a pour but de fixer les mitoses obtenues. Elle nécessite la préparation de la solution Carnoy I (fixateur : 2/3 de méthanol + 1/3 d'acide acétique).

Préfixation :

- rajouter 1 cc de fixateur aux cellules et homogénéiser doucement (les mitoses sont très fragiles à cette étape),
- centrifuger à 1300 tours/min pendant 8 minutes,

➤ **Fixation 1:**

- enlever le surnageant (1/3 culot, 2/3 surnageant), puis rajouter 1cc de fixateur et homogénéiser doucement,
- compléter jusqu'à 8 ml avec le fixateur et homogénéiser doucement puis centrifuger à 1300 tours/min pendant 8 min.

On peut faire jusqu'à 3 fixations afin d'obtenir un culot blanc. Après l'obtention du culot cellulaire clair, on doit le conserver à +4°C avant de procéder aux étalements cellulaires.

II.2.2. L'étalement cellulaire sur lame :

Principe :

L'étalement est une étape cruciale pour la qualité des mitoses et des bandes chromosomiques. Il doit être réalisé sous des conditions de température et d'humidité particulières. Généralement, la lame est étalée dans une pièce à température de 22°C et à 45% d'humidité minimum, dans le but d'avoir des mitoses bien éclatées et des noyaux bien séparés (Tjio et Levan, 1956).

Mode opératoire :

- retirer le surnageant et remettre le culot en suspension (la quantité de carnoy I sera plus au moins importante suivant l'épaisseur du culot),
- identifier les lames avec le nom, prénom du patient et la date du prélèvement,
- homogénéiser le culot délicatement et prélever à l'aide d'une pipette pasteur deux gouttes aux extrémités des lames humidifiées au préalable,
- surveiller l'étalement par le phénomène d'irisation de la goutte qui diffuse sur la lame, puis déposer la lame sur un papier sec et laisser sécher à température ambiante.

Remarque :

- si le culot est trop dilué; on aura un étalement pauvre, dans ce cas il faut le concentrer en enlevant l'excès du surnageant,
- si le culot est trop dense on aura des mitoses chevauchées ce qui empêche de faire l'analyse du caryotype, dans ce cas il faut le diluer avec le fixateur.

II.2.3. Protocole de cytogénétique conventionnelle caryotype (Bandes R) :

La technique de bandes R :

La technique de bandes R fait intervenir un prétraitement par la chaleur avant la coloration au GIEMSA et montre une distribution de bandes inverse à celle des bandes G.

Ce sont des régions riches en G et C et qui présente une réplication précoce.

A. Réhydratation :

Après l'étalement de la culture cellulaire sur lame, laisser sécher 45min avant de la réhydrater à l'eau distillée dans un bac à température ambiante pendant 5 min.

B. Dénaturation thermique :

La dénaturation thermique est effectuée dans un tampon phosphate NaH_2PO_4 à 87°C pendant 12 minutes 10 secondes pour la première série, et 12 minutes 15 secondes pour la deuxième série.

C. Arrêt de la dénaturation :

Par refroidissement en mettant les lames dénaturées dans un bac d'eau distillée à 18°C pendant 5 min.

D. Coloration :

Procéder à la préparation du colorant dans un bac avec 4cc de Giemsa, 4 cc de tampon de coloration ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$) pour améliorer la coloration, complété avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml, mettre 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. Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc les techniques de marquage particulières : le caryotype en bande R (Reverses) 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.

D. Lecture du caryotype :

Après avoir séché les lames, rajouter de l'huile d'immersion avant la lecture sous microscope. Il est nécessaire d'obtenir au minimum 20 mitoses pour permettre le comptage et l'identification des chromosomes. Enfin, les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante, leur indice centromérique, et les bandes.

II.2.4. Protocole de la cytogénétique moléculaire FISH :

Protocole conforme au protocole Cytocell aquarius company.

Principe :

La FISH est une technique qui utilise des sondes d'ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers, ou à des séquences spécifiques. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et le tampon 2SSC (solution saline) pour dénaturer la double hélice, la rendant simple brin. L'ADN cible peut alors s'hybrider avec une sonde ADN complémentaire simple

brin, marquées par un fluorochrome. Après hybridation, l'ADN non hybridé de la sonde est éliminé par une série de lavages stringents. L'ADN est ensuite contre-coloré par le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). La sonde hybridée sur l'ADN cible sera visualisée grâce à un microscope à fluorescence (figure 10).

