

N° d'ordre

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES DE LILLE
EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Nathalie LARDEUR - HENIC



ETUDE CYTOGENETIQUE ET MOLECULAIRE DES HEMOPATHIES
PRESENTANT UN CHROMOSOME PHILADELPHIE

Soutenue le 24 octobre 1997 devant la Commission d'Examen :

Président : Professeur G. SPICK
Rapporteurs : Docteur J.L. LAÏ
Professeur M. ZANDECKI
Examineurs : Professeur P. FENAUX
Docteur C. PREUDHOMME

A Frédéric,

qui a su se montrer très patient...

merci.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame et Messieurs les membres du Jury pour avoir pris de leur temps pour examiner et juger ce travail.

Je remercie le Docteur C. Preudhomme et le Professeur P. Fenaux pour m'avoir permis et aider à réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, dans le laboratoire d'Oncohématologie moléculaire U124 INSERM, dirigé par le Dr M.H. Loucheux-Lefebvre, après son départ en retraite, par le Dr J.P. Kerckaert, et, au laboratoire d'Hématologie A de l'hôpital Calmette de Lille, dirigé par le Professeur A. Cosson. Merci à eux pour m'y avoir accueillie.

Ce travail a été financé pendant deux ans par le Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille et par la région Nord-Pas-de-Calais. Je tiens à remercier ces deux organismes, et particulièrement Mlle L. Delille, sa secrétaire et Mme Tourvielle.

Je tiens à remercier le Dr M. Collyn-d'Hooghe, M. Lohez, le Dr M.H. Loucheux-Lefebvre, A. Mostaert, le Dr D. Marez, le Pr M. Zandecki pour leur disponibilité, leur soutien et surtout, leur générosité.

Un grand merci à Vincent Mouroux, Isabelle Huvent, Claudine Bernard, Marielle Cavrois, Eric Wattel et Bruno Quesnel pour leur nombreux conseils.

Je tiens également à remercier tout le personnel de l'U124 INSERM et de l'IRCL, et plus particulièrement : Florence, Laurent, Emmanuelle, l'équipe du « haut » ; ainsi que tout le personnel du laboratoire d'hématologie A de l'hôpital Calmette de Lille, et plus particulièrement : Anne, Roselyne, Bertrand, Germaine, Barbara, Corinne, Philippe et Cathy pour les moments de détente partagés.

**ETUDE CYTOGENETIQUE ET
MOLECULAIRE DES HEMOPATHIES
PRESENTANT UN CHROMOSOME
PHILADELPHIE**

PLAN

INTRODUCTION	10
GENERALITES	14
<u>I- Les principales caractéristiques de la leucémie myéloïde chronique (LMC).</u>	14
I-1- Les caractéristiques de la phase chronique.	14
I-2-La transformation de la maladie.	16
I-3- Les cellules souches de LMC.	17
I-4- Pronostic et traitements.	18
<u>II- Les principales caractéristiques de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) associée à la présence du chromosome Philadelphie (LAL Ph+).</u>	20
II-1- Principaux aspects clinico-biologiques.	20
II-2- Phénotype membranaire des LAL Ph+.	21
II-3- Pronostic et traitements.	22
<u>III- Le chromosome Philadelphie (Ph), résultant de la translocation t(9;22) (q34;q11).</u>	23
III-1- Historique.	23
III-2- Moyens d'étude.	23
III-3- Incidence au niveau des LMC et des LAL.	25
III-4- Description « moléculaire».	27
III-4-1- Le proto-oncogène c-abl.	27
III-4-2- Le gène bcr.	29
III-4-3- Le gène de fusion bcr-abl.	29

III-5- Fonctions biologiques.	31
<i>III-5-1- La protéine c-ABL (p145^{c-abl}).</i>	31
III-5-1-a- <u>Structure.</u>	31
III-5-1-b- <u>Fonctions biologiques.</u>	32
<i>III-5-2- La protéine BCR (p160^{bcr}).</i>	35
III-5-2-a- <u>Structure.</u>	35
III-5-2-b- <u>Fonctions biologiques.</u>	36
<i>III-5-3- Les protéines de fusion p210^{bcr-abl} et p190^{bcr-abl}.</i>	36
III-5-3-a- <u>Localisation.</u>	36
III-5-3-b- <u>Fonctions biologiques.</u>	37
III-5-3-c- <u>Corrélations entre la structure et les fonctions</u>	
<u>biologiques.</u>	39
III-5-3-d- <u>Les protéines substrats de BCR-ABL.</u>	42
III-6- <i>bcr-abl</i> et phénotypes de leucémies.	46
III-7- Conclusion.	48
MATERIELS ET METHODES	50
<u>I- Les techniques de cytogénétique conventionnelle.</u>	51
<u>II- Les techniques de biologie moléculaire.</u>	52
I-1- la technique de Southern.	52
<i>I-1-1-Présentation des différentes sondes utilisées.</i>	52
II-1-1-a- <u>Sondes couvrant la région M-bcr.</u>	52
II-1-1-b- <u>Sondes couvrant la région m-bcr.</u>	53
<i>I-1-2- Présentation des principales étapes de cette technique.</i>	54

II-2- La technique d'hybridation « in situ » en fluorescence ou FISH	
(« fluorescence in situ hybridization. »).	57
II-3- Les techniques d'amplification génique ou PCR (« polymérase	
chain reaction ») couplées à une technique de transcription inverse (RT).	59
<i>II-3-1- Préparation des culots cellulaires.</i>	59
<i>II-3-2- Extraction des ARN cellulaires totaux.</i>	60
<i>II-3-3- Transcription inverse ou « retrotranscription » (RT).</i>	61
<i>II-3-4- Détection des transcrits b3a3.</i>	63
<i>II-3-5- Détection des transcrits b3a2, b2a2 (« nested » PCR).</i>	64
<i>II-3-6- Détection des transcrits e1a2 (« semi-nested » PCR).</i>	65
<i>II-3-7- Analyse des différents produits d'amplification.</i>	66
<i>II-3-8- Les problèmes de contamination.</i>	66
II-4- La technique de RT-PCR compétitive.	67
<i>II-4-1- Préparation du standard interne de coamplification.</i>	67
II-4-1-a- <u>Préparation des culots cellulaires.</u>	68
II-4-1-b- <u>Extraction des ARN cellulaires totaux.</u>	68
II-4-1-c- <u>Amplifications géniques grâce aux couples d'amorces :</u>	
<u>3SABIE et Bcr1/3AS.</u>	68
II-4-1-d- <u>Réaction de PCR grâce au couple d'amorces Bcr1/AblE</u>	
<u>sur ces fragments d'ADN amplifiés (Bcr1/3AS et 3S/AblE) et purifiés.</u>	72
II-4-1-e- <u>Ligature de fragments d'ADN amplifiés et purifiés de</u>	
<u>399 pb (Bcr1/AblE) dans un vecteur plasmidique pBluescript II SK +/- (2961</u>	
<u>pb).</u>	73
II-4-1-f- <u>Amplification du standard interne de coamplification par</u>	
<u>transformation bactérienne.</u>	75

II-4-1-g- <u>Vérification de la présence de la délétion de 8 pb, étape de séquençage.</u>	78
II-4-2- Présentation des différentes réactions de RT-PCR.	79
II-4-2-a- <u>Préparation des culots cellulaires à partir de prélèvements de sang ou de moelle.</u>	79
II-4-2-b- <u>Les deux types d'amplification génique : ABL2-Abl3 et BcrA1-Abl3.</u>	79
II-4-2-c- <u>Le rendement d'amplification.</u>	85
II-4-2-d- <u>Les problèmes de contamination.</u>	85
II-4-2-e- <u>Analyse des différents produits d'amplification.</u>	86
II-5- La technique d'Inverse PCR.	90
II-5-1- Préparation des culots cellulaires.	90
II-5-2- Extraction de l'ADN génomique.	90
II-5-3- Digestion de l'ADN génomique par l'endonucléase de restriction NlaIII.	93
II-5-4- Ligature.	95
II-5-5- PCR exponentielle (b2-2/b4).	96
II-5-6- PCR linéaire (b6 ou « Run of »f).	97
II-5-7- Analyse des produits d'amplification obtenus.	98
RESULTATS ET DISCUSSION	99
<u>I- Etudes réalisées pour l'aide au diagnostic des hémopathies.</u>	100
I-1- Les LMC classiques et les LMC sans chromosome Philadelphie.	100

I-2- Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) et LMC : deux entités distinctes ?	102
I-3- Incidence du Ph dans les LAL de l'enfant.	104
I-4- Recherche par les techniques de RT-PCR de transcrits chimères e1a2, b2a2 et b3a2 à partir de culots cellulaires fixés dans un mélange de méthanol et d'acide acétique (3/1), en vue d'une étude cytogénétique.	105
<u>II- Etude de la maladie résiduelle.</u>	107
II-1- Les différents méthodologies de suivi de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LMC.	108
<i>II-1-1- Etude qualitative par technique de RT-PCR chez des patients ayant reçu une greffe allogénique de moelle non « déplétée » en lymphocytes de type T. Comparaison des résultats obtenus avec ceux apportés par technique de cytogénétique conventionnelle.</i>	108
II-1-1-a- <u>Présentation des patients.</u>	108
II-1-1-b- <u>Méthodologie.</u>	109
II-1-1-c- <u>Résultats.</u>	109
<i>II-1-1-c-1- Le suivi clinique post-greffe.</i>	109
<i>II-1-1-c-2- Le suivi cytogénétique post-greffe.</i>	110
<i>II-1-1-c-3- Le suivi moléculaire.</i>	110
II-1-1-d- <u>Discussion.</u>	114
<i>II-1-2- Etude qualitative par technique de RT-PCR chez des patients traités par l'interféron alpha. Comparaison des résultats obtenus avec ceux apportés par technique de cytogénétique conventionnelle.</i>	119
II-1-2-a- <u>Patients et méthodologie.</u>	119
II-1-2-b- <u>Résultats.</u>	120

II-1-2-c- <u>Discussion.</u>	120
<i>II-1-3- Essais d'une étude quantitative par technique d' « Inverse PCR » associée à une technique de PCR compétitive.</i>	124
II-1-3-a- <u>Principe.</u>	124
II-1-3-b- <u>Méthodologie.</u>	125
II-1-3-c- <u>Résultats et discussion.</u>	125
II-1-3-d- <u>Partant du même principe, les résultats de quantification obtenus par J.G. Zhang et al..</u>	128
II-2- La maladie résiduelle chez des patients atteints de LAL Ph+.	129
<i>II-2-1- Etude qualitative par technique de RT-PCR. Comparaison des résultats obtenus avec ceux apportés par technique de cytogénétique conventionnelle.</i>	129
II-2-1-a- <u>Présentation des patients.</u>	129
II-2-1-b- <u>Méthodologie.</u>	130
II-2-1-c- <u>Résultats.</u>	131
II-2-1-c-1- <i>Le devenir clinique.</i>	131
II-2-1-c-2- <i>Les résultats des analyses par technique de cytogénétique conventionnelle.</i>	132
II-2-1-c-3- <i>les résultats des analyses par techniques de RT- « semi-nested » et « nested » PCR.</i>	132
II-2-1-d- <u>Discussion.</u>	134
<i>II-2-2- Essais d'une étude quantitative de la maladie résiduelle par technique de RT-PCR compétitive.</i>	137
II-2-2-a- <u>Principe.</u>	137

II-2-2-b- <u>Applications.</u>	137
II-2-2-c- <u>Discussion.</u>	139
II-2-2-d- <u>Présentation des résultats de quantification obtenus par différentes équipes.</u>	141
CONCLUSION	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149
ANNEXES	184

INTRODUCTION

Les leucémies sont des proliférations clonales hématopoïétiques associées à un blocage de maturation (leucémies aiguës, entraînant l'accumulation de blastes dans la moelle) ou sans blocage de maturation (leucémies chroniques, avec accumulation de cellules sanguines à divers stades de maturation).

Leur diagnostic fait appel aujourd'hui à un ensemble de méthodes ne reposant plus uniquement sur l'examen clinique et sur la cytologie classique (étude de l'hémogramme et du myélogramme). Celles-ci regroupent l'immunophénotypage (recherche d'antigènes spécifiques) essentiellement pour les leucémies aiguës, la cytogénétique conventionnelle (recherche sur des cellules en métaphase d'anomalies caryotypiques plus ou moins spécifiques) et la biologie moléculaire (recherche d'anomalies chromosomiques, d'anomalies structurales ou fonctionnelles de certains gènes, de certains transcrits, de certaines protéines...). La combinaison de ces différentes méthodes a permis l'identification de nombreux marqueurs moléculaires permettant de caractériser certains types de leucémie. On sait par exemple que certains types de leucémie aiguë lymphoblastique de type T sont associés aux translocations $t(10;14)$ (q24;q32) et $t(7;10)$ (q35;q24) avec comme conséquence l'activation du gène *HOXII* ; les leucémies promyélocytaires sont toujours associées à la $t(15;17)$ (q21-q11-22) entraînant la juxtaposition de deux gènes : *PML* (15q22) et *RAR α* (17q21), avec formation de transcrits de fusion et de protéines de fusion PML-RAR α . Les marqueurs moléculaires les plus étudiés actuellement correspondent au produit d'une translocation, la $t(9;22)$ (q34; q11). Au cours de cette translocation, la très grande majorité des séquences du gène *abl* (9q34) vont fusionner à des séquences du gène *bcr* (22q11). Il y a ainsi formation du gène de fusion *bcr-abl* sur le chromosome, que l'on nomme alors chromosome Philadelphie (Ph) (ou 22q-) et du gène de fusion *abl-bcr* sur le chromosome alors nommé 9q+. La transcription du gène de fusion *bcr-abl* permet la formation de différents types de transcrits

de fusion, traduits en deux protéines de fusion p210^{bcr-abl} et p190^{bcr-abl}. La majorité des cas de leucémie myéloïde chronique (LMC) et quelques cas de leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) sont associés à la présence du chromosome Ph.

Une leucémie est habituellement découverte lorsque la masse de cellules tumorales dépasse 10^{12} cellules. Les thérapeutiques mises en route, quelles qu'elles soient, auront pour but de diminuer suffisamment le nombre de cellules du clone tumoral, en espérant qu'en deçà d'un certain nombre (inférieur à 10^5) l'organisme sera capable d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles, permettant ainsi la reprise de croissance des précurseurs hématopoïétiques normaux. Les moyens d'apprécier rapidement, après l'instauration d'un traitement, la rémission de la maladie sont basés sur l'étude cytomorphologique du sang et de la moelle, mais aussi, lorsqu'il existe une anomalie caryotypique au diagnostic, sur une étude cytogénétique des cellules de la moelle ou du sang en métaphase. Avec de telles méthodes, le suivi de la masse tumorale n'est possible que pendant une période très courte pendant ou après l'instauration d'un traitement. Elles ne suffisent pas pour évaluer le risque de rechute pouvant exister plusieurs années après l'instauration d'un traitement, c'est à dire pour évaluer au mieux la quantité de cellules tumorales résiduelles persistant dans l'organisme, que l'on appelle maladie résiduelle, ceci bien avant que le myélogramme et/ou le caryotype ne redeviennent anormaux. Pour que cette évaluation soit possible, il est nécessaire d'avoir recours d'une part à des marqueurs moléculaires spécifiques du type de pathologie étudiée, d'autre part à des techniques de détection sensibles. L'une de ces techniques permettant ce type d'approche est la technique d'amplification génique ou PCR (« polymerase chain reaction»). Elle permet la détection d'une cellule tumorale sur un million de cellules normales.

Le travail que nous présentons ici s'insère dans la thématique de recherche et de développement des connaissances sur les hémopathies associées à la présence du

chromosome Ph et/ou des transcrits de fusion qui en découlent, tout autant que sur les moyens de mieux appréhender la maladie résiduelle dans ces différents types de pathologies.

Après avoir situé les principales leucémies présentant un chromosome Philadelphie, nous avons voulu définir sous l'angle moléculaire les gènes de fusion *bcr-abl* et les divers transcrits de fusion qui en sont la résultante. Les fonctions normales et pathologiques des gènes impliqués seront également abordées. Notre contribution technique sera ensuite présentée sous la forme d'une reprise des diverses méthodes permettant de mettre en évidence la translocation soit sous l'angle cytogénétique, soit sous l'angle moléculaire, par l'étude des gènes de fusion et des transcrits de fusion qui en découlent. Nous avons voulu insister plus particulièrement sur les principaux écueils techniques (ou les limites) de chaque méthode. Enfin, nous intégrerons nos résultats parmi ceux de la littérature.

GENERALITES

I- Les principales caractéristiques de la leucémie myéloïde chronique (LMC).

La LMC est un désordre clonal myéloprolifératif résultant de la prolifération des cellules souches myéloïdes pluripotentes (précurseurs des granuleux, des érythrocytes, des mégacaryocytes), sans blocage de leur maturation. Parfois l'on observe également une prolifération de cellules souches lymphoïdes. C'est une maladie acquise. Elle représente 7 à 15 % de tous les types de leucémies de l'adulte (1-5), sa fréquence annuelle est de 1 à 1,5 cas sur 100 000. Elle touche préférentiellement les hommes (2-4) et peut survenir à tout âge, avec toutefois une prédominance entre 50 et 60 ans. Trois phases de développement la caractérisent : la phase chronique, la phase accélérée et la phase blastique ou phase de transformation aiguë (TA).

I-1- Les caractéristiques de la phase chronique.

A la phase initiale de la maladie, appelée phase chronique, environ la moitié des patients présentent une splénomégalie, c'est à dire une rate augmentée de volume. Celle-ci est le siège d'une métaplasie myéloïde. D'autres signes cliniques sont parfois observables, mais plus rarement, car la maladie tend à être découverte de plus en plus précocément (surveillance en médecine du travail, bilans biologiques systématiques, moyens de diagnostic plus précis et plus spécifiques).

L'hémogramme, assez caractéristique, suffit très souvent pour faire le diagnostic. L'hyperleucocytose est variable, souvent importante (de 20 à $150 \cdot 10^9/l$). Celle-ci est constituée d'un grand nombre de polynucléaires neutrophiles et de cellules granuleuses

immatures, métamyélocytes et myélocytes essentiellement, avec très peu de myéloblastes et de promyélocytes.

Le myélogramme est très riche en cellules de la lignée granuleuse (plus de 90%) sans prédominance des promyélocytes et myéloblastes. On peut constater une augmentation du nombre des mégacaryocytes souvent de taille réduite.

Cette phase chronique peut être plus ou moins prolongée et contrôlée par les thérapeutiques. La prédiction de la durée de cette phase est possible grâce à l'utilisation de scores pronostiques, tel le score de Sokal (6-7). Celui-ci est formule mathématique prenant en compte l'âge, la taille de la rate, les taux de plaquettes, le pourcentage de blastes sanguins, l'hématocrite. Schématiquement, une classification des patients en plusieurs groupes peut être établie : la catégorie des patients à faible risque ayant un score inférieur à 0,8 avec une médiane de survie de 60 mois ; ceux à risque intermédiaire avec un score compris entre 0,8 et 1,2 ; ceux à risque élevé avec un score supérieur à 1,2 avec en moyenne une durée de survie de 32 mois. Sans traitement, la phase chronique dure en moyenne de 3 à 7 ans. Elle est suivie de phases plus agressives : la phase accélérée et la phase blastique.

I-2- La Transformation de la maladie.

Celle-ci survient inéluctablement après un nombre variable d'années et ce, de 2 manières.

Dans environ 30% des cas, on constate, sur une période courte allant de quelques semaines à quelques mois, une brusque augmentation de nombre de blastes sanguins et médullaires. On parle alors d'acutisation brutale ou de TA de la maladie. Le patient se présente comme si il avait une leucémie aiguë avec un nombre de blastes médullaires proche de 100%. Dans cette situation, les blastes sont très souvent des lymphoblastes avec un phénotype B et exprimant l'antigène CD10.

Dans les autres cas, on constate une résistance progressive au traitement, une persistance ou une réapparition progressive de la splénomégalie. Par ailleurs, l'hémogramme se modifie progressivement. On constate une augmentation du nombre de cellules immatures (myéloblastes et promyélocytes), une persistance ou une augmentation du nombre de granulocytes basophiles en autres. Le myélogramme montre lui aussi un excès croissant de cellules immatures. Après plusieurs mois un tableau de leucémie aiguë ou proche de celui-ci est retrouvé. En effet, souvent ce type d'acutisation est fait de blastes myéloïdes (myéloblastes uniquement ou encore, associés par exemple à des mégacaryoblastes responsables d'une fibrose médullaire plus ou moins nette).

A ce stade, la situation est toujours très grave et, quand on obtient une rémission avec un retour en phase chronique, elle est généralement de courte durée.

I-3- Les cellules souches de LMC.

L'origine clonale de la maladie a été démontrée par des techniques basées sur l'inactivation du chromosome X, d'abord par l'étude des isoformes de la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) puis par celle du polymorphisme des fragments de restriction avec analyse de la méthylation différentielle (8).

Au cours de la phase chronique de la maladie, l'expansion des cellules clonogéniques est une caractéristique de la cellule souche de LMC (9). Il existe une amplification extrêmement forte du clone leucémique au niveau du sang périphérique tandis qu'il persiste une grande quantité de cellules souches normales dans la moelle. Celles-ci ayant un avantage de de maintien par rapport aux cellules leucémiques (10, 11). Les bases physiopathologiques de la disparité entre compartiment sanguin et médullaire restent inconnues. Elles peuvent faire intervenir un déficit de l'adhésivité des cellules souches de LMC qui pourraient plus

facilement se détacher du stroma lors des changements de milieu ou l'inhibition sélective de ces dernières par un facteur stromal analogue.

Il a été démontré que si la plupart des cellules clonogéniques de LMC ont un phénotype engagé dans la différenciation (CD34+, HLA-DR+ et rhodamine fort), environ 20 à 30% des LTC-IC (cellules initiateuses de culture à long terme) de LMC ont un phénotype CD34+, HLA DR- ou rhodamine faible, similaire à celui observé au niveau des cellules normales (11). Cette observation est corrélée avec des approches de purification de cellules souches basées sur les marqueurs CD34 et HLA-DR démontrant la présence du transcrit *bcr-abl* dans les cellules hématopoïétiques primitives (CD34+/ HLA-DR-) (12).

I-4- Pronostic et traitements (13-16).

Des travaux ont montré la coexistence de cellules médullaires Ph + et de cellules médullaires Ph - au début de la maladie, par conséquent il paraît logique d'appliquer le plus tôt possible des thérapeutiques susceptibles de faire disparaître la population de cellules Ph+ ; car en fait il existe une relation de causes à effets entre les événements moléculaires liés à la présence du chromosome Ph et l'initiation et le développement de la maladie. Le but des traitements sera donc l'obtention de rémissions cytogénétiques et, si possible, de rémissions moléculaires.

Par le passé, les patients atteints de LMC étaient de très mauvais pronostic. Moins de 20% d'entre eux avaient une chance d'être en vie 5 ans après le diagnostic. De nos jours, du fait que le diagnostic est porté plus tôt, que de nouvelles thérapeutiques ont fait leur apparition (en plus des monochimiothérapies conventionnelles : hydroxyurée, busulfan sont apparues l'interféron alpha seul ou en association avec la cytosine arabinoside, la chimiothérapie

intensive, la greffe de moelle osseuse (allogénique ou autologue), la médiane de survie se situe entre 60 et 65 mois, le taux de survie à 3 ans varie entre 75% et 85% et à 5 ans entre 50 à 60%.

Cependant, seuls trois traitements sont capables d'entraîner des rémissions cytogénétiques : la greffe de moelle osseuse allogénique, les interférons et la greffe de moelle osseuse autologue. Seule la greffe allogénique, en dehors de quelques exceptions, est capable d'assurer une rémission moléculaire. Ces notions sont développées dans le chapitre « Résultats-discussion », pp : 99-143.

Il existe différents types de greffe allogénique : avec donneur apparenté ou avec donneur non apparenté. Deux types de greffe allogénique avec un donneur apparenté sont possibles : la greffe syngénique à partir d'un jumeau vrai et la greffe allogénique, avec un donneur ou greffe géno-identique : à partir d'un frère ou d'une sœur HLA compatible.

Concernant l'interféron alpha, l'évolution de la réponse à l'interféron alpha se fait suivant les critères développés par différentes équipes (17, 18, 19).

- Une rémission hématologique est dite complète, quand le taux des leucocytes est inférieur à $9 \cdot 10^9/l$, le taux des plaquettes est inférieur à $450 \cdot 10^9/l$, que l'on dénote l'absence de cellules immatures et la disparition de tous les signes et symptômes cliniques apparentés à cette maladie, telle qu'une splénomégalie palpable. Elle est dite partielle quand le taux de leucocytes a diminué de moitié par rapport à ce qu'il était avant l'application du traitement, inférieur alors à $20 \cdot 10^9/l$, ou s'il y a normalisation des leucocytes avec persistance d'une splénomégalie et de cellules périphériques immatures.

- Une réponse cytogénétique est dite minime, quand il y a persistance de 35 à 95% de cellules Ph+, après traitement. Elle est dite partielle, quand ce taux varie de 1 à 34% de cellules Ph+. Elle est dite complète, quand ce taux est de 0% . Une réponse cytogénétique

majeure peut inclure des réponses cytogénétiques complète et partielle, car l'estimation de ce stade est possible quand le taux de clones Ph⁺ est inférieur à 35%.

II. Les principales caractéristiques de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) associée à la présence du chromosome Philadelphie (LAL Ph⁺).

Les leucémies aiguës (LA) sont des proliférations malignes du tissu hématopoïétique caractérisées par une expansion clonale de cellules immatures : les blastes. Selon que ces blastes correspondent à des lymphoblastes ou des myéloblastes, on parle alors de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) ou de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) respectivement. Le diagnostic différentiel majoritaire entre une LAL et une LAM est l'absence d'activité de la myéloperoxydase dans les LAL.

Selon une classification établie par un groupe d'hématologistes français, américains et britanniques (« FAB Cooperative Group ») (20, 21), il existe trois types de LAL : les types L1, L2, L3. Les caractères ayant été pris en considération pour définir ces différents types de LAL sont la taille de la cellule, la morphologie du noyau, la présence de nucléoles, l'aspect de la chromatine, la quantité et la basophilie du cytoplasme.

II-1- Principaux aspects clinico-biologiques.

Chez l'adulte, le type de LAL le plus communément retrouvé est le type L2 (22). Le chromosome Philadelphie est retrouvé, selon les séries décrites dans la littérature, dans 25 à 30% des LAL de l'adulte (23-28). Sa présence est souvent associée à un taux plus élevé de

leucocytes sanguins (69% contre 40% respectivement) (29). Toutefois, ces données sont controversées par certains auteurs (30, 31). Ces différences peuvent être dues au nombre de patients étudiés et à leur âge.

Chez l'enfant, le type de LAL le plus communément retrouvé est le type L1. La découverte d'un chromosome Philadelphie est rare chez l'enfant et représente moins de 5% des cas de LAL à cet âge (26, 32, 33). Au diagnostic, la présence du chromosome Ph est souvent associée à des taux de leucocytes et de plaquettes élevés (32-34). Son association avec une localisation au niveau du système nerveux central (CNS) (32-34) et un type de la classification FAB (French-American-British) reste controversée (35).

II-2- Phénotype membranaire des LAL Ph+.

Il n'a pas été montré de différence majeure entre les blastes des LAL Ph+ des enfants et des adultes. Généralement, la lignée des précurseurs lymphoïdes de type B est impliquée (25), très rarement la lignée des précurseurs des lymphoïdes de type T (30). 70% de marqueurs spécifiques de la lignée myéloïde sont retrouvés quand il y a expression de la protéine de fusion p190^{bcr-abl}, contre 37% quand il s'agit de la protéine de fusion p210^{bcr-abl} (30).

Bien qu'ils soient également exprimés chez les patients atteints de LAL Ph-, les antigènes de surface les plus communément exprimés chez adultes et les enfants atteints de LAL Ph+ sont le CD10 (ou CALLA) et le CD19 (23, 24, 32, 33, 36). Il a également été décrit que, le CD34, antigène caractéristique des progéniteurs cellulaires présents habituellement dans moins de 1% des cellules normales de la moelle, peut être exprimé dans beaucoup de cas de LAL Ph+ (37). Cette expression permet d'émettre l'hypothèse d'une implication dans le processus de leucémogénèse de cellules souches pluripotentes ou de progéniteurs cellulaires

très précoces. Quelques marqueurs spécifiques des cellules malignes existent. Mori T. et *al.* (38) ont récemment décrit un anticorps (KOR-SA3544) pouvant reconnaître, parmi un pool de cellules lymphoïdes, les cellules portant le chromosome Ph.

II-3- Pronostic et traitements.

Aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte, un taux élevé de leucocytes et un âge avancé sont deux paramètres souvent associés à un très mauvais pronostic (22, 23, 39-41). Les caractéristiques cytogénétiques et immunophénotypiques des cellules leucémiques sont deux facteurs à prendre en considération, ainsi que le statut de la maladie dans le système nerveux central pour les LAL de l'enfant (42). Il n'en reste pas moins que la présence du chromosome Ph paraît être un élément pronostique très péjoratif, même en l'absence de ces différents signes de gravité (23, 25, 34, 39, 41, 43).

Les traitements s'avèrent être complexes, intensifs et généralement très toxiques (44-47). A cause de l'hétérogénéité de la maladie, en relation directe avec le pronostic, l'uniformisation des traitements n'est pas adéquate.

Tous les protocoles de chimiothérapie actuels partagent quatre objectifs : l'induction d'une rémission, la consolidation ou l'intensification de l'éradication des cellules leucémiques résiduelles, la prévention d'un développement possible d'une leucémie au niveau du CNS et le maintien du stade de rémission. Aussi bien chez les adultes que chez les enfants, les traitements par chimiothérapie intensive induisent des taux de réponse importants, similaires à ceux obtenus chez des patients atteints de LAL classiques, mais avec des taux de rechute élevés et ceci relativement tôt. Ces résultats (chez les enfants, comme chez les adultes) évoquent alors la nécessité de recourir à des approches thérapeutiques encore plus

intensives, telles que le greffe de moelle osseuse allogénique ou autologue. Ces différentes notions sont développées dans le chapitre « Résultats-Discussion », pp : 99-143.

III- Le chromosome Philadelphie (Ph), résultant de la translocation t(9;22) (q34;q11).

III- 1- Historique.

La découverte du chromosome Philadelphie (Ph) revient à Nowell et Hungerdorf en 1960 (48), sa caractérisation exacte à Rowley en 1973 (49). Le chromosome Ph (50) est le résultat de réarrangements chromosomiques : la translocation t(9;22)(q34;q11). Au cours de cette translocation, la très grande majorité des séquences du gène *abl*, situé sur le chromosome 9, au niveau de la bande q34, vont fusionner à des séquences du gène *bcr*, situé sur le chromosome 22, au niveau de la bande q11. Il y aura ainsi formation du gène de fusion *bcr-abl* sur le chromosome, que l'on nomme alors chromosome Ph (ou 22 q-) et du gène de fusion *abl-bcr* sur le chromosome alors nommé 9q+.

III-2- Moyens d'étude.

Différentes techniques permettent la détection du chromosome Philadelphie. Elles regroupent les techniques de cytogénétique conventionnelle et de biologie moléculaire.

Les techniques de cytogénétique conventionnelle, plus précisément la technique du caryotype, permet l'examen de cellules de moelle osseuse et/ou sanguines en métaphase. Elle présente l'avantage d'une grande spécificité. Le chromosome Philadelphie est souvent

détecté sans ambiguïté, sa présence est retrouvée dans 95% des cas de LMC. Concernant les LAL Ph+, la détection du Ph par la technique de cytogénétique classique ne s'effectue avec succès que dans 65 à 80% des cas (24, 39, 51). Chez de nombreux patients atteints de LAL Ph+, la moelle est souvent très difficilement aspirable : certains prélèvements seront très pauvres en cellules blastiques et, par ailleurs, les lymphoblastes sont très difficiles à maintenir en culture. Ainsi, le pourcentage de cellules leucémiques dans un échantillon de LAL Ph+ peut être faible, inférieur à 30%, alors que dans les échantillons de LMC la quasi-totalité des cellules étudiées est porteuse de l'anomalie chromosomique.

Différentes techniques de biologie moléculaire permettent la détection du chromosome Philadelphie ou, plus précisément la détection du gène de fusion *bcr-abl* et des transcrits chimères qui en découlent. Au niveau de l'ADN, on peut étudier les réarrangements du gène *bcr* grâce à la technique de Southern. L'étude des réarrangements du gène *abl* peut être réalisée grâce à la technique de Southern après électrophorèse en champs pulsés. Le gène de fusion *bcr-abl* peut être identifié « in situ » sur le chromosome par la technique d'hybridation « in situ » en fluorescence : la FISH (pour « Fluorescence in situ hybridization »). Au niveau de l'ARN, les différents transcrits chimères résultant de la transcription des gènes de fusion *bcr-abl* peuvent être détectés par la technique classique de Northern. Cette technique est largement supplantée de nos jours par la technique de RT-PCR (RT pour transcription inverse ou « retrotranscription » et PCR pour amplification génique ou « polymerase chain reaction »), technique de détection plus simple et plus sensible.

III-3- Incidence au niveau des LMC et des LAL.

Le chromosome Ph, sous sa forme classique, est présent dans environ 85% des cas de LMC. Sa détection permet de poser formellement le diagnostic. Cette anomalie chromosomique est acquise et clonale. Elle est présente dans toutes les cellules myéloïdes, ainsi que dans les lymphocytes de type B et quelque-fois dans les lymphocytes de type T. Dans 5% des cas, le chromosome Ph se trouve être impliqué dans des translocations complexes faisant intervenir plus de 3 chromosomes, dont les chromosomes 9 et 22. Dans 10% des cas, aucun chromosome Ph ne peut être détecté par les techniques de cytogénétique conventionnelle. L'absence de Ph ne peut être qu'apparente. En effet, il existe des cas Ph⁺ à fort mosaïcisme, avec un nombre relativement faible de cellules Ph⁺, il faut alors examiner un nombre suffisant de mitoses pour le trouver (52-55). Parmi ces patients, 50% présentent le réarrangement *bcr-abl* détectable par les différentes techniques de biologie moléculaire. Dans les autres 5% restants, bien que ces patients semblent présenter un tableau clinique de LMC, ils se trouvent être Ph⁻ et *bcr-abl* - (56, 57). Il s'avère, toutefois, que la plupart de ces patients ne présentent pas de LMC et appartiennent à un autre cadre proche ou identique à celui des syndromes myélodysplasiques (55, 58). Au moment de l'acutisation de la LMC, dans 80% des cas, des anomalies chromosomiques nouvelles, numériques et/ou structurales, s'ajoutent au Ph. Il existe une certaine corrélation entre ces anomalies chromosomiques et le type cytologique de l'acutisation. Dans les transformations myéloblastiques, on note surtout la duplication du Ph, une trisomie 8, un iso 17q et une trisomie 19 (anomalies acquises et clonales). Une atteinte du chromosome 7 (monosomie ou translocation) est rare (59). Dans les très rares TA à promyélocytes on peut retrouver une anomalie additionnelle, la t(15;17) (60). Dans les TA lymphoïdes on note le plus souvent une hyperploïdie rarement une hypoploïdie. On rencontre aussi mais beaucoup plus rarement

une duplication du Ph. Des atteintes du chromosome 7 et du chromosome 14 (14q+) sont aussi décrites (61, 62). D'autres anomalies moléculaires sont constatées. Liu E. *et al.* (63) ont décrit une activation par mutations ponctuelles des gènes appartenant à la famille de *ras* (*N-ras* et *H-ras*). Ahuja H. *et al.* (64) ont décrit des anomalies du gène p53, délétions et réarrangements dans 8 cas sur 34 de TA, dans une phase accélérée sur 4, et dans un cas sur 38 de phase chronique. En TA, les transcrits normaux du gène p53 ont été trouvés en quantité réduite ou n'ont pas été détectés dans 10 cas sur 16, et, étant donné ce que l'on sait du rôle supresseur de malignité de p53, ces faits ont peut-être une grande importance. Les raisons pour lesquelles ces anomalies chromosomiques et/ou génétiques apparaissent, et plus généralement les raisons qui font que presque toutes les LMC se transforment, restent encore largement inconnues.

Au niveau des LAL, le chromosome Philadelphie est retrouvé dans 25 à 30% des LAL de l'adulte (23-28, 65), 3 à 5% des LAL de l'enfant (26, 32, 33) et 2% des cas de leucémie aiguë myéloblastiques (LAM) (28). Après application de techniques de biologie moléculaire, les taux d'incidence de réarrangements *bcr-abl* varient entre 30 et 50% dans les LAL de l'adulte. Comme dans le cadre des LMC, des variantes de la translocation t(9 ; 22) ont été décrites. Au diagnostic, des anomalies additionnelles (-7, 7q-, réarrangements du 9, etc...) sont présentes dans environ la moitié des cas. Lors de l'évolution clonale, les anomalies additionnelles les plus fréquentes sont une monosomie 7, une duplication du Ph et beaucoup plus rarement une trisomie 8.

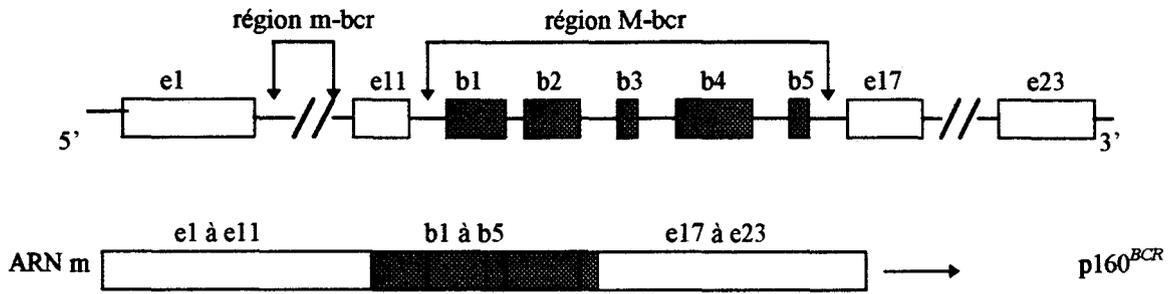
III-4- Description « moléculaire ».

Comme nous l'avons déjà expliqué, lors de la translocation, il y a formation de deux produits de recombinaison : le gène *bcr-abl* sur le chromosome Ph et le gène *abl-bcr* sur le chromosome 9q+. Que ce soit sur le chromosome Ph ou sur le chromosome 9q+ (son réciproque), les gènes *bcr* et *c-abl* fusionnent dans la même orientation transcriptionnelle, le cadre de lecture est conservé.

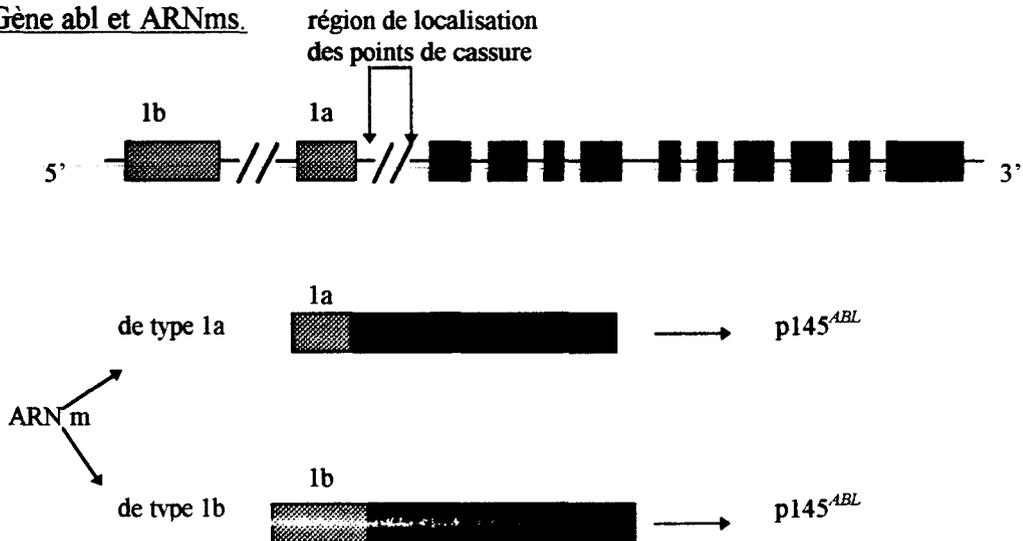
III- 4- 1- Le proto-oncogène *c-abl*. (figure 1, p : 28).

c-abl, localisé sur le chromosome 9 au niveau de la bande q34, comprend 12 exons et s'étend sur 250 à 300 kb (66). Il s'agit de l'homologue cellulaire de l'oncogène viral, *v-abl*, à l'origine de la leucémie murine d'Abelson sous la forme activée *gag-abl*. Il semble jouer un rôle particulier au niveau du développement des cellules hématopoïétiques. Après transcription et épissage alternatif (des exons de type Ia et Ib chez l'homme, et, des exons de type I et IV chez la souris), deux types d'ARN messagers (ARNm) ou transcrits sont produits chez l'homme et chez la souris. Ces ARNm codent deux protéines de 145 kDa (*p145^{abl}*) chacune, ne différant que dans leur partie N-terminale (Ib et Ia) et synthétisées dans la plupart des tissus (67).

Gène *bcr* et ARNm.



Gène *abl* et ARNms.



Les transcrits après translocation t(9;22) (q34;q11).

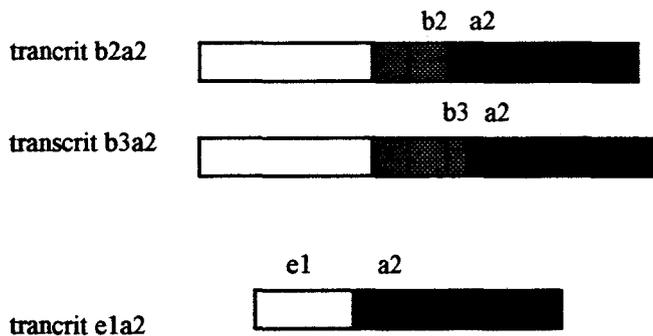


Figure 1 : Représentation schématique des gènes *bcr*, *abl* et des transcrits chimères b2a2, b3a2 et e1a2 résultant de la t(9;22) (q34;q11).

III-4-2- Le gène *bcr*.(figure 1, p : 28)

Le gène *bcr*, localisé sur le chromosome 22 au niveau de la bande q11, comporte 23 exons et s'étend sur environ 130 kb (28). La région promotrice de ce gène, riche en séquences GC, contient des sites de fixation pour la protéine Sp1 et ne possède pas de boîte TATA (68). Deux principaux types d'ARNm (de 4,5 et 6,7 kb) sont produits, ils ne diffèrent que dans leur partie non traduite. Le produit de traduction de ces ARNm est une protéine de 160 kDa (p160^{bcr}) exprimée dans de nombreux tissus (69).

III-4-3- Le gène de fusion *bcr-abl*.

Au cours de la translocation, au sein du gène *abl*, quelque soit le type de leucémie (LMC ou LAL Ph+), à de rares exceptions près, les points de cassure se situent entre les exons 1 et 2, au niveau du premier intron de 175 kb.

Au sein du gène *bcr*, dans la majorité des cas de LMC et dans environ 15 à 30% des cas de LAL Ph+, les points de cassure se situent au sein d'une région de 5,8 kb désignée sous le nom de M-*bcr* (pour « major breakpoint cluster region » (70-72). Cette région couvre les exons 12, 13, 14, 15 et 16 du gène *bcr* (exons b1 à b5 de M-*bcr*). L'analyse nucléotidique de cette région a mis en évidence des séquences caractéristiques pouvant expliquer un fort taux de recombinaison (73), comme une séquence Alu, une séquence riche en AT similaire aux origines de réplication virale, des séquences de recombinaison des gènes d'immunoglobulines. Deux principaux types de transcrits sont produits : b2a2 (fusion de l'exon b2 de M-*bcr* avec l'exon 2 du gène *c-abl*) et b3a2 (fusion de l'exon b3 de M-*bcr* avec l'exon 2 de *c-abl*). Dans 5 à 10% des cas de LMC, on peut retrouver dans la même cellule,

ces deux types de transcrits (ARNms) chimères. Ils comprennent toute la séquence codante de *c-abl* à l'exception de l'exon 1. Ils traduisent une protéine de 210 kDa ($p210^{bcr-abl}$). (figure 1, p : 28). Des auteurs (74-76) ont décrit chez certains patients atteints de LMC des transcrits chimères « atypiques » incluant l'exon 3 du gène *abl*, à la place de l'exon 2, fusionné avec l'exon b3 ou b2 du gène *bcr*. De très rares cas de LMC présentent le transcrit chimère e1a2 (77), et plus rarement un transcrit chimère e1a6 (74). Dans tous les cas, ces ARNm présentent un cadre de lecture, et peuvent donc traduire une protéine de fusion. L'identification de ces différents types de transcrits inusuels a deux implications. La première est que les protéines de fusion dérivant de ces transcrits, en dehors du fait qu'il leur manque un nombre variable d'acides aminés, ont un pouvoir oncogène. La deuxième est que leur détection par la technique de RT-PCR dépend du choix des amorces nucléotidiques.

Dans 70 à 85% des cas de LAL Ph+, les points de cassure se situent au sein du premier intron du gène *bcr* (78), région nommée « minor cluster region » ou m-bcr. Seul le premier exon du gène *bcr* participe à la translocation. Un seul type de transcrit chimère (7,5 kb) est retrouvé : e1a2 (fusion de l'exon 1 du gène *bcr* avec l'exon 2 du gène *abl*), il traduit une protéine de 190 kDa ($p190^{bcr-abl}$), (quelquefois encore appelée $p185^{bcr-abl}$) (figure 1, p : 28).

Il n'est pas certain que la transcription de *bcr-abl* ait lieu très tôt dans les cellules souches hématopoïétiques (79, 80). La transcription de *bcr-abl* est contrôlée par une séquence promotrice de *bcr* de 270 bp localisée en 5' de *bcr-abl* (81, 82). Cette région est similaire à celle située en 3' de l'exon 1 du gène *bcr* incluant le site donneur d'épissage. Il est également possible que les régions introniques de la région M-bcr régulent la transcription en liant des suppresseurs qui agissent comme des « silenciers » du promoteur du gène *bcr* (83).

III-5- Fonctions biologiques.

III-5-1- La protéine c-ABL (p145^{c-abl}).

Elle fait partie de la famille des tyrosines kinases, non-récepteurs de membrane et parmi celles-ci, certaines ont une activité oncogène potentielle (comme Src, Fps). (84)

III-5-1-a - Structure. (figure 2, p : 34)

De sa région N-terminale à sa région C-terminale, différents domaines peuvent être individualisés :

- La zone variable de myristylation est due aux exons 1 alternatifs de c-ABL. La protéine de type Ib peut se fixer aux membranes cellulaires par myristylation, la protéine de type Ia en est incapable.
- Suivent ensuite trois régions d'homologie de Src désignées sous le nom de « src-homology regions 2, 3 et 1 » (SH2, SH3 et SH1), ceci faisant de c-ABL une protéine de signalisation intracellulaire.

Le domaine SH3, d'environ 60 acides aminés, reconnaît des motifs riches en proline (85). Il interagit de façon constitutive avec des protéines possédant des motifs cibles.

Le domaine SH2, d'environ 100 acides aminés, permet la reconnaissance de motifs contenant une tyrosine phosphorylée (85).

Le domaine SH1 ou domaine tyrosine kinase (TK) est le siège de l'activité majeure de c-ABL.

- Le reste de la protéine, non retrouvée dans Src, présente sans doute une activité spécifique.
- La protéine c-ABL a une localisation cytoplasmique ou nucléaire (86, 87). Sa localisation nucléaire est possible grâce à un signal de translocation nucléaire (NTS) (86), dont la délétion entraîne une séquestration cytoplasmique (88).
- La région pré-carboxy terminale contient un large site de fixation à l'ADN : domaine D-B (pour « DNA binding ») (89).
- Les 162 derniers acides aminés de c-ABL permettent sa fixation sur des molécules d'actine polymérisées, domaine A-B (pour « acting binding ») (84, 88). En fait, cette fixation n'a lieu que lorsque la protéine est synthétisée en très grande quantité. Il convient de remarquer aussi que le domaine carboxy-terminal est très riche en prolines (88).

La protéine ABL peut donc être schématisée en deux régions, une zone NH₂-terminale, en partie similaire à Src, et une zone C-terminale essentielle à la localisation de la protéine au niveau du cytosquelette ou de l'ADN.

III-5-1-b- Fonctions biologiques.

L'inactivation des gènes par recombinaison homologue produit des mutants nuls par « perte de fonction ». Le gène cible n'étant plus exprimé, l'observation des conséquences de la mutation sur la souris transgénique permet d'appréhender les fonctions biologiques de la protéine. Si une telle mutation affecte *c-abl*, on constate la mort de souris homozygotes très rapidement après leur naissance. Une atrophie thymique et splénique est observée, ainsi qu'une leucopénie (90). Des souris dont le gène *abl* possède une mutation à l'origine d'une

protéine tronquée dans sa partie C-terminale, mais avec une activité tyrosine kinase conservée, présentent également une leucopénie et une mortalité néonatale (91). Le domaine fixant l'ADN et celui fixant l'actine participent à la fonction physiologique de c-ABL. On ne sait que peu de choses sur l'action de c-ABL au niveau du cytosquelette. En revanche, la fonction nucléaire de c-ABL est mieux cernée. Sa fixation à l'ADN suggère que c-ABL joue un rôle dans la transcription, la réplication de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire. Des travaux portant sur le rôle de c-ABL dans le cycle cellulaire ont montré que celle-ci est hyperphosphorylée pendant la métaphase. Cette phosphorylation correspond à la perte de son aptitude à fixer l'ADN (89). D'autres données indiquent que c-ABL exerce un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire (91). Au contraire, nous verrons que la protéine de fusion agit comme un régulateur positif de la croissance.

