



UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO / BURKINA FASO



INSTITUT DE DEVELOPPEMENT RURAL



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
SOURO SANOU (CHUSS) DE
BOBO-DIOULASSO

Année académique 2008-2009

MEMOIRE

Présenté par :
SALIFO SAWADOGO

Pour l'obtention du :
**Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie Appliquée et
Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)**

Titre :

**Analyse clinique, hématologique, cytogénétique
et moléculaire de quatre variants complexes de
leucémie myéloïde chronique**

Soutenu le 10 Février 2011

Devant le Jury

Directeur de mémoire

Professeur Georges Anicet Ouédraogo

Président

Professeur Adrien Marie Gaston Bélem

Membre :

Professeur Georges Anicet Ouédraogo

Dr Zakaria Bengaly

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes frères TASSÉRE et BOUKARÉ.

Nous sommes tous éprouvés, mais vous encore plus que nous.

Ce travail est le signe d'un combat pour la recherche de la Liberté.

C'est un hymne à la gloire d'Allah.

La recherche du savoir est une obligation pour tout musulman et musulmane du berceau à la tombe .

REMERCIEMENTS

Au professeur OUEDRAOGO Georges Anicet :

Professeur titulaire de biochimie des universités, co-responsable du DEA en biologie Appliquée et modélisation des systèmes biologiques. Merci de m'avoir ramené à la vie et permis d'apprendre et d'honorer Dieu. Qu'Allah vous récompense

Au Professeur BELEM Adrien Marie Gaston :

Professeur titulaire en parasitologie des universités. Responsable du DEA en biologie appliquée et modélisation des systèmes biologiques. Président de notre Jury. C'est un honneur pour nous que vous acceptiez de juger ce travail. Soyez en remercié.

Au Docteur BENGALY Zakaria :

Parasitologue et épidémiologiste. Chercheur au Centre International de recherche- Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES). Nous sommes flatté de faire votre connaissance et content de vous avoir comme membre de notre jury.

A madame VANNIER Brigitte :

Maitre de conférences de biologie cellulaire à l'université de Poitiers (Faculté des sciences fondamentales et appliquées). Vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire et vous nous avez permis d'accéder au Laboratoire d'hématologie du CHU de Poitiers. Toute notre gratitude.

A tous les enseignants du DEA :

Merci de nous avoir permis d'apprendre.

Tables des matières

Liste des abréviations	3
Listes des tableaux et figures	4
Résumé.....	5
I-INTRODUCTION.....	6
II- OBJECTIFS	15
2-1 -OBJECTIF GENERAL.....	15
2-2-OBJECTIFS SPECIFIQUES	15
III-MATERIELS ET METHODES	16
3-1-REALISATION DE L'HEMOGRAMME.	16
3-1-1-Matériel.....	16
3-1-2 Réactifs.....	16
3-2-DETERMINATION DU CARYOTYPE OU CARYOGRAMME:.....	16
3-2-1.Le matériel	16
3-2-2.Les réactifs	17
3-2-3 Etapes de la technique	17
a- Enrichissement en leucocytes	17
b-Mise en culture.....	18
c-Ajuster la concentration cellulaire	18
3-2-4-Culture	18
a-Synchronisation.....	18
b-Contrôle de qualité interne.....	19
3-2-5-Recueil des métaphases	19
3-2-6-Etalement et dénaturation bandes R(RHG)	22
3-3- HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE OU HYBRIDATION FLUORESCENTE IN SITU (FISH)	25
3-3-1.Matériel	25
3-3-2.Réactifs.....	25
3-3-3.Etapes de la technique	26
a-Préparation des lames.....	26
b-Dénaturation de la sonde.....	27
c-Hybridation	27
d-Lavage post-hybridation	28
e-Contre -coloration et conservation	28
3-4-POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	28
3-4-1 Extraction des ARN totaux	28
a-Principe	28
b-Matériels	29
c-Méthodes	29
3-4-2 La rétrotranscription.....	32
3-4-3 La PCR proprement dite.....	33
a-Matériels.....	33

b-Méthode	33
3-5- LES PATIENTS	35
3-5-1-Evaluation avant et durant le traitement	36
3-5-2-Critères de réponse(3)	36
3-5-3-Observance du traitement	37
3-5-4-Score de Sokal. (4).....	37
3-6-TYPE D'ETUDE.....	37
3-7- TECHNIQUES DE COLLECTE.....	37
3-8- ECHANTILLONNAGE.	37
3-8-1-Population cible	38
3-8-2-Taille de l'échantillon	38
3-8-3-Critère d'inclusion	38
3-8-4-Critère d'exclusion.....	38
3-8-5-Limites de l'étude.	38
3-8-6-Consentement.....	38
3-8-7-L'éthique.	38
IV-LES RESULTATS	39
4-1 PATIENT N° 1	40
4-1-1-Hémogramme au diagnostic	40
4-1-2-Evolution clinique et hématologique	40
4-1-3-Evolution du caryotype.....	41
4-2 PATIENT N° 2	42
4-2-1-Hémogramme au diagnostic	42
4-2-2-Evolution clinique et hématologique	42
4-2-3-Evolution du caryotype	42
4-3 PATIENT N° 3	43
4-3-1-Hémogramme au diagnostic	43
4-3-2- Evolution clinique et hématologique	43
4-3-3-Evolution du caryotype.....	44
4-3-4-FISH.....	44
4-4 PATIENT N° 4	45
4-4-1-Hémogramme au diagnostic	45
4-4-2-Evolution clinique et hématologique.	45
4-4-3-Evolution du caryotype	45
4-4-4-FISH.....	46
V- DISCUSSION.....	46
VI- CONCLUSION.....	50
VII-BIBLIOGRAPHIE	51
VIII-ANNEXE.....	53

Liste des abréviations

ABL :	Abelson
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
BCR :	Breakpoint Cluster Région
c ADN :	ADN Complémentaire
CML :	Chronic Myeloid Leukemia
CO₂ :	Dioxyde de Carbone
DAPI :	4',6'-Diamidino-2-Phénylindole (molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN)
DMSO	Diméthyl sulfoxide
dNTP	Désoxyribonucléotide Triphosphate
FISH:	Fluorescence In Situ Hybridization (Hybridation In Situ par Fluorescence)
FITC :	Fluorescein Isothiocyanate
GR :	Globule Rouge
H₂O :	Eau
Hb :	Hémoglobine
HCl :	Acide Chlorhydrique
Hte :	Hématocrite
IL2 :	Interleukine2
KCl :	Chlorure de Potassium
LMC :	Leucémie Myéloïde Chronique
MgCl₂	chlorure de magnésium
NP40 :	Nonyl Phénoxy polyéthoxy ethanol 40
PBD :	Phosphate Buffered Detergent (M NaH ₂ PO ₄ , M Na ₂ HPO ₄ , (W/V) Nonadet P40)
Ph1 :	Chromosome Philadelphie
PHA :	Phytohémagglutinine
PNB :	Polynucléaire Basophile
PNE :	Polynucléaire Eosinophile
PNN :	Polynucléaire Neutrophile
RT-PCR :	Real Time Polymerase Chain Reaction Ou RQ-PCR (Real Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR :	Reverse Transcriptase Polymérase Chain Réaction
SSC (Na₃C₆H₅O₇) :	Salt Sodium Citrate
Taq polymérase :	ADN polymérase extrait de <i>Thermus aquaticus</i>

Listes des tableaux et figures

Listes des figures

Figure 1: Aspect du frottis sanguin, coloré au May Grunwald Giemsa.....	7
Figure 2: Aspect du frottis médullaire au faible grossissement (en haut à gauche), moyen grossissement (en haut à droite), et au fort grossissement (en bas)	8
Figure 3: Le Caryotype a la Phase chronique avec le chromosome Philadelphie (chromosome 22Court).....	9
Figure 4: Mécanismes de formation classique du chromosome Philadelphie (chromosome 22 court).....	10
Figure 5: Lieux de cassures classiques et mécanisme de formation du gène BCR-ABL.....	11
Figure 6: Mécanisme de formation du gène BCR- ABL dans les translocations variantes simples et aberrantes.....	13
Figure 7: Mécanisme de formation du gène BCR-ABL dans les translocations complexes dans la LMC.....	14
Figure 8: Type d'organisation d'un laboratoire de biologie Moléculaire dans un Hôpital.	71

Analyse clinique, hématologique, cytogénétique et moléculaire de quatre variants complexes de leucémie myéloïde chronique.

Résumé

Les auteurs rapportent quatre cas de complexes variants de leucémie myéloïde chronique parmi dix sept traitées par des anti-tyrosines kinases (Imatinib, Nilotinib) de Mars 2003 à Juin 2010 dans les services d'hématologie des centres hospitaliers universitaires Yalgado Ouédraogo et Souro Sanou. Ils ont tous eu un score de Sokal de haut risque, les circonstances de découverte sont des complications. Les caractéristiques hématologique et thérapeutique sont peu différentes des formes classiques. L'évolution cytogénétique de ces variants complexes est en conformité avec le mécanisme selon lequel l'installation de ces variants complexes est une suite d'événements.

Mots clés : Leucémie myéloïde chronique ; Variants complexes

Adresse : Salifo Sawadogo, Service d'hématologie et d'immunologie du CHUSS, Cel : 70267790

E-mail : sasawadogo@hotmail.com

I-INTRODUCTION

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une prolifération monoclonale maligne prédominante sur la lignée granuleuse sans arrêt de maturation. C'est une maladie qui survient surtout entre 20 et 50 ans mais peut se voir à tout âge même chez l'enfant. Elle touche légèrement plus les hommes que les femmes.

Circonstances de découverte : Peut être fortuite à la suite d'un hémogramme (surtout dans les pays développés). La maladie évolue en trois phases (chronique, accélérée, acutisation ou blastique) en l'absence de traitement. Le début peut être insidieux avec amaigrissement, asthénie.

- **La période d'état ou phase chronique**

La splénomégalie constitue le seul signe objectif. Elle peut atteindre ou dépasser l'horizontal passant par l'ombilic et atteindre le pubis. Elle est mobile avec la respiration, indolore ou gênant le coucher du côté gauche, souvent douloureuse en cas d'infarctus. Généralement il n'y a pas d'adénopathie, ni d'hypertension portale. L'hépatomégalie est modérée.

On peut rencontrer des complications:

-hémorragies de tout ordre, thrombose, priapisme, crise de goutte.

- **La phase d'accélération.**

Elle est marquée par: Fièvre ; amaigrissement ; sueurs nocturnes ; splénomégalie (réapparaît même sous traitement).

- **La phase d'acutisation ou de transformation aiguë**

Majoration des signes de la phase d'accélération avec des adénopathies le plus souvent et où des complications thromboemboliques, des hémorragies.

- **Le diagnostic biologique**

L'hémogramme à la période d'état est le suivant (voir figure 1) :

- Globules Rouges (GR) : normal ou $3,45.10^6/\text{mm}^3$
- Hémoglobine (Hb) : normal ou 11,2 g/dl.
- Normochrome normocytaire ;

- Hématocrite (Hte) : 31,3%.
- Plaquettes : $>500.10^3/mm^3$ fréquemment
- Taux de réticulocytes : normal ou diminué
- Globules Blancs(GB) : hyperleucocytose majeure granuleuse $>55000/mm^3$ pouvant aller à $800000/mm^3$
- Myélémie majeure équilibrée avec maturation jusqu'au stade des PNN
lymphocytes : 03-07%
- Monocytes : 05% augmentation en nombre absolu
- Blastes : 02%; Myéloblastes : 04%; Promyélocytes : 03%; Myélocytes : 20%; Métamyélocytes : 07%.
- PNN : 46% augmentation en nombre absolu; PNE : 03% augmentation en nombre absolu; PNB : 1-4% augmentation importante en nombre absolu. (Caractéristique des syndromes myéloprolifératifs)

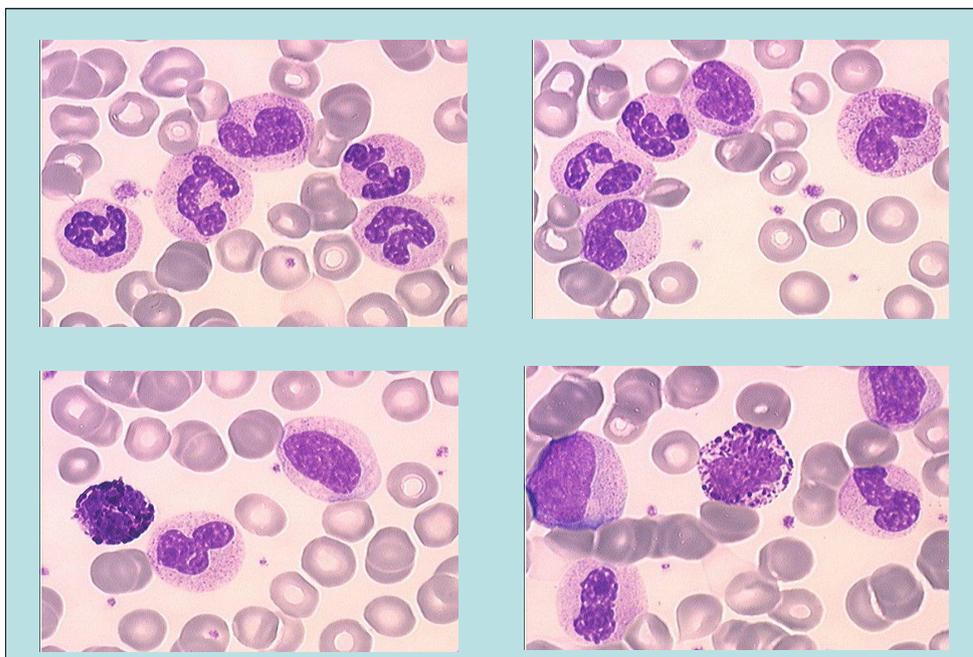


Figure 1: Aspect du frottis sanguin, coloré au May Grunwald Giemsa

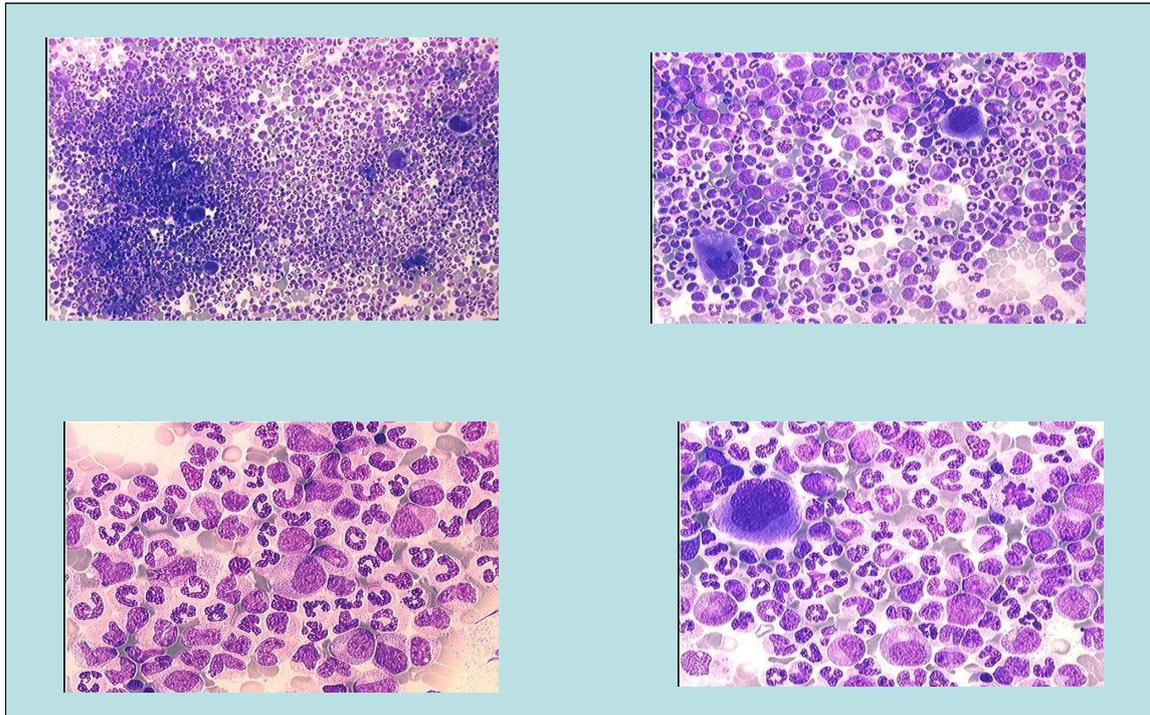


Figure 2: Aspect du frottis médullaire au faible grossissement (en haut à gauche), moyen grossissement (en haut à droite), et au fort grossissement (en bas)

Le myélogramme à la période d'état (figure2)

Le frottis très riche montre :

- Une hyperplasie de la lignée granuleuse >75% où tous les stades de maturation sont respectés ;
- les blastes sont < 5%, érythroblastopénie relative (< 5%), hyperplasie de la lignée mégacaryocytaire avec des micromégacaryocytes.
- Les lymphocytes sont relativement rares.