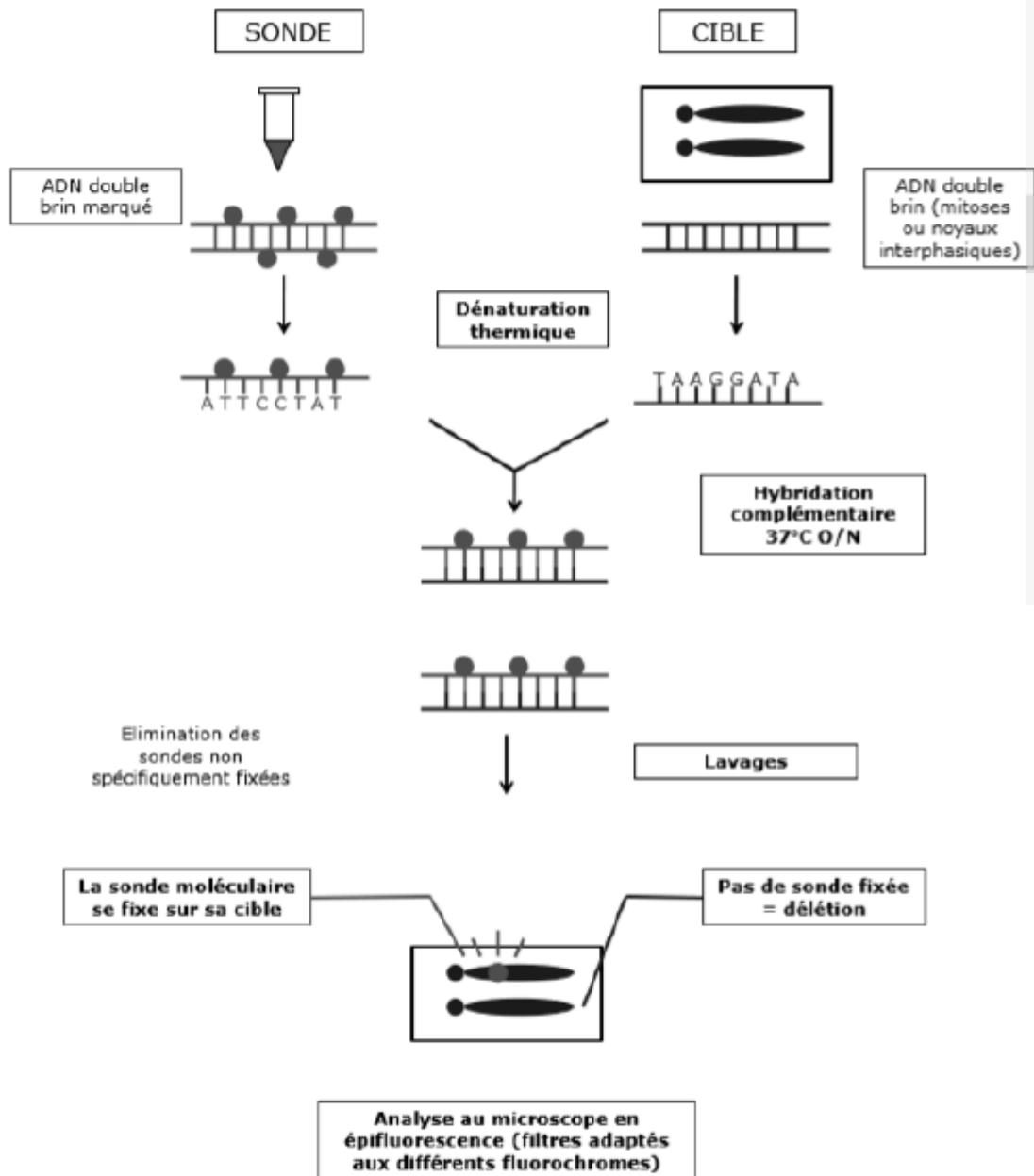


Figure 10: principe de la technique d'hybridation in situ en fluorescence avec des sondes froides (FISH) (Chabbert, 2010).

Mode opératoire :

Toutes les étapes de la FISH sont réalisées à l'abri de la lumière et avec précaution (Annexe2).

A. Préparation des échantillons :

- concernant la culture cellulaire et la sortie de culture les étapes sont identiques à celles déjà citées pour la réalisation du caryotype (paragraphe II.2.1.2),
- préparer des étalements cellulaires avec les échantillons (culture cellulaire) séchés à l'air.

B. Prétraitement des lames :

- délimiter la région d'intérêt, face opposée à l'étalement cellulaire par un crayon diamant,
- plonger les lames dans le tampon 2SSC pendant 2 minutes,
- déshydrater les lames dans des bains d'éthanol (70%, 85%, 100%) respectivement, 1 minute pour chaque bain,
- laisser sécher à température ambiante.

C. Dénaturation et hybridation de l'ADN :

- retirer la sonde AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) dual colore dual fusion (Cytocell) du congélateur à -20°C, et la préchauffer à température ambiante,
- bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois,
- préchauffer la sonde et la lame à échantillon sur une plaque chauffante à 37°C pendant 5 minutes,
- déposer 10 µl de la sonde sur les zones limitées où sont étalés les chromosomes en métaphase,
- couvrir les dépôts des sondes par une lamelle qui est ensuite scellée sur la lame avec de la colle rubber ciment,

- laisser sécher,
- dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon, en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C pendant 2 minutes dans un Thermobrite programmé,
- l'hybridation des sondes avec leurs séquences complémentaires au niveau de l'ADN est effectuée à 37°C (à l'abri de la lumière) dans le thermobrite pendant une nuit.

D. Lavages :

- enlever le rubber ciment,
- afin d'éliminer l'ADN non hybridé et les traces de rubber ciment, les lames sont lavées dans une série de lavage stringents :
- immerger les lames dans du détergent 0,1% IGEPAL pendant 2 minutes,
- enlever les lamelles,
- égoutter les lames et les immerger dans du détergent 0.3% IGEPAL à 72°C pendant 2 minutes, ensuite 0,05% Tween (pH7) à température ambiante, sans agitation pendant 30 secondes,
- passage des lames dans des bains d'alcool successifs (70%, 85%, 100%), 1 minute 30 secondes pour chaque bain,
- sécher les lames à température ambiante, et les garder à l'abri de la lumière.

E. Contre coloration (DAPI) :

- appliquer 10 µl de DAPI sur la lame au niveau de la préparation cellulaire,
- recouvrir les lames de lamelles, et enlever les bulles d'air en appliquant une légère pression sur la lamelle,
- les lames préparées sont conservées à + 4° C (dans des boites à FISH).

F. Analyse microscopique :

La lecture se fait grâce à un microscope à épi fluorescence. 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. L'huile d'immersion doit être adaptée à une utilisation en microscopie à fluorescence et formulée pour une auto-fluorescence faible. Pour chaque zone de lecture, nous observons entre 20 à 30 mitoses (tout dépend de la richesse en cellules) et de 200 à 500 noyaux.

Chapitre III :

Résultats et

discussion.

Les prélèvements des cinq (05) patients ont été réalisés durant la période allant du 12/10/2015 au 18/09/2016 (culots cellulaires conservés à -20°C), et sur lesquels nous avons pratiqué un caryotype et une FISH. L'exploitation de ces résultats a conclu que les cinq patients sont atteints d'une LAM 2 dont la cytogénétique révèle une t(8;21)(q22;q22).

III.1. Résultats et discussion des hémogrammes :

Les prélèvements sanguins des cinq (05) patients, dont deux (02) femmes et trois (03) hommes ont fait l'objet d'un hémogramme, à savoir : le dosage des leucocytes, de l'hémoglobine ainsi que les plaquettes. Les résultats obtenus figurent tableau VI.

Patients	Globules blancs / μ l	Hémoglobine g/dl	Plaquettes / μ l
1	11100	11	137000
2	73900	7,1	25000
3	24680	8	112000
4	20710	7,2	16000
5	38740	7,4	29000
Normes	4000 – 10 000	14- 18 : Homme 12 - 16 : Femme	150 000 - 400 000

Tableau VI : Résultats des hémogrammes des patients étudiés.