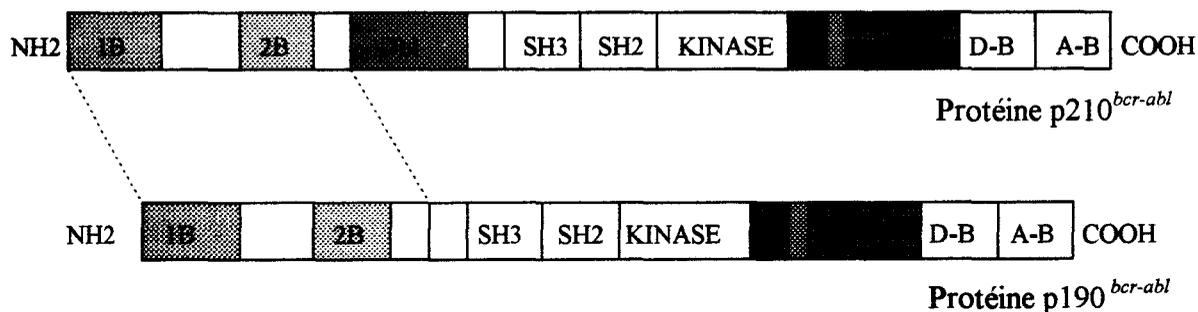
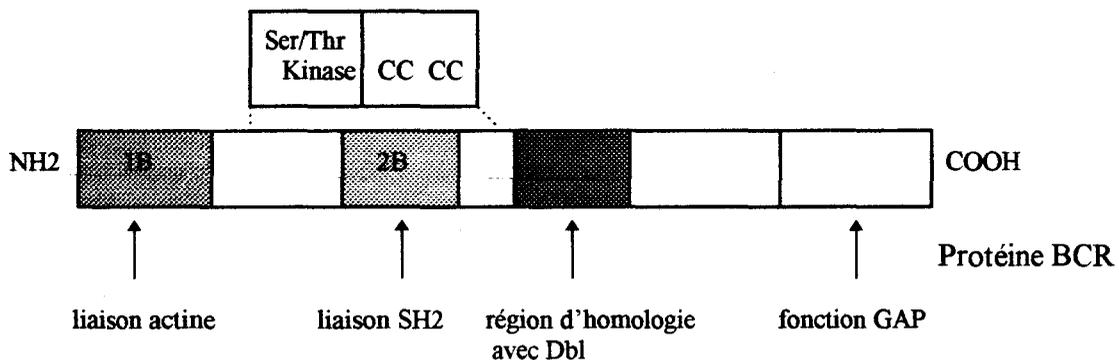
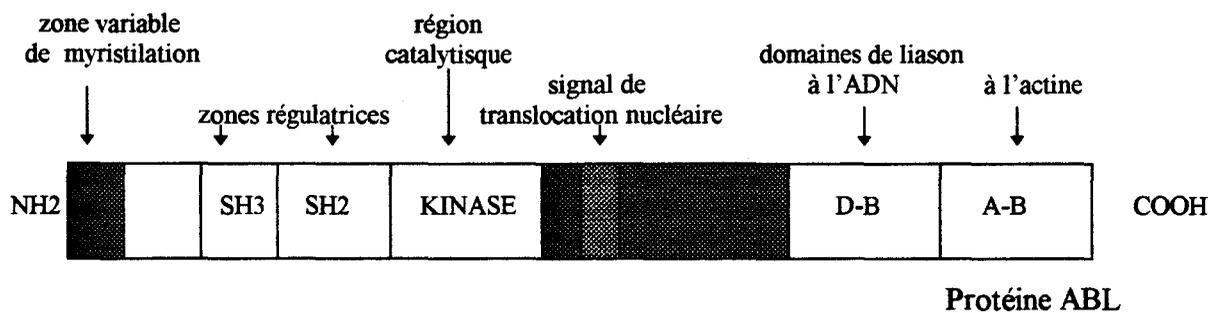


Figure 2 : Représentation schématique des protéines BCR, ABL, p210^{bcr-abl} et p190^{bcr-abl}.

III-5-2- La protéine BCR (p160^{bcr}).

III-5-2-a- Structure (figure 2, p : 34).

Son analyse met en évidence différentes régions :

- La partie N-terminale de la protéine est entièrement codée par le premier exon du gène *bcr*.
- Les acides aminés 1 à 63 définissent le domaine 1B et constituent une région indispensable à l'activation de c-ABL dans la protéine hybride (88, 93). En outre, cette région est à l'origine de réactions d'oligomérisation (94).
- Les acides aminés 176 à 242 caractérisent le domaine 2B qui possède deux sites de liaison aux domaines SH2 de certaines protéines (SH2-B pour SH2 « binding »). L'interaction BCR/protéines à module SH2 se fait, soit par l'intermédiaire de sérines/thréonines phosphorylées, soit, le plus souvent, sur les tyrosines phosphorylées de SH2-B.
- Le domaine 2B chevauche une région sérine/thréonine kinase suivie d'une zone riche en cystéines (95). L'activité sérine/thréonine kinase de BCR peut s'exercer, soit sur la protéine elle-même, soit sur des protéines substrats.
- Les paires de cystéine trouvées en aval de l'activité kinase sont importantes pour l'activation de l'enzyme.
- La partie centrale de BCR présente des homologies avec les protéines Dbl à fonction de facteur d'échange GDP-GTP pour cdc24. On ne retrouve cette région qu'au niveau de la p210^{bcr-abl}.
- La région C-terminale de BCR, que l'on ne retrouve pas chez les protéines de fusion BCR-ABL, possède une fonction GAP (« GTPase-activating protein ») pour les protéines Rac 1 et Rac 2 (96). Ces protéines appartiennent à la famille de p21^{rho} impliquées dans

l'organisation du cytosquelette. Les p21^{rac1/rac2} favorisent la production d'oxygène actif dans les polynucléaires neutrophiles et les macrophages « via » la chaîne respiratoire dépendante du NADP (97).

III-5-2-b- Fonctions biologiques.

Afin de préciser les fonctions de BCR, des mutants nuls ont été créés. Contrairement aux souris *abl* ^{-/-}, les souris transgéniques homozygotes mutées dans *bcr* sont viables. Aucune différence entre les phénotypes normaux et mutants n'est observée, notamment en ce qui concerne le développement hématopoïétique de la fonction lymphoïde (98). Cependant, l'introduction d'endotoxines bactériennes, sous la forme de lipopolysaccharides, chez les individus homozygotes mutés est à l'origine d'un choc anaphylactique. Ce phénomène est dû à une synthèse exagérée de peroxydes d'hydrogène par les polynucléaires neutrophiles. De plus, un taux élevé de protéine Rac sous-membranaire est retrouvé dans les cellules des mutants nuls. On peut donc en déduire que BCR exerce un contrôle de l'équilibre Rac-GTP/Rac-GDP au cours de l'activation des neutrophiles (99).

III-5-3- Les protéines de fusion p210^{bcr-abl} et p190^{bcr-abl}.

III-5-3-a- Localisation.

Ces protéines peuvent être détectées grâce à des anticorps dirigés contre les parties amino-terminale de BCR ou carboxy-terminale d'ABL par immunoprécipitation (100-102), par la technique classique de Western blot (103-104) ou par immunocytochimie (80).

Si la protéine BCR est cytoplasmique et la protéine c-ABL à la fois cytoplasmique et nucléaire, les protéines hybrides ou de fusion p190^{bcr-abl} et p210^{bcr-abl} sont cytoplasmiques (105), bien que le signal de translocation nucléaire d'ABL soit conservé (87).

III-5-3-b- Fonctions biologiques.

Comparées à la p145^{abl}, les deux protéines de fusion p210^{bcr-abl} et p190^{bcr-abl} possèdent une activité tyrosine kinase (TK) anormalement élevée, surtout « in vivo ». La protéine p190^{bcr-abl} possède une activité tyrosine kinase (TK) plus élevée que celle de la p210^{bcr-abl} et également une activité plus transformante (106, 107). De part leur activité, elles induisent une augmentation de la prolifération cellulaire et seraient à l'origine du processus de leucémogénèse. La p190^{bcr-abl} est très communément exprimée chez les enfants LAL Ph+ et chez 50 à 76% des adultes LAL Ph+. Il est à noter qu'un même patient peut exprimer, de manière concomitante, la p190^{bcr-abl} et la p210^{bcr-abl} (25, 108, 109).

- *Implication dans le phénomène d'apoptose.*

De part leurs activités biologiques, ces protéines de fusion inhibent l'apoptose.

Des lignées hématopoïétiques exprimant BCR-ABL ont été traitées avec des oligonucléotides antisens dirigés contre le gène de fusion *bcr-abl* (110, 111). Comparées à des cellules témoins, ces cellules ont une croissance inhibée et prennent un aspect apoptotique. Le gène de fusion *bcr-abl* pourrait donc bloquer l'apoptose (112, 113) via l'activité tyrosine kinase importante des protéines de fusion. L'utilisation d'un mutant *bcr-abl* thermosensible a permis de préciser l'effet précoce de la production des protéines de fusion dans les cellules Ba/F3 dont la croissance dépend normalement d'IL3 (114). En

absence d'IL3, on observe dans un premier temps, la survie des cellules transfectées, puis, dans un deuxième temps, leur prolifération (115).

- Implication dans la leucémogénèse.

Les mécanismes moléculaires de transformation induits par le gène de fusion *bcr-abl* ont pu être étudiés grâce à l'étude de l'effet transformant de *v-abl*, rétrovirus murin, résultat d'une expérience de recombinaison et obtenu après injection de rétrovirus Moloney sauvage à une souris BALB/c (116). Au cours de cette recombinaison, les séquences *gag* du virus Moloney sont fusionnées au gène *abl*. Il est apparu très tôt que les séquences GAG pouvaient être responsables de l'activation d'ABL.

Le virus de la leucémie murine d'Abelson est déficient, il ne possède pas les protéines de réplication *pol*, ni d'enveloppe *env*, mais il induit chez des souris transfectées, des leucémies pré-B et transforme « in vitro » les cellules lymphoïdes, myéloïdes et fibroblastiques.

« In vivo », les études concernant l'implication biologique des protéines de fusion dans la LMC ont été réalisées selon deux types d'approches. Des souris irradiées et reconstituées à partir de moelle osseuse infectée par un rétrovirus contenant la séquence du gène de fusion *bcr-abl* développent des maladies de type LMC (117, 118). Jusqu'à présent, il n'a pas été possible d'obtenir des souris transgéniques produisant la protéine p210^{*bcr-abl*}. En revanche, des souris transgéniques portant soit la construction *bcr-v-abl*, soit le gène *bcr-abl* codant la protéine à l'origine des LAL (p190^{*bcr-abl*}) développent des lymphomes ou LA (119, 82).

La protéine hybride est donc bien à l'origine de la LMC ou des LAL Ph⁺ par des mécanismes moléculaires que l'on commence à appréhender.

III-5-3-c- Corrélations entre la structure et les fonctions biologiques (figure 2, p : 34).

L'activation oncogénique ne provient pas d'un mécanisme de dérégulation transcriptionnelle mais de la structure de la protéine hybride. BCR-ABL comprend la partie N-terminale de BCR, notamment les domaines 1B et 2B, et la totalité de c-ABL, sauf la zone variable. L'acquisition de l'activité transformante de BCR-ABL passe par la suppression de mécanismes inhibiteurs et par l'activation de la fonction tyrosine kinase d'ABL. Cette activation permettant alors la phosphorylation de nombreuses protéines substrats.

- *Rôle des séquences de c-ABL.*

Certaines mutations de l'extrémité NH₂-terminale de c-ABL entraînent l'acquisition d'une capacité de transformation et s'accompagnent d'un changement de localisation de la protéine du noyau vers le cytoplasme.

Sur le plan moléculaire, une comparaison entre les séquences des gènes *v-abl* et *c-abl* a permis de déterminer le rôle crucial des domaines SH2 et SH3. Des expériences ont montré que le domaine SH3 semble jouer un rôle de régulation négative, sa délétion entraînant l'acquisition d'une activité tyrosine kinase « in vivo » sans qu'il y ait transformation. Ce rôle négatif des séquences du domaine SH3 est également suggéré par leur absence dans *v-abl* à la suite de la fusion *gag-abl*. Des arguments expérimentaux ont pu être obtenus pour confirmer ces hypothèses, en effet, un signal de myristylation est toujours présent au niveau d'un résidu glycine de la protéine v-ABL, permettant l'ancrage de cette dernière à la membrane cellulaire. En l'absence de myristylation, le pouvoir de transformation des

fibroblastes NIH-3T3 par *v-abl* est altéré, en revanche ce mutant possède toujours une activité transformante sur une lignée lymphoblastoïde pro-B (cellule Ba/F3). La protéine c-ABL de type Ib ne possède pas de signal de myristylation (67). De même que l'étude de *bcr-abl* a montré que les protéines p210^{*bcr-abl*} et p190^{*bcr-abl*} ne possèdent pas de signal de myristylation, elles transforment les cellules Ba/F3 et non pas les fibroblastes NIH-3T3 (120). Ces expériences suggèrent que le mécanisme de transformation des fibroblastes NIH-3T3 est différent de celui des cellules Ba/F3, l'un nécessitant la fixation de la protéine transformante à la membrane (*v-ABL* sur les NIH-3T3), l'autre non (*BCR-ABL* ou *v-ABL* non myristylée sur les cellules Ba/F3) (121). Ainsi, la protéine de fusion *BCR-ABL* possède une activité transformante spécifique des cellules hématopoïétiques. Ces expériences ont également établi que la localisation cellulaire de la protéine pouvait jouer un rôle capital dans la transformation.

La possibilité de l'action inhibitrice des séquences SH3 au niveau de la protéine *BCR-ABL* a conduit le groupe de Baltimore à découvrir une nouvelle protéine (3BP-1) qui se lie de manière spécifique sur la séquence SH3 de c-ABL (122). Il y aurait donc existence d'un mécanisme de trans-inhibition. Cette liaison pourrait être responsable d'une levée d'inhibition que ces séquences exercent normalement sur l'activité de la protéine *BCR-ABL*, mais il n'existe actuellement aucune évidence expérimentale étayant cette hypothèse. L'activation de *ABL* par *BCR* passe, dans un premier temps, par la levée de ces inhibitions.

- Rôle des séquences de BCR.

L'impossibilité d'identifier une anomalie sur la partie *abl* de la translocation a conduit à penser que les séquences *bcr* pourraient jouer un rôle actif dans la transformation. Ainsi, des expériences de mutagenèse dirigées ont permis de montrer que le premier exon du gène *bcr*

est indispensable à la transformation induite par *bcr-abl* dans le système de transformation « in vitro » utilisant la lignée Rat61 (123).

On a par ailleurs identifié une séquence dans BCR interagissant directement avec le domaine SH2 de c-ABL et dont la délétion abolit l'activité transformante de BCR-ABL (124).

Le domaine 2B de BCR se lie au domaine SH2 d'ABL et contribue à la dérégulation de la fonction tyrosine kinase (124). Cette fixation nécessite la phosphorylation de BCR sur des résidus sérines ou thréonines et non sur une tyrosine.

Enfin, on a pu montrer que BCR-ABL se lie dans le cytoplasme aux filaments d'actine et que les 63 premiers acides aminés de BCR sont indispensables pour cette liaison en l'absence de laquelle la capacité transformante de *bcr-abl* est inhibée (125). Le domaine 1B codé par le gène *bcr* est, en fait, à l'origine d'oligomérisation favorisant notamment la formation de tétramères BCR-ABL. La présence au sein du tétramère de quatre sites de liaison à l'actine permet à la protéine de fusion d'avoir une grande affinité pour le cytosquelette (88). Ces tétramères BCR-ABL sont en grande partie fixés sur les filaments d'actine, ce qui leur confère une localisation cytoplasmique diffuse. L'action oncogénique de *bcr-abl* provient donc de l'activation de la fonction tyrosine kinase d'ABL au niveau cytoplasmique.

La démonstration récente d'une interaction entre les protéines p210^{*bcr-abl*} et p190^{*bcr-abl*} avec le produit normal du gène *bcr* (p160^{*bcr*}) a permis de penser que celui-ci pourrait participer au phénomène de transformation (126). En effet, BCR-ABL co-précipitent avec p160^{*bcr*} en phosphorylant les résidus Tyr au niveau de la partie NH2-terminale de la protéine. Il y aura alors formation de tétramères BCR-ABL comme cités précédemment mais également d'oligomères BCR/BCR-ABL, favorisant ainsi l'autophosphorylation de BCR-ABL ou la transphosphorylation de BCR. Le complexe BCR /BCR-ABL permet une modification de BCR, à la fois sur le plan de la localisation et sur le plan biochimique. BCR incapable de se

lier à l'actine, se retrouve au voisinage des filaments d'actine où elle pourrait participer aux phénomènes de transduction du signal. On sait, en effet, que la région carboxy-terminale de la protéine BCR (qui est absente dans la protéine de fusion BCR-ABL) possède une activité GTPase (guanine triphosphatase activating protein ou GAP) pour $p21^{ras}$. Par ailleurs, la protéine codée par son premier exon a une activité sérine-thréonine kinase et la partie centrale de la molécule possède une similitude de séquence modérée avec l'oncogène *dbl* et le produit du gène *cdc24* de la levure. Le redéploiement de ces activités au niveau du complexe BCR/BCR-ABL et actine, pourrait donc entraîner l'activation d'une voie de transduction du signal dont la nature exacte reste à déterminer (123).

III-5-3-d- Les protéines substrats de BCR-ABL.

Dans les cellules Ph⁺, de nombreuses protéines apparaissent phosphorylées alors qu'elles ne le sont pas dans les cellules normales. La plupart de ces substrats potentiels possèdent des domaines SH2 ou SH3 caractéristiques des protéines impliquées dans les signaux de transduction.

Le premier substrat de BCR-ABL est comme nous l'avons vu la protéine de fusion ou hybride elle-même ou la protéine BCR. Des protéines impliquées dans la voie mitogénique de $p21^{ras}$ peuvent être également des substrats de BCR-ABL. (comme Shc, des protéines associées à Ras-GAP, la phosphatase Syp) (67). Des protéines exprimées spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques ont également été trouvées phosphorylées dans les cellules Ph⁺, comme c-Fes, ainsi que le facteur Vav jouant un rôle d'échange GDP-GTP pour la $p21^{ras}$. Divers autres substrats potentiels ont été identifiés, comme Crk1, Bap-1 (Bcr-associated protein) (67).

Le rôle de ces protéines phosphorylées est encore mal connu. Cependant, on peut supposer que leur phosphorylation est à l'origine de désordres importants impliqués dans le métabolisme cellulaire, notamment dans la transduction des signaux.

Des expériences ont permis de démontrer que la transformation induite par BCR-ABL fait intervenir au moins deux voies différentes de signalisation et de transcription par Ras et Myc.

Le rôle de Myc a pu être suggéré par des observations indirectes connues de longue date. En effet, dans les cellules transformées par *v-abl*, il existe une sélection biologique des clones hyperexprimant Myc. De même, les plasmocytomes de souris doubles transgéniques *abl* et *myc* apparaissent plus rapidement que les souris transgéniques *myc*. Récemment, le groupe de Witte a démontré le rôle direct de Myc dans la transformation induite par BCR-ABL grâce à expériences de co-transfert des gènes *bcr-abl* et *myc*, soit sous forme sauvage, soit sous forme « dominante négative ». Cette dernière forme de Myc est modifiée de telle manière qu'il est incapable de se dimériser avec Max et ne peut donc activer la transcription. Dans le système de transformation de Rat-1, alors que l'on observe une synergie très nette entre *myc* sauvage et *v-abl*, une diminution très importante de l'effet transformant est obtenue lorsque *v-abl* et *myc* dominant-négatif sont cotransférés dans les cellules au sein du même vecteur d'expression. (127).

Plus récemment, le rôle direct de $p21^{ras}$ comme voie de transduction essentielle dans la transformation induite par BCR-ABL a été démontré. On sait actuellement que l'activité des protéines de la superfamille de Ras (Rho, Rac, Rab) est contrôlée de manière étroite par les protéines de régulation qui ont la capacité de les faire alterner entre leurs formes actives et inactives. Pour la famille Ras, la forme active, liée au GTP, est rapidement transformée en une forme inactive grâce à l'action catalysante d'une protéine ayant la capacité d'activer une GTPase (GTPase activating protein ou GAP). Ras liée au GDP se trouve alors inactivée. La

réactivation de Ras-GDP fait intervenir le remplacement du GDP par le GTP, possible grâce à l'action de « facteurs d'échange » (GEF ou « guanine nucleotide exchange factors»). Le proto-oncogène *ras* peut être activé de manière constitutionnelle par des mutations » bien connues. Le rôle joué par Ras dans la transduction du signal induite par BCR-ABL a été cerné grâce à la découverte d'un mutant *ras* dominant-négatif (Asn 17-H-*ras*) ayant une affinité préférentielle pour le GDP. Cette molécule inhibe de manière compétitive les GEF permettant ainsi une augmentation intracytoplasmique du pool Ras-GDP. Il a été établi que l'expression du gène *ras* dominant-négatif est suivie d'une abolition totale des voies de transduction de signal induites par des récepteurs ou des oncogènes à activité tyrosine kinase. De manière très significative, il a été démontré que la voie de transduction de Ras est activée dans les cellules hématopoïétiques transformées par *bcr-abl*, activation régulée par l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL (128). Enfin, plus récemment un argument plus direct en faveur de l'interaction entre la voie d'activation de Ras et la protéine p210^{*bcr-abl*} a pu être obtenu par la démonstration d'une liaison de BCR-ABL à GRB-2 (growth factor receptor binding protein), une petite molécule d'adaptation ayant un domaine SH2 et deux domaines SH3 (129). Sa liaison avec BCR-ABL se fait de manière extrêmement spécifique au niveau du domaine SH2 de BCR (tyrosine 177) et elle est indispensable à l'activation de la voie de transduction de Ras dans les cellules exprimant BCR-ABL (118). Par ailleurs, la mutation du résidu tyrosine 177 du BCR en phénylalanine entraîne une inhibition de la liaison avec GRB-2 et l'abolition de l'activité transformante de BCR-ABL (129). Si l'engagement direct d'une protéine GEF entre p210^{*bcr-abl*} lié au GRB-2 et la voie d'activation de Ras n'est pas formellement démontré, il est établi que GRB-2 se lie par son extrémité SH3 à un facteur d'échange de manière constitutionnelle (comme Sos). Le complexe GRB-2/Sos cytoplasmique migre à la membrane en cas d'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase. Ainsi, dans les cellules transformées par *bcr-abl*, le

complexe BCR-ABL/GRB-2/Sos permettrait de transformer Ras-GDP (inactif) en Ras-GTP avec, comme conséquence, l'activation permanente de la voie de transduction de Ras suivie d'une hyperphosphorylation du produit du proto-oncogène *raf*. D'autres molécules de signalisation pourraient participer à ce complexe, comme la protéine Shc qui a par elle-même une activité transformante (130). Il est connu que la voie de la $p21^{ras}$ est une voie de transduction du signal mitogénique activée par des facteurs de croissance hématopoïétiques. Il a été montré que BCR-ABL exerçait son pouvoir transformant principalement sur les cellules lymphoïdes ou myéloïdes. Dans ce modèle, BCR-ABL simule un récepteur à tyrosine kinase activé. Par l'intermédiaire d'adaptateurs comme GRB-2 ou Shc (85, 131), BCR-ABL est capable d'activer la $p21^{ras}$. En se fondant sur ces hypothèses et en postulant que BCR-ABL est située au niveau des filaments d'actine sous-membranaire et non sur l'actine cytoplasmique, BCR-ABL pourrait être à l'origine d'un signal mitogénique via la cascade des MAP kinases. Cependant, s'il a bien été observé dans les cellules Ph+ un taux élevé de Ras sous forme GTP, l'activation des MAP kinases n'a pas été démontrée. Une autre voie de signalisation issue de Ras-GTP semble donc devoir jouer un rôle dans l'apparition du phénotype transformé induit par BCR-ABL. Cette voie d'activation de Ras ne semble pas être la seule possible car il est également établi que $p210^{bcr-abl}$ est capable de se lier à $p120^{gap}$ d'où une diminution de l'activité de cette dernière conduisant également à une augmentation du pool intracellulaire de Ras-GTP (132). L'inhibition de GAP par $p210^{bcr-abl}$ s'accompagne de la phosphorylation de deux protéines associées au $p120^{gap}$, p62 et p190, qui pourraient jouer un rôle transformant direct (132). Cette hypothèse reste à démontrer expérimentalement.

Enfin le rôle de l'anti-oncogène *p53* dans la progression de la LMC fut soupçonné de longue date (133) avec notamment la démonstration d'anomalies comme des réarrangements, des délétions ou des mutations lors des crises blastiques (environ 20% des

cas). L'ensemble de ces modifications a pour conséquence une inactivation du gène *p53* sauvage pouvant entraîner des modifications des mécanismes de contrôle que ce dernier exerce sur le cycle cellulaire et la transcription.

III-6- *bcr-abl* et phénotype des leucémies.

On ne sait pourquoi dans certaines circonstances BCR-ABL cause des LMC et dans d'autres cas des LAL Ph⁺. Bien que la phase chronique de LMC soit préférentiellement associée à l'expression de p210^{*bcr-abl*}, quelques rares cas sont associés à l'expression de p190^{*bcr-abl*} (134, 135). Comment expliquer que les LAL Ph⁺ soient, quant à elles, associées à l'expression de p190^{*bcr-abl*} ou de p210^{*bcr-abl*} ? Ces différentes protéines BCR-ABL peuvent donc déterminer différents types de leucémies. Ce fait est étayé par des expériences de transfection de p210^{*bcr-abl*} et p190^{*bcr-abl*} dans des souris qui développent alors des leucémies chroniques ou aiguës (117, 136-140).

Une cause possible du polymorphisme des leucémies relatives à BCR-ABL serait le type de cellule cible impliquée dans la transformation. Dans les LMC, de nombreux travaux suggèrent que la transformation induite par BCR-ABL aurait lieu dans des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (141). Des expériences de transfection de *bcr-abl* dans des cellules hématopoïétiques immatures résultent en un développement d'une LMC ; quand ces expériences de transfection ont lieu sur des cellules plus différenciées, on constate alors le développement d'une hyperleucocytose transitoire (137). Toutefois, dans 20 à 50% des cas de LAL Ph⁺, la transformation d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente est associée soit à l'expression de p210^{*bcr-abl*} ou soit à celle de p190^{*bcr-abl*} (142-144). Ces résultats suggèrent donc que le type de cellule cible impliquée dans la transformation ne permet pas d'expliquer l'hétérogénéité des phénotypes des différentes leucémies induites.

La diversité phénotypique des différentes leucémies pourrait-elle être due à une différence des taux d'expression de BCR-ABL ? Des résultats d'études comparant la transcription de *bcr-abl* en phase chronique ou aiguë de LMC et dans les LAL Ph⁺ ne sont pas concluants (145, 146).

La relation qui pourrait exister entre le type de LAL Ph⁺ associée à l'expression de p210^{*bcr-abl*} et la phase transformée lymphoïde de LMC fait toujours l'objet de beaucoup d'attention (147, 148). Il a été suggéré que la LAL Ph⁺ associée à l'expression de p210^{*bcr-abl*} pourrait être une variante de LMC à partir d'une cellule souche pluripotente : elle se présenterait alors comme une phase transformée lymphoïde de LMC, après une phase chronique silencieuse ou non diagnostiquée. En ce sens, les types de LAL Ph⁺ associées à l'expression de p190^{*bcr-abl*} représenteraient alors des LAL « de novo », ayant pour origine des progéniteurs cellulaires de la lignée lymphoïde. (149, 150). Cette hétérogénéité entre ces deux types de LAL ne pourrait cependant pas être associée à un tableau clinique ou à des réponses aux traitements différentes. En effet, prenant en compte différents paramètres comme l'âge, les degrés d'organomégalie, d'anémie, de leucocytose, de thrombopénie, le type FAB, l'apparition d'anomalies caryotypiques supplémentaires, la réponse éventuelle à un type de traitement ou pronostique, de nombreux auteurs n'ont pas trouvé de différences entre ces deux types de LAL Ph⁺ (p190^{*bcr-abl*} ou p210^{*bcr-abl*}). De plus, les taux de rémission complète et de survie sont similaires (23, 25, 41, 151, 152). Quelques études controversées suggèrent que la localisation des différents points de cassure peut être un facteur prédictif d'une progression en phase aiguë de la LMC. (153, 154). D'autres études suggèrent que la progression en phase aiguë de la maladie peut être due à différents niveaux de méthylation de *bcr-abl*. (155).

Une autre possibilité pouvant expliquer la diversité des leucémies développées serait due à l'évolution d'anomalies génétiques supplémentaires autres que *bcr-abl*. Cette hypothèse implique que les événements initiaux dans la LMC et les LAL Ph+ soient similaires. La durée de la phase chronique, variable dans la LMC et absente dans les LAL Ph+ et les LAM, peut dépendre du développement d'anomalies génétiques supplémentaires. Des changements génétiques et chromosomiques, impliquant des oncogènes et des anomalies chromosomiques typiques des leucémies aiguës, se développent dans des souris transgéniques *bcr-abl* (156) et chez les patients en phase de transformation de la LMC vers une phase aiguë.(157-159). Quelques résultats cliniques confirment de manière indirecte le rôle de ces anomalies génétiques supplémentaires. Comment ces anomalies génétiques additionnelles interviennent-elles dans la progression de la maladie ? La question n'est pas encore résolue. Elles peuvent peut-être affecter la dépendance par rapport aux facteurs de croissance ou être corrélées à une résistance induite par des réactions du système immunitaire « anti-leucémiques » (160-161).

Les taux de transcription de *bcr-abl* ou le type de réarrangement *bcr-abl* peuvent contrôler ces anomalies génétiques additionnelles (17, 163, 164).

III-7- Conclusion.

Plus de trois décades après la découverte du chromosome Philadelphie par Nowell et Hungerdorf les connaissances sur la translocation t(9.22) (q34;q11) ont considérablement progressé.

Toutefois, plusieurs questions subsistent : quels sont les événements associés à l'apparition de la protéine de fusion dans une cellule ?, y-a-t-il une cellule cible exprimant préférentiellement p210^{*bcr-abl*} et différente de celle exprimant p190^{*bcr-abl*} ?, quel est le rôle

des différents types de gènes de fusion *bcr-abl* dans le phénotype de la leucémie ?, le gène *bcr-abl* est-il toujours fonctionnel ? Il semblerait que le gène *bcr-abl*, comme les autres gènes de fusion, apparaisse à n'importe quel stade du cycle cellulaire dans des cellules de la moelle et du sang périphérique. Mais, seule la combinaison d'un gène de fusion correct dans un progéniteur primitif hématopoïétique correct aurait un avantage sélectif, et dans ce sens, le gène *bcr-abl* deviendrait fonctionnel. Le progéniteur hématopoïétique aurait alors la capacité de pouvoir proliférer en un clone leucémique. De même, comment expliquer que certaines patients atteints de LMC possèdent des cellules dont le gène *bcr-abl* ne s'exprime pas ?

En résumé, il est actuellement difficile d'établir un schéma définitif des voies de transduction induites par *bcr-abl*. Cette transformation semble en tout cas être multifactorielle, utilisant au moins deux voies principales de transduction du signal, faisant intervenir d'une part Ras (et plus en aval Raf) et d'autre part Myc. Il est également clair que les séquences de BCR jouent un rôle actif dans la transformation, notamment en agissant au niveau des filaments d'actine où la protéine BCR est habituellement absente. L'inhibition de l'apoptose par les cellules exprimant *bcr-abl* (165) pourrait favoriser la survenue de remaniements génétiques secondaires en prolongeant la durée de vie de la cellule transformée.

MATERIELS ET METHODES

Dans le cadre des LMC et des LAL Ph⁺, le chromosome Ph, comme le gène de fusion *bcr-abl* et les différents transcrits chimères qui en découlent sont de bons marqueurs spécifiques de la cellule maligne. En ce sens, ils représentent des cibles pour les techniques de cytogénétique conventionnelle et de biologie moléculaire. Dans ce chapitre, nous présentons les différentes techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire que nous avons développées afin de mettre en évidence la présence du chromosome Ph, du gène de fusion *bcr-abl* et/ou les transcrits chimères qui en découlent, chez des patients atteints de LMC ou de LAL Ph⁺.

I- Les techniques de cytogénétique conventionnelle.

Toute cette partie technique a été réalisée par le Dr. J.L. Lai et son équipe au sein du service de cytogénétique du Pr. de Martinville.

Les cellules sanguines ou médullaires sont cultivées « in vitro » pendant 24 à 48 heures dans du milieu RPMI complété avec 20 % de sérum de veau foetal, puis bloquées au stade métaphasique grâce à l'utilisation de colchicine à 0,09 g/ml. La suspension cellulaire est ensuite soumise à un choc hypotonique (KCl 0,3% ; citrate de Na (2H₂O) 0,5%) pendant 20 min, puis fixée dans une solution de méthanol et d'acide acétique dans les proportions 3/1 (-20°C) et étalée sur lames flambées. Après dénaturation et coloration au Giemsa, les chromosomes métaphasiques sont photographiés, découpés et classés selon la nomenclature du système international (ISCN, 1995) (166). Pour qu'un caryotype soit fiable, dans le cadre d'un suivi de maladie résiduelle, il faut interpréter entre 20 et 50 cellules métaphasiques.

II- Les techniques de biologie moléculaire.

II-1- La technique de Southern.

Cette technique permet une étude des réarrangements ayant lieu au niveau du gène *bcr* (plus particulièrement au niveau de la région M-bcr).

Le principe de cette technique est la détection de fragments ADN, dont la séquence nucléotidique est connue, à l'aide d'une sonde nucléotidique marquée par un radioélément (le plus souvent du ³²P) complémentaire de cette séquence d'ADN. Le choix des sondes nucléotidiques d'hybridation utilisées est crucial pour ce type de technique.

II-1-1- Présentation des différentes sondes utilisées (figures 3a et 3b, p : 56).

II-1-1-a- Sondes couvrant la région M-bcr.

Pour explorer la région M-bcr, nous disposons de 2 sondes : bcr-1 et bcr-3 (Onco-Sciences, USA).

La sonde bcr-1, fragment *Hind* III - *Bgl* II de l'intron 3 de la région M-bcr, détecte 90% des réarrangements de la région M-bcr, elle n'explore pas la partie 5' de cette région (figure 3a, p : 56). Après une digestion enzymatique de l'ADN génomique par les endonucléases de restriction *Bgl* II, *Bam* HI et *Hind* III, l'hybridation de l'ADN digéré avec cette sonde peut mettre en évidence des fragments de 5 ; 3,3 et 4,5 kb respectivement.

La sonde bcr-3, juxtaposition de 2 fragments *Hind* III- *Hind* III, couvre l'ensemble de la région M-bcr. (figure 3a, p : 56). Après une digestion enzymatique de l'ADN génomique par l'endonucléase de restriction *Bgl* II, l'hybridation de l'ADN digéré avec cette sonde peut mettre en évidence des fragments de 1,1 ; 2, 3 et 4,8 kb respectivement.

II-1-1-b- Sondes couvrant la région m-bcr.

Les travaux réalisés par Chen S.J. et al. (167), Berger R. et al. (168), Heisterkamp N. et al.(169) ont montré que les réarrangements au sein du premier intron du gène *bcr* (région m-bcr) sont divisées en deux zones, toutes deux localisées en 3' de cet intron.

La première zone nommée m-bcr2 peut-être explorée par une sonde : bb1 (fragment *Bam* HI - *Bam* HI de 1,1 kb) (figure 3b p : 56). Après une digestion enzymatique de l'ADN génomique par les endonucléases de restriction *Eco* RI, *Hind* III et *Bgl* II et hybridation de cet ADN digéré avec la sonde, on peut observer un premier profil de restriction avec des fragments à 8,5 ; 13 et 9, 3 kb respectivement. Un deuxième profil de restriction avec des fragments à 11 ; 12,5 et 8,5 kb peut être également observé après une digestion enzymatique de l'ADN génomique par les endonucléases de restriction *Eco* RI, *Hind* III et *Bgl* II respectivement.

La seconde zone, m-bcr3, peut-être explorée par une sonde : bb2 (fragment *Bam* HI - *Bam* HI de 0,9 kb) et une sonde : bb 3 (fragment *Eco* RI - *Kpn* de 0,9 kb) (figure 3b, p : 56).

Après une digestion enzymatique de l'ADN génomique par les endonucléases de restriction *Eco* RI, *Hind* III et *Bgl* II et hybridation de cet ADN digéré avec la sonde bb2, on peut observer des fragments de 16,5 ; 1,6 et 1,1 kb respectivement.

Après une digestion enzymatique de l'ADN génomique par l'endonucléase de restriction *Bam* HI et hybridation de cet ADN digéré avec la sonde bb3, on peut observer un fragment de 3,7 kb

II-1-2- Présentation des principales étapes de cette technique.

Les molécules d'ADN génomique sont extraites à partir de culots cellulaires mononucléées ou médullaires grâce à la méthode classique : protéinase K - sarcosyl - phénol (170). Après extraction, l'ADN est repris par 1 ml d'une solution TE 1X (Tris 10 mM ; E.D.T.A. 1 mM ; pH 8,3) et, est ensuite dosé par spectrophotométrie UV à 366 nm.

10 µg d'ADN génomique sont ensuite digérés par 100 à 150 unités d'endonucléases de restriction. 4 endonucléases de restriction sont utilisées : *Bam* HI, *Bgl* II, *Hind* III et *Eco* RI. Après 2 heures de digestion (volume de réaction au maximum de 15 µl), l'ADN génomique est précipité (2,5 V d'éthanol à 100%, -20°C et 1/10^{ème} V d'acétate d'ammonium 2M), lavé (éthanol à 70%, -20°C) et repris par 30 µl d'une solution de TE 1X.

Après une migration électrophorétique en gel d'agarose à 0,8% (P/V), sous une tension de 30V constante pendant 14 heures, les fragments d'ADN génomiques digérés sont transférés sur une membrane de nitrocellulose. Préalablement, le gel d'agarose a été placé dans une solution de dénaturation (NaOH 0,2 N ; NaCl 0,6 M) pendant 30 min, puis dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 ; NaCl 1,5 M) pendant 30 min. Le transfert a lieu pendant une nuit dans une solution de SSC 6X (SSC 20X : NaCl 3M ; Citrate trisodique 0,3 M). L'ADN est ensuite fixé à la membrane par chauffage à 80°C pendant 2 heures.

La membrane est ensuite incubée dans un tampon de pré-hybridation (Formamide désionisé 50% ; solution de Denhart 0,1% (solution de Denhart 100 X : ficoll 2% ; polyvinylpyrrolidone 2% ; sérum albumine bovine 2%) ; SSPE 5X (solution de SSPE 20 X : NaCl 3,6 M ; NaH₂PO₄ 0,2 M ; EDTA 0,002 M, pH 8,3) ; sulfate de dextran 5% ; SDS 1X ; ADN dénaturé de sperme de saumon à 200 µg/ml) pendant 1 heure à 42°C sous agitation.

La sonde marquée au [α -³²P] dCTP (utilisation du « kit : rediprime DNA labelling system », Amersham, Allemagne) et dénaturée (soude 0,3 N) est ensuite ajoutée (environ 1.10⁷ cpm). L'hybridation a lieu à 42°C pendant 1 nuit. La sonde en excès ou retenue de manière non spécifique est éliminée par rinçage de la membrane : 1 rinçage de 5 mn dans du SSC 2X à température ambiante suivi de 4 rinçages de 5 mn dans du SSC 0,1 X - SDS 0,1% dont 2 à température ambiante et 2 à 65°C. La membrane est ensuite analysée grâce à un PhosphorImager : 445 SI (Molecular Dynamics, USA).

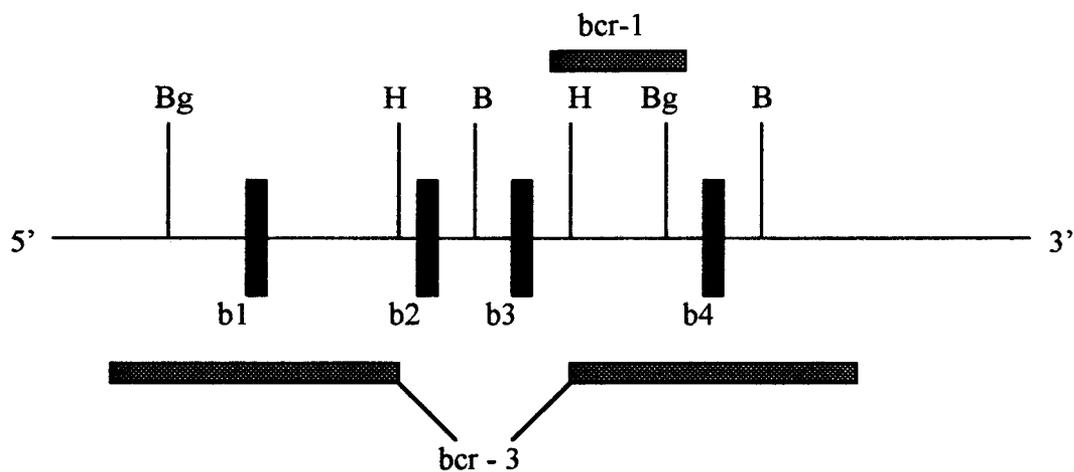


Figure 3a : Carte de restriction de la région M-bcr du gène *bcr* (Bg : site de restriction *Bgl* II, H : site de restriction *Hind* III, B : site de restriction *Bam* HI) et position des sondes bcr-1 et bcr-3.

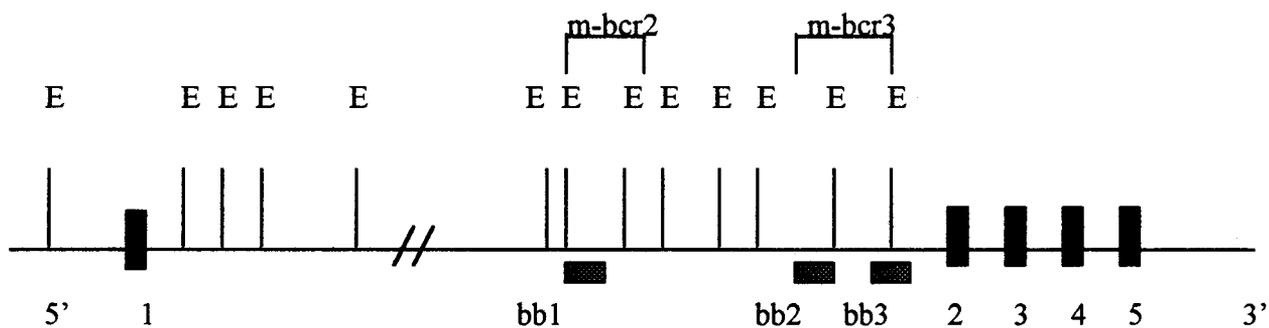


Figure 3b : Carte de restriction du premier intron du gène *bcr* (E : site de restriction *Eco* RI) et position des sondes bb1, bb2 et bb3.

II-2- La technique d'hybridation « in situ » en fluorescence ou FISH (« fluorescence in situ hybridization »).

Toute cette partie technique a été réalisée avec l'aide du Dr. V. Soenen au sein du service d'Hématologie A de l'hôpital Calmette, dirigé par le Pr A. Cosson, CHRU, Lille.

Cette technique est basée sur l'appariement au sein du noyau, d'une ou de plusieurs séquence(s) d'ADN (correspondant à un ou plusieurs gènes) avec une ou plusieurs sonde(s) nucléotidiques complémentaires par leur séquence à cette ou ces séquence(s) d'ADN étudiée(s). Cette ou ces sonde(s) est ou sont marquée(s) en 5' directement ou indirectement par des fluorochromes.

La localisation, au niveau des gènes *bcr* et *abl*, des sondes utilisées (Vysis, USA) est schématisée figure 4, p 58.

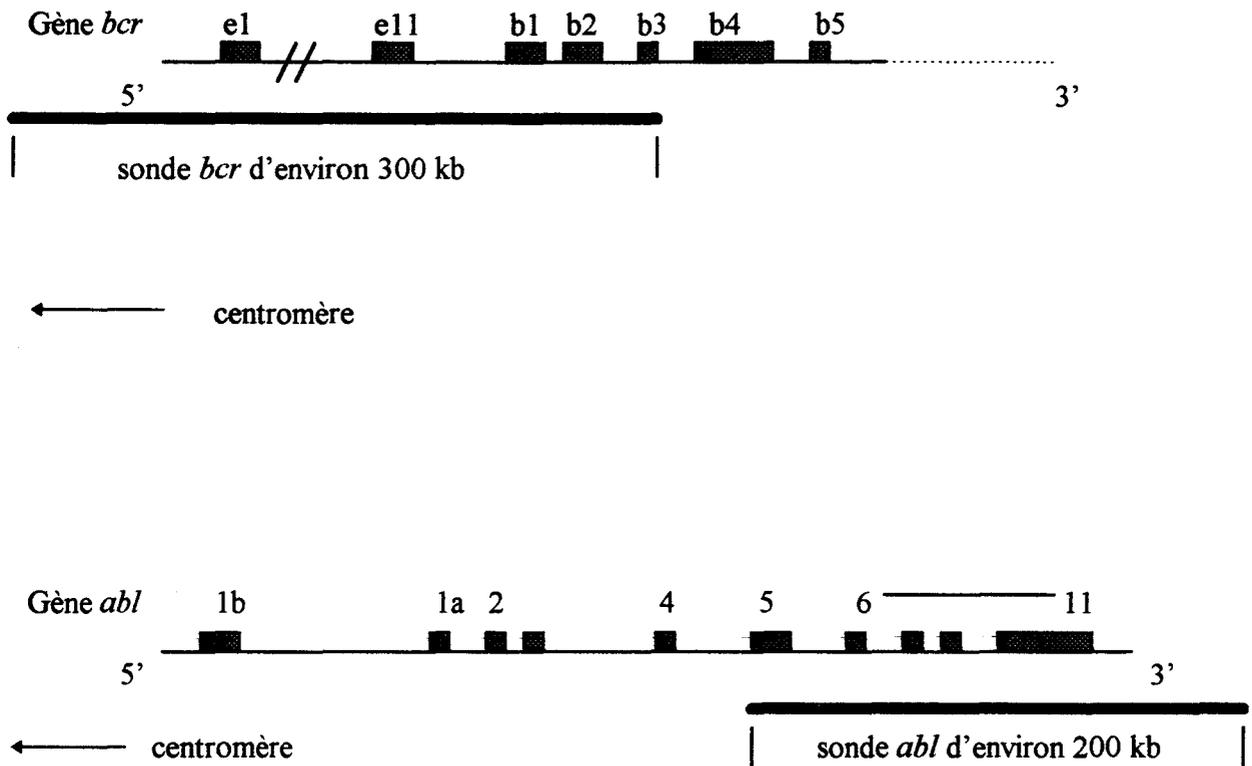


Figure 4 : Localisation sur les gènes *bcr* et *abl* des sondes utilisées (Vysis, USA) au cours de la technique d'hybridation « in situ » en fluorescence (FISH)

II-3- Les techniques d'amplification génique ou PCR (« polymerase chain reaction ») couplées à une technique de transcription inverse (RT-PCR).

Dans le cadre des LMC et des LAL Ph+, l'amplification génique ou PCR est pratiquement toujours réalisée à partir des transcrits chimères. Pour ce faire, l'ARN est converti en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse ou retrotranscription (RT), ADNc cible.

II-3-1- Préparation des culots cellulaires.

La préparation de culots cellulaires est effectuée à partir de prélèvements de sang ou de moelle réalisés au diagnostic et à différents stades de la maladie (avant, pendant et après traitements). Il s'agit d'isoler les leucocytes.

Dans un premier temps on ajoute aux différents types de prélèvements un tampon de lyse (NH_4Cl 250 mM). Le tout est mélangé délicatement par retournements successifs, suivis de plusieurs centrifugations (10 min à 3000 t/min). Il s'agit d'éliminer principalement les hématies, plus particulièrement l'hémoglobine. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire est repris dans un tampon de lavage ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ 250 mM ; $\text{NaH}_2\text{P}_0_4, 2\text{H}_2\text{O}$ 250mM ; NaCl 130 mM ; EDTA 5 mM, pH 8 ; 4°C). Afin d'évaluer le nombre de leucocytes contenus au sein du culot cellulaire, après une centrifugation (10 min à 3000 t/min) et l'élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris de nouveau par du tampon de lavage. Le nombre de leucocytes est calculé grâce au passage du mélange dans un automate : le Coulter STKR (Coultrenics, USA). Le tout est ensuite aliquoté en fonction

d'un nombre de cellules désiré dans des tubes Eppendorf. Les culots cellulaires sont stockés à sec, à -80°C.

II-3-2- Extraction des ARN cellulaires totaux.