Le caryotype à la phase chronique montre classiquement le chromosome Philadelphie ou chromosome 22 raccourci (figure 3).

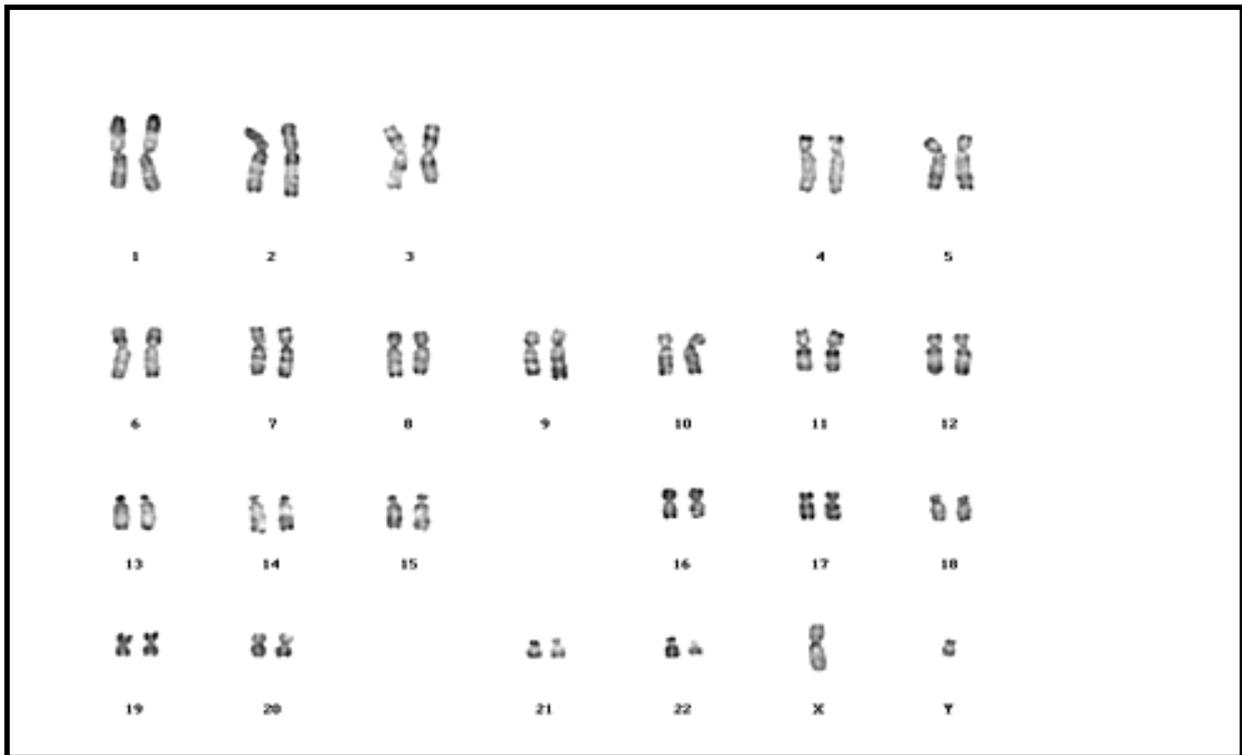


Figure 3 : Le Caryotype a la phase chronique avec le chromosome Philadelphie (chromosome 22 court)

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est une transformation maligne d'une cellule souche totipotente, caractérisée par une anomalie génétique acquise : le Chromosome Philadelphie (Ph1) (figure 4). Le Ph1 qui signifie chromosome 22 court est classiquement le résultat de la translocation réciproque du bras long du chromosome 9 et du bras long du chromosome 22 t (9 ; 22).

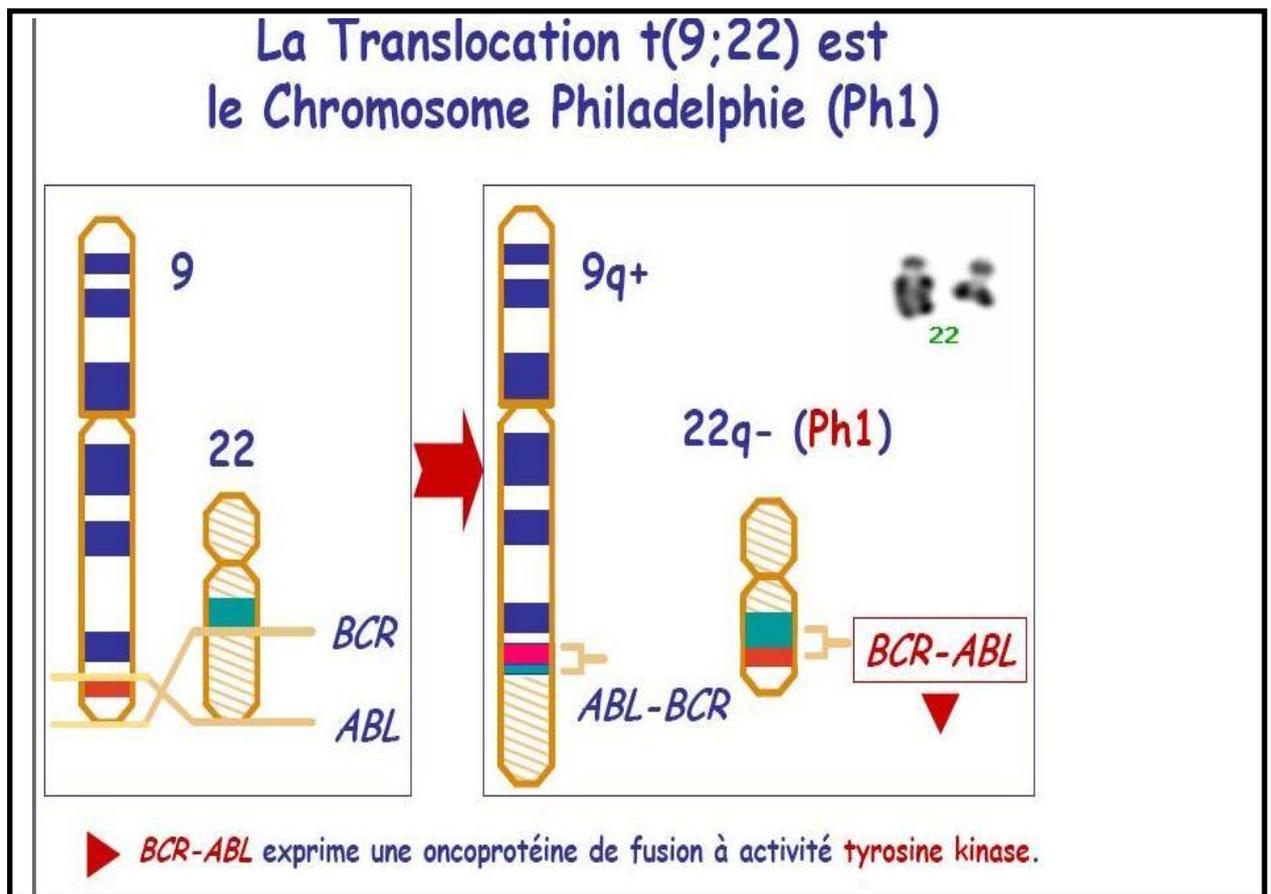


Figure 4 : Mécanismes de formation classique du chromosome Philadelphie (chromosome 22 court) [Dr Franck Nicolini groupe Fi(ϕ)-LMC]

La coupure se faisant au niveau de la région 3 et dans la bande 4 (q34) du bras long du chromosome 9 ; et dans la région 1 et dans la bande 1 du chromosome 22 (q11) [t (9 ; 22) (q34 ; q11)]. La conséquence de cette translocation au niveau génique est la formation d'un gène chimérique, l'oncogène BCR-ABL. (figure5)

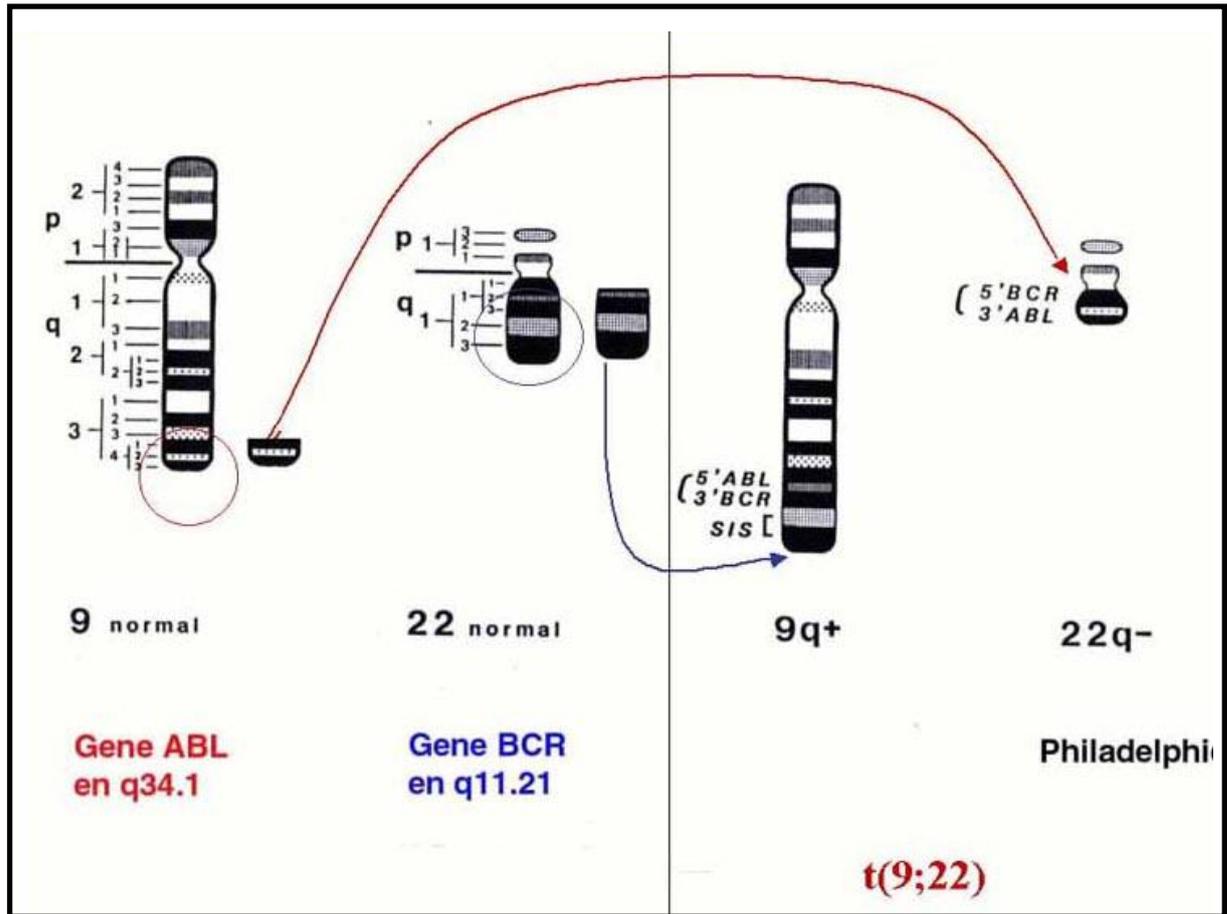


Figure 5 : Lieux de cassures classiques et mécanisme de formation du gène BCR-ABL [Dr Franck Nicolini Groupe Fi(φ)-LMC]

La protéine résultante de cet oncogène BCR-ABL présente une activité tyrosine kinase constitutive qui agit sur les voies anti apoptotiques, de prolifération et d'adhérence cellulaire. Le chromosome Philadelphie n'est pas toujours le résultat d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et le 22, mais peut résulter d'une translocation complexe entre le chromosome 9 ou le chromosome 22 et un ou deux autres chromosomes avec formation toujours de l'oncogène BCR-ABL. Ces translocations complexes peuvent se faire sans formation de chromosome Philadelphie mais avec toujours formation de l'oncogène BCR-ABL. Il existe des cas de LMC avec en apparence sur le caryotype une translocation entre un chromosome autre que

le 9 avec le chromosome 22 t (M ; 22) ; ou bien en apparence une translocation entre un autre chromosome que le 22 avec le chromosome 9 t (M ; 9) (Figure 6).

Il faut une étude par hybridation in situ (FISH) (1) ou une peinture des bandes chromosomiques de haute résolution ou un DNA blotting ou une RT-PCR pour révéler la présence de l'oncogène BCR-ABL et ou le transcrit BCR-ABL. Ce qui signifie que dans le premier cas t (M ; 22) il y avait une implication du 9 et dans le deuxième cas t (M ; 9), il y avait une implication du 22. Dans les deux cas la translocation t (9 ; 22) était masquée. Cela a fait dire que les translocations en apparence simples sont en réalité des translocations complexes. On peut aussi avoir le type de translocation suivant : t (M ; 9 ; 22 ; M') beaucoup plus complexe et impliquant deux chromosomes supplémentaires (figure7).

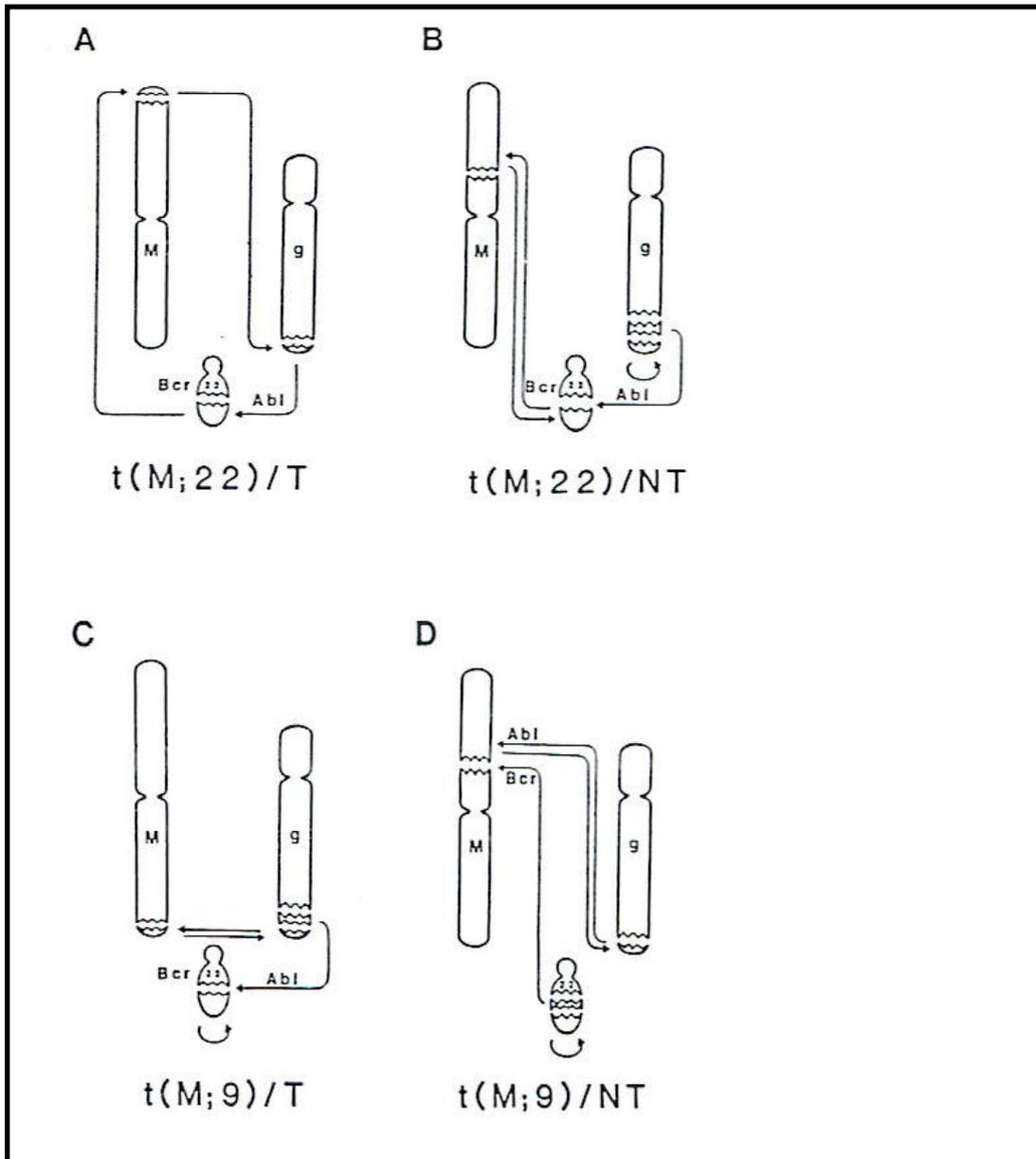


Figure 6 : Mécanisme de formation du gène BCR- ABL dans les translocations variantes simples et aberrantes.