Les résultats des hémogrammes de l'ensemble des patients révèlent pour chaque cas, une hyperleucocytose, une anémie et une thrombopénie.

- **Concernant l'hyperleucocytose :**

On parle d'hyperleucocytose chez l'adulte, quand le nombre de globules blanc est >10 000/ μ l de sang.

Selon Beck (2009), l'hyperleucocytose est l'augmentation des leucocytes sanguins par rapport à des valeurs normales qui varient avec l'âge du patient.

Elle peut être réactionnelle, bénigne (ex : hyperleucocytose avec polynucléose neutrophile en réaction à une infection bactérienne) ou au contraire maligne (hyperleucocytose avec blastes circulants dans le cadre d'une leucémie aiguë).

Ceci est confirmé par Francia et al en 2013, qui expliquent que les hyperleucocytoses résultent soit d'une augmentation des besoins par exemple en cas d'infection (hyperleucocytose réactionnelle), soit d'une hémopathie maligne.

Notons que la leucocytose constitue un facteur pronostique majeur dans le cas d'une leucémie aigue. Le pronostic est plus favorable quand la leucocytose est inférieure à 100 000/ μ l (Preudhomme et al., 2004), c'est d'ailleurs le cas des cinq (05) patients étudiés.

- **Concernant l'anémie :**

Les cinq patients présentent un taux d'hémoglobine inférieur à la norme, reflétant une anémie.

D'après Imber (2002), l'anémie est expliquée par l'insuffisance médullaire et peut être aggravée par les hémorragies thrombopéniques.

Il est connu que les anémies peuvent varier, allant de l'anémie discrète, à l'anémie sévère et passant par l'anémie modérée.

Dans notre cas, le patient 1 présente une anémie discrète, le patient 3 quant à lui présente une anémie modérée. Par contre, les patients 2, 4 et 5 présentent une anémie sévère.

Selon la même étude réalisée par Imber en 2002, une anémie d'importance variable, est présente dans 90 à 95% des cas de leucémie aigue myéloblastique, généralement de type normochrome normocytaire arégénérative.

- **Concernant la thrombopénie :**

Les résultats du taux des plaquettes des cinq (05) patients étudiés (Tableau IV), montrent pour l'ensemble des patients des taux de plaquettes inférieurs à la norme qui est de 150 000 à 400 000/ μ l.

Selon Provan et al (2010), la thrombopénie est classiquement définie comme un chiffre de plaquettes inférieur à 150 000/ μ l.

Selon Ebbo et al (2015), la cause d'une thrombopénie est due probablement à une aplasie médullaire d'origine néoplasique, après avoir éliminé l'origine auto immune et iatrogène (post-thérapeutique).

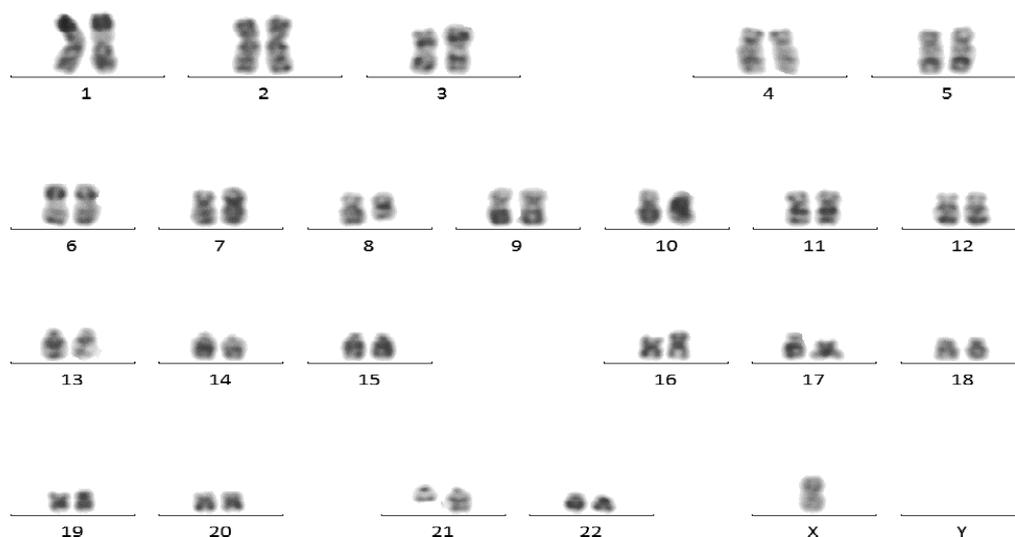
Nous pouvons conclure suivant les résultats des hémogrammes des cinq (05) patients étudiés, que l'origine néoplasique est fortement évoquée devant la bicytopénie (thrombopénie et anémie) et l'hyperleucocytose, entre autre la leucémie aigue myéloblastique.

III.2. Examen de la cytogénétique conventionnelle (caryotype) :

La présence d'anomalies récurrentes est fréquente dans la leucémie aigue myéloblastique. Ces anomalies sont indispensables pour déterminer le sous-type de LAM en fonction de la classification OMS (Vardiman, 2008 ;Arber et al., 2016).

Nous avons réalisé un caryotype (Bande R) qui a permis d'identifier chez l'ensemble des patients la présence de la t(8;21)(q22;q22) sur les vingt (20) mitoses analysées par patient (figures 11, 12, 13, 14 et 15) ; celle-ci correspond à une translocation réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 8 (en q22) et 21 (en q22). Cette translocation a été décrite pour la première fois en 1973 (Rowley, 1973). Elle est de bon pronostic (Rollig, 2011).

Ci-dessous les caryotypes et FISH des cinq patients.



Etablissement Hospitalier Spécialisé EHS ELCC CAC Blida
Plateau de cytogenétique Hématologique .
ARB N : Caryotype: t(8;21)(q22;q22)

Figure 11: Le caryotype (bandes R) du patient 1 : 45 X, -X, t(8;21) (q22;q22).