Les molécules d'ARN étant facilement dégradables, en prévention, tout le protocole technique s'effectue à 4°C, les réactifs utilisés sont stockés à cette même température et les tubes Eppendorf sont traités au diéthyl pyrocarbonate (DEPC), exempts de toute activité ribonucléasique.

L'extraction des ARN cellulaires totaux est réalisée à partir des culots cellulaires grâce à la technique au RNAzol™B (Bioprobe Systems, France) selon la méthode mise au point par Chomczynski et Sacchi (171). Les culots d'ARN cellulaires totaux secs obtenus sont repris dans un petit volume (12 µl) d'eau DEPC. Pour prévenir leur dégradation, les culots d'ARN cellulaires totaux sont stockés à -80°C.

On peut apprécier la qualité de l'extraction des ARN cellulaires totaux après une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % (P/V) « coloré » au Bromure d'Ethidium (BET, à 0,5 µg/ml). 3µl /12µl du volume total, mélangés à 5 µl de BBφ (bleu de bromophénol à 0,25%, saccharose à 40%) et 2 µl d'H₂O mQ sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose à 0,8 %. Au cours de la migration électrophorétique, les différents fragments d'ARN se séparent en fonction de leur taille (en paires de bases ou pb) et de leur charges électriques. La migration se fait sous une tension de 80 V constante et grâce au tampon de migration TBE 1X (TBE 10X : Tris 135 mM, acide borique 45 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). La révélation des bandes d'ARN cellulaires totaux se fait sous UV (à 366 nm), grâce

à la visualisation des molécules de BET fluorescentes s'intercalant entre les bases nucléotidiques des fragments d'ARN.

II-3-3- Transcription inverse ou « retrotranscription » (RT).

La transcription inverse ou « retrotranscription » (RT), réalisée à partir des culots d'ARN totaux, permet l'obtention d'ADN complémentaires (ADNc) conformes par leur séquence nucléotidique aux transcrits chimères étudiés. Ceci est rendu possible grâce à l'emploi de l'amorce Abl-RT (Bioprobe systems, France) complémentaire d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl* (figure 5, p : 62) et, de l'enzyme M-MLV (pour « Moloney Murin Leukemia Virus », Gibco BRL, USA), transcriptase inverse ou « retrotranscriptase ».

2µl du culot d'ARN cellulaires totaux sont mélangés dans un tube Eppendorf à une solution contenant du Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 ; du KCl 40 mM ; du MgCl₂ 6 mM; du dithiothréitol (DTT) 1 mM ; de la sérum albumine bovine (BSA) 1mg/ml ; des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) 2,5 mM et 7,5 pmol de l'amorce Abl-RT (figure 5, p : 64). Le volume final réactionnel est de 10 µl. Après avoir placé le tube Eppendorf à 70°C pendant 5 minutes dans l'appareil Trio-thermoblock (Biometra, Allemagne) ou Progene (Techne, Angleterre), cette étape permettant l'appariement des amorces et le « dépelotonnage » des ARNm, on ajoute immédiatement 200 unités de M-MLV. L'échantillon est ensuite placé 1 h à 37°C, selon les recommandations du fabricant (Gibco BRL, Angleterre).

Comme témoin négatif de cette réaction nous remplaçons l'ARN par de l'H₂O mQ.

Abl-RT : 5'-AACGAAAAGGTTGGGGTC-3'

Abl3 : 5'-TTCCCCATTGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAGC-3'

A1 : 5'-TCACTGGGTCCAGCGAGAAGGTTTTCTTGGAGTT-3'

A2 : 5'-CTCAGACCCTGAGGCTCAAAGTCAGATGCTA-3'

A3 : 5'-CGAGCCGGGCCTGAGCCGGGCCCGGACCGA-3'

A4 : 5'-TTTATGGGGCAGCAGCCTGGAAAAGTACTTGGG-3'

B1 : 5'-AGCATGGCCTTCAGGGTGCACAGCCGCAACGGCAA-3'

B2 : 5'-GTTCTGATCTCCTCTGACTATGAGCGTGCA-3'

B5 : 5'-CAAGACCGGGAGATCCCCTGGGGCCCAAC-3'

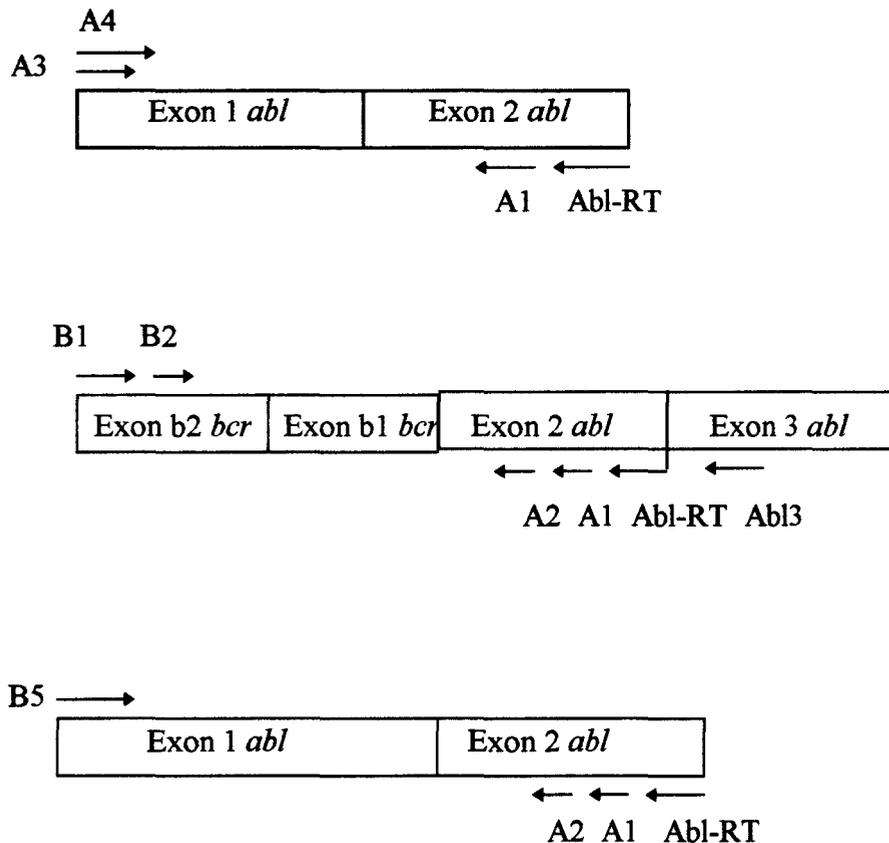


Figure 5 : Séquences oligonucléotidiques et localisation des différentes amorces employées lors de la PCR (B1/Abl3), de la « nested » PCR (A1/B1 et A2/B2), de la « semi-nested » PCR (A1/B5 et A2/B5) et de la PCR (A1,A3,A4) couplées à une transcription inverse (Abl-RT).

II-3-4-Détection des transcrits b3a3.

Une réaction de PCR, de 35 cycles d'amplification, est réalisée grâce au couple d'amorces B1/Abl3. L'amorce B1 est complémentaire d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon b2 du gène *bcr* (figure 5, p : 62). L'amorce Abl3 est complémentaire d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 3 du gène *abl* (figure 5, p : 62).

1µl d'ADNc est mélangé, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; 0,25 unités de Taq polymérase (Stratagene USA ou Appligene, France) et 15 pmol de chaque amorce (B1/Abl3). Le volume final réactionnel est de 10 µl. Au dessus de chaque mélange réactionnel, on ajoute 15 µl d'huile minérale (Sigma, USA). Après une étape de dénaturation à 94°C (5 min), une étape d'appariement et d'élongation à 72°C (4 min), 34 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1min), une étape d'appariement et d'élongation à 72°C (3 min) sont réalisés. La réaction d'amplification se termine par une étape d'élongation à 72°C (10 min).

La taille des fragments d'ADN amplifiés, B1Abl3, attendue est de 507 paires de base (pb).

Comme témoin négatif de la réaction de PCR, nous utilisons les échantillons d'H₂O mQ « retrotranscrits » par l'amorce Abl-RT.

Comme témoin positif de la réaction de PCR, nous réalisons de manière concomitante, à partir des mêmes échantillons, une autre réaction de PCR, avec, cette fois-ci, les amorces A1, A3 et A4 (Bioprobe, France) (figure 5, p : 62). L'amorce A1 est complémentaire d'une

partie de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl* (figure 5, p : 62). Les amorces A3 et A4 sont complémentaires respectivement d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon Ia ou Ib du gène *abl*. (figure 5, p : 62).

Les conditions de réalisation de cette réaction de PCR A1, A3, A4 sont identiques à celles utilisées pour la réaction de PCR (B1/ABI3).

La taille des fragments d'ADN amplifiées attendue est de 235 pb (A1/A3) et de 251 pb (A1/A4) respectivement.

II- 3 -5- Détection des transcrits b2a2, b3a2 (« nested »-PCR).

Deux réactions de PCR, de 35 cycles d'amplification, sont réalisées successivement grâce à deux couples d'amorces : A1/B1 et A2/B2 (Bioprobe systems, France). Les amorces A1 et A2 sont complémentaires d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl* (figure 5, p : 62). Les amorces B1 et B2 sont complémentaires de différentes parties de la séquence nucléotidique de l'exon b2 du gène *bcr* (figure 5, p : 62).

1 µl d'ADNc est mélangé, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; 0,25 unités de Taq polymérase (Stratagene, USA ou Appligene, France) et 15 pmol de chaque amorce (A1/B1). Le volume final réactionnel est de 10 µl. Au dessus de chaque mélange réactionnel, on ajoute 15 µl d'huile minérale (Sigma, USA). Après une étape de dénaturation à 94°C (5 min), une étape d'appariement et d'élongation à 72°C (4 min), 34 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement et d'élongation à 72°C (3 min) sont réalisés. La réaction d'amplification se termine par une étape d'élongation à

72°C (10 min). La taille des fragments d'ADN amplifiés, A1/B1, attendue est de 392 pb ou de 317 pb, tailles correspondant respectivement aux transcrits chimères b3a2 et b2a2.

Pour réaliser la deuxième réaction de PCR (A2/B2), 1 µl des produits d'amplification obtenus au premier tour (A1/B1) est mélangé, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; 0,2 mM de dNTP ; 0,25 unités de Taq polymérase (Stratagene, USA ou Appligene, France) et 15 pmol de chaque amorce (A2/B2). Le volume final réactionnel est de 10 µl. Au dessus de chaque mélange réactionnel, on ajoute 15 µl d'huile minérale (Sigma, USA). Le programme d'amplification est identique à celui utilisé au cours de la première réaction de PCR (A1/B1).

La taille des fragments d'ADN amplifiés, A2B2, attendue est de

Les témoins positifs et négatifs utilisés sont identiques à ceux utilisés au cours de la technique de PCR (B1/AB13 : détection des transcrits b3a3).

II-3-6- Détection des transcrits e1a2 (« semi-nested »-PCR).

Deux réactions de PCR, de 35 cycles chacune, sont réalisées successivement grâce aux couples d'amorces A1/B5 et A2/B5 (Bioprobe systems, France). Les amorces A1 et A2 sont complémentaires d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. L'amorce B5 est complémentaire d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon e1 du gène *bcr*. (figure 5, p : 62)

Les conditions de réalisation de cette technique de « semi-nested » PCR sont identiques à celles utilisées pour la détection des transcrits b2a2, b3a2.

La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue, après la première étape ou le premier tour, grâce au couple d'amorces A1/B5 est de 156 pb. La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue, après la deuxième étape ou le deuxième tour, grâce au couple d'amorces A2/B5 est de 105 pb.

Les témoins positifs et négatifs utilisés sont identiques à ceux utilisés au cours de la technique de « nested » PCR (détection des transcrits b2a2, b3a2).

Les appareils utilisés pour la technique de RT et les différents types de PCR sont le Trio-thermoblock (Biometra, Allemagne) ou le Progene (Techne, Angleterre).

II-3-7- Analyse des différents produits d'amplification.

La vérification de la qualité de chaque réaction de PCR s'effectue après une électrophorèse des produits amplifiés en gel d'agarose à 2% (P/V) « coloré » au BET. 7 µl/10 µl du volume réactionnel final mélangés à 5 µl de BBΦ sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose. La migration se fait sous une tension de 80 V constante et grâce au tampon de migration TBE 1X. La révélation des bandes d'ADN amplifiés se fait sous UV (à 366 nm), grâce à la visualisation des molécules de BET fluorescentes.

II-3-8- Les problèmes de contamination.

Pour minimiser les problèmes de contamination, plusieurs précautions sont prises : 1) réalisation dans des pièces séparées de la réaction d'extraction des ARN cellulaires totaux, de la réaction de PCR et de l'analyse des produits amplifiés, 2) stockage dans des pièces différentes des réactifs utilisés, ceux-ci sont aliquotés, 3) utilisation d'un jeu de pipettes par

type de réaction, avec l'emploi d'embouts contenant du papier filtre, 4) Lavages réguliers des pipettes, des paillasses à l'HCl 0,1 N et passages des pipettes sous UV (à 366 nm).

II-4- La technique de RT-PCR compétitive (figures 6 et 7, p : 70 et 81 respectivement).

Notre modèle est basé sur celui développé par le Dr. B. Grandchamp (172, 173). Il est utilisé pour une étude quantitative de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LAL Ph+, donc une étude quantitative des transcrits correspondant à l'allèle normal du gène *abl* et des transcrits chimères e1a2 .

Il s'agit d'estimer les quantités respectives de transcrits chimères étudiés après coamplification par la technique de PCR, dans un même tube Eppendorf, des ADNc correspondant aux transcrits étudiés et d'un standard interne, dont la quantité est connue avant et après coamplification

II-4-1- Préparation du standard interne de coamplification.

Le standard interne de coamplification est une séquence d'ADN double brin, identique par sa séquence nucléotidique au transcrit chimère e1a2.

Au sein de cette séquence d'ADN double brin, il existe une délétion nucléotidique de 8 pb présente au niveau de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. Cette séquence d'ADN double brin est clonée dans un vecteur plasmidique : le pBluescript II SK +/-.

II-4-1-a- Préparation des culots cellulaires.

Cette préparation est réalisée à partir de prélèvements de sang ou de moelle réalisés, au diagnostic, chez deux patients atteints de LAL Ph+ (n^{os} 519, sang et 1053, moelle) et un patient atteint de LMC (n° 984, sang). Toutes les étapes opératoires sont identiques à celles décrites au chapitre précédent (Chap. II-3-1-, pp : 59-60)

L'utilisation d'échantillons préparés à partir de prélèvements du patient atteint de LMC, nous permet d'affirmer la spécificité de chaque réaction. Ils servent de témoins négatifs, comme l'H₂O mQ.

II-4-1-b- Extraction des ARN cellulaires totaux.

Elle est réalisée à partir des culots cellulaires. La technique utilisée est la technique au RNazolTMB (Bioprobe Systems, France). Les conditions et les étapes opératoires sont identiques à celle décrites au chapitre précédent (chap. II-3-2-, pp : 60-61).

II-4-1-c- Amplifications géniques grâce aux couples d'amorces : 3S/AblE et Bcr1/3AS.

A partir de 2 µl d'ARN cellulaires totaux, deux types de transcriptions inverses sont réalisées conjointement grâce à l'utilisation des amorces AblE et 3AS (Bioprobe systems, France) respectivement (figure 6, p : 70).

L'amorce AblE est complémentaire d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 3 du gène *abl* (figure 6, p : 70). L'amorce 3AS est complémentaire d'une partie de la

séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. Il est à noter qu'au sein de la séquence nucléotidique de l'amorce 3AS, il existe une zone de délétion de 8 pb. (figures 6, p : 70).

Les conditions et les étapes préparatoires de cette technique sont identiques à celles décrites chapitre .

Les ADNc produits servent de matrice pour deux réactions de PCR sont réalisées, conjointement, grâce à deux couples d'amorces : Bcr1/3AS (utilisation des ADNc « retrotranscrits » grâce à l'amorce 3AS) d'une part, et 3S/AblE (utilisation des ADNc « retrotranscrits » grâce à l'amorce AblE) (Bioprobe systems, france) d'autre part (figure 6, p 70).

L'amorce Bcr1 est complémentaire d'une partie de la séquence de l'exon 1 du gène *bcr*. L'amorce AblE est complémentaire d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 3 du gène *abl*. Les amorces 3S, 3AS sont complémentaires de différentes parties de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. L'amorce 3S, comme l'amorce 3AS possède au sein de sa séquence nucléotidique une zone de délétion de 8 pb. L'amorce 3S est complémentaire de l'amorce 3AS. (figure 6, p : 70)

Les conditions opératoires sont identiques pour les deux réactions de PCR.

3 µl d'ADNc, obtenus après transcription inverse des transcrits par l'amorce 3AS ou par l'amorce Able, sont mélangés, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,25 mM ; 4 unités de Taq polymérase (Appligene, France) et 30 pmol de chaque amorce. Le volume réactionnel est de 100 µl. 15 µl d'huile minérale sont ajoutés au dessus de chaque mélange réactionnel (Sigma, USA). Après une étape de dénaturation à 94°C (5 min), 30 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 56°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (2 min) sont réalisés. La réaction d'amplification se termine par une étape d'élongation à 72°C (7 min).

La taille des fragments d'ADN amplifiés, Bcr1/3AS, attendue est de 244 pb.

La taille des fragments d'ADN amplifiés, 3S/Able, attendue est de 187pb.

Les appareils utilisés pour ces deux types de PCR sont le Trio-thermoblock (Biometra, Allemagne) ou le Progene (Techne, Angleterre).

La vérification de la qualité de chaque réaction de PCR s'effectue après une électrophorèse des produits amplifiés en gel d'agarose à 2% (P/V) « coloré » au BET et analyse des fragments d'ADN amplifiés sous UV (à 366 nm) grâce à la visualisation des molécules de BET. 10 µl/100 µl du volume réactionnel final sont mélangés à 5 µl de BBφ et déposés dans chaque puits du gel d'agarose à 2%. La migration se fait sous une tension de 80V constant et grâce au tampon de migration TBE 1X.

Une purification des fragments d'ADN amplifiés (Bcr1/3AS ou 3SAble) est ensuite réalisée directement à partir du mélange réactionnel de PCR, grâce à la méthode Centricon (Amicon, USA). 50 µl d'échantillons/100 µl du volume total de la réaction de PCR sont

purifiés par cette méthode. Après purification, précipitation des fragments d'ADN amplifiés par 2,5 V d'éthanol à 100% (stocké à -20°C) et 1/10^{ème} V d'acétate d'ammonium 2M et centrifugation (30 min à 15 300 t/min, 4°C), les culots sont lavés par 200 µl d'éthanol à 70% (stocké à 20°C) (élimination des sels). Après une nouvelle étape de centrifugation, les culots sont repris dans 20 µl d'H₂O mQ.

II-4-1-d- Réaction de PCR grâce au couple d'amorces Bcr1/AblE sur ces fragments d'ADN amplifiés (Bcr1/3AS et 3S/AblE) et purifiés.

Dans un même tube Eppendorf sont placés 4 µl des fragments d'ADN amplifiés par les deux couples d'amorces Bcr1/3AS et 3S/AblE respectivement, on y ajoute une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,25 mM ; 4 unités de la Taq polymérase (Appligène, France). 15 µl d'huile minérale (Sigma, USA) sont ajoutés au dessus de chaque mélange réactionnel. Après une étape de dénaturation à 94°C (3 min), une étape d'appariement à 56°C (2 min), 5 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 56°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (2 min) sont réalisés. 30 pmol de chaque amorce Bcr1 et AblE sont ajoutés dans chaque tube de réaction de PCR respectivement. Le volume final réactionnel est de 100 µl. Après une étape de dénaturation à 94°C (5min), 25 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 56°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (2 min) sont réalisés. La réaction d'amplification se termine par une étape d'élongation à 72°C (7 min).

La taille des fragments d'ADN amplifiés, Bcr1/AblE, attendue est de 399 pb.

L'analyse des différents fragments d'ADN amplifiés s'effectue après une électrophorèse en gel d'agarose à 1,8 % (P/V) « coloré » au BET et une révélation des molécules de BET sous UV (à 366 nm). 10 µl / 100 µl du volume total de la réaction de PCR sont mélangés à 5 µl de BBφ et déposés dans chaque puits du gel d'agarose. La migration s'effectue sous une tension constante de 80 V et grâce au tampon de migration TBE 1X.

les fragments d'ADN amplifiés (Bcr1/AblE) sont ensuite purifiés directement à partir du mélange réactionnel de PCR (Bcr1/AblE) grâce à la méthode Centricon (Amicon, USA).

II-4-1-e- Ligature des fragments d'ADN amplifiés et purifiés de 399 pb (Bcr1/AblE) dans un vecteur plasmidique pBluescript II SK +/- (2961 pb).

Les endonucléases de restriction choisies sont *Eco* R1 et *Bam* H1. Ces enzymes génèrent des extrémités, de préférence cohésives, complémentaires entre le vecteur plasmidique (pBluescript II SK +/-, 2961 bp) et l'insert (fragment d'ADN double brin de 399 pb, Bcr1/AblE). L'amorce Bcr1 permet la constitution du site de restriction *Bam* H1, l'amorce ABLE le site de restriction endonucléasique *Eco* R1 (figure 6, p 71).

On effectue la digestion d'environ 3 pmol d'insert (1 µg) pour 1pmol de vecteur plasmidique (3 µg), avec 10 unités de chaque endonucléase de restriction/ µg d'ADN double brin. Le volume total de la réaction est au maximum de 15 µl. La réaction s'effectue 2 heures à 37°C, selon les conditions indiquées par le fabricant (Boehringer Mannheim, Allemagne).

La vérification des produits de digestion est possible après une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% (P/V) (pour les fragments du vecteur plasmidique digérés) ou à 1,8%

(P/V) (pour les fragments d'ADN double brin amplifiés) « colorés » au BET. La totalité des produits de digestion mélangée à 5 µl de BBφ est déposée dans chaque puits du gel d'agarose. La migration s'effectue sous une tension constante de 80 V et grâce au tampon de migration TBE 1X. La visualisation des bandes d'ADN digéré est possible après une révélation sous UV (à 366 nm) des molécules de BET.

Comme témoin de digestion, 1 pmol du vecteur plamidique **non digéré** est déposé sur le même gel d'agarose, au cours de la même électrophorèse.

Une étape de purification des différents fragments d'ADN double brin digérés s'effectue directement après électrophorèse à partir du gel d'agarose à 0,8 % (P/V) ou à 1,8 % (P/V) grâce à la méthode GeneClean II[®]Kit (BIO 101 Inc., USA).

La ligature d'environ 3 pmol d'inserts pour environ 1 pmol de vecteur plasmidique est possible grâce à 2 unités d'ADN « ligase » T4 (Gibco BRL, USA). Le volume réactionnel est au maximum de 25 µl. La réaction s'effectue pendant une nuit à 16°C selon les instructions du fabricant (Gibco BRL, USA).

Le résultat de la réalisation successive de ces différentes étapes est l'obtention du standard interne de coamplification, fragment d'ADN double brin de 399 pb (Bcr1/AblE), identique par sa séquence nucléotidique au transcrit chimère e1a2. Au sein de cette séquence d'ADN double brin, il existe une délétion de 8 pb présente au sein de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. Ce fragment d'ADN double brin est cloné dans un vecteur plasmidique pBluescript II SK +/-.

II-4-1-f- Amplification du standard interne de coamplification par transformation bactérienne.

La souche bactérienne utilisée pour réaliser cette étape est la souche d'*E.coli* JM109 (endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_k^- , m_k^+), relA1, supE44, λ^- , Δ (lac-proAB), F', traD36, proAB, lac^qZ Δ M15). les caractéristiques de cette souche sont les suivantes :

* déficience en activité β -galactosidase suite à des délétions dans la copie génomique et épisomale du gène *lacZ*. La copie épisomale est déléetée de la région correspondant au peptide- α . L'introduction dans cette souche d'un plasmide exprimant le peptide- α permet la restauration de l'activité β -galactosidase par α -complémentation. Le vecteur plasmidique pBluescript II SK +/- porte ces caractéristiques.

Le phénomène de restauration de l'activité β -galactosidase peut être visualisé grâce à l'utilisation d'un substrat chromogène : le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma, USA) qui donne une coloration bleue après catalyse. Ceci permet la sélection rapide des clones recombinés après leur étalement sur des boites de Pétri contenant du milieu LB (milieu Luria-Bertani : extrait sec de levure 5g/l ; peptone 10 g/l ; NaCl 86 mM, pH 7,5 ; additionné d'ampicilline 50 ug/ml) gélosé (15 g d'agar-DIFCO/l de milieu LB ; pH 7), de l'inducteur IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, Sigma, USA) et du substrat X-gal. Les bactéries contenant le plasmide d'origine vont donner des colonies de couleur bleue, alors que les bactéries contenant le plasmide recombiné dont le peptide- α a été inactivé, suite au clonage d'un insert dans les sites de clonage multiples, vont donner des colonies de couleur blanche.

* la présence de l'épisome F'

*la déficience en système de restriction et de recombinaison d'*E.coli*

Avant l'étape de transformation bactérienne, les bactéries sont rendues « compétentes », La technique utilisée est celle décrite par Cohen S.N. et *al.* (174). Elle consiste en un traitement au chlorure de calcium froid, suivi de chocs thermiques, ce qui crée un état de « compétence » transitoire (une fragilisation, une perméabilisation de la membrane bactérienne) permettant ainsi la pénétration d'ADN dans la bactérie. Les bactéries sont mises en culture dans 30 ml de milieu LB, sous agitation à 37°C. Lorsque la turbidité, mesure de l'absorbance à 580 nm, est d'environ 0,5, cette culture bactérienne est centrifugée à 6 000-8 000 t/min pendant 10 min à 4°C. Après l'élimination du surnageant, les bactéries sont lavées dans 20 ml de CaCl₂ 100 mM (placé préalablement dans de la glace et stérile). Elles sont ensuite reprises, après une centrifugation, par le même volume de CaCl₂ 100 mM et laissées dans de la glace pendant 20 min. Les bactéries sont centrifugées une dernière fois et mises en suspension dans 0,75 ml de CaCl₂ 100 mM.

Un aliquote de 0,1 ml des bactéries devenues « compétentes » est mis en contact avec le plasmide recombiné (le standard interne de coamplification). Ce mélange subit une succession de 5 chocs thermiques de 30 sec chacun (37°C/0°C), puis est placé 20 min dans de la glace.

Les bactéries transformées sont ensuite mises en culture dans 1 ml de milieu LB, 45 min sous agitation à 37°C, puis sont étalées sur du milieu LB gélosé, additionné d'ampicilline 50 µg/ml et/ou d'IPTG 0,5 mM et de X-gal 40 µg/ml. Après étalement, les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C, toute une nuit.

Comme témoin de la transformation on emploie du plasmide sans insert.

Les clones bactériens contenant le standard interne de coamplification sont identifiés après une double digestion enzymatique (*EcoR1*, *BamH1*), à la suite d'une minipréparation de standards internes de coamplification. Chaque clone, parmi ceux sélectionnés (résistance à l'ampicilline et/ou couleur blanche), est ensemencé dans 10 ml de milieu LB additionné d'ampicilline 50 µg/ml, puis est mis en culture, sous agitation à 37°C, toute une nuit. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 6 000-8 000 t/min, 10 min, puis sont soumises à une lyse alcaline. Le culot de bactéries est repris par 200 µl de tampon TNE (Tris-HCl 10 mM, pH 8 ; NaCl 100 mM ; EDTA 1 mM) auquel on ajoute 200 µl d'un mélange contenant du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (dans les proportions 25/24/1). Après avoir mélangé vigoureusement le tout (vortex), on le centrifuge à 12 000 t/min, 5 min, 4°C. L'ADN se trouve alors au niveau de la phase aqueuse (la phase supérieure). On récupère cette phase aqueuse (contenant l'ADN), on y ajoute 2,5 V d'éthanol à 100% (à -20°C) et 1/10^{ème} V d'acétate d'ammonium 2M. Cette étape permet la précipitation de l'ADN. Après une centrifugation (12 000 t/min, 10 min, 4°C) et l'élimination du surnageant, le culot d'ADN est lavé grâce à 700 µl d'éthanol à 70% (-20°C). Cette étape permet l'élimination des sels. Après une nouvelle étape de centrifugation et l'élimination du surnageant, le culot d'ADN, après avoir été séché rapidement sous vide, est dissous dans 50 µl d'H₂O mQ.

L'ADN (correspondant normalement au standard interne de coamplification) est alors clivé par les endonucléases de restriction *EcoR1* et *BamH1*. En parallèle, sont réalisées une double digestion enzymatique *EcoR1* et *BamH1* et deux digestions enzymatiques simples *EcoR1* ou *BamH1*. Une comparaison des résultats obtenus après une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% (P/V) est réalisée avec le plasmide témoin non digéré.

Les clones de bactéries recombinées, identifiés comme étant ceux portant le standard interne de coamplification, sont alors utilisés pour, d'une part effectuer de grandes préparations de standard interne de coamplification, et, d'autre part sont conservés à -20°C dans du milieu riche 2XTY+ mc (extrait sec de levure 10 g/l ; tryptone 18 g/l ; NaCl 86 mM ; extrait de viande 8g/l contenant 50% de glycérol ; ampicilline 50 µg/ml).

A partir de ces clones de bactéries recombinées, une purification des plasmides (standard interne de coamplification) en grande quantité est possible après utilisation du « Qiagen plamid kit » (Qiagen, USA). Le principe de cette technique est une lyse alcaline des bactéries suivie d'une purification des plasmides par chromatographie échangeuse d'anions. On récupère les plasmides (standard interne de coamplification) sous leur forme superenroulée. Après un séchage rapide sous vide des culots d'ADN et l'évaluation de la quantité de plasmides par une mesure de l'absorbance à 260 nm, ceux-ci (standards internes de coamplification) sont repris dans un volume approprié d'H₂O mQ sous une épaisse couche d'huile minérale (Sigma, USA) et stockés à 4°C.

Comme le stockage des standards interne de coamplification s'effectue à 4°C, il y a un risque certain de dégradation, donc une vérification régulière de leur « état » est nécessaire.

II-4-1-g- Vérification de la présence de la délétion de 8 pb : étape de séquençage.

Cette étape est réalisée grâce au « Sequenase Version 2.0, DNA Sequencing Kit » (USB, USA). On utilise les amorces Abl-RT (15 pmol/µl) et Bcr1 (15 pmol/µl), d'après la méthode décrite par Sanger F. et *al.* (175).

La visualisation des séquences est possible après une électrophorèse en gel dénaturant (urée 600 mM) à 6% d'acrylamide/bis-acrylamide (19:1) de 3 µl de chaque échantillon et une

autoradiographie (utilisation au cours de la réaction de séquence d' $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$). La migration s'effectue sous une puissance constante de 85 W et grâce au tampon de migration TBE 1X (TBE 10X : Tris 2 M ; acide borique 2 M ; EDTA 40 mM).

II-4-2-Présentation des différentes réactions de PCR, chacune couplée à une étape de transcription inverse (figures 6 et 7, p : 70 et 81 respectivement).

II-4-2-a- Préparation des culots cellulaires à partir de prélèvements de sang ou de moelle.

Les prélèvements de sang ou de moelle sont réalisés sur des patients (adultes ou enfants) atteints de LAL Ph+, à différents stades de la maladie (au diagnostic, en cours de traitement, en cours de remission hématologique et/ou cytogénétique, en cours de rechute...). Les conditions et les différentes étapes opératoires de cette préparation sont identiques à celles décrites au chapitre précédent (Chap. II-3-1-, pp : 59-60).

II-4-2-b-Les deux types d'amplification génique : Abl2-Abl3 et BcrA1-Abl3.

Après extraction des ARN cellulaires totaux, (les conditions et les différentes étapes opératoires de cette extraction sont identiques à celles décrites au chapitre :), une étape de transcription inverse est réalisée à partir des culots d'ARN cellulaires totaux. Elle permet l'obtention d'ADNc conformes par leur séquences nucléotidiques aux transcrits chimères *ela2* correspondant au gène de fusion *bcr-abl* et aux transcrits correspondant au gène *abl*.

L'amorce utilisée Able (Bioprobe systems, France) est spécifique d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 3 du gène *abl*. (figure 6, p : 71)

Les conditions et étapes opératoires de cette étape de transcription inverse sont identiques à celles décrites dans le chapitre : .

On obtient ainsi des ADNc conformes par leur séquence nucléotidique aux transcrits chimères e1a2 correspondant aux gènes de fusion *bcr-abl* et aux transcrits correspondant au gène *abl*.

Le problème de cette étape est qu'il est difficilement possible d'évaluer le rendement d'efficacité de la réaction de transcription inverse.

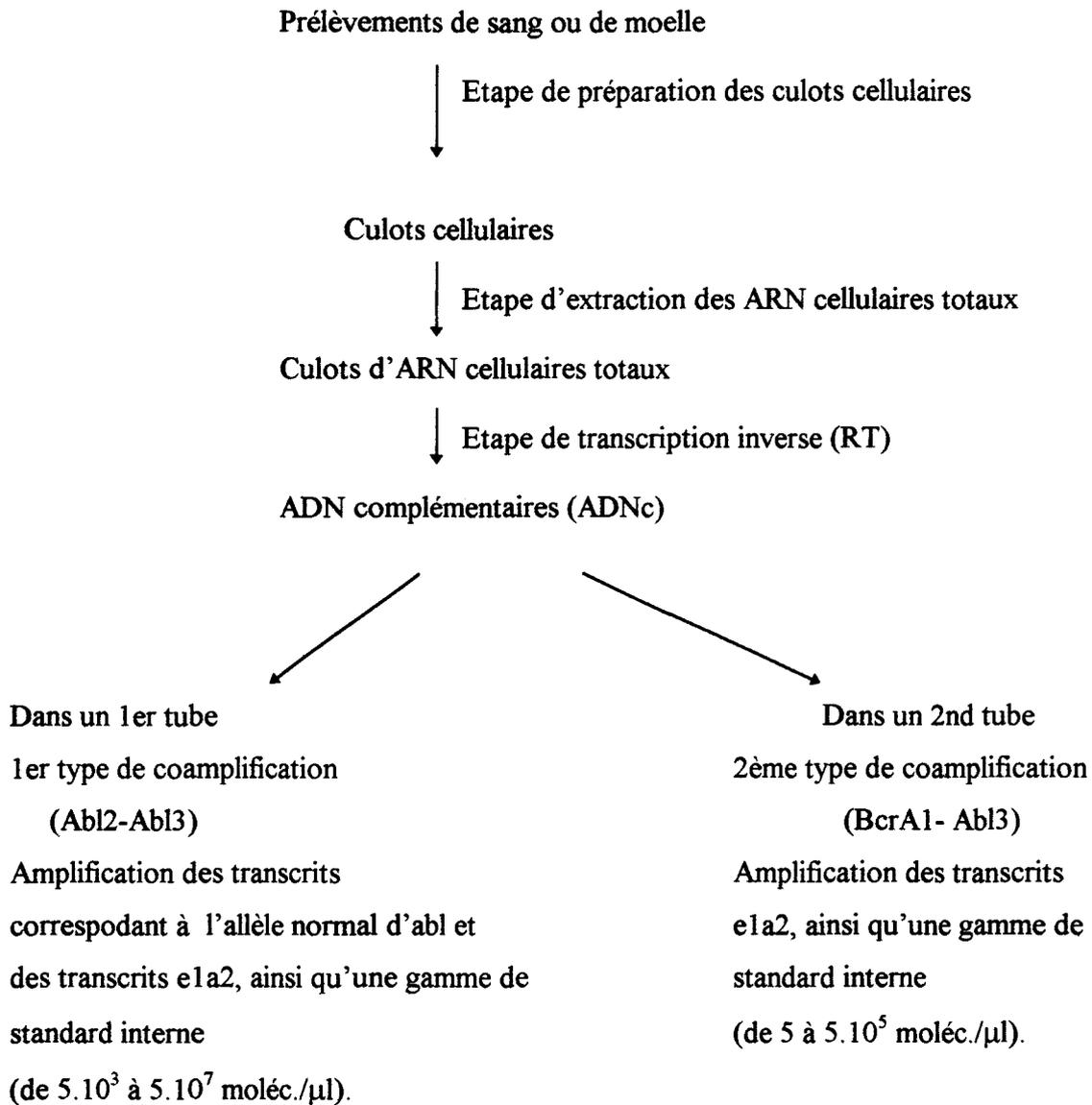


Figure 7 : Récapitulatif des différentes étapes de la technique de RT-PCR compétitive.

Deux types d'amplification sont conjointement réalisées.

La première est réalisée avec le couple d'amorces Abl2-Abl 3 (Bioprobe systems, france).

L'amorce Abl2 est spécifique d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. L'amorce Abl3 est quant à elle spécifique d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 3 du gène *abl*. Grâce à l'utilisation du couple d'amorces Abl2-Abl3, on amplifie les transcrits chimères e1a2 correspondant à l'expression des gènes *bcr-abl*, les transcrits correspondant au gène *abl* et/ou une gamme étalon, en quantités connues, de standards internes de coamplification (de $5 \cdot 10^3$ molécules/ μ l à $5 \cdot 10^7$ molécules/ μ l). (figures 6 et 7, pp : 70 et 81 respectivement)

La deuxième est réalisée avec le couple d'amorces BcrA1-Abl3 (Bioprobe systems, france).

l'amorce BcrA1 est spécifique d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon 1 du gène *bcr*. Grâce au couple d'amorces BcrA1-Abl3 on amplifie les transcrits chimères e1a2 correspondant à l'expression des gènes *bcr-abl* et/ou une gamme étalon, de quantités connues, de standards internes de coamplification (de 5 molécules/ μ l à 10^4 molécules/ μ l). (figures 6 et 7, pp : 70 et 81 respectivement)

L'amorce Abl3, commune aux deux types de réaction de PCR, est marquée en 5' par une molécule de fluorochrome (Bioprobe systems, France).

- L'amplification Abl2-Abl3.

Coamplification (PCR compétitive et quantitative).

2 µl d'ADNc ou 2 µl d'H₂O mQ et 1 µl de standard ($5 \cdot 10^3$ à $5 \cdot 10^7$ molécules/µl) sont mélangés, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,05 mM ; 0,5 unités de Taq polymérase (Appligène, France) et 7,5 pmol de chaque amorce. Le volume réactionnel final est de 50 µl. 15 µl d'huile minérale (Sigma, France) sont déposés au dessus de chaque mélange réactionnel. Après une étape de dénaturation à 94°C (10 min), 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 67°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (2 min) sont réalisés. La réaction d'amplification se termine par une réaction d'élongation à 72°C (10 min). Les réactions d'amplification sont réalisées sur l'appareil Trio-thermoblock (Biometra, Allemagne) ou le Progene (Techne, Angleterre).

La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue est de 212 pb (pour le transcrit) et de 204 pb (pour le standard).

Amplification simple (contrôles de la qualité de la réaction de PCR et de la réaction de transcription inverse).

2 µl d'ADNc 2 µl d'H₂O mQ ou 1 µl de standard ($5 \cdot 10^4$ molécules/µl) sont mélangés, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,05 mM ; 0,5 unités de Taq polymérase (Appligène, France) et 7,5 pmol de chaque amorce. Le volume réactionnel est de 50 µl. 15 µl d'huile minérale (Sigma, France) sont déposés au dessus de chaque mélange réactionnel. Les étapes suivantes sont identiques à celles réalisées lors de la coamplification.

La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue est de 212 pb (pour le transcrit) et de 204 pb (pour le standard).

- L'amplification BcrA1-Abl3.

Coamplification. (PCR compétitive et quantitative).

2 µl d'ADNc ou 2 µl d'H₂O mQ et 1 µl de standard (5 à 5.10⁴ molécules/µl) sont mélangés, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,05 mM ; 0,5 unités de Taq polymérase (Appligène, France) et 7,5 pmol de chaque amorce. Le volume réactionnel final est de 50 µl. 15 µl d'huile minérale (Sigma, France) sont déposés au dessus de chaque mélange réactionnel. Après une étape de dénaturation à 94°C (10 min), 48 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 68°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (2 min) sont réalisés. La réaction d'amplification se termine par une réaction d'élongation à 72°C (10 min).

La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue est de 378 pb (pour le transcrit) et de 370 pb (pour le standard).

Amplification simple (contrôles de la qualité de la réaction de PCR et de la réaction de transcription inverse).

2 µl d'ADNc ou 2 µl d'H₂O mQ ou 1 µl de standard (5.10⁴ molécules/µl) sont mélangés, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,05 mM ; 0,5 unités de Taq polymérase (Appligène, France) et 7,5 pmol de chaque amorce. Le volume réactionnel final est de 50 µl. 15 µl

d'huile minérale (Sigma, France) sont déposés au dessus de chaque mélange réactionnel. Les étapes suivantes sont identiques à celles réalisées lors de la coamplification.

La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue est de 378 pb (pour le transcrit) et de 370 pb (pour le standard).

II-4-2-c- Le rendement d'amplification.

Il est à noter que le rendement d'amplification, au cours des différents types de PCR compétitive, est certainement identique pour le standard interne de coamplification et l'ADNc (le transcrit étudié), ceci pour deux principales raisons. La première est qu'au cours d'une même réaction de PCR compétitive, nous utilisons le même couple d'amorces pour le standard interne et l'ADNc. La deuxième est que la petite délétion de 8 pb au sein de la séquence nucléotidique du standard interne de coamplification ne peut entraîner un dééquilibrage.

II-4-2-d- Les problèmes de contamination.

Pour chaque type de réactions de PCR, afin de palier à l'obtention toujours possible de résultats faussement positifs ou faussement négatifs, différents types de contrôle sont réalisés : comme témoin « négatif » ou de « non-contamination », on utilise de l'eau mQ ou une quantité fixe d'ARNm (pas de transcription inverse) ; comme témoin « positif », on utilise une quantité fixe et connue de standard interne de coamplification (5.10^4 molécules/ μ l). Cette précaution nous permet, également, de juger de la qualité de la réaction de transcription inverse. Le stockage et la préparation des culots cellulaires, des culots d'ARN cellulaires totaux (-80°C), des culots d'ADNc (4°C), des réactifs de la réaction de

PCR, du standard interne de coamplification (4°C), des produits d'amplification (à température ambiante) se font dans des endroits spécifiques et différents. Concernant plus particulièrement la réaction de PCR compétitive, la préparation des « mix » de PCR, leur répartition dans plusieurs tubes Eppendorf, ainsi que le dépôt des ADNc et d'une couche d'huile recouvrant le tout sont réalisés sous une hotte stérile (à flux laminaires verticaux) dans une pièce, différente de celle utilisée pour le dépôt dans chacun de ces mélanges, à travers la couche d'huile, du standard interne de coamplification ou de l'H₂O mQ.

La préparation de la gamme étalon, de quantités connues de standard, se fait également dans cette dernière pièce.

II-4-2-e- Analyse des différents produits d'amplification.

Cette analyse est possible

soit, après une électrophorèse en gel d'agarose à 3 % (P/V) « coloré » au BET (0,5 µg/ml).

10µl d'échantillons /50µl total de la réaction de PCR mélangés à 3µl de BBφ sont déposés dans chaque puits du gel d'agarose à 3%. La migration se fait sous une tension de 80 V constante et grâce au tampon de migration TBE 1X. La révélation des fragments d'ADN amplifiés se fait sous UV (à 366 nm) grâce à la révélation des molécules de BET.

ou soit, grâce à l'utilisation du « 373 DNA sequencer , Applied Biosystems » (Perkin Elmer, USA), après une électrophorèse en gel dénaturant (urée 600 mM) à 6% d'acrylamide/bis-acrylamide (19:1) et l'analyse des fragments d'ADN amplifiés grâce à l'utilisation du programme informatique « Genescan 672». (figure 8, p : 89)

La délétion de 8 pb au sein de la séquence nucléotidique du standard interne de coamplification permet de distinguer les fragments d'ADN amplifiés correspondant aux

transcrits étudiés et ceux, plus courts de 8 bp, correspondant au standard interne de coamplification.

Pour que ce type d'analyse soit possible, une attention technique particulière doit être apportée concernant :

- la préparation des échantillons avant leur dépôt sur le gel de polyacrylamide.

Aux 4 µl d'échantillons/50µl total la réaction de PCR sont ajoutés 0,5 µl de NaOH (100 mM), 3µl d'une solution d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) (50 mM, pH 8)/formamide (100%, désionisée) à la proportion 1/5 et 0,5 µl d'un marqueur de taille : le Genescan-2500™ ROX (Perkin Elmer, USA). Ce mélange est ensuite placé à 94°C, 4 min, puis très vite à 4°C (ceci afin d'éviter la renaturation).

- la préparation du gel dénaturant (urée 600 mM) à 6% d'acrylamide/bis-acrylamide (19:1).

L'urée et le mélange d'acrylamide/bis-acrylamide sont dissous dans 24 ml d'H₂O mQ. On ajoute à cette solution 1 g de résine échangeuse d'ions. On laisse le tout en contact sous agitation pendant 5 min. On filtre la solution sous vide, on y ajoute 8 ml d'une solution de TBE et on complète le tout par de l'H₂O mQ, qsp 80 ml. On filtre de nouveau la solution sous vide. On y ajoute les catalyseurs de polymérisation : 600 µl de Peroxidisulfate d'ammonium (NH₄)₂S₂O₈ et 60 µl de TEMED (N,N,N',N'-Tétra-méthyl éthylènediamine).

Il est important de ne pas utiliser d'alcool, de détergents agressifs, ni de gants pour le nettoyage et l'assemblage des plaques avant de couler le gel de polyacrylamide, car il y a risque de fluorescence parasite. Pour les mêmes raisons, il est également nécessaire de ne pas rayer les plaques avant leur montage.

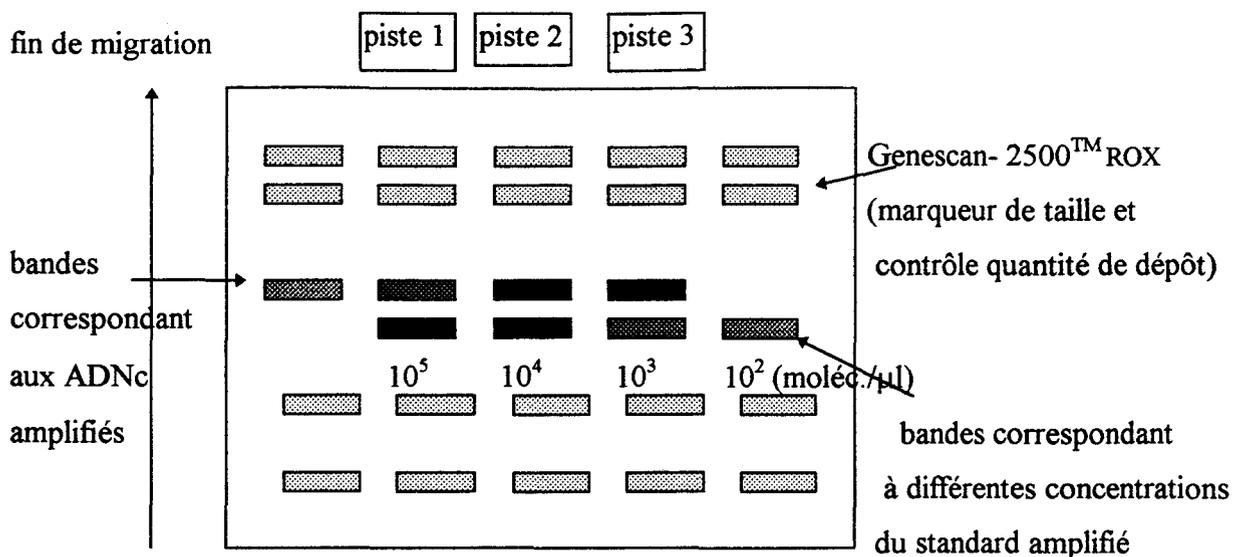
Les conditions de migration sont :

- pour le 1^{er} type de réaction de PCR, couple d'amorces Abl2-Abl3 : 24 puits, 4 µl de chaque échantillon par puits, 6 h, 100 V constants, tampon de migration TBE 1X.

- pour le 2^{ème} type de réactions de PCR , couple d'amorces BcrA1-Abl3 : 24 puits, 4 µl de chaque échantillon par puits, 12 h, 800 V constants, tampon de migration TBE 1X.

L'analyse des résultats s'effectue au cours de la migration par électrophorèse en gel d'acrylamide, un système alliant un faisceau laser et le programme informatique « Genescan 672 » permet de détecter chaque molécule de fluorochrome fixée en 5' de l'amorce Abl3. Une mesure de l'intensité de fluorescence est donc possible, elle correspond soit à la quantité initiale inconnue des transcrits étudiés, soit à la quantité initiale connue du standard interne de coamplification. On peut ainsi connaître, au point d'équivalence de ces deux types d'intensité de fluorescence, le nombre initial de molécules de transcrits étudiés présents dans chaque culot cellulaire par rapport au nombre de molécules de standard interne de coamplification (figure 8, p : 89).