M=chromosome supplémentaire. Le dérivé 9 classique est absent (2) .

T =point de cassure télomérique sur le chromosome M .

NT= point de cassure non télomérique sur le chromosome M

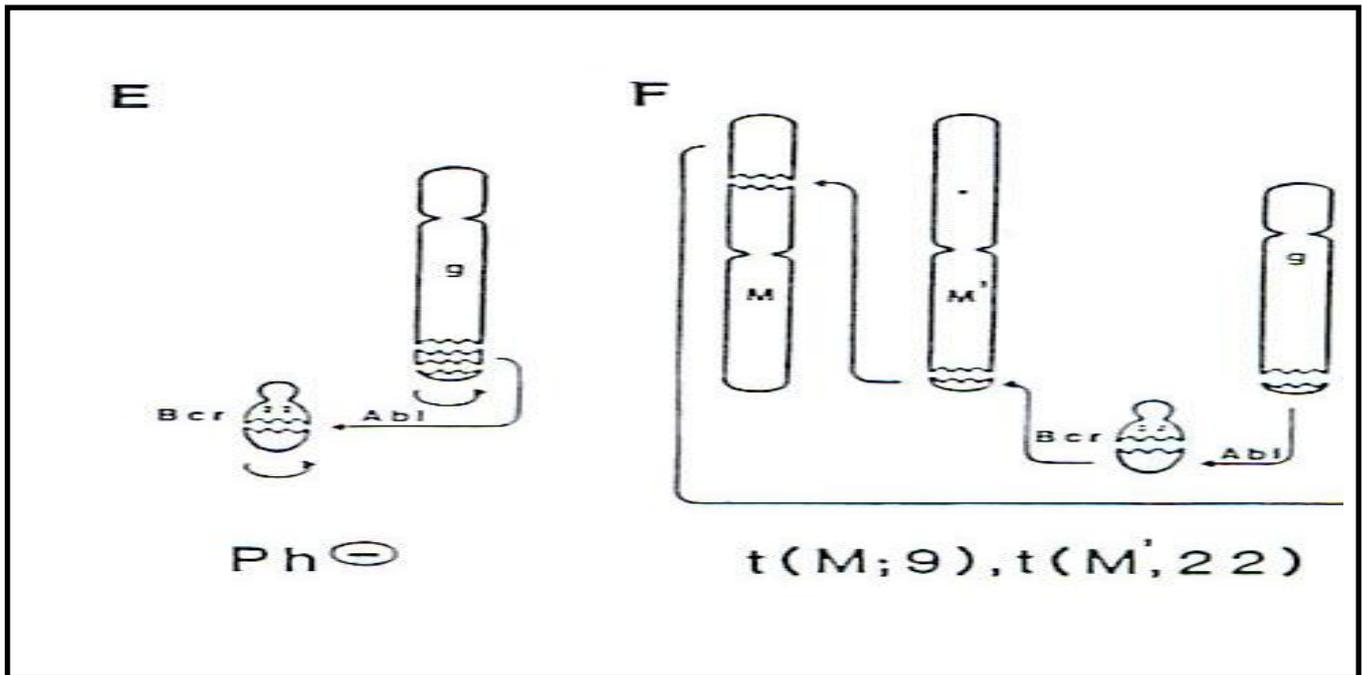


Figure 7 : Mécanisme de formation du gène BCR-ABL dans les translocations complexes dans la LMC.

Le dérivé 9 classique est absent (2). M' = 2^{ème} chromosome supplémentaire

Question de recherche.

Quelle est la présentation clinique, hématologique, cytogénétique, moléculaire, évolutif et thérapeutique des translocations variantes de leucémie myéloïde chronique que nous avons rencontrées ?

II- OBJECTIFS

2-1 -OBJECTIF GENERAL

Améliorer la qualité diagnostique des hémopathies malignes en général et celui des leucémies myéloïdes chroniques en particulier dans les services d'hématologie des deux Centres Hospitaliers Universitaires.

2-2-OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Décrire les différentes formes possibles de présentations cytogénétiques de leucémies myéloïdes chroniques
- Décrire les outils de diagnostic
- Acquérir des connaissances et des compétences dans la manipulation de ces outils
- Décrire les aspects cliniques, hématologiques, cytogénétiques et moléculaires des formes variantes rencontrées dans notre pratique.

III-MATERIELS ET METHODES

L'étude a été menée entre mars 2003 et juin 2010 dans les services d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo (CHUYO) et du Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou (CHUSS)

3-1-REALISATION DE L'HEMOGRAMME.

3-1-1-Matériel

Tubes VACUTEST avec EDTA tricalcique, portes- aiguilles et aiguilles pour faire le prélèvement avec les tubes VACUTEST. Lames, Automate de numération sanguine : ABX PENTRA 60

3-1-2 Réactifs

May Grunwald Giemsa, ABX Diluent, ABX Cleaner, ABX Eosinofix, ABX Basolyse II, ABX Alphalyse.

3-2-DETERMINATION DU CARYOTYPE OU CARYOGRAMME:

Le caryotype est l'arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule en mitose pendant la métaphase. Les chromosomes sont photographiés et classés par paire, par taille et par position du centromère.

3-2-1.Le matériel

Trocart de Mallarmé, seringue de 10cc, compresses stériles, alcool éthylique, sparadrap perforé, Hygromètre, Giemsa pour caryotype, lames superfrost, microscope type Leica DM 2500 avec logiciel d'analyse d'image type tribun. Moelle prélevée sur flacon stérile avec héparine liquide
Flasques de culture de 25ml
Pipettes graduées stériles

Etuve à CO₂ 5%, 37°C

Etuve sèche à 37°C

Centrifugeuse

Tube à hémolyse

Hotte à flux laminaire

3-2-2. Les réactifs

- Milieu de culture : RPMI sans glutamine, 20% sérum de veau fœtal, 2mM L-glutamine, pénicilline-streptomycine (120 UI/ml-120µg/ml)
- Synchronet = solution A et solution B
- Colcémide : 10µg/ml
- DSP30 (CpG-oligodeoxynucleotides (ODNs)):500 µM
- IL2 (interleukine 2) : 5000 UI/ml
- TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acétate) : 0,1mg/ml
- PHA (phytohémagglutinnine) : 9mg/ml

3-2-3 Etapes de la technique

Tous les ensemencements cellulaires sont effectués sous une hotte à flux laminaire à l'aide de matériel stérile.

- Porter des gants à chaque manipulation.
- Mettre le matériel souillé dans les poubelles prévues à cet effet.

Toute centrifugation est faite avec des tubes bouchés.

a- Enrichissement en leucocytes

b-Mise en culture

c-Ajuster la concentration cellulaire

Chaque flasque doit contenir 5ml en volume final ($10 \cdot 10^6$ de cellules sont ensemencées/flasque)

3-2-4-Culture

Pour les cultures, les flasques sont posées à plat (bouchon dévissé d'un demi-tour) dans une étuve à CO₂ réglée précisément à 37°C et sur une concentration en CO₂ à 5%. Pour les prélèvements pauvres les flasques sont entreposées debout.

Culture sans mitogène.

La durée de la culture est fonction de l'arrivée au laboratoire. Les cultures de 24h sont privilégiées et 72 h à 96 h pour les arrivées tardives au laboratoire, ou les arrivées du vendredi et les veilles de fêtes.

a-Synchronisation

Tous les prélèvements de moelle contenant des cellules pathologiques sont synchronisés.

Jour1 :

Après $\frac{3}{4}$ d'heure de mise en culture,

- ajouter :- 50µl de solution A (fluorodéoxyuridine) dans chaque flasque de 5 ml (solution prête à l'emploi conservée au congélateur à -20°C)
- remettre les flasques en culture dans l'étuve à CO₂ 5% et à 37°C pendant 17h. Les flasques sont posées à plat (bouchon dévissé d'un demi-tour) ou laissées debout pour les prélèvements pauvres.

Jour 2 :

Au bout de ces 17h,

- ajouter :- 50 µl de solution B (= Thymidine) dans chaque flasque de 5ml.
- Remettre les flasques en culture à l'étuve CO2 5%, et à 37°C pendant 5h50 minutes.
- Arrêt de la culture.
- Ajouter : -30µl de Colcémide pure dans chaque flasque de 5ml ; 50µl si flasque de 10ml
- Mettre les flasques bouchons fermés à l'étuve sèche 37°C pendant 10 minutes.

b-Contrôle de qualité interne.

- Avant de mettre en culture, contrôler la couleur du milieu de culture : un changement de couleur correspond à un changement de pH. Si c'est le cas, le milieu est jeté.
- La date de préparation ou d'ouverture d'un réactif est contrôlée à chaque fois. Même si la date de péremption n'est pas atteinte, les réactifs suivants sont conservés : Colcémide : 15 jours maximum ; Milieu de culture : 7 jours au maximum
- L'aspect de la culture et la couleur du milieu est contrôlé visuellement lors de la pousse cellulaire (absence de contamination) .Un traitement antifongique de l'étuve est fait une fois par mois.
- Le pourcentage en gaz et la température de l'étuve sont contrôlés automatiquement à l'aide d'une sonde (alarme). Un autostart de l'étuve est fait tous les trimestres.

3-2-5-Recueil des métaphases

a-Matériels et réactifs

a-1- Le matériel :

- Tubes coniques en plastique, Flacons hermétiques en verre, Pipettes plastiques,
- Etuve sèche 37°C, Centrifugeuse, Pompe à vide

a-2- Les réactifs :

- Solution de KCL 0.075M, Acide acétique, Méthanol

b-Etapes de la technique

b-1-Préparation

- Le matin, préparer la solution choc KCL 0,075 M, puis stocker celle-ci dans l'étuve sèche à + 37°C jusqu'au moment de l'utilisation.
- Préparer le fixateur (1volume d'acide acétique pour 3 volumes de méthanol), puis le stocker à + 4°C au réfrigérateur dans un flacon en verre hermétique.

b-2-Recueil des métaphases

- Vider les flasques dans des tubes coniques en plastique préalablement identifiés (NOM + Numéro d'Inscription sur le tube et N° sur le bouchon).
- S'il ya 3 flasques pour un patient, répartir leur contenu dans 2 tubes coniques.
- S'il y a 2 flasques pour un patient :
 - soit regrouper leur contenu dans 1 tube conique (en cas de prélèvement pauvre en hématies)
 - soit répartir dans 2 tubes coniques (en cas de prélèvement riche en hématies)
- Centrifuger 10 min à 1200t/min
- Aspirer le surnageant avec la pompe à vide (laisser environ 5 mm de surnageant)

b-3-Choc hypotonique

- Ajouter le KCL 0,075 M maintenu à 37°C depuis sa fabrication.
- Remplir une pipette plastique de KCl et refouler son contenu progressivement dans le tube conique en plusieurs étapes (refouler-aspirer plusieurs fois pour assurer un mélange progressif du culot et du KCL).
- Compléter avec du KCL jusqu'à 25 ml de volume final.
- Homogénéiser.
- Incuber 20 min à l'étuve sèche à 37°C

b-4-Préfixation

- Ajouter 2 à 5 gouttes de fixateur dans la suspension cellulaire ;
- Mélanger avec plusieurs aspiration-refoulement ;
- Centrifuger 10 min à 1200t/min ;
- Aspirer le surnageant avec la pompe à vide (laisser environ 2 mm de surnageant).

b-5-Fixation

- Remettre en suspension le culot avec une pipette vide (plusieurs aspirations-refoulements) ;
- Remplir une pipette de fixateur et le mélanger avec le culot très progressivement (refouler-aspirer plusieurs fois de petits volumes) (étape critique).
- Compléter avec 20 ml de fixateur.
- Mélanger avec plusieurs aspirations-refoulements.
- Refermer le tube .
- Centrifuger 10 min à 1200t/min .
- Aspirer le surnageant avec la pompe à vide (laisser environ 1 à 2 cm de hauteur de surnageant pour un culot standard) (laisser un plus grand volume pour un tout petit culot) (risque de pertes cellulaires) .

- Remettre en suspension le culot avec une pipette vide (plusieurs aspirations-refoulements) .
- Si 2 tubes coniques pour un seul patient, regrouper leur contenu dans un seul tube (bien rincer le tube vide avec du fixateur qui sera récupéré dans le tube à garder) .
- Compléter avec du fixateur jusqu'à 20ml.
- Mélanger avec plusieurs aspiration-refoulement. Refermer le tube ; Centrifuger 10 min à 1200t/min.
- Conserver une nuit à +4°C, puis stocker au congélateur -20°C.

3-2-6-Etalement et dénaturation bandes R(RHG)

Les Bandes R sont obtenues par dénaturation thermique. Elles révèlent l'euchromatine c'est-à-dire les régions chromosomiques où l'ADN est transcrit.

a-Matériels et réactifs

a-1- Le matériel

Bacs en céramique ; Tubes coniques ; Bain-marie ; Pompe à vide ; Pipettes Pasteur en verre ; Lames ; Appareil Thermotron ; Microscope à contraste de phase ; Centrifugeuse ; Sorbonne

a-2- Les réactifs

Solution de phosphate ; Fixateur (Méthanol : acide acétique) (3 :1) ; Méthanol ; Eau distillée ; Solution de Giemsa à 4%.

b-Etapes de la technique

b-1- Préparation pour l'étalement

Chaque début de semaine, changer la solution phosphate des bacs en céramique présents dans le bain-marie.

.Allumer le bain-marie, où se trouvent les solutions phosphates et attendre qu'il soit à 88°C

.Mettre les tubes coniques contenant les culots cytogénétiques à étaler à température ambiante pendant environ 30 min.

.Allumer le Thermotron.

b-2-Etalement

Cette étape nécessite des conditions thermiques et hygrométriques contrôlées : elle s'effectue donc dans une enceinte régulée : le THERMOTRON®

– **Conditions optimales d'étalement**

- Température optimale 23°C-24°C.
- Hygrométrie optimale : 45%.

– **Préparation du culot**

- Aspirer le surnageant ;
- Rajouter quelques gouttes de fixateur frais si nécessaire ;
- Remettre en suspension le culot à étaler à l'aide d'une pipette pasteur en verre à pointe fine (souffler de l'air dans le culot sans l'aspirer, ce qui minimise le risque de rupture cellulaire).