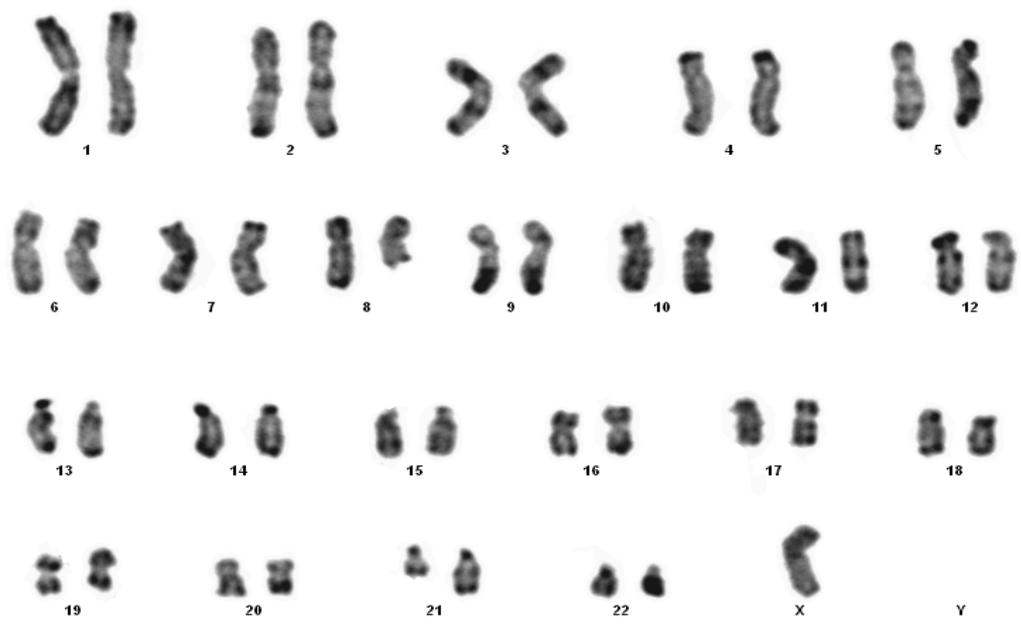
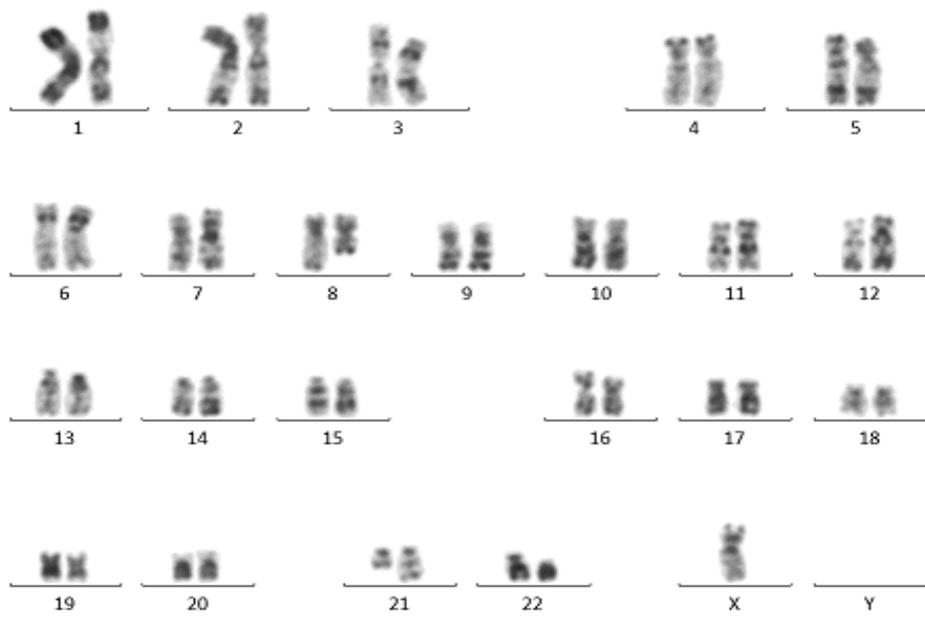


Figure 12 : Le caryotype (bandes R) du patient 2 : 45 X, -X, t(8;21)(q22;q22).

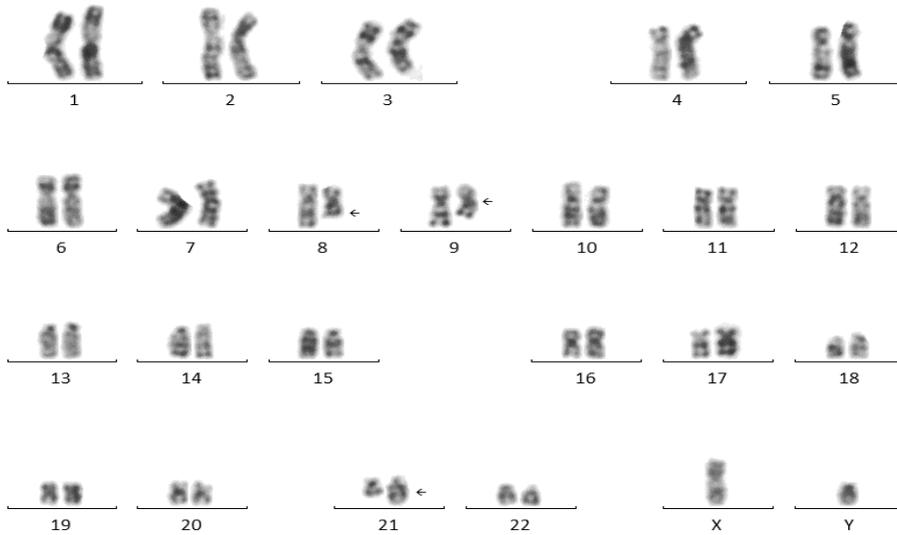


Etablissement Hospitalier Spécialisé EHS ELCC CAC Blida

Plateau de cytogénétique Hématologique . MCH. F.

Caryotype : t(8;21)(q22;q22)

Figure 13 : Le caryotype (bandes R) du patient 3: 45 X,-Y, t(8;21)(q22;q22).



Etablissement Hospitalier Spécialisé EHS ELCC CAC Blida
 Plateau de cytogénétique Hématologique . MED.A.
 Caryotype: t(8;21)(q22;q22)

Figure 12: Le caryotype (bandes R) du patient 4 : 46 XY, t(8;21)(q22;q22),del 9q12q13.