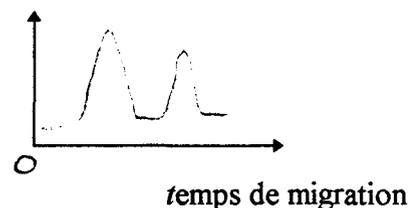
Sachant que le premier type de coamplification (Abl2-Abl3) permet l'amplification des transcrits correspondant à l'expression de l'allèle normal du gène *abl* et des transcrits chimères e1a2 ; que le deuxième type de coamplification (BcrA1-Abl3) ne permet que l'amplification des transcrits chimères e1a2 ; et que pour chaque type de coamplification il est possible de calculer le nombre de molécules de chaque type de transcrits ; il est donc possible d'estimer la quantité de transcrits chimères e1a2 par rapport à la quantité de transcrits correspondant à l'expression de l'allèle normal du gène *abl*. Ce rapport a surtout comme directive principale de pouvoir juger de la qualité des transcrits étudiés, en début de méthodologie, ainsi que de la qualité de la réaction de transcription inverse en prenant comme références des échantillons préparés à partir de prélèvements de sang ou de moelle prélevés au diagnostic.



début de migration

piste 1

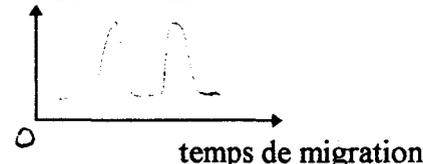
Intensité de fluorescence



piste 1 : l'intensité de fluorescence de la bande correspondant aux ADNc amplifiés est plus faible que celle correspondant à une concentration de standard interne amplifié

piste 2

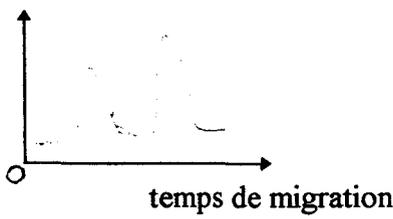
Intensité de fluorescence



piste 2 : l'intensité de fluorescence de la bande correspondant aux ADNc amplifiés est identique à celle correspondant à une concentration de standard interne amplifié

piste 3

Intensité de fluorescence



piste 3 : l'intensité de fluorescence de la bande correspondant aux ADNc amplifiés est plus forte que celle correspondant à une concentration de standard interne amplifié

Figure 6 : Résultats obtenus après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 6% et analyse des échantillons par le « 373 DNA sequencer, Applied Biosystems » couplé au « Genescan 672 ».

II-5- La technique d'Inverse PCR (figures 9 et 10, pp : 92 et 94 respectivement).

Cette technique va nous permettre d'isoler des fragments d'ADN double brin correspondant à l'allèle transloqué *bcr-abl*.

II-5-1- Préparation des culots cellulaires.

Cette préparation s'effectue à partir de prélèvements de sang. Toutes les étapes de cette méthode sont identiques à celles décrites, chap. II-3-1-, pp : 59-60.

II-5-2- Extraction de l'ADN génomique.

Cette extraction d'ADN est réalisée à partir de culots de 50 à 80 millions de cellules.

On reprend les culots cellulaires dans une solution de STE 1X, à raison de 1 ml pour 10 millions de cellules, puis on y ajoute une solution de STE 1X contenant du sarcosyl à 1 %, à raison de 1 ml pour 10 millions de cellules, additionnée de 1 mg de protéine kinase K. Cette étape permet la fragilisation de membranes cellulaires et nucléaires. On laisse l'échantillon 1 nuit, sous agitation, à 42°C (T° optimale d'action de l'enzyme). Suit ensuite l'étape d'extraction de l'ADN génomique. Après cette incubation sous agitation, on ajoute dans une proportion isovolumétrique une solution de phénol. Après avoir mélangé délicatement l'échantillon par retournements successifs, on le centrifuge 7 min à 3 000 t/min. On récupère alors la phase aqueuse (la phase supérieure) qui contient l'ADN génomique et on y ajoute dans une proportion isovolumétrique une solution contenant pour moitié du phénol

et pour autre moitié du chloroforme. On mélange doucement l'échantillon pendant 5 min et on le centrifuge 7min à 3 000 t/min. On récupère de nouveau la phase aqueuse ou supérieure. On réitère cette dernière opération une seconde fois. On ajoute à la phase supérieure ou aqueuse contenant l'ADN génomique dans des proportions isovolumétriques une solution de chloroforme, on agite et on centrifuge une nouvelle fois l'échantillon. Suit ensuite l'étape de précipitation de l'ADN génomique. A la phase aqueuse (la phase supérieure) contenant l'ADN génomique, on ajoute 1/10ème V d'acétate de Na 2M et 2,5 V d'alcool absolu (- 20°C). L'ADN génomique précipite. Délicatement on enroule les molécules d'ADN autour d'une baguette en verre. On lave les molécules d'ADN en trempant la baguette dans une solution d'alcool à 70 % (- 20°C). Puis on dissout ces molécules d'ADN dans une solution de TE 1X. On conserve l'ADN à - 20°C. L'ADN est dosé par spectrophotométrie UV à 260 nm.

II-5-3- Digestion de l'ADN génomique par l'endonucléase de restriction Nla III (figure 9 et 10, pp : 92 et 94 respectivement).

La première étape de cette technique consiste en une digestion de l'ADN génomique par l'endonucléase de restriction *Nla III* :

- de patients atteints de LMC, et pour lesquels les points de cassure au cours de la translocation se situent, au niveau du gène *bcr*, exclusivement entre les exons b2 et b3 (transcrits chimères b2a2).
- de patients ne présentant pas de LMC.

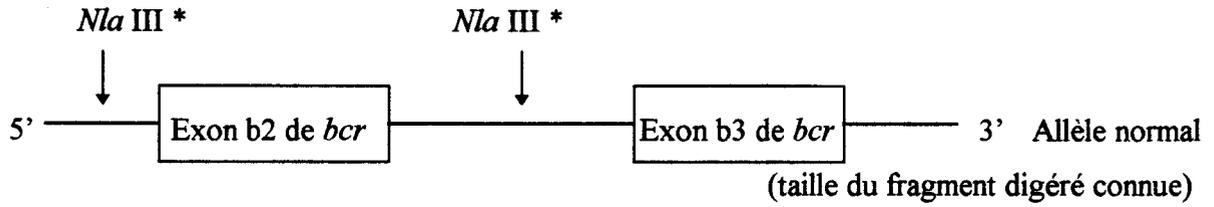
Pour l'allèle correspondant au gène *bcr*, la localisation des sites de restriction *NlaIII* est connue, ils se situent sur la partie intronique entre les exons b1 et b2, et, entre les exons b2 et b3 (figures 9 et 10, pp : 92 et 94 respectivement).

Concernant l'allèle transloqué *bcr-abl*, le ou le(s) site(s) de restriction *Nla III* se situe(nt) sur la partie intronique entre l'exon b2 du gène *bcr* et l'exon 2 du gène *abl*, sa ou leur localisation(s) est ou sont inconnue(s) (figure 10, p : 94).

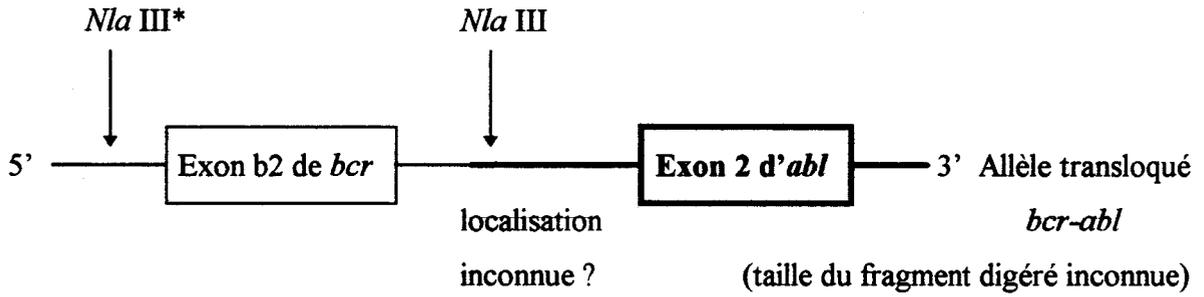
On digère environ 1 µg d'ADN génomique avec 10 unités de l'endonucléase de restriction *NlaIII* / µg d'ADN double brin. Le volume total de la réaction est au maximum de 20 µl. La réaction s'effectue, selon les conditions indiquées par le fabricant (New England Biolabs Inc., USA), 3 h à 37°C.

Dans le but d'une amélioration du rendement de la réaction de digestion, en gardant les mêmes quantités d'ADN (1 µg) et de *NlaIII*, nous avons fait varier la durée de réaction (2 h, 2 h 30min,

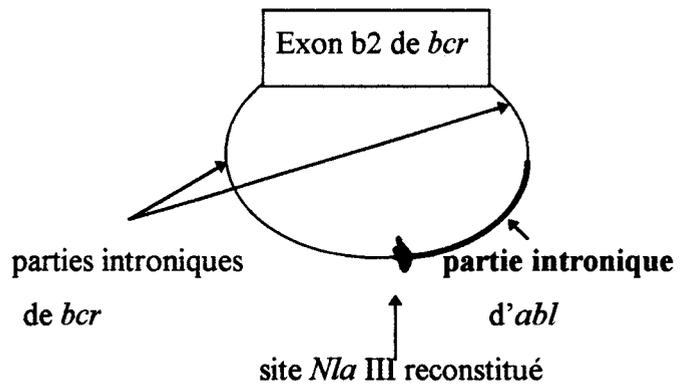
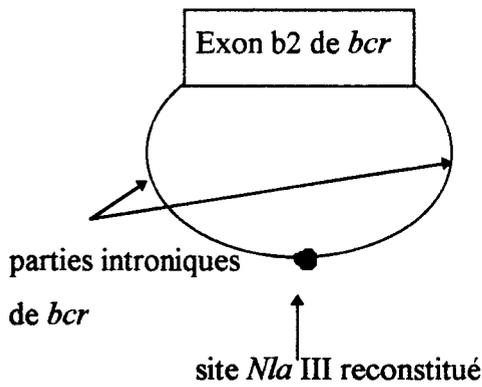
Digestion enzymatique par *Nla* III



* : localisation connue



Circularisation



Localisation des différentes amorces utilisées

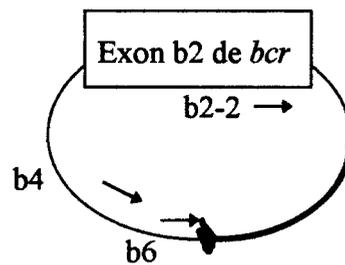
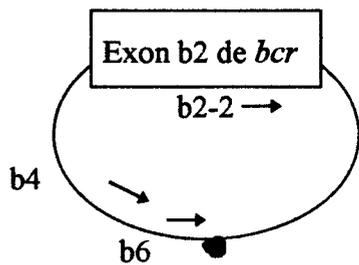


Figure 10 : Récapitulatif des différentes étapes de la technique d' « Inverse » PCR

3 h, 3 h 30 min, ...), les concentrations d'ADN à digérer pour une même quantité de *Nla III*, le volume final de la réaction de digestion, sans plus de résultats.

Après purification, précipitation de l'ADN génomique digéré par 2,5 V d'éthanol à 100% (-20°C) et 1/10^{ème} V d'acétate d'ammonium 2M et centrifugation (30 min, 15 300 t/min, 4°C), l'ADN est lavé par 200 µl d'éthanol à 70% (-20°C). Après une nouvelle étape de centrifugation, les culots d'ADN sont repris dans 20 µl d'H₂O mQ.

II-5-4- Ligature (figure 10, p : 94).

Après cette étape, une étape de ligature est effectuée sur les fragments d'ADN génomique double brin digérés obtenus. Celle-ci permet la reconstitution des sites nucléotidiques reconnus par l'endonucléase de restriction *NlaIII* et donc l'obtention de fragments d'ADN circulaires double brin.

On réalise la ligature de 150 ng ou 200 ng d'ADN génomique précédemment digéré. A cet ADN, on ajoute 120 unités de « T₄ DNA ligase » (New England Biolabs, USA) et 100 mM d'adénosine 5'-triphosphate (pH 7,5) (Pharmacia Biotech., USA). La réaction de ligature s'effectue dans un volume final de 600 µl, 12 h à 16°C.

Dans le but d'une amélioration de cette étape de ligature, nous avons fait varier le volume final de la réaction, les quantités d'ADN, la température de réaction (12°C, 37°C, 25°C, 16°C), ainsi que la durée de la réaction, sans plus de résultats.

Après purification, précipitation par 2,5 V d'éthanol à 100% (-20°C) et 1/10^{ème} V d'acétate d'ammonium 2M et centrifugation (30 min, 15 300 t/min, 4°C), les fragments d'ADN

circulaires double brin sont ensuite lavés par 200 µl d'éthanol à 70% (- 20°C). Après une nouvelle étape de centrifugation, les culots d'ADN sont repris par 20 µl d'H₂O mQ.

II-5-5- PCR exponentielle (b2-2/b4) (figures 9 et 10, p : 92 et 94 respectivement).

Sur ces fragments d'ADN circulaires double brin, on réalise une étape de PCR exponentielle à l'aide d'un couple d'amorces b2-2/b4 orientées de façon opposée sur le fragment d'ADN circulaire double brin (Bioprobe systems, France). L'amorce b2-2 est spécifique d'une partie de la séquence nucléotidique de l'exon b2 du gène *bcr*. L'amorce b4 est spécifique d'une partie de la séquence nucléotidique de l'intron situé entre les exons b1 et b2 du gène *bcr*, elle est située à proximité d'une des deux sites de restriction *Nla*III reconstitués (figures 9 et 10, pp : 92 et 94 respectivement).

La totalité des fragments d'ADN (12 µl) est mélangée, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,2 mM ; de la formamide désionisée 2% ; 1 unité de Taq polymérase (Appligene, France) et 15, 20 ou 25 pmol de chaque amorce. Le volume réactionnel final est de 50 µl. Au dessus de chaque mélange réactionnel, on ajoute 15 µl d'huile minérale (Sigma France). Après une étape de dénaturation à 94°C (10 min), 40 ou 50 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 62°C ou 65°C ou 67°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (10 min) sont réalisés. La réaction d'amplification s'achève par une étape d'élongation à 72°C (10 min). Les réactions d'amplification sont possibles grâce à l'emploi de l'appareil Trio-thermoblock (Biometra

Allemagne) ou Progene (Techne, Angleterre). La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue est de 451 pb.

II-5-6- PCR linéaire(b6 ou « Run off ») (figures 9 et 10, pp : 92 et 94 respectivement).

A la suite de cette étape de PCR exponentielle, à partir des produits d'amplification obtenus, une autre étape de PCR est réalisée grâce à l'amorce b6 marquée en 5' par du [γ -P³²] dATP. Cette amorce est située à proximité de l'amorce b4, dans la même orientation (figures 9 et 10, pp : 92 et 94 respectivement).

On marque 50 à 100 pmol de l'amorce b6 avec 3 μ l de [γ -P³²]dATP. 2 μ l de DTT et 10 unités de « Polynucleotide kinase FPLC pure cloned » (Pharmacia, USA) sont utilisés. Le volume final de la réaction est de 20 μ l. Cette réaction s'effectue, selon les recommandations du fabricant, au minimum 1 h à 37°C. Elle est stoppée par l'élévation de la température à 94°C, pendant 2 min et l'addition d'EDTA 1M, pH 7,5. L'amorce b6 marquée en 5' par du [γ -P³²]ATP est ensuite purifiée, après une étape de chromatographie sur colonne « Quick Spin TM Columns Sephadex G-25 fine » (Boehringer Mannheim, Allemagne).

5 ou 10 μ l des produits d'amplification obtenus après l'étape de PCR exponentielle (b2-2/b4) sont mélangés, dans un tube Eppendorf, à une solution contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 ; du MgCl₂ 1,5 mM ; du KCl 50 mM ; des dNTP 0,2 mM ; 1 unité de Taq polymérase (Appligene, France) et 5 pmol de l'amorce b6 marquée. Le volume réactionnel

final est de 20 µl. Au dessus de chaque mélange réactionnel, on ajoute 15 µl d'huile minérale (Sigma, France). Après une étape de dénaturation à 94°C (10 min), 10, 15 ou 25 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation à 94°C (1 min), une étape d'appariement à 52°C, 54°C, 56°C ou 58°C (1 min) et une étape d'élongation à 72°C (2 min) sont réalisés. La réaction d'amplification s'achève par une étape d'élongation à 72°C (10 min). Les réactions d'amplification sont possibles grâce à l'emploi de l'appareil Trio-thermoblock (Biometra Allemagne) ou Progene (Techne, Angleterre). La taille des fragments d'ADN amplifiés attendue est de 474 pb pour l'allèle normal du gène *bcr*.

II-5-7- Analyse des produits d'amplification obtenus.

Elle est possible après une électrophorèse en gel dénaturant (urée 600 mM) à 6% d'acrylamide/bis-acrylamide (19:1), de 4 µl de produits d'amplification mélangés à 4 µl d'une solution « stop » (95% de formamide ; EDTA 20 mM ; 0,05% de BBφ ; 0,05% de Xylène). La migration s'effectue sous 85 W constant et grâce au tampon de migration TBE 1X. L'analyse des fragments d'ADN amplifiés obtenus, est possible grâce à l'utilisation d'un PhosphorImager : 445 SI (Molecular Dynamics, USA).



RESULTATS ET DISCUSSION

Le chromosome Philadelphie, comme le gène de fusion *bcr-abl* et comme les transcrits chimères qui en découlent représentent de bons marqueurs génétiques. En ce sens, leur détection par les différentes techniques de cytogénétique conventionnelle et de biologie moléculaire, présentées au chapitre « Matériels et méthodes », est utile pour pouvoir affiner, confirmer ou affirmer un diagnostic, mais également pour réaliser un suivi de la maladie résiduelle, c'est à dire estimer le nombre de cellules leucémiques résiduelles et donc évaluer l'efficacité d'un traitement.

I- Etudes réalisées pour l'aide au diagnostic des hémopathies.

I-1- Les LMC classiques et les LMC sans chromosome Philadelphie.

(Résultats présentés sous forme de poster au 2ème congrès de l'« European Haematology Association », à Paris en juin 1996, résumé situé en annexe pp : 185)

Entre janvier 1981 et janvier 1996, 563 patients, dont le tableau clinique évoquait une LMC, ont été étudiés par les techniques de cytogénétique conventionnelle, de Southern, d'hybridation « in situ » en fluorescence (FISH) et de RT-PCR décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

Sur ces 563 patients, 97 % présentent au sein de leurs cellules leucémiques la translocation $t(9;22)$ classique, les 3% restants (= 15 patients) ne présentent pas de translocation $t(9;22)$ classique au sein de leur cellules leucémiques. Parmi ces 15 patients, 14 avaient un caryotype normal et 1 patient présentait une $t(5;12)$ (q32;p12).

Pour ces 15 patients, une recherche des gènes de fusion *bcr-abl* par la technique de FISH et des transcrits chimères b2a2, b3a2, b2a3, b3a3 et e1a2 par les différentes techniques de

RT-PCR ont été réalisées. Si ces patients présentaient des résultats de RT-PCR et/ou de FISH négatifs, une analyse des réarrangements au sein de la région M-bcr est réalisée par la technique de Southern. 5 de ces 15 patients présentaient des résultats de RT-PCR (présence des transcrits chimères b2a2 et b3a2 exclusivement), de FISH et de Southern positifs. Ces 5 patients avaient un caryotype normal. Concernant le sex ratio, le pourcentage d'éosinophiles ou de basophiles sanguins, le taux de plaquettes, le taux d'hémoglobine et le pourcentage d'érythroblastes médullaires, aucune différence n'est retrouvée entre les patients Ph- bcr+ et Ph-bcr-. Par contre, une différence significative est retrouvée pour la moyenne d'âge (51 ans pour les Ph-bcr+ contre 69 ans pour les Ph-bcr-), le taux de leucocytes (103 giga/l pour les Ph-bcr+ contre 40 giga/l pour les Ph-bcr-). De même, sur le plan morphologique, une dysmyélopoïèse est retrouvée chez 5 des 10 patients Ph-bcr- et nullement chez aucun des patients Ph-bcr+.

En conclusion, notre étude diffère de celles de la littérature (176, 177) : les cas de LMC Ph-bcr+ observés sont très rares et représentent moins de 2 % de la population totale des LMC. Ces différences de résultats peuvent être le reflet de démarches méthodologiques différentes selon les équipes. Cette étude confirme que ces LMC Ph-bcr+ présentent certaines caractéristiques cliniques qui leur sont spécifiques ; ces formes sont à distinguer des LMC Ph-bcr- (encore appelés LMC atypique ou aCML) (176-178). D'autre part, nos résultats montrent que les techniques de cytogénétique conventionnelle permettent de détecter, au diagnostic, dans 97 % des cas de LMC et sans ambiguïté, une t(9;22) (q34;q11). Pour affiner l'étude des LMC Ph-, il est nécessaire d'avoir recours, en plus de la cytogénétique conventionnelle, à des techniques telles que le Southern, la FISH et la RT-PCR permettant la détection de réarrangements moléculaires au niveau des gènes *bcr* et *abl*. En utilisant une ou plusieurs de ces techniques, certains auteurs ont pu mettre en évidence la présence du gène de fusion *bcr-abl* au niveau d'un chromosome qui n'est pas le chromosome Ph, ou

encore l'insertion du gène *abl* dans le gène *bcr* sans translocation réciproque, ou encore des réarrangements au sein du gène *bcr* sans juxtaposition de séquences du gène *abl* (176, 177). Il paraît même plus judicieux d'utiliser la technique de FISH plutôt que celle de RT-PCR pour ces LMC Ph-. En effet, certains patients atteints de LMC présentent des transcrits chimères « atypiques » (74-77). Depuis cette étude, nous avons d'ailleurs pu mettre en évidence, dans le cadre d'une étude portant sur d'autres patients, en particulier des formes thrombocytémiques de syndrome myéloprolifératif, un patient présentant un transcrit de type b3a3. La mise en évidence des différents types de transcrits pouvant être présents dans les LMC, par la technique de RT-PCR, nécessite donc l'utilisation d'un grand nombre d'amorces, alors que la technique de FISH permet, avec l'utilisation d'un seul couple de sondes, la détection de l'ensemble des points de jonction (sans en préciser, toutefois, les points de cassure). D'autre part, la technique de FISH a pour avantage par rapport à la technique de RT-PCR de ne pas nécessiter autant de contrôles et de précautions afin d'éviter les résultats dits faussement négatifs ou faussement positifs.

I-2- Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) et LMC : deux entités distinctes ?

(Cette étude a fait l'objet d'une publication située en annexe, pp : 186-187)

Cinq cas de LMC Ph+ avec des réarrangements au niveau de la région m-bcr (transcrits e1a2) ont été rapportés dans la littérature (77). Ces 5 patients présentent une monocytose excessive, une basophilie, une forte myélémie et un score de phosphatases alcalines effondré suggérant un tableau clinique intermédiaire entre celui d'une LMC et celui d'une LMMC. Ces résultats permettent de penser qu'il pourrait exister dans certains cas de LMMC des transcrits e1a2 (77). Les LMMC sont des hémopathies clonales dont une partie

est caractérisée à la fois par des signes de myélodysplasie et des signes de myéloprolifération. Les mécanismes génétiques impliqués dans le développement et la progression de cette hémopathie sont peu connus, à l'exception des gènes de la famille RAS dont on peut décrire des mutations ponctuelles chez 20 à 30% des patients et du gène *fms* pour qui des mutations ponctuelles ont été découvertes chez 10% des patients. Nous avons voulu vérifier l'hypothèse de Melo *et al.* (77). Pour ce faire nous avons recherché, grâce à la technique de RT-PCR décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes », la présence des transcrits b2a2, b3a2 et e1a2 chez 36 patients présentant un tableau clinique typique de LMMC. Dans tous les cas, un caryotype a été réalisé, qui n'a jamais détecté de chromosome Ph. Aucun de ces patients ne présente de réarrangements dans les loci m ou M-bcr. Nous n'avons donc pas vérifié l'hypothèse émise par Melo *et al.* (77). Depuis notre étude, 2 observations de syndromes myélodysplasiques avec réarrangements au niveau du locus m-bcr ont été rapportés dans la littérature (179). Dans ces 2 cas, aucune hypermonocytose n'est retrouvée. Récemment, nous avons pu détecter un chromosome Ph au cours de l'évolution d'un syndrome myélodysplasique. Initialement, la patiente présentait une anémie réfractaire simple associée à une délétion 5q. C'est au cours de l'évolution de la maladie qu'est apparu le chromosome Ph. 2 sous-clones sont détectés : le premier présente une délétion 5q isolée et le deuxième une délétion 5q, un chromosome Ph et une monosomie 17. Ceci suggère donc que l'apparition du chromosome Ph est un événement cytogénétique secondaire. L'analyse en biologie moléculaire a permis de savoir qu'il s'agissait d'un réarrangement au niveau du locus m-bcr ; ce résultat a d'ailleurs été confirmé par technique de FISH. Au stade d'évolution de la maladie, la patiente présentait un tableau de LMMC (nombre de monocytes sanguins supérieur à 50 giga/l) associé à une dysgranulopoïèse et à une dysérythropoïèse franches. L'anomalie typique des mégacaryocytes observée initialement n'était plus évaluable en raison du nombre très faible de mégacaryocytes

médullaires. La patiente présentait comme pour les cas décrits par Melo *et al.* (77) une hyperbasophilie.

En conclusion, il semble donc que dans les cas de LMMC typiques le gène *bcr* ne soit pas impliqué. Par contre, il existe un très petit nombre de cas de syndromes myélodysplasiques atypiques, formes frontières entre LMMC et LMC, pour lesquels des réarrangements du gène *bcr* dans les loci m-bcr et M-bcr sont retrouvés (179). Il est intéressant de noter que l'apparition de ces événements coïncide souvent avec une progression de la maladie vers un stade plus agressif. Ces formes de syndromes myélodysplasiques atypiques sont à rapprocher d'autres syndromes myéloprolifératifs atypiques, comme ceux exprimant un transcrite *e1a2* (77, 180), une $t(5;12)(q31-33;p12-p13)$ (181) ou une $t(8;13)(p11;q12)$ (182,183) ou enfin des syndromes myélodysplasiques avec anomalie de condensation de la chromatine (184).

I-3- Incidence du chromosome Ph dans les LAL de l'enfant.

(Résultats présentés sous forme de poster à la Société Française d'Hématologie, à Paris en février 1994 et résumé situé en annexe, pp : 188)

Entre juillet 1992 et septembre 1994, une recherche systématique des transcrits *e1a2*, *b2a2* et *b3a2* grâce aux techniques de RT-PCR décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes » et des transcrits *e2a-pbx1* a été réalisée chez 76 enfants atteints de LAL inclus dans le protocole EORTC 58881. Une analyse caryotypique sur la moelle a donné les résultats suivants : deux $t(9;22)$, trois $t(1;19)$, 21 hyperdiploïdies, 25 caryotypes normaux, 19 autres anomalies et six échecs. L'analyse moléculaire permet de détecter des transcrits *e1a2* chez les 2 patients présentant une $t(9;22)$ (soit 2,6% des patients), des transcrits *e2a-pbx1* chez les 3 patients présentant une $t(1;19)$, ainsi que chez 2 autres patients présentant soit un échec de caryotype, soit un caryotype normal.

Notre étude confirme donc, en accord avec la littérature (32, 33, 64), que les LAL de l'enfant sont rarement associées à la présence de transcrits chimères e1a2 (taux inférieur à 5%) et celle de transcrits e2a-pbx1 (taux inférieur à 8%). Toutefois, une recherche systématique de ces transcrits doit être effectuée en particulier lorsqu'il existe un échec de caryotype ou un caryotype normal.

I-4- Recherche par techniques de RT-PCR des transcrits chimères e1a2, b2a2 et b3a2 à partir de culots cellulaires fixés dans un mélange de méthanol et d'acide acétique (3/1) préparés en vue d'une étude cytogénétique.

(Cette étude a fait l'objet d'une publication présentée en annexe, pp : 189-191)

Dans les laboratoires, les analyses rétrospectives de matériels cellulaires conservés pendant plusieurs années prennent une place de plus en plus importante du fait de la découverte de nouveaux gènes impliqués dans les processus de leucémogénèse. Ces analyses sont basées sur une étude de l'ADN, mais surtout sur une étude des ARN messagers grâce à différentes techniques, plus particulièrement la technique de PCR. L'étude rétrospective des ARN messagers est particulièrement délicate car elle nécessite des conditions très particulières de conservation des culots cellulaires à partir desquels sont extraites les molécules d'ARN cellulaires totaux. Jusqu'à ce travail, les seuls résultats corrects étaient obtenus à partir de culots cellulaires conservés à sec à - 80°C ou dans de l'azote liquide (avec addition au moment de la congélation d'un réactif contenant un inhibiteur d'activités ribonucléasiques). Dans ce travail, nous montrons qu'il est possible de détecter, par des techniques de RT-PCR, les transcrits e1a2, b2a2 et b2a3 à partir de cellules conservées dans un mélange de

méthanol et d'acide acétique dans les proportions 3/1 destinées en principe à l'analyse cytogénétique conventionnelle. 3 patients atteints de LAL Ph⁺ et 2 patients atteints de LMC Ph⁺ ont été étudiés. Les prélèvements de moelle ont été réalisés, au diagnostic, entre 1982 et 1989. Les étapes de la préparation des culots de cellules de moelle pour une analyse du caryotype sont décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ». A partir de ces culots cellulaires, maintenus dans une solution contenant du méthanol et de l'acide acétique dans les proportions 3/1, sont extraits les ARN cellulaires totaux. Les différentes étapes de cette extraction sont décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Avant cette étape d'extraction, les culots cellulaires sont lavés deux fois grâce à une solution de PBS à 1 % (NaCl 0,13 M ; Na₂HPO₄H₂O 8 mM ; KH₂PO₄ 0,87 mM ; KCl 2,68 mM). Chacun de ces lavages est suivi d'une centrifugation (20 min à 3 000 t/min, 4°C). Cette étape permet de resuspendre les cellules de moelle, maintenues jusque là dans un milieu acide, dans un milieu neutre (pH 7,5-7,8). Après extraction, nous avons constaté que ces ARN cellulaires totaux étaient de bonne qualité. Nous avons alors voulu savoir s'il nous était possible, à partir de ces culots d'ARN cellulaires totaux, d'amplifier par les techniques de RT-PCR les transcrits chimères e1a2, b2a2 et b3a2 décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ». La réponse fut positive : il nous est possible d'amplifier ces différents types de transcrits, alors que les culots de cellules de moelle sont stockées dans une solution de méthanol et d'acide acétique depuis plus de 10 ans. C'est vraisemblablement ce mélange de méthanol et d'acide acétique qui permet aux molécules d'acides nucléiques, de part leur propriété très hydrophile, de ne pas être totalement dégradées. Ces résultats obtenus sont très intéressants, car ils laissent envisager que des études similaires pourraient être envisagées pour d'autres types de transcrits à partir de matériels conservés depuis plusieurs années par nos collègues cytogénéticiens. Toutefois, même si les ARN cellulaires totaux semblent être de bonne qualité, il n'est pas à omettre qu'ils ont été extraits à partir de

prélèvements de moelle collectés au diagnostic. Il semble donc difficile d'envisager aujourd'hui un suivi rétrospectif de maladie résiduelle à partir de tels échantillons puisque dans ce cas il s'agit de détecter une cellule leucémique sur 10^4 à 10^6 cellules normales.

II- Etude de la maladie résiduelle.

Chez des patients atteints de LMC, ayant reçu une greffe allogénique de moelle osseuse ou traités par l'interféron alpha, une étude qualitative (présence ou non des transcrits chimères b2a2 et b3a2) a été réalisée grâce à une technique de RT-PCR Afin de confirmer l'intérêt d'utiliser une telle méthodologie dans le cadre d'un suivi de la maladie résiduelle, les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus par technique de cytogénétique conventionnelle. Cette étude a fait l'objet de deux publications situées en annexe, pp : 192-198 et 199-200.

Un essai d'étude quantitative de l'ADN correspondant à l'allèle transloqué *bcr-abl* a été réalisé grâce à une technique d'inverse PCR couplée à une technique de PCR compétitive et quantitative chez des patients ayant une LMC et traités par l'interféron alpha.

Chez des patients atteints de LAL Ph⁺ et traités soit par chimiothérapie intensive, soit par greffe allogénique ou greffe autologue de moelle osseuse, une étude qualitative (présence ou absence des transcrits chimères e1a2, b2a2 et b3a2) a été réalisée grâce aux techniques de RT-PCR. Afin de confirmer l'intérêt d'utiliser une telle méthodologie dans le cadre d'un suivi de la maladie résiduelle, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus par technique de cytogénétique conventionnelle. Ce travail a fait l'objet d'une publication située en annexe, pp : 201-205.

Un début d'étude quantitative des transcrits chimères *e1a2* a été réalisée grâce à une technique de RT-PCR compétitive sur des patients présentant une LAL Ph+.

II-1-Les différentes méthodologies de suivi de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LMC.

II-1-1- Etude qualitative par technique de RT-PCR chez des patients ayant reçu une greffe allogénique de moelle non « déplétée » en lymphocytes T. Comparaison des résultats obtenus avec ceux apportés par technique de cytogénétique conventionnelle.

Cette étude a fait l'objet d'une publication située en annexe, pp : 192-198.

II-1-1-a- Présentation des patients.

Entre septembre 1985 et février 1993, 52 patients atteints de LMC Ph+ ont reçu une greffe allogénique de moelle osseuse non « déplétée » en lymphocytes de type T. Après l'application d'un tel traitement, 38 patients ont été retenus pour l'étude que nous présentons ici.

Parmi ces 38 patients, 32 ont reçu une greffe allogénique en première phase chronique, un patient en deuxième phase chronique, 2 patients en phase accélérée et 3 patients en phase aiguë. Pour 32 d'entre eux la greffe allogénique est réalisée avec un donneur histocompatible apparenté, pour les 6 autres avec un donneur histocompatible non apparenté. Les régimes de conditionnement de la moelle sont composés pour 28 patients

d'une irradiation corporelle totale et de cyclophosphamide, pour 10 patients de busulfan et de cyclophosphamide.

II-1-1-b- Méthodologie.

Ces 38 patients ont été étudiés par la technique du caryotype et par la technique de « nested » PCR couplée à une technique de transcription inverse (RT) décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ». 3 analyses du caryotype (100 mitoses étudiées/analyse) ont été effectuées en moyenne par patient sur de la moelle. 4 analyses de RT- « nested » PCR ont été réalisées en moyenne par patient sur du sang et rarement sur de la moelle. Les transcrits étudiés sont les transcrits chimères b2a2 ou b3a2.

II-1-1-c- Résultats.

II-1-1-c-1- Le suivi clinique post-greffe.

Ce suivi a été réalisé en moyenne pendant 56 mois après la greffe (de 6 mois à 98 mois).

18 cas de réactions aiguës et 15 cas de réactions chroniques du greffon contre l'hôte sont observés.

6 patients sont en rechute hématologique 9, 15, 20, 27, 28 et 56 mois respectivement après la greffe. 1 patient (n° 26) est en rechute cytogénétique 69 mois après la greffe. Parmi ces 7 patients, 3 patients (n°14, 30 et 35) meurent rapidement à 10, 18 et 26 mois.

II-1-1-c-2- Le suivi cytogénétique post-greffe.

Au cours des 6 premiers mois qui suivent la greffe de moelle osseuse, 25 patients sont analysés. 23 des 25 patients étudiés présentent un caryotype normal, 2 patients (n° 28 et 26) présentent au sein de leur caryotype un chromosome Ph. L'un de ces deux patients (n°26) recevra de l'interféron alpha peu après le diagnostic de sa rechute cytogénétique.

Après les 6 mois qui suivent la greffe, 32 patients sont analysés. 6 de ces 32 patients présentent au sein de leur caryotype un chromosome Ph. 5 de ces 6 (n° 4, 8, 30, 14 et 25) font une rechute hématologique 1 à 7 mois après cette rechute cytogénétique.

II-1-1-c-3- Le suivi moléculaire.

Pendant les 6 premiers mois qui suivent la greffe de moelle osseuse, 10 des 14 patients étudiés par la technique de RT-« nested » PCR, présentent des résultats de PCR positifs à au moins une occasion. Ces 10 patients peuvent être classés en deux catégories.

- Quatre patients (n° 8, 25, 30, et 14) présentent des résultats de PCR positifs au 1^{er} ou au 2nd tour, associés à des caryotypes normaux.

2 patients ont reçu une greffe allogénique en phase chronique (avec un donneur histocompatible apparenté pour le patient n°30, avec un donneur histocompatible non apparenté pour le patient n°8), 1 patient (n°25) en phase accélérée et 1 patient (n° 14) en phase aiguë (avec un donneur histocompatible apparenté). Pour deux patients (n° 8 et 14), le régime de conditionnement était une irradiation corporelle totale, pour les deux autres patients (n° 25 et 30) du busulfan. 2 patients (n° 8 et 25) présentaient un risque de Sokal

faible, les 2 autres patients (n° 14 et 30) un risque de Sokal intermédiaire. 2 patients (n° 8 et 25) ont reçu par transfusion des leucocytes du donneur d'origine, un de ces patients (n°25) réalisera une réaction du greffon contre l'hôte chronique.

Les résultats de PCR positifs au 1^{er} ou au 2nd tour s'avèrent être ensuite une constante. On observe d'ailleurs dans trois cas (n°8, 14 et 30) que les résultats de PCR positifs uniquement au 2nd tour, sont ensuite positifs au 1^{er} tour. Ces résultats précèdent tous des rechutes cytogénétiques et/ou hématologiques. Deux des ces quatre patients (n°14 et 30) décéderont 10 et 18 mois après la greffe.

- Cinq patients (n°10, 12, 13, 22, 33) présentent des résultats de PCR positifs au 2nd tour, associés à un caryotype normal. 1 patient (n°28) présente des résultats de PCR+ au 1^{er} tour, associé à un caryotype anormal (1Ph+/120 mitoses).

Ces six patients ont reçu une greffe allogénique en phase chronique, tous avec un donneur histocompatible apparenté. Cinq patients (n° 10, 13, 22, 33 et 28) ont reçu comme régime de conditionnement une irradiation corporelle totale, 1 patient (n°12) du busulfan. 2 patients (n° 12 et 22) présentaient un risque de Sokal faible, 2 autres patients (n° 10 et 33) un risque de Sokal intermédiaire et les 2 derniers patients (n° 13 et 28) un risque de Sokal élevé. 2 patients (n°12 et 13) sont amenés à réaliser une réaction de greffon contre l'hôte chronique, 2 autres patients (n°22 et 28) une réaction de greffon contre l'hôte chronique et aiguë.

Ces six patients (n°10, 12, 13, 22, 33 et 28) présentent ensuite des résultats de PCR négatifs, sans qu'aucune rechute cytogénétique et/ou hématologique ne soit décelée après 16 à 66 mois après la greffe.

Après 6 mois de greffe, 30 patients présentent des résultats de PCR constamment négatifs, aucun d'eux ne rechutera pendant la période d'étude.

8 patients présentent au moins un résultat de PCR positif. Parmi eux, nous retrouvons les 4 patients (n° 8, 25, 30 et 14), décrits précédemment et présentant des résultats de PCR + pendant les 6 premiers mois. Comme nous l'avons signalé, ces résultats de PCR + précèdent la rechute cytogénétique et/ou hématologique.

1 patient (n°4) présente un caryotype normal 44 mois après la greffe, des résultats de PCR+ au 2nd tour après 45 et 48 mois après la greffe associés à un caryotype normal 50 mois après la greffe. Ces résultats de PCR+ précèdent une rechute cytogénétique (23 cellules Ph+/26 mitoses) et hématologique 56 mois après la greffe. Ce patient reçoit alors de l'interféron alpha : on observe ensuite des rechutes cytogénétiques 80 et 86 mois après la greffe (18 et 22 cellules Ph+/ 22 mitoses, respectivement), mais sans rechute hématologique.

Ce patient avait reçu une greffe allogénique en phase chronique (avec un donneur histocompatible apparenté), avec un régime de conditionnement par irradiation corporelle totale. Il présentait un risque de Sokal faible. Il a fait une réaction du greffon contre l'hôte de type chronique.

1 patient (n° 26), après détection d'une rechute cytogénétique 10 mois après la greffe (8 cellules Ph+/40 mitoses), reçoit de l'interféron alpha. Il présente ensuite des résultats de PCR + au 2nd tour 53 mois après la greffe et des résultats de PCR+ au 1^{er} tour 65 mois après la greffe. Ces résultats de PCR+ précèdent une rechute cytogénétique 68 mois post-greffe (2 cellules Ph+/67 mitoses), avec des résultats de PCR+ au 1^{er} tour 78 mois post-greffe, sans rechute hématologique.

Ce patient a reçu une greffe allogénique en phase chronique (avec un donneur histocompatible apparenté), avec un régime de conditionnement par irradiation corporelle totale. Il présentait un score de Sokal faible.

1 patient (n°35) présente un caryotype normal 12 mois après la greffe et des résultats de PCR+ au 2nd tour. Ces résultats précèdent une rechute extramédullaire et décès 19 mois après la greffe.

Ce patient a reçu une greffe allogénique en phase aiguë (avec un donneur histocompatible apparenté), avec un régime de conditionnement par irradiation corporelle totale. Il présentait un risque de Sokal intermédiaire. Il a développé des réactions du greffon contre l'hôte de type aiguë et chronique.

1 patient (n°23) présente un caryotype normal 36 mois après la greffe, accompagné de résultats de PCR+ au 1^{er} tour. 60 mois et 76 mois après la greffe, il présente des résultats de PCR négatifs.

Ce patient a reçu une greffe allogénique en phase chronique (avec un donneur histocompatible apparenté), avec un régime de conditionnement par irradiation corporelle totale. Il présentait un score de Sokal faible. Il a réalisé des réactions du greffon contre l'hôte de type aiguë et chronique.

Aucun résultat concomitant de Ph+ et de PCR négatif n'a été observé.

Au cours des 6 premiers mois qui suivent la greffe, de nombreux résultats concomitants de Ph- et de PCR+ sont observés. Après 6 mois de greffe, 3 cas de résultats concomitants de Ph- et PCR+ sont observés, ils incluent les patients n° 4, 23 et 35.

II-1-1-d- Discussion

Au cours des 6 premiers mois qui suivent la greffe de moelle osseuse allogénique, les résultats apportés par la technique de RT-PCR n'ont pas forcément une valeur prédictive de rechute cytogénétique et/ou hématologique. De plus on observe dans la majorité des cas une conversion des résultats de PCR + en résultats de PCR négatifs. Ces faits sont en accord avec les conclusions formulées par d'autres équipes (185-196).

Après 6 mois de greffe, les résultats de PCR +, plus particulièrement quand ils sont obtenus de façon répétée et pendant un laps de temps court, ont une valeur prédictive de rechute cytogénétique et/ou hématologique. Une progression des résultats de PCR + au 2nd tour vers des résultats + au 1^{er} tour est immédiatement suivie d'une rechute cytogénétique et/ou hématologique.

D'autres équipes sont en accord avec nos conclusions : des résultats de PCR + obtenus de façon répétée plus de 6 mois après la greffe allogénique ont une bonne valeur prédictive de rechute cytogénétique et/ou hématologique. Par contre, le fait d'obtenir un résultat de PCR + intéressant est souvent corrélé avec une phase de rémission importante (186, 190). Cross N.C.P. et *al.*(188) ont constaté que le nombre de patients greffés obtenant des résultats de PCR négatifs augmente en général avec le temps. Il est de 36% la première année qui suit la greffe, puis de 60% après deux ans et de 78% après cinq ans. Pour eux comme pour nous, l'obtention de résultats de PCR+ au cours de la première année qui suit la greffe a peu de signification. Par contre, une conversion des résultats de PCR négatifs en résultats de PCR+, ou l'obtention d'une succession de résultats de PCR+, plus d'un an après la greffe, doit renforcer la surveillance moléculaire et cytogénétique (187, 192-196).

Ces faits ne sont pas toujours en accord avec les conclusions apportées par d'autres équipes. En effet pour certains, des résultats de PCR + obtenus 6 mois voire plusieurs années après la greffe se sont pas forcément suivis de rechute cytogénétique et/ou hématologique (185, 186, 188, 191, 197-200).

Le fait que les analyses de RT-PCR aient été réalisées principalement à partir de prélèvements de sang et plus rarement à partir de prélèvements de moelle n'altère pas la valeur informative des résultats obtenus. En effet, Lin F. et *al.*(201) ont observé, sur une large série de patients atteints de LMC, une concordance entre les résultats obtenus par RT-« nested » PCR à partir de prélèvements de moelle et ceux obtenus à partir de prélèvements de sang.

Différents critères influencent les résultats obtenus : l'utilisation d'une moelle non T-déplétée ; les réactions du greffon contre l'hôte ; le stade de la maladie ; l'âge des patients.

- L'utilisation d'une moelle non T-déplétée : afin d'éviter toutes réactions du greffon contre l'hôte, certains auteurs réalisent des greffes de moelle osseuse déplétée en lymphocytes de type T. Une revue de 12 études (202) a rapporté le suivi moléculaire de patients ayant reçu une greffe allogénique à différents stades de la maladie avec de la moelle « déplétée » ou non en lymphocytes T. L'influence de cette « déplétion » sur la positivité de la PCR est très nette : au cours des 2 ans post-greffe un taux de positivité de 30% est observé chez les patients ayant reçu une moelle non manipulée, alors que ce taux est de 77% pour les patients ayant reçu une moelle déplétée en lymphocytes T.

- Les réactions du greffon contre l'hôte : la persistance d'une maladie résiduelle avec des résultats de PCR+ semble être corrélée avec à l'importance des réactions du greffon contre l'hôte et le traitement immunosuppresseur. Cross N.C.P. et *al.* (188) ont montré que la

proportion des patients présentant des résultats de PCR négatifs, quatre mois après la greffe, semble être directement corrélée avec la gravité de la réaction du greffon contre l'hôte. Cette corrélation s'estompant ultérieurement. Ce fait a d'ailleurs été confirmé par d'autres équipes (203, 204). Celles-ci ont mis en évidence une fréquence de résultats de PCR+ plus élevée chez des patients n'ayant pas développé de réaction du greffon contre l'hôte de type aiguë ou chronique. Toutefois, ces résultats sont en contradiction avec d'autres études (205, 206) qui montrent à l'inverse que l'obtention de résultats de PCR+ est plus fréquente chez des patients ayant développé des réactions du greffon contre l'hôte de type chronique. Ces observations peuvent être liées au type de traitement immunosuppresseur, systématiquement appliqué en cas de réactions du greffon contre l'hôte. Ces traitements immunosuppresseurs peuvent augmenter la fréquence d'obtention de résultats de PCR+. Cette hypothèse a été confirmée par l'équipe de Xu W.M. et *al.* (207). Ils ont observé que des patients sous traitement immunosuppresseur ont une probabilité d'obtention de résultats de PCR+ significativement augmentée. Ils obtiennent d'ailleurs des résultats de PCR négatifs après l'arrêt des ces traitements. Dans notre série, parmi les 8 patients ayant rechuté, un seul patient a développé une réaction du greffon contre l'hôte de type aiguë par opposition aux 17 des 30 patients n'ayant pas rechuté. Par contre aucune différence n'a été observée entre les deux populations concernant le développement d'une réaction contre l'hôte de type chronique.

- Le stade de la maladie : la majorité de nos patients (86 %) ont reçu une greffe de moelle osseuse en phase chronique. 75% d'entre eux ne présentent aucune rechute cytogénétique et/ou hématologique post-greffe. Parmi les 8 patients qui rechutent, deux patients (n°14 et 35) ont reçu une greffe de moelle osseuse en phase accélérée 11 et 30 mois après le diagnostic, un autre patient (n°25) en phase accélérée 9 mois après le diagnostic. Cette plus haute fréquence de rechutes observée quand la greffe de moelle osseuse est réalisée en

phases accélérée ou aiguë est en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes (208, 209). Quand une greffe de moelle allogénique est réalisée en phase chronique les taux de survie se situent entre 50 et 60 %, mais ils passent de 40 à 15% en phase accélérée et sont inférieurs à 15% en phase aiguë. Au cours de la phase chronique, il semblerait que les résultats de survie à long terme les plus probants soient obtenus quand la greffe de moelle osseuse allogénique est réalisée au cours de la première année qui suit le diagnostic (210). Dans notre série, 70% des patients en phase chronique ont reçu une greffe de moelle osseuse allogénique plus de 18 mois après le diagnostic. Le taux de survie à 5 ans, pour ces patients est de 35%. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes (211, 212). Des patients transplantés au cours de la première ou de la deuxième année qui suit le diagnostic ont les mêmes taux de survie à 5 ans, de 35 à 40 %. Ces chances sont moins importante pour les patients transplantés au cours de la troisième année et plus suivant le diagnostic. Concernant la valeur pronostique du score de Sokal, certains auteurs ont observé qu'un patient présentant un score de Sokal élevé a plus de probabilité d'obtenir un taux de positivité de PCR important, contrairement à celui présentant un score de Sokal faible (202, 203, 206, 213). Ces observations sont en contradiction avec celles apportées par d'autres études (214).

- L'âge des patients : environ 50 % de nos patients ont plus de 40 ans. Tous ces patients, greffés en phase chronique, ne présentent à long terme aucune rechute cytogénétique et/ou hématologique. L'âge des patients semble donc peu influencer les résultats de la greffe. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Devergie *et al.* (215). Ils ont décrit un taux de survie à long terme de 52 % pour les patients âgés de moins de 30 ans et de 41 % pour les patients âgés de plus de 40 ans. Par contre pour Speck *et al.* (216), le taux de survie à long terme est de 70 % pour les patients âgés de moins de 20 ans, mais n'est plus que de 40 % pour les patients âgés de plus de 40 ans.

Même si la greffe de moelle allogénique semble capable d'assurer, à quelques exceptions près, une rémission moléculaire très souvent à long terme, une quantification des transcrits chimères étudiés s'impose afin d'améliorer la « finesse » du suivi de la maladie résiduelle. Il est clair que la technique de PCR, par rapport aux autres techniques qui peuvent être utilisées, est la technique de détection la plus sensible. Elle permet, après deux tours d'amplification, la détection d'une cellule leucémique résiduelle sur au minimum 10^6 cellules normales. Mais, que signifie l'obtention de résultats successifs de PCR + au cours d'un suivi « qualitatif » de la maladie résiduelle ? Sont-ils les reflets d'une augmentation, d'une diminution ou d'une constance des taux de transcrits chimères étudiés ? Comment expliquer que certains patients en rémission hématologique complète présentent des résultats de PCR+ pendant plusieurs mois voire plusieurs années après la greffe ? Existe-t-il des mécanismes immunologiques pouvant aider à l'élimination totale de la population tumorale résiduelle ? Le rôle des lymphocytes du donneur d'origine est probablement majeur, comme cela est illustré par l'efficacité des transfusions de lymphocytes du donneur lorsqu'une rechute cytogénétique survient après la greffe allogénique (217), ou par le taux élevé des rechutes lorsque l'on pratique une greffe allogénique avec une moelle déplétée en lymphocytes T. Un suivi quantitatif de la maladie résiduelle par la technique de PCR devrait permettre de fournir des réponses (218-222). Afin d'éviter toutes rechutes cytogénétiques il est nécessaire de mieux « cerner » l'évolution de la maladie, en terme de taux de transcrits chimères étudiés, pour qu'un traitement comme l'injection de leucocytes du donneur d'origine, ou par l'interféron alpha soit instauré rapidement.

II-1-2- Etude qualitative par technique de RT-PCR chez des patients traités par l'interféron alpha. Comparaison des résultats obtenus avec ceux apportés par technique de cytogénétique conventionnelle.

Cette étude a fait l'objet d'une publication située en annexe, pp 199-200 .

II-1-2-a- Patients et méthodologie.

Entre 1988 et 1993, 64 patients atteints de LMC associée à la présence du chromosome Philadelphie ont été traités par interféron alpha recombinant à 5 M UI/m²/jour durant au moins 6 mois, avec ou sans association avec de l'aracytine à faible dose.

Au cours de cette période, 2 analyses du caryotype (50 mitoses étudiées/analyse) ont été réalisées , en moyenne par patient, sur de la moelle. Cette méthodologie est décrite au cours du chapitre « Matériels et méthodes ». 8 des 64 patients (14 %) présentent une conversion cytogénétique complète et persistante, avec une médiane de 27 mois (de 9 à 48 mois).

6 de ces 8 patients sont étudiés grâce à la technique de RT-PCR : 4 analyses sont réalisées en moyenne par patient sur des prélèvements de sang. Les transcrits étudiés sont les transcrits chimères b2a2 ou b3a2 selon la méthodologie décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

Ces 6 patients sont en rémission cytogénétique complète après 7 à 24 mois de traitement, et le traitement avec interféron alpha est maintenu pendant 12 à 42 mois.

II-1-2-b- Résultats.

4 de ces 6 patients, en conversion cytogénétique complète et persistante, se révèlent être positifs au 1^{er} comme au 2nd tour.

Les 2 autres patients présentent des résultats négatifs au 1^{er} comme au 2nd tour après 19 et 34 mois de traitement avec interféron alpha. La persistance de ces résultats négatifs se retrouve 23 et 31 mois respectivement après l'obtention du premier résultat négatif. Ces patients présentaient des taux de leucocytes faibles (inférieurs à 15 000/mm³), aucune splénomégalie et un score de Sokal faible (en dessous de 0,8). Donc, ces patients étaient de « bon pronostic ». L'un de ces patients a reçu de l'interféron alpha associé à de faibles doses de cytosine-arabinoside (Ara-C).

II-1-2-c- Discussion.

Chez des 2 des 64 patients (3% des cas) nous observons une réduction des taux de transcrits chimères telle qu'ils ne sont plus détectés par la technique de RT-PCR. Ces résultats n'ont pas une valeur statistique suffisante pour pouvoir juger de l'efficacité thérapeutique de l'interféron alpha à long terme.

Dès 1983, Talpaz et son équipe (223) ont mis en évidence l'efficacité d'action de l'interféron. Dans un premier temps avec de l'interféron alpha leucocytaire, sur une série de 51 patients, ils ont obtenu 71 % de rémissions hématologiques complètes et 41 % de réponses cytogénétiques, dont 14 % de rémissions cytogénétiques complètes. Dans un deuxième temps, avec de l'interféron alpha recombinant, sur une série de 45 patients, après

en moyenne 12 mois de traitement, la majorité des patients présentent une rémission hématologique complète et 25 % des patients une rémission cytogénétique complète (215). Depuis, il a été obtenu 60 à 80 % de rémissions hématologiques complètes et des taux de réponses cytogénétiques de l'ordre de 29 à 65 % (225-227). Comme nous avons pu également l'observer, une rémission hématologique complète peut être obtenue après 1 à 2 mois de traitement. Des réponses cytogénétiques commencent à apparaître après 3 à 12 mois de traitement. Une rémission cytogénétique complète est obtenue le plus souvent après 12 à 18 mois de traitement (227). 90 % des patients en rémission cytogénétique complète peuvent maintenir ce stade pendant 2 à 8 ans. Ceci n'est valable que pour 30 % des patients en rémission cytogénétique partielle ou mineure (226, 227). En accord avec ce que nous observons les meilleures réponses sont obtenues pour des patients en stade précoce de la phase chronique, avec un risque de Sokal faible (226, 227).

Comparant l'action de l'interféron alpha avec l'action de l'hydroxyurée ou du busulfan sur la survie, trois essais suggèrent fortement un bénéfice de l'interféron sur la survie (228-231). Dans une étude italienne (228) portant sur 332 patients, 218 patients reçoivent de l'interféron à des doses croissantes ou de l'hydroxyurée. A 3 mois, 45 % des patients traités avec interféron obtiennent une réponse hématologique complète contre 46 % avec hydroxyurée. A 8 mois, ces taux sont respectivement de 62 % et de 52 %. Aucune réponse cytogénétique complète n'est obtenue avec hydroxyurée. En revanche, il est possible d'obtenir celle-ci pour 8 % des patients traités avec interféron alpha. Dans une étude britannique (229, 230) réalisée sur 515 patients, la durée de survie est améliorée de façon significative avec interféron alpha même en absence de réponse cytogénétique. Une étude japonaise (231) réalisée sur 107 patients montre que les taux de réponses cytogénétiques majeures sont de 16 % avec interféron, de 5 % avec le busulfan. Les taux de survie sont de 54 % et de 32 % respectivement. Toutefois, un essai multicentrique alimente la controverse

(232) : la médiane de survie avec interféron est de 66 mois, de 58 mois avec l'hydroxyurée et de 45 mois avec le busulfan. 7 % de réponses cytogénétiques complètes sont obtenus avec l'interféron alors qu'un seul patient obtient ce résultat avec l'hydroxyurée et aucun avec le busulfan. De façon significative, l'hydroxyurée permet l'obtention de taux de survie améliorés par rapport à ceux obtenus avec le busulfan et les taux de survie sont similaires pour l'interféron et l'hydroxyurée.

Certains essais, actuellement en cours, cherchent à améliorer les résultats en combinant de l'interféron alpha à de l'hydroxyurée ou à de l'Ara-C. L'Ara-C semble particulièrement indiquée, car elle agit sur les cellules en phase S et semble être toxique uniquement sur les progéniteurs leucémiques. L'interféron aurait, combiné à l'Ara-C, le double rôle de « toxique » pour les cellules Ph⁺ et de « protecteur » des cellules souches normales en les bloquant en phase G0-G1 (233). Cette hypothèse semble être confirmée par les résultats très encourageants obtenus par différentes équipes appliquant ce type de combinaison (234-237). Les taux de rémission cytogénétique complète et durable obtenus avec une telle association sont plus importants que ceux obtenus lorsque l'interféron est administré seul.

En définitive, il semble d'une part que l'interféron alpha soit devenu un traitement de référence dans la LMC, et, d'autre part, que l'amélioration de la durée de survie obtenue dans la plupart des études soit liée en grande partie à la qualité des réponses cytogénétiques. En général, les réponses cytogénétiques mineures sont associées à une rémission de courte durée. Les rémissions cytogénétiques complètes sont quant à elles associées à une durée de rémission durable, plus importante que celles observées dans le passé après une chimiothérapie intensive. Mais, il existe peu de rapports suggérant que l'interféron alpha puisse induire une éradication totale de la maladie (238-243). La majorité des patients en

conversion cytogénétique complète et persistante se révèlent être positifs au 1er comme au 2nd tour de PCR. Ce fait a d'ailleurs été observé dans une autre étude (244).

Nos résultats soulèvent au moins une question : les résultats de PCR négatifs observés pour les 2 patients de « bon pronostic », correspondent-ils à une éradication totale du clone leucémique ou à la persistance de taux de transcrits chimériques trop faibles pour être détectés ?

Certains auteurs (245, 246) ont montré chez des patients atteints de LMC, après un traitement par interféron alpha, qu'environ 25 % des colonies Ph⁺ n'expriment pas de transcrits chimères. Pour expliquer ce fait, ils émettent l'hypothèse d'un blocage de la transcription des gènes de fusion *bcr-abl* par action de l'interféron alpha. Les cellules n'exprimant alors plus les transcrits chimères, n'auraient plus le pouvoir de proliférer « activement » et, par conséquent, seraient amenées à disparaître. « In vitro », l'interféron inhibe la prolifération des progéniteurs cellulaires hématopoïétiques dans la moelle de patients atteints de LMC (226). Mais, il n'a pas été mis en évidence une suppression sélective des clones Ph⁺. L'interféron alpha restaure « in vitro » la propriété d'adhésion des progéniteurs cellulaires atteints de LMC sur le stroma cellulaire. Ce fait expliquerait qu'après un traitement avec interféron alpha, il y ait réapparition d'un pool important de progéniteurs cellulaires de LMC dans la moelle (226). L'interféron alpha régulerait de manière différentielle l'expression de cytokines par les cellules du stroma de la moelle, comme l'interleukine de type 1 (IL-1), le GM-CSF, le G-CSF et le TNF- α (226).

De part les questions que posent notre étude et les autres, il est nécessaire de procéder à un suivi de la maladie résiduelle plus « fin ». D'autant que l'interféron alpha ne permet que très

peu souvent l'obtention de rémissions moléculaires à long terme. Il faut pouvoir mieux cerner l'évolution de la maladie en cours de traitement. Il est évident que la technique de PCR est la technique de détection de choix, de par son seuil de sensibilité (1 cellule leucémique sur 10^6 cellules normales), pour réaliser un suivi correct de la maladie résiduelle. Mais, que signifie l'obtention de résultats de PCR négatifs successifs ? A partir de combien de résultats de PCR négatifs peut-on être sûr qu'un patient est totalement guéri ? Le fait d'obtenir des résultats qualitatifs de PCR + ne nous permet pas de cerner correctement l'évolution du clone leucémique. Des résultats successifs de PCR+ correspondent-ils à une augmentation, une diminution ou une constance des taux de transcrits chimères ? Comme dans le cadre des patients atteints de LMC Ph+ et traités par greffe de moelle osseuse allogénique, une étude quantitative par la technique de PCR de la maladie résiduelle a été entreprise.

II-1-3- Essais d'une étude quantitative par technique « d'Inverse PCR » associée à la technique de PCR compétitive.

II-1-3-a- Principe.

Il s'agit d'estimer la quantité d'ADN correspondant à l'allèle transloqué *bcr-abl* par la technique de PCR compétitive, en prenant comme standard interne de coamplification l'ADN double brin correspondant à l'allèle normal du gène *bcr*, sachant que cette quantité d'ADN peut être rapporté à un nombre de cellules leucémiques résiduelles. En fait, il ne s'agit pas uniquement d'estimer la quantité d'ADN correspondant à l'allèle transloqué, mais également comparer cette quantité à celle correspondant au nombre de transcrits chimères b2a2.

Pourquoi une étude quantitative sur l'ADN ? En général et sauf exceptions (en phase d'acutisation), un gène de fusion *bcr-abl* correspond à une cellule leucémique. Par contre, il est très difficile de rapporter un nombre de transcrits de fusion à un nombre de cellules leucémiques résiduelles.

II-1-3-b- Méthodologie.

Les différentes étapes de cette méthodologie, plus précisément les étapes de la technique d'Inverse PCR, ainsi que les différentes conditions opératoires testées pour chaque type d'étape, sont décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

II-1-3- c- Résultats et discussion.

Avant d'appliquer la méthodologie dans son ensemble à des patients atteints de LMC Ph+, notre premier soucis était d'optimiser au mieux les conditions opératoires de la technique d'« Inverse » PCR. Pour ce faire, nous avons travaillé principalement sur des culots d'ADN de 3 patients ne présentant pas de LMC et donc pas de chromosome Ph. Il s'agissait d'obtenir des bandes d'ADN correspondant uniquement à l'allèle normal du gène *bcr*.

Nous avons réussi à amplifier des bandes d'ADN correspondant à l'allèle normal du gène *bcr*, mais celles-ci, malgré tous nos efforts d'optimisation, sont toujours accompagnées de nombreuses bandes d'ADN parasites. Ces bandes d'ADN parasites résultent probablement d'une amplification de molécules d'ADN circulaires double brin. En effet, en incluant une étape de digestion des molécules d'ADN circulaires double brin par une endonucléase de restriction *Ava II*, ceci juste avant les deux étapes d'amplification, nous avons obtenu

uniquement les bandes d'ADN correspondant à l'allèle normal du gène *bcr*.(figure 11, p : 127). Il est à noter que le site de coupure de l'endonucléase de restriction *Ava* II se situe sur la partie intronique localisée en 5' de l'exon b2, en aval des « sites » d'appariement des amorces b4 et b6. (figure 9, p 92).

Ces résultats sont toutefois à confirmer.

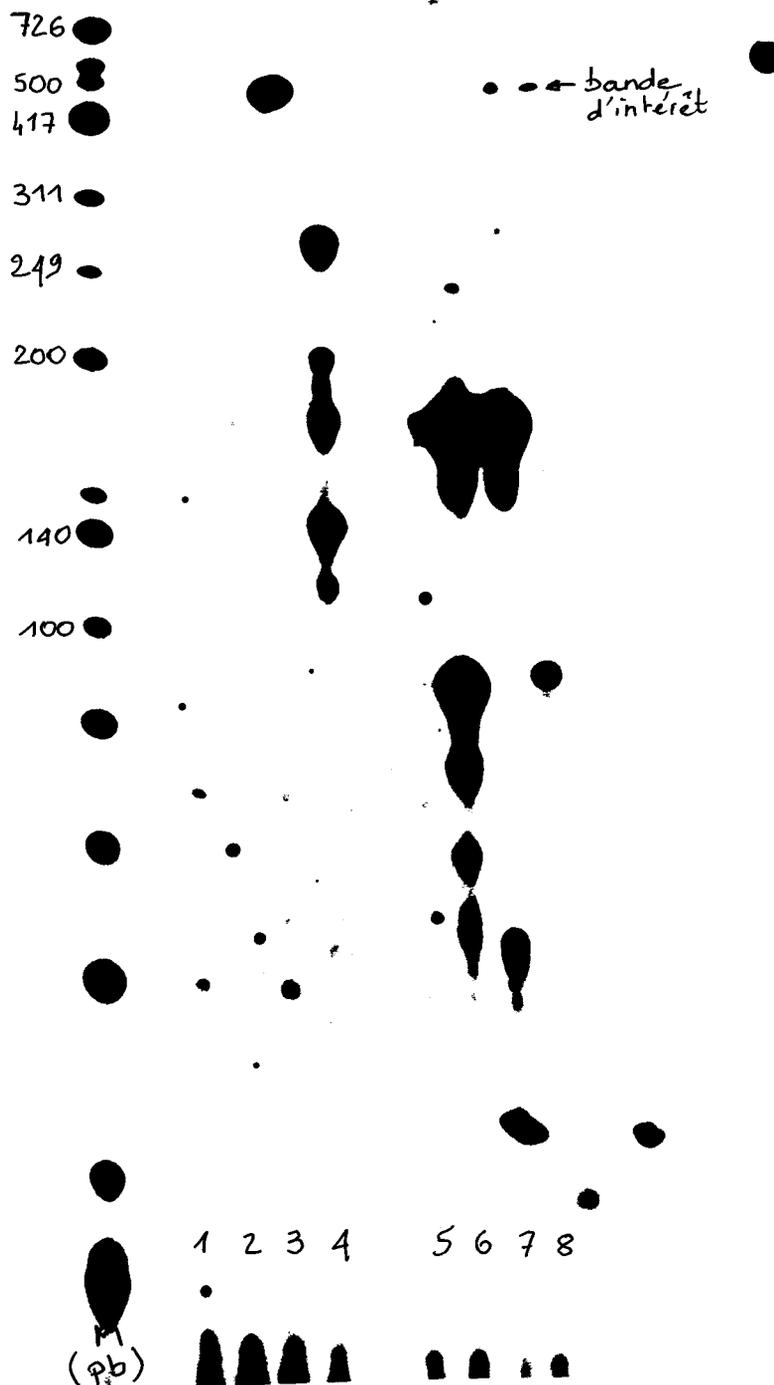


Figure 11 : M : marqueur moléculaire en pb ; pistes 1, 5 : témoin négatif ; pistes 2, 6 : pt. 2332 ; pistes : 3, 7 : pt. 2869 ; pistes 4, 8 : pt. 2946 (patient sans Ph). Circularisation : 150 ng d'ADN (pistes : 1, 2, 3, 4) et 200 ng d'ADN (pistes : 5, 6, 7, 8). Digestion Ava II : 10 unités, 4h à 37°C. PCR exponentielle : 67°C, 50 cycles, 25 pmol de chaque amorce. « Run-off » : 58°C, 20 cycles, 5 pmol d'amorces, 5 µl de PCR exponentielle.

II-1-3-d- Partant du même principe, les résultats de quantification obtenus par J.G. Zhang et al. (247).

La technique d'ADN-« bubble » PCR permet, après digestion par l'endonucléase de restriction *Rsa* I d'ADN génomique de patients atteints de LMC et ligature, l'amplification par une technique de « nested » PCR (2 x 30 cycles) de fragments d'ADN double brin circulaires correspondant soit à l'allèle transloqué *bcr-abl*, soit à l'allèle normal du gène *bcr*. Chaque fragment d'ADN amplifié est séquencé après purification.

Avec cette technique ils ont, dans un premier temps, analysé les séquences nucléotidiques situées aux alentours des points de cassure, pour mieux essayer de cerner le ou les mécanisme(s) intervenant lors du phénomène de translocation (247). Après analyse des différentes séquences nucléotidiques, le ou les mécanisme(s) intervenant lors du phénomène de translocation s'avèrent être toujours très difficiles à cerner.

Dans un deuxième temps, ils ont appliqué cette technique à des patients atteints de LMC ayant subi une greffe de moelle osseuse allogénique (248, 249). Il s'agissait pour eux de vérifier l'hypothèse selon laquelle certaines cellules leucémiques Ph⁺ n'exprimeraient pas activement les transcrits chimères « classiques » correspondant aux gènes de fusion *bcr-abl*. La présence de ces pools cellulaires transcriptionnellement inactifs chez certains patients, indétectables par technique de RT-PCR qualitative, contribuerait au fait que ceux-ci, supposés en rémission complète, rechutent après « réactivation » de ces cellules. A partir des mêmes échantillons, ils ont donc également amplifié, par des techniques de RT-PCR qualitative et quantitative, les transcrits chimères « classiques » correspondant aux gènes de fusion *bcr-abl*. Ils ont pu constater, dans plus de 79% des cas, une concordance entre les résultats obtenus avec la technique d'ADN-« bubble » PCR et ceux obtenus avec les

techniques de RT-PCR. Donc, généralement, les clones leucémiques Ph⁺ résiduels expriment activement les transcrits chimères « classiques » correspondants aux gènes de fusion *bcr-abl*.

II-2- La maladie résiduelle chez des patients atteints de LAL Ph⁺.

II-2-1- Etude qualitative par technique de RT-PCR. Comparaison des résultats obtenus avec ceux apportés par technique de cytogénétique conventionnelle.

Cette étude a fait l'objet d'une publication située en annexe , pp : 201-205.

II-2-1-a- Présentation des patients.

Cette étude a été réalisée de manière prospective chez des patients diagnostiqués entre 1991 et 1995. 17 patients atteints de LAL Ph⁺ ont été étudiés après qu'ils aient obtenu une rémission hématologique complète par divers protocoles de chimiothérapie. 1 patient (n°14) a été étudié rétrospectivement, il a reçu une greffe autologue en 1^{ère} rémission complète.

Parmi les 17 patients étudiés, nous avons 6 enfants (âgés de moins de 15 ans) et 11 adultes.

Tous ces patients présentent une LAL de type B, CD10⁺ dans 16 cas et CD10⁻ dans un cas.

Tous ces patients avaient un chromosome Ph, au diagnostic, après analyse par la technique de cytogénétique classique.

Les points de cassure, au cours de la translocation, sur le gène *bcr* se situent au niveau de la région m-bcr pour 14 patients. Pour 2 patients, ils se situent au niveau de la région M-bcr et pour un patient ils se situent au niveau des deux régions.

Après avoir achevé leur rémission hématologique complète, 9 patients (n° 1 à 9 inclus) reçoivent un traitement de consolidation par polychimiothérapie intensive ; 6 patients (n° 8 à 13 inclus) reçoivent une greffe allogénique, 4 patients très tôt au cours de leur première rémission complète, 1 patient (n°8) en fin de première rémission complète (après 18 mois). Ce patient sera uniquement considéré comme traité par chimiothérapie, car il décédera rapidement d'une réaction de rejet du greffon contre l'hôte aiguë. 1 patient (n°9) reçoit une greffe allogénique en seconde rémission complète. Ce patient est suivi dans le groupe « des patients traités par chimiothérapie », comme dans le groupe « des patients allogreffés ». 4 patients (n° 14 à 17 inclus) reçoivent une greffe autologue, pour 2 patients (n° 14 et 15), une purge médullaire « in vitro » par mafosfamide ou anticorps monoclonaux est effectuée.

II-2-1-b- Méthodologie.

50 mitoses, en moyenne, sont étudiées lors d'examens cytogénétiques, tous réalisés sur des prélèvements médullaires.

Une recherche des transcrits e1a1, b2a2 et b3a2 est réalisée grâce aux techniques de RT- « semi-nested » (e1a2) et de RT- « nested » PCR (b2a2, b3a2).

Ces différentes techniques sont décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes »

II-2-1-c- Résultats.

II-2-1-c-1- Le devenir clinique.

Parmi les 9 patients (n° 1 à 9 inclus) ayant reçu une consolidation par chimiothérapie intensive, nous constatons 7 rechutes après 5 à 28 mois. 2 patients (n° 2, 8) décèdent en 1^{ère} rémission complète d'infections ou d'une réaction de rejet du greffon contre l'hôte aiguë. 1 patient (n°7) est toujours en vie en 2^{ème} rémission complète 50 mois après le diagnostic malgré une rechute méningée isolée.

Parmi les 5 patients qui ont reçu une greffe allogénique, nous constatons 3 cas de rechute (n° 9, 12 et 13), toutes suivies du décès des patients. 1 patient (n° 10) est toujours en vie, en 2^{ème} rémission complète 17 mois après le diagnostic. 1 patient (n° 11) décède rapidement après une réaction de rejet du greffon.

Les 2 patients (n°16 et 17) qui ont reçu une greffe autologue, avec de la moelle non purgée « in vitro », rechutent 9 et 13 mois après le diagnostic. Ces rechutes sont suivies rapidement de leur décès. Les 2 patients (n° 14 et 15) qui ont reçu une greffe autologue, avec de la moelle purgée « in vitro », sont toujours en vie en 1^{ère} rémission complète 20 et 137 mois après le diagnostic.

II-2-1-c-2- Les résultats des analyses par la technique de cytogénétique conventionnelle.

Au moment de l'obtention de la rémission hématologique complète, sur les 14 cas étudiés, nous avons détecté la présence du chromosome Philadelphie chez un seul patient (n°13) (3 cellules Ph+/12 mitoses).

Au cours du suivi, 8 patients (n° 1, 3, 4, 5, 6, 9, 13 et 16) ont présenté des caryotypes normaux (absence de chromosome Ph) 4 mois avant la rechute hématologique. 4 patients (n° 2, 10, 14 et 15), toujours en vie en 1^{ère} ou en 2^{ème} rémission complète, ont toujours présenté des caryotypes normaux.

II-2-1-c-3- Les résultats des analyses par techniques de RT-« semi-nested » et « nested » PCR.

Parmi les 9 patients ayant reçu une consolidation par polychimiothérapie intensive, 4 patients ont toujours présenté, au niveau de la moelle, des résultats de PCR+ au 1^{er} tour (n° 3, 4 et 5) et au 2nd tour (n° 6). Il est à noter que la majorité de ces résultats est associée à des caryotypes normaux. Pour les 3 patients (n° 3, 4 et 5) ayant présenté, au niveau de la moelle, des résultats de PCR+ au 1^{er} tour, on observe, après l'obtention de tels résultats, des rechutes hématologiques 7, 8 et 5 mois après le diagnostic respectivement. Ces 3 patients décèdent peu de temps après leur rechute hématologique. Pour le patient (n° 6) ayant présenté des résultats de PCR+ au 2nd tour, dans la moelle, la rechute hématologique est constatée plus tardivement, 16 mois après le diagnostic.

5 autres patients (n° 1, 2, 7, 8 et 9) présentent, au niveau de la moelle, quelques résultats de PCR négatifs au 2nd tour. 2 patients (n° 2 et 8) ayant présenté des résultats de PCR négatifs au 2nd tour, dans la moelle, 4 et 16 mois après le diagnostic respectivement, avec des résultats de caryotype normaux, décèdent en 1^{er} rémission. 1 patient (n°1) présente, 7 et 18 mois après le diagnostic, une succession de résultats de PCR négatifs dans la moelle, mais également dans le sang, suivis de deux résultats de PCR + au 2nd tour dans la moelle et négatifs dans le sang. Tous les résultats de PCR sont associés à des résultats de caryotype normaux. Il rechute 22 mois après le diagnostic. 1 patient (n°9) présente un résultat de PCR - dans la moelle, suivi d'un résultat de PCR + au 2nd tour dans la moelle et ensuite de deux résultats de PCR+ au 1^{er} tour dans la moelle. Tous les résultats de PCR sont associés à des résultats de carotype normaux. Il rechute 28 mois après le diagnostic. 1 patient (n°7) présente une rechute méningée isolée. Cette rechute n'a pu être détectée par la technique du caryotype, mais 5 mois avant la rechute méningée, le patient présentait des résultats de PCR+ au 2nd tour dans la moelle. Ce patient a ensuite été traité par chimiothérapie intensive : il est toujours en deuxième rémission complète avec des résultats de PCR négatifs dans la moelle.

Parmi les 6 patients ayant reçu une greffe allogénique, cinq patients ont pu être suivis (n° 9 à 13 inclus). 2 patients (n° 10 et 11) présentent, après la greffe, des résultats de PCR négatifs dans la moelle comme dans le sang. Le patient n°11 qui a présenté un résultat de PCR négatif dans la moelle et dans le sang 4 mois après la greffe, associé à un caryotype normal, décède d'une réaction de rejet du greffon contre l'hôte de type aiguë 2 mois après l'obtention de ce résultat. Le patient n°10 qui a présenté une succession de résultats PCR négatifs dans la moelle comme dans le sang, 2 à 9 mois après la greffe, est toujours en rémission complète. Les patients n° 9, 12 et 13 présentent, après la greffe, des résultats de

PCR+ au 1^{er} tour dans la moelle associés à des caryotypes normaux. Ces résultats sont très rapidement suivis de rechute et de décès après 5, 6 et 10 mois.

Les 2 patients (n° 16 et 17) dont la moelle n'a pas été purgée « in vitro » présentent, avant la greffe autologue, des résultats de PCR+ au 1^{er} ou au 2nd tour de PCR dans la moelle. Après la greffe, ils présentent un résultat de PCR+ au 1^{er} tour dans la moelle. Ces résultats sont suivis rapidement d'une rechute hématologique et de décès. Parmi les deux patients ayant reçu de la moelle purgée « in vitro », le patient (n°15) présente, avant la greffe, des résultats de PCR+ au 2nd tour dans la moelle, avec des caryotypes normaux. Après la greffe, il présente encore pendant 6 mois des résultats de PCR + au 2nd tour dans la moelle et négatifs dans le sang, suivis ensuite de résultats de PCR- dans la moelle. Ce patient est toujours en rémission complète. Le patient (n°14) suivi jusqu'à 116 mois après le diagnostic présente toujours des résultats de PCR négatifs dans la moelle et dans le sang, avec des caryotypes normaux. Il est toujours en rémission complète.

35 analyses ont pu être réalisées de manière concomitante sur du sang et de la moelle. Dans 34% des cas, on peut constater que des résultats de PCR négatifs au 2nd tour dans le sang s'avèrent être positifs au 2nd tour dans la moelle et que, des résultats de PCR+ au 2nd tour de PCR dans le sang s'avèrent être positifs déjà au 1^{er} tour de PCR dans la moelle.

II-2-1-d - Discussion.

Parce qu'une réduction rapide des clones leucémiques est souvent corrélée à un taux de survie long, beaucoup de protocoles spécifiques des LAL à très haut risque associent 4 drogues ou plus pour induire une rémission complète. Immédiatement après l'obtention

d'une rémission complète, un traitement de consolidation est appliqué. Celui-ci est constitué d'une combinaison de plusieurs types de drogues, comparables par leur intensité à celles des traitements d'induction. Cette étape a pour but l'éradication si possible complète des cellules leucémiques résiduelles. Avec de telles approches, les taux de rémission chez les patients (enfants ou adultes) atteignent des valeurs qui jusqu'à présent n'étaient obtenus que chez les patients à faible risque. Il n'en reste pas moins vrai, comme nous avons pu le constater que le nombre de rechute s'avère être très élevé, et ceci précocement (250-252). Pour cette raison, des approches thérapeutiques plus intensives telles que la greffe de moelle osseuse allogénique ou la greffe de moelle osseuse autologue sont requises. Il est clair que de telles approches permettent d'obtenir, comme nous l'avons constaté, des taux de rémission et de survie à long terme plus conséquents (251-256). Concernant plus particulièrement la greffe autologue de moelle osseuse, 2 patients sur 4 reçoivent une moelle purgée « in vitro », ces 2 patients sont toujours en rémission complète. Par contre les 2 autres patients qui ont reçu de la moelle non purgée « in vitro » rechutent rapidement. Au vu de ces résultats, même si le nombre de patients étudiés est faible, une purge de moelle « in vitro » s'avère être bénéfique dans le cadre d'une greffe autologue. Ces faits sont d'ailleurs en accord avec ceux rapportés par d'autres équipes (257, 258). Comment expliquer ces résultats ? La purge médullaire « in vitro » dans le cadre d'une greffe médullaire, quelles que soient les méthodes employées (culture des cellules à long terme, avec du mafosfamide, de l'interféron alpha...), doit permettre une sélection négative des clones Ph+ (CD34 +, HLA DR +) au profit d'une sélection positive des clones Ph- (CD34 +, HLADR -).

Concernant le suivi de la maladie résiduelle, au vu des résultats obtenus, la technique conventionnelle du caryotype, du fait de son seuil de détection faible, de l'ordre de 1 à 5 %,

n'est pas adaptée. Actuellement la technique de détection la plus sensible est la technique de PCR (1 cellule leucémique résiduelle détectée sur 10^6 cellules normales). Mais quelle valeur prédictive de rechute hématologique et/ou cytogénétique doit-on accorder à cette technique du fait de son seuil de sensibilité si élevé ? Il est certain qu'un seul résultat de PCR + ou de PCR négatif ne peut avoir une valeur prédictive de survie ou de rechute à plus ou moins long terme. Seule une succession de résultats de PCR négatifs, tout comme seule une succession de résultats de PCR + peut avoir une valeur prédictive. Ces faits sont en accord avec ceux apportés par d'autres équipes (259, 260).

Les 35 analyses de PCR réalisées de manière concomitante sur de la moelle et sur du sang montrent que, dans 34% des cas, les résultats obtenus à partir de moelle ont une valeur informative plus importante que celles réalisées à partir du sang. Ces observations sont à rapprocher de celles obtenues par van Rhee *et al.* (261). Ils ont quantifié, par technique de RT-PCR, des taux de transcrits *bcr-abl* dans des échantillons de sang et de moelle chez 18 patients atteints de LAL Ph+. 29 paires d'échantillons ont été analysés. Ils ont montré, dans la majorité des cas (25 paires d'échantillons/29 étudiés), une concordance entre les résultats obtenus au niveau du sang et ceux obtenus dans la moelle. Concernant les 4 paires d'échantillons restantes, ils constatent l'absence de transcrits *bcr-abl* au niveau du sang alors qu'ils sont présents et quantifiables dans la moelle.

Enfin, d'après ce que nous observons pour un de nos patients (n°7), une succession de résultats de PCR+ dans la moelle semble avoir une valeur prédictive de rechute méningée.

II-2-2- Essais d'une étude quantitative par technique de RT-PCR compétitive.

II-2-2-a- Principe.

L'objectif est d'estimer la quantité initiale de transcrits chimères étudiés, après coamplification par la technique de PCR, dans un même tube Eppendorf, d'ADN complémentaires (ADNc, obtenus après une transcription inverse des transcrits étudiés) et d'un standard interne conforme par sa séquence nucléotidique aux transcrits étudiés, dont la quantité est connue avant et après coamplification.

Les différentes étapes de la méthodologie sont décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

Les transcrits étudiés correspondent à l'allèle normal du gène *abl* et aux transcrits chimères *e1a2*, chez des patients atteints de LAL Ph⁺ à différents stades d'évolution de leur maladie.

II-2-2-b- Applications.

Au départ, nous disposions de prélèvements réalisés chez 8 patients atteints de LAL Ph⁺.

Mais, pour différentes raisons liées soit à l'absence de culots cellulaires utilisables (dégradation probablement due à une mauvaise conservation et/ou à des défauts inhérents à la préparation des prélèvements de sang ou de moelle), ou soit à l'absence de culots d'ARN totaux (dégradation due probablement à des défauts de préparation et/ou à des problèmes de conservation), seuls deux patients ont finalement pu être étudiés.

Il s'agit des patients n° 1 et 4 de l'étude précédente (publication située en annexe, pp : 204-205)

Pour le patient n° 4, nous disposons de 4 culots d'ARN cellulaires totaux préparés à partir de culots cellulaires (10 millions de cellules en moyenne) réalisés à partir de prélèvements de moelle différents, effectués sur une période de cinq mois (de février à juin 1995). Ces quatre culots ont été étudiés par la technique de RT-PCR compétitive (deux couples d'amorces : Abl2/Abl3 et BcrA1/Abl3). Seuls 2 échantillons sur les 4 ont présenté des résultats de PCR+ après coamplification Abl2/Abl3. Pour ces deux culots, après le premier type de coamplification Abl2/Abl3, quelque soit le type d'échantillon utilisé, le point d'équivalence entre les intensités de fluorescence, correspondant soit au nombre initial d'ADNc étudiés ou au nombre initial de molécules de standard interne de coamplification, oscille toujours entre les intensités de fluorescence correspondant à 10^4 et 10^5 molécules de standard interne de coamplification. Après le deuxième type de coamplification (BcrA1/Abl3), quelque soit le type d'échantillon étudié, ce point d'équivalence oscille toujours entre 10^2 et 10^3 molécules de standard interne de coamplification. Il est intéressant de noter que ces 2 échantillons sont positifs au 1er tour de PCR après leur amplification par la technique de RT-PCR « semi-nested » (couples d'amorces : A1/B5 et A2/B5, 2 fois 35 cycles).

Pour le patient n° 1, nous disposons de 8 culots d'ARN cellulaires totaux préparés à partir de culots cellulaires (10 millions de cellules en moyenne) réalisés à partir de 4 prélèvements de moelle et de 4 prélèvements de sang différents, effectués sur une période de 13 mois (de novembre 1994 à décembre 1995). Après le deuxième type de coamplification BcrA1/Abl3, tous des résultats de PCR sont négatifs. Ceci est valable aussi bien après analyse des échantillons par le « 373 DNA sequencer Applied Biosystems » (Perkin Elmer, USA) couplé au logiciel « Genescan 672 », qu'après analyse de ces mêmes échantillons suite à une électrophorèse en gel d'agarose et révélation des molécules de BET sous lumière UV (à 366 nm). Par contre, 2 des ces 8 échantillons (de la moelle) s'avèrent être positifs au second tour

de PCR, après leur amplification par la technique de RT- « semi-nested » PCR (couples d'amorces : A1/B5 et A2/B5, 2 fois 35 cycles).

II-2-2-c- Discussion.

En ce qui nous concerne, au vu des résultats obtenus, plus particulièrement ceux obtenus pour 2 échantillons sur 8 du patient n° 1, il est certain que le seuil de sensibilité apporté par la technique de RT-« semi-nested » PCR (couples d'amorces A1/B5 et A2/B5, 2 fois 35 cycles d'amplification) est plus important que celui apporté par la technique de RT-PCR compétitive (BcrA1/Abl3, 48 cycles d'amplification).

A partir de ce fait, différentes questions se posent.

1) Concernant notre technique de RT-PCR compétitive, directement basée sur celle développée par l'équipe de B. Grandchamp (172, 173), la valeur de son rendement d'amplification est-elle optimale ? Quand l'on réalise la même coamplification (BcrA1/Abl3) sur 4 gammes différentes de standard interne de coamplification oscillant entre 5, 50, $5 \cdot 10^2$, $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ molécules, on obtient, après électrophorèse en gel d'agarose et analyse des fragments d'ADN amplifiés sous lumière UV, 4 profils différents. Ces résultats nous permettent d'affirmer que les conditions actuelles d'amplification ne sont pas optimales. Ils nous permettent également de soulever un second problème qui est celui de la variabilité rencontrée de « tube » à « tube », quand il s'agit d'établir une gamme de concentrations connues en nombre de molécules de standard interne de coamplification. Cette gamme est réalisée à partir d'une concentration de 10^8 molécules/ μl , auxquelles on prélève 1 μl donc 10^8 molécules que l'on dilue dans 9 μl d'eau afin d'obtenir une dilution de la concentration initiale au $1/10^{\text{ème}}$. Cette étape est renouvelée jusqu'à l'obtention de 5 molécules/ μl . Un

troisième problème, directement lié à celui précédemment cité, peut être également soulevé : celui du « pipettage » et de sa reproductibilité.

2) Est-il utile de réaliser 48 cycles d'amplification au cours de la PCR (BcrA1/Abl3) ? A partir d'une gamme de concentrations de standard interne de coamplification variant de 5, 50, $5 \cdot 10^2$, $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^4$ et $5 \cdot 10^5$ molécules, nous avons fait varier le nombre de cycles d'amplification de 35, 40, 45 à 48 cycles. Après électrophorèse des échantillons amplifiés en gel d'agarose et visualisation des fragments d'ADN amplifiés sous lumière UV (à 366 nm), il semble que 45 cycles d'amplification suffisent et, qu'à partir de 48 cycles une reproductibilité des résultats semble plus aléatoire.

3) N'existe-t-il pas un déséquilibre entre les rendements d'amplification du standard interne de coamplification (molécule d'ADN circulaire double brin) et ceux des ADNc (molécules d'ADN linéaires double brin) ?

4) Avec des conditions d'amplification optimales, serait-on certain d'obtenir des seuils de sensibilité de détection équivalents entre celui obtenu par technique de RT- « semi-nested » PCR (2 x 35 cycles d'amplification, tailles des fragments attendues : 105 pb (A2/B5) et 156 pb (A1/B5)) et celui obtenu par technique de RT-PCR compétitive (1 x 48 cycles (BcrA1/Abl3), taille des fragments attendues : 370 pb (standard) et 378 pb (ADNc)) ?

Les techniques de RT-PCR compétitive et de RT- « semi-nested » PCR ont toutes les deux les mêmes contraintes. Pour une interprétation correcte des résultats obtenus, différents paramètres sont à appliquer et à vérifier. Ces deux méthodologies dépendent d'une part de la qualité de préparation des culots cellulaires et des culots d'ARN cellulaires totaux utilisés, et, d'autre part, de leur qualité de stockage dans le temps. Il est certain qu'avant d'aborder ces deux types de méthodologies, il faut être certain de pouvoir vérifier ces deux paramètres et les contrôler. Pour ce faire, à partir d'un prélèvement donné, il faudrait pouvoir préparer

plusieurs culots cellulaires à des concentrations identiques. Il serait primordial de vérifier la qualité et la quantité des ARN cellulaires totaux extraits à partir de chacun de ces culots. Afin de s'assurer d'une part de la qualité de préparation et de stockage des culots cellulaires et, d'autre part, de la qualité de la transcription inverse, son rendement. On pourrait ainsi éviter les résultats faussement négatifs. Un autre problème, commun à ces deux méthodologies, est celui des contaminations, c'est à dire l'obtention de résultats faussement positifs. L'obtention possible de tels résultats lie ces deux méthodologies à certaines règles, à certaines contraintes techniques. Quoiqu'il en soit la technique de RT-PCR compétitive permet, dans des conditions optimales d'application, la quantification des transcrits d'intérêt. Alors que la technique de RT- « semi-nested » PCR ne permet qu'un apport de résultats « qualitatifs » (présence ou non des transcrits étudiés). Il est certain que pour un suivi correct de la maladie résiduelle une quantification des transcrits étudiés s'impose.

II-2-2-d- Présentation de résultats de quantification de la maladie résiduelle obtenus par différentes équipes.

En reprenant la méthode de PCR compétitive développée par N.C.P. Cross et *al.* (222), le standard interne de coamplification correspond à un fragment d'ADNc contenant les séquences nucléotidiques des exons b1, b2 et b3 du gène *bcr* juxtaposées aux séquences nucléotidiques des exons a2 et a3 du gène *abl*. Au sein de cette séquence nucléotidique, il y a adjonction, entre les exons a2 et a3 du gène *abl*, d'une séquence nucléotidique de 201 pb. L'adjonction de cette séquence permet, après une électrophorèse en gel d'agarose des fragments d'ADNc amplifiés grâce à une « nested »PCR et l'analyse des molécules de BET sous lumière UV (à 366 nm), de distinguer les fragments d'ADNc amplifiés correspondant aux transcrits étudiés (b2a2 et b3a2) de ceux correspondant au standard interne de

coamplification. Cette méthode a permis l'étude quantitative de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LMC, ayant reçu une greffe de moelle osseuse (219, 222, 262) ou un traitement par interféron alpha (263, 264). Ils ont remarqué, à chaque fois, qu'une nette augmentation du nombre de transcrits étudiés est toujours suivie d'une rechute cytogénétique et/ou hématologique. Par contre, une constance de ce nombre voire une diminution est toujours suivie d'une rémission hématologique et/ou cytogénétique. Ils ont également remarqué une bonne corrélation entre le type de réponse cytogénétique obtenu (complète, partielle ou mineure) et le nombre de transcrits chimères étudiés.

Partant du même principe, ils ont étudié et comparé l'expression des transcrits chimères *e1a2* chez des patients atteints de LAL Ph⁺ dans le sang et dans la moelle (252). Le standard interne de coamplification correspond à une séquence d'ADNc contenant la séquence nucléotidique de l'exon e1 du gène *bcr* juxtaposée aux séquences nucléotidiques des exons a2 et a3 du gène *abl*. Au sein de la séquence nucléotidique de l'exon e1 du gène *abl*, il y a adjonction d'une séquence nucléotidique de 134 bp. Ils ont montré, dans la majorité des cas (25 paires d'échantillons/ 29 étudiés), une concordance entre les résultats obtenus au niveau du sang et ceux obtenus dans la moelle. Des résultats similaires ont été obtenus chez des patients atteints de LMC (265). Pour eux, un suivi de la maladie résiduelle peut être réalisé de manière sensiblement équivalente à partir de moelle ou de sang. Notre étude qualitative de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LAL Ph⁺ (publication située en annexe, pp :) a montré par contre, sur les 35 analyses réalisées de manière concomitante dans le sang et dans la moelle, que dans 34% des cas, les analyses réalisées à partir de la moelle ont une valeur informative plus importante que celles réalisées à partir du sang.

Si l'on étudie maintenant la méthode de PCR compétitive développée par T. Lion *et al.* (266), le standard interne de coamplification correspond à un fragment d'ADNc contenant

les séquences nucléotidiques des exons b2 et b3 du gène *bcr* juxtaposées à la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *abl*. Une différence de 75 paires de base existe entre la taille des fragments correspondant aux transcrits chimères étudiés et celle correspondant au standard interne de coamplification. L'amplification des différents types d'ADNc s'effectue grâce à une « nested »PCR, l'analyse des fragments amplifiés est réalisée après une électrophorèse en gel d'agarose et une visualisation des molécules de BET sous UV. Ce type de méthode a permis l'étude quantitative de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LMC traités par interféron alpha. Ils ont émis les mêmes conclusions que Cross N.C.P. et son équipe (219, 222, 261-264) concernant la bonne valeur prédictive de rechutes ou de rémissions cytogénétiques et/ou hématologiques que permet ce type de technique. Ils ont également remarqué qu'une augmentation du nombre de transcrits chimères étudiés est toujours précédée d'une transformation de la maladie. Pour ces auteurs, une augmentation du nombre de transcrits chimères étudiés serait suivie d'une augmentation du taux de cellules immatures au pouvoir de prolifération très important, et donc d'une résistance à l'interféron alpha.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en valeur l'importance prédictive d'une évolution de la maladie apportée par la quantification des transcrits étudiés. Cette valeur prédictive semble supérieure à celle obtenue au cours d'un suivi « qualitatif » de la maladie résiduelle.

CONCLUSION

Il est certain que de nos jours la technique de choix à utiliser pour réaliser un suivi de la maladie résiduelle est la technique de PCR. En effet, grâce à cette technique il est possible de détecter 1 cellule leucémique pour 10^4 - 10^5 cellules normales, voire jusqu'à 10^6 cellules normales dans le cadre de la « nested »-PCR.

Pour le suivi de la maladie résiduelle chez des patients atteints de LMC ou de LAL Ph+, les matrices amplifiées sont généralement les transcrits b2a2, b3a2 (dans la grande majorité des cas de LMC et dans environ 20% des cas de LAL Ph+, surtout chez les adultes) et e1a2 (dans 80% des cas de LAL Ph+). Il est alors nécessaire de coupler la technique de PCR à une technique de transcription inverse, RT-PCR. Cette technique de RT-PCR est associée à de nombreux inconvénients, qui sont :

- des molécules d'ARNm peu stables, facilement dégradables,
- une mise au point qui peut s'avérer difficile, sa réalisation dépendant de plusieurs facteurs techniques comme : la composition en bases nucléotidiques de la séquence amplifiée, le choix des amorces, la taille en bases nucléotidiques de la séquence à amplifier, la concentration des différents composants du « mix » de PCR (et surtout du $MgCl_2$, des dNTP, des amorces),
- des résultats faussement positifs dus aux contaminations, plus fréquentes quand on utilise le principe de « nested »-PCR,
- des résultats faussement négatifs liés soit à une dégradation de l'ARNm, ou soit à un mauvais choix d'amorces oligonucléotidiques, plus particulièrement, quand l'on se trouve confronté à la présence de transcrits « atypiques ».

La base du suivi de la maladie résiduelle repose sur un suivi « qualitatif », c'est à dire la détermination de la présence ou non des transcrits étudiés chez des patients ayant reçu

différentes thérapeutiques. Chez des patients en rémission hématologique et/ou cytogénétique complète et présentant plusieurs résultats de PCR +, un suivi « qualitatif » ne suffit pas, il faut pouvoir quantifier le nombre de transcrits étudiés. L'une des techniques permettant ce suivi « quantitatif » est la technique de PCR compétitive couplée à la présence d'un standard interne de coamplification. Grâce à ce type de méthodologie, certains auteurs (219, 222, 261-265) ont pu constater qu'une augmentation nette et durable du nombre de transcrits étudiés est toujours suivie d'une rechute cytogénétique et/ou hématologique. Par contre, une constance de ce nombre voire, une diminution de celui-ci est toujours suivie d'une rémission hématologique et/ou cytogénétique. Certains ont même remarqué qu'une augmentation du nombre de transcrits étudiés est toujours suivie d'une augmentation du taux de cellules leucémiques immatures au pouvoir de prolifération très important (266).

Actuellement, que ce soit pour des patients atteints de LMC ou de LAL Ph⁺ et quelque soit la thérapeutique appliquée, il est difficile de comparer les résultats obtenus d'un patient à l'autre, à cause de la très grande hétérogénéité des techniques et des pratiques utilisées : groupes de patients souvent hétérogène, critères les définissant souvent peu précis, protocoles thérapeutiques différents. Il n'est ainsi pas possible d'affirmer d'une part, qu'un patient en rémission hématologique et/ou cytogénétique complète, car présentant une succession de résultats de PCR « qualitatifs » négatifs, même pendant plusieurs années, restera en rémission ou rechutera. D'autre part, qu'une augmentation des taux de transcrits étudiés, en PCR « quantitative », sera suivie au bout d'un temps plus ou moins long d'une rechute cytogénétique et/ou hématologique.

Récemment, au cours de l'E.I.C.M.L (« European Group of Investigators on CML »), la décision a été prise de prendre en compte les résultats du suivi de la maladie résiduelle par les techniques de PCR quantitative dans les prochains protocoles thérapeutiques (267). Leur

principales recommandations étant, pour des patients ayant subi une greffe de moelle osseuse, d'effectuer mensuellement des analyses par techniques de PCR qualitatives et quantitatives sur des échantillons de sang. Si, au cours des 3 à 6 mois post-greffe, le nombre de cellules leucémiques résiduelles diminue jusqu'à des limites de détection inférieures à celles apportées par la technique de PCR, ces analyses pourraient alors s'effectuer tous les 3 mois pendant la 1ère année post-greffe. Si, les résultats s'avèrent être toujours négatifs, les intervalles entre les différentes analyses seraient étendus à 6 mois. Etant donné que des cellules leucémiques peuvent réapparaître plus de 10 ans post-greffe, il est nécessaire de continuer pendant plusieurs années des analyses sur des échantillons de moelle. Chez des patients pour lesquels on peut constater une réapparition de cellules leucémiques juste après un résultat négatif de PCR, ou chez qui l'on peut observer une augmentation des taux de transcrits étudiés, il semble nécessaire de réaliser hebdomadairement des analyses par la technique de PCR quantitative afin d'évaluer très rapidement la progression du clone leucémique.

Chez des patients recevant de l'interféron en monothérapie ou combiné à d'autres agents de chimiothérapie, l'analyse des métaphases Ph⁺ par techniques de cytogénétique conventionnelle représente la « référence » pour juger de l'efficacité du traitement. Bien que cette approche ne permette pas d'évaluer correctement l'expansion du clone leucémique, l'EICML recommande l'analyse des échantillons par la technique de PCR quantitative uniquement quand les cellules leucémiques ne peuvent plus être détectées par ces techniques. Il peut être considéré que 10% des cellules Ph⁺ en division ne peuvent être analysées. Chez des patients recevant continuellement de l'interféron alpha et pour lesquels on peut constater une régression rapide de la maladie, l'EICML préconise des analyses par la technique de PCR quantitative tous les trois mois. Ceci est également valable pour les patients présentant des résultats de PCR⁺ de façon régulière. Mais, la première indication

d'une augmentation des taux de transcrits étudiés doit amener à réaliser des analyses par la technique de PCR quantitative sur des échantillons de sang toutes les semaines, afin de pouvoir juger rapidement d'une progression effective du clone leucémique.

Concernant les résultats de PCR obtenus après une « quantification » de la maladie résiduelle, plusieurs questions peuvent se poser. L'augmentation du nombre de transcrits étudiés est-il proportionnel à une augmentation du nombre de cellules leucémiques, et donc à une expansion du clone leucémique ? Ou, celle-ci correspond-elle à une augmentation du taux de transcription du gène de fusion *bcr-abl* ? Si tel est le cas quels sont les mécanismes qui en régissent le contrôle ? Finalement, est-il possible de ne prendre en considération qu'un nombre de transcrits pour définir la rémission ou la rechute d'un patient ?

Il est donc clair que l'exploitation correcte des résultats d'un suivi de maladie résiduelle par la technique de PCR nécessite non seulement une standardisation des techniques et des protocoles utilisés pour que des études multicentriques soient possibles, mais également une meilleure compréhension, une meilleure maîtrise des mécanismes biologiques qui sont à l'origine du développement d'une LMC ou d'une LAL Ph+.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Morrison V.A.. Chronic leukemias. *C. A. Cancer J. Clin.*, 1994, 44 : 353-377.
- 2) Brincker H.. Population-based age- and sex-specific incidence rates in the 4 main types of leukaemia. *Scand. J. Haematol.*, 1982, 29 : 241-249.
- 3) Call T.G., Loël P., Habermann T.M., Beard C.M., O'Fallon M., Kurland L.T.. Incidence of leukemia in Olmsted Country, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo. Clin. Proc.*, 1994, 69 : 315-322.
- 4) Hughes T.P., Goldman J.M.. Chronic myeloid leukemia. In : Hoffman R., Benz E.J., Shattil S.J., et al., eds. *Hematology. Basic principles and Practics*. New York : Churchill Livingstone, 1991, pp : 854-869.
- 5) Moloney W.C.. Natural history of chronic granulocytic leukaemia. *Clin. Haematol.*, 1977, 6 : 41-60.
- 6) Sokal J.E.. Prognosis in chronic myeloid leukemia : biology of the disease vs. treatment. *Baillière's Clin. Heamatol.*, 1987, 1 : 907-917.
- 7) Sokal J.E., Gomez G.A., Baccarani M., Tura S., Clarkson B.D., Cervantes F., Rozman C., Carbonell F., Anger B., Heimpel H., et al.. Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Philadelphie chromosome-positive granulocytic leukemia. *Blood*, 1988, 72 : 294-298.
- 8) Raskind W.H., Fialkow P.J.. The use of cell markers in the study of human hematopoietic neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 1987, 49 : 127-167.
- 9) Eaves C.J., Eaves A.C.. Cell culture studies in CML. In : Goldman J.M., Bailliere S., eds. *Clinical haematology. Chronic myeloid leukaemia*. London : Baillière Tindall, 1987, 931-961.
- 10) Udomanski C., Eaves C.J., Swolin B., Reid D.S., Barnett M.J., Eaves A.C.. Rapid decline of chronic myeloid leukemia cells in long-term culture due to a defect at the

leukemic stem cell level. *Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of the USA*, 1992, 89 : 6192 - 6196.

11) Udomanski C., Eaves C.J., Landsdorp P.M., Eaves A.C.. Phenotypic heterogeneity of primitive leukemic hematopoietic cells in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1992, 80 : 2522-2530.

12) Leemhuis T., Leibowitz D., Cox G., Silver R., Srour E.F., Tricot G., Hoffman R.. Identification of BCR/ABL-negative primitive hematopoietic progenitor cells within chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1993, 81 : 801-807.

13) Guilhot F.. Diagnostic et traitement des hémopathies malignes comportant un réarrangement bcr-abl. *Hématologie*, 1995, 2 : 133-144.

14) Cortes J.E., Talpaz M., Kantarjian H.. Chronic myelogenous leukemia : A review. *The american journal of medicine*, 1996, 100 : 555-570.

15) Kantarjian H.M., Deisseroth A., Kurzrock R., Estrov Z., Talpaz M.. Chronic myelogenous leukemia : A concise update. *Blood*, 1993, 82 : 691-703.

16) Kantarjian H.M., O'Brien S., Anderlini P., Talpaz M.. Treatment of chronic myelogenous leukemia : Current status and investigational options. *Blood*, 1996, 87 : 3069-3081.

17) Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R., Trujillo J.M., Gutterman J.U... Interferon alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia Philadelphia chromosome positive patients. *Ann. Intern. Med.*, 1991, 114 : 532-536.

18) Kantarjian H., Smith T., O'Brien S., Mc Credie K.B., Trujillo J.M., Gutterman J.U.. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia following cytogenetic response to alpha interferon therapy. *Ann. Intern. Med.*, 1995, 122 : 254-260.

- 19) Talpaz M., Kantarjian H., Mc Credie K., Trujillo J.M., Gutterman J.U.. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1986, 314 : 1065-1071.
- 20) Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnik H.R., Sultan C.. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *Br. J. of Haematol.*, 1976, 33 : 451-458.
- 21) Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., Sultan C.. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.*, 1985, 103 : 626-633.
- 22) Champlin R., Gale R.P.. Acute Lymphoblastic Leukemia : Recent advances in biology and therapy. *Blood*, 1989, 73 : 2051-2056.
- 23) Secker-Walker L., Craig J., Hawkins J.M., Hoffbrand A.V.. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults. Age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia*, 1991, 5 : 196-200.
- 24) Walters R., Kantarjian H., Keating M., Estey E.H., Trujillo J., Cork A., Mc Credie K.B., Freireich E.J.. The importance of cytogenetic studies in adult acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Med.*, 1990, 89 : 579-587.
- 25) Kantarjian H., Talpaz M., Dhingra K., Estey E., Keating M.J., Ku S., Trujillo J., Huh Y., Stass S., Kurzrock R.. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood*, 1991, 78 : 2411-2418.
- 26) Third International Workshop on Chromosomes in leukemia : Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*, 1983, 43 : 868-873.

- 27) Williams D., Raimondi S., Rivera G., George S., Berard C.W., Murphy S.B.. Presence of clonal chromosomal abnormalities in virtually all cases of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1985, 313 : 640-641.
- 28) Kurzrock R., Gutterman J.U., Talpaz M.. The molecular genetics of Philadelphia chromosome positive leukemias. *N. Engl. J. Med.*, 1988, 319 : 990-998.
- 29) Bloomfield C.D., Peterson L.C., Yunis J.L., Brunning R.D.. The Philadelphia chromosome (Ph1) in adults presenting with acute leukemia : A comparison of Ph1+ and Ph1- patients. *Br. J. Haematol.*, 1977, 36 : 347-358.
- 30) Hoobermann A.L., Westbrook C., Davey F., Schiffer C., Bloomfield C.D.. Molecular detection of the Philadelphia chromosome in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1989, 74 (S1) : 52a.
- 31) Specchia G., Mininni A., Guerrasio A., Palumbo G., Pastore D., Liso V.. Ph positive acute lymphoblastic leukemia in adults : molecular and clinical studies. *Leuk. Lymphoma*, 1995, 18 (S1) : 37-42.
- 32) Crist W., Shuster J., Jackson J, Head D. Borowitz M., Behm F., Link M., Steuber P., Ragab A., Hirt A., Brock B., Land V., Pullen J.. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. Clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. *Blood*, 1990, 76 : 489-495.
- 33) Ribeiro R., Abromowitch M., Raimondi S., Murphy S.B., Behm F., Williams D.L.. Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1987, 70 : 948-953.
- 34) Fletcher J.A., Lynch E., Kimball V., Donnelly M., Tantravahi R., Sallan S.E.. Translocation (9 ;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1991, 77 : 435-439.

- 35) Lestingi T.M., Hooberman A.L.. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hem. Oncol. Clin. of North Am.*, 1993, 7 : 161-175..
- 36) Linker C.A., Levitt L.J., O'Donnell M., Forman S.J., Ries C.A.. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with intensive cyclical chemotherapy : A follow-up report . *Blood*, 1991, 78 : 2814-2822.
- 37) Azuma E., Umemoto M., Kubo M., Ohta Y., Zhang S.L., Komada Y., Ito M., Sakurai M.. CD34 antigen expression in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 1991, 67 : 1565-1569.
- 38) Mori T., Manabe A., Okazaki T., Suzuki T., Sugita K., Hosoya R., Nishimura K., Mizutani S., Nakazawa S.. KOR-SA3544 : A novel monoclonal antibody which specifically binds to cell membrane of Philadelphia chromosome (Ph1) positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1993, 82 (S1) : 52a.
- 39) Gaynor J., Chapman D., Little C.. A cause specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia : The Memorial Hospital experience since 1969. *J. Clin. Oncol.*, 1988, 6 : 1014-1021.
- 40) Rubin C.M., Le Beau M., Mick R., Bitter M.A., Nachman J., Rudinsky R., Appel H.J., Morgan E., Suarez C.R., Schumacher H.R., *et al.* Impact of chromosomal translocations on prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 1991, 12 : 2183-2192.
- 41) Westbrook C.A., Hoobermann A.L., Spino C., Dodge R.K., Larson R.A., Davey F., Wuster-Hill D.H., Sobol R.E., Schiffer C., Bloomfield C.D.. Clinical significance of the BCR-ABL gene in adult acute lymphoblastic leukemia : a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). *Blood*, 1992, 80 : 2983-2990.

- 42) Smith M.. Towards a more uniform approach to risk-classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Chicago : American Society of Clinical Oncology Educational Book, 1994 : 124-130.*
- 43) Priest J., Robinson L., Mc Kenna R.. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood, 1980, 56 : 15-20.*
- 44) Lestingi T.M., Hoobermann A.L.. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America, 1993, 7 : 161-175.*
- 45) Pui C.H., Crist W.M.. Treatment of childhood leukemias. *Current opinion in oncology, 1995, 7 : 36-44.*
- 46) Copelan E.A., Mc Guire E.A.. the biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood, 1995, 85 : 1151-1168.*
- 47) Pui C.H.. Medical progress : Childhood leukemias. *The new england journal of medicine, 1995, 332 : 1618-1630.*
- 48) Nowell P.C., Hungerdorf D.A.. A minute chromosome in human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science, 1960, 132 : 1497.*
- 49) Rowley J.D.. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature, 1973, 243 : 290-293.*
- 50) Baikie A.G., Court-Brown W.M., Buckton K.E., Hardern D.G., Jacobs B.A., Tough I.M.. A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature, 1960, 188 : 1165-1166.*
- 51) Fenaux P., Lai J.L., Morel P., Nelken B., Taboureau O., Deminatti M., Bauters F.. Cytogenetics and their prognostic value in childhood and adult lymphoblastic leukemia (ALL) excluding L3. *Hematol. Oncol., 1989, 7 : 307-317.*

- 52) Kantarjian H., Kurzrock R., Talpaz M.. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 1990, 4 : 389-404.
- 53) Dobrovic A., Morley A.A., Seshadri R., Januszewicz E.H.. Molecular diagnosis of Philadelphia negative CML using the polymerase chain reaction and DNA analysis : clinical features and course of M-bcr negative and M-bcr positive CML. *Leukemia*, 1991, 5 : 187-190.
- 54) Cortes J., Talpaz M., O'Brien S. Rios M.B., Stass S., Kantarjian H.. Philadelphia-chromosome negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region : long term follow-up results. *Cancer*, 1995, 75 : 464-470.
- 55) Kurzrock R., Kantarjian H.M., Shatalid M., Gutterman J.U., Talpaz M.. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement : a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood*, 1990, 75 : 445-452.
- 56) Shepherd P.C.A., Ganesan T.S., Galton D.A.G.. Haematological classification of the chronic myeloid leukemias. *Baillière's Clin. Haematol*, 1987, 1 : 887.
- 57) Wiedemann L.M., Karhi K.K., Shivji M.K., Rayter S.I., Pegram S.M., Dowden G., Bevan D., Will A., Galton D.A., Chan L.C.. The correlation of breakpoint cluster region rearrangement and P210^{bcr/abl} expression with morphological analysis of Ph-negative chronic myeloid leukemia and other myeloproliferative disease. *Blood*, 1988, 349-355.
- 58) Hirsch-Ginsberg C., le Maistre A.C., Kantarjian H., Talpaz M., Cork A., Freireich E.J., Trujillo J.M., Lee M.S., Stass S.A.. RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 1990, 76 : 1214-1219.

- 59) Diez-Martin J.L., Dewald G.W., Pierre R.V.. Possible genetic distinction between lymphoid and myeloid blast crisis in chronic granulocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 1988, 27 : 35-37.
- 60) Berger R., Bernheim A., Daniel T., Flandrin G.. t(15;17) in a promyelocytic form of chronic myeloid leukemia blastic crisis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1983, 8 : 149-152.
- 61) Bernstein R.. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. *Sem. Hematol.*, 1988, 25 : 20-34.
- 62) Hagemeyer A.. Chromosome abnormalities in CML. *Baillière's Clin. Hematol.*, 1987, 1 : 963-981..
- 63) Liu E., Hjelle B., Bishop J.M.. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. of Acad. of Sci.*, 1988, 85 : 1952-1956..
- 64) Ahuja H., Bar-Eli M., Advani S.H., Benchimol S., Cline M.J.. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86 : 6783 - 6787.
- 65) Sandberg A.. The chromosomes in human leukemia. *Semin. Hematol.*, 1986, 23 : 3-9.
- 66) Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson J.R., Spurr N.K., Goodfellow P.N., Solomon E., Carritt B., Bodmer W.F.. Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature*, 1982, 299 : 747-750.
- 67) Chomel J.C., Guihlot F., Tanzer J., Kitzis A.. Mécanismes de l'action oncogénique de Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique. *m/s*, 1995, 11 : 1669-1678.
- 68) Shah N.P., Witte O.N., Denny C.T.. Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 11 : 1854-1860.

- 69) Collins S., Colman H., Groudine L.. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7 : 2870-2876.
- 70) Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G.. Philadelphia chromosome breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 1984, 36 : 93-99.
- 71) Heisterkamp N., Jenkins R., Thibodeau S., Testa J.R., Weinberg K., Groffen J.. The bcr gene in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1989, 73 : 1307-1311.
- 72) de Klein A., Hagemeyer A., Bartram C.R., Houwen R., Hoefsloot L., Carbonell F., Chen L., Barnett M., Greaves M., Kleihauer E., Heisterkamp N., Groffen J., Grosveld G.. Bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1986, 68 : 1369-1374.
- 73) Sowerby S.J., Kennedy M.A., Fitzgerald P.H., Morris C.M.. DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the BCR gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias. *Oncogene*, 1993, 8 : 1679-1683..
- 74) Hochhaus A, Reiter A., Melo J.V., Skladny H., Shepherd P.C.A., Sick C., Clark R.E., Tobler A., Bell A., Hehlmann R. Goldman J.M., Cross N.C.P.. Atypical BCR-ABL transcripts in chronic myelogenous leukemia (CML) patients detect by multiplex polymerase chain reaction. *Blood*, 1995, 86 (S1.) : 526 a.
- 75) van der Plas D.C., Soekarman S., van Gent A.M., Grosveld G., Hagemeyer A.. bcr-abl mRNA lacking abl exon a2 detected by polymerase chain reaction in a chronic myelogenous leukemia patient . *Leukemia*, 1991, 5 : 457-461.
- 76) Iwata S, Mizutani S, Nakazawa S, Yata J. Heterogeneity of the breakpoints in the ABL gene in cases with BCR/ABL transcript lacking ABL exon a2. *Leukemia*, 1994, 8 : 1696-1702.

- 77) Melo J.V., Myint H., Galton D.A.G., Goldman J.M. P190^{BCR-ABL} chronic myeloid leukemia : the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia ? *Leukemia*, 1994, 8 : 208-211.
- 78) Hermans A., Heisterkamp N., von Lindern M., van Baal S., Meijer D., van der Plas D., Wiedemann L.M., Groffen J., Bootsma D. Grosveld G.. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, 1987, 51 : 33-40.
- 79) Keating A., Wang X.H., Laraya P.. Variable transcription of BCR/ABL by Ph⁺ cells arising from hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1994, 83 : 1744.
- 80) Bedi A., Zehnbauser B.A., Collector M.I., Barber J.P., Zicha M.S., Sharkis S.J., Jones R.J.. BCR/ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1993, 81 : 2898-2902.
- 81) Kelliher M., Knott A., Mc Laughlin.J., Witte O.N., Rosenberg N.. Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of BCR/ABL oncogene. *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11 : 4710-416.
- 82) Heisterkamp N., Jenster G., ten-Hoeve J., Zovich D., Pattengale P.K., Groffen J.. Acute leukemia in BCR/ABL transgenic mice. *Nature*, 1990, 344 : 251-253.
- 83) Stewart M.J., Cox G., Reifel-Miller A., Kim S.Y., Westbrook C.A., Leibowitz D.S.. A novel transcriptional suppressor located within a downstream intron of the BCR gene. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 108-120.
- 84) Wang J.Y.J.. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr. Opin. GeEnt. Dev.*, 1993, 3 : 35-43.
- 85) Chardin P.. Domaines SH2 et SH3 : un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *m/s*, 1994, 10 : 709-712.

- 86) van Etten R.A., Jackson P., Baltimore D.. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*, 1989, 58 : 669-678.
- 87) Wetzler M., Talpaz M., van Etten R.A., Hirsh-Ginsberg C., Beran M., Kurzrock R.. Subcellular localization of Bcr, Abl and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92 : 1925-1939.
- 88) Mc Whirter J.R., Wang J.Y.J.. Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-Abl by Bcr sequences in Bcr/Abl fusion proteins. *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11 : 1553-1563.
- 89) Kipreos E.T., Wang J.Y.J.. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*, 1992, 256 : 382-385.
- 90) Tybulewicz V.L.J., Crawford C.E., Jackson P.K., Bronson R.T., Mulligan R.C.. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*, 1991, 65 : 1153-1163.
- 91) Chwartzberg P.L., Stall A.M., Hardin J.D., Bowdish K.S., Humaran T., Boast S., Harbison M.L., Roberson E.J., Goff S.P.. Mice homozygous for the abl^m mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*, 1991, 65 : 1165-1175.
- 92) Sawyers C.L., Mc Laughlin J., Goga A., Haviik M., Witte O.N.. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*, 1994, 77 : 121-131.
- 93) Muller A.J., Young J.C., Pendergast A.M., Pondel M., Landau N.R., Littman D.R., Witte O.N.. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11 : 1785-1792.

- 94) Mc Whirter J.R., Galasso D.L., Wang J.Y.J.. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell Biol.*, 1993, 13 : 7587-7595.
- 95) Maru Y., Witte O.N.. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, 1991, 67 : 459-468.
- 96) Diekmann D., Brill S., Garrett M.D., Totty N., Shuan J., Monfries C., Hall C., Lim L., Hall A.. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21^{rac}. *Nature*, 1991, 351 : 400-402.
- 97) Benna J.E., Ruedi J.M., Babior B.M.. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac 2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxydase. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 6729-6734.
- 98) Voncken J.W., van Schaick H., Kaartinen V., Deemer K., Coates T., Landing B., Pattengale P., Dorseuil O., Bokoch G.M., Groffen J., Heisterkamp N.. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell*, 1995, 80 : 719-728.
- 99) Dorseuil O.. Le rôle physiologique pour Bcr. *m/s*, 1995, n°7, vol. 11, p. 1039.
- 100) Konopka J.B., Witte O.N.. Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol*, 1985 ; 5 : 3116-3123.
- 101) Maxwell S.A., Kurzrock R., Parsons S.J., Talpaz M., Gallick G.E., Kloetzer W.S., Arlinghaus R.B., Kouttab N.M., Keating M.J., Gutterman J.U.. Analysis of P210^{bcr-abl} tyrosine protein kinase activity in various subtypes of Philadelphia chromosome-positive cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Cancer Res*, 1987 ; 47 : 1731-1739.
- 102) Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N.. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, 1990 ; 247 : 1079-1082.

- 103) Guo J.Q., Wang J.Y.G., Arlinghaus R.B.. Detection of BCR-ABL proteins in blood cells of benign phase chronic myelogenous leukemia patients. *Cancer Res*, 1991 ; 51 : 3048-3051.
- 104) Kuwao F., Takahashi I.. Detection of P210^{bcr-abl} in mature granulocytes from Ph¹-positive chronic myelogenous leukemia patients by immunoblotting method. *Leukemia*, 1993 ; 8 : 1168-1173.
- 105) van Etten R.A., Jackson P., Baltimore D.. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*, 1989, 58 : 669-678.
- 106) Davis R.L., Konopka J.B., Witte O.N.. Activation of the c-abl oncogene by viral transduction of chromosomal translocation generates altered c-Abl proteins with similar in vitro kinase properties. *Mol. Cell Biol.*, 1985, 5 : 204-209.
- 107) Konopka J., Watanabe S.M., Singer J.W., Collins S.J., Witte O.N.. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-Abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82 : 1810-1814.
- 108) Hoobermann A., Rubin C.M., Barton K.P., Westbrook C.A.. Detection of the Philadelphia chromosome in acute lymphoblastic leukemia by pulsed-field gel electrophoresis. *Blood*, 1989, 74 : 1101-1107.
- 109) Suryanaryan E., Hunger S.P., Kohler S., Carroll A.J., Crist W., Link M.P., Cleary M.L.. Consistent involvement of the BCR gene by 9 ; 22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood*, 1991, 77 : 324-330.
- 110) Smetsers T.F.C.M., Skorski T., van de Locht L.T.F., Wessels H.M.C., Pennings A.H.M., de Witte T., Calabretta B., Mensink E.J.B.M.. Antisense BCR-ABL

- oligonucleotides induce apoptosis in the Philadelphia chromosome-positive cell line BV173. *Leukemia*, 1994, 8 : 129-140.
- 111) Bedi A., Zehnbaauer B.A., Barber J.P., Sharkis S.J., Jones R.J.. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1994, 83 : 2038-2044.
- 112) Evans C.A., Owen-Lynch P.J., Whetton A.D., Dive C.. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with apoptosis in hematopoietic cells. *Cancer Res.*, 1993, 53 : 1735-1739.
- 113) Mc Gahan A., Bissonette R., Schmitt M., Cotter K.M., Green D.R., Cotter T.G.. BCR/ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, 1994, 83 : 1179-1184.
- 114) Kabarowski J.H.S., Allen P.B., Wiedemann L.M.. A temperature sensitive P210^{BCR-ABL} mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependant cells. *E.M.B.O.*, 1993, 13 : 5887-5895.
- 115) Sirard C., Laneuville P., Dick J.E.. Expression of BCR/ABL abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic MO7E cells by an autocrine mechanism. *Blood*, 1994, 83 : 1575-1581.
- 116) Groffen J., Heisterkamp N.. The BCR/ABL hybrid gene. *Baillière's Clin. Haematol.*, 1987, 1 : 983-999.
- 117) Daley G.Q., van Etten R.A., Baltimore D.. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210^{bcr/abl} gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, 1990, 247 : 824-830.
- 118) Kelliher M.A., Mc Laughlin J., Witte O.N., Rosenberg N.. Induction of chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice v-abl and BCR-ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87 : 6649-6653.

- 119) Hariharan I.K., Harris A.W., Crawford M., Abud H., Webb E., Cory S., Adams J.M.. A bcr-v-abl oncogene induces lymphomas in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.*, 1989, 9 : 2798-2805.
- 120) Daley G.Q., Mc Laughlin J., Witte O.N., Baltimore D.. The CML-specific p210^{bcr/abl} protien, unlike v-abl, does not transform NIF/3T3 fibroblasts. *Science*, 1987, 237 : 523-525.
- 121) Daley G.Q., van Etten R.A., Jackson P.K., Bernards A., Baltimore D.. Nonmyristoylated Abl proteins transform a factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12 : 1864.-1871
- 122) Cicchetti P., Mayer B.J., Thiel G., Baltimore D.. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-Rho. *Science*, 1992, 257 : 803-806.
- 123) Turhan A.. Translocation bcr-abl : données biologiques. *Hématologie*, 1995, 2 : 123-131.
- 124) Pendergast A.M., Muller A.J., Havlik M.H., Maru Y., Witte O.N.. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind the ABL/SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine dependent manner. *Cell*, 1991, 66 : 161-165.
- 125) Mc Whirter J.R., Wang J.Y.J.. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *E.M.B.O. J.*, 1993, 12 : 1533-1546.
- 126) Liu J., Campbell M., Guo J.Q., Lu D., Xian Y.M., Andersson B.S., Arlinghaus R.B.. BCR-ABL tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylates P160^{BCR} on tyrosine predominantly within the first BCR exon. *Oncogene*, 1993, 8 : 101-109.
- 127) Sawyers C.L., Callahan W., Witte O.N.. Dominant negative myc blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell*, 1994, 70 : 901-910.

- 128) Mandanas R.A., Leibowitz D.S., Gharehbaghi K., Tauchi T., Burgess G.S., Miyasawa K., Jayaram H.N., Boswell H.S.. Rôle of P21^{RAS} in P210^{bcr/abl} transformation of murine myeloid cells. *Blood*, 1993, 82 : 1838-1847.
- 129) Pendergast A.M., Quilliam L.A., Cripe L.D., Bassing C.H., Dai Z., Li N., Batzer A., Rabun K.M., Der C.J., Schlessinger J., Gishizky M.L.. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, 1993, 75 : 175-185.
- 130) Tauchi T., Boswell H.S., Leibowitz D., Broxmeyer H.E.. Coupling between p210^{bcr-abl} and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permit growth factor receptor-indépendant link to Ras activation pathway. *J. Exp. Med.*, 1994, 179 : 167-175.
- 131) Chardin P.. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *m/s*, 1994, 10 : 657-664.
- 132) Skorski T., Kanakaraj P., Ku D.H., Nieborowska-Skorska M., Canaani E., Zon G., Perussia B., Calabretta B.. Negative regulation of P120GAP GTPase promoting activity by p210^{bcr/abl}. Implication for RAS-dependent philadelphia chromosome-positive cell growth. *J. Exp. Med.*, 1994, 179 : 1855-1865.
- 133) Ahuja H., Bar-Eli M., Advani S.H., Benchimol S., Cline M.J.. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86 : 6783-6787.
- 134) Selleri L., van Lindern M., Hermans A., Meijer D., Torelli G., Grosveld G... Chronic myeloid leukemia may be associated with several BCR/ABL transcripts including the acute lymphoid leukemia type 7 Kb transcript. *Blood*, 1990, 75 : 1146-1153.
- 135) Guo J., Hirsch-Ginsberg C.F., Xian Y.M., Stass S.A., Champlin R.E., Giralt S.A., Mc Credie K.B., Campbell .M.L., Arlinghaus R.B.. Acute lymphoid leukemia molecular

- phenotype in a patient with benign-phase chronic myelogenous leukemia. *Hemat. Pathol.*, 1993, 7 : 91-106.
- 136) Gishizky M.L., Johnson-White J., Witte O.N.. Efficient transplantation of BCR/ABL-induced chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 : 3755-3759.
- 137) Gishizky M.L., Johnson-White J., Witte O.N.. Evaluating the effect of P210 BCR/ABL on growth of hematopoietic progenitor cells and its role in the pathogenesis of human chronic myelogenous leukemia. *Sem. Hematol.*, 1993, 30 (3) : 6-10.
- 138) Elefanty A.G., Cory S.. Hematologic disease induced in BALB/c mice by a bcr-abl retrovirus is influenced by the infection conditions. *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12 : 1755-1763.
- 139) Daley G.Q., van Etten R.A., Baltimore D.. Blast crisis in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88 : 11335-11338.
- 140) Kelliher M., Knott A., Mc Laughlin J., Witte O.N., Rosenberg N.. Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of BCR/ABL oncogene. *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11 : 4710-4716.
- 141) Fialkow P.J., Jacobson R.T., Papayannopolou T.. Chronic myelocytic leukemia : clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, platelet and monocyte macrophage. *Am. J. Med.*, 1977, 63 : 125-130.
- 142) Tachibana N., Raimondi S.C., Lauer S.J., Sartain P., Dow L.W.. Evidence for a multipotential stem cell disease in some childhood Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1987, 70 : 1458-1461.
- 143) Turhan A.G., Eaves C.J., Kalousek D.K., Humphries R.K.. Molecular analysis of clonality and BCR rearrangements in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1988, 71 : 1495-1498.

- 144) Estrov Z., Talpaz M., Kantarjian H.M., Zipf T.F., Mc Clain K.L., Kurzrock R.. Heterogeneity in lineage derivation of Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia expressing P190^{BCR-ABL} or P210^{BCR-ABL} : determination by analysis of individual colonies with the polymerase chain reaction. *Cancer Res.*, 1993, 53 : 3289-3293.
- 145) Andrews D.F., Collins S.J.. Heterogeneity in expression of the BCR/ABL fusion transcript in CML blast crisis. *Leukemia*, 1987, 1 : 718-724.
- 146) Konopka J.B., Clark S., Mc Laughlin J., Nitta M., Kato Y., Strife A., Clarkson B., Witte O.N.. Variable expression of the translocated c-abl oncogene in Philadelphia chromosome positive B lymphoid cell lines from chronic myeloid leukemia patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83 : 4049-4052.
- 147) Catovsky D.. Ph1-positive acute leukemia and chronic granulocytic leukaemia : one or two diseases ? *Br. J. of Haematol.*, 1979, 42 : 493-498.
- 148) Gale R.P., Butturini A.. Ph-chromosome positive acute leukemias and acute phase CML : one or two diseases ? *Two Leuk. Res.*, 1990, 14 (1) : 295-297.
- 149) Kitano K., Sato Y., Suda T., Miura Y.. Differences of cell lineage expression of haematopoietic progenitor cells in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia and chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. of Haematol.*, 1988, 70 : 21-26.
- 150) Carrino J.J. Leibowitz D., Rowley J.D., Le Beau M.N., Arlin Z.A., Westbrook C.A.. Unexpected heterogeneity of BCR-ABL fusion mRNA detected by polymerase chain reaction in philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 86 (11) : 4259-4263.
- 151) Secker-Walker L., Cooke H., Browett P., Shippey C.A., Norton J.D., Coustan-Smith E., Hoffbrand A.V.. Variable Philadelphia breakpoints and potential lineage restriction of bcr rearrangement in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1988, 72 : 784-791.

- 152) Saglio G., Guerrasio A., Rosso C., Lo Coco F., Frontani M., Annino L., Mandelli F.. Detection of Ph1-positive acute lymphoblastic leukemia by PCR analysis. *Lancet*, 1991, 338 : 958-962.
- 153) Morris S.W., Daniel L., Ahmed C.M., Elias A., Leibowitz P.. Relationship of BCR breakpoint to chronic phase duration, survival and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase. *Blood*, 1990, 75 : 2035-2041
- 154) Dreazen O., Berman M., Gale R.P.. Molecular abnormalities of BCR and ABL in chronic myelogenous leukemia associated with a long chronic phase. *Blood*, 1988, 71 : 797-799.
- 155) Ben-Yehuda D., Zion M., Avraham A., Krichevsky S., Ben-Neriah Y.. De novo methylation at the BCR/ABL locus in the course of CML. A possible marker of tumor progression. *Blood*, 1994, 84 (1) : 154a.
- 156) Vonken J.W., Morris C., Pattengale P.K., Dennert G., Kikly C., Groffen J., Heisterkamp N.. Clonal development and karyotype evolution during leukemogenesis of BCR/ABL transgenic mice. *Blood*, 1992, 79 : 1029-1033.
- 157) Kantarjian H.M., Dixon D., Keating M.J.. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 1991, 61 : 1441-1449.
- 158) Mitani K., Ogawa S., Tanaka T., Miyoshi H., Kurokawa M., Mano H., Yazaki Y., Ohki M., Hirai H.. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3 ;21) (q26 ;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *E.M.B.O. J.*, 1994, 13 : 504-510.
- 159) Mc Carthy D.M., Rassool F.V., Goldman J.M., Graham S.V., Birnie G.D.. Genomic alteration involving the c-myc protooncogene locus during evolution of a case of chronic granulocytic leukemia. *Lancet*, 1984, 2 : 1362-1368.

- 160) Verfaillie C., Kay N., Mc Glave P.. Adherent lymphokine activated killer cells in chronic myelogenous leukemia : a benign cell population with potent cytotoxic activity. *Blood*, 1989, 74 : 793-797.
- 161) Verfaillie C., Kay N., Mc Glave P.. Diminished A-LAK cytotoxicity and proliferation accompany disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1990, 76 : 401-408.
- 162) Wetzler M., Kurzrock R., Lowe D.G., Kantarjian H., Gutterman J.U., Talpaz M.. Alteration in bone marrow adherent layer growth factor expression : a novel mechanism of chronic myelogenous leukemia progression. *Blood*, 1991, 78 : 2400-2406.
- 163) Gale R.P., Baccarani M., Horowitz M.M., Zhang M.J., Gutterman J.U.. Is the course of chronic myelogenous leukemia affected by bone marrow transplant. *Blood*, 1994, 82 (S1) : 167a.
- 164) The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alpha-2 as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330 : 820-825.
- 165) Mc Gahan A., Bissonnette R., Schmitt M., Cotter K., Green D.R., Cotter T.G.. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, 1994, 83 : 1179-1187
- 166) ISCN, 1995, An international System for Human Cytogenetic Nomenclature (eds. F. Mitelman), published in coll. with Cytogenetics and Cell Genetics (Karger, Basel, 1995).
- 167) Chen S.J., Chen Z., Grausz D., Hillion J., d'Auriol L., Flandrin G., Larsen C.J., Berger R.. Molecular cloning of a 5' segment of the genomic Ph1 gene defines a new breakpoint cluster region (bcr2) in Philadelphia-positive acute leukemias. *Leukemia*, 1988, 2 : 634-641.

- 168) Berger R., Chen S.J., Chen Z.. Philadelphia-positive acute leukemia. Cytogenetic and molecular aspects. *Cancer. Genet. Cytogenet.*, 1990, 44 : 143-152.
- 169) Heisterkamp N., Knoppel E., Groffen J.. The first BCR gene intron contains breakpoints in Philadelphia chromosome positive leukemia. *Leukemia*, 1989, 1 : 3-10.
- 170) Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.. Molecular cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982
- 171) Chomczynski P., Sacchi N.. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162 : 156.
- 172) Porcher C., Malinge M.C., Picat C., Grandchamp B.. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *Biotechniques*, 1992, 13 : 106-114.
- 173) Malinge M.C., Mahon F.X., Delfau M.H., Daheron L., Kitzis A., Guihlot F., Tanzer J., Grandchamp B.. Quantitative determination of the hybrid bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukaemia under interferon therapy. *Br. J. of Haematol.*, 1992, 82 : 701-707.
- 174) Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L.. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria : genetic transformation of Escherichia coli by R. factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 69 : 2110-2114.
- 175) Sanger F., Niklen S., Coulson A.R.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, 74 : 5463-5467.
- 176) Galton D.A.G.. Haematological differences between chronic granulocytic leukaemia, atypical chronic myeloid leukaemia, and chronic myelomonocytic leukaemia. *Leukemia and lymphoma*, 1992, 7 : 343-350.
- 177) van der Plas, Grosveld G., Hagemeijer A.. Review of clinical, cytogenetic, and molecular aspects of Ph-negative CML. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1991, 52 : 143-156.

- 178) Martiat P., Michaux J.L., Rodhain J. for the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Philadelphia-Negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML) : comparison with Ph+ CML and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 1991, 78 : 205-211.
- 179) Lesesve J.F., Troussard X., Bastars C., Hurst J.P., Nouet D., Callat M.P., Lenormand B., Piguet H., Flandrin G., Macintyre E.. p190^{bcr/abl} rearrangement in myelodysplastic syndromes : two reports and review of the literature. *Br. J. of Haematol.*, 1996, 95 : 372-375.
- 180) Costello R.T., Gabert J., Brunel V., Sainty D., Arnoulet C., Mozziconacci M.J., Camerlo J., Perret C., Gastaut J.A., Bouabdallah R., Lafage-Pochitaloff M. Minor breakpoint cluster region (m-BCR) positive chronic myeloid leukaemia with an acute lymphoblastic leukaemia onset : a case report. *Br. J. of haematol.*, 1995, 91 : 428-430.
- 181) Baranger L., Szapiro N., Gardais J., Hillon J., Derre J., François S., Blanchet O., Boasson M., Gerger R.. Translocation (5;12) (q31-33;p12-p13) : a non random translocation associate with a myeloid disorder with eosinophilia. *Br. J. of Haematol.*, 1994, 88 : 343-348.
- 182) Leslie J., Barker T., Glancy M., Jennings B., Pearson J.. t(8;13) (p11;q12) translocation in a myeloproliferative disorder associated with a T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. of Haematol.*, 1994, 86 : 876-878.
- 183) Mac Donald D., Sheerin S.M., Cross N.C.P., Spencer A., Goldman J.M. An atypical myeloproliferative disorder with t(8;13) (p11;q12) : a third case. *Br. J. of Haematol.*, 1994, 86 : 879-880.
- 184) Felman P., Bryon P.A., Gentilhomme O., French M., Charrin C., Espinouse D., Viala J.J.. The syndrome of abnormal chromatin clumping in leucocytes : a

myelodysplastic disorder with proliferative features ? *Br. J. of Haematol.*, 1988, 70 : 49-54.

185) Hughes T.P., Morgan G.J., Martiat P., Goldman J.M.. Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia : Role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood*, 1991, 77 : 874-878.

186) Miyamura K., Tahara T., Tanimoto M., Morishita Y., Kawashima K., Morishima Y., Saito H., Tsuzuki S., Takeyama K., Koderu Y., *et al.* Long persistent bcr-abl positive transcript detected by polymerase chain reaction after marrow transplant for chronic myelogenous leukaemia without clinical relapse : a study of 64 patients. *Blood*, 1993, 81 : 1089-1093.

187) Guerrasio A., Martinelli G., Saglio G., Rosso C., Zaccaria A., Rosti G., Testoni N., Ambrosetti A., Izzi T., Sessarego M., *et al.* Minimal residual disease status in transplanted chronic myelogenous leukemia patients : Low incidence of polymerase chain reaction positive cases among 48 long disease-free subjects who received unmanipulated allogeneic bone marrow transplants. *Leukemia*, 1992, 6 : 507-512.

188) Cross N.C.P., Hughes T.P., Lin F., O'Shea P., Bungey J., Marks D.I., Ferrant A., Martiat P., Goldman J.M.. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase : correlation with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br. J. of Haematol.*, 1993, 84 : 67-74.

189) Delfau M.H., Kerckaert J.P., Collyn d'Hooghe M., Fenaux P., Lai J.L. Jouet J.P., Grandchamp B.. Detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia*, 1990, 4 : 1-5.

190) Roth M.S., Antin J.H., Ash R., Terry V.H., Gotlieb M., Silver S.M., Ginsburg D.. Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by the

polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1992, 79 : 276-282.

191) Gaiger A., Lion T., Kalhs P., Mitterbauer G., Henn T., Haas O. Fodinger M. Kier P., Fostinger C., Quehenberger P., *et al.*. Frequent detection of BCR-ABL specific mRNA in patients with chronic myeloid leukemia (CML) following allogeneic and syngeneic bone marrow transplantation (BMT). *Leukemia*, 1993, 7 : 1766-1772.

192) Radich J.P., Gehly G., Gooley T., Bryant E., Clift R.A., Collins S., Edmans S., Kirk J., Lee A., Kessler P., *et al.*. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia : results and implications in 346 patients. *Blood*, 1995, 85 : 2632-2638.

193) Arnold R., Janssan J.W.G., Heinze B., Bunjes D. Hertenstein B., Wiesneth M., Kubanek B., Heimpel H., Bartram C.R.. Influence of graft-versus-host disease on the eradication of minimal residual leukemia detected by polymerase chain reaction in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Leukemia*, 1993, 7 : 747-751.

194) Pichert G., Roy D-C., Gonin R., Alyea E.P., Bélanger R., Gyger M., Perreault C., Bonny Y., Lerra I., Murray C., Soiffer R.J., Ritz J.. Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J. of Clin. Oncol.*, 1995, 13 : 1704-1713.

195) Pignon J.M., Henni T., Amselem M., Vidaud M., Duquesnoy P., Vernant J.P., Kuentz M., Cordonnier C., Rochant H., Goossens M.. Frequent detection of minimal residual disease by use the polymerase chain reaction in long-term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 1990, 4 : 83-86.

- 196) Santini V., Zoccolante A., Bosi A., Guidi S., Saccardi R., Vannucchi A.M., Martinazzo G., Bernabei P.A., Ferrini P. R.. Detection of BCR/ABL transcripts by RT-PCR and their colorimetric evaluation in chronic myeloid leukemia patients receiving allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica*, 1996, 81 : 201-207.
- 197) Garcia A., Roman J., Brunet S., Andres P., Baiget M., Torres A., Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia in patients with long survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Med. Clin. (Barc)*, 1995 104 : 401-406.
- 198) Lee M., Khouri I., Champlin R., Kantarjian H., Talpaz M., Trujillo J., Freireich E. Deisseroth A., Stass S.. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction of bcr/abl transcripts in chronic myelogenous leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. of Haematol.*, 1992, 82 : 708-714.
- 199) Pichert G., Aleya E.P., Soiffer R.J., Roy D.C., Ritz J.. Persistence of myeloid progenitor cells expressing BCR-ABL mRNA after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1994 84 : 2109-2114.
- 200) Costello R.T., Kirk J., Gabert J.. Value of PCR analysis for long term survivors after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia : a comparative study. *Leuk. Lymphoma*, 1996, 20 : 239-243.
- 201) Lin F., Goldman J.M., Cross N.C.P.. A comparison of the sensitivity of blood and bone marrow for the detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Br. J. of Haematol.*, 1994, 86 : 683-685.
- 202) Miyamura K., Barrett A.J., Kodaera Y., Saito H.. Minimal residual disease after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia and implications for graft-versus-leukemia effect : a review of recent results. *Bone Marrow Transplant.*, 1994, 14 : 201-209.

- 203) Goldman J.M., Gale R.P., Horowitz M.M., Biggs J.C., Champlin R.E., Gluckman E., Hoffmann R.G., Jacobsen S.J., Marmont A.M., Mc Glave P.B. *et al.*. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. med.*, 1988, 108 : 806-814.
- 204) Pichert G., Roy D.C., Gonin R., Aleya E.P., Belanger R., Gyger M., Perreault C., Bonny Y., Lerra I., Murray C., *et al.*. Distinct patterns of minimal residual associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 1995, 13 : 1704-1713.
- 205) Weisford D., Haake R., Blazar B., Miller W., Mc Glave P., Ramsay N., Kersey J., Filipovich A. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation : an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*, 1990 75 : 1024-1030.
- 206) Devergie A., Reiffers J., Venant J.P., Herve P. Guyotat D., Maraninchi D., Rio B., Michallet M., Jouet J.P., Milpied N., *et al.*. Long-term follow-up after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia : factors associated with relapse. *Bone Marrow Transplant.* 1990, 5 : 379-386.
- 207) Xu W.M., Piao X.H., Addy L., Jamal M., Minden M.D., Messner H.A. Minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, 1994, 14 : 299-306.
- 208) Biggs J.C., Szer J., Crilley P., Atkinson K., Dows K., Doods A., Concannon A.J., Avalos B., Tutschka P., Kapour N., Brodsky D., Topdsky D., Bulova S.I., Copelan E.A. Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2. *Blood*, 1992, 80 : 1352-1357.

- 209) Thomas E.D., Clift R.A., Fefer A., Appelbaum F.R., Beatty P., Bensinger W.I., Buckner D., Cheever M.A., Deeg H.G., Doney K, *et al.* Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1986, 104 : 155 -160.
- 210) Guihlot F., Abgrall J.H., Harousseau J.L., Bauters F. Brice P., Dine G., Tilly H., Ifrah N., Cassasus P., Rochant H., *et al.* A multicenter randomized study of alfa 2b interferon and hydroxyurea with or without cytosine-arabioside in previously untreated patients with Ph⁺ chronic myelocytic leukemia : preliminary cytogenetic results. *Leuk. Lymphoma*, 1993, 11 (1) : 181-183.
- 211) Clift R.A., Appelbaum F.R., Thomas E.D.. Treatment of chronic leukemia by bone marrow transplantation. *Blood*, 1993, 82 : 1954-1956.
- 212) Clift R.A., Appelbaum F.WR., Thomas E.D.. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1994, 83 : 2752.
- 213) Mackinnon S., Barnett L., Heller G.. Polymerase chain reaction is highly predictive of relapse in patients following T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, 1996, 17 : 643-647.
- 214) Drobyski W.R., Ash R.C., Gasper J.T., Mc Auliffe T., Horowitz M.M., Lawton C., Keever C., Baxter-Lowe L.A., Camitta B., Garbrecht F., *et al.* Effect of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis on engraftment, relapse and disease-free survival in unrelated marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1994, 83 : 1980-1987.
- 215) Devergie A., Reiffers J., Vernant J.P., Herve P., Guyotat D., Maraninchi D., Rio B., Michallet M., Louet J.P., Milpied N., *et al.* Long term follow-up after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia : factors associated with relapse. *Bone Marrow Transplant.*, 1990, 5 : 379-386.

- 216) Speck B., Bortin M.M., Champlin R., Goldman J.M., Herzig R.H., Mac Glave P.B., Messner H.A., Weiner H.A., Rimm A.A. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Lancet*, 1984, *i* : 665-668.
- 217) van Rhee F., Lin F., Cullis J.O., Spencer A., Cross N.C.P., Chase A., Garicochea B., Bungey J., Barrett J., Goldman J.M. Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant : The case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood*, 1994, *83* : 3377-3383.
- 218) van Rhee, Lin F., Cross N.C., Reid C.D., Lakhani A.K., Szydlo R.M., Goldman J.M. Detection of residual leukaemia more than 10 years after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Bone Marrow Transplant.*, 1994, *14* : 609-612.
- 219) Lin F., van Rhee F., Goldman J.M., Cross N.C. Kinetics BCR-ABL transcript number in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood*, 1996, *87* : 4473-4478.
- 220) Lion T., Henn T., Gaiger A., Kahls P., Gadner H. Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Lancet*, 1993, *341* : 275-276.
- 221) Thompson J.D., Brodsky I., Yunis J.J. Molecular quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation. *Blood*, 1992, *79* : 1629-1635.
- 222) Cross N.C.P., Lin F., Chase A., Bungey J., Hughes T.P., Goldman J.M. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*, 1993, *82* : 1929-1936.

- 223) Talpaz M., Kantarjian H.M., Mc Credie K.B., Trujillo J., Gutterman J.U.. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1987, 69 : 1280-1288.
- 224) Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R., Trujillo J.M., Gutterman J.U.. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1991, 114 : 532-538.
- 225) Kantarjian H.M., Smith T.L., O'Brien S., Mc Credie K.B., Trujillo J., Gutterman J.U.. Prolonged survival following achievement of cytogenetic response with alpha interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.* 1995, 122 : 254-261.
- 226) Aulitzky W.E., Peschel C., Schneller F., Huber C.. Biotherapy of chronic myelogenous leukemia. *Ann. Haematol.*, 1995, 70 : 113-120.
- 227) Wetzler M.D.. Interferon- α therapy for chronic myelogenous leukemia. *The Am. J. of Med.*, vol 99, n $^{\circ}$ 4, pp 402-411.
- 228) The Italian Cooperative Study group on chronic myeloid leukemia. Interferon alpha-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. Med.*, 1994, 330 : 820-825.
- 229) Allan N., Richards S., Shepherd D.P.. UK MRC randomized trial of interferon- α in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Br. J. of Haematol.*, 1994, 87 (S1) : 165-169.
- 230) Allan N.C., Shepherd P.C.A., Richards S.M.. Interferon- α prolongs survival for patients with CML chronic phase : preliminary results of the UK MRC randomized multicenter trial. *Blood*, 1994, 84 (S1) : 382a.
- 231) Ohnishi K., Ohno R., Tomonaga M., Kamada N., Onazawa K., Kuramoto A., Dohy H., Mizoguchi H. Miyawaki S., Tsubaki K., *et al.* A randomized trial comparing

interferon- α with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 1995, 86 : 906-916.

232) Hehlmann R. Heimpel L.H., Hasford J., Kolb H.J., Pralle H., Hossfeld D.K., Queisser W. Loffler H.,Hocchaus A., Heinze B., *et al.* Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia : prolongation by hydroxyurea. *Blood*, 1993, 82 : 398-407.

233) Richman C.M., Slapak C.A., Toh B.. Interferon protects normal human granulocyte/macrophage colony-forming cells from Ara-C cytotoxicity. *J. Biol. Response Mol.*, 1990, 9 : 570-575.

234) Guihlot F., Dreyfus B., Brizard A., Huret J.L., Tanzer J.. Cytogenetic remission in chronic myelogenous leukemia using interferon alpha-2a and hydroxyurea with or without low-dose cytosine-arabioside. *Leuk. Lymphoma*, 1991, 4 : 49-55.

235) Guihlot F., Abgrall J.F., Harousseau J.L., Bauters F., Brice P., Dine G., Tilly H., Ifrah N., Cassasus P., Rochant H., *et al.* A multicentric randomized study of alpha 2b interferon (IFN) hydroxyurea (HU) with or without cytosine-arabioside (Ara-C) in previously untreated patients with Ph⁺ chronic myelocytic leukemia (CML) : preliminary cytogenetic results. *Leuk. Lymphoma*, 1993, 11 (1) : 181-183.

236) Guihlot F., Chastang C., Guerci A., Michallet M., Harousseau J.L., Maloisel F., Brière J., Bouabdallah R., Guyotat D., Tertian G., *et al.* Interferon alpha 2b and cytarabine (Ara-C) increase survival and cytogenetic response in chronic myeloid leukemia (CML). Results of a randomized trial. *Blood*, 1996, 88, S(1) : 141 a.

237) Arthur C.K., Ma D.D.F.. Combined interferon alfa-2a and cytosine arabioside as first-line treatment for chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.*, 1993, 89 S(1), 15-21.

238) Lee M.S., Kantarjian H., Talpaz M., Freireich E.J., Deisseroth A., Trujillo J.M., Stass S.. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in

- 246) Keating A.. Investigation of bcr-abl transcription by Ph-positive chronic myeloid leukemia progenitors. *Stem Cells*, 1993, 11 (suppl. 3) : 31-33.
- 247) Zhang J.G., Goldman J.M., Cross N.C.P.. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. *Br. J. of Haematol.*, 1995, 90 : 138-146.
- 248) Zhang J.G., Lin F., Chase A., Goldman J.M., Cross N.C.P.. Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 1996, 87 : 2588-2593.
- 249) Zhang J.G., Lin F., Goldman J.M., Cross N.C.P.. Detection of residual disease after BMT for CML by amplification of BCR-ABL breakpoints from genomic DNA : comparison with RT-PCR. *Br. J. of Haematol.*, 1995, 89 : S.
- 250) Evensen S.A., Brinch L., Tjonnfjord G., Stavem P., Wisloff F.. Estimated 8-year survival of more than 40 % in a population-based study of 79 adults patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. of Haematol.*, 1994, 88 : 88-93.
- 251) Vowels M.R., Lam-Po Tang R., Mameghan H., Ford D., Trickett A., White L., Marshall G., Brown R.. Bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukaemia after marrow relapse. *Med. J. Aust.*, 1990, 152 : 416-418.
- 252) Bacigalupo A., van Lint M.T., Frassoni F., Occhini D., Pittaluga P.A., Comelli A., Dini G., Massimo L., Marmont A.M.. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia in second remission. *Bone Marrow Transplant.*, 1986, 1 : 75-80.
- 253) Frassoni F., Labopin M., Gluckman E., Prentice H.G., Gahrton G., Mandelli F., Carella M., Herve P., Gratwohl A., Goldman J., *et al.* Are patients with acute leukaemia, alive and well 2 years post bone marrow transplantation cured ? A European survey.

Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia following interferon therapy. *Blood*, 1992, 79 : 1920-1923.

239) Mahon F.X., Daheron L., Malinge M.C., Ahmad M., Delfau .H., Grandchamp B., Kitzis A., Tanzer J., Guihlot F.. Polymerase chain reaction for detection of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission under interferon or without chemotherapy. *Leukemia*, 1992, 6 : 1232-1234.

240) Dhingra K., Kurzrock R., Kantarjian H.. Minimal residual disease in interferon-treated chronic myelogenous leukemia : results and pitfalls analysis based on polymerase chain reaction. *Leukemia*, 1992, 6 : 754-760.

241) Martiat P., Maisin D., Philippe M., Ferrant A., Michaux J.L., Cassiman J.J., van der Berghe H., Sokal G.. Detection of residual BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia patients in complete remission using the polymerase chain reaction and nested primers. *Br. J. of Haematol.*, 1990, 75 : 355-358.

242) Bartram C.R., Yokota S., Hansen-Hagge T.E., Janssen J.W.G.. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant.*, 1990, 6 (1) : 4-8.

243) Wandl U.B., Bützler R., Niederle N., Kloke O., Mengelkoch B., Becher R., Seeber S., Opalka B.. Bcr-abl-positive and -negative clonogenic cells in CML patients undergoing long-term interferon treatment. *Leukemia*, 1994, 8 : 776-779.

244) Guihlot F.. The role of interferon in the treatment of chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Nouv. rev. Fr. Hematol.*, 1994, 36 (suppl. 1) : 539-546.

245) Gaiger A., Henn T., Hörth E., Geissler K., Mitterbauer G., Maier-Dobersberger T., Greinix H., Mannhalter C., Haas O.A., Lechner K., Lion T.. Increase of BCR-ABL chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*, 1995, 86 : 2371-2378.

Acute leukemia working party of the european group for bone marrow transplantation (EBMT). *Leukemia*, 1994, 8 : 924-928.

254) Weisford D.J., Mc Glave P.B., Ramsay N.K., Miller W.J., Nesbit M.E.Jr, Woods W.G., Goldman A.I., Kim T.H., Kersey JH.. Allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia : comparative outcomes for adults and children. *Br. J. of Haematol.*, 1988, 69 : 351-358.

255) Oakhill A., Pamphilon D.H., Potter M.N., Steward C.G., Goodman S., Green A., Goulden P., Goulden N.J., Hale G., Waldmann H., Cornish J.M.. Unrelated donor bone marrow transplantation for children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia in second complete remission. *Br. J. of Haematol.*, 1996, 94 : 574-578.

256) Mangoni L., Degliantoni G., Porcellini A., Carella A.M. Alessandrino E.P., Aglietta M., Resegotti L., Torlontano G., Coleselli P., Mozzana R., *et al.* Autologous bone marrow transplantation in acute leukemia. *Acta Haematol.*, 1987, 78 : 190-193.

257) Chang J., Dexter T.M.. Long-term marrow cultures : in vitro purging of leukaemic cells. *Baillieres Clin. Haematol.*, 1991, 4 : 775-788.

258) Jackson G.H., Taylor P.R., Lennard A.L., Proctor S.J.. Autologous bone marrow transplantation in acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*, 1994, 8 : 161-168.

259) Mitterbauer G., Födinger M., Scherrer R., Knöbl P., Jager U., Laczika K., Schwarzingler I., Gaiger A., Geissler K., Greinix H., *et al.* PCR-monitoring of minimal residual leukaemia after conventional chemotherapy and bone marrow transplantation in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. of Haematol.*, 1995, 89 : 937-941.

260) Gehly G.B., Bryant E.M., Lee A.M., Kidd P.G., Thomas E.D.. Chimeric bcr-abl messenger RNA as a marker for minimal residual disease in patients transplanted for

Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1991, 78 : 458-465.

261) van Rhee F., Marks D.I., Lin F., Szydlo R.M., Hochhaus A., Treleaven J., Delord C., Cross N.C.P., Goldman J.M.. Quantification of residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia : comparison of blood and marrow. *Leukemia*, 1995, 9 : 329-335.

262) Lin F., Chase A., Bungey J., Goldman J.M., Cross N.C.P.. Correlation between the proportion of Philadelphia chromosome-positive metaphase cells and levels of BCR-ABL mRNA in chronic myeloid leukaemia. *Genes, Chrom. and Cancer*, 1995, 13 : 110-114.

263) Hochhaus A., Lin F., Reiter A., Skladny H., Mason P.J., van Rhee F., Shepherd P.C.A., Allan N.C., Hehlmann R., Goldman J.M., Cross N.C.P.. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*, 1996, 87 : 1549-1555.

264) Hochhaus A., Lin F., Reiter A., Skladny H., Hehlmann R., Goldman J.M., Cross N.C.P.. Quantitative molecular methods to monitor the response of CML patients to interferon- α . *Bone Marrow Transplant.*, 1996, 17 (3) : S41-S44.

265) Lin F., Goldman J.M., Cross N.C.P.. A comparison of the sensitivity of blood and bone marrow for the detection of residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Br. J. of haematol.*, 1994, 86 : 683-685.

266) Lion T., Izraeli S., Henn T., Gaiger A., Mor W., Gadner H.. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia by quantitative polymerase chain reaction. *Leukemia*, 1992, 6 : 495-499.

267) Lion T.. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia : methodological approaches and clinical aspects. *Leukemia*, 1996, 10 : 896-906.

ANNEXES

Philadelphia (PH1) Negative Chronic Myeloid Leukemia (CML): Good Correlation Between Molecular and In Situ hybridization (FISH) in 15 Cases

C. Preudhomme, V. Soenen, N. Henic, K. Azzouzi, J.L. Lai, F. Vasseur, F. Bauters, A. Cosson, P. Fenaux. *CHU Lille France*

CML is characterised by the presence of a PH1 chromosome in 95% of cases. At our institution, 563 karyotypes were performed between January 1981 and January 1996 for suspicion of CML (after excluding patients (pts) who fulfilled criteria for chronic myelomonocytic leukemia or who had extensive myelofibrosis). 15 pts (3%) had no PH1 chromosome: 14 pts had normal karyotype and one had a t (5;12) (q32;p12). b2a2, b3a2 (M-bcr) and e1a2 (m-bcr) fusion transcript were searched by RT-PCR performed on blood leukocytes. The ABL gene primer was localised on a3 exon. FISH analysis was performed in parallel on cytogenetic material using M-bcr and ABL cosmid probes (ONCOR). In pts with negative RT-PCR and/or FISH result, we performed Southern-blot analysis with BCR 1 and BCRu probes (ONCOR) that can be detect M-bcr rearrangement. 5/15 pts had positive results and we observed a complete correlation between the techniques used. All the positive pts had b2a2 or b3a2 transcript and no e1a2, b2a3, b3a3 transcript was detected. The 5 positive pts had normal karyotype. No significant differences between BCR+ and BCR- pts were observed for sex ratio, eosinophil or basophil count, platelet count, hb level and % of BM erythroblasts. A significant difference was observed for age median age 51, range (37-71) for BCR+ vs median age 69 (39-81) for BCR- cases, leukocytes median 103 giga/l range (91-308) for BCR+ vs median 40 giga/l range (19-360) for BCR- cases. 4/10 pts BCR- had platelet counts < 100 giga/l vs 0/5 BCR+. Finally 5/10 BCR- had dysmyelopoiesis vs 0/5 BCR+.

In conclusion: this study shown that Ph1 negative BCR + CML are very rare (< 2%). RT-PCR or FISH have similar sensitivity for the diagnosis of Ph1 negative CML, and confirm that BCR+ and BCR- pts have different clinical and biological characteristics.

Absence of BCR-ABL Rearrangement (with m-bcr Breakpoint) in Chronic Myelomonocytic Leukemia

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a clonal hematopoietic disorder with features of both myelodysplastic and myeloproliferative syndrome (1–3). Although N-RAS, C-FMS and P53 genes are found mutated in about 30, 10 and 5% of CMML cases, respectively, little is known of the genetic mechanisms leading to the development and progression of CMML. The Philadelphia chromosome (Ph) and BCR-ABL rearrangement in the major breakpoint cluster region (M-bcr), leading to $b_2 a_2$, or $b_3 a_2$ mRNA (by fusion between exons b_2 or b_3 on BCR gene and exon a_2 on ABL gene) and to P_{210} fusion protein (P_{210} BCR-ABL), which are characteristics of chronic myeloid leukemia (CML), are not found in CMML (4). In the Ph chromosome found in some acute lymphoblastic and less often myeloid leukemias (ALL and AML), the breakpoint in the BCR gene generally occurs in the minor breakpoint cluster region (m-bcr), resulting in $e_1 a_2$ mRNA (by fusion between exon 1 of BCR gene and exon a_2 of ABL gene), and in a P_{190} BCR-ABL fusion protein.

Very rare cases of Ph-positive CML with m-bcr rearrangement (P_{190} CML) have been reported, and they were recently reviewed by Melo *et al.* (5) who also added a new case. In all five reported cases, intermediate features between CMML and typical CML were seen: consistent and significant monocytosis, resembling CMML, but also basophilia, a high percentage of immature granulocytes, and low NAP score, more suggestive of CML. The authors also noted that all previously published cases of m-bcr Ph-positive AML had a monocytic comment. This suggested a possible link between P_{190} BCR-ABL and monocytic involvement in myeloid proliferations. Thus Melo *et al.* (5) raised the possibility that some cases of CMML (which is also a myelomonocytic proliferation) may have an m-bcr rearrangement.

We looked for both M-bcr rearrangement by PCR in 36 cases of CMML diagnosed according to FAB criteria. In those patients, median age was 73 years (range 64–82), median circulating WBC count was $16.3 \times 10^9/l$ (range 7–43), median circulating monocytes $3.6 \times 10^9/l$ (range 1.9–21), and monocytes accounted for 21 to 48% of the differential count. No basophilia was found in any patient. Circulating immature granulocytes were seen in 25 (70%) of the patients, their percentage never exceeding 10%. The NAP score was not determined in any case. Karyotype, performed in all patients, found no Ph chromosome. PCR analysis of M-bcr and m-bcr rearrangement was made on RNA obtained from circulating or marrow leukocytes, with the methods we used in a previous report (6). Briefly, the cDNA was obtained from RNA by MMLV reverse transcriptase. The cDNA was amplified between B_1 and A_1 primers, specific of b_2 and a_2 exons

respectively, for M-bcr rearrangements. Amplification between B_5 and A_1 primers, specific for e_1 and a_2 exons, respectively, was made for m-bcr rearrangements. In order to avoid false negative results, the following control reactions were performed in parallel: (i) amplification of cDNA for c-abl gene, using primers A_1 and A_3 (another primer on c-abl gene); (ii) amplification by B_1 and A_1 of K562 cell line, which carries an M-bcr rearrangement, and by B_5 and A_1 of a case of Ph-positive ALL with m-BCR rearrangement, obtained from our previous report (6). We took the same precautions as in this report to avoid contamination leading to false-positive results.

Neither M-bcr nor m-bcr rearrangement was seen in any of the 36 cases of CMML studied. The absence of M-bcr rearrangement in CMML confirms previous results (4). On the other hand, no study of m-bcr rearrangement had been performed until now in CMML, to our knowledge. The absence of m-bcr in our patients does not support the hypothesis made by Melo *et al.* (5) that some cases of CMML could correspond to Ph-negative m-bcr positive myeloproliferative disorders and could thus be Ph-negative counterparts of the rare patients these authors reported. On the other hand, more systematic analysis of m-bcr rearrangements in Ph-negative M-BCR-negative CML (4), and 'atypical' CML (7), which are often associated with monocytosis, would be justified and could perhaps help clarify the relationship of these myeloproliferative disorders with typical CML and with CMML.

Acknowledgements. Supported by the Centre Hospitalier Universitaire de Lille, France.

NATHALIE HENIC^{1,2},
CLAUDE PREUDHOMME^{1,2},
MICKAËL VANRUMBEKE^{1,2},
and PIERRE FENAUX^{2,3}

¹Laboratoire d'Hématologie A,
C.H.U. Lille,
²Inserm U₁₂₄,
Institut de Recherche sur le
Cancer, Lille, and
³Service des Maladies du
Sang, C.H.U. Lille, France

REFERENCES

1. Fenaux P, Jouet JP, Zandecki M, Lai JL, Simon M, Pollet JP, Bauters F. Chronic and subacute myelomonocytic leukemias in adults. Report on 60 cases. *Br J Haematol* 1987;65:101–106.
2. Fenaux P, Beuscart R, Jouet JP, Bauters F. Prognostic factors in adult chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1988; 6:1417–1424.
3. Michaux JL, Martiat P. Chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) – a myelodysplastic or myeloproliferative syndrome? *Leuk Lymphoma* 1993;9:35–41.
4. Martiat P, Michaux JL, Rodhain J. Philadelphia-negative (Ph⁻) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph⁺ CML and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1991;78:205–211.
5. Melo JV, Myint H, Galton DAG, Goldman JM. $P_{190}^{BCR-ABL}$ chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia* 1994;8:208–211.
6. Preudhomme C, Fenaux P, Lai JL, Lepelletier R, Sartiaux C, Colly-

Received February 21, 1994. Accepted June 1, 1994.
Correspondence to: Dr P. Fenaux, Service des Maladies du Sang, C.H.U. 1, Place de Verdun, 59037 Lille, France.

LEUKEMIA
© 1994 Macmillan Press Ltd

D'Hooghe M, Zandecki M, Cosson A, Jouet JP, Kerckaert JP. Philadelphia-negative, bcr-abl-positive adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) in 2 of 39 patients with combined cytogenetic and molecular analysis. *Leukemia* 1993;7:1054-1057.

7. Galton DAG. Haematological differences between chronic granulocytic leukaemia, atypical chronic myeloid leukaemia, and chronic myelomonocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1992; 7:343-350.

Reply to Henic *et al.*

We read with interest the letter from Henic *et al.* (1). We do not think there is any discrepancy in their data and ours (2). Conventionally chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) is always Philadelphia (Ph)-negative. Very rare cases of Ph-positive chronic myeloproliferative disorders have a P190^{BCR-ABL} gene, and we have shown that these cases have some features in common with CMML. Thus one would not expect to find evidence of Ph positivity or a BCR-ABL gene among 36 cases of CMML studied by Henic *et al.*, although one or more cases of Ph-positivity might be found among say 1000 CMML patients. Henic *et al.*'s data do nevertheless reinforce our suggestion that a P190^{BCR-ABL} type of rearrangement should be tested for, particularly in patients with atypical features intermediate between chronic myeloid leukaemia (CML) and classical CMML.

JUNIA V. MELO,
and JOHN M. GOLDMAN

*LRF Leukaemia Unit,
Department of Haematology,
Royal Postgraduate Medical
School, London, UK*

REFERENCES

1. Henic N, Preudhomme C, Vanrumbeke M, Fenaux P. Absence of BCR-ABL rearrangement (with m-bcr breakpoint) in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 1994;8:1795-1796.
2. Melo JV, Myint H, Galton DAG, Goldman JM. P190^{BCR-ABL} chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia* 1994;8:208-211.

Received March 6, 1994. Accepted June 1, 1994.

Correspondence to: Dr Junia V. Melo, Department of Haematology, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, Du Cane Rd, London W12 0NN, UK.

LEUKEMIA
© 1994 Macmillan Press Ltd

128 Recherche systématique des transcrits BCR-ABL et E2A-PBX1 chez 76 leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant inclus dans le protocole EORTC 58881

N.Henic¹, P.Cochaux², J.L.Lai¹, N.Balduck³, A.Ferster⁴, B.Nelken¹, E.Vamos⁴, M.Fournier¹, E.Van Assche³, T.Velu², C.Preudhomme¹. 1:CHU de Lille, 2:Hôpital Erasme (Bruxelles), 3:AZK (Bruxelles), 4:HUDERF (Bruxelles)

Les LAL avec t(9;22) et t(1;19) sont associées aux transcrits chimériques BCR-ABL et E2A-PBX1 et sont de très mauvais pronostic. Le dépistage de ces LAL est donc très important. C'est pourquoi, dans ce travail, nous avons comparé 2 méthodes de diagnostic : le caryotype et la biologie moléculaire.

Entre juillet 1992 et septembre 1994, 76 LAL du protocole EORTC 58881 ont été inclus dans cette étude. L'analyse immunophénotypique des blastes fut interprétable chez 71 pts. Un phénotype T a été retrouvé chez 12 pts (17%), B chez 58 pts (82%), nul chez 1 pt. L'analyse du caryotype sur moelle a donné les résultats suivants : 2 t(9;22), 3 t(1;19), 21 hyperdiploidies, 25 caryotypes normaux, 19 autres anomalies et 6 échecs. L'analyse moléculaire a été réalisée par technique de RT-PCR. L'ARN a été extrait des cellules médullaires et/ou sanguines. Après rétrotranscription effectuée à l'aide d'hexanucléotides, 4 réactions de PCR ont été réalisées en parallèle à l'aide d'oligo nucléotides spécifiques permettant l'amplification d'une part de l'ensemble des transcrits BCR-ABL (e1a2, b2a2 ou b3a3) caractérisant la t(9;22) et des transcrits E2A-PBX1 caractérisant le t(1;19) et d'autre part des transcrits normaux ABL servant de contrôle interne de rétrotranscription. Les lignées TOM1 (A.Hagemeyer), K562, IARC 318 (G.Lenoir) servant respectivement de contrôle positif d'amplification par les transcrits e1a2, b2a2, et E2A-PBX1. La lignée CEM a été utilisée comme contrôle négatif. Après 35 cycles de PCR, les produits d'amplification ont été déposés sur un gel d'agarose 2% coloré au BET. Un transcrit BCR-ABL (e1-a2) a été retrouvé uniquement chez les 2 pts avec t(9;22) et un transcrit E2A-PBX1 a été retrouvé 5 fois, incluant les 3 pts avec t(1;19) et 2 autres pts présentant soit un échec de caryotype, soit un caryotype normal.

En conclusion, en accord avec la littérature, nos résultats confirment que la fréquence des transcrits BCR-ABL (3%) et E2A-PBX1 (8%) est faible dans les LAL de l'enfant, mais qu'une recherche de ceux-ci doit être effectuée en particulier lorsqu'il existe un échec de caryotype ou un caryotype normal comme cela a été précédemment démontré dans les LAL de l'adulte.

CORRESPONDENCE

RNA for reverse PCR analysis can be obtained from bone marrow cells prepared for cytogenetic analysis and stored at -20°C for several years

Detection of chromosome translocations at the molecular level by PCR analysis in hematological malignancies generally cannot be made from DNA but requires RNA. It is generally considered that obtaining of good quality RNA for PCR analysis from frozen cells is only possible if cells have been directly frozen at -80°C or in liquid nitrogen. It is also possible to extract RNA from paraffin-embedded tissues.¹ In our experience, however, RNA can be obtained from cells prepared for cytogenetic analysis and frozen in a fixative solution -20°C , for several years.

Bone marrow samples were collected for cytogenetic analysis at diagnosis in three cases of Philadelphia (Ph)-positive acute lymphoblastic leukemia (BCR+ ALL) in 1982, 1983 and 1989, respectively, and two cases of Ph-positive chronic myeloid leukemia (BCR+ CML) in 1985 and 1987. One milliliter of bone marrow (containing approximately 10 million cells) was cultured for 24 h in RPMI with 20% fetal calf serum, then treated by colchicin (to a final concentration of 0.09 g/ml) for 1 h, followed by treatment with a hypotonic solution (0.3% KCl, 0.5% Natrium-citrate; pre-warmed at 37°C) for 20 min, and cells were finally kept in a freshly prepared fixative solution (methanol:acetic acid 3:1) at -20°C .

For RNA extraction, frozen fixed cells were washed twice in a solution of 1% PBS (0.13 M NaCl; 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.87 mM KH_2PO_4 ; 2.68 mM KCl) followed by centrifugation at 15 000 r.p.m. for 20 min at 4°C . Total RNA extraction was made using RNA QUICK II solution (Bioprobe Systems, Montreuil, France) according to Chomczynski and Sacchi.² Total RNA was then resuspended in 12 μl of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water; 10 μl were electrophoresed on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide, and compared with a control total RNA extracted from fresh bone marrow cells by the same method of total RNA extraction (Figure 1).

Ph chromosome leads to BCR-ABL fusion gene. Two different breakpoint cluster regions (bcr) in the BCR gene are found: major bcr (M-bcr) principally observed in CML but also in some ALL, and minor bcr (m-bcr), characteristic of ALL. In the former, either of exons b2 or b3 of BCR is coupled to ABL exon 2 (b3-a2 or b2-a2 junction), whereas in the latter, the first exon of the BCR gene is spliced to the second exon of the ABL gene (e1-a2 junction).³ In this work, the retrotranscription was done with ABL-RT primer, specific to exon 2 of ABL (Figure 2). Two microliters total RNA resuspended in DEPC-treated water were mixed with 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 40 mM KCl, 6 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 2.4 mM dNTP, 15 pmol of ABL-RT primer in a final volume of 10 μl . After 5 min at 70°C , 200 units MMLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) was added and the mixture incubated for 1 h at 37°C . For PCR amplification, 1 μl cDNA was

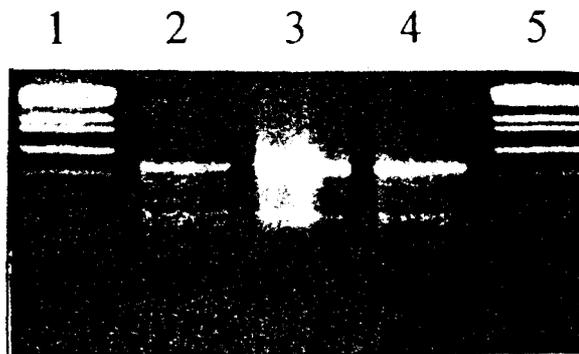


Figure 1 Verification of RNA quality. Lanes 1 and 5, ladder; lane 2, RNA extracted from a BCR+ ALL sample collected in 1982; lane 3, RNA extracted from a CML sample collected in 1985; lane 4, control RNA extracted from fresh bone marrow cells pellets. RNA extractions were made by RNA QUICK II.

diluted in a final solution containing 15 pmol of each primer, 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.25 units Taq polymerase (Appligene, Illkirch, France). Each reaction was then overlaid with 15 μl of mineral oil. Three reactions were carried out in parallel; one with primers A1, A3, A4, one with primers A1 and B1 (M-bcr region) and one with primers A1 and B5 (m-bcr region) (Figure 2). Amplification was performed in an automated thermocycler (PHC2, Techne, Princeton, NJ, USA). After denaturation at 94°C (10 min), 35 cycles of 94°C denaturation step (1 min), 72°C annealing/elongation step (3 min), followed by a final elongation at 72°C (10 min) were performed. After amplification, 7 μl aliquots of the reaction product were run on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. With primers A1, A3, A4, two bands of 251 bp (A1-A4) and 235 bp (A1-A3) could be observed; with primers A1-B1, two bands of 392 bp and 317 bp, corresponding to b3a2 or b2a2 transcripts respectively, could be observed; with primers A1-B5, one band of 156 bp was observed, corresponding to e1-a2 transcripts.³

As seen in Figure 1, the total RNA electrophoretic pattern of the five cases studied was identical to the one obtained in the control. The expected BCR-ABL mRNA could be amplified by RT-PCR in the five cases of BCR+ ALL and CML, but results were negative when 1 μl of 1 mg/ml RNase was added (15 min at 37°C) just before the retrotranscription step and when the retrotranscription step was omitted, demonstrating that only the RNA was amplified (figure 3). The size of the BCR-ABL fragment amplified was in agreement with the expected size deduced from mRNA sequences.

Fixation of living cells, usually with chemical agents, is made to preserve their structural and/or chemical components for subsequent study. Alcohol and acetic acid are the two components of Carnoy's fluid (where they are combined in a 3:1 proportion) which is one of the most reliable and widely used fixatives for the preservation of chromosomes.⁴ For the study of chromosome morphology, the use of acidic fixatives

Correspondence: Dr C Preudhomme, Laboratoire d'Hématologie A, Hôpital A Calmette, Boulevard du Professeur Leclercq 59037 Lille Cédex, France

Received 5 December 1994; accepted 18 April 1995

ABL-RT 5' AACGAAAAGGTTGGGGTC
 A1 5' TCACTGGGTCCAGCGAGAAGGTTTTGGTTGGAGTT
 A3 5' CGAGCCGGGCCTGAGCCGGGCCCGGACCGA
 A4 5' TTTATGGGGCAGCAGCCTGGAAAAGTACTTGGG
 B1 5' AGCATGGCCTTCAGGGTGCACCAGCCGCAACGGCAA
 B5 5' CAAGACCGGGAGATCCCCTGGGGCCCAAC

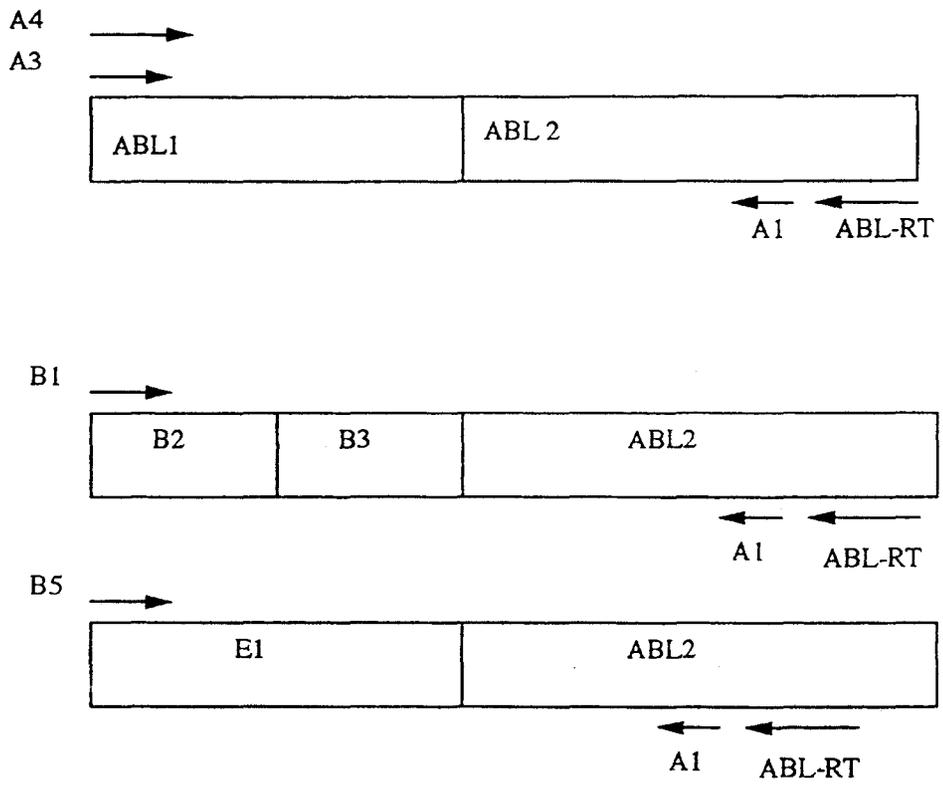


Figure 2 Sequence and localization of the primers used

is important because they maintain the chromosomes in a highly precipitated form, suitable for staining and microscopic study, but they do not necessarily preserve the chemical organization of the cell. Alcohols denature proteins and dissolve many organic molecules. Acetic acid precipitates nucleoproteins and dissolves most of the cytoplasmic proteins. In general, acetic acid fixes those proteins, where the pI is near the pH of the acid. The bound water of the protein disappears leading to loss of electric charge and precipitation of nucleoproteins that render them insoluble, whereas highly hydrated structures such as nucleic acids may not be degraded.⁵

These reasons may explain why it is possible to amplify by RT-PCR total RNA extracted from cell suspensions treated for cytogenetic analysis and kept for several years in a fixative solution (methanol:acetic acid 3:1) at -20°C. As many cytogenetic laboratories have generally kept such frozen suspensions from their patients, this should allow the retrospective analysis of different chromosome translocations by RT-PCR.

Figure 3 Amplification of cDNA for BCR-ABL chimeric messenger. (a) Amplification of cDNA using primers A1, A3, A4. M, ladder; lanes 1, 2, H₂O control; lanes 3, 4, 5, RNA extracted from a CML sample collected in 1985; lanes 6, 7, 8, RNA extracted from a BCR+ ALL sample collected in 1982. RNA extractions were made by RNA QUICK II. Lanes 2, 4, 7, suppression of the retrotranscription step; lanes 5, 8, 1 µl of RNase (1 µg/µl) was added just before the retrotranscription step. (b) Amplification of cDNA using primers A1-B5. M, ladder; lanes 1, 2, H₂O control, lanes 3, 4, 5, RNA extracted from a CML sample collected in 1985; lanes 6, 7, 8, RNA extracted from a BCR+ ALL sample collected in 1982. RNA extractions were made by RNA QUICK II. Lanes 2, 4, 7, suppression of the retrotranscription step; lanes 5, 8, 1 µl of RNase (1 µg/µl) was added just before the retrotranscription step. (c) Amplification of cDNA using primers A1-B1. M, ladder; lanes 1, 2, H₂O control; lanes 3, 4, 5, RNA extracted from a CML sample collected in 1985; lanes 6, 7, 8, RNA extracted from a BCR+ ALL sample collected in 1982. RNA extractions were made by RNA QUICK II. Lanes 2, 4, 7, suppression of the retrotranscription step; lanes 5, 8, 1 µl of RNase (1 µg/µl) was added just before the retrotranscription step

Acknowledgements

This work was supported by CHU of Lille, France.

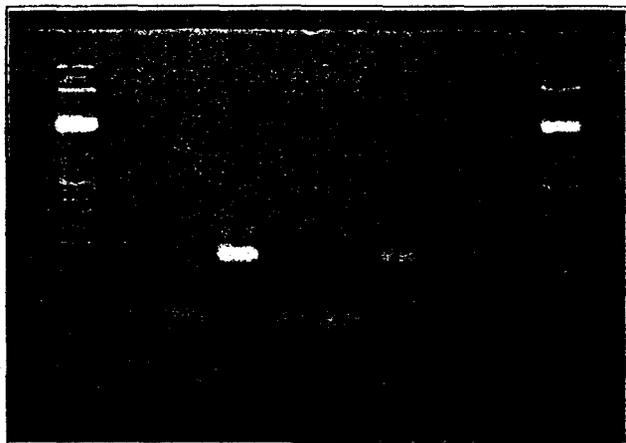
N HENIC^{1,4},
P FENAUX^{1,4},
J-L LAI² and
C PREUDHOMME^{1,4}

¹Laboratoire d'Hématologie A;
²Service de Cytogénétique;
³Service des Maladies du Sang,
CHU Lille; ⁴Inserm 124, Institut
de Recherche sur le Cancer de
Lille, France

References

- 1 Mies C. A simple, rapid method for isolating RNA from paraffin-embedded tissues for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 811–813.
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156–159.
- 3 Preudhomme C *et al.* Philadelphia negative, BCR-ABL positive adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) in 2 of 39 patients with combined cytogenetic and molecular analysis. *Leukemia* 1993; **7**: 1054–1057.
- 4 Wilson GB, Morrison JH. Survey of cytological techniques. In: *Cytology, Books in Biological Sciences*, 2nd edn. Reinhold: New York, 1966, pp 232–290.
- 5 Brown WV, Berthe EM. Cytological techniques. In: *Text Book of Cytology*. Mosby: St Louis, 1969, pp 15–35.

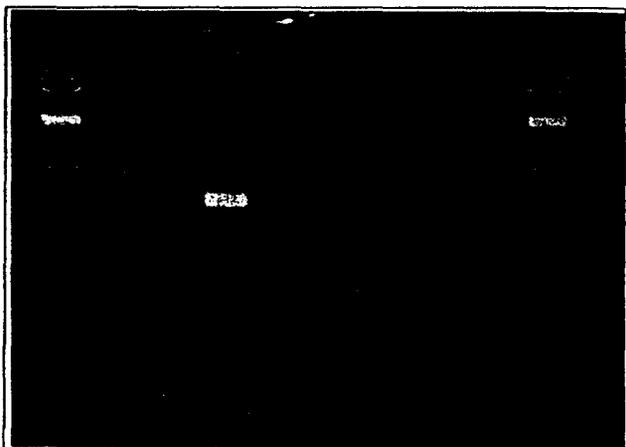
a M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



b M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



c M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



Good Predictive Value of Combined Cytogenetic and Molecular Follow Up in Chronic Myelogenous Leukemia After Non T-Cell Depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation: A Report on 38 Consecutive Cases

CLAUDE PREUDHOMME,^{1,2} ERIC WATTEL,^{2,3} JEAN-LUC LAI,⁴ NATHALIE HENIC,^{1,2} LAURENCE MEYER,¹ MARIE-PIERRE NOEL,³ ALAIN COSSON,¹ JEAN-PIERRE JOUET³ and PIERRE FENAUX^{2,3}

¹Laboratoire d'Hématologie A, CHU Lille, ²Inserm U124, Institut de Recherche sur le Cancer, Lille, ³Service des Maladies du Sang, and ⁴Service de Cytogénétique, CHU Lille

(Received August 28, 1994)

We prospectively performed repeated cytogenetic and PCR monitoring of residual disease in all cases Ph positive of chronic myeloid leukemia (CML) allografted with non T cell depleted marrow at our institution over a period of 8 years. Thirty eight patients who survived the immediate post transplant period could be analyzed (median of 3 cytogenetic analyses/patient, examining 100 mitoses, and 4 PCR analyses/patient). Seven of the 38 patients had a hematological relapse (which was extramedullary in one case) and one a purely cytogenetic relapse, possibly stabilised by interferon treatment. Within 6 months of transplant, Ph positive mitoses were seen in 2 patients, and positive PCR in most cases, without implying subsequent relapse. Six of the 32 patients analyzed cytogenetically more than 6 months post transplant had Ph positive mitoses on at least one occasion: 5 had a hematological relapse within 7 months of positive cytogenetic analysis, and the remaining patient, treated by interferon remained in purely cytogenetic relapse. (The extramedullary relapse was not preceded by a positive marrow karyotype).

Eight of the 38 patients had positive PCR findings on at least one occasion more than 6 months post transplant. Seven relapsed (6 hematological relapses including the extramedullary relapse, and 1 cytogenetic relapse) after 3 to 20 months, but the remaining patient remained in CR 36 months later, with negative PCR. The 30 patients who never had positive PCR findings remained in CR. In this relatively large series of patients, we found a good correlation between PCR findings more than 6 months post transplant and remission or relapse status. Cytogenetic follow up was useful in the presence of positive PCR results, as positive cytogenetic findings in this situation indicated imminent hematological relapse, justifying rapid therapeutic intervention in order to prevent it.

Key Words: Predictive Value Cytogenetics Molecular follow up
Bone marrow transplantation Chronic myelogenous leukemia

Chronic myelogenous leukemia (CML) is characterized, in more than 95% of the cases, by translocation t(9;22) (Philadelphia (Ph) chromosome) between the

ABL protooncogene on chromosome 9 and the BCR gene on chromosome 22¹. Ph positive CML expresses a BCR-ABL chimeric mRNA in which either the exon 2 (b₂a₂ junction) or the exon 3 (b₃a₂ junction) of the major breakpoint cluster region of the BCR gene are spliced to exon 2 of the ABL gene. Amplification of the chimeric BCR-ABL m-RNA by the polymerase chain reaction (PCR) is

Address for correspondence: Dr. C. PREUDHOMME, Laboratoire d'Hématologie, CHU, Hôpital Calmette, Bd Leclercq, 59045 Lille, France. Supported by the Centre Hospitalier Universitaire of Lille, France

a very sensitive technique for the detection of minimal residual disease after treatment in CML, which can detect 1 abnormal cell in 10^4 to 10^6 cells.²⁻⁸

Although treatment with alpha interferon may prolong survival in CML, allogeneic bone marrow transplantation is the only known curative treatment of Ph positive CML.⁹ In many cases, the mechanism of cure after allogeneic BMT is not only disease eradication associated with the bone marrow ablative conditioning regimen, but also a more-progressive antileukemic effect of the donor marrow (graft versus host leukemia) which probably explains why residual disease can be detected by PCR in most CML patients during the first 6 to 9 months following BMT without producing subsequent relapse.²⁻⁹ Later PCR positivity is associated with a higher risk of relapse but, because in several series a variable number of PCR positive cases have enjoyed prolonged remissions, the test is often considered to have little predictability in individual patients.²⁻⁹ Cytogenetic analysis, on the other hand, is considered to have relatively limited interest in the monitoring of residual disease in CML, because it only has a 1 to 3% sensitivity for the detection of Ph chromosome.⁹

We report here our experience with repeated cytogenetic and PCR analysis after allogeneic BMT in 38 CML patients, showing the practical importance of these examinations in the follow up of CML.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Between September 1985 and February 1993, 52 patients consecutively allografted for Ph positive CML at our center were prospectively studied after transplant. Fourteen of them could not be analyzed because of early death (13 cases), and follow up in another city (1 case). The remaining thirty eight cases were serially analyzed by cytogenetics and PCR analysis of the BCR-ABL transcript. Thirty two of them were transplanted in first chronic phase, 1 in second chronic phase, 2 in accelerated phase, and 3 in blast crisis. Median age was 37 (range: 17 to 51), and M/F was 1.5. The conditioning regimen was total body irradiation (TBI) + cyclophosphamide (Cy) in 28 patients, and Busulfan (Bu) + Cy in 10 patients. The donor was an HLA identical MLC negative familial sibling in 32 cases, and an HLA identical MLC negative unrelated donor in 6 cases (Table 1). No T cell depletion of transplants was performed. Graft versus host disease (GVHD) prophylaxis was made by cyclosporin A and methotrexate. Early PCR results of the first patients tested have previously been published.⁶

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis was performed on bone marrow cells at diagnosis and during evolution, after a 24h *in vitro* cul-

ture without stimulation. Chromosomes were identified by RHG and GTG banding. At least 100 mitoses were analyzed before concluding to the absence of Ph chromosome.

PCR analysis

PCR analysis was performed on RNA generally obtained from circulating leukocytes, and rarely from marrow samples.

cDNA preparation.

RNA was extracted using the guanidine cesium chloride gradient technique. The cDNA was obtained by MMLV reverse transcriptase. 1 μ g total RNA was mixed with 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol (DTT), 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 2.5 mM each dNTP, 15 pmol of the primer ABL-RT in a final volume of 10 μ l. After 5 min at 70°C, 200 units MMLV reverse transcriptase (Gibco, BRL) was added and the mixture incubated 1 h at 37°C.

PCR amplification

The names, nucleotide sequences, and position of the primers used in this work are listed in Figure 1¹⁰. For the first PCR step, 1 μ l cDNA was diluted in a 10 μ l final solution containing 15 pmol of each primer, 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.25 units Taq polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Each reaction mixture was then overlaid with 15 μ l of mineral oil. Two reactions were carried out in parallel. One with Primers A1, A3, A4 (this reaction served as amplification control), and one with primers A1 and B1. Amplification were performed in an automated thermocycler (Techne PHC2, Cambridge UK). After denaturation at 94°C (7 min), 34 cycles of 94°C denaturation step (1 min), 72°C annealing elongation step (3 min), followed by a final elongation at 72°C for 7 min were performed.

After amplification, 7 μ l aliquots of the reaction product were run on a 2% agarose gel in Tris/borate/EDTA (TBE) buffer. Gels were stained with ethidium bromide and photographed. With primers A1-A3-A4, two bands can be observed, at 251 bp (A1-A4) or 235 bp (A1-A3). With primers A1-B1, two bands can be observed, at 392 bp or 317 bp, corresponding to b3a2 or b2a2 transcripts respectively; in this reaction, the positive control RNA was a dilution of 0.01 μ g total RNA from K562 cell line in 10 μ g of total RNA from CEM cell line. When no bands were observed after the first step of PCR with A1 and B1 primers, a second PCR step was performed with A2 and B2 primers. An aliquot (0.1 μ l) of the first step PCR product was mixed in a final volume of 10 μ l with 20mM Tris HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each

Table 1 Clinical status of patients

Patients	Age (years)	Sex	Disease stage	Time from diagnosis to BMT (months)	Regimen (TBI or Busulphan)	Risk	Donor (unrelated or familial)	GVHD acute	GVHD chronic	Relapse
1	36	F	C*	180	TBI	L	F	Y	Y	N
2	42	F	C	18	TBI	L	U	Y	Y	N
3	39	F	C	15	TBI	H	U	N	N	N
4	23	M	C	37	TBI	L	F	N	Y	Y
5	47	M	C	9	Bu	L	U	N	N	N
6	44	M	C	7	TBI	H	F	Y	N	N
7	40	F	C	72	TBI	L	U	Y	Y	N
8	39	M	C	24	TBI	L	F	N	N	Y
9	17	M	C	5	TBI	I	F	Y	Y	N
10	20	M	C	14	TBI	L	F	N	N	N
11	20	M	C	11	Bu	I	F	N	Y	N
12	43	M	C	20	Bu	L	F	N	Y	N
13	23	M	C	10	TBI	H	F	N	Y	N
14	27	M	AP	11	TBI	I	F	N	N	Y
15	38	M	AP	6	TBI	L	F	N	N	N
16	39	M	ACC	15	TBI	L	F	Y	Y	N
17	42	M	C	10	TBI	L	F	Y	Y	N
18	44	F	C	13	TBI	L	U	Y	Y	N
19	41	M	C	8	TBI	L	F	N	N	N
20	41	M	C	44	Bu	L	F	N	Y	N
21	40	F	C	24	TBI	L	F	Y	Y	N
22	27	F	C	11	TBI	L	F	Y	Y	N
23	38	M	C	15	TBI	L	F	Y	Y	N
24	43	F	C	19	TBI	L	F	Y	Y	N
25	27	M	ACC	9	Bu	L	F	N	Y	Y
26	21	M	C	22	TBI	L	F	N	N	Y
27	28	F	C	20	TBI	I	F	Y	Y	N
28	33	F	C	10	TBI	H	F	Y	Y	N
29	43	M	C	28	TBI	L	F	N	N	N
30	35	M	C	6	Bu	I	F	N	N	Y
31	36	F	C	18	TBI	L	U	N	Y	N
32	26	M	C	22	Bu	L	F	N	Y	N
33	47	M	C	36	TBI	I	F	N	N	N
34	19	M	C	23	Bu	L	F	Y	Y	N
35	35	F	AP	30	TBI	I	F	Y	Y	Y
36	37	F	C	23	Bu	L	F	Y	Y	N
37	51	F	C	19	Bu	L	F	N	N	N
38	36	F	C	14	TBI	L	F	Y	Y	N

abbreviations: C: chronic phase (*C: second chronic phase); AP: acute phase; ACC: acceleration phase; Risk: according to Sokal's score (Blood, 1985, 66, 1352); L: low; I: intermediate; H: high; Y: yes; N: no; t: cytogenetic relapse (otherwise, hematological relapse).

dNTP, 15 pMol of each primer A2 and B2 and 0.25 unit of the same Taq polymerase. Parameters used for denaturation, annealing and elongation were identical to those of the first step. In this second step, the positive control was a dilution of 0.001 µg RNA from K562 in 10 µg of total RNA from CEM.

In our hands, this PCR technique could detect 1 abnormal K562 cell in 10⁴ CEM cells after one round, and 1 in 10⁶ after two rounds. In order to minimize contamination problems, the following precautions were taken: (1) the PCR experiment was kept in a separate room from the laboratory where RNA preparation was performed and where the PCR products were analyzed; (2) all reagents used in the PCR were prepared, aliquoted, and stored in an area that was free of PCR-amplified products; (3) pipet tips with filter paper were used; (4) two negative controls, one

with no RNA and one with RNA obtained from CEM cell line were assayed.

RESULTS

Hematological and cytogenetic follow up

Follow up after transplantation ranged from 6 to 98 months (median 56). Acute and chronic GVHD were observed in 18 and 25 patients, respectively. Six patients had a hematological relapse, after 9, 15, 20, 27, 28 and 56 months, respectively and one (n°26) had a cytogenetic relapse after 69 months. Three of the relapsing patients (n°14, 30, 35) rapidly died, two patients (n°4 and 26) received alpha interferon, and two patients (n°8 and 25) have just received leukocyte infusions from their donor.

During follow up, cytogenetic analysis was done in 37

Abi RT 5'- AACGAAAAGGTTGGGGTC-3'
A 1 5'- TCACTGGGTCCAGCGAGAAGGTTTTTCCTTGGAGTT-3'
A 2 5'- CTCAGACCCTGAGGCTCAAAGTCAGATGCTA-3'
A 3 5'- CGAGCCGGGCCTGAGCCGGGCCCGGACCGA-3'
A 4 5'- TTTATGGGGCAGCAGCCTGGAAAAGTACTTGGG-3'
B 1 5'- AGCATGGCCTTCAGGGTGCACAGCCGCAACGGCAA-3'
B 2 5'- GTTCCTGATCTCCTCTGACTATGAGCGTGCA-3'

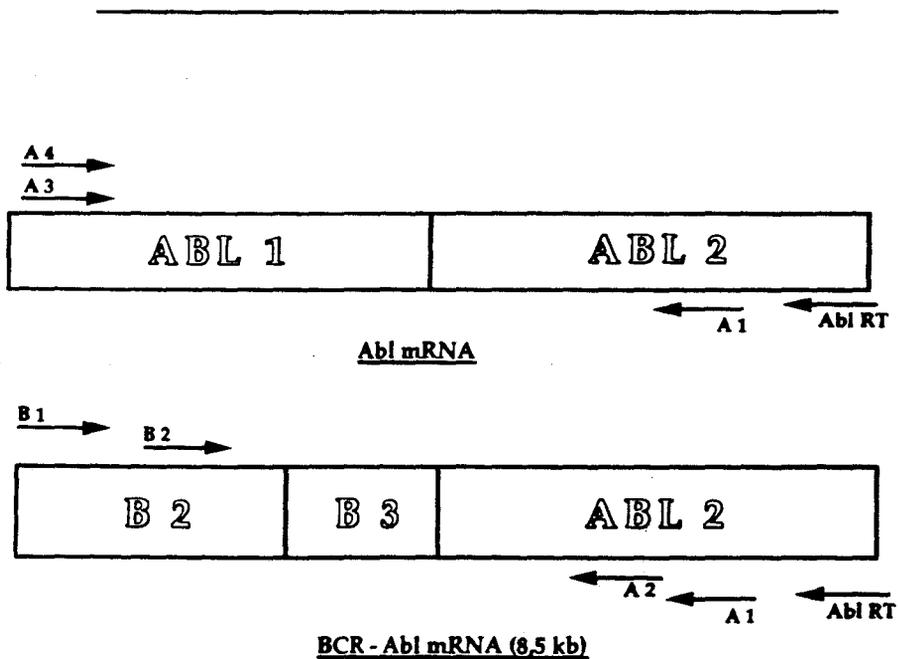


Figure 1 Primers used for PCR analysis of BCR-ABL rearrangement.

patients (median 3 analyses/patient). Twenty three of the 25 patients examined within 6 months of transplantation had a normal karyotype. In the 2 remaining cases, 1/130 (patient n°28) and 5/40 (patient n°26) Ph positive mitoses were seen. The karyotype was subsequently found to be normal in those 2 patients, but patient n°26 eventually had a cytogenetic relapse. A positive cytogenetic analysis was found in 6 of 32 patients analyzed more than 6 months post transplant. Five of them had a hematological relapse, 1, 1, 1, 6, and 7 months, respectively, after cytogenetic relapse whereas patient n°26 was still in hematological remission 12 months after the positive analysis, but after having been

treated with alpha interferon since the diagnosis of cytogenetic relapse. Bone marrow karyotype was normal 1 month before relapse in the remaining patient who had a hematological relapse (patient n°35), but in this patient, the relapse was extramedullary, as previously published.¹¹

PCR analysis

PCR analysis was performed on 2 to 7 occasions (median 4) in the 38 patients. Ten of the 14 patients analyzed within 6 months of transplant were positive on at least one occasion. Four of the 10 positive cases subsequently had a

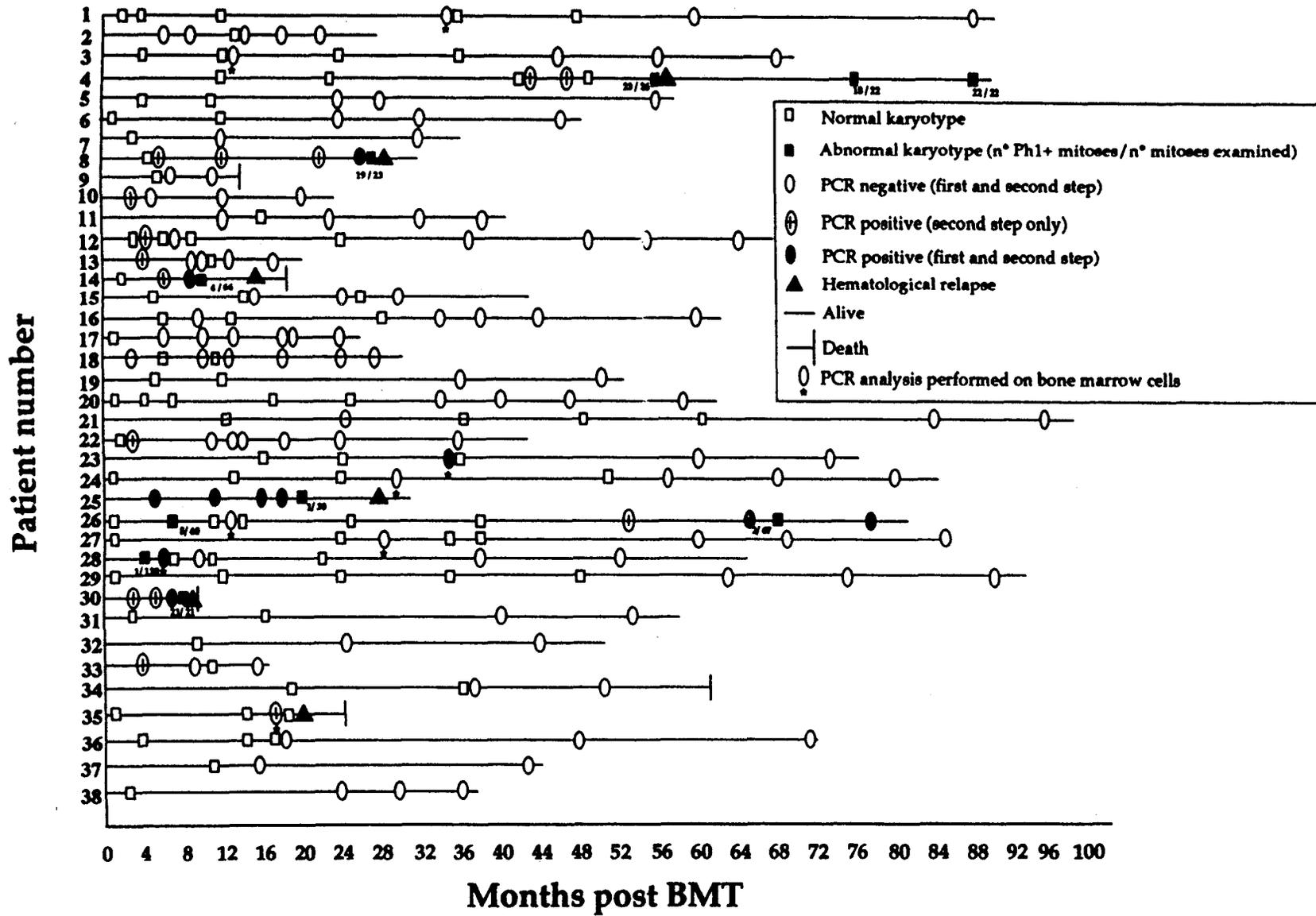


Figure 2 Clinical, cytogenetic and PCR follow up of the 38 patients allografted for CML.

hematological relapse but six remained in hematological and cytogenetic remission. Beyond the first 6 months of the post transplant period, 30 of the 38 patients always had PCR negative results (median 3 analyses/patient) and none of them relapsed. A positive PCR result on at least one occasion was seen in 8 patients, of whom 7 had a subsequent hematological (patients n°4, 8, 14, 25, 30, 35) or cytogenetic patient (n°26) relapse, 3 to 20 months after the first positive PCR. The last patient (n°23) had positive PCR findings with normal karyotype 35 months after transplant, but subsequently had negative PCR findings, and did not relapse. The positive sample, in this patient, was among the few marrow samples we analyzed by PCR (Figure 2).

No concomitant Ph positivity-PCR negativity was observed. Ph negativity PCR positivity was often observed in the early post transplant period, but was seen after 6 months in 3 cases only, including patient n°4 whose karyotype became positive 13 months later, just before hematological relapse patient n°23, who subsequently had negative PCR findings, and patient n°35 who had a rapid extra medullary relapse.

DISCUSSION

As in previous reports, we found that, in most allografted CML patients, PCR analysis was generally positive in the 6 months post transplant and that this was not an indicator of subsequent relapse if PCR results subsequently became negative.²⁻⁸ The prognostic value of positive PCR results more than 6 to 9 months after non T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation ("late" positive PCR) in CML remains more controversial. In some series, although a statistical correlation between late positive PCR and subsequent relapse was seen, positive findings in a given patient were not always associated with subsequent relapse.^{2,3,5,8} In other studies, persistent late positive PCR (on at least two examinations) was generally associated with rapid relapse, but positive PCR seen on only one occasion was compatible with prolonged remission.^{4,7} In our series, one of the largest published so far, PCR was found to be positive more than 6 months after transplant in 8 patients, and 7 of them had a hematological (6 cases) or cytogenetic (1 case) relapse, within 3 to 20 months of the positive PCR analysis. The remaining patient with a late positive PCR did not experience relapse with a follow up greater than 3 years. With this exception, a very good correlation between late positive PCR and subsequent relapse was seen.

One could argue that the better correlation we observed between late positive PCR findings and relapse by com-

parison with some earlier studies was due to the fact that we generally performed PCR analyses on peripheral blood samples instead of bone marrow. For example, in CML patients treated with interferon, Opalka *et al.*¹² noted a more rapid disappearance of abnormal bands (by Southern blot analysis) in the peripheral blood than in the bone marrow. A better sensitivity of marrow examination for the detection of residual disease was also suggested in B cell lymphoma¹³ and Ph negative ALL.¹⁴ However, concordant blood and marrow PCR results have been obtained recently in CML by Lin *et al* in a large series of patients.¹⁵

Our findings also suggest the interest of combining cytogenetic analysis of a large number of mitoses (a technique with relatively low sensitivity) to PCR (a highly sensitive technique) in the follow up of CML after transplant. Positive late cytogenetic findings, even in a minority of mitoses, were always associated with a rapid hematological relapse, (except in the patient who was immediately treated with interferon). On the other hand, late positive PCR associated with negative cytogenetic findings (in 100 mitoses examined) were not immediately followed by hematological relapse (at least in the bone marrow), allowing for close molecular and cytogenetic monitoring before taking any therapeutic decision. Indeed, treatments aimed at eradicating minimal residual disease in CML, including donor leukocyte transfusions and possibly interferon, may in fact be more efficient before the onset of hematological relapse.^{9,16} However, they are not without risks, and should not be administered in the absence of a high probability of relapse. Competitive PCR may also prove useful¹⁷ for making a treatment decision and, like other groups, we are currently developing this technique in our laboratory.

Acknowledgements The authors are indebted to Vincent Mouroux et Anne Deleplanque for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Kurzrock, R., Gutterman, J. and Talpaz M. (1988) The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl J. Med.*, **319**, 990-998.
2. Hughes, T. P., Morgan, G. J., Martiat, P. and Goldman, J. M. (1991) Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia: Role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood*, **77**, 874-878.
3. Miyamura, K., Tahara, T., Tanimoto, M., Morishita, Y., Kawashima, K., Morishima, Y., Saito, H., Tsuzuki, S., Takeyama, K., Kodera, Y., Matsuyama, K., Hirabayashi, N., Yamada, H., Naito, K., Imai, K., Sakamaki, H., Asai, O. and Mizutani, S. (1993) Long persistent bcr-abl positive transcript detected by polymerase chain reaction after marrow transplant for chronic myelogenous leukemia without clinical relapse: a study of 64 patients. *Blood*, **81**, 1089-1093.
4. Guerrasio, A., Martinelli, G., Saglio, G., Rosso, C., Zaccaria, A., Rosti, G., Testoni, N., Ambrosetti, A., Izzi, T., Sessarego, M.,

- Frasconi, F., Gasparini, P., Chiamenti, A., Di Bartolomeo, P. and Pignatti, P. F. (1992) Minimal residual disease status in transplanted chronic myelogenous leukemia patients: low incidence of polymerase chain reaction positive cases among 48 long disease-free subjects who received unmanipulated allogeneic bone marrow transplants. *Leukemia*, **6**, 507-512.
5. Cross, N. C. P., Hughes, T. P., Feng, L., O'Shea, P., Bungey, J., Marks, D. I., Ferrant, A., Martiat, P. and Goldman, J. M. (1993) Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlation with acute graft-versus-host disease and relapse. *B. J. Haematol.*, **84**, 67-74.
 6. Delfau, M. H., Kerckaert, J. P., Collyn d'Hooghe, M., Fenaux, P., Lai, J. L., Jouet, J. P. and Grandchamp, B. (1990) Detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia*, **4**, 1-5.
 7. Roth, M. S., Antin, J. H., Ash, R., Terry, V. H., Gotlieb, M., Silver, S. M. and Ginsburg, D. (1992) Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by the polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **79**, 276-282.
 8. Gaiger, A., Lion, T., Kalhs, P., Mitterbauer, G., Henn, T., Haas, O., Fodinger, M., Kier, P., Forstinger, C., Quehenberger, P., Hinterberger, W., Jager, U., Linkesch, W., Mannhalter, C. and Lechner K. (1993) Frequent detection of BCR-ABL specific mRNA in patients with chronic myeloid leukemia (CML) following allogeneic and syngeneic bone marrow transplantation (BMT). *Leukemia*, **7**, 1766-1772.
 9. Kantarjian, H. M., Deisseroth, A., Kurzrock, R., Estrov, Z. and Talpaz, M. (1993) Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*, **82**, 691-703.
 10. Preudhomme, C., Fenaux, P., Lai, J. L., Lepelley, R., Sartiaux, C., Collyn-d'Hooghe, M., Zandecki, M., Cosson, A., Jouet, J. P. and Kerckaert, J. P. (1993) Philadelphia negative, bcr-abl positive adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) in 2 of 39 patients with combined cytogenetic and molecular analysis. *Leukemia*, **7**, 1054-1057.
 11. Millot, F., Facon, T., Kerckaert, J. P., Fenaux, P., Lai, J. L., Parent, M., Bauters, F. and Jouet J. P. (1991) Unusual recurrence of chronic myelogenous leukemia following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, **7**, 393.
 12. Opalka, B., Wandl, U. B., Becher, R., Klobe, O., Nagel-Hiemke, M., Moritz, T., Beer, U., Seeber, S. and Niederle, N. (1991) Minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia undergoing long-term treatment with recombinant Interferon α -2b alone or in combination with Interferon γ . *Blood*, **78**, 2188-2193.
 13. Gribben, J. G., Neuberg, D., Barber, M., Moore, J., Pesek, K. W., Freedman, A. S. and Nadler, L. M. (1994) Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood in significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow. *Blood*, **83**, 3800-3807.
 14. Yokota, C., Hansen-Hagge, T. E., Ludwig, W. D., Reiter, A., Raghavachar, A., Kleihauer, E., Bartram, C. R. (1991) Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood*, **77**, 331-339.
 15. Lin, F., Goldman, J. M., Cross, N. C. P. (1994) A comparison of the sensitivity of blood and bone marrow for the detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *B. J. Haematol.*, **86**, 683-685.
 16. Van Rhee, F., Lin, F., Cullis, J. O., Spencer, A., Cross, N. C. P., Chase, A., Garicochea, B., Bungey, J., Barrett, J. and Goldman, J. M. (1994) Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: The case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood*, **83**, 3377-3383.
 17. Cross, N. C. P., Feng, L., Chase, A., Bungey, J., Hughes, T. P., Goldman, J. M. (1993) Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*, **82**, 1929-1936.

LETTERS TO THE EDITOR

Frequency of molecular elimination of Ph1 clone in chronic myelogenous leukemia (CML) with interferon alpha



Allogeneic bone marrow transplantation currently appears to be the only curative treatment of CML, capable of eradicating the Ph1 clone. However, treatment with interferon alpha can also induce significant reduction of the Ph1 clone in two thirds of CML and complete cytogenetic remissions are observed in about 15% of cases.¹

Analysis of minimal residual disease by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), in patients who achieved cytogenetic CR, has shown persistence of BCR-ABL transcript in most but not all cases.² Indeed, in a recent issue of *Leukemia*, Ishiyama *et al*³ reviewed 12 published cases of CML treated with interferon alpha with negative RT-PCR for BCR-ABL fusion RNA. However, in those 12 patients, two cases were positive after two-step PCR (ie the two patients of Dhingra *et al*⁴), only one negative PCR analysis was reported in three patients (the patients reported by Opalka, Martiat and Malinge^{2,5,6}), another patient obtained negative RT-PCR findings only after treatment with high-dose Ara-C (patient of Rege Cambrin⁷) and finally one of the patients of Bilhou-Nabera *et al*⁸ was a post-transplant relapse. Furthermore, the authors did not report the incidence of molecular elimination of Ph1 clone after treatment with interferon alpha in large published series, and initial characteristics of the patients who obtained negative RT-PCR were not described.

Between 1988 and 1993 we treated 64 newly diagnosed cases of Ph1 positive CML by recombinant interferon alpha 5 M UI/m²/day during at least 6 months, with or without low-dose Ara-C. Cytogenetic response (evaluated on at least two examinations and analysis of 50 mitoses) was complete in eight cases (14%). Six of those eight patients could be analyzed sequentially by RT-PCR for BCR-ABL fusion mRNA. In those six patients, cytogenetic CR had been obtained after 7

to 24 months of interferon (median 9 months) and patients were still on interferon, 12 to 42 months after achieving cytogenetic CR. A median of four RT-PCR analyses per patient (range 3–9) was made. RNA was extracted from total blood leukocytes. Using nested PCR after reverse transcription, the sensitivity of our technique for BCR-ABL fusion transcript was one K562 cell in 10⁶ CEM cells. RT-PCR remained positive (after one or two rounds) in four patients. In the remaining two patients, PCR became negative after 19 and 34 months of interferon, and has always remained so during 23 and 31 months after the first negative two-step PCR findings, respectively (five and seven negative RT-PCR analyses were made in those two patients, respectively). Both patients had low WBC counts (<15 000/mm³), had no splenomegaly at presentation and had a low Sokal index (below 0.8). One of them was receiving low-dose Ara-C in addition to interferon.

If one takes into account only patients with negative two-step RT-PCR, with at least two negative RT-PCR examinations, and treated *de novo* (excluding patients with a prior allograft), only six cases of molecular elimination of the Ph1 clone had been previously reported, including four of the cases reviewed by Ishiyama *et al*³ and two cases recently reported by Liberati *et al*¹⁰ (Table 1). Except in our study, the total number of patients treated with interferon alpha was not known; the number of treated patients who achieved cytogenetic CR was known in two studies: two of four and two of 10 patients, of those patients respectively, achieved molecular CR. Apart from our two patients, initial risk factors of patients who had no detectable BCR-ABL transcript were not known. In three cases, RT-PCR was transiently positive during evolution and in one case, the last PCR examination was found positive. This was attributed, in one of the former cases, to lowering of the dose

Table 1 A review of previously reported cases whose BCR-ABL mRNA disappeared after IFN alpha therapy

Authors	No. of patients who received IFN	No. of patients with cytogenetic CR	No. of patients with negative PCR	Age/Sex	Treatment	Time of PCR negativation (months) after onset of IFN	Number of negative PCR (months after onset of IFN)	Follow-up since first negative PCR
Ishiyama ³	NK	NK	1	78/M	IFN alpha	42	2(42,47)	Transiently positive at 44 months
Liberati ¹⁰	NK	4	2	NK	IFN alpha	20	6(20,26,28,29,34,40)	Became positive again at 54 months
				25/F	IFN alpha	54	4(54,57,71,75)	Transiently positive at 60 months
Bilhou-Nabera ⁸	NK	10	2	54/M	IFN alpha	31	3(31,37,43)	Follow up of 12 months
				35/M	IFN alpha	28	2(28,34)	Transiently positive at 31 months
Oguma ⁹	NK	NK	1	55/M	IFN alpha + HU	41	2(41,43)	Follow-up of only 2 months
Henic (this study)	64	8	2*	27/M	IFN alpha	34	7(34,39,45,52,57,60,65)	Follow-up of 31 months
				21/F	IFN alpha + low-dose Ara-C	19	(19,29,34,38,42)	Follow-up of 23 months

Only cases treated *de novo*, who received no intensive chemotherapy, where two-step PCR was performed, and where at least two PCR examinations were negative are included.

*RT-PCR analysis performed in only six of the eight patients who achieved cytogenetic CR.

NK, not known; HU, hydroxyurea.

Correspondence: Dr P Fenaux, Institute Service des Maladies du Sang, 1, Place de Verdun, CHU, F 59037, Lille, France
Received 24 July 1995; accepted 24 August 1995

of interferon. In the remaining two published cases, RT-PCR findings remained negative during evolution, but follow-up was limited (three and two negative PCR examinations, respectively).

In conclusion, interferon alpha (with or without low-dose Ara-C) appears to be able to reduce the level of BCR-ABL fusion transcript below detectable levels in about 3% of CML. Patients where this occurs appear to have initially low 'risk factors'. Whether this corresponds to true eradication of the Ph1 clone or rather to its persistence at low level, corresponding to cells expressing small amounts of BCR-ABL fusion mRNA is at present unknown. Longer follow-up will be required before conclusions can be made.

N HENIC¹,
C PREUDHOMME,^{1,2}
M NOEL³,
J LAI⁴,
M WETTERWALD⁵,
M SIMON⁶
and P FENAUX^{2,3}

¹Laboratoire d'Hématologie CHU Lille;
²U₁₂₄ Inserm Institut de Recherche
contre le Cancer, Lille;
³Service des Maladies du Sang,
CHU, Lille;
⁴Service de Cytogénétique, CHU, Lille;
⁵Service de Médecine Interne,
Hôpital de Dunkerque;
and ⁶Service d'Hématologie Clinique,
Hôpital de Valenciennes, France

References

- 1 Talpaz M *et al.* Interferon alpha produce sustained cytogenetic response in chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 1991; **114**: 532-538.

- 2 Opalka B *et al.* Minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia undergoing longterm treatment with recombinant interferon-alpha 2b alone or in combination with interferon. *Blood* 1991; **78**: 2188-2193.
- 3 Ishiyama K *et al.* Molecular elimination of Ph1 clone in a chronic myelogenous leukemia patient with interferon alpha alone. *Leukemia* 1994; **8**: 2243-2245.
- 4 Dhingra K *et al.* Minimal residual disease in interferon-treated chronic myelogenous leukemia: results and pitfalls of analysis based on polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; **6**: 754-760.
- 5 Martiat P *et al.* Detection of residual BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia patients in complete remission using the polymerase chain reaction and nested primers. *Br J Haematol* 1990; **75**: 355-358.
- 6 Malinge MC *et al.* Quantitative determination of the hybrid Bcr-Abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia under interferon therapy. *Br J Haematol* 1992; **82**: 701-707.
- 7 Rege-Cambrin G *et al.* Transient cytogenetic relapse in a Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patient previously treated with alpha-interferon. *Leukemia* 1992; **6**: 738-741.
- 8 Bilhou-Nabera C *et al.* Complete cytogenetic conversion in chronic myelocytic leukemia patients undergoing interferon alpha therapy: follow-up with reverse polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; **6**: 595-598.
- 9 Oguma N *et al.* Molecular elimination of the minimal residual Ph1 clone with IFN alpha in CML. *Lancet* 1992; **339**: 557.
- 10 Liberati AM *et al.* Repeated PCR in CML during INF alpha therapy. *Eur J Haematol* 1994; **52**: 152-155.

Persistence of AML1/ETO fusion mRNA in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) in prolonged remission: is there a consensus?

The (8;21) translocation occurring in AML leads to a fusion between two genes, AML1 and ETO.¹ Detection of the AML1/ETO fusion transcript can be made by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), which allows detection of minimal residual disease (MRD) after treatment. Several groups have found AML1/ETO transcript by RT-PCR in AML with t(8;21) in complete remission (CR) after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation (BMT): Nucifora *et al*² in three of three patients who had been in CR for 83 to 94 months, Maruyama *et al*³ in four of four cases in CR for 12, 15, 34 and 52 months, respectively, and Kusec *et al*⁴ in five of five cases in CR for 7, 8, 8, 10 and 66 months, respectively. Our analysis of samples of AML patients with t(8;21) in prolonged CR performed by two different laboratories, however, failed to detect AML1/ETO fusion transcript by RT-PCR.

RNA was extracted from bone marrow cells of patients with AML and t(8;21) at diagnosis and at various intervals after CR achievement. Experiments were performed in two different laboratories (in Lille and Paris Necker). The RT-PCR technique used in Lille, including the primers for amplification and the

junction oligonucleotide probe, was that published by Downing *et al*.⁵ Briefly, RNA was reverse transcribed using random hexamer primers. The cDNA was amplified by two rounds of PCR; 1 µl of the first round product was used as a template for the second round of PCR, that used nesting primers. RT-PCR analysis of cABL gene mRNA served as positive control for the reaction, RNA from blast cells of a patient with t(8;21) AML as positive control RNA, and RNA from HL60 cells as negative control RNA. AML1/ETO fusion RNA could be detected with a sensitivity of 10⁻³ after one round of PCR on ethidium bromide stained gel, 10⁻⁴ after two rounds of PCR, and 10⁻⁵ after two rounds and hybridization with the specific oligonucleotide probe (Figure 1). The analysis was also performed in Paris Necker (Dr MacIntyre) on the same samples, using a two-round semi-nested RT-PCR technique, which also achieved detection levels of 10⁻³, 10⁻⁴ and 10⁻⁵ after one round, two rounds and two rounds plus hybridization, respectively.

RT-PCR analysis was positive at diagnosis in seven of seven cases of AML with t(8;21) analyzed, confirming previous reports that showed constant detection of AML1/ETO fusion transcript in AML with t(8;21).²⁻⁵ By contrast, no AML1/ETO transcript was found by this method in 37 patients with M₁ AML (14 cases) or M₂ AML (23 cases) and Auer rods but no

Correspondence: Dr C Preudhomme, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Calmette CHU, Boulevard Leclercq, 59045 Lille, France
Received 18 April 1995; accepted 3 October 1995

BRIEF COMMUNICATION

Good correlation between RT-PCR analysis and relapse in Philadelphia (Ph1)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL)

C Preudhomme^{1,2}, N Henic^{1,2}, B Cazin³, JL Lai⁴, MF Bertheas⁵, M Vanrumbeke^{1,2}, F Lemoine⁶, JP Jouet³, E Deconninck⁷, B Nelken⁸, A Cosson¹ and P Fenaux^{2,3}

¹Laboratoire d'Hématologie A, CHU, Lille; ²Unité INSERM U124, Lille; ³Service des Maladies du Sang, CHU, Lille; ⁴Service de Cytogénétique, CHU, Lille; ⁵Service de Cytogénétique, CHU, St Etienne; ⁶Service d'Oncopédiatrie, CHU, Angers; ⁷Service des Maladies du Sang, CHU, Besançon; and ⁸Service d'Oncopédiatrie, CHU, Lille, France

We sequentially performed cytogenetic analysis and RT-PCR analysis of BCR-ABL transcripts in 17 cases of Ph1-positive ALL who had achieved hematological complete remission (CR) with intensive chemotherapy (CT). Sixteen cases were studied prospectively. All but one of the patients had reached cytogenetic CR, but cytogenetic has low sensitivity in predicting relapse. Twelve patients relapsed, three died in first CR and two were alive in first CR. Two of five, two of four, and five of nine patients who were allografted (in first or second CR), autografted and received consolidation CT, respectively, achieved negative two-round PCR in the bone marrow (BM): three died in CR, three remained in CR with negative two-step PCR in the BM and three relapsed after 22 to 28 months. In all cases, relapse was preceded by switch to PCR positivity in the BM by 4 to 6 months. The remaining nine patients remained PCR-positive in the BM and relapsed after 2 to 16 months. In the four autografted cases, PCR was positive at the time of bone marrow harvest. The two patients who received a purged transplant achieved negative PCR and prolonged CR, whereas the two patients who received an unpurged transplant remained PCR positive and relapsed. In 34% of the samples where analysis was concomitant, sensitivity of PCR proved lower in the blood than in the BM. These findings show that RT-PCR is a useful tool in the monitoring of MRD in Ph1 positive ALL.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia; Philadelphia chromosome (Ph1); BCR-ABL

Introduction

The Ph1 chromosome t(9;22) translocation, found in about 20% of adult ALL, and 1% of childhood ALL, results in a fusion between the second exon of c-abl gene and generally the first intron of BCR gene (m-bcr breakpoint, e1a2 fusion) or rarely its second or third exon (M-bcr breakpoint, b3a2 or b2a2 fusion).¹⁻³ Reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis of these fusion transcripts has demonstrated its usefulness in the diagnosis of Ph1 ALL, especially in cases of cytogenetic failure.^{4,5} RT-PCR analysis of BCR-ABL fusion transcripts is also a useful tool in the evaluation of minimal residual disease (MRD) after treatment (particularly allogeneic BMT) in Ph1-positive chronic myeloid leukemia.⁶⁻¹⁰ However, very few studies have attempted to correlate RT-PCR of these transcripts and clinical outcome in Ph1-positive ALL.^{11,12} We performed such a study in 17 patients in whom sequential cytogenetic analysis was also made.

Patients and methods

Patients

Sixteen newly diagnosed cases of Ph1-positive ALL, seen from 1991 to 1995 in several French institutions, and who had achieved hematological complete remission (CR) with intensive chemotherapy were studied. Another patient (patient 14 in Figure 1), diagnosed in 1984 and autografted in first CR, was studied retrospectively.

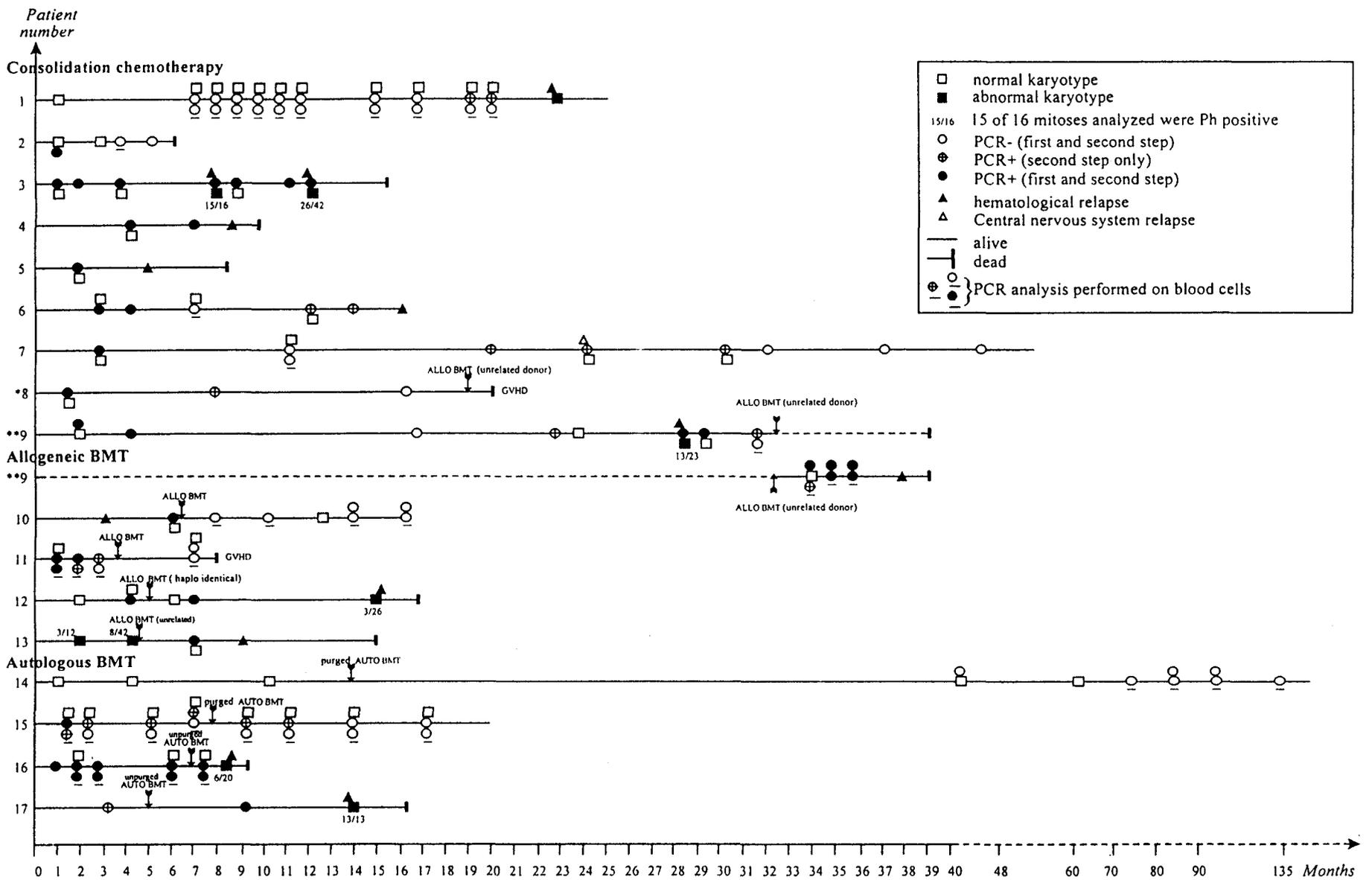
Patients included six children aged <15 years and 11 adults. All patients had early B-ALL, CD10 positive in 16 cases and CD10 negative in one case. Blasts also carried myeloid markers in seven cases. All patients had detectable Ph1 chromosome by cytogenetic analysis at diagnosis. By RT-PCR analysis, 14 patients had m-BCR gene breakpoint, two had M-bcr breakpoint, and the last patient had both M-bcr and m-bcr breakpoint. All patients received induction chemotherapy with vincristine, prednisone, anthracycline and L-asparaginase, according to EORTC protocols 58-880 or 58-881 in children and the French GOELAL 01 or GOELAL 02 protocols in adults.¹³

After achieving hematological CR, nine patients initially received consolidation chemotherapy (CT) according to the EORTC and GOELAL trials. Six received allogeneic BMT in first or second CR, with an HLA-identical familial donor in two cases, a haplo-identical familial donor in one case and an HLA-identical unrelated donor in three cases. The conditioning regimen was with cyclophosphamide-total body irradiation (TBI) in all cases. The remaining four patients received autologous BMT in first CR with purged bone marrow in two cases (with mafosfamide in patient 14 and with MoAb in patient 15), and unpurged bone marrow in the remaining two patients. For the purpose of this study, patients were categorized as in Table 1 according to the type of consolidation treatment after which cytogenetic and molecular follow-up was available. Patients 1 to 9 had cytogenetic and molecular follow-up after consolidation chemotherapy; patients 9 to 13 were studied after allogeneic BMT in second CR, (patients 9 and 10) and in first CR (patients 11 to 13);

Figure 1 Cytogenetic and molecular data of the 17 patients, divided according to the type of consolidation treatment (consolidation chemotherapy, allogeneic BMT, autologous BMT) after which cytogenetic and molecular follow-up was available. Patients 1 to 9 were followed-up after consolidation chemotherapy, patients 9 to 13 after allogeneic BMT and patients 14 to 17 after autologous BMT. With regard to time of follow-up, 0 means date of CR achievement. For allogeneic BMT, the absence of indications in parentheses means that the donor was a familial HLA identical donor.

Correspondence: Dr C Preudhomme, Laboratoire d'Hématologie A, Hôpital Calmette, Boulevard du Professeur Leclercq, 59037 Lille, France

Received 24 July 1996; accepted 11 November 1996



* : Patient 8 : although this patient was allografted, cytogenetic and molecular follow up was only available after consolidation chemotherapy.
 ** : Patient 9 , followed up after consolidation chemotherapy in first CR, and after allogeneic BMT in second CR, was included in the two treatment categories.

ABL-RT 5' AACGAAAAGGTTGGGGTC 3'
A1 5' TCACTGGGTCAGCGAGAAGGTTTTGGTTGGAGTT 3'
A2 5' CTCAGACCTGAGGCTCAAAGTCAGATGCTA 3'
A3 5' CGAGCCGGCCTGAGCCGGCCCGGACCGA 3'
A4 5' TTTATGGGGCAGCAGCCTGGAAAAGTACTTGGG 3'
B1 5' AGCATGGCCTTCAGGGTGACAGCCGCAACGGCAA 3'
B2 5' GTTCTGATCTCCTCTGACTATGAGCGTGCA 3'
B5 5' CAAGACCGGAGATCCCCTGGGGCCCAAC 3'

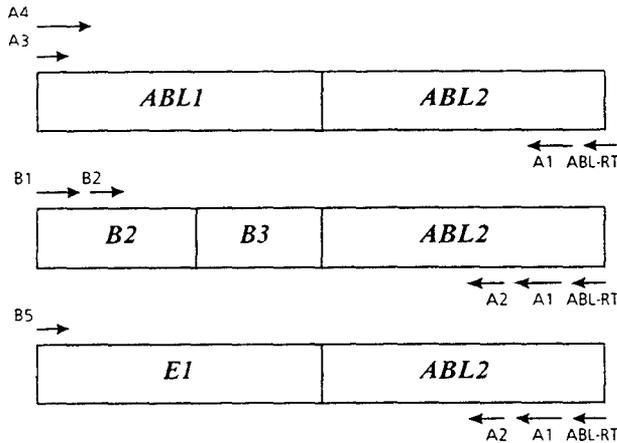


Table 1 Sequence and localization of primers

patient 9, followed-up in first CR after chemotherapy and in second CR after allogeneic BMT, therefore appears in both categories in Table 1; patients 14 to 17 were autografted; patient 8, although he was allografted late in first CR, was only categorized in the consolidation chemotherapy group in Table 1 as no follow-up post-transplant was available.

Methods

Cytogenetic analysis was performed on bone marrow cells, after 24 h *in vitro* culture without stimulation. Chromosomes were identified by RHG and GTG banding. Thirty to 50 mitoses were analyzed before reaching a conclusion on the absence of Ph1 chromosome.

PCR analysis was performed on RNA obtained from bone marrow and/or circulating mononuclear leukocytes, as previously published.^{1,6} Briefly, after reverse transcription of RNA, two-step PCR was performed using nested primers, as shown in Table 1. Positive control cell lines were K562 (M-bcr) and TOM1 (m-bcr) a generous gift of A Hagemeijer (Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands). In our hands, this PCR technique allows detection of one abnormal K562 or TOM1 cell in 10⁴ CEM cells after one round, and 1 in 10⁶ after two rounds. Precautions taken to minimize contamination problems were as previously published.⁶

Results

Clinical outcome

Overall, 12 patients had relapsed. One of the relapses only involved the CNS (patient 7). Three patients died in first CR,

including two from GVH disease after allogeneic BMT (patients 8 and 11) and one from infection after consolidation CT (patient 2). Two patients (patients 14 and 15) were alive in first CR after 137 and 20 months, and two patients (patients 7 and 10) were alive in second CR after 26 and 14 months.

Of the nine patients followed up after consolidation CT (patients 1 to 9; Table 1), seven relapsed after 5 to 28 months, and two died in CR after 6 and 20 months. Of the five patients followed up after allogeneic BMT (patients 9 to 13), one died from GVH disease (patient 11), three relapsed (patients 9, 12 and 13) and one remained in CR after 17 months (patient 10). Of the four autografted patients (patients 14 to 17), two relapsed after 9 and 13 months, and the two patients who had been autografted with purged marrow were still in first CR after 20 and 137 months.

Cytogenetic results

A total of 54 examinations were performed during follow up. (Figure 1). Upon hematological CR achievement, normalization of cytogenetics was observed in 14 cases. PH1 mitoses were still found in one patient and no cytogenetic analysis was performed at this stage in three patients. In eight of the patients who had a hematological relapse, cytogenetics had been performed within 4 months of relapse and no PH1 mitose was found in any case. The four patients who were still in CR (patients 7, 10, 14 and 15), had normal karyotype.

RT-PCR results

During follow-up, 81 points of RT-PCR analysis were made (Figure 1).

Of the nine patients followed molecularly after consolidation CT, four patients always remained PCR-positive after one round (patients 3, 4, 5) and two rounds (patient 6) in the bone marrow. The three former relapsed after 7, 8 and 5 months, respectively, and the latter after 16 months. Five patients (patients 1, 2, 7, 8 and 9) became two-round PCR negative in the marrow, after 4 to 16 months, patients 2 and 8 died in first CR; patient 1 and 9 relapsed after 22 and 28 months, 4 and 6 months after switch to positivity of two-round PCR, respectively, and patient 7 relapsed after 24 months in the CNS, but not in the bone marrow. In patient 7, PCR had become positive after two rounds in the bone marrow 5 months earlier; 26 months after retreatment with intensive chemotherapy, this patient remained in second CR, with negative PCR.

Of the five patients followed molecularly after allogeneic BMT, two (patients 10 and 11) became PCR-negative in the marrow: patient 11 died from GVH disease after 5 months, and patient 10 remained in CR after 9 months. Patients 9, 12 and 13 remained one-round PCR-positive in the marrow; they relapsed 6, 10 and 5 months after the procedure, respectively.

Of the two patients autografted with a purged marrow patient 15, who had positive two-round PCR in the marrow before the procedure, remained so during 6 months after which PCR became negative in the marrow. She remained in CR 12 months later. The other patient (patient 14) was only tested 26 to 116 months after the procedure, while still in CR, and was always found negative in the marrow. The two patients (patients 16, 17) autografted with unpurged marrow were PCR positive before the transplant, remained so after one

round, in the marrow after the transplant, and relapsed 2 and 9 months after BMT.

Overall, five of nine, two of five and two of four of the patients followed molecularly after consolidation CT, alloBMT and autoBMT respectively became negative after two-step PCR in the marrow. Three died in CR, three remained in CR with persistently negative two step PCR in the marrow, and three relapsed after 22 to 28 months. In all cases, relapse was preceded by switch to PCR positivity in the bone marrow after two-step PCR, by 4 to 6 months. In contrast, the nine patients who remained PCR-positive in the bone marrow had short CR; eight patients positive after one round relapsed after 5 to 10 months and one patient positive after two rounds relapsed after 16 months.

In 35 samples studied concomitantly, a lower sensitivity of RT-PCR performed on blood samples, as compared to bone marrow, was seen in 12 cases (34%). In these samples, PCR was negative in the blood after two rounds but positive in bone marrow after two rounds or positive in the blood after only two rounds, but in the marrow after the first round.

Discussion

In this study, we first showed the low sensitivity of cytogenetics in predicting relapse in Ph1 ALL. Indeed, in eight patients analyzed cytogenetically within 4 months of relapse, karyotype was normal in all cases. This confirmed findings made in other hematological malignancies. By contrast, RT-PCR proved a sensitive tool in predicting outcome. Although figures are too small for statistical analyses, the nine cases that became PCR negative after two-step PCR did not relapse or had late relapse (after 22 to 28 months), always preceded by switch to PCR positivity in the bone marrow. In contrast, the eight patients who remained positive after one-step PCR relapsed within 10 months and the patient who remained positive after two-step PCR relapsed after 16 months. These findings suggest that, in patients who achieve PCR negativity in the marrow after two rounds, relatively prolonged CR can be expected, and that relapse is always preceded over several months by switch to PCR positivity. In patients who remain PCR-positive in the marrow, short CR duration can be predicted (especially if PCR remains positive after one round).

Results of our prospective study extend those of two previous reports. Mitterbauer *et al*,¹¹ studied MRD in nine Ph1 ALL patients, with a sensitivity of 10^{-5} and 10^{-3} respectively for two-step and one-step PCR. Only two patients became two-step PCR negative, including one of the six patients who received consolidation CT, the only allografted patient and none of the two autografted patients. Relapse was always preceded by 15 to 5 weeks by one-step positivity. Miyamura *et al*,¹² using one-step RT-PCR (10^{-5} sensitivity) to follow-up MRD in nine allografted and six autografted patients, obtained in all but two negative PCR. The two patients who remained PCR-positive rapidly relapsed. All other relapses were preceded by switch to positivity by 1 to 2 months except in one case, who was however not studied in the 4 months preceding relapse. Therefore RT-PCR appears as a useful tool to monitor MRD in Ph1 ALL, although publication of larger numbers of cases will be required for validation of these results.

In the case of autologous BMT, three of the four autografted patients that were studied molecularly at the time of marrow collection were two-step PCR-positive. Therefore it is interesting to note that the two patients who received ABMT with a purged marrow remained in CR with negative two-step PCR,

whereas both patients who received unpurged BMT relapsed after remaining one-step PCR-positive post-transplant. Miyamura *et al*¹² also reported that in five patients autografted with purged marrow, three of the four patients studied by PCR were positive at the time of bone marrow harvest. They became PCR-negative after transplant and two were in prolonged CR. In contrast, the only patient transplanted without marrow purging never became PCR-negative and rapidly relapsed. These findings suggest that bone marrow purging prior to ABMT may be important in Ph1-positive ALL.

Finally, our results also show the lower sensitivity of RT-PCR performed in blood, as compared to bone marrow, in one third of the samples. Van Rhee *et al*,¹⁴ using quantitative PCR comparatively in 29 paired specimens of blood and marrow of 18 Ph1-ALL patients collected contemporaneously found similar numbers of BCR-ABL transcripts in 25 samples, but in the remaining four samples, BCR-ABL transcripts were present in BM and absent in PB.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Lille and the Association de la Recherche contre le Cancer (ARC)

References

- 1 Preudhomme C, Fenaux P, Lai JL, Lepelley P, Sartiaux C, Collynd'Hooghe M, Zandecki M, Cosson A, Jouet JP, Kerckaert JP. Philadelphia-negative, BCR-ABL-positive adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) in two of 39 patients with combined cytogenetic and molecular analysis. *Leukemia* 1993; 7: 1054-1057.
- 2 Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge DK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study (8762). *Blood* 1992; 80: 2983-2990.
- 3 Secker-Walker LM, Craig JM. Prognostic implications of breakpoint and lineage heterogeneity in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: a review. *Leukemia* 1993; 7: 147-154.
- 4 Maurer J, Janssen JWG, Thiel E, Van Denderen J, Ludwig WD, Aydemir U, Heinze B, Fonatsch C, Harbott J, Reiter A, Riehm H, Hoelzer D, Bartram CR. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 337: 1055-1058.
- 5 Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV. Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in adults age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia* 1991; 5: 196-199.
- 6 Preudhomme C, Wattel E, Lai JL, Henic N, Meyer L, Noel MP, Cosson A, Jouet JP, Fenaux P. Good predictive value of combined cytogenetic and molecular follow-up in chronic myelogenous leukemia after non-T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation: a report on 38 consecutive cases. *Leuk Lymphoma* 1995; 18: 265-271.
- 7 Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM. Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood* 1991; 77: 874-878.
- 8 Guerrasio A, Martinelli G, Saglio G, Rosso C, Zaccaria A, Rosti G, Testoni N, Ambrosetti A, Izzi T, Sessarego M, Frassoni F, Gasparini P, Chiamenti A, Di Bartolomeo P, Pignatti PF. Minimal residual disease status in transplanted chronic myelogenous leukemia patients: low incidence of polymerase chain reaction positive cases among 48 long disease-free subjects who received unmanipulated allogeneic bone marrow transplants. *Leukemia* 1992; 6: 507-512.
- 9 Delfau MH, Kerckaert JP, Collynd'Hooghe M, Fenaux P, Lai JL, Jouet JP, Grandchamp B. Detection of minimal residual disease in

- chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia* 1990; 4: 1-5.
- 10 Gaiger A, Lion T, Kalhs P, Mitterbauer G, Henn T, Haas O, Födinger M, Kier P, Forstinger C, Quehenberger P, Hinterberger W, Jager U, Linkesch W, Mannhalter C, Lechner K. Frequent detection of BCR-ABL specific mRNA in patients with chronic myeloid leukemia (CML) following allogeneic and syngeneic bone marrow transplantation (BMT). *Leukemia* 1993; 7: 1766-1772.
 - 11 Mitterbauer G, Födinger M, Scherrer R, Knöbl P, Jager U, Laczika K, Schwarzinger I, Gaiger A, Geissler K, Greinix H, Kalhs P, Linkesch W, Lechner K, Mannhalter C. PCR-monitoring of minimal residual leukaemia after conventional chemotherapy and bone marrow transplantation in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 89: 937-941.
 - 12 Miyamura K, Tanimoto M, Morishima Y, Horibe K, Yamamoto K, Akatsuka M, Modera Y, Kojima S, Matsuyama K, Hirabayashi N, Yazaki M, Imai K, Onozawa Y, Kanamuru A, Mizutani S, Saito H. Detection of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction: possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation. *Blood* 1992; 79: 1366-1370.
 - 13 Ifrah N, Harousseau JL, Jouet JP, Desablens B, Linassier C, Guyotat D, Witz F, Babin A, Briere J, Lamy T, Sadoun A, Pignon B, Flesch M, Caillot D, Abgrall JF, Casassus P, Mignard D, Danel P, Boasson M. Traitement intensif avec autogreffe précoce dans les LAL de l'adulte. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35: 334 (Abstr.).
 - 14 Van Rhee F, Marks DI, Lin F, Szydlo RM, Hochhaus A, Treleaven J, Delord C, Cross NCP, Goldman JM. Quantification of residual disease in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of blood and bone marrow. *Leukemia* 1995; 9: 329-335.