– **Etalement**

- Placer une lame vierge identifiée (n° cytogénétique et nom du patient) sur la paillasse du Thermotron.
- Déposer une goutte de suspension cellulaire au milieu de la lame. Laisser sécher à l'intérieur de l'enceinte.
- Contrôler la dilution au microscope à l'objectif x10 en contraste de phase. L'idéal étant que les mitoses et les noyaux soient bien étalés et séparés les uns des autres.
- Réajuster la dilution si nécessaire avec du fixateur,

- lorsque la dilution optimale a été établie, étaler de la même façon plusieurs lames (6 à 8 par patient) afin de pouvoir obtenir et sélectionner le meilleur temps de dénaturation.
- Laisser sécher à l'intérieur de l'enceinte.
- Inscrire sur chaque lame le numéro d'identification du patient et le temps de dénaturation qui sera appliqué.
- Exemple : faire 6 lames avec des temps de dénaturation espacés d'une minute.

b-3-Obtention des bandes R (RHG)

b-3-a-Réhydratation

- Immerger les lames à dénaturer 5min dans du méthanol pur
- Rincer dans 2 bains d'eau distillée
- Enlever l'excès d'eau en secouant chaque lame d'un geste énergique
- Ne pas les laisser sécher

b-3-b-Dénaturation thermique

- Immerger immédiatement les lames dans la solution de phosphate préalablement chauffée à 88°C, durant le temps indiqué sur la lame (la durée de dénaturation est fonction de l'aspect des chromosomes et des conditions climatiques, donc à déterminer localement)
- Sortir chaque lame une par une et les tremper dans 2 bains successifs d'eau fraîche (environ 18°C)
- Laisser les lames dans l'eau le temps de sortir les suivantes du bain-marie.

b-3-c-Coloration

- Colorer avec du Giemsa à 4% pendant 2 min 30 à 3 min. (Colorant stocké dans le réfrigérateur) ;

- Rincer sous l'eau du robinet pour éliminer l'excès de colorant (étape critique car un rinçage trop abondant peut faire disparaître le banding et un rinçage insuffisant donnera des chromosomes trop foncés) ;
- Laisser sécher et observer au microscope. Si le résultat n'est pas satisfaisant, ré-étaler (3 fois maximum)

b-3-d-Lecture au microscope

- Microscope ZEISS menu d'un logiciel d'analyse d'image (Meta Systems)

3-3- HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE OU HYBRIDATION FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

Le principe fait appel à un procédé basé sur l'appariement chimique par des liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires de deux séquences nucléotidiques pour former une structure double brin. Cette hybridation se fait sur des préparations cellulaires et se définit de ce fait comme hybridation << in situ >>. Elle met en jeu deux protagonistes : -L'ADN chromosomique présent dans les métaphases (chromosomes) et ou les cellules interphasiques (noyaux cellulaires) d'une part et la molécule à hybrider ou sonde, marquée directement ou indirectement par un ou des fluorochromes d'autre part.

3-3-1.Matériel

Lames, lamelles 24x50 mm, lamelles 24x24, chronomètre, étuve à 37°C, plaque chauffante, hotte chimique, microtubes 0,5 ml TREFF violet, thermocycleur << crocodile III >>, congélateur -20°C, réfrigérateur à 4°C, chambre humide à 37°C, Microscope, analyseur d'image.

3-3-2.Réactifs

-20xSSC (Préparation de 2x SSC (1L) Composant Concentration (mM) quantité pour 1L (g) Sodium Chloride (Na CL) 300 17.5 Sodium Citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 30 8.8); éthanol absolu ; formamide désionisée ; Rubber cement ; DAPI ; sondes VYSIS/ABBOT ; NP 40 ; anticorps de détection ; lait écrémé ; PBD10x

3-3-3.Etapes de la technique

a-Préparation des lames

-prétraitement des lames

- Préparer une série de dilution d'éthanol de 70 à 100%
- Tremper les lames dans chaque bain selon les indications suivantes :

Réactifs	Temps	Température (Rt=température ambiante)
Ethanol 70%	3'	Rt
Ethanol 80%	3'	Rt
Ethanol 90%	3'	Rt
Ethanol 100%	3'	Rt

- Laisser sécher à température ambiante.
- Dénaturation séparée des ADNs (technique de la plaque chauffante)
- Préchauffer la plaque de dénaturation
- Allumer la hotte
- Sortir le formamide 70% /2xSSC pH7 du réfrigérateur (toujours manipuler le formamide sous la hotte chimique, produit très dangereux)
- Préparer un bac 2xSSC pH7 a +4°C
- Préparer une série de déshydratation à l'éthanol (70%,80%,90%,100%) et la refroidir dans le congélateur a -20°C.

- Déposer 125µl de formamide 70%/ 2xSSC pH7 sur la lame à dénaturer et couvrir d'une lamelle 24x50mm
- Poser la lame sur la plaque chauffante (75⁰c) pendant 3'
- Enlever la lamelle en secouant la lame sur le Sopalin et tremper immédiatement dans le bain de 2xSSC pH7 à +4°C sans incubation.
- Puis déshydrater la lame dans chaque bain selon les indications suivantes :

Réactif	Temps	Température (Rt =température ambiante)
Ethanol 70%	3'	+4°C
Ethanol 80%	3'	+4°C
Ethanol 90%	3'	+4°C
Ethanol 100%	3'	+4°C
Ethanol 100%	3'	RT

- Laisser sécher à température ambiante.

b-Dénaturation de la sonde

NB : En raison de la présence de fluorochromes, il est impératif de travailler à l'abri de la lumière.

- Préparer la sonde dans un microtube 0,5 ml TREFF violet en suivant les indications spécifiques de la sonde.
- Placer le microtube à dénaturer dans le thermocycleur << crocodile>> en suivant les indications spécifiques à la sonde.

c-Hybridation

- Déposer 5µl de sonde sur chaque lame.
- Couvrir avec une lamelle 24x24mm.
- Luter la lame avec du " RUBBER cement" et incubation des lames toute la nuit à 3°C dans une chambre humide.

d-Lavage post-hybridation

- 0.4 SSC/0.3 NP40 3' 72°C
- 2SSC/0.1 NP40 1' Rt (température ambiante)
- Détection des sondes indirectes

Complément aux lavages post-hybridation	PBD1X5' Rt PBD1X lait 5'Rt	PBD1Xlait : 5g de lait écrémé+ QSP 100ml PBD1X
REVELATION Avidine/FITC	125µl de préparation d'AC Si 1 AC 30' 37°C Si 2 AC 1H 37°C	Préparation AC : 1µl Avidine /FITC 5µl anti-Dig rhodamine
Anti-Dig rhodamine	En chambre humide PBD1x 3x5' Rt	500µl PBD1x+lait
LAVAGES	PBD1X5'Rt	

e-Contre –coloration et conservation

- Déposer une goutte de DAPI sur chaque lame couvrir avec une lamelle de 24x50mm.
- Laisser reposer à +4°C pendant au moins 5min
- Les lames lues et en attente de lecture sont conservées à+4°C.
- Lecture des lames au microscope

3-4-POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

3-4-1 Extraction des ARN totaux

a-Principe

A partir des prélèvements de sang ou de moelle, on prépare des culots cellulaires après isolement des cellules mononuclées sur ficoll. A Partir des culots cellulaires, les ARN totaux sont extraits afin de pouvoir réaliser la recherche de réarrangement génique après une étape de transcription inverse.

b-Matériels

Hotte chimique aspirante

Jeu de pipettes réservé ; cônes stériles (protégés) ; tubes Eppendorf stériles ; un portoir vert pour extraction ; un portoir bleu pour réceptionner les échantillons à congeler ; marqueurs pour identification des tubes ; agitateur type vortex ; centrifugeuse minifuge ; porte-coton stériles ; Pissettes HCL dilué H₂O distillée. Etuve sèche réservée au séchage des ARN/ADN en cours d'extraction. Sur-blouses. Gants.

Réactifs

-Trizol Reagent : Invitrogen Life technologies réf. : 15596-018

-Chloroforme: Ready Red. Réf.: 130321 (Chloroforme +alcool isoamylique +colorant rose)

-Isopropanol: (ou 2-propanol) C₃H₈O ; Réf. : VWR INTERNATIONAL : 20839297

-Ethanol 75% (Diluer l'éthanol absolu C₂H₆O dans de l'eau). Réf. : CALOERBA REAGENT.

- RNASE out. (In Vitrogen Réf.:10777-019 (40 U/μl) maintenir dans de la glace lors de l'utilisation.

c-Méthodes

Mettre des gants et une sur-blouse.

- Travailler sous la hotte aspirante, vitre de la hotte abaissée.
- Travailler à froid.
- Jeter impérativement tout matériel souillé par le Trizol (embouts, pipettes,...) dans le container réservé à cet usage et situé sous la hotte. Ce container doit être correctement fermé avant et après usage.

c-1- Préparation des culots

Prévoir un petit container contenant de la glace pilée pour chaque patient. Mettre ces containers dans un grand bac contenant de la glace. Laisser décongeler l'échantillon dans la glace pendant un quart d'heure environ.

- Vortexer jusqu'à homogénéisation complète.
- Ajouter :

160 µL de chloroforme pour 0,8 ml de Trizol

200 µL de chloroforme pour 1 ml de Trizol

240 µL de chloroforme pour 1,2 ml de Trizol.

- Vortexer pendant 15 secondes.
- Laisser reposer 5 min dans la glace.
- Centrifuger à 12.000 g (au maximum) à +4°C pendant 15 min.

c-2-Précipitation

- Identifier et dater un tube Eppendorf stérile (qui contiendra la solution d'ARN définitive).
- Transférer la phase supérieure aqueuse qui contient l'A.R.N. dans ce tube. Bien pipeter au centre le maximum de solution en évitant de pipeter l'interphase.
- Bien mesurer le volume transféré pour pouvoir ajouter un volume identique d'Isopropanol.
- Ajouter le même volume en Isopropanol maintenu au froid (-20°C).
- Vortexer fortement.
- Déposer dans le tubier vert « spécial extraction » et maintenir :
 - soit à -20°C une nuit (le mieux).
 - Soit à -20°C pendant 15 min (moins bien).
 - Soit à +4°C pendant 15 min (moins bien).

Garder un tubier réservé uniquement à cet usage dans le congélateur pré-PCR (ne jamais le sortir)

- Centrifuger à 12 000 g à +4°C pendant 15 min.

c-3-Lavages

- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 75% sorti du -20°C au dernier moment.
- Vortexer.
- Centrifuger à 8000g à +4°C pendant 10 min.

c-4-Séchage

- Eliminer le surnageant.
- Sécher les parois du tube avec du coton tige stérilisé puis mettre le culot à l'étuve (située à gauche de la hotte) à 65°C pendant 3 min.
- Ajouter :

30 µL d'eau distillée stérile: pour les prélèvements > 10 millions (25 µL pour les prélèvements entre 5 et 10 ; 15µL pour les prélèvements pauvres < 5 M)

1 µL de RNASin (RNASE inhibiteur) maintenu dans la glace.

- Mélanger très longuement à la pipette pour s'assurer d'avoir solubilisé tout l'A.R.N.

(Par vortex, *minifuge* et pipette plusieurs fois). La solution doit bien monter dans la pipette.

c-5-Dosage au spectrophotomètre.

Le dosage se fait avec l'appareil NANODROP-1000 programmé pour la lecture directe du dosage de l'A.R.N. Il permet d'apprécier la qualité des

ARN totaux extraits notamment l'absence de contamination protéique. La lecture se fait à 260nm et 280nm. On fait le rapport DO260 nm/ DO 280nm.

Rendement d'extraction attendu:

1 µg d'A.R.N. pour 1×10^6 de cellules congelées.

Si la concentration est > **1,5 µg/µL** ou 1500 ng/µL, diluer l'A.R.N. dans de l'eau distillée, puis doser à nouveau.

Si le nombre de cellules est élevé et le rendu du dosage faible, il est nécessaire de doser à nouveau après avoir remplacé le tube 5 min au four ; homogénéiser, doser, diluer de nouveau si nécessaire et doser de nouveau.

NB : Le ratio (indicateur de pureté) doit se situer entre **1.8 et 2.0** .Tout écart à partir de ces valeurs indique la présence d'impuretés.

c-6- Conservation.

Congeler les solutions d'A.R.N. dans le petit congélateur à -80°C
Transporter les cellules dans de la glace afin d'éviter la décongélation.

c-7-électrophorèse

Après l'appréciation du rendement il faut contrôler la présence effective d'ARN et ceci est réalisé par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. La présence des deux fractions D'ARN ribosomiaux 40 et 60 S (les seuls visibles) signifie qu'il ya de L'ARN dans l'extraction. (Voir méthode ci-dessous)

3-4-2 La retrotranscription

Elle permet de copier en présence d'une amorce et d'une transcriptase inverse une molécule d'ARN simple brin en une molécule d'A.D.N. simple brin complémentaire (A.D.N.c ou cD.N.A.) de la séquence d'A.R.N. messenger.

(Voir annexe)

3-4-3 La PCR proprement dite

a-Matériels

Hotte chimique aspirante, thermocycleur ; transluminateur relie à une imprimante ; bac de migration pour électrophorèse avec un générateur ; Micro- onde ; cuve a immersion de gel ; tubes safe-lock.

H₂O, Tampon 10X, MgCl₂ 25mM, DNTP 5Mm, DMSO, Amorces : BCRx12-F3 10μM ; BCRx01-F3 10μM ; BCRx03-F1 10μM ; BCRx15-F1 10 μM ; ABLx03-R1 10μM ; TAQ GOLD 5U/μl ; contrôle positifs : lignée TOM (e1a2) ; lignée K562 (b3a2) ; cD.N.A ; Réactifs pour l'électrophorèse : poudre d'agarose (Invitrogen), TBE 1X, marqueur de taille biotinylé (Promega), BET Ethidium bromide 10 mg/ml (Sigma)

b-Méthode

b-1-Préparation des "MIX"

Il faut d'abord préparer les "MIX" selon les modalités suivantes en fonction du nombre d'échantillons à traiter.

Réactifs utilisés			Concentration finale	Nombre d'échantillons	
N° Lot	Réactifs	Concentration initiale		N=1	N=15
	H2O	/	/	7,3	109,5
	Tampon10x Gold	10x	1x	2,5	37,5
	MgCl2	25mM	2,5mM	2,5	37,5
	dNTP	5mM	0,2mM	1	15
	DMSO	/	/	1,5	22,5
	BCRx12-F3	10μM	0,4μM	1	15
	BCRx01-F3	10μM	0,4μM	1	15
	BCRx03-F1	10μM	0,4μM	1	15
	BCRx15-F1	10μM	0,4μM	1	15
	ABLx03-R1	10μM	0,4μM	1	15
	Taq	5U/μl	2U	0,2	3
			Volume finale	20	300

Changer de salle et ajouter 5µl de cD.N.A dilue au 2/5 par tube.

b-2-Amplification.

Placer les tubes dans le thermocycleur et le mettre en marche pour la RT-PCR. Après la RT-PCR, le produit d'amplification est visualisé sur un gel d'agarose qui permet la résolution des fragments en fonction de leur taille.

b-3-Préparation du gel d'agarose à 2%.

Toutes les manipulations où il y a du BET, nécessitent le port de gants en nitrile. Insérer les embouts en plastique de chaque côté de la plaque et mettre le peigne sur une extrémité. Placer la plaque sur un support de mise à niveau. Mettre 50 ml de TBE1x dans un Erlenmeyer puis ajouter 1g d'agarose. Remuer puis faire chauffer au micro onde. Renouveler l'opération plusieurs fois jusqu'à ce que le mélange soit totalement translucide. Ajouter 4µl de BET et bien homogénéiser le mélange. Couler le gel sur la plaque puis attendre 30 minutes. Lorsque le gel est solidifié, retirer les 2 embouts en plastique et le peigne puis placer la plaque dans une cuve et ajouter du TBE 1x jusqu'à immersion totale du gel.

b-4-Préparation et dépôt des échantillons et migration

Dans des petits tubes safe-lock : mélanger 2µl de tampon de charge+ 10µl de produit PCR. Prévoir un tube avec 2µl de tampon de charge et 10µl de marqueur de taille. Déposer 10µl du mélange dans chaque puits, puis faire migrer à 150v. Le dépôt se fait du côté négatif, la migration se faisant du – vers le +.

b-5-Photo du Gel.