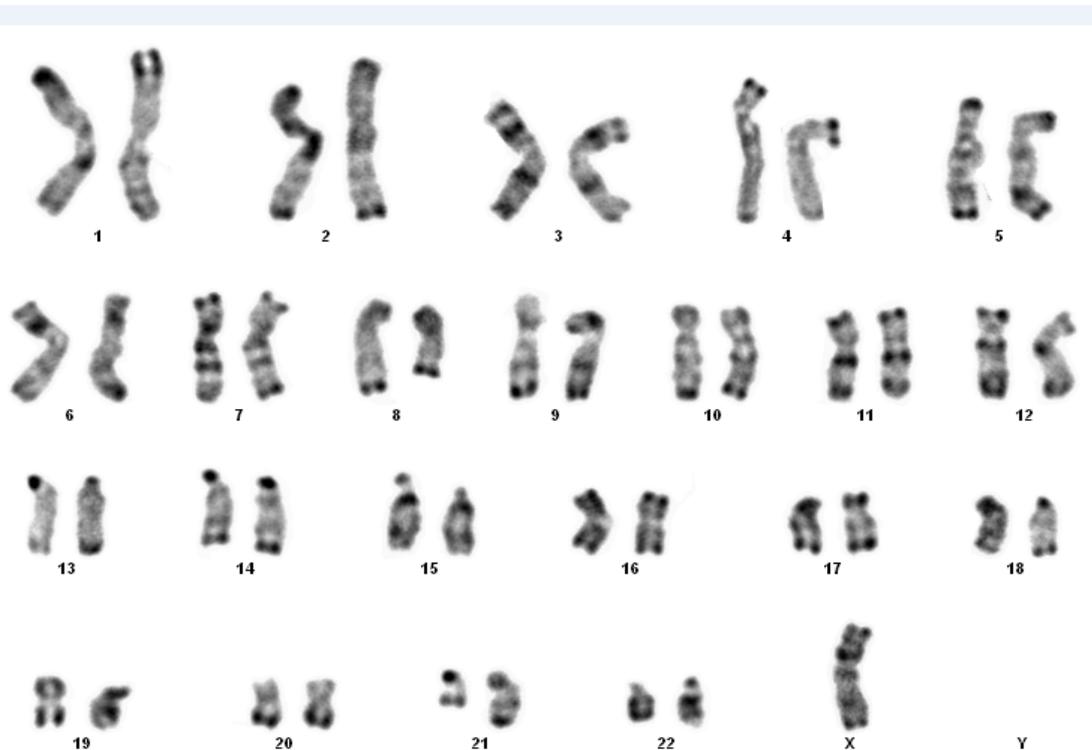


Figure 13: Le caryotype (bandes R) du patient 5: 45X, -Y, t(8;21) (q22;q22).

Les résultats de la cytogénétique conventionnelle montrent en plus que les cinq patients présentent des anomalies chromosomiques additionnelles, dont quatre (04) patients sur cinq (05) ont une délétion du chromosome sexuel (-X pour les patientes 1 et 2 et -Y pour les patients 3 et 5). Par contre le patient 4 présente une délétion du bras long du chromosome 9 (-9q).

Les LAM avec t(8;21) présentent également des caractéristiques cytogénétiques particulières puisque des anomalies chromosomiques additionnelles sont observées dans 70 à 80% des cas. Elles sont essentiellement représentées par la perte d'un chromosome sexuel (perte du chromosome Y chez 50% des hommes, perte d'un chromosome X chez 30 à 40% des femmes), la présence d'une délétion du bras long du chromosome 9 (del (9q), 15 à 20% des cas) (Sakurai et al., 1974 ; Schoch et al., 1996 ; Marucci et al., 2005 ; Appelbaum et al., 2006).

La présence d'anomalie(s) additionnelles ou secondaire(s) ne modifie pas le bon pronostic de cette translocation pour certains auteurs (Luquet et al, 2016).

D'autres auteurs trouvent à l'inverse que la perte du chromosome Y et la délétion du bras long du chromosome 9 (9q) sont associées à un mauvais pronostic (Schoch et al., 1996 ; Schlenk et al., 2004).

III.3. Examen de la cytogénétique moléculaire (FISH) :

Les résultats de la FISH de l'ensemble des patients avec la sonde AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) dual colore dual fusion (Cytocell) (figures 16, 17, 18, 19 et 20) a montré la présence du signal AML1-ETO sur 100% des noyaux et des mitoses.

La sonde couvrant le gène AML1 sur le chromosome 8 est marquée en vert, celle couvrant le gène ETO sur le chromosome 21 est marquée en rouge. On observe un signal vert sur le chromosome 8, un signal rouge sur le chromosome 21 et un signal de fusion en jaune sur les deux dérivés 8 et 21.

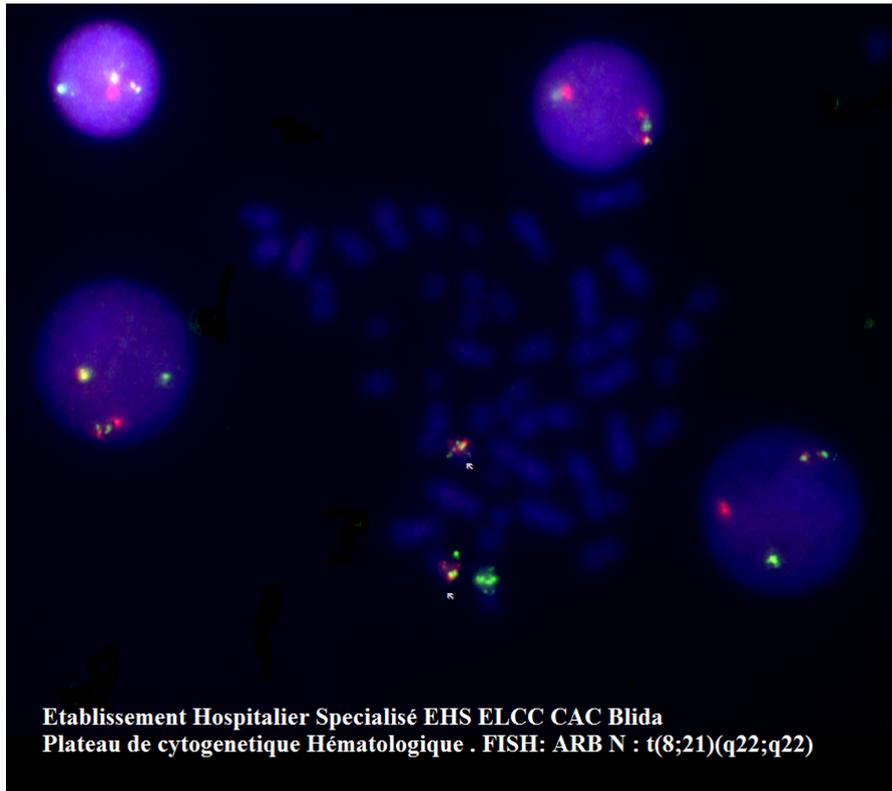


Figure 14: Résultat de la FISH du patient 1.

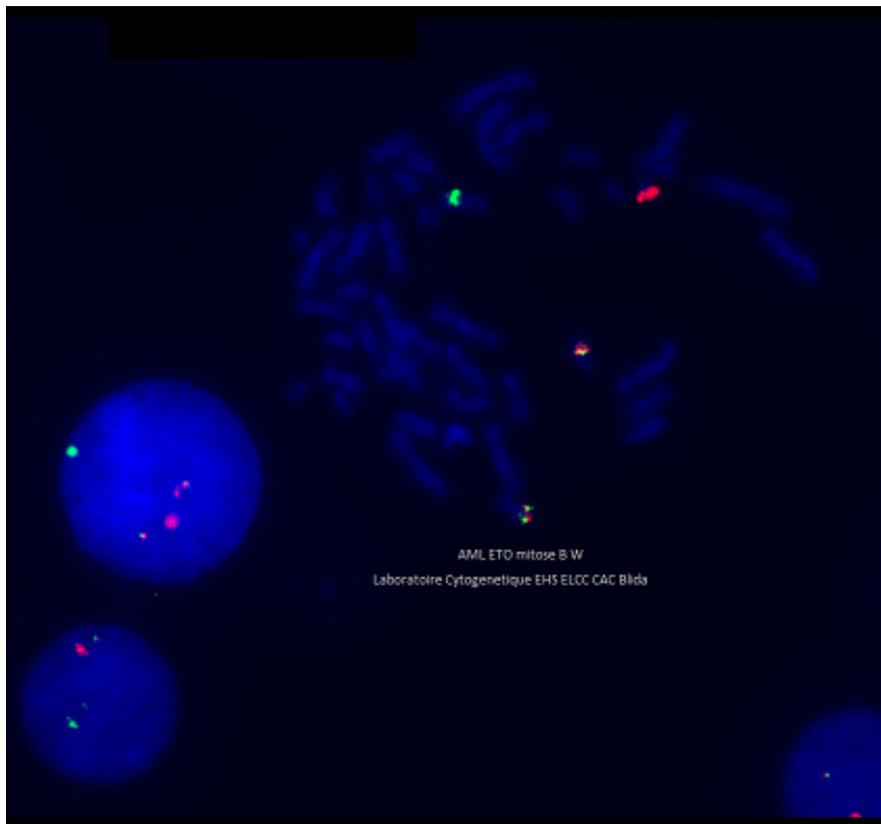


Figure 15: Résultat de la FISH du patient 2.

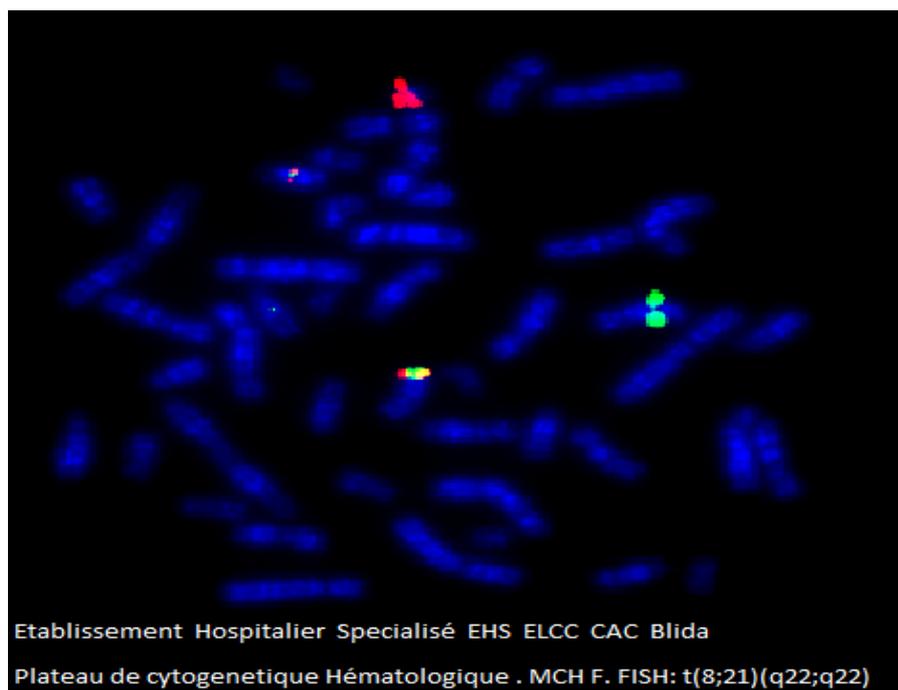


Figure 16: Résultat de la FISH du patient 3.

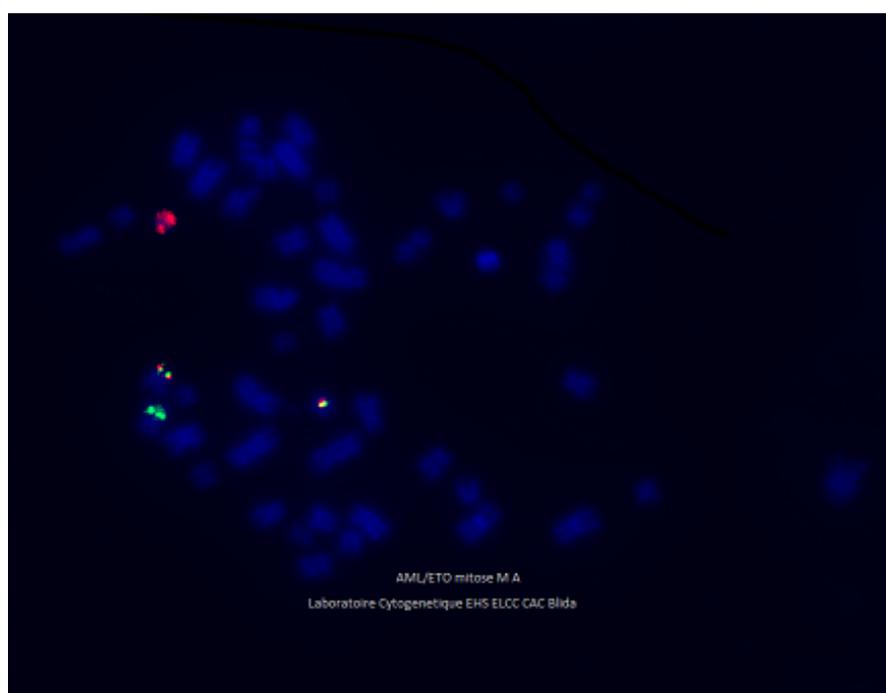


Figure 17: Résultat de la FISH du patient 4.