La photo du permet de rechercher les fragments pathologiques attendus et de les conserver.

Déposer le gel sur le transilluminateur, allumer la lumière ordinaire de l'appareil puis l'écran et l'imprimante qui sont l'un au dessus de l'autre,

ajuster la position du gel et la taille de l'image avec la roulette du haut au milieu.

Eteindre la lumière ordinaire et allumer les UV sur 100%, appuyer sur le bouton "acq/sat" pour commencer l'acquisition, puis faire varier l'intensité sur l'écran avec les boutons + et - à gauche de l'écran. Lorsque l'image est satisfaisante, appuyer sur "freeze "pour éteindre les UV. Imprimer l'image et l'enregistrer sur une clé.

Taille des fragments attendus :

*m e1a2	521pb
e1a3	347pb
*μ	586pb
*M b3a2	417pb
b2a2	342pb
b2a3	168pb.

3-5- LES PATIENTS

Les patients ont été inclus après signature d'un consentement éclairé.

Les critères d'inclusion sont :

- souffrir d'une LMC dont le diagnostic a été fait par des signes cliniques, par l'hémogramme, le myélogramme et la biopsie ostéo-médullaire (optionnelle),
- présenter au caryotype un variant avec ou sans chromosome Philadelphie et confirmer par une hybridation in situ (gène BCR-ABL) et ou une PCR conventionnelle ou quantitative (transcrit BCR-ABL).

Ils ont reçu de l'Hydroxyuré (Hydréa) à raison de 2g par jour en deux prises avant la confirmation du diagnostic et après la confirmation ils ont reçu de l'Imatinib (Glivec) à raison de 400 mg en une prise quotidienne.

Les patients ont été considérés en phase chronique s'ils ont :

- des blastes dans le sang et dans la moelle < 15% ;
- blaste et promyélocyte <30% ;

- polynucléaire basophile <20% ;
- Plaquettes $>100 \times 10^3 / \text{mm}^3$;
- et sans signe évident de localisation extra médullaire de la maladie.

Les patients sont dits en phase chronique précoce quand ils sont vus en consultation moins d'un an après le début de la maladie en phase chronique tardive, plus d'un an après le début de la maladie.

3-5-1-Evaluation avant et durant le traitement

Avant le début du traitement les patients sont interrogés et examinés physiquement, et les examens suivants sont demandés : numération formule sanguine, créatininémie, Amino-transférases, myélogramme, caryotype, FISH et RT-PCR possible.

Des que le traitement a commencé, le suivi a été fait par une NFS chaque semaine du 1^{er} au 3^{ème} mois ensuite tous les deux ou 6 semaines, un myélogramme, un caryotype ou une FISH tous les 3 mois pendant la première année et tous les 6 mois après. La toxicité des médicaments a été évaluée à chaque consultation selon les données clinique et biologique.

3-5-2-Critères de réponse(3)

- Une réponse hématologique complète est définie par : globules blancs (GB) $< 10000 / \text{mm}^3$; plaquettes (PQ) $< 450000 / \text{mm}^3$, absence de myélémie, disparition de tout signe clinique de la maladie. Ceci au plus trois mois après le début du traitement.
- La réponse hématologique complète a été classée en fonction de la réponse cytogénétique.
- Réponse cytogénétique complète (absence de PH1 au caryotype)
réponse cytogénétique partielle (1-34% de PH positive), réponse cytogénétique mineure (35-90 % de PH1 positive). -La réponse cytogénétique majeure inclus : la réponse cytogénétique complète et la

réponse cytogénétique partielle. La réponse cytogénétique est appréciée par les résultats du caryotype et ou de l'hybridation in situ (FISH).

- Une réponse moléculaire majeure est définie par un rapport de transcrit BCR-ABL/ABL $<0,05\%$ et une réponse moléculaire complète par un taux indétectable du transcrit BCR-ABL.
- Echecs : pas de RHC à trois mois ; pas de RCC à 12 mois ; pas de RMM à 18 mois. A tout moment perte de la RHC ; RCC ; RMM ; apparition d'une anomalie cytogénétique associée (ACA)

3-5-3-Observance du traitement

Chaque patient doit ramener les boîtes et les plaquettes vides à la fin du traitement. Ils doivent venir 1 ou 2 jours avant les dernières capsules pour éviter la rupture.

3-5-4-Score de Sokal. (4)

Score pronostic de la leucémie myéloïde chronique établi au diagnostic avant tout traitement. Il tient compte de l'âge, du sexe, de la taille de la rate en centimètre sous le rebord costal, du nombre de plaquettes en giga /litre et du nombre de blaste en %. On dit que le score de Sokal est de bas risque s'il est $< 0,8$; risque intermédiaire s'il est compris entre 0,8 et 1,2 et de haut risque s'il est $> 1,2$

3-6-TYPE D'ETUDE

C'est une étude longitudinale prospective.

3-7- TECHNIQUES DE COLLECTE.

Consultations médicales, examens hématologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire ; analyse des résultats des différents examens.

3-8- ECHANTILLONNAGE.

3-8-1-Population cible

Tous les patients présentant une hyperleucocytose et ou une hyperthrombocytose avec ou sans splénomégalie.

3-8-2-Taille de l'échantillon

Quarante trois [43] patients souffrant d'une leucémie myéloïde chronique, dix sept [17] ont été inclus dans le protocole de traitement avec l'Imatinib et parmi ces 17, quatre [4] ont présenté une translocation variante.

3-8-3-Critère d'inclusion

Patient souffrant d'une leucémie myéloïde chronique avec un variant cytogénétique au caryotype

3-8-4-Critère d'exclusion

Patient souffrant d'une leucémie myéloïde chronique avec une translocation simple.

3-8-5-Limites de l'étude.

Le coût élevé des examens de cytogénétique et de biologie moléculaire. Des patients avec des signes clinique et hématologique d'une leucémie myéloïde chronique mais ne pouvant supporter le prix des examens n'ont pas été inclus.

3-8-6-Consentement.

Les patients ont signé un consentement éclairé avant l'inclusion dans l'étude.

3-8-7-L'éthique.

C'est une étude approuvée par « THE MAX FOUNDATION » donatrice de l'Imatinib et du Centre Hospitalier Universitaire Yalgado Ouédraogo.

IV-LES RESULTATS

Quatre patients ont été inclus dont deux Burkinabè, un mauritanien et un camerounais, tous de sexe masculin. L'âge à l'inclusion a été respectivement de : 20, 24, 27 et 30 ans. Selon la profession, ont été identifiés : deux étudiants, deux cultivateurs.

Circonstances de découverte :

- Baisse de l'acuité visuelle par hémorragie maculaire,
- priapisme,
- infarctus splénique,
- splénomégalie type V de Haquet avec hyperleucocytose majeure.

L'examen clinique a retrouvé dans tous les cas une splénomégalie et une hépatomégalie. Trois des patients sont arrivés en phase chronique précoce et un en phase chronique tardive. Tous les patients étaient de haut risque selon le score de Sokal. Un patient a débuté le traitement par l'Hydroxyuré pendant un mois avant la mise sous Imatinib. Les trois autres ont débuté le traitement par l'Imatinib.

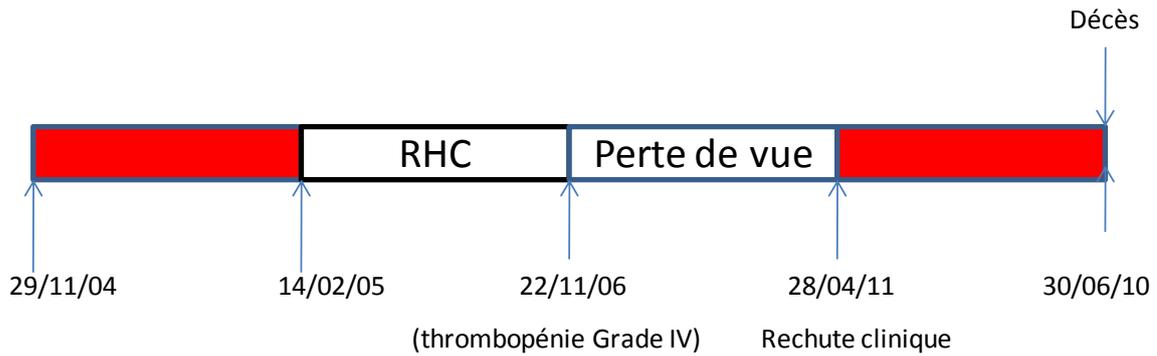
Le type de variant était : t (9, 11,22) trois patients, t (9, 17,22) un patient.

4-1 PATIENT N° 1

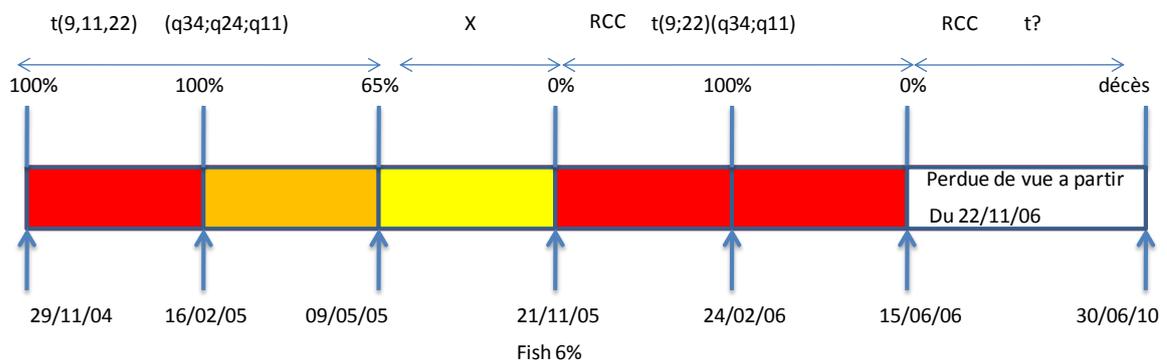
4-1-1-Hémogramme au diagnostic

GR	Hb	Hte	VGM	TGMH	CCMH	PQ	GB
$2.2.10^6/\text{mm}^3$	6,2g/dl	19,8%	87 fl	27pg	31,1%	$439.10^3/\text{mm}^3$	$143.10^3/\text{mm}^3$

4-1-2-Evolution clinique et hématologique



4-1-3-Evolution du caryotype.



t (9, 11,22) (q34 ; q24 ; q11) RCC t(9,22) (q34 ; q11) RCC inconnu

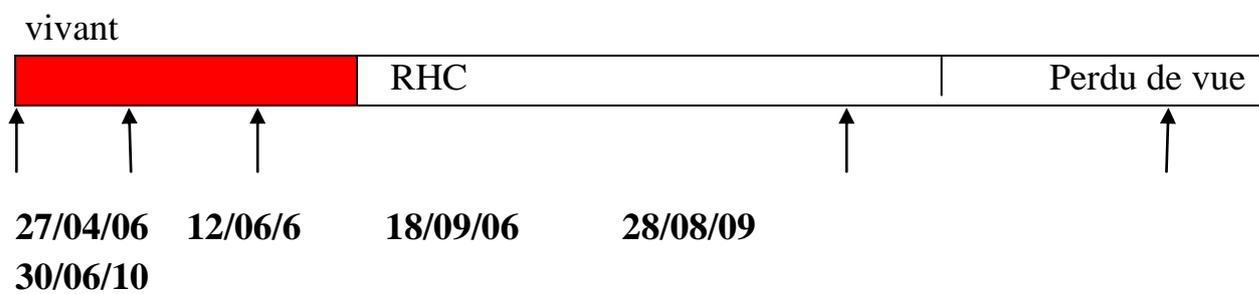
Ce patient a été traité uniquement avec de l'Imatinib. A la date du 21/11/05 le caryotype était normal sans le clone variant mais la FISH avait mis en évidence le gène chimérique BCR-ABL dans 6% des noyaux interphasiques. Le contrôle suivant (24/02/06) a confirmé l'absence de la translocation variante mais la présence de la translocation classique qui n'existait auparavant. Cette translocation classique a disparu au contrôle suivant (15/06/06). En raison d'une thrombopénie de grade IV (5) [$<25000/\text{mm}^3$] survenue après la rémission cytogénétique complète, nous avons arrêté le traitement {notre système transfusionnel est défaillant pour la production des concentrés plaquettaires} et proposé une surveillance jusqu'à la normalisation de la thrombopénie mais le patient a été perdu de vue et n'est revenu que trois ans sept mois après en rechute clinique. Il a été remis sous traitement, et il n'est plus revenu pour le contrôle cytogénétique jusqu'à son décès.

4-2 PATIENT N° 2

4-2-1-Hémogramme au diagnostic

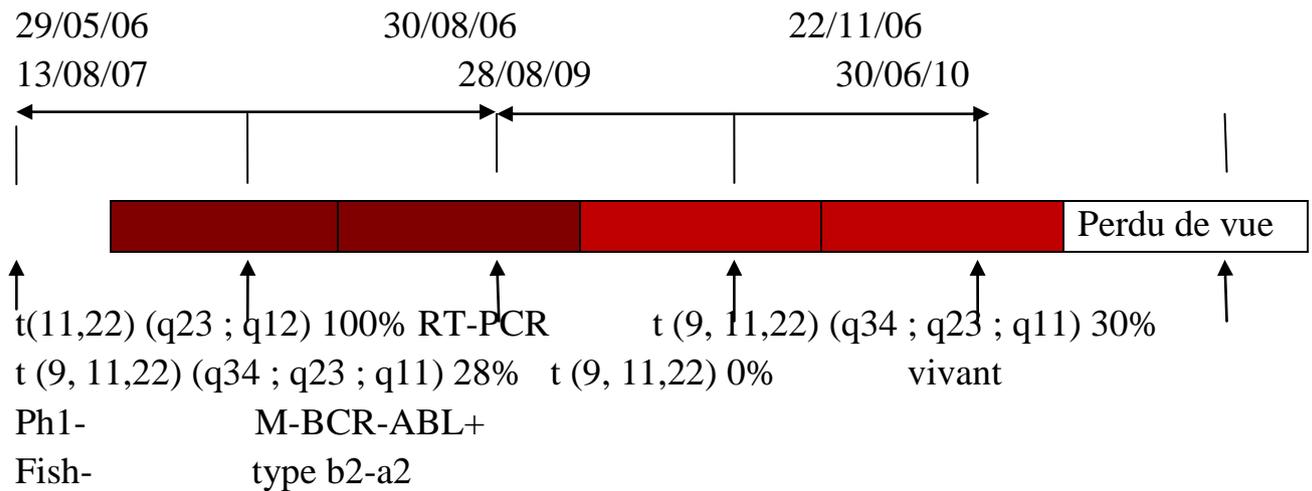
GR	Hb	Hte	VGM	TGMH	CCMH	PQ	GB
$3,12 \cdot 10^6/\text{mm}^3$	11,1g/dl	39,3%	126 fl	35,6pg	28,2%	$423 \cdot 10^3/\text{mm}^3$	$810 \cdot 10^3/\text{mm}^3$

4-2-2-Evolution clinique et hématologique



Le diagnostic clinique et hématologique a été fait le 27/04/06 mais le traitement a débuté le 12/06/06 pour des raisons financières et de contraintes d'inclusion. Il n'y a donc pas d'échec thérapeutique comme le laisserait croire le temps écoulé.

4-2-3-Evolution du caryotype



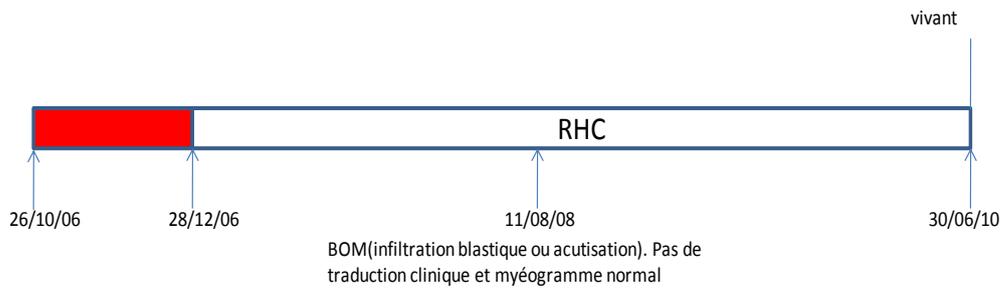
Les critères d'inclusion ne nous permettaient pas d'inclure le patient avec les premiers résultats du caryotype et de la FISH même si sur le plan clinique et hématologique nous avons conclu à une LMC. Nous avons fait un traitement d'épreuve pendant un mois et comme c'était concluant, nous avons demandé une RT-PCR qui a confirmé le diagnostic et cela nous permis d'inclure le patient. Le caryotype de contrôle du 22/11/06 a démasqué la translocation complexe et en changeant les sondes DNA, marquage direct bicolore double fusion (Q-Biogène) utilisées lors de la première FISH par les sondes Vysis/ABBOT, le gène chimérique.

4-3 PATIENT N° 3

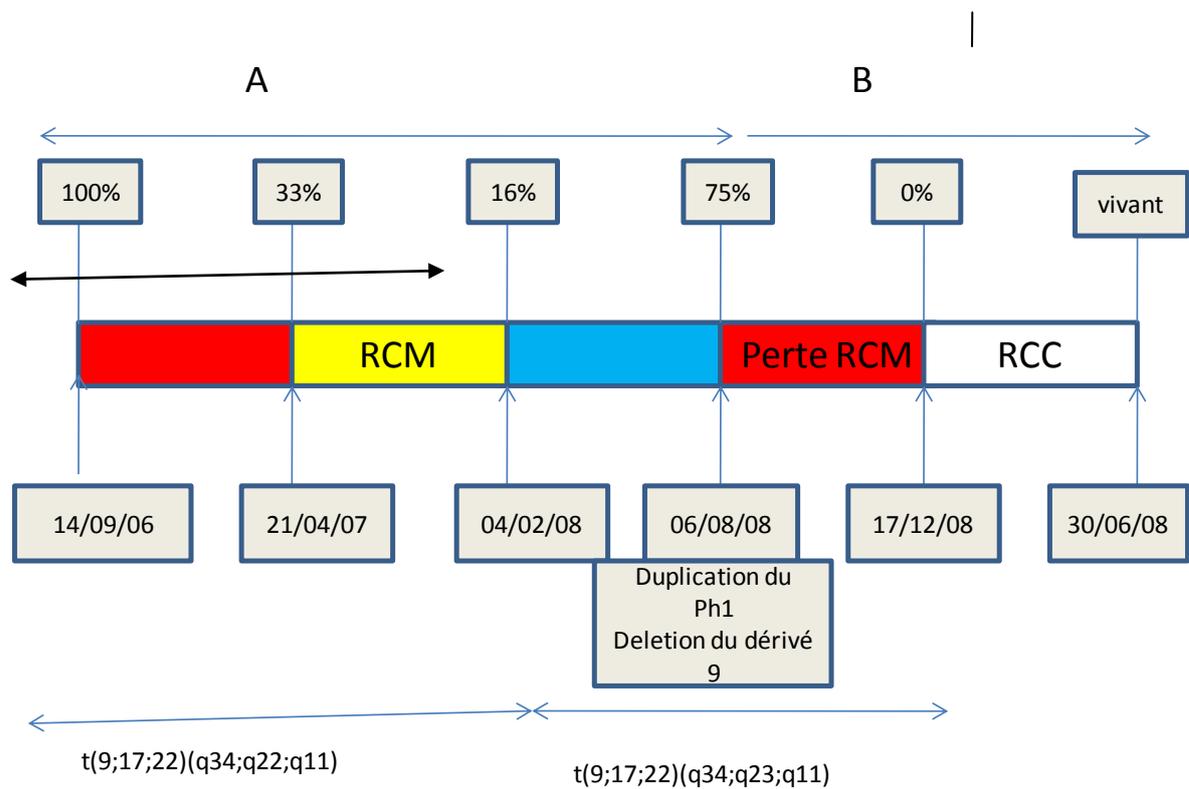
4-3-1-Hémogramme au diagnostic

GR	Hb	Hte	VGM	TGMH	CGMH	PQ	GB
$3,20 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$	09g/dl	28,4%	89fl	28 pg	32 %	$141 \cdot 10^3 / \text{mm}^3$	$348,7 \cdot 10^3 / \text{mm}^3$

4-3-2- Evolution clinique et hématologique



4-3-3-Evolution du caryotype.



B= traitement par le Nilotinib

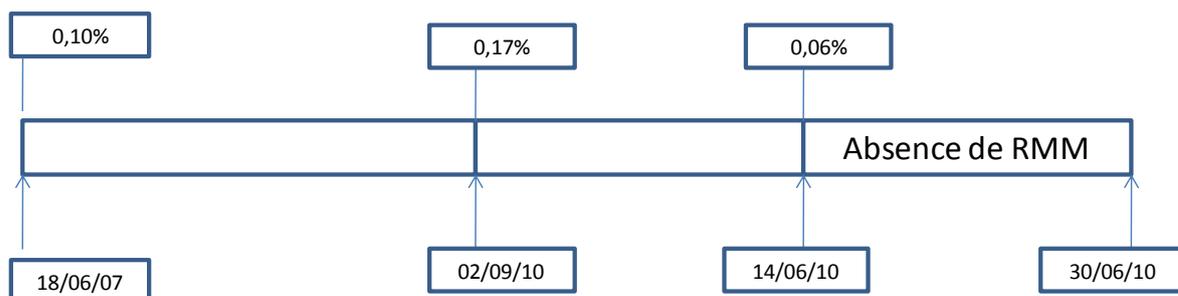
A= traitement avec Imatinib (Glivec*)

Le changement de traitement est lié à l'échec thérapeutique avec l'Imatinib.

4-3-4-FISH

14/09/06 (100% Ph1 + 17/09/07 (27% des cellules ont présenté et 25% des cellules ont présenté une délétion du der 9) une duplication du Ph1 dans toutes les cellules Interphasiques)

-Evolution RQ-PCR

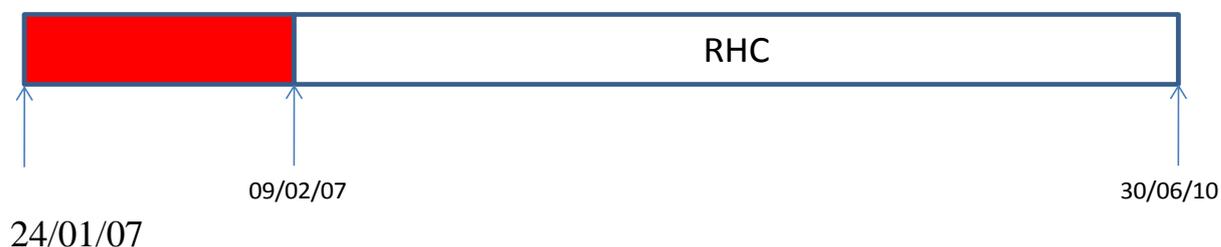


4-4 PATIENT N° 4

4-4-1-Hémogramme au diagnostic

GR	Hb	Hte	VGM	TGMH	CGMH	PQ	GB
$3,33.10^6/mm^3$	8,7g/dl	27,7%	83 fl	26 pg	31 %	$199.10^3/mm^3$	$351,7.10^3/mm^3$

4-4-2-Evolution clinique et hématologique.



4-4-3-Evolution du caryotype

Les translocations ont été décrites dans toutes les leucémies, 24,2% des leucémies aiguës lymphoblastiques, toutes translocations confondues, 4,6% des cas leucémies aiguës myéloblastiques ont une translocation t(8,21) et 1,5% ont une translocation t (15,17) et toutes les leucémies myéloïdes chroniques ont une translocation impliquant le 9 et le 22. (6,7). Les translocations variantes simples ou complexes représenteraient 5-10% des cas de LMC(8) certains disent 2 à 10% de toutes les LMC (9) et d'autres disent 3-8% des LMC (10). Nous, nous avons trouvé 4 variants sur 17 soit 23,52% de notre effectif. Il a été rapporté (9) que le pronostic clinique et la présentation hématologique des LMC avec variant cytogénétique n'étaient pas différents de la forme classique de LMC.

Dans notre série, les circonstances de découverte sont presque toujours des complications et en phase chronique précoce ; complications que nous avons rarement rencontrée dans les formes classiques.

Sur le plan hématologique, un des patients découvert en phase chronique tardive avait une hyperleucocytose majeure et une splénomégalie énorme que nous n'avons rencontrée dans aucune forme classique en phase chronique tardive ou accélérée. Il a été dit que dans les formes classiques ou dans les variants simple ou complexe le lieu de cassure sur le chromosome 9 et sur le 22 était respectivement en q34 et en cas q11, mais dans le cas du patient n^o2 le premier caryotype a retrouvé une translocation en q12 sur le 22 et q23 sur le 11 avec une absence de mise en évidence du gène BCR-ABL à l'hybridation in situ. Ce patient paradoxalement répondait bien à l'Imatinib et ce qui nous a conforté à faire une RT-PCR qui a confirmé le diagnostic par la mise en évidence du transcrite BCR-ABL et le second caryotype a mis en évidence la translocation complexe t (9, 11,22) avec les points de cassure classique sur le 9 et le 22. Est ce que c'est le traitement qui a démasqué cette translocation ou bien c'est l'évolution normale de l'instabilité chromosomique qui en est responsable ?(11).

Le mécanisme de survenue des variants complexes cytogénétiques des leucémies myéloïdes chroniques fait l'objet de controverses (12,13). Si le traitement d'épreuve n'avait eu lieu, cette translocation allait-elle apparaître ? Les caryotypes de ce patient ont confirmé ce qui a été déjà dit (2,14). Les variants simples sont en réalité des variants complexes. Trois patients (patient 1, 2,4) ont eu des translocations impliquant les chromosomes 9,11 et 22 mais le lieu de cassure sur le chromosome 11 est différent pour chacun d'eux (q24, q23, p13). q 23 et q24 ont été décrits comme des lieux de cassure récurrents sur des translocations complexes(13), quand à p13, il n'a pas été décrit spécifiquement, il est dit qu'il ya un lieu de cassure sur le bras court du chromosome 11 mais sans précision sur la région et la bande(14). L'évolution clinique et cytogénétique des trois patients n'a pas été la même.

Le premier a présenté le complexe variant dès le premier caryotype qui a disparu sous traitement et secondairement est apparu la translocation classique t (9 ; 22) avec les lieux de cassure classiques sur le 9 et le 22. Ce second clone a disparu aussi sous traitement. Ceci signifie que la translocation complexe est survenue secondairement a la translocation classique. Le traitement en les éliminant a fait apparaître les cellules souches totipotentes portant la translocation primitive. Autrement dit si un caryotype avait été fait juste au début de la maladie et sans traitement cible, dans l'évolution on verrait apparaître la translocation complexe. Traditionnellement ce qui est décrit c'est la translocation classique qui secondairement se complique d'une translocation complexe ou bien il y a une mosaïque au départ qui disparaît sous traitement. Ce malade a malheureusement disparu après la rémission cytogénétique et n'est revenu que trois après en rechute clinique et nous n'avons pas eu l'opportunité de faire un caryotype pour apprécier le caryotype de rechute avant son décès.

Le second patient a posé un problème de diagnostic parce que le caryotype de départ a mis en évidence un variant simple avec un lieu de

cassure sur le 22 qui n'était pas classique q12 et non q 11 et qui expliquerait que la sonde utilisée pour l'hybridation in situ ait été incapable de mettre en évidence le gène hybride BCR-ABL. Des problèmes financiers ne nous ont pas permis de faire immédiatement la RT-PCR pour la recherche du transcrite de fusion et nous amené à faire un traitement d'épreuve avec le Glivec pour voir si c'était effectivement une LMC. Son second caryotype a permis de mettre en évidence la translocation complexe avec les lieux de cassure classique sur le 9 et le 22 ; et le chromosome Philadelphie. C'est possible que lors du premier caryotype, la translocation était non télomérique, donnant un Ph1 masqué. Le traitement a provoqué un événement qui a conduit à une translocation télomérique, permettant de découvrir le Ph1 et la translocation complexe lors du second caryotype. Ce patient a évolué positivement sous traitement mais a disparu après la rémission cytogénétique pour des raisons économiques.

Le troisième patient n'a pas changé de nature sur le plan cytogénétique jusqu'à son départ de notre équipe mais était en échec thérapeutique sous Glivec. Ce qui nous amène à nous poser la question comme J.L Huret (12), le site de cassure sur le chromosome additif dans les translocations variantes simples ou complexes contiennent ils des oncogènes ou des anti- oncogènes ou des gènes de facteurs de croissance ou de cytokines ou d'hormones qui influencerait sur l'évolution de la maladie ? En effet si le gène hybride BCR-ABL est le même dans les translocations classiques et complexes, ce n'est pas la même chose sur le dérivé 9 classique et le dérivé 9 des formes complexes.

Le dernier patient (patient n°3) a eu une t (9 ; 17 ; 22) (q34 ; q22 ; q11) qui dans l'évolution sous Imatinib a donné une t (9 ; 17 ; 22) (q34 ; q23 ; q11) avec duplication du Ph1 et délétion du dérivé 9 qui connu pour être un facteur de mauvais pronostic dans la LMC(9).

Si la délétion du dérivé 9 est vraiment un facteur de mauvais pronostic, naturellement les formes variantes peuvent ne pas avoir le même pronostic

que les formes classiques car leurs dérivé 9 ne sont pas les mêmes. L'implication du chromosome 17 se voit surtout chez les femmes, ici c'est un homme. Les lieux de cassure 17q22 et 17q23 ne sont décrits comme des lieux de cassure récurrents. Ce patient a eu un score de Sokal de haut risque, il a eu un priapisme avec perte de la fonction de son organe, il a été en échec sous Glivec et est maintenant sous Nilotinib. Il est en rémission cytogénétique dans le temps sous Nilotinib mais sans rémission moléculaire après 22 mois de traitement par Nilotinib. L'évolution de ce patient confirme que la délétion du dérivé 9 est un facteur de mauvais pronostic dans la LMC.

La distribution des variants cytogénétiques est variable en fonction des pays et pour le même pays(15) on en trouve presque pas en Italie, beaucoup en Angleterre avec une fréquence allant de 2,27 % à Londres jusqu'à 15,1% à Nottingham et pas du tout à Canterbury et Edinburg. En France sa fréquence est de 4,3% en général avec un taux atteignant 9,6% dans le centre est de la France et 2,3% dans les autres régions du pays. Dans notre série deux sont Burkinabè, un Mauritanien et un Camerounais. La série est tellement petite que nous ne pouvons tirer une conclusion de l'influence géographique sur la prévalence des complexes variants de leucémie myéloïde chronique.

VI- CONCLUSION

La caractéristique clinique des variants complexes que nous avons rencontrés est : qu'ils ont tous un score de Sokal de haut risque, leur circonstance de découverte sont des complications. La présentation hématologique est peu différente des formes classiques.

Leur évolution cytogénétique tend à confirmer que le mécanisme de survenue des complexes variants se déroule en plusieurs étapes. Leur caractéristique thérapeutique par les anti-tyrosines kinases n'est pas différentes des formes classiques.

VII-BIBLIOGRAPHIE

1. Zhong Chen, Rodman Morgan, Carol S. berger, Lori Pearce-Birge, John F.Stone, and Avery A. Sandberg. Identification of masked and variant Ph (complex Type) Translocations in CML and classic Ph in AML and ALL by Fluorescence in Situ Hybridization with the Use of bcr/abl cosmid. *Probes Cancer Genet cytogenet* 70 :103-107 (1993)
2. J.L.Huret , J.L Bresson, D.Couet, J.Tanzer. Aberrant translocations in chronic myelogenous Leukaemia with hidden chromosome 9 or 22 involvement. *Ann Genet*, 1987,30,No3,175-177.
3. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Soverini S. European leukemianet Response definitions and European leukemianet management recommendations. *Clinical Haematology*, volume 22 page 331-341 (September 2009)
4. Usman M, Syed NN, Kakepoto GN, Adil SN, Khurshid M. Chronic phase chronic myeloid leukemia: response of Imatinib mesylate and significance of Sokal score, age and disease duration in predicting the hematological and cytogenetic response. *J. Assoc Physicians India*.2007 Feb; 55:103-7
5. Les principales complications biologiques des traitements des cancers.
Santemaghreb.com le guide de la médecine et de la sante en Algérie
6. Peter H. Fitzgerald. Complex Ph translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer genet and Cytogenet* 55:129-131 (1991).
7. C.R. Bartram. Rearrangement of bcr and c-abl Sequences in Ph-positive Acute Leukemias and Ph-negative CML an update. *Haematology and Blood transfusion .vol 31 .Modern Trends in Human Leukemia VII*). Edited by Neth, Gallo, Greaves, and Kabisch. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1987
8. Ana Valencia, José Cervera, Esperanza Such, Eva Barranga, Pascual Bolufer, Oscar Fuster, Rosa Collado, Jesús martinez, and Miguel A. Sanz. Complex Variant t (9, 22) chromosome translocation in five cases of chronic myeloid leukemia *Advances in Hematology Volume 2009 (2009)*, article ID 187125

9. Letter to the editor Chronic myeloid leukemia with a novel four-way t (6, 13, 9, 22) (p21; q32; q34; q11.2) successfully treated with Imatinib mesylate. *Cancer genet and Cytogenet* 201 (2010)135-136
10. Christine M.Morris, Ingrid Rosman, Susan A. Archer, Jill M. Cochrane, and Peter Fitzgerald. A cytogenetic and molecular analysis of five Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 35:179-197 (1988)
11. Mohamad Sami JOHA. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine Kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique. Université du droit et de la Santé-Lille 2 15 décembre 2009(Thèse)
12. Alfonso Zaccaria et al. Chromosome abnormalities additional to the Philadelphia chromosome at diagnosis of chronic myelogenous leukemia: pathogenetic and prognostic implications. *Cancer Genet. and Cytogenet.* 199(2010) 76-80.
13. Letter to editor regarding the article "chromosome abnormalities additional to Philadelphia chromosome at diagnosis of chronic myelogenous leukaemia: pathogenic and prognostic implications". *Cancer Genet and Cytogenet* 203355-356 (2010)
14. J.L.Huret. Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum Genet* (1990)85:565-568
15. M. De Braekeleer. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid Leukemia. *Cytogenet Cell Genet* 44:215-222 (1987)

VIII-ANNEXE

PROCEDURE D'ORGANISATION GENERALE DU SECTEUR DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

a-Organisation des locaux et équipements

L'accès des locaux destinés à la P.C.R. est strictement réservé au personnel du laboratoire. Les portes sont maintenues fermées.

Le principe de base régissant l'organisation des locaux est la séparation entre les étapes intervenant avant l'amplification génique (pièce pré-P.C.R.) et après l'amplification (pièce post-P.C.R.).

a-1-Secteur pré-PCR

Le secteur pré-P.C.R. comporte trois pièces distinctes :

- Une pièce N°1 réservée à la congélation et extraction des échantillons (hotte n°1) : secteur vert-bleu.
- Une pièce N°2 réservée à la manipulation des réactifs (paillasse n°2) : secteur blanc.
- Une pièce N°3 réservée à la manipulation des cibles (cA.D.N. et A.R.N.) (hotte n°3) : secteur jaune.

Une couleur est attribuée à chaque secteur. Le matériel dédié à chaque secteur est étiqueté selon ce code couleur et ne doit en aucun cas être déplacé dans des secteurs de couleur différente. Après lavage et décontamination, les portoirs et pipettes d'un secteur donné doivent y retourner.

a-1-a-Pièce n°1 : zone congélation-extraction des ARN (zone **vert bleu**)

Matériel : hotte chimique pour la manipulation des réactifs contenant du phénol-chloroforme.

Opérations réalisées : Congélation ; extraction.

Matériel présent sous la hotte : *le matériel de congélation est bleu, le matériel d'extraction est vert*, Jeu de pipettes réservé ; cônes stériles (protégés) ; tubes

eppendorff stériles ; un portoir vert pour extraction ; un portoir bleu pour réceptionner les échantillons à congeler ; marqueurs pour identification des tubes ; agitateur type vortex ; centrifugeuse *minifuge* ; porte-coton stériles ; Pissettes HCL dilué H2O distillée.

Equipement du manipulateur : sur-blouse réservée à cette hotte, gants.

Paillasse pour l'extraction d'A.D.N.

Matériel présent sur la paillasse : Jeu de pipettes réservé ; cônes stériles (protégés); tubes eppendorff stériles ; un portoir vert pour extraction; marqueurs pour identification des tubes ; Agitateur type vortex ; centrifugeuse *minifuge* ; tubes *FALCON* 50ml ; tubes bouchons rouges ; pipettes pasteur.

Etuve sèche réservée au séchage des ARN/ADN en cours d'extraction.

accès réservé : aux manipulateurs, au dépôt des échantillons à congeler (après ficoll) à déposer sur le portoir bleu.

Mode opératoire extraction des A.R.N totaux par le réactif Trizol

Objet

Cette procédure décrit la technique d'extraction et de conservation des A.R.N. totaux à partir d'un échantillon de cellules.

Objectif

Permet d'obtenir des A.R.N. de qualité en vue de la détection ultérieure de transcrits de fusion.

Principe

A partir des culots cellulaires, les A.R.N. totaux sont extraits afin de pouvoir réaliser la recherche de réarrangement génique par P.C.R. après une étape de transcription inverse. Le réactif Trizol, solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, permet d'extraire les A.R.N. totaux des cellules tout en maintenant leur intégrité pendant les phases d'homogénéisation et de lyse des cellules. L'addition de chloroforme et la

centrifugation permettent de séparer les ARN présents dans la phase aqueuse, de l'ADN et des protéines contenus dans la phase organique.

Procédure d'extraction

Prélèvement

Echantillon :

Cinq [5] ml de sang prélevé au niveau de la veine centrale du pli du coude ou de la moelle dans des flacons TEMPUS de 10 ml pour la conservation de L'ARN. (Si le prélèvement doit voyager au moins dix heures avant d'arriver au laboratoire.) Si le lieu de prélèvement et celui du laboratoire n'est pas éloigné, le prélèvement peut se faire sur des tubes EDTA)

L'extraction est réalisée à partir des échantillons cellulaires congelés.

Réactifs

Trizol Reagent : Invitrogen Life Technologies Réf. : 15596-018

Stocké et aliquoté (tube de 10 ml) à +4°C dans le réfrigérateur.

Chloroforme : Ready Red Réf. : 130 321(Chloroforme+Alcool isoamylique+colorant rose)

Stocké dans le placard P2 et aliquoté (tube de 10 ml) à -20°C dans le réfrigérateur (freezer).

Isopropanol : (ou 2-propanol) C₃H₈O ; Réf. : VWR INTERNATIONAL: 20 839 297

Stocké dans le placard P2 et aliquoté (tube de 10 ml) à -20°C dans le réfrigérateur (freezer).

Ethanol 75% (Diluer l'éthanol absolu C₂H₆O dans de l'eau). Réf.: CARLOERBA REAGENT.

Stocké dans le placard P2 et aliquoté (tube de 10 ml) à -20°C dans le réfrigérateur 4 (freezer).

RNASE out. (In Vitrogen Réf.: 10777-019 (40U/ μ l) ; Conc : 40 U/ μ l.
MAINTENIR DANS LA GLACE LORS DE L'UTILISATION.
Stockée à -20°C dans le réfrigérateur (freezer).

4-3-Mode opératoire d'extraction proprement dit.

Manipulation à effectuer sous la hotte n°1 zone verte (hotte « congélation-extraction »)

Précautions indispensables.

Mettre des gants et une sur-blouse.

Travailler sous la hotte aspirante, vitre de la hotte abaissée.

Travailler à froid.

Jeter impérativement tout matériel souillé par le Trizol (embouts, pipettes,...) dans le container réservé à cet usage et situé sous la hotte. Ce container doit être correctement fermé avant et après usage.

→ Préparation des culots

Prévoir un petit container contenant de la glace pilée (porte 23) pour chaque patient. Mettre ces containers dans un grand bac contenant de la glace. Laisser décongeler l'échantillon dans la glace pendant un quart d'heure environ.

Vortexer jusqu'à homogénéisation complète.

Ajouter :

160 μ L de chloroforme pour 0,8 ml de Trizol

200 μ L de chloroforme pour 1 ml de Trizol

240 μ L de chloroforme pour 1,2 ml de Trizol.

Vortexer pendant 15 secondes.

Laisser reposer 5 min dans la glace.

Centrifuger à 12.000 g (au maximum) à +4°C pendant 15 min.

→Précipitation

Identifier et dater un tube eppendorf stérile (qui contiendra la solution d'ARN définitive).

Transférer la phase supérieure aqueuse qui contient l'A.R.N. dans ce tube. Bien pipeter au centre le maximum de solution en évitant de pipeter l'interphase.

Bien mesurer le volume transféré pour pouvoir ajouter un volume identique d'isopropanol.

Ajouter le même volume en isopropanol maintenu au froid (-20°C).

Vortexer fortement.

Déposer dans le tubier vert « spécial extraction » et maintenir :

-soit à -20°C une nuit (le mieux).

-Soit à -20°C pendant 15 min (moins bien).

-Soit à +4°C pendant 15 min (moins bien).

Garder un tubier réservé uniquement à cet usage dans le congélateur pré-PCR (ne jamais le sortir)

Centrifuger à 12 000 g à +4°C pendant 15 min.

→Lavages

Éliminer le surnageant.

Ajouter 1 ml d'éthanol 75% sorti du -20°C au dernier moment.

Vortexer.

Centrifuger à 8000g à +4°C pendant 10 min.

→Séchage

Éliminer le surnageant.

Sécher les parois du tube avec du coton tige stérilisé puis mettre le culot à l'étuve (située à gauche de la hotte) à 65°C pendant 3 min.

Ajouter :

30 μL d'eau distillée stérile: pour les prélèvements > 10 millions (25 μL pour les prélèvements entre 5 et 10 ; 15 μL pour les prélèvements pauvres $< 5 \text{ M}$)

1 μL de *RNASin* (RNASE inhibiteur) maintenu dans la glace.

Mélanger très longuement à la pipette pour s'assurer d'avoir solubilisé tout l'A.R.N.

(Par vortex, *minifuge* et pipette plusieurs fois). La solution doit bien monter dans la pipette.

→*Dosage au spectrophotomètre.*

Appareil NANODROP-1000 programmé pour la lecture directe du dosage de l'A.R.N.

Rendement d'extraction attendu:

1 μg d'A.R.N. pour 1×10^6 de cellules congelées.

Si la concentration est $> 1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ou 1500 ng/ μL , diluer l'A.R.N. dans de l'eau distillée, puis doser à nouveau.

Si le nombre de cellules est élevé et le rendu du dosage faible, il est nécessaire de doser à nouveau après avoir replacé le tube 5 min au four ; homogénéiser, doser, diluer de nouveau si nécessaire et doser de nouveau.

NB : Le ratio (indicateur de pureté) doit se situer entre **1.8 et 2.0** .Tout écart à partir de ces valeurs indique la présence d'impuretés.

→ Conservation.

Congeler les solutions d'A.R.N. dans le petit congélateur à -80°C porte 21; puis lorsque la boîte est pleine, la transvaser dans la **salle des congélateurs**.

Le stockage de toutes les boîtes « A.R.N. » se trouve dans la salle des congélateurs.

Transporter les cellules dans de la glace afin d'éviter la décongélation.

Pièce n°2 : secteur "mix et réactifs"(secteur blanc)

Opérations réalisées :

Préparation des réactifs ; dilutions des solutions mères d'amorces P.C.R ; préparation des mix de RT ; préparation des mix d'amplification ; distribution des mix.

→Matériel présent sur la paillasse :

Jeu de pipettes réservé.

Cônes stériles protégés ; tubes eppendorf stériles (500 µL et 1,5 ml) ; portoirs blancs ; marqueurs pour identification des tubes ; minifuge ; ampoules d'eau stérile ; plaques blanches de 96 puits.

→Équipement du manipulateur :

sur-blouse réservée à cette hotte

gants.

Accès interdit :

-aux échantillons biologiques, A.D.N., A.R.N., contrôles internes, RT, ...

-à tout matériel provenant d'un autre secteur du laboratoire.

c. Pièce n°3 : Secteur "cibles" (Secteur jaune)

Hotte ADN/ARN permet une décontamination par rayonnement UV.

Opérations réalisées :

dilution des A.R.N.

distribution des A.R.N. dans les mix de RT

distribution des cD.N.A.

Matériel :

Jeu de pipettes réservé; cônes stériles protégés; tubes *ependorff* stériles;
Marqueurs pour identifier les tubes ; Pissettes HCL dilué, H2O distillée.

Manipulateur :

sur-blouse réservée à cette hotte
gants.

B-Secteur post-PCR (secteur rouge)

a-paillasse N°1 "post-PCR"

Opérations réalisées : électrophorèse des produits d'amplification

*Matériel :

Jeu de pipettes réservé (étiqueté rouge)

Cônes non protégés (analyse des produits PCR) ; tubes *ependorff* stériles
(500 µl et 1,5 ml) ; marqueurs pour identification des tubes ; matériel pour
électrophorèse (agarose, acrylamide) ; cuves électrophorèse ; four micro-
ondes ; générateur.

Manipulateur :

blouses réservées au secteur post PCR
gants.

****Mode opératoire électrophorèse en gel d'agarose.**

Objectif

Décrire toutes les étapes techniques de l'étape d'électrophorèse des produits de RT-P.C.R.

Principe

Après la RT-P.C.R., le produit de l'amplification est visualisé sur un gel d'agarose qui permet la résolution des fragments en fonction de leur taille.

3. Réactifs pour l'électrophorèse.

Poudre d'agarose (Invitrogen) ;

TBE 1X

Marqueur de taille biotinylé (PROMEGA).

Pour évaluer la taille des transcrits entre 100 et 1000 Pb.

Chaque lot contient : - 250 µl de MT biotinylé
 - 250 µl de tampon de charge (bleu)

BET Ethidium Bromide 10 mg/ml (SIGMA).

4. Mode opératoire de l'électrophorèse proprement dit.

4.1. Préparation du gel d'agarose à 2%

Insérer les 2 embouts en plastique de chaque côté de la plaque et mettre le peigne sur une extrémité.

.Placer la plaque sur un support de mise à niveau.

.Mettre 50ml de TBE 1X dans un Erlenmeyer puis ajouter 1g d'agarose.

.Remuer puis faire chauffer au four micro onde. Renouveler l'opération plusieurs fois jusqu'à ce que le mélange soit totalement translucide.

.Ajouter 4 μ L de BET (bien homogénéiser le mélange).

ATTENTION : Mettre des gants nitrile.

.Couler le gel dans la plaque puis attendre 30 min.

.Lorsque le gel est solidifié, retirer les 2 embouts en plastique et le peigne puis placer la plaque dans la cuve.

.Ajouter du TBE 1X jusqu'à immersion totale du gel.

Préparation, dépôts des échantillons et migration

.Dans des petits tubes safe-lock : mélanger 2 μ L de tampon de charge + 10 μ L de produit P.C.R. Prévoir un tube avec 2 μ L de tampon de charge + 10 μ L de marqueur de taille.

.Déposer 10 μ L du mélange dans chaque puits, puis faire migrer à 150 V.

Faire le dépôt du côté du pôle négatif (la migration allant du « moins » vers le « plus »).

NB : pour un grand gel d'agarose, doubler les quantités de réactifs.

c.Paillasse N°2 "post-PCR"

Opérations réalisées : photo des gels.

*Matériel :

lecteur UV, analyseur d'image.

Bac à BET.

Manipulateur :

blouses réservées au secteur post P.C.R.

gants nitrilés.

****Photo du gel :**

Déposer le gel sur le transluminateur ("Num" de l'appareil), allumer la lumière ordinaire de l'appareil puis l'écran et l'imprimante qui sont l'un au dessus de l'autre à droite, ajuster la position du gel et la taille de l'image avec la roulette du haut au milieu.

Eteindre la lumière ordinaire et allumer les UV sur 100%, appuyer sur le bouton "acq/sat" pour commencer l'acquisition, puis faire varier l'intensité sur l'écran avec les boutons + et - à gauche de l'écran. Lorsque l'image est satisfaisante, appuyer sur "freeze" éteindre les U.V., faire une sortie papier de l'image ("print") et un enregistrement sur disquette ("Save").

Mettre la photo dans le classeur.

C. LES CIRCUITS

C.1 La règle

Contrôler :

tout ce qui entre dans le secteur pré-P.C.R.

tout ce qui sort du secteur post-P.C.R.

Ce contrôle repose sur une organisation rigoureuse de la circulation des personnes et du matériel entre les différents secteurs.

La circulation du matériel se fait exclusivement dans le sens :

Pré-P.C.R. → Post-P.C.R.

C.2 Manipulateurs

En théorie :

Une personne ayant travaillé dans le secteur post-P.C.R. doit éviter de retourner en secteur pré-PCR dans la même journée.

En pratique :

Respecter impérativement 2 précautions si l'on vient de la pièce de post-P.C.R. :

Changer de blouse (la blouse de post-P.C.R. ne doit pas entrer dans la pièce de pré-P.C.R.).

Se laver les mains en entrant en pré-P.C.R.

C.3 Matériel

Le matériel de laboratoire, ainsi que cahiers de paillasse, stylos, photos, fiches techniques, calculettes, (etc...) ne doivent pas circuler entre les secteurs.

C.4 Nettoyage

Le circuit pré-PCR puis post-PCR doit être appliqué également au nettoyage des locaux et paillasses:

Un matériel de nettoyage est réservé à chaque secteur.

Le nettoyage des paillasses se fait muni de gants en latex.

Le personnel de ménage :

Ne doit nettoyer que les sols, les extérieurs des hottes et les portes des placards.

Doit toujours nettoyer la pièce pré-P.C.R. en premier.

Pour la post-P.C.R., nettoyer 2 fois /semaine les poignées des placards, portes...

Doit utiliser un produit de nettoyage adapté.

Le nettoyage des paillasse est sous la responsabilité des utilisateurs :

Nettoyer la paillasse au Surfanios tous les matins.

Le nettoyage quotidien des paillasse doit respecter un ordre précis :

.nettoyage du secteur pré-P.C.R. : secteur blanc puis secteurs vert et jaune

.nettoyage du secteur pos

C.5 Stockage

Les réactifs de pré-P.C.R. sont stockés en pré-P.C.R.

Les réactifs de post-P.C.R. sont stockés en post-P.C.R.

D. MODE OPERATOIRE

D.1 Précautions générales

Les réactifs doivent être conservés sous forme d'aliquotes à usage unique.

Jeter les aliquotes entamés.

Les cD.N.A. positifs sont distribués en premier.

Les témoins négatifs sont distribués en dernier ; le témoin négatif est le meilleur système pour détecter les contaminations. Il doit contenir tous les éléments nécessaires à une réaction de PCR sauf la matrice.

Fermer le tube après addition du cD.N.A. ou d'A.D.N.

Eviter les longues séries.

Ne jamais préparer le même jour une série de patients à analyser et la préparation des contrôles positifs (lignée K562...).

Le jour de la préparation des témoins positifs, être encore plus vigilant.

D-2.Matériel et réactifs :

Privilégier :

le matériel jetable

les réactifs industriels prêts à l'emploi (tampon Taq, MgCl₂, ...).

Ceci afin d'éviter les contacts entre matériel pré- et post amplification au niveau des laveries ou balances.

Choisir des réactifs, qualité "biologie moléculaire" et du matériel "RNase free/DNase free".

La sur-blouse est utilisée exclusivement pendant les P.C.R. ou les manipulations d'échantillons destinés à la P.C.R. Les sur-blouses sont changées tous les soirs.

D-3.Déroulement d'une RT-PCR

a. Secteur pré-P.C.R.

Pour toutes les manipulations en **pré-P.C.R.**, mettre une sur-blouse correspondant à la hotte utilisée et des gants.

A partir de ce moment et jusqu'à la fin de la manipulation, le manipulateur ne doit pas :

.Toucher son visage ou ses cheveux (ou, dans ce cas, changer de gants)

.sortir de la pièce (même si le téléphone sonne)

.répondre aux questions d'un interlocuteur (donc ne pas parler au technicien en cours de manipulation)

. « Emprunter » le matériel dédié à un poste de travail.

En **zone jaune**

Préparer les dilutions d'A.R.N. sous la hotte n°3 (secteur jaune).

Linéariser 10 min à 70°C dans un thermocycleur. Pour cela, ôter la sur-blouse correspondant à la hotte n°3 et remettre sa propre blouse. Aller déposer les tubes dans le thermocycleur.

En zone blanche

Remettre la sur-blouse correspondant à la paillasse n°2, sortir les réactifs nécessaires à la RT et les laisser décongeler sur la paillasse N°2 (zone blanche). Sortir l'enzyme en dernier. Préparer le mix RT (zone blanche).

Passer de zone blanche à **zone jaune**

Sortir le portoir contenant les tubes (toujours ouverts) dessous de la paillasse n°2 et, sans poser le portoir, transférer les tubes sur un portoir de la paillasse "cibles" : hotte n°3 (secteur jaune).

Changer de sur-blouse et distribuer l'ARN linéarisé récupéré dans le thermocycleur selon les mêmes modalités que précédemment décrites sous la hotte n°3 (secteur jaune).

Puis en zone blanche

Pour la PCR, mettre la sur-blouse dédiée à cette paillasse, sortir les réactifs nécessaires (sauf la Taq polymérase) et les laisser décongeler sur la paillasse n°2. La Taq polymérase sera mise dans la glace. Cependant, c'est une *Taq* dite « hotstart » dont l'activité ne se déclenche pas à température ambiante mais à haute température.

Disposer les tubes P.C.R. (eppendorf 0,5 ml) sur le portoir.

Après décongélation, bien mélanger au vortex les réactifs sauf la Taq polymérase.

Passer de la zone blanche à la **zone jaune**

Enlever le portoir contenant les tubes (toujours ouverts) de la paillasse N°2 et, sans poser le portoir, transférer les tubes sur un portoir de la paillasse "cibles": hotte n°3 (secteur jaune).

Remettre le portoir sur la paillasse n°2 (zone blanche).

Jeter les aliquots de réactifs entamés et ranger les enzymes (*Taq polymérase*).

En zone jaune

Changer de sur-blouse puis distribuer les cD.N.A. en utilisant des cônes à filtres.

Fermer soigneusement chaque tube après ajout de la cible.

En cas de contact entre du matériel biologique et les gants, changer immédiatement le gant souillé.

Nettoyer immédiatement au l'HCl dilué et rincer à l'eau.

Mise en route de la P.C.R.

Enlever la sur-blouse et remettre sa propre blouse.

Disposer les tubes dans l'appareil P.C.R. en les enfonçant bien (attention au chevauchement des bouchons).

Lancer le programme désiré.

Revenir dans la pièce « pré-PCR » en laissant la sur-blouse à l'entrée. Mettre celle de la hotte N°3, ranger la paillasse "cibles".

Oter gants et sur-blouse.

Mettre les UV en route.

Fin de la PCR

Lorsque la P.C.R. est terminée, les tubes sont sortis de l'appareil et apportés dans le secteur post-PCR (secteur rouge). Les produits P.C.R. se conservent bien à température ambiante. Si gardés à +4°C, réserver une étagère pour les produits de P.C.R.

Aucun tube P.C.R. ne doit jamais être ouvert en pré-P.C.R.! En cas d'ouverture accidentelle d'un tube après la P.C.R., prévenir le manipulateur concerné et décontaminer soigneusement l'appareil et les surfaces environnantes au SURFANIOS ou à la javel diluée.

b-Secteur post-P.C.R. :

Toutes les manipulations se font avec des gants et en évitant de disséminer les produits amplifiés.

Jeter les produits de P.C.R. après analyse.

D-4.Déroulement d'une RQ-PCR

Secteur pré-P.C.R.

La transcription inverse se déroule de la même manière que décrit ci-dessus.

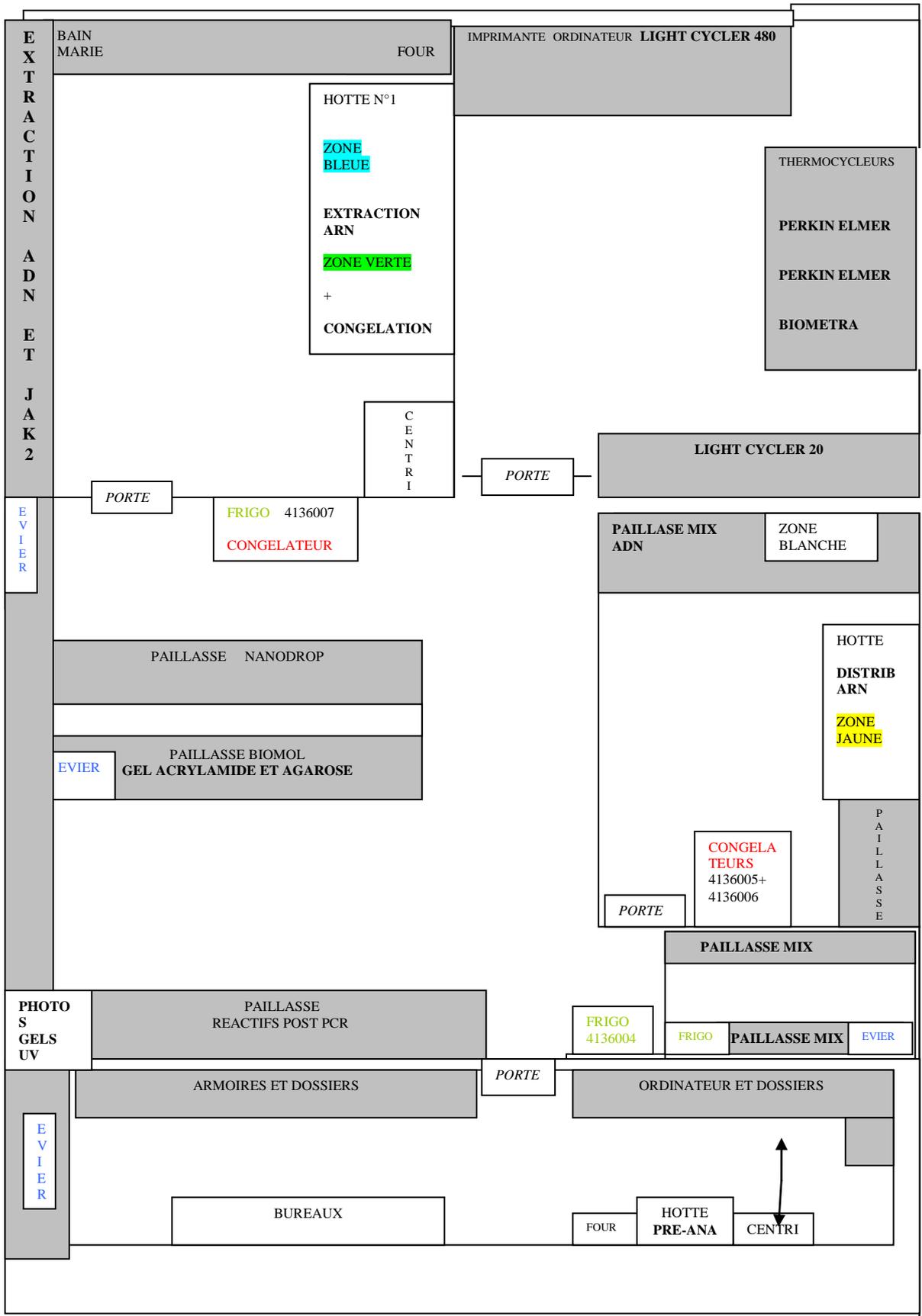
Pour la préparation de la P.C.R., les mêmes précautions sont prises que précédemment .Le mix est préparé et distribué sur plaque sur la paillasse N°2 et le cD.N.A. ainsi que les plasmides distribués sous la hotte N°3 avec les sur-blouses correspondantes.

Attention : les plasmides sont très contaminants !!! Prendre des précautions très rigoureuses.

Secteur PCR

On quitte la pièce « pré-P.C.R. » avec la plaque, pour se rendre dans la pièce « réserve » afin de déposer la plaque dans le Light Cycler 480. La sur-blouse « Light Cycler » est remise afin de déposer la plaque dans l'appareil. Lorsque la PCR est commencée, on quitte la pièce « réserve » en enlevant la sur-blouse « Light Cycler » et en remettant sa propre blouse.

Figure 8 : Type d'organisation d'un laboratoire de biologie Moléculaire dans un Hôpital. [Centre Hospitalier Universitaire de Purpan Toulouse France]



La retrotranscription

1. OBJET

Ce mode opératoire décrit les étapes de la technique de retrotranscription.

2. DOCUMENTS

Modes opératoires des appareils relatifs à la technique
Enregistrements techniques associés

3. PRINCIPE

Cette technique permet de copier en présence d'une amorce et d'une transcriptase inverse une molécule d'ARN simple brin en une molécule d'A.D.N. simple brin complémentaire (A.D.N.c ou cD.N.A.) de la séquence d'A.R.N. messenger.

4. ETAPES DE LA TECHNIQUE

4.1. Linéarisation de l'A.R.N

Calculer le volume d'A.R.N. à pipeter (en μL) en fonction de la concentration en A.R.N. en sachant qu'il faut pour la RT 1 μg d'A.R.N. Pour cela, on divise 1000 par la concentration en $\text{ng}/\mu\text{l}$. Ce volume correspond au volume d'ARN à utiliser pour un tube de RT.

Exemple : pour une concentration à 1500 $\text{ng}/\mu\text{l}$, on devra prélever $1000/1500 = 0,66 \mu\text{L}$.

Compléter les colonnes avec le nom du patient, la date, le nombre de cellules et la nature du prélèvement, le volume d'A.R.N. à rajouter (calculé ci-dessus) et le nombre de tubes de RT à préparer par patient. Le logiciel calcule la quantité d'A.R.N. et d'eau à mélanger pour chaque patient pour un volume final de 10 μl .

Nom	Prénom	Date Prél.	Nature Prél. et quantité cellules	RATIO (260/280)	ARN ng,µL	VOLUME ARN µL	H2O QSP (µL)	R7
		28-mars	SG 8M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		28-mars	SG 13M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		28-mars	SG 6M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		28-mars	SG 0,9M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		28-mars	SG 7,6M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		28-mars	SG 2,8M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		28-mars	SG 6,4M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		29-mars	SG 8M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		29-mars	SG 6M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		29-mars	SG 4,5M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		29-mars	SG 9,7M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		29-mars	MO 15M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		29-mars	SG 15M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		30-mars	SG 15M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		30-mars	SG 15M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
		30-mars	SG 10M			#DIV/0!	#DIV/0!	1
						#DIV/0!	#DIV/0!	0
						#DIV/0!	#DIV/0!	0

Préparer les dilutions d'A.R.N. dans des tubes de 500 µL.

Linéariser pendant 10 min à 70°C.

Programme BIOMETRA , Subdirectory 5 Hémopathies programme 1.

Mettre les tubes dans la glace immédiatement après.

4.2.Rétrotranscription

Dans la pièce 21-2

- Préparer le mix Vilo :

MIX	c final	n=1	17
5X VILO Réaction			
Mix N° LOT:	1X	4	68
H2O		4	68
10X			
SuperScritEnzyme			
Mix	1X	2	34
RT +	<i>vol final</i>	<i>10</i>	<i>170</i>

- Récupérer les tubes stockés dans la glace.

Pièce 21-3 :

- Ajouter 10 µl de mix dans chacun des tubes.

Programme N°13 du thermocycleur BIOMETRA Subdirect 5 Hémopathies.

Utilisation	Temps/ Températures	Biometra
RT	10' à 25°C	Prog 13
	60' a 42°C	
	5' à 99°C	
à 4°C	

6.4 CONSERVATION DES cD.N.A.

Conservation à -20°C (1 an à $-\infty$) porte 21-3.