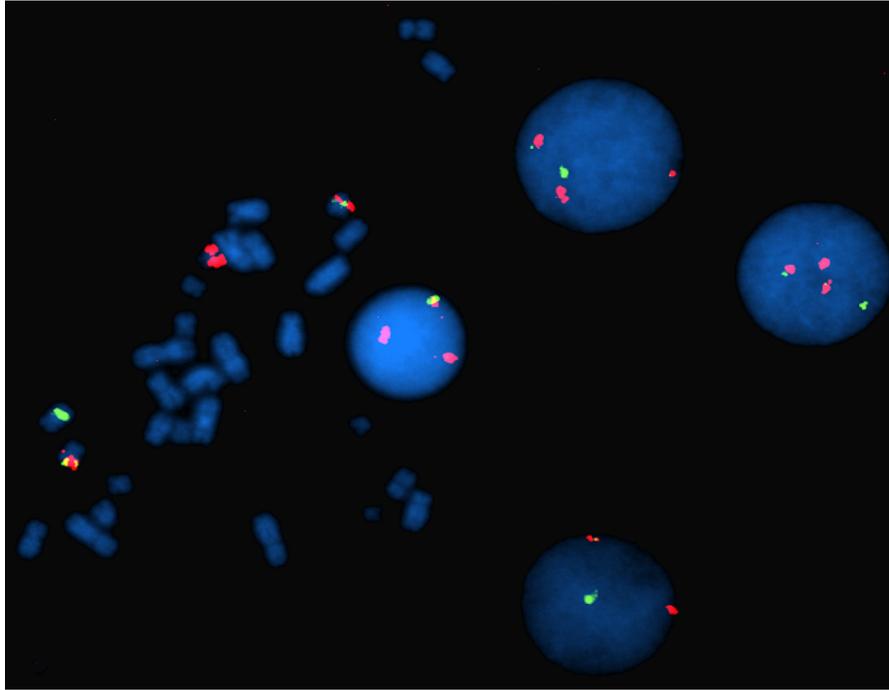


Figure 18: Résultat de la FISH du patient 5.

La FISH est un examen ciblé qui ne permet de visualiser que l'anomalie ou les anomalies que l'on recherche.

Elle est un complément précieux au caryotype lorsque celui-ci ne peut conclure en particulier en cas de micro délétions ou d'insertions ou d'échec de caryotype.

C'est par ailleurs un examen plus fiable du fait de qu'il n'exige pas une qualité de noyaux ou de mitoses et de par sa grande sensibilité.

Conclusion

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons analysé les caractéristiques hématologiques (hémogramme) et cytogénétiques (caryotype et FISH) de cinq (05) patients atteints de LAM2.

Au terme de cette étude, il ressort clairement que :

- concernant l'hémogramme : les cinq patients ont présenté une hyperleucocytose, une anémie et une thrombopénie ; ceci peut être expliqué par le syndrome tumoral et l'insuffisance médullaire observés dans cette pathologie.
- concernant le caryotype : la réalisation du caryotype (bandes R) a permis d'identifier chez les patients étudiés une t (8 ; 21) (q22 ; q22) sur les vingt (20) mitoses analysées par patient. Ces patients présentent également, des anomalies chromosomiques additionnelles telles que la perte du chromosome sexuel X ou Y, ainsi que la délétion partielle du bras long du chromosome 9.
- concernant la FISH : l'examen de la FISH a montré la présence du signal AML1-ETO sur 100% des noyaux et des mitoses des cinq (05) patients étudiés.

A l'issue de ces résultats, nous pouvons conclure que les cinq (05) patients étudiés sont atteints d'une LAM2 avec t(8;21) connue de bon pronostic.

- Il serait intéressant d'étudier un nombre plus important de malades, pour mieux préciser l'impact pronostique de cette anomalie cytogénétique dans notre contexte.

Références bibliographiques :

A

- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Altounian . Lucille (2014) Identification du partenaire de *RUNX1* dans une leucémie aiguë myéloïde avec translocation t(8;21)(q22;q22) atypique n'impliquant pas le gène *RUNX1T1* par utilisation de techniques cytogénétiques et de biologie moléculaire. Université de Lorraine- France- Diplôme d'études spécialisées de biologie médicale. p154.
- Anonyme. (2014) <http://www.miloo.org/lesson/leucemies-aigues/f04-08-97822947395071/>
- Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107:3481-5.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391– 2405.

B

- Benakli M et al. (2009). Approches épidémiologiques des leucémies aiguës myéloïdes en Algérie, travail coopérative et multicentrique sur 1877 cas (1995-2005). *Revue Algérienne d'hématologie*, sous l'égide de la société Algérienne d'hématologie et de transfusion sanguine.

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33:451-8.
- Berger Roland Cytogénétique humaine. Ouvrage : Principes de génétique humaine. Chapitre 2 Editeurs des sciences et des arts 1998.
- Byrd JC, Ruppert AS, Mrozek K et al. Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461. *J Clin Oncol* 2004; 22:1087-94.

C

- Cavazzana-Calvo, M., Lagresle, C., Andre-Schmutz, I., and Hacein-Bey-Abina, S. (2004). [The bone marrow: a reserve of stem cells able to repair various tissues?]. *Annales de biologie clinique* 62, 131-138.
- CHABBERT Victor, (2010), Génétique médicale, techniques d'étude en cytogénétique, p16.

D

- Dadoune J.P., 1990. Histologie. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- Delabesse E., Asnafi V., Macintyre E., 2003. Application à l'hématologie maligne des techniques de biologie moléculaire. *Revue générale*. 335–352.
- Ebbo M, Grados A, Bernit E, Harlé JR, Schleinitz N. Comment j'explore une thrombopénie de l'adulte ? *mt* 2015 ; 21 (2) : 124-9 doi:10.1684/met.2015.0494
- Erickson P, Gao J, Chang KS, et al. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 1992; 80:1825-31.

F

- Ford CE, Hamerton JL. A colchicine, hypotonic citrate, Squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain technol.* 1956 ; 31 : 247

G

- Giguere A. Caracterisation clinique et moleculaire de nouvelles translocations chromosomiques ciblant le gene RUNX1 dans les leucemies aigues de l'adulte. Universite de Montreal; 2012.
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002 Sep1;100(5):1532–42.

I

- Imbert M, Place du biologiste dans le diagnostic et le suivi des leucémies aigues. *Revue Française des Laboratoires*, juin 2002, N ° 344
- Irons, R. D., and Stillman, W. S. (1996). The process of leukemogenesis. *Environmental health perspectives 104 Suppl 6*, 1239-1246.

J

- Jouault H. place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi de LA. *Rev. Fr. Lab.* 2002; 344: 25-29. Sociétés, Volume 10, Issue 1, 2002, Pages 97-98.

K

- Kita K, Nakase K, Miwa H et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent

expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood* 1992;80:470-7.

- Kurokawa M, Hirai H. Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer science*. 2003;94(10):841–6.

L

- Lacombe C. Les cellules souches hématopoïétiques humaines normales: régulation et méthodes d'exploitation D1 – *Hématologie* 2005 – 2006.
- Lam K, Zhang D--- E. RUNX1 and RUNX1--- ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2012;17:1120.

M

- Marcucci G, Mrozek K, Ruppert AS et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005;23:5705-17.
- Mbensa L, Ngiyulu R, Binda P, Lukuni L. La leucémie aiguë de l'enfant : indice et manifestation clinique en milieu tropical. *Méd Af Noire* ; 1993 ; 40(8/9) :555-6.
- McKenzie SB. Advances in understanding the biology and genetics of acute myelocytic leukemia. *Clin Lab Sci* 2005 ; 18 : 28-37.
- Mrozek K, Prior TW, Edwards C, et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2001;19:2482-92.

O

- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996;84:321-30.

P

- Prebet T., Etienne A., Vey N. Prise en charge thérapeutique des leucémies aiguës myéloïdes. *EMC - Hématologie* 2012;7(1):1-17 [Article 13-018-G-50].
- Preuhomme C, Leroy H, De Botton S (2004) Facteurs biologiques du pronostic des leucémies aiguës myéloïdes. *Hématologie* 10(1):59–67
- Provan D, Stasi R, Newland A, *et al.* International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010 ; 115 : 168-86.

R

- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, *et al.* Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008 ; 22 : 915-31.
- Rollig C, Bornhauser M, Thiede C, *et al.* Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol* 2011 ; 29 : 2758-65
- Romana S, Malan V Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention. *Archives de Pédiatrie*, Volume 19, Issue 4, April 2012, Pages 437-442
- Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 1973;16:109-112.

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

S

- Saitoh Y and Laemmli UK, Metaphase chromosome structure: Bands arise from a differential folding path of the highly A-trichscaffold, 609-622, 1994
- Schlenk RF, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004;22:3741-50.
- Schoch C, Haase D, Haferlach T, et al. Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia* 1996;10:1288-95.
- Sakurai M, Oshimura M, Kakati S, Sandberg AA. Letter: 8-21 translocation and missing sex chromosomes in acute leukaemia. *Lancet* 1974;2:227-8.
- Swerdlow S., Campo E, Harris N., Jaffe E., Pileri S., Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.

T

- Tjio HJ, Levan A. The chromosome numbers of man *Hereditas*. 1956;42:1-6
- Tumburini et Varet (2012). *Le livre de l'interne en hématologie*, 3^{ème} édition, p187.

V

- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.

W

- Wang Q, Stacy T, Miller JD, et al. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. Cell 1996;87:697-708.

Annexes

Annexe 1 :

1) Verreries et autres :

- lames de microscope,
- lamelles 24×24mm,
- bac en porcelaine avec couvercle,
- pipette pasteur,
- micropipette,
- tubes coniques de 15ml,
- flasques,
- bécher,
- seringue de 10 ml,
- crayon diamant,
- chronomètre,
- l'humidificateur,
- colle rubber ciment,
- huile à immersion pour microscope à fluorescence.

2) Appareillages :

- Centrifugeuse,
- bain marie à 90°C,

- étuve à CO₂,
- hotte à flux laminaire,
- étuve sèche,
- microscope avec logiciel (Méta System),
- Thermobrite,
- Plaque chauffante.

3) Réactifs et solutions :

- RPMI complet (RPMI 1640+ sérum de veau + héparine+ glutamine+ pénicilline streptomycine),
- colchicine ou colcémide 10 mg/ml,
- fixateur (Carnoy I) 2/3 méthanol+ 1/3 acide acétique,
- KCl (0.065 M : 2.8g dans 500ml d'eau distillé),
- tampon de dénaturation (NaH₂PO₄),
- tampon de coloration (Na₂HPO₄ + 12H₂O),
- Giemsa,
- eau distillée stérile,
- tampon 2SSC,
- tween-20,
- éthanol. HCL pepsine,
- formaldéhyde,
- 0,1 et 0,3détergent IGEPAL,
- DAPI antifading (ES: 0.125ug/ml DAPI (4.6-diamidino-2-phenylindole),
- les sondes,

- synchro test solution A et synchro test solution B (FRDU + Thymidine).



Hotte chimique



Bain marie



Thermobrite



Centrifugeuse



Etuve sèche



Etuve à CO2



Bains d'alcool



Colorant Giemsa R



RPMI



DAPI



Huile à immersion



Etagement cellulaire



Microscope optique avec logiciel de caryotypage

Annexe 2 :

➤ Avertissement et précautions :

- le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants, des lunettes, une blouse, une surblouse et manipuler sous hotte. Après élimination, rincer abondamment à l'eau,
- 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,
- toute matière dangereuse doit être éliminée selon la réglementation mise en vigueur dans notre institution pour l'élimination des déchets dangereux,
- veuillez toujours s'assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire.