

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2009

N° 53

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional
le **20 octobre 2009**

par **Marion Eveillard**

Conformément aux dispositions du décret
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

Impact des réarrangements des gènes EVI1 et PRDM16
sur les caractéristiques clinico-morphologiques et pronostiques
des leucémies aiguës myéloblastiques

Président du jury : Mme Virginie FERRE, Professeur de Virologie – Pharmacie

Directeur de thèse : M. Hervé AVET LOISEAU, Professeur d'Hématologie -
Médecine

Membres du jury : M. le Docteur Richard GARAND, Praticien Hospitalier
Mme le Docteur Laurence LODE, Praticien Hospitalier
Mme le Docteur Pascaline TALMANT, Praticien Hospitalier
M. le Docteur Jacques DELAUNAY, Praticien Hospitalier

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
GENERALITES	5
I - La Leucémie Aiguë Myéloblastique (LAM).....	5
A– Définition et critères diagnostiques.....	5
B– Classification des LAM.....	7
C – Epidémiologie.....	9
D– Impact de la cytogénétique dans les LAM	11
1 – Caractéristique générale de la cytogénétique.....	12
2 – Les différents types d’anomalies du caryotype.....	13
i– Anomalies primaires.....	13
ii –Anomalies secondaires.....	14
3 – Valeur pronostic de la cytogénétique.....	14
i – Anomalies de bon pronostic.....	14
ii– Anomalies de pronostic intermédiaire.....	15
iii– Anomalies de mauvais pronostic.....	15
E – Principes de la prise en charge et du traitement des LAM.....	16
1 – Stratégie d’induction.....	17
2 – Stratégie de consolidation.....	17
II– Cas particulier de la LAM avec inv(3)(q21 q26.2) ou t(3 ; 3)(q21 ;q26.2), impliquant les gènes RPN1 et EVI1	18
A – Définition.....	18
B – Epidémiologie.....	18
C – Présentation clinique.....	19
D – Morphologie et cytochimie.....	19
E – L’Immunophénotypage.....	20
F – La génétique.....	20
G – Pronostic et facteur prédictif	21
III – Cytogénétique : implication des gènes EVI1 et PRDM16 dans les hémopathies myéloïdes.....	21
A - EVI1	21
1 - EVI1 : du gène à la protéine	21
2 Rôle d’EVI1	24
B - PRDM16 (PR domain containing 16).....	28
1 - PRDM16 : du gène à la protéine	28
2 - Rôle de PRDM16.....	29
OBJECTIFS DE L’ETUDE.....	31

MATERIEL ET METHODES.....	33
I – Les patients.....	34
II – Numération et lecture des lames de myélogramme et des frottis sanguins.....	35
A - Analyse des frottis de sang	35
B – Analyse des myélogrammes.....	35
III– La réaction de Myéloperoxydase à la benzidine (MPO).....	36
IV – Analyse de l’expression des myéloperoxydases en cytométrie en flux (CMF).....	37
A – Principe de la CMF.....	37
B – Préparation des échantillons.....	38
C – Le marquage.....	38
D – L’appareillage.....	39
E – L’analyse.....	39
V - Etude cytogénétique.....	40
A –Obtention du culot de cellules.....	40
1 – Le prélèvement	40
2 – La culture.....	40
3 - La technique récolte.....	41
4 – L’étalement sur lame.....	41
B – Le caryotype : marquage bande R/NaH ₂ PO ₄	42
C – L’Analyse par Fluorescence In Situ Hybridation (F.I.S.H).....	42
1 – La technique.....	42
2 – Les sondes utilisées.....	43
i - EVI1.....	43
ii - PRDM16.....	45
a - Choix des sondes.....	46
b - Amplification des sondes.....	46
c - Marquage des sondes par Nick translation.....	47
d – Précipitation des sondes.....	47
e – Hybridation.....	47
VI – Analyse statistique.....	48
RESULTATS.....	49
I - Résultats : caractéristique cytogénétique.....	49
A – EVI1.....	49
1 - Caryotype standard.....	49
2 - Diagnostic des anomalies par FISH.....	51
i - Cas de l’inversion paracentrique du chromosome 3.....	51
ii- Cas de la translocation t(3 ;partenaire).....	52

B – PRDM16.....	52
1 – Caryotype standard.....	52
2 - Diagnostic des anomalies par FISH pour RPN1 et PRDM16.....	53
II – Classification morphologique des patients de l'étude.....	53
A – Classification selon la FAB.....	54
B – Selon l'OMS 2001.....	54
III – Analyse de l'hémogramme.....	56
A – EVI1.....	56
1 –Analyse des plaquettes.....	56
i - La numération des plaquettes.....	56
ii - La dystrophie plaquettaire.....	57
2- Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes.....	58
i - L'hémoglobine.....	58
ii - Les leucocytes.....	59
B – PRDM16.....	59
1 –Analyse des plaquettes.....	59
2- Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes	59
IV – Analyse du myélogramme.....	60
A – EVI1.....	61
1 - Le pourcentage de blastes.....	61
2 - Analyse de la dystrophie.....	62
i - Les mégacaryocytes.....	62
ii - La lignée granuleuse.....	64
iii - La lignée érythrocytaire.....	64
3 – Analyse de l'expression des myéloperoxydases.....	65
B – PRDM16.....	66
1 - Le pourcentage de blastes.....	66
2 – Analyse de la dystrophie.....	67
i - Les mégacaryocytes	67
ii - La lignée granuleuse et la lignée érythrocytaire.....	68
3 – Analyse de l'expression des myéloperoxydases.....	69
V –Analyse de la survie globale.....	70
A - L'âge moyen au diagnostic.....	70
B - Analyse de la survie.....	71
DISCUSSION.....	73
CONCLUSION.....	80
ANNEXE.....	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	84

LISTE DES ABREVIATIONS

Add	addition
Anis	anisocytose
AND	acide désoxyribonucléique
APC	allophycocyanine
AREB I	anémie réfractaire I
ATRA	acide tout – trans- rétinoïque
BFU-E,	burst forming unit erythroid
BOM	biopsie ostéo médullaire
CBF	core binding factor
CD	cluster de différenciation
CFU-E	colony forming unit erythroid
CFU-G,	colony forming unit granulocyte
CFU-GM,	Colony Forming Unit granulocyte monocyte
CFU–GEMM	Colony Forming Unit - granulocyte-erythroid-makrophage-megakaryocyte
CFU–MK,	colony forming unit mégacaryocytic
CMF	cytométrie en flux
kDa	kilo Dalton
dc	diagnostic
degran	dégranulé
Del	délétion
DLBCL	diffuse large B cell lymphoma
DM	miroirs dichroïques
DML	dysplasie multilignée
EV11	ecotropic viral integration site 1
F	fusion
FAB	French American British
FISH	fluorescence in situ hybridation
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FLT3	FMS like tyrosine kinase 3
FSC	forward scatter
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
Hb	hémoglobine
IL3	interleukine 3
IFN	Interféron
Inv	inversion
JMML	leucémie myélomonocytaire juvénile
KCL	chlorure de potassium
KO	knock out
LAM	leucémie aiguë myéloblastique
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMC	leucémie myéloïde chronique
LMMC	leucémie myélomonocytaire chronique
MDS1	myelodysplasia syndrome 1
ME	MDS1/EV11
MEL1	MDS1/EV11 like gene, = PRDM16
MEL1S	MDS1/EV11 like gene short
MF	myélofibrose primitive

MGG	May Grünwald Giemsa
MKL1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1
MLL	mixed lineage leukemia
MLL T3	mixed lineage leukemia translocated to 3
MNI	meningioma 1
MPO	myéloperoxydase
MYH11	myosin heavy chain 11
NPM1	nucléophosmin 1
NR	non renseigné
NUP214	nucleophorin 214kDa
OMS	Organisation mondiale de la santé
p	bras court du chromosome
pb	paire de bases
PML RARA	promyelocytic leukemia retinoic acid receptor alpha
PR	Positive regulatory-Domain 1-binding factor 1 (PRD1-BF1) /Retinoblastoma Interacting Zinc-finger protein 1 (RIZ1) homology
PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma
PRDM16	PR domain containing 16
Pt	plaquettes
r	rechute
R	rouge
RBM15	RNA binding motif protein 15
RHAMM	HMMR (hyaluronan mediated motility receptor)
RHG	reverse hot Giemsa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RPN1	ribophorine 1
RUNX1	runt related transcription factor 1
PE	phycoérythrine
PV	polyglobulie de Vaquez
q	bras long du chromosome
sc	secondaire
SMD	syndrome myélodysplasique
SMP	syndrome myéloprolifératif
SMD/SMP	syndrome myélodysplasique / myéloprolifératif
SSC	side scatter
TE	thrombocytémie essentielle
t	translocation
V	vert
Wald	Waldenström
WHO	World Health Organization

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

TABLEAUX :

Tableau 1 : Classification des hémopathies malignes proposées par l'OMS (Swerdlow et al., WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues , 2008)

Tableau II : Expression des résultats des myéloperoxydases

Tableau III : Signaux observés pour la sonde Kreatech EVI1

Tableau IV : Caryotype des patients présentant une anomalie du gène EVI1
Dc :diagnostic, r : rechute, sc : secondaire, ineval : inévaluable.

Tableau V : Caryotype des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

Tableau VI : Analyse des Plaquettes des patients présentant une anomalie du gène EVI1.

Tableau VII :Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes des patients présentant une anomalie du gène EVI1
Figures

Tableau VIII : Analyse des plaquettes des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

Tableau IX : Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

Tableau X : Analyse du myélogramme des patients présentant une anomalie du gène EVI1

Tableau XI : Analyse du myélogramme des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

Tableau XII : Analyse de la survie

FIGURES :

Figure 1 : Schéma des gènes EVI1, MDS1 et MDS1/EVI1
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03781119>

Figure 2 : Domaines protéiques d'EVI1. Les carrés noirs correspondent au motif en doigt de zinc, RD pour les domaines de répression et ac pour les régions acides. D'après Gene 396, R. Wieser, 'The oncogene and developmental regulator EVI1: Expression, biochemical properties, and biological functions', pages 346-357.

Figure 3 : partenaires d'EVI1 et de MDS1/EVI1 impliqués dans les translocations. D'après <http://atlasgeneticsoncology.org>

Figure 4 : dérégulation du gène EVI1, d'après Hélène Van Oost Masson *et al.* 2008.
Laboratoire de cytogénétique Hématologique du CHU de Nantes

Figure 5 : structure du gène PRDM16 et de ces deux transcrits, PRD pour PR domaine, DBD pour DNA binding domain, PRR pour proline rich domain, RD pour repressor domain et AD pour acidic domain. D'après Nishikata *et al.*, 2003.

Figure 6 : exemple de translocation t(1 ;3)(p36 ;q21) en G banding (à gauche) et R banding (à droite), extrait de <http://atlasgeneticsoncology.org>

Figure 7 : sonde Kreatech EVI1

Figure 8 : nouvelle sonde triple couleur Ktreatech ref : KB-10205 ainsi que son image en FISH

Figure 9 : analyse par FISH d'une métaphase de patient présentant une inv(3)(q21q26) avec la sonde commerciale EVI1 dual color Kreatech ref. KB 10204, stratégie break apart

Figure 10 : analyse par FISH d'une métaphase de patient présentant une t(2 ;3)(p21 ;q26) avec la sonde commerciale EVI1 dual color Kreatech ref. KB 10204, stratégie break apart

Figure 11 A: patient BIT, anomalie RPN1 en 3q21, par une sonde break apart. B : patient LOR, anomalie PRDM16 en 1p36, par une sonde break apart. Photos du laboratoire de Génétique Hématologique, Clinique Universitaire de Bruxelles.

figure 12 : sang coloré au MGG : présence de plaquettes géantes, de plaquettes de taille augmentée

Figure 13 : Présence de plaquettes dégranulées et de plaquettes géantes

figure 14 : anomalie des mégacaryocytes : mégacaryocytes en amas, unis ou hypo lobés, de petite taille.

Figure 15 : dysplasie granuleuse, dégranulation des polynucléaires, des métamyélocytes et des myélocytes.

figure 16 : analyse de l'expression des myéloperoxydase en cytochimie

figure 17 : Mégacaryocytes en amas, unilobés ou hypo lobés, image d'empéripolèse

Figure 18 : dystrophie de la lignée granuleuse et érythrocytaire des patients avec anomalie du gène PRDM16.

Figure19 : Immunohistochimie des patients ayant une anomalie PRDM16.

Figure 20 : Analyse de la survie médiane par la méthode de Kaplan-Meier de notre série

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La plupart des cancers, dont les leucémies, sont liés à des altérations du génome pouvant modifier la physiologie cellulaire. Ces anomalies génétiques sont soit innées (présentes dans les cellules somatiques et les cellules souches) ou acquises (dans les cellules somatiques). Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes, les inversions, les translocations, les délétions et les duplications sont responsables de transformation néoplasique et sont souvent retrouvées dans le clone leucémique. Le plus souvent, une seule mutation ne suffit pas à la transformation néoplasique et plusieurs mécanismes de mutations sont nécessaires à la formation du clone. L'étude des anomalies chromosomiques dans les leucémies a conduit à l'identification de plusieurs régions chromosomiques contenant des gènes importants pour l'hématopoïèse et l'organopoïèse.

Un des gènes identifiés, à la fois chez la souris et chez l'homme, dans l'induction des leucémies myéloïdes est EVI1 (pour ecotropic viral integration site 1). En effet, l'activation de ce gène par insertion de génome proviral au niveau du son locus provoque des hémopathies myéloïdes dans un modèle murin (Morishita *et al*, 1988).

Les hémopathies myéloïdes regroupent des pathologies hétérogènes, tant au niveau biologique que pronostique : les syndromes myélodysplasiques (SMD), les syndromes myéloprolifératifs (SMP), les syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques, les néoplasies myéloïdes avec hyper éosinophilie et les leucémies aiguës myéloblastiques. Ces différentes pathologies ont une présentation différente dans la moelle osseuse (tableau I).

Maladie	cellularité MO	% blastes MO	Maturation	Morphologie	Hématopoïèse	sang
SMP	Normalement augmentée, souvent normal dans la TE	Normal ou légèrement augmenté; <10% en phase chronique	Présente	Lignée granuleuse et érythrocytaire normale mégacaryocytes anormaux	Efficace	Variable; une ou plusieurs lignées myéloïdes souvent augmentées
Hémopathie myéloïde/ lymphoïde avec éosinophilie et des anomalies de PDGFRA, PDGFRB or FGFR1	Augmentée	Normal ou légèrement augmenté; <20% en phase chronique	Présente	Relativement normal	Efficace	Eosinophilie (> 1,5 G/L)
SMD	Augmentée, parfois normocellulaire ou hypocellulaire	Normal ou augmenté, <20%	Présente	Dysplasie d'une ou plusieurs lignées	Inefficace	Cytopénie(s)
SMD/SMP	Augmentée	Normal ou légèrement augmenté; <20%	Présente	Le plus souvent une ou plusieurs lignées dysplasiques ; LMMJ a souvent une dysplasie minimal	Variable selon les lignées	Variable, leucocyte souvent augmenté
LAM	Souvent augmentée	Augmenté, >20%, excepté dans certains cas d'anomalies cytogénétiques ou des cas de leucémie à érythroblastes	Variable, souvent minime	Variable, souvent minime	Variable	Leucocytes variables, souvent anémie et thrombopénie

Tableau I : Classification des hémopathies malignes proposées par l'OMS (Swerdlow et al., WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues , 2008)

La diversité des résultats obtenus dans le traitement des néoplasies myéloïdes a conduit à identifier des facteurs pronostiques pour la stratification des malades en différents groupes de risque afin d'adapter le traitement à la probabilité de rechute et à la survie .

Parmi ces facteurs pronostiques figurent l'âge, certains paramètres biologiques (cytopénie, hyperleucocytose...) et les anomalies cytogénétiques clonales. Ces anomalies constatées au diagnostic dans les blastes leucémiques constituent l'un des facteurs pronostiques les plus importants permettant de prédire la réponse au traitement, la durée de rémission et la survie

globale. Ainsi, dans les LAM et les SMD, la valeur pronostique de ces anomalies a été identifiée ; 3 groupes pronostiques sont reconnus par comparaison au caryotype normal : favorable (meilleure survie que les caryotypes normaux), intermédiaire (survie identique) et défavorable (survie inférieure).

C'est ainsi que les anomalies des gènes d'EVI1 (ecotropic viral integration site 1) et PRDM16 (PR domain containing 16) ont été associées à un mauvais pronostic avec des survies inférieures.

Nous avons donc étudié de façon rétrospective de 1996 à 2009, la présentation cytologique, cytochimique et immunophénotypique de cas de patients nantais présentant des LAM avec des anomalies du gène EVI1 (17 patients) et du gène PRDM16 (4 patients). Pour des raisons d'homogénéité, le seul cas d'anomalie EVI 1 observé dans un SMD (AREB I) a été exclu de cette série.

Cette thèse se divise en 6 parties.

Une première partie est consacrée aux généralités sur les leucémies aiguës myéloblastiques et les gènes EVI 1 et PRDM16

Une seconde partie porte sur les objectifs de l'étude

Une troisième partie s'intéresse à la description des patients, du matériel et des méthodes.

Une quatrième partie concerne les résultats

Une cinquième partie aborde la discussion des résultats

La dernière partie étant la conclusion

GENERALITES

GENERALITES :

I - La Leucémie Aiguë Myéloblastique (LAM)

A – Définition et critères diagnostiques

La leucémie aiguë myéloblastique (ou myéloïde) est définie par une expansion clonale de blastes myéloïdes dans la moelle osseuse, le sang ou d'autres tissus dérivant de la transformation maligne d'un progéniteur myéloïde totipotent ou engagé (CFU–GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU–MK, BFU-E, CFU-E). C'est une maladie cliniquement, morphologiquement et génétiquement hétérogène qui peut toucher une ou plusieurs lignées myéloïdes.

Selon l'actuelle classification OMS 2008 des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, le diagnostic positif est posé par la mise en évidence sur le myélogramme, la biopsie ostéo – médullaire (BOM) ou l'hémogramme, d'un pourcentage de blastes supérieur ou égal à 20% (Swerdlow *et al*, 2008). Le seuil retenu par la précédente classification FAB (French American British) était de 30% mais plusieurs études ont démontré une survie à long terme identique pour les patients ayant entre 20 et 30% de blastes et ceux ayant plus de 30% de blastes au diagnostic (Estey *et al*, 1993 ; Greenberg *et al*, 1997).

A noter le cas particulier de certaines translocations récurrentes, incluant la t(8 ;21), l'inv(16) et la t(15 ;17) et leurs variants cytogénétiques, dont la présence suffit à elle seule au classement en LAM, et ce, quel que soit le pourcentage de blastes.

B– Classification des LAM

La classification OMS 2008 des leucémies aiguës s'appuie sur des caractéristiques cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et génétiques dans l'objectif de définir des entités homogènes en corrélation avec leur comportement clinique. Le caractère myéloïde repose sur des données cytologiques (aspect des blastes, présence de corps d'Auer), cytochimiques (activité myéloperoxydase, butyrate - estérase, estérase – NASDA inhibée par le fluorure de sodium) et phénotypique : expression d'antigènes myéloïdes, incluant la myéloperoxydase, les CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD65 et CD117, d'antigènes plaquettaires, correspondant aux glycoprotéines GpIIbIIIa (CD41a), GPIb (CD42), et GpIII (CD61), d'antigènes érythrocytaires ABH, rhésus et les glycophorines A et B (CD235A et CD235B respectivement) pour ne citer que les principaux.

Les LAM sont classées en sept catégories.

- 1 – LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes
- 2 – LAM avec caractéristiques de myélodysplasie (LAM à antécédent de SMD, LAM avec dysplasie multilignée et LAM à caryotype complexe)
- 3 – LAM secondaire, induite par un traitement anti-néoplasique
- 4 – LAM autre, non caractérisée
- 5 – Sarcome myéloïde
- 6 – Prolifération myéloïde liée à la trisomie 21
- 7 – Leucémie à cellules dendritiques.

La première catégorie est la plus importante pour ce travail. En effet, elle comprend :

- LAM à translocation t(8 ;21)(q22 ;q22) impliquant les gènes RUNX1 – RUNX1T1
- LAM avec inversion du chromosome 16 : inv(16)(p13.1q22) impliquant les gènes CFBF-MYH11
- LAM de type promyélocytaire à t(15 ;17)(q22 ;q12) impliquant les gènes PML-RARA
- LAM à t(9 ;11)(p22 ;q23) impliquant les gènes MLLT3-MLL
- LAM à t(6 ;9)(p23 ;q34) impliquant les gènes DEK – NUP214
- LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3 ;3)(q21 ;q26.6) impliquant les gènes RPN1-EVI1. Cette catégorie fait l'objet de notre étude. A noter qu'elle n'était pas incluse dans la version 2001 de la classification OMS (Jaffe S.E. *et al*, 2001).
- LAM à mégacaryoblastes à t(1 ;22)(p13 ;q13) impliquant les gènes RBM15-MKL1
- LAM avec des mutations de gènes : NPM1 , CEBPA : entité provisoire, des études complémentaires sont nécessaires pour qu'elles deviennent une classe à part entière.

La quatrième catégorie correspond à l'ensemble des formes morphologiques décrites par l'ancienne classification FAB (Bennett et al, 1976, 1985) comprenant les LAM0 (à différenciation minimale), les LAM1 (sans maturation granuleuse), les LAM2 (avec maturation granuleuse), les LAM4 (myélomonocytaire), les LAM5 (monoblastique), les LAM6 (érythroïde) et les LAM7 (mégacaryoblastique). Cette catégorie comprend aussi les très rares leucémies à polynucléaires basophiles et les myélofibroses aiguës. Pour des raisons pratiques, cette classification est toujours largement utilisée dans la plupart des publications ; nous la retrouverons également dans notre étude.

Les trois dernières catégories sont des entités plus rares, elles n'apparaissent pas sous cette forme dans la classification OMS 2001 (Jaffe *et al*, 2001).

C – Epidémiologie

L'incidence globale des leucémies aiguës est d'environ 3,4 nouveaux cas par an pour 100000 habitants, avec 75% des cas de l'adulte qui sont des LAM. Cette incidence augmente progressivement avec l'âge, passant de 1,2/100000 avant 30 ans à 16,3/100000 à 65 et 30/100000 au delà de 80 ans. Le nombre estimé de nouveaux cas de LAM en 2004 en France était de 2500 cas, où elle représentait 1,2% de la mortalité par cancer. A Nantes, en 2008, nous avons diagnostiqué 123 nouveaux cas de LAM.

Le sexe ratio homme/femme est de 1:1 et il n'existe pas de facteur ethnique connu. Les facteurs étiologiques identifiés sont certains virus, les rayonnements ionisants, la chimiothérapie cytotoxique et les hydrocarbures benzéniques (risque relatif = 2). Cependant, malgré ces associations bien établies, seulement 1 à 2% des LAM peuvent être attribués à ces agents toxiques (Sandler et *al*, 1997). Les LAM peuvent être *de novo* ou secondaires à une hémopathie antérieure (myélodysplasie, syndrome myéloprolifératif, syndrome myélodysplasique / myéloprolifératif) ou un traitement (therapy related).

Les syndromes myélodysplasiques sont caractérisés un asynchronisme de maturation. En effet, deux mécanismes simultanés mais contradictoires sont présents: la prolifération et l'apoptose exacerbées des cellules hématopoïétiques, avec hématopoïèse inefficace, pouvant conduire à une hypercellularité ou une normocellularité de la moelle osseuse, contrastant avec une pancytopenie périphérique. Ils regroupent l'anémie réfractaire (AR), la neutropénie réfractaire (NR) la thrombopénie réfractaire (TR), l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne, la cytopénie réfractaire à dysplase multilignée, l'anémie réfractaire avec excès de blaste (AREB), le syndrome myélodysplasique à anomalie 5q-, les syndromes

myélodysplasiques inclassables et les syndromes myélodysplasiques de l'enfant. Une entité provisoire a été créée : la cytopénie réfractaire de l'enfant (Swerdlow *et al*, 2008).

Les syndromes myéloprolifératifs sont caractérisés par une expansion clonale d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Leur incidence est de 6 à 10/100000 habitants par an. Ils sont fréquemment associés à une splénomégalie ou hépatomégalie. Ils regroupent plusieurs pathologies : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie à polynucléaires neutrophiles, la polyglobulie vraie (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MF), la leucémie à éosinophile, les mastocytoses systémiques et les syndromes myéloprolifératifs inclassables (Swerdlow *et al*, 2008).

Les syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques sont des pathologies mixtes caractérisées par une hypercellularité de la moelle osseuse liée à la prolifération d'une ou de plusieurs lignées myéloïdes présentant des signes de myélodysplasies associés. Ils regroupent la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), la leucémie myéloïde chronique atypique, la leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML) et les syndromes myéloprolifératif/myélodysplasique inclassables. Une entité provisoire a été créée : l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (Swerdlow *et al*, 2008).

Ces hémopathies myéloïdes ont toutes un risque plus ou moins important de transformation en LAM.

D– Impact de la cytogénétique dans les LAM :

La valeur de l'étude cytogénétique dans la LAM est double.

Tout d'abord, la cytogénétique a permis d'améliorer de façon significative notre connaissance des bases moléculaires des mécanismes impliqués dans la leucémogénèse et donc de mieux appréhender la très grande hétérogénéité clinique et biologique de cette hémopathie. La découverte d'anomalies chromosomiques récurrentes a permis de confirmer le rôle des altérations géniques dans l'oncogénèse des blastes leucémiques ainsi que de cloner les gènes dont la dérégulation aboutit à l'apparition et au maintien du phénotype tumoral (Look *et al*, 1998, Caligiuri *et al*, 2001).

Dans un second temps, les anomalies chromosomiques apportent des informations pour le diagnostic, le pronostic et l'évaluation de la réponse au traitement (Lodé *et al*, 2007). La découverte de ces anomalies permet le développement de thérapie ciblée. Ainsi, pour la LAM à t(15 ;17) avec apparition du gène de fusion PML-RARA une molécule l'acide tout trans rétinoïque (ATRA) permet la différenciation du clone leucémique.

Ces anomalies cytogénétiques sont utilisées dans l'actuelle classification OMS des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes pour définir des entités spécifiques au sein des hémopathies myéloïdes (Swerdlow *et al*, 2008). La cytogénétique reste un des facteurs pronostiques indépendants les plus importants dans la LAM (Grimwade *et al*, 1998 ; Wheatley *et al*, 1999).

1 – Caractéristique générale de la cytogénétique

Par définition, l'analyse du caryotype nécessite l'obtention de métaphases au sein de clone tumoral. Le prélèvement (moelle osseuse, sang, ganglion) doit être de bonne qualité et rapidement mis en culture. Cette étape de culture in vitro varie de quelques heures à 3 à 4 jours. Les prélèvements sanguins ou médullaires sont directement mis en culture dans un milieu supplémenté en sérum. L'ajout de colchicine dans le milieu provoque le blocage des cellules en stade métaphasique de la mitose. Les cellules, après avoir dispersé les chromosomes dans un milieu hypotonique, sont fixées sur lame puis colorées. L'analyse des chromosomes s'effectue désormais avec l'aide d'un système d'acquisition d'images par informatique, et le classement se fait directement sur l'écran d'ordinateur. L'analyse d'un certain nombre de métaphases (idéalement 20 par patient) permet d'établir la formule chromosomique. Celle-ci est établie selon une nomenclature internationale régulièrement actualisée. Il est important d'avoir en mémoire que l'on travaille sur une population cellulaire mixte, normale et tumorale. Il est donc fréquent d'obtenir des mosaïques correspondant à ces deux populations cellulaires. Si le résultat du caryotype est normal, soit les cellules tumorales ont un caryotype qui ne met pas en évidence d'anomalie clonale visible, soit seules les cellules normales se sont divisées pendant la culture et le caryotype n'est pas représentatif du clone tumoral. Il faut donc rester prudent quant à l'interprétation d'un caryotype normal. En revanche, si l'anomalie est présente dans toutes les mitoses, il faut garder en mémoire la possibilité d'une anomalie constitutionnelle (Lodé. et al, 2007).

La cytogénétique est importante pour la prise en charge des patients et pour établir le pronostic. La plupart des essais cliniques intègrent cette donnée pour la stratégie proposée ; les patients présentant des anomalies cytogénétiques de bon pronostic sont traités de façon moins agressive. Certaines anomalies sont fortement corrélées à l'aspect cytologique, c'est ce

que nous montrerons dans notre étude pour les anomalies liées aux gènes EVI1 et PRDM16.

La majorité des patients atteints de LAM avec caryotype analysable au diagnostic présentent des anomalies chromosomiques clonales, à savoir une anomalie de structure ou le gain de chromosomes sur au moins deux mitoses, ou la perte de chromosomes sur au moins trois métaphases. Le taux de caryotypes anormaux est d'environ 50% sur certaines grandes séries mais il peut varier de 54 à 78%. L'absence d'anomalie détectable sur le caryotype standard n'élimine pas la possibilité de réarrangement cryptique, visible par FISH ou par technique de biologie moléculaire.

2 – Les différents types d'anomalies du caryotype

i– Anomalies primaires

Ces anomalies primaires sont considérées comme jouant un rôle essentiel dans les étapes précoces de la leucémogénèse et sont séparées en anomalie de structure comprenant les translocations, insertions, inversions, délétions, isochromosomes et les anomalies de nombre. Les anomalies de structure équilibrée les plus fréquemment rencontrées sont la t(8 ;21), l'inv(16), et la t(15 ;17) associées à un pronostic favorable. Au sein des anomalies de nombre, la trisomie du 8 est la plus fréquente et elle représente 3 à 4% des LAM *de novo* de l'adulte . Les autres anomalies les plus fréquentes sont la trisomie des chromosomes 13, 11, 21 et 4. Les monosomies les plus fréquentes sont la perte du chromosome 7, du chromosome Y suivies des délétions des chromosomes 5, 9 et 21. Le rôle de ces anomalies dans la progression tumorale n'est pas encore connu avec précision mais certaines sont associées à un pronostic péjoratif (monosomie du 7).

ii – Anomalies secondaires

Les anomalies secondaires sont, par opposition aux anomalies primaires, définies par la présence d'au moins deux anomalies chromosomiques dans le même clone. Elles représentent 45% des caryotypes anormaux chez l'adulte et peuvent être mises en évidence au diagnostic comme à la rechute. Contrairement aux anomalies primaires, elles comprennent plus fréquemment des anomalies déséquilibrées (délétions, isochromosomes et translocations déséquilibrées). Les plus fréquentes sont la trisomie du 8, der(16)t(1;16), délétion du 7q et la trisomie du chromosome 21. De plus, la fréquence de ces anomalies secondaires est dépendante de l'anomalie primaire à laquelle elles sont associées.

Ainsi, l'inv(3)(q21;q26) est isolée dans seulement 30% des cas.

3 – Valeur pronostique de la cytogénétique

La valeur pronostique de la cytogénétique dans les LAM a été démontrée pour la première fois dans une étude prospective multicentrique durant le 4^{ème} Workshop International sur les chromosomes dans la Leucémie (IWCL) en 1982. Des différences significatives des taux de rémission, d'incidence cumulative des rechutes et de la survie globale ont été observées chez les 716 patients de l'étude préalablement regroupés par anomalie cytogénétique.

i – Anomalies de bon pronostic

Les anomalies associées à un bon pronostic sont les anomalies impliquant le réarrangement du gène Core Binding Factor (CBF), la t(8.21) impliquant sa chaîne α et

l'inv(16)/t(16 ;16) impliquant sa chaîne β . Cette anomalie conduit à la plus grande sensibilité de ces LAM à l'aracytine. La troisième anomalie de bon pronostic est la t(15 ;17). Cette translocation réciproque entraîne le réarrangement du gène codant pour la sous-unité alpha du récepteur à l'acide rétinoïque (RAR α) rendant ces LAM sensibles à l'acide tout trans rétinoïque (ATRA).

ii– Anomalies de pronostic intermédiaire

Les patients présentant un caryotype normal au diagnostic sont considérés comme ayant un pronostic intermédiaire. En effet, leur survie est inférieure à celle obtenue avec les translocations de bon pronostic mais reste supérieure à celles des anomalies de mauvais pronostic. Ces patients représentent une entité hétérogène ; des analyses de biologie moléculaire permettent d'affiner le pronostic (recherche du réarrangement du gène MLL, recherche de mutations du gène NPM1, FLT3). En effet, les mutations de NPM1 et CEBP α sont favorables, alors que la duplication en tandem de FLT3, l'hyper expression de ERG et les réarrangements de MLL sont défavorables (Santamaria *et al*, 2009).

Cette catégorie comprend par ailleurs les anomalies qui ne sont classables ni dans le groupe favorable ni dans le groupe défavorable, comme la plupart des trisomies et des monosomies isolées, en dehors des anomalies des chromosomes 5 et 7.

iii– Anomalies de mauvais pronostic

Plusieurs anomalies ont été identifiées de façon itérative comme étant associées à un pronostic défavorable . Parmi elles, on retrouve les anomalies en 3q comme l'inv(3)t(3 ;3), la

délétion 5q, la monosomie du chromosome 5, du chromosome 7, la t(9 ;22), les anomalies 12p et les caryotypes complexes.

La définition du caryotype complexe reste discutée et ne fait pas l'objet d'un consensus. En effet, même si tous les auteurs s'accordent sur le fait qu'il est systématiquement associé à un mauvais pronostic, certains considèrent un caryotype complexe à partir de 5 anomalies dans un même clone (Grimwade *et al*, 2001) alors que d'autres le considèrent comme tel à partir de 3 anomalies (Fröling *et al*, 2006). Ces différences sont principalement liées au fait que certaines études ont mis en évidence un pronostic plus péjoratif chez les patients présentant au moins 5 anomalies que chez les patients en ayant 3 ou 4 (Frag *et al*, 2006).

E – Principes de la prise en charge et du traitement des LAM :

L'obtention de la rémission complète est basée sur l'administration d'une chimiothérapie d'induction associant l'aracytine et une anthracycline dont les plus utilisées sont la daunorubicine et l'idarubicine. Ce traitement de référence est applicable à tous les âges et pour l'ensemble des LAM à l'exception des formes promyélocyaires à t(15 ;17) où il est associé systématiquement à l'ATRA (acide tout - trans rétinoïque). Les patients jeunes (moins de 60 ans) tirent le plus souvent bénéfice de cures de chimiothérapie intensive de consolidation successives mais aucune chimiothérapie d'entretien de la rémission complète n'est considérée comme standard chez les sujets de plus de 60 ans. L'allogreffe de moelle osseuse peut être proposée jusqu'à 65 ans grâce aux conditionnements non myéloablatifs et est envisagée chez les patients appartenant au groupe de cytogénétique intermédiaire ou défavorable compte tenu du risque élevé de rechute. Dans le groupe des LAM à cytogénétique favorable, l'allogreffe de moelle osseuse est le plus souvent proposée aux patients rechutant

ou avec une maladie résiduelle positive persistante en première rémission complète, tel que le propose l'actuel protocole LAM–CBF en France.

1 – Stratégie d'induction

Durant les dernières décennies, un ensemble d'études a permis d'établir un schéma d'induction considéré comme standard par la majorité des équipes. Ce traitement de référence comprend l'aracytine (drogue cycle dépendante) à la dose de 100 mg/m²/j pendant 7 jours et la daunorubicine (drogue cycle indépendante) à la dose de 45 à 60 mg/m²/j pendant 3 jours. Avec cette chimiothérapie d'induction, le taux de RC chez les sujets de moins de 60 ans est de 60 à 80% pour une survie globale à 5 ans d'environ 30%. Chez les sujets de plus de 60ans, le taux de RC varie de 40 à 55% et le taux de survie globale à 5 ans n'excède pas 15%

2 – Stratégie de consolidation

Pour les patients jeunes de risque favorable, les données suggèrent l'intérêt d'effectuer 3 ou 4 cures de chimiothérapie de consolidation comprenant de l'aracytine à fortes doses afin d'augmenter le taux de guérison (Dodge *et al*,1999). Les patients de risque cytogénétique intermédiaire reçoivent également souvent un traitement de consolidation à base de fortes doses d'aracytine avant de bénéficier d'une allogreffe de moelle lorsqu'un donneur compatible, apparenté ou non, a pu être identifié. Chez les patients à haut risque cytogénétique ou dans le cadre d'une LAM secondaire à une hémopathie pré-existante, l'allogreffe est envisagée systématiquement car l'effet allogénique anti-tumoral prévient habituellement plus efficacement le risque de rechute que la chimiothérapie conventionnelle.

Pour les patients de plus de 65ans, plusieurs facteurs sont à prendre en compte. Les particularités liées à l'hôte dans la LAM du sujet âgé amènent un certain nombre de questions sur la prise en charge optimale de cette hémopathie : celle des groupes de patients à qui il convient de proposer un traitement à visée curative plutôt que palliatif, l'intensité du traitement à envisager et la place des facteurs de croissance hématopoïétique.

II– Cas particulier de la LAM avec inv(3)(q21 q26.2) ou t(3 ; 3)(q21 ;q26.2), impliquant les gènes RPN1 et EVI1.

A – Définition

Cette LAM à translocation particulière a été décrite comme une entité à part entière dans la nouvelle classification OMS 2008. Elle est souvent associée à un taux normal ou élevé de plaquettes dans le sang périphérique. Il existe des anomalies particulières de la lignée mégacaryocytaire avec des mégacaryocytes de petites tailles en amas, présentant des noyaux hypolobulés (un ou deux lobes) (Sweet *et al*, 1979 ; Bitter *et al*,1985 ; Secker-Walker *et al*,1991 ;), parfois associées à une dysplasie des autres lignées.

B – Epidémiologie

Elle représente 1 à 2% des LAM (Byrd *et al*, 2002 ; Slovak *et al*, 2000) et est plus fréquente chez l'adulte avec un sexe ratio égal à 1. Elle peut arriver soit de novo ou secondairement à une hémopathie myéloïde. L'anomalie du gène EVI1 a été décrite chez des patients présentant une myélodysplasie, une LMC en transformation (Secker-Walker *et*

al,1995 ; De Weer *et al*, 2008) mais aussi lors de la transformation de leucémie myéломocytaire chronique (LMMC).

C – Présentation clinique

Le plus souvent, les patients présentent une anémie, sans thrombopénie. Il peut y avoir une thrombocytose chez 7 à 22% des patients (Gripp *et al*, 1993 ; Secker-Walker *et al*, 1991).

D – Morphologie et cytochimie

Dans le sang, il peut y avoir des polynucléaires avec anomalies de pseudo Pelger – Huët, avec ou sans présence de blastes. La présence de paquettes géantes et hypogranulées est fréquente (Bitter *et al*,1985). D’après plusieurs auteurs, les blastes de cette leucémie peuvent correspondre quant à la cytologie et la cytochimie à ceux de tous les sous-types de LAM de la classification FAB (sauf la LAM3) ; les plus fréquentes étant la LAM0, LAM4 et LAM7. (Fonatsch *et al*, 1994 ; Secker-Walker *et al*,1995). Nous affinerons cette comparaison dans notre travail.

La cellularité de la moelle osseuse est variable, certains cas étant hypo-cellulaires. Parfois une myélofibrose est associée. Une dysplasie multilignée associée à des anomalies particulières des mégacaryocytes permettent d’évoquer cette hypothèse au diagnostic. (Fonatsch *et al*, 1994 ; Secker-Walker *et al*,1995 Jenkins *et al*, 1989). Les mégacaryocytes sont souvent de petite taille (<30µm, monlobés ou bilobés) et assez nombreux, mais d’autres anomalies sont parfois décrites comme les mégacaryocytes en amas. Dans la moelle osseuse, il peut y avoir une augmentation des polynucléaires éosinophiles, basophiles ou des mastocytes. La BOM

montre aussi une dystrophie des mégacaryocytes : petites tailles, hypolobés, en nombre augmenté et en amas.

E – L'Immunophénotypage

Les études sont assez limitées. Les blastes expriment généralement les marqueurs myéloïdes tel que le CD13, le CD33, les marqueurs d'immaturation comme le HLA DR, le CD34 et le CD38 et plus inconstamment le CD7. Les blastes leucémiques peuvent aussi exprimer les marqueurs de la lignée plaquettaire comme le CD41 et le CD61. (Shi *et al*, 1997)

F – La génétique

Plusieurs anomalies peuvent toucher le chromosome 3 dans les néoplasies myéloïdes. L'inv(3)(q21q26.2) ou la t(3;3)(q21;q26.2) sont les mécanismes les plus communs. Ces anomalies impliquent le gène EVI1 au locus 3q26.2, ou sa forme plus longue MDS1-EVI1, avec le gène RPN1 au locus 3q21. RPN1 agit comme enhancer de l'expression d'EVI1, d'où il résulte une augmentation de la prolifération et des défauts de différenciation cellulaire. (Suzakawa *et al*, 1994 ; Lahortiga *et al*, 2004 ; Nucifora *et al*, 2006).

D'autres anomalies cytogénétiques touchant le locus 3q26.2, comme la t(3;21)(q26.2;q22) conduisant à la formation d'un gène de fusion EVI1-RUNX1 sont le plus souvent observées dans les néoplasies secondaires à un traitement. Ces pathologies ne sont pas incluses dans cette catégorie de la nouvelle classification OMS 2008.

Des anomalies secondaires à celle du chromosome 3 sont souvent observées sur les caryotypes comme la monosomie du chromosome 7, présente dans la moitié des cas, suivie de

la délétion du bras long du chromosome 5. Cette anomalie est aussi accompagnée de caryotype complexe (Secker-Walker *et al*,1995)

Des patients présentant une LMC à t(9 ;22) peuvent aussi acquérir une inv3(q21q26.2) ou la t(3 ;3)(q21 ;q26.2) lors de l'accutisation de la maladie. Ces patients ont un pronostic plus sombre que ceux ayant la seule anomalie du chromosome 3.

G – Pronostic et facteur prédictif

C'est une pathologie agressive associée à une survie courte (Fonatsch *et al*, 1994 ; ; Secker-Walker *et al*,1995 ; Reiter *et al*, 2000). Une revue de la littérature du devenir des patients présentant une anomalie en 3q publiée en 1993, a montré que sur les 59 patients de l'étude, 3 sont encore en vie avec une survie sans événement à deux ans (Grigg *et al*, 1992). Deux patients présentant une myélodysplasie avec une inv3(q21q26.2) ont été décrits comme ayant répondu au trioxyde d'arsenic associé au thalidomide ; un de ces patients a obtenu une rémission complète (Raza *et al*, 2004).

III –Cytogénétique : implication des gènes EVI1 et PRDM16 dans les hémopathies myéloïdes

A - EVI1

1 - EVI1 : du gène à la protéine :

Dans les leucémies, les anomalies chromosomiques sont souvent acquises et observées seulement dans le clone leucémique. Plusieurs anomalies sont nécessaires pour la progression

des progéniteurs hématopoïétiques en clone leucémique. Dans les hémopathies myéloïdes, les anomalies identifiées en région 3q26 sont fortement évocatrices d'anomalie du gène EVI1 (ecotropic viral integration site 1). Ce gène a été identifié pour la première fois il y a une vingtaine d'années et nommé ainsi pour ses capacités à induire dans un modèle murin AKXD des transformations myéloïdes, et ce, quand il était activé par la présence d'ADN proviral au niveau de son locus (Mucenski *et al*, 1988 ; Morishita *et al*, 1988). EVI1 a ensuite été localisé sur le chromosome 3 de la souris (Mucenski *et al*, 1988). L'insertion de l'ADN proviral dans ce locus chez la souris a lieu dans deux régions bien définies. Dans la première région, elle induit une expression inappropriée d'EVI1 à travers l'activation du promoteur viral (la séquence LTR pour long terminal repeat) (Morishita *et al*, 1988). Ces séquences sont situées aux extrémités du génome du virus et permettent son intégration dans le chromosome cellulaire par l'intermédiaire d'intégrase virale. Le site préférentiel d'intégration est situé dans l'exon 1 non codant en amont du gène, ce qui suggère que la transcription d'EVI1 pourrait être permise par la séquence LTR du rétrovirus. EVI1 peut aussi être activé par l'intermédiaire d'un second site d'insertion au niveau du locus Cb-1/Fim3, situé 90 kb en amont de l'exon 1. Comme l'insertion du rétrovirus dans cette configuration est située loin du gène, l'activation d'EVI1 doit probablement se faire à l'aide d'activateur viral.

Bien que l'hyper-expression d'EVI1 dans les LAM soit liée à des réarrangements chromosomiques, aucune étude ne montre que, chez l'homme, elle n'est liée à l'insertion d'un rétrovirus. Le gène EVI1 a été isolé chez l'homme à l'aide d'une sonde codant pour le cDNA d'EVI1 murin appliquée au génome humain. Il a ainsi été isolé sur le chromosome 3, en région 3q24-q28 (Morishita *et al*, 1990).

Le gène est très conservé au cours de l'évolution. L'ADNc humain a 91% d'homologie avec la séquence de nucléotides de la souris et 94% avec la séquence d'acides aminés (Moroshita *et al*, 1990). Le gène EVI1 est situé sur le chromosome 3, au niveau de la

bande 3q26.2. Il recouvre 100 kb et contient 12 exons, avec une alternative possible pour l'exon 1 (1a ou 1b). Parmi ces 12 exons, 10 sont codants.

Une forme longue du gène *EVI1* a été identifiée, *MDS1/EVI1* issue d'un épissage entre le gène *MDS1* (myelodysplasia syndrome 1) et le second exon d'*EVI1* (Nucifora *et al*, 2005). *MDS1* a été identifié en premier car il est réarrangé dans les translocations t(3 ;21). Des techniques de FISH ont permis de localiser le gène 300 kb en amont d'*EVI1*. Il existe 5 transcrits de ce gène.

MDS1/EVI1 est exprimé indépendamment d'*EVI1*. Le produit de traduction fait 188 codons de plus qu'*EVI1*. Les 125 premiers codons proviennent des 2 premiers exons de *MDS1* et les 63 autres codons proviennent du second et troisième exon d'*EVI1*. Cette région, conservée lors de l'évolution, est appelée le « PR » domaine (Positive regulatory-Domain 1-binding factor 1 (PRD1-BF1)/ Retinoblastoma Interacting Zinc-finger protein 1 (RIZ1) homology) (figure 1). Ce domaine est aussi présent dans la protéine *BLIMP1* (Lin *et al*, 1997), et est commun à une famille de 16 protéines contenant des domaines en doigt de zinc et des domaines PR.

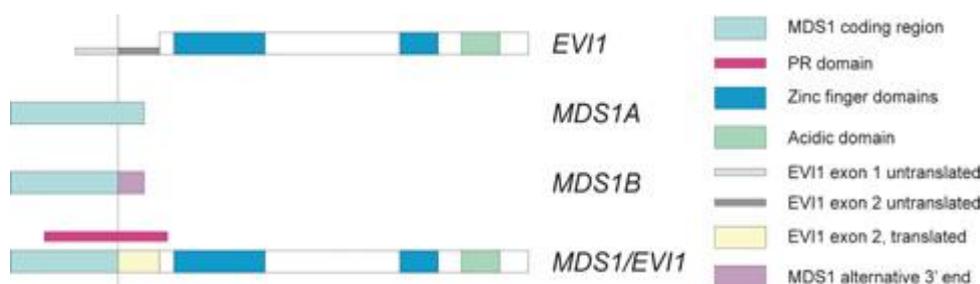


Figure 1 : Schéma des gènes *EVI1*, *MDS1* et *MDS1/EVI1*
<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03781119>

Les protéines contenant le domaine PR comme *MDS1/EVI1* ou *BLIMP1* sont souvent associées à une diminution de la croissance cellulaire ou de la différenciation terminale, et sont souvent sous exprimées dans les cancers. En revanche, les protéines comme *EVI1*,

n'ayant pas ce domaine PR sont hyper exprimées dans les cancers et sont considérées comme oncogéniques (Jiang *et al*, 2000 ; Barjesteh *et al*, 2003).

EVII code pour une protéine nucléaire de 145kDa composée de 1051 acides aminés. C'est une métalloprotéine, contenant des domaines en doigt de zinc, permettant la liaison aux protéines Smad3, GATA 1 (figure 2). Cette structure est fréquemment observée parmi les facteurs de transcription impliqués dans les translocations chromosomiques associées aux leucémies, comme BCL6 identifié dans les réarrangements en 3q27 (Baron *et al*, 1993).

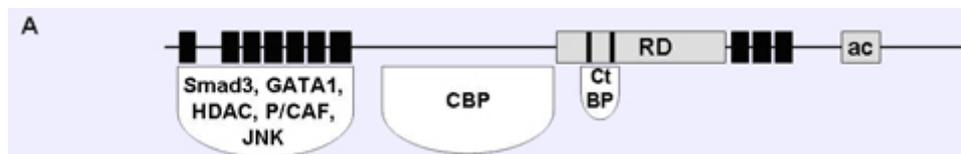


Figure 2 : Domaines protéiques d'EVII. Les carrés noirs correspondent au motif en doigt de zinc, RD pour les domaines de répression et ac pour les régions acides. D'après Gene 396, R. Wieser, 'The oncogene and developmental regulator EVII: Expression, biochemical properties, and biological functions', pages 346-357.

2 - Rôle d'EVII : (Wieser , 2007)

EVII est considéré comme un oncogène, un facteur de transcription en régulant la transcription, et comme protéine anti-apoptotique. Il a un rôle à la fois dans le développement et l'oncogénèse. Le rôle d'EVII a été déterminé sur lignées cellulaires et modèles murins (Goyama *et al*, 2009).

Rôle d'EVII dans l'embryogénèse

EVII n'est pas détecté dans les cellules embryonnaires totipotentes indifférenciées mais apparaît au troisième jour de la différenciation pour disparaître 10 jours plus tard (Sitailo *et al*, 1999). Le rôle d'EVII dans l'embryogénèse a donc été étudié par l'intermédiaire de modèle de souris KO (knock out) pour le gène. Les embryons homozygotes n'étaient pas

viables et les mutants présentaient une hémorragie, une pancytopenie, des anomalies cardiaques et du système nerveux périphérique (Hoyt *et al*, 1997).

Rôle d'EVI1 dans les cellules

Il y a aujourd'hui peu d'informations sur le rôle exact d'EVI1 dans les cellules, bien qu'il soit considéré comme un oncogène (Nucifora *et al*, 2006). Il est très possible que l'agressivité d'EVI1 comme oncoprotéine soit en partie médiée par la possibilité qu'a EVI1 d'annuler le potentiel inhibiteur de certaines cytokines qui contrôlent la croissance cellulaire. Il y a probablement plusieurs voies permettant ce mécanisme. Par exemple, pour inhiber l'action de l'IFN α (interféron) et permettre uniquement aux cellules sensible à l'IFN de proliférer, EVI1 inhibe spécifiquement l'induction d'un gène pro-apoptotique, PML. Cette spécificité semble dépendre de la situation des ISRE (éléments de réponse stimulés par l'IFN) dépendant de la TATA box du gène transcrit (Buonamici *et al*, 2005). En revanche, l'inhibition de la signalisation liée au TGF β dépend de l'interaction d'EVI 1 avec Smad3, un effecteur extracellulaire du TGF β , qui supprime l'activité transcriptionnelle de Smad3 (Sood *et al*, 1999). Il est important de noter qu'à la différence d'EVI1, MDS1/EVI1 coopère avec ces cytokines et augmente la sensibilité des cellules à la fois à l'IFN α et le TGF β , induisant la répression de la croissance cellulaire.

Rôle d'EVI1 dans la lignée hématopoïétique.

L'hyper expression d'EVI1 dans les lignées cellulaires et la moelle osseuse affecte non seulement la prolifération mais aussi la différenciation cellulaire. Le modèle de lignée cellulaire 32Dcl3 ayant permis l'étude des fonctions d'EVI1 est une lignée cellulaire

hématopoïétique murine dépendante à l'IL3 pour la croissance mais se différenciant en granulocytes en réponse au G - CSF. Les cellules de cette lignée hyper exprimant EVI1, se multiplient correctement avec l'IL 3 mais perdent leur sensibilité au G-CSF, les cellules entrant en apoptose. Il a été évoqué par Morishita *et al* en 1992 qu'EVI1 conduit à un blocage de la différenciation granuleuse et de l'apoptose parce que les cellules EVI1 positives sont incapables d'exprimer la myéloperoxydase et ne sont donc pas capables de progresser dans la différenciation . Cette hypothèse a été suggérée par les travaux sur cette lignée cellulaire. Nous allons donc la tester dans notre série de patients.

Kreider *et al* ont montré que l'expression d'EVI1 dans les progéniteurs hématopoïétiques de souris conduit à la perte d'expression de l'érythropoïétine, cela inhibant la différenciation de la lignée érythrocytaire. (Kreider *et al*, 1993 ; Buonamici *et al*, 2004).

Dans les cellules embryonnaires indifférenciées de souris, L'hyper-expression d'EVI1 provoque une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'expansion clonale et change le programme de différenciation des cellules embryonnaire vers la lignée mégacaryocytaire (Buonamici *et al*,2004).

Rôle d'EVI1 dans les pathologies myéloïdes :

EVI1 n'est pas détecté dans la moelle osseuse des individus sains (Nucifora *et al*, 1994). Son expression inappropriée dans les cellules hématopoïétiques a été impliquée dans le développement d'hémopathie myéloïde (LAM, SMD, LMC). Elle est liée à des mécanismes de réarrangements du gène en 3q26. Les mécanismes de dérégulation du gène sont des translocations ou des inversions conduisant à l'activation constitutive du gène. Les partenaires d'EVI1 les plus fréquemment rencontrés sont résumés sur la figure 3. EVI1 est réarrangé dans environ 5% des hémopathies myéloïdes (De Weer *et al*, 2008).

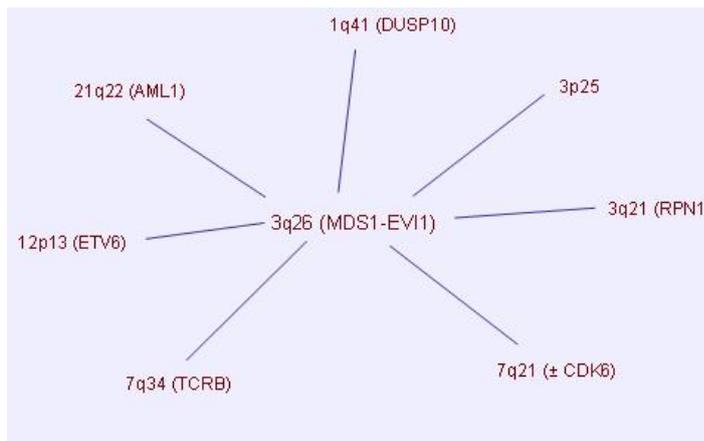


Figure 3 : partenaires d'EVI1 et de MDS1/EVI1 impliqués dans les translocations. D'après <http://atlasgeneticsoncology.org>

Les mécanismes de dérégulation les plus fréquents sont l'inv(3)(q21q26) et la t(3 ;3)(q21 ;q26) qui sont parfois associés à une monosomie du chromosome 7, une délétion du bras long du chromosome 7 et moins fréquemment à une perte partielle du chromosome 5.

Les 2 types de réarrangement impliquent les mêmes gènes (RPN1 et EVI1), mais le point de cassure de la t(3 ;3) est situé en 5' d'EVI1 (télomérique) alors que le point de cassure de l'inv(3) est situé en 3'(centromérique) (Nucifora *et al*, 2006). Dans les deux cas, cela conduit à une dérégulation d'EVI1 liée à la juxtaposition de l'activateur d'un gène de ménage la ribophorine I (Suzukawa *et al*, 1994). Lors de la translocation t(3 ;partenaire), il y a formation d'une protéine de fusion (figure 4)

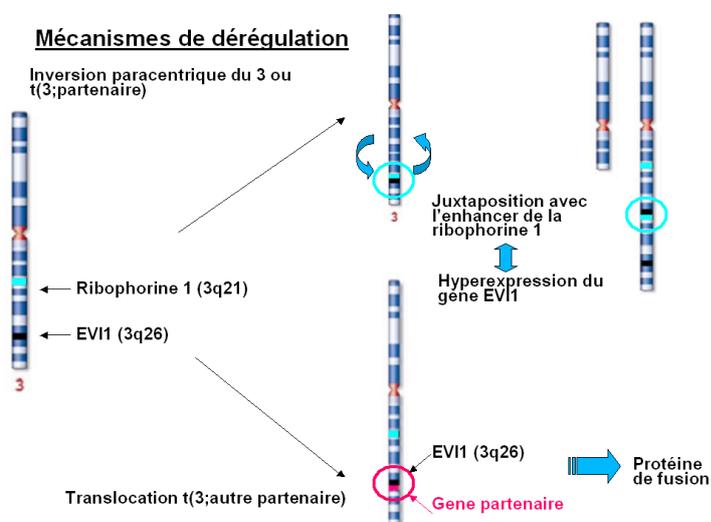


Figure 4 : dérégulation du gène EVI1, d'après Hélène Van Oost Masson *et al*. 2008. Laboratoire de cytogénétique Hématologique du CHU de Nantes

B - PRDM16 (PR domain containing 16) :1 - PRDM16 : du gène à la protéine

Le gène a été isolé la première fois dans une banque d'ADN provenant de patients présentant une LAM avec translocation t(1 ;3)(p36 ;q21). PRDM16 est aussi appelé MEL1 pour MDS1/EVI1 like gene. Il est situé au niveau du locus 1p36.3. Le gène mesure 369 kb et est formé de 17 exons. Il existe deux transcrits différents : MEL1 (170 kDa) et MEL1S (150 kDa). Comme MDS1/EVI1, MEL1 contient un domaine PR en N terminal, deux domaines de liaison à l'ADN en doigt de zinc, et un domaine acide en C terminal. MEL1S n'a pas de domaine PR comme EVI1 (figure 5). Les deux protéines fonctionnent en tandem et ont probablement des propriétés antagonistes comme EVI1/MDS1 et EVI1, le domaine PR agissant comme répresseur de la tumorigénicité. Ce sont des protéines présentes au niveau du noyau. Il y a 63% d'homologie entre PRDM 16 et MDS 1/EVI1, les deux étant des membres de la famille des protéines à domaines répétés en doigt de zinc (Nishikata *et al*, 2003).

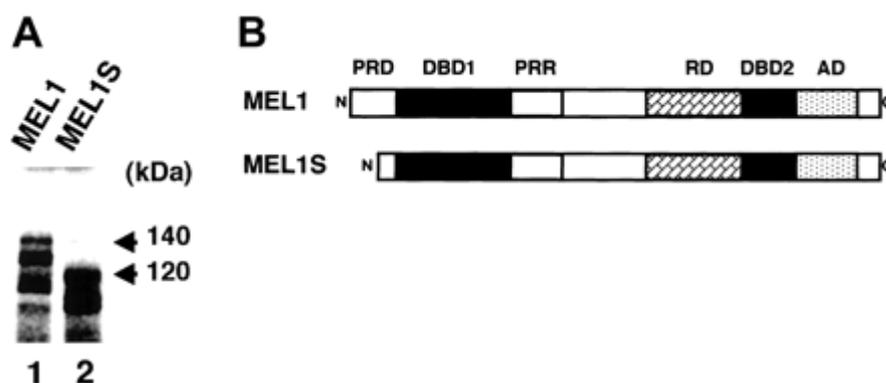


Figure 5 : structure du gène PRDM16 et de ces deux transcrits, PRD pour PR domaine, DBD pour DNA binding domain, PRR pour proline rich domain, RD pour repressor domain et AD pour acidic domain. D'après Nishikata *et al*, 2003.

2 - Rôle de PRDM16

Rôle dans la différenciation granuleuse :

Nishikata *et al* ont souhaité connaître quel était des 2 transcrits de PRDM16, celui qui était capable d'induire la leucémogénèse. Pour cela, ils ont travaillé sur des lignées cellulaires myéloïdes dépendantes à l'IL3. Après intégration de MEL1 ou de MEL1S par des rétrovirus dans le génome de ces cellules, ils ont étudié comment ces deux gènes affectaient la différenciation cellulaire après ajout de G-CSF dans le milieu. La maturation des cellules hyper-exprimant MEL1S était bloquée alors que les cellules exprimant MEL1 présentaient des signes de différenciation. Des observations similaires avaient déjà été montrées par Morishita *et al* en 1992 pour EVI1. Ces deux protéines ne possèdent pas de domaine PR à la différence de leur homologue MDS 1/EVI 1 et MEL1.

Il est donc probable que l'hyper-expression de ces protéines dont il manque le domaine PR (EVI 1 et MEL1S) soit responsable, en partie, de l'oncogénèse des cellules myéloïdes (Nishikata *et al*, 2003). Le domaine PR est donc un inhibiteur important de la tumorigénèse.

Des études complémentaires sur des modèles de souris transgéniques Knock Out pour le gène PRDM16 permettraient de connaître son rôle exact dans le développement.

Rôle dans la leucémogénèse :

Des études effectuées dans des modèles murins ont montré que l'insertion d'un rétrovirus dans les gènes de PRDM16 et d'EVI1 était capable, à lui seul, d'induire des leucémies (Modlich *et al*, 2008).

Il est impliqué dans la translocation $t(1;3)(p36;q21)$ touchant les gènes RPN1 et PRDM16 (figure 6). Il est donc retrouvé dans les hémopathies myéloïdes (SMD, LAM, SMP) présentant des anomalies similaires à celles observées dans les syndromes 3q21q26, comme l'anomalie des mégacaryocytes. Cette anomalie est associée à un mauvais pronostic. L'hyper-expression de PRDM16 est liée, comme pour EVI1, à la juxtaposition avec l'enhancer du gène de ménage de la ribophorine 1

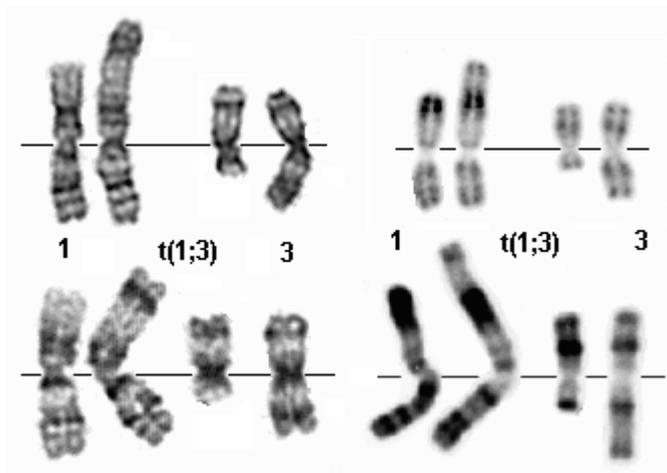


Figure 6 : exemple de translocation $t(1;3)(p36;q21)$ en G banding (à gauche) et R banding (à droite), extrait de <http://atlasgeneticsoncology.org>

Il existe d'autres partenaires associés à PRDM16. En effet, un cas de LAM secondaire à un traitement de cancer du sein a été décrit avec une anomalie du gène PRDM16. La translocation identifiée est la $t(1;21)(p36;q22)$, associée à une perte du bras long du chromosome 7, induisant la formation d'un transcrite de fusion RUNX1-PRDM16. Cette translocation est décrite comme de mauvais pronostic dans la littérature (Stevens-kroef *et al*, 2006).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de cette étude est de mieux préciser les caractéristiques morphologiques, immunochimiques et cytochimiques de patients nantais présentant une hémopathie myéloïde avec des anomalies des gènes EVI1 (17 patients) et PRDM16 (4 patients) en comparaison à l'ensemble des données des LAM diagnostiquées au laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes entre 1987 et 2009 (n=1844). Cette étude a aussi pour but d'analyser, de façon plus spécifique, l'expression des myéloperoxydases chez ce groupe de patients, actuellement peu décrite dans la littérature.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I – Les patients

Nous nous sommes intéressés aux patients présentant une LAM avec des anomalies du bras long du chromosome 3. Rappelons que le seul cas d'AREB I avec anomalie du gène EVI1 a été exclu de la série pour plus d'homogénéité. A la vue des corrélations effectuées dans la littérature entre les translocations (1 ;3) et les anomalies touchant EVI1 en 3q26, nous avons recherché dans notre base de données (laboratoire de Cytogénétique Hématologique, CHU de Nantes) les patients présentant ces anomalies et colligé les dossiers . Les patients ayant une t(1 ;3) ont été analysés au laboratoire de Génétique Hématologique à la Clinique universitaires Saint - Luc de Bruxelles pour confirmer l'atteinte des gènes PRDM16 et RPN1 par des techniques de FISH complémentaires.

Notre étude a inclus des patients présentant une LAM avec des anomalies des gènes EVI1 et PRDM16 diagnostiquées au laboratoire, entre 1996 et 2009. Pour être sélectionnés, les patients devaient avoir des données cytogénétiques interprétables en caryotype et en hybridation in situ (F.I.S.H.). Un total de 21 patients ont ainsi été retenus : 17 patients présentant une leucémie aiguë myéloïde et des anomalies du gène EVI1, et 4 patients des anomalies du gène PRDM16. Ils devaient avoir des renseignements suffisants quant à l'analyse des données biologiques : relecture des frottis de moelle possible chez 19/21 patients, des résultats de la réaction des myéloperoxydases en cytochimie pour 17/21 patients, et en cytométrie de flux pour 9/21 patients. Les patients ont été suivis dans différents centres : La Roche sur Yon, Cholet, Vannes, Nantes. Lorsqu'un traitement d'induction a été mis en place, les patients étaient suivis sur Nantes. L'âge moyen au diagnostic est de 54 ans.

II – Numération et lecture des lames de myélogramme et des frottis sanguins

Les patients ont eu une numération formule sanguine lors du diagnostic effectuée par un automate. De 1996 à 1998, l'automate utilisé était le Coulter STKS, de 1998 à 2001 le Sysmex SE 9500 et de 2001 à aujourd'hui le Sysmex XE 2100. Les frottis de sang ont été étalés et colorés par le SP100 jusqu'en 2008 puis le SP1000i (Sysmex).

A - Analyse des frottis de sang :

Ces données nous ont permis de diagnostiquer les cytopénies et d'apprécier la morphologie des différentes lignées (granuleuses, érythroïdes et plaquettaires). Les frottis de sang ont été analysés par deux cytologistes, à l'aide du microscope Olympus BH2.

B – Analyse des myélogrammes :

Les frottis de moelle ont été colorés au May Grünwald Giemsa, tel que :

3 minutes dans un bain de May Grünwald

5 minutes dans un bain de May Grünwald dilué au demi

15 minutes dans un bain de Giemsa à 10%

les frottis ont été ensuite lavés et séchés avant d'être lus par deux observateurs différents :

Nous avons analysé la cellularité, l'envahissement tumoral, la morphologie des blastes et la dysplasie des différentes lignées (mégacaryocytaires, granuleuses et érythroblastiques). Nous avons compté un frottis par patient, à raison d'un minimum de 200 cellules par observateur, afin d'obtenir le pourcentage des différentes lignées. Pour les besoins de l'étude, nous avons compté le nombre de mégacaryocytes présents sur chaque frottis. L'ensemble de

ces données a été comparé à celles de la totalité des LAM diagnostiquées à Nantes, évaluées techniquement dans les mêmes conditions par les deux cytologistes du laboratoire (Françoise Accard et Richard Garand) et dont les données ont été colligées dans une base, Dbase V, dédiée au LAM. Il faut noter que les lames de la cohorte de référence n'ont pas fait l'objet d'une relecture par les deux observateurs de l'étude EVI1/PRDM16 (Richard Garand et Marion Eveillard).

III– La réaction de Myéloperoxydase à la benzidine (MPO):

Cette technique s'effectue sur frottis de moelle secs, en utilisant toujours un témoin en parallèle (lame de sang avec de nombreux polynucléaires neutrophiles). Les lames sont fixées pendant 3 minutes avec un mélange (C) extemporané de deux solutions : la solution A (20 mL) contenant de la benzidine en solution alcoolique et la solution aqueuse B (0.4 mL) de nitroprussiate de Na. Pendant ce temps de fixation, la solution d'eau oxygénée à 0.6% (10 µL H₂O₂ à 30% + 25 mL d'eau distillée froide) est préparée.

Puis les lames sont colorées en deux étapes : les frottis sont recouverts par un mélange de 6 mL de solution C et 5mL d'H₂O₂ diluée pendant 5 minutes, puis lavés et séchés. Les frottis sont contre – colorés 10 minutes avec la solution de Giemsa à 7% préparée extemporanément (46.5 mL d'eau tamponnée + 3.5 mL de Giemsa) ; ils sont ensuite rincés et séchés.

La lecture s'effectue au microscope à immersion, il faut compter 100 blastes pour évaluer la positivité. Le seuil de positivité est évalué à 3% ; les résultats sont rendus en pourcentage et en intensité (tableau II).

BLASTES	TYPE FAB	MPO
Hémoblastes	LAM 1	
Myéloblastes	LAM 2 LAM 4	+ à ++
Promyélocytes	LAM 3	+++
Monoblastes	LAM 4 LAM 5	0 à +
Lymphoblastes	LAL	-
Autres blastes (lignée méga ou érythroblastique)	LAM 6 LAM 7	-

Tableau II : expression des résultats des myéloperoxydases

IV – Analyse de l’expression des myéloperoxydases en cytométrie en flux (CMF)

Lorsque cela était possible, des analyses par cytométrie de flux ont été effectuées. Nous avons étudié l’expression de la myéloperoxydase en intra-cytoplasmique chez 9/21 patients avec l’aide de deux cytomètres de flux sur la période de l’analyse: le premier était le FACS Calibur utilisé au laboratoire d’Hématologie de Nantes jusqu’en 2006 puis le FACS Canto (Becton Dickinson).

A – Principe de la CMF

La CMF est une technique d’analyse et/ou de tri basée sur la mesure de signaux lumineux émis par des cellules isolées en solution aqueuse.

B – Préparation des échantillons

Les blastes issus des prélèvements de moelle osseuse ont été récupérés grâce une technique de gradient de densité (Ficoll). Les prélèvements ont été mis en solution dans du PBS et sont ensuite déposés sur le milieu de séparation des lymphocytes. L'ensemble a été centrifugé à 1800 tours/minutes pendant 20 minutes. Les cellules mononuclées formaient un anneau à la surface du Ficoll. Ces cellules ont été récupérées, lavées en tampon PBS puis numérotées afin d'ajuster le nombre de cellules par tube à la concentration cellulaire adéquate pour le marquage ultérieur.

C – Le marquage

Différents anticorps ont été utilisés pour caractériser les blastes leucémiques. Nous avons réalisé un marquage intra cellulaire pour l'analyse des MPO intra-cytoplasmiques.

Une étape de pré-marquage est nécessaire : 500 000 cellules sont incubées avec l'anticorps anti CD 45 couplé au PerCP (clone 2 D1, Becton Dickinson) pour le marquage de surface pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées.

Après le prémarquage, les cellules sont fixées avec 50 µL de réactif A puis perméabilisées avec 50 µL de réactif B du kit de perméabilisation Intra Stain (Dako) pour réaliser le marquage intra-cytoplasmique. Lors de l'étape de perméabilisation, on ajoute au milieu les anticorps anti MPO et Anti CD79a.

Nous avons effectué deux combinaisons de 3 anticorps par échantillon : la première contenant le CD45 couplé au PerCP, l'Ac anti MPO couplé au FITC (clone H 43.5, Dako) et le CD 79a couplé à la PE (clone HM 57, Dako); la seconde est la combinaison contrôle

contenant le CD45 PerCP, le contrôle FITC (contrôle mouse IgG1 FITC, Immunotech) et le contrôle PE (contrôle mouse IgG1 PE, Immunotech) .

D – L'appareillage :

Le système analytique comporte le système fluide et le système optique. Les cellules en suspension dans une gaine liquide arrivent dans une chambre d'analyse où elles sont interceptées par deux lasers (diode laser 635 nm, puis laser 488 nm), choisis en fonction de la longueur d'onde d'excitation du ou des fluorochromes utilisés. La lumière diffusée aux grands angles (Side Scatter, SSC) est fonction de la structure interne des cellules telle que la granulosité. La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) est fonction de la taille des cellules. Cette lumière est récupérée soit sur une photodiode (FSC) soit par un photomultiplicateur (SSC) . Un jeu de miroirs dichroïques (DM) permet de réfléchir et/ou de transmettre les fluorescences de longueur d'onde différente sur des photomultiplicateurs différents : FL1 : isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ; FL2 : phycoérythrine (PE) ; FL3 : phycoérythrine cyanine5 (PC5) ; FL4 : allophycocyanine (APC). Enfin, le signal électrique est amplifié, converti en un signal numérique et traité par le système informatique.

E – L'analyse

Elle a été possible chez 9 patients de 1997 à 2009. Nous avons étudié l'expression des MPO par cette combinaison de triple marquage (CD45, CD79a, MPO en intracytoplasmique). Dans un premier temps, nous avons procédé à la sélection des blastes obtenue en fenêtrant les cellules exprimant faiblement le CD45 et présentant un SSC moyen. Dans un second temps,

nous avons sélectionné les blastes MPO positifs dans le quadrant supérieur droit de l'histogramme bi-paramétrique (MPO en ordonnée et CD79a en abscisse).

V - Etude cytogénétique :

Différentes étapes sont nécessaires pour effectuer une analyse cytogénétique : le prélèvement, la mise en culture, la technique récolte, l'étalement , le marquage RHG, la capture au microscope et l'analyse sur logiciel.

A –Obtention du culot de cellules

1 – Le prélèvement :

Le prélèvement sanguin ou médullaire doit en premier lieu être effectué soit sur tube spécifique contenant un milieu stérile délivré par le laboratoire de cytogénétique hématologique, soit sur tube hépariné. Le délai de transport doit être bref et ne pas excéder 24 heures.

Après réception, les prélèvements ont été numérisés pour évaluer leur richesse et déterminer le nombre de cellules à potentiel de division à partir desquelles il sera possible d'obtenir des mitoses.

2 – La culture :

Ensuite les cellules ont été mises en culture dans un milieu contenant du RPMI, du serum de veau fœtal, de la glutamine, de la pénicilline , de la streptomycine et de l'héparine.

A partir de la numération, il faut évaluer la quantité de cellules à ajouter au milieu de culture pour obtenir une concentration optimale de 1 à 2 millions de cellules/mL de milieu de culture. Les cellules sont ensuite placées à l'étuve à 37°C, avec une concentration de CO₂ égale à 5%. Le temps de culture varie en fonction du prélèvement, de 24 à 72 heures (24 heures pour les pathologies myéloïdes).

3- La technique récolte :

Nous avons effectué une technique récolte pour obtenir une suspension cellulaire que nous avons fixée et à partir de laquelle nous avons pu réaliser une expertise cytogénétique classique ou moléculaire. L'arrêt des divisions cellulaires est obtenu par l'ajout de colchicine (0.05 µg/mL) au milieu de culture. La colchicine inhibe la polymérisation des microtubules et bloque les cellules en métaphase. Les cellules ont ensuite subi un choc hypotonique par du KCl à 0.075M à 37°C permettant la lyse des hématies et la ballonnisation des cellules, puis elles sont fixées dans une solution de Carnoy (3 volumes d'éthanol et un volume d'acide acétique). Le culot peut ainsi être conservé à -20°C.

4 – L'étalement sur lame :

Il consiste à laisser tomber une goutte du culot de cytogénétique remis en suspension sur une lame refroidie préalablement trempée dans l'alcool dans le but d'obtenir des . métaphases bien étalées afin d'analyser les chromosomes.

B – Le caryotype : marquage bande R/NaH₂PO₄ :

Il est obtenu par marquage par dénaturation thermique de l'euchromatine des chromosomes.

Les lames d'abord réhydratées ont été plongées dans un bain thermostaté à 87°C de NaH₂PO₄H₂O à 1 M pendant 13 minutes. Les lames sont ensuite contre-colorées par une solution de Giemsa à 4% pendant 10 minutes. Ce marquage permet d'identifier les chromosomes et de détecter les anomalies. Les métaphases sont photographiées avec l'aide d'un microscope à immersion à l'objectif 100 et les chromosomes analysés avec le logiciel de classement Mac type5.6. Les résultats sont rendus conformément à la nomenclature du Système International de Nomenclature en Cytogénétique Humaine (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman 2009). Les patients présentant des anomalies du chromosome 3 (inv(3), t(3 ; partenaire)) ont été analysés en FISH pour la détection d'anomalie impliquant le gène EVI1. Les patients présentant une t(1 ;3) ont été analysés en FISH pour les gènes PRDM16 en 1p36 et RPN1 en 3q21 au laboratoire de Génétique Hématologique à la clinique universitaire Saint-Luc de Bruxelles.

C – L'Analyse par Fluorescence In Situ Hybridation (F.I.S.H) :

1 – La technique :

L'Hybridation in situ est une technique de cytogénétique moléculaire basée sur l'appariement d'une sonde d'ADN marquée par un fluorochrome sur sa cible spécifique par complémentarité de bases. L'hybridation est réalisée sur lame à partir d'un culot de cytogénétique permettant de travailler sur métaphases (FISH métaphasique) et sur noyaux

(FISH interphasique). Elle débute par une étape de dénaturation (= séparation des brins d'ADN) de la sonde et de la cible (lame contenant les chromosomes étalés) en simultané.

Les lames sont dénaturées dans une solution de formamide à 70% dans un bain marie à 73°C pendant 2 minutes, puis séchées et déshydratées dans trois bains d'alcool de concentration croissante.

Après dénaturation, la sonde est déposée sur sa cible (5µL de sonde par spot). Les lames sont ensuite incubées en chambre humide à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, elles sont placées dans différentes solutions permettant d'éliminer l'excès de sonde et les fragments non hybridés. Les cellules sont ensuite contre colorées avec du DAPI – ANTIFADE dilué au 1/10. Il s'agit d'un agent intercalant qui colore l'ADN en bleu permettant la visualisation des chromosomes et des noyaux facilitant ainsi la lecture des signaux. Après avoir déposé 10µL de DAPI au niveau de la zone d'hybridation, une fine lamelle est déposée sur la lame permettant la lecture au microscope.

La lecture des lames a été réalisée au laboratoire d'hématologie de l'Hôtel Dieu de Nantes sur le microscope à épifluorescence ZEISS. Ce microscope est couplé à l'analyseur d'image Macprobe 4.3. Pour chaque patient , un minimum de 100 noyaux est analysé.

2 – Les sondes utilisées :

i- EVI1 :

La sonde utilisée pour la détection des réarrangements du gène EVI1 en 3q26 est une sonde commerciale EVI1 dual color Kreatech, ref. KB – 10204, stratégie break-apart ou séparation des signaux (figure 7). Il s'agit en réalité d'un mélange de 2 sondes :

- une sonde marquée en Platinum Bright 550 (rouge) recouvrant la partie télomérique en 5' du gène EVI1 (hTERC).
- Une sonde marquée en Platinum bright 495 (vert) recouvrant la partie centromérique en 3' du gène EVI1.

La sonde EVI1 double couleur permet la détection des réarrangements du gène EVI1 en région 3q26 (translocation, inversion). Dans une configuration normale, les sondes vertes et rouges étant très proches l'une de l'autre, on observe 2 signaux de fusion (2 chromosomes 3 et donc 2 gènes EVI1). En cas de réarrangement du gène, en fonction du point de cassure sur EVI1, on observe différents types de configuration conduisant tous à la séparation des signaux verts et rouges (Tableau III). Une cassure est définie par la disparition du signal de fusion (F) (Rouge+Vert = Jaune) au profit de deux signaux séparés. Les signaux sont considérés comme séparés si l'espace entre les 2 est supérieur ou égal au diamètre d'un spot.

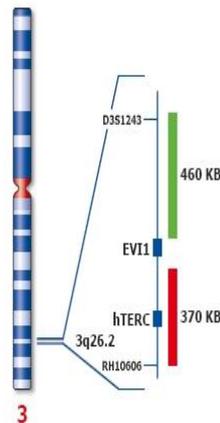


Figure 7 : sonde Kreatech EVI1

	Absence d'anomalie	t(3 ;partenaire) , inv(3)
Signal observé	2F	1F1R1V ; 2F1V ; 2F1R

Tableau III : signaux observés pour la sonde Kreatech EVI1

Pour chaque type de configuration, le seuil de sensibilité globale est de 12%.

Depuis mai 2009, une nouvelle sonde à 3 couleurs (utilisant aussi la même stratégie de séparation des signaux) est commercialisée. Elle comporte une sonde supplémentaire marquée en aqua permettant une meilleure analyse des réarrangements en 5' du gène. En effet, la première sonde ne recouvrait pas l'ensemble des points de cassure du gène EVI1 en 5'd'où, parfois, de faux négatifs. Cette sonde a été utilisée pour un patient de notre cohorte : FER (figure 8). Pour cette sonde, la lecture s'effectue à l'aide de 3 filtres au lieu des 2 habituellement utilisés pour les sondes double couleurs.

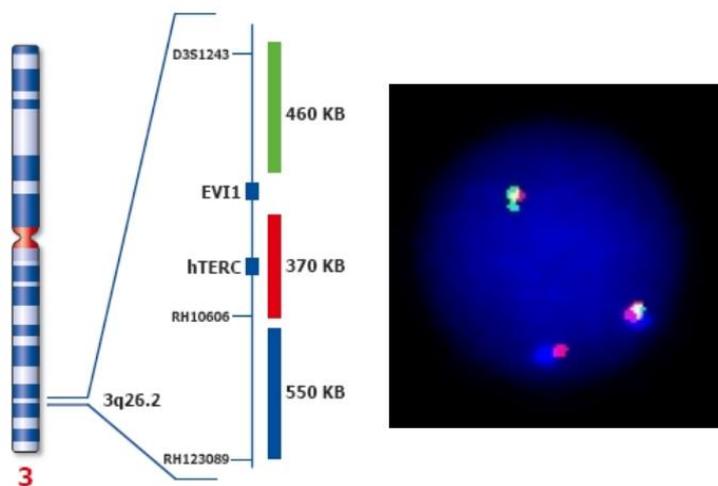


Figure 8 : nouvelle sonde triple couleur Ktreatech ref : KB-10205 ainsi que son image en FISH

ii-PRDM16

Les quatre patients présentant une translocation (1;3)(p36;q21) ont été analysés au laboratoire génétique hématologique de la clinique universitaire Saint – Luc à Bruxelles par les docteurs Hélène Antoine Porel et François Duhoux.

a- Choix des sondes

Elles ont été sélectionnées en fonction de la zone d'intérêt qu'elles recouvraient. En effet, plusieurs gènes d'intérêts sont situés sur le bras court du chromosome 1. L'analyse du gène PRDM16 en 1p36 a été effectuée par deux sondes : RP11-181G12 située entre 2062347pb et 2242269pb en bande 1p36.33 et RP 11-22L13 située entre 3117043pb et 3216520 pb. L'analyse du gène partenaire RPN1 situé en 3q21 a été effectuée par les sondes RP11-475N22 située entre 129803278 pb et 129803833 pb et RP11 – 456 K4 située entre 129716273pb et 129920493 en bande3q21.3.

b- Amplification des sondes

L'amplification est obtenue à partir d'un kit enzymatique à activité polymérasique, le GenomiPhiV2 DNA Amplification Kit (Illustra™, GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Les sondes étaient contenues dans des plasmides bactériens et étaient dépendantes d'un gène codant pour la résistance à un antibiotique, l'Erythromycine. Les bactéries, contenant l'ADN à amplifier sont diluées dans 10 µL d'eau. 1 µL de cette dilution a été mélangé à 9µL de diluant pour obtenir environ 10ng d'ADN. L'ensemble est dénaturé à 95°C dans le thermocycler puis refroidi sur glace. On ajoute 9 µL de tampon de réaction et 1 µL de Phi29. On place les tubes de nouveau au thermocycler pour la réaction d'amplification. L'enzyme est ensuite inactivée à 65°C.

c- Marquage des sondes par Nick translation :

On utilise une technique de Nick translation qui permet à la DNase contenue dans le kit de couper l'ADN cible et à la polymérase de le re synthétiser (Abbott, Rungis, France) en y intégrant lors de la même étape de l'UTP marqué par un fluorochrome orange ou vert qui permettra la lecture au microscope à fluorescence. On met en présence des sondes amplifiées, des dUTP marqués, des dATP, dCTP, dTTP et dGTP, du tampon, de la DNase et la polymérase. On laisse cette solution incuber pendant 8 à 16 heures à 15°C, et on inactive ensuite l'enzyme à 75 °C pendant 10 minutes. Ces sondes marquées sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

d- Précipitation des sondes

Les cellules conservées dans un fixateur sont isolées par centrifugation . On dispose 5 µL de cet isolat sur une lame Superfrost[®]. Les sondes amplifiées et marquées sont mélangées à 1 µL de cot ADN (Invitrogen Inc, Gaithersburg, MD), à de l' acétate de sodium et de l' alcool absolu froid, afin de les précipiter. Ce mélange est incubé 15 minutes à -20°C, puis centrifugé . On enlève l'excédent obtenu pour ne garder que la sonde et on ajoute 5 µL de tampon d'hybridation (Abbott, Rungis, France) par patient à hybrider. La solution est incubée 10 minutes à 75°C, puis 15 minutes à 37°C.

e- Hybridation

La technique d'hybridation des sondes sur les lames est identique à celle de la FISH classique décrite précédemment.

VI – Analyse statistique :

La population de référence utilisée est une population de 1844 patients dont le diagnostic de LAM a été effectué à Nantes entre 1987 et 2009. Cette entité regroupe les LAM *de novo*, secondaire à une myélodysplasie, à un traitement ou secondaire à un syndrome myéloprolifératif.

Nous avons utilisé le test statistique du Chi 2 pour comparer la population de l'étude à la population de référence. L'analyse de la survie a été effectuée par la méthode de Kaplan-Meier.

RESULTATS

RESULTATS

I - Résultats : caractéristique cytogénétique :

A – EVI1

1 Caryotype standard

Nous avons obtenu une série de 17 patients.

Patient	LAM/FAB	Etiologie	Caryotype
GRI	M1	<i>de novo</i>	45,XY,-7[8]/45,XY,-7,inv(3)(q21q26)[5]/46,XY[3]
BAR	M4	<i>de novo</i>	45,XX,inv(3)(q21q26),-7[8]/45,XX,-3,-7,+mar?der(3)[6]/46,XX[8]
MEV	M0	<i>de novo</i>	46,XY,inv(3)(q21q26)[10]/45,XY,inv(3)(q21q26),-7[2]/46,XY[8]
OLI	M4	<i>de novo</i>	46,XY,inv(3)(q21q26)[18]/46,XY[2]
VAL	M5b	<i>de novo</i>	45,XY,inv(3)(q21q26),-7[14]/46,XY[6]
ELU	M0	SMD sc LLC	46,XY,inv(3)(q21q26)[12]/46,XY[8]
LE R	M0	sc Wald	45,XX,inv(3)(q21q26),-7[17]/46,XX[3]
FER	M2	LMC	46,XY,t(1;9;22)(q12;q34;q11),inv(3)(q21q26)[13]/46, idem,del(7)(q22qter)[2]
BEN*dc	M0	<i>de novo</i>	46,XX
BEN r	M0	<i>de novo</i>	45,XX,add(1)(p32),add(2)(q33),?add(3)(q26),add(4)(q27),7,?der(15), add(20)(qter)[19]/46,XX[1]
LE P	M0	<i>de novo</i>	46,XX,t(3;3)(q21;q26),-7,t(9;22)(q34;q11)[15]
JAH	ineval	sc DLBCL	45,XX,t(3;3)(q21;q26),-7[14]/46,XX[1]
MAR	M4	<i>de novo</i>	45,XX,t(3;3)(q21;q26),-7[20]
PLA	M2	TE	46,XY,add(6)(p22)[7]/46,XY,der(3)t(3;3)(q21;q26),-17, der(20)del(20q11)t(17;20)(p11;q11)[7]/46,XY[8]
LEM	M5b	LMMC	46,XY,t(3;21)(q26;q22)[20]
DUR	M1	<i>de novo</i>	46,XY,t(2;3)(p21-22;q26),del(7)(?p11p13)[20]
CHA	M2	LMC	47,XX,add(3)(q21),+8,t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)[4]/47,XX, idem,del(11)(q22)[10]/48,XX, idem,del(11)q(22),+der(22)t(9;22)[1]
LUS	M4	<i>de novo</i>	46,XY,t(3;12)(q26;p13)[20]

	inv(3)
	t(3;3)
	t(3;21)
	t(2;3)
	add(3)
	t(3;12)

Tableau IV : Caryotype des patients présentant une anomalie du gène EVI1
Dc :diagnostic, r : rechute, sc : secondaire, ineval : inévaluable.

*: Un patient (BEN) a rechuté de sa maladie en acquérant d'autres réarrangements chromosomiques. L'anomalie EVI1 était cryptique sur le caryotype standard initial. Elle a été mise en évidence par la sonde Kreatech EVI1 à la rechute et retrouvée en FISH au diagnostic.

L'analyse des caryotypes montrent que:

- **L'inversion paracentrique du chromosome 3, inv(3)(q21q26)** a été retrouvée chez 9 des 17 patients (52.9%).

Elle est associée à une monosomie du chromosome 7 pour 5 des 9 patients (55.5%) et à une délétion du bras long du chromosome 7 chez un patient supplémentaire.

- **La translocation t(3 ; partenaire)** a été retrouvée chez 7 patients (41.2%)

Le partenaire était le chromosome 3 pour 4 patients, et **3 des 4 patients présentaient aussi une monosomie du chromosome 7.**

Les autres partenaires impliqués sont les chromosomes 2 ; 12 et 21 dans chacun un cas de notre série. Deux patients (CHA et FER) ont, lors de **l'accutisation de la LMC, acquis l'anomalie EVI 1** (confère caryotype Annexe 1).

2 - Diagnostic des anomalies par FISH

i - Cas de l'inversion paracentrique du chromosome 3 : Inv(3)(q21q26)

(n=8/17)

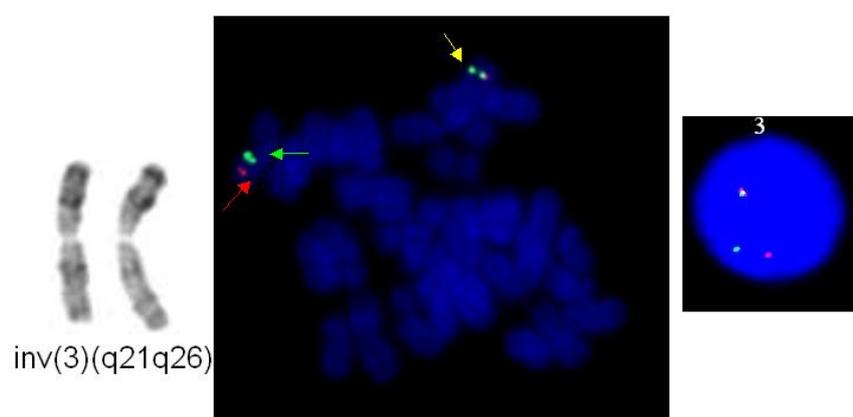


Figure 9 : analyse par FISH d'une métaphase de patient présentant une inv(3)(q21q26) avec la sonde commerciale EVI1 dual color Kreatech ref. KB 10204, stratégie break apart

Nous observons sur la figure 9 de l'analyse en FISH 3 signaux : 1 fusion, 1 rouge et 1 vert: (1F1R1V).

ii - Cas de la translocation t(3 ;partenaire) (n=8/17): exemple de la t(2 ;3)(p21;q26)

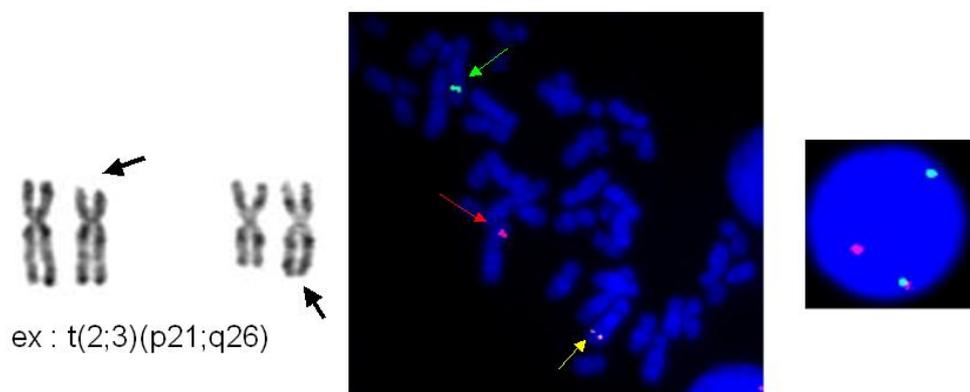


Figure 10 : analyse par FISH d’une métaphase de patient présentant une t(2 ;3)(p21 ;q26) avec la sonde commerciale EVI1 dual color Kreatech ref. KB 10204, stratégie break apart

Les Partenaires impliqués dans les translocations de notre série sont les chromosomes : 2 (1 patient); 3 (4 patients); 12 (1 patient) et 21 (1 patient). Les signaux observés sont 1F1R1V (figure 10).

B – PRDM16

1 – Caryotype standard

Nous avons obtenu 4 patients présentant une translocation t(1 ;3)(p36;q21). Les 2 gènes impliqués dans cette translocation sont les gènes PRDM16 sur le chromosome 1 et RPN1 sur le chromosome 3.

Patient	FAB	Etiologie	Caryotype
GUE	1	SMD	46,XX,del(5)(q15q34),t(1;3)(p36;q21)[20]
REN	2	SMD 5q sc	46,XX,t(1;3)(p35;q12-13)[8]/46,idem,del(5)(q21q34)[5]/46,XX[12]
LOR	4	LMMC	92,XXYY,t(1;3)(p36;q21)x2[8]/46,XY,t(1;3)(p36;q21)[17]
BIT	2	MF del 20q	46, XY,t(1;3)(p36;q21),ider(20)((q10)del(20)(q11q13)[20]

Tableau V: Caryotype des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

Les 4 patients présentant une anomalie du gène PRDM16 ont tous eu une pathologie hématologique antérieure. Chez 2 des 4 patients, cette anomalie est associée à une délétion du bras long du chromosome 5.

2 - Diagnostic des anomalies par FISH pour RPN1 et PRDM16 :

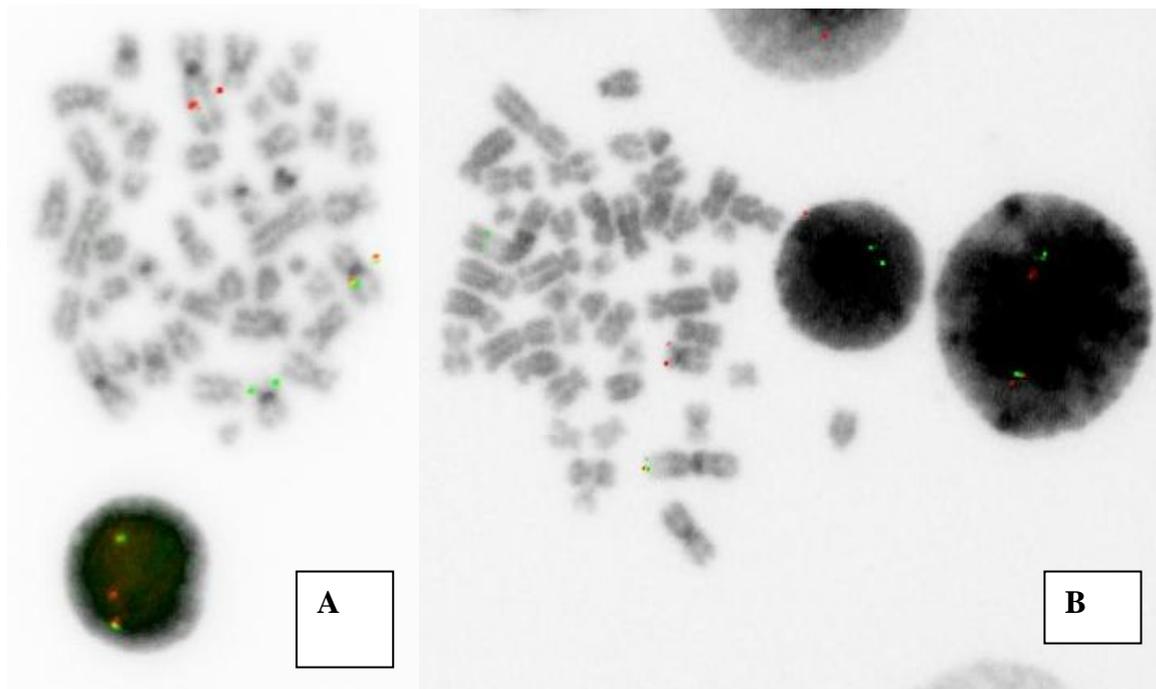


Figure 11 A: patient BIT, anomalie RPN1 en 3q21, par une sonde break apart. B : patient LOR, anomalie PRDM16 en 1p36, par une sonde break apart. Photos du laboratoire de Génétique Hématologique, Clinique Universitaire de Bruxelles.

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de Génétique Hématologique de Bruxelles (figure 11).

II – Classification morphologique des patients de l’étude

Nous présentons les résultats des patients de la série EVI1. En effet, l’effectif des patients ayant une anomalie de PRDM16 est trop restreint pour émettre des conclusions.

A – Classification selon la FAB

La répartition des leucémies aiguës myéloblastiques par la classification FAB est de :

- 5 LAM 0 pour 16 patients évaluables (31.25%)
- 2 LAM 1 (12.5%)
- 3 LAM 2 (18.75%)
- 4 LAM 4 (25%)
- 2 LAM5b (12.5%)

En comparaison dans notre population de référence, il y a 7.5% de M0, 16.6% de M1, 28.2% de M2, 5.3% de M3, 14.58% de M4, 11% de M5, 5.37% de M6, 3.36% de M7 et 8.1% de non classée.

La fréquence des M0 dans la série des LAM avec anomalie EVI1 est donc significativement plus importante que dans la population de référence (p=0.002)

Il faut noter que les 3 LAM2 étaient des transformations de syndrome myéloprolifératif (2 LMC et 1 TE).

B – Selon l’OMS 2001

La classification OMS 2001 identifie 5 catégories de LAM :

- LAM avec anomalie cytogénétique récurrente : t(8 ;21), inv16, t(15 ;17), MLL
- LAM avec dysplasie multilignée : la dysplasie multilignée est fréquente pour les LAM avec une anomalie du gène EVI1
- LAM secondaire à un syndrome myélodysplasique ou à un traitement

- LAM non catégorisée (ancien FAB)
- LAM multilignée

Dans cette série, 7 patients ont présenté une LAM secondaire à un traitement ou une hémopathie antérieure (41,12%). Dans la cohorte de référence, 360 des 1844 LAM (19.52%) sont secondaires à un SMP, à un SMD, à une radiothérapie, une chimiothérapie ou à l'exposition au benzène. Cette différence est significative ($p=0.035$). **Les LAM avec une anomalie du gène EVI1 sont donc plus souvent des LAM secondaires.**

Les 10 autres patients ont une LAM de novo. Parmi ces 10 patients, 5 ont une dysplasie multilignée. La dysplasie était présente dans au moins 2 lignées myéloïdes et sur plus de 50% des cellules. Les LAM avec dysplasie multilignée peuvent survenir de novo ou secondairement à une myélodysplasie, à un syndrome myéloprolifératif ou à un traitement.

La nouvelle classification OMS 2008 incluse, dans les LAM avec translocation récurrente, les leucémies présentant les anomalies $inv(3)(q21q26.2)$ ou $t(3;3)(q21;q26.2)$ impliquant les gènes EVI1 et RPN1. **En revanche, Les $t(3; \text{partenaire})$, où le partenaire est différent du chromosome 3, ne sont pas incluses dans cette nouvelle entité.**

III – Analyse de l'hémogramme :**A – EVI1 :**

Nom	FAB	Pt <100	Pt 100-150	Pt 150-400	Pt >400	dystrophie Pt	Pt géante
GRI	M1	51000				N	N
BAR	M4	33 000				O	O
MEV	M0			172 000		N	O
OLI	M4	63000				O grise	O
VAL	M5B	56000				O dégran	O
ELU	M0			154 000		inéval	inéval
LE R	M0			292 000		N	N
FER	M2		131 000			O dégran	O
BEN	M0	46 000				O	N
LE P	M0		123 000			O	O
JAH	ineval			218 000		inéval)	inéval
MAR	M4	84 000				inéval	inéval
PLA	M2				417 000	O (anis)	O
LEM	M5b	72 000				inéval	inéval
DUR	M1	43 000				N	N
CHA	M2				412 000	O	N
LUS	M4			195 000		N	O

Tableau VI: Analyse des Plaquettes des patients présentant une anomalie du gène EVI1.**1 –Analyse des plaquettes :****i - La numération des plaquettes :**

La moyenne est de 150 588 plaquettes (range de 33000 à 417000) avec une médiane à 123 000 plaquettes. 9 des 17 (53%) patients ont plus de 100 000 plaquettes au diagnostic. Parmi les 1724 patients de l'ensemble des LAM étudiées dans notre laboratoire dont le nombre des plaquettes étaient connus, 432 patients avaient plus de 100 000 plaquettes. A l'aide du test du Chi 2, cette différence est significative ($p=0.019$).

Les patients présentant une LAM avec des anomalies du gène EVI1 sont plus souvent non thrombopéniques (plus de 100 000 plaquettes) lors du diagnostic par rapport à la cohorte nantaise des LAM de référence.

ii - La dystrophie plaquettaire :

7/14 (50%) des patients évaluables (qualité correcte de la coloration du frottis de sang) présentent des dystrophie plaquettaires (type plaquette dégranulée ou plaquette grise).

8/14 (57%) des patients présentent des plaquettes géantes (figure 12).

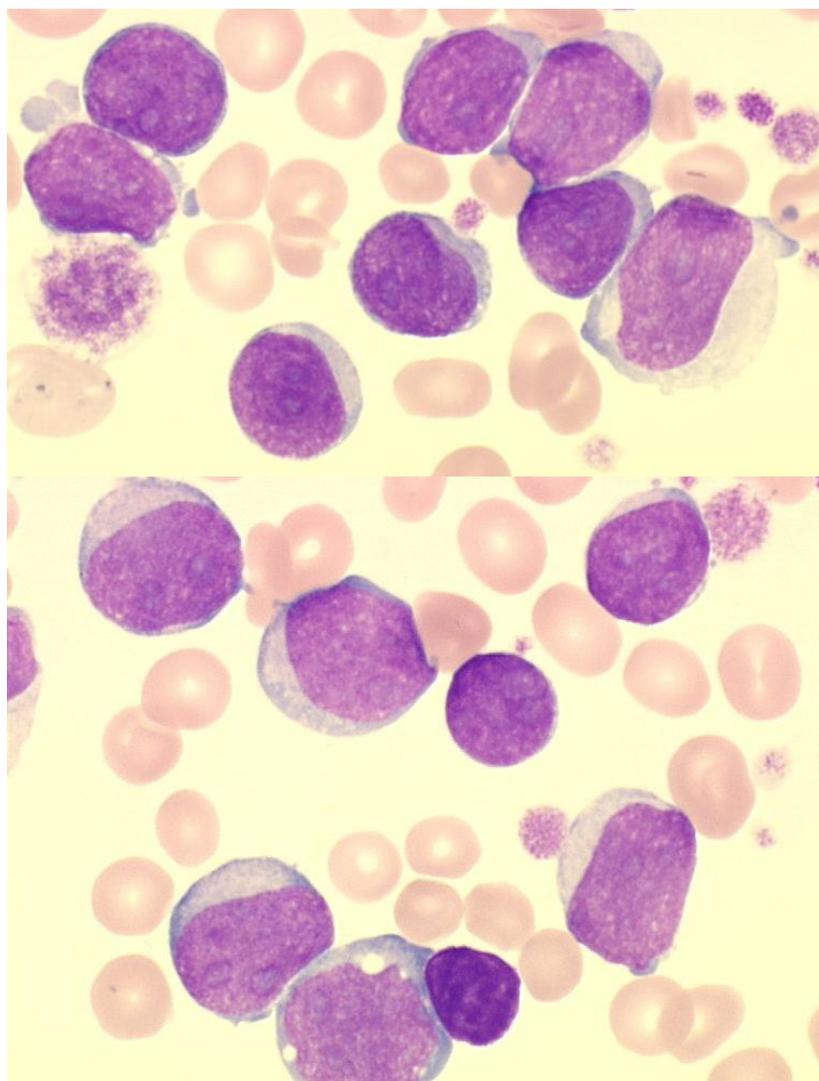


figure 12 : sang coloré au MGG : présence de plaquettes géantes, de plaquettes de taille augmentée

La moitié des patients présentant une anomalie du gène EVI1 ont une dystrophie plaquettaire sur le frottis de sang.

2- Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes :

Nom	FAB	Hb g/dL	Leucocytes (G/L)
GRI	M1	9,1	2,4
BAR	M4	10,3	12,4
MEV	M0	10,8	3,5
OLI	M4	10,0	105
VAL	M5	8,3	8,7
ELU	M0	9,8	47
LE R	M0	12,3	9,4
FER	M2	11,8	2,3
BEN	M0	4,6	44,5
LE P	M0	11,5	36
JAH	inéval	11,1	1,5
MAR	M4	11,0	58,3
PLA	M2	7,0	4,02
LEM	M0	NC	NC
DUR	M1	8,4	9,3
CHA	M2	8,2	10,7
LUS	M4	7,9	8,5

Tableau VII :Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes des patients présentant une anomalie du gène EVI1

Nous avons pu obtenir l'hémogramme du diagnostic pour 16 des 17 patients de la série. En effet, tous les patients n'ont pas été suivis à Nantes.

i - L'hémoglobine :

La valeur moyenne est de 9.5g/dL.

3/16 (18.75%) patients ont moins de 8 g/dL au diagnostic. Pour les 1625 patients de la cohorte nantaise de référence dont le paramètre hémoglobine était renseignée, seul 556 patients (34.2%) ont moins de 8 g/dL au diagnostic. La différence n'est pas significative entre les 2 groupes ($p = 0.31$).

ii - Les leucocytes :

La moyenne est de 47,751 G/L, avec 4/16 (25%) des patients leucopéniques (<4G/L). Sur les 1738 patients de la cohorte nantaise dont la valeur des globules blancs était renseignée, 661 patients (38%) sont leucopéniques. La différence n'est pas significative entre les 2 groupes ($p= 0.418$).

B – PRDM161 –Analyse des plaquettes :

Nom	FAB	Pt <100	Pt 100-150	Pt 150-400	dystrophie Pt	Pt géante
GUE	M1			500000	ineval	ineval
REN	M2		144000		ineval	ineval
LOR	M4	94000			O	O
BIT	M2			300000	N	O

Tableau VIII : Analyse des plaquettes des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

La moyenne de la numération des plaquettes est de 259 000 plaquettes/mm³. Ainsi, bien que notre série soit limitée, la majorité (3/4) de nos patients ne sont pas thrombopéniques lors du diagnostic.

Les plaquettes sont dystrophiques pour 2 patients évalués (figure 13), sachant que nous n'avons pas pu récupérer les frottis de sang du diagnostic pour les 2 autres patients.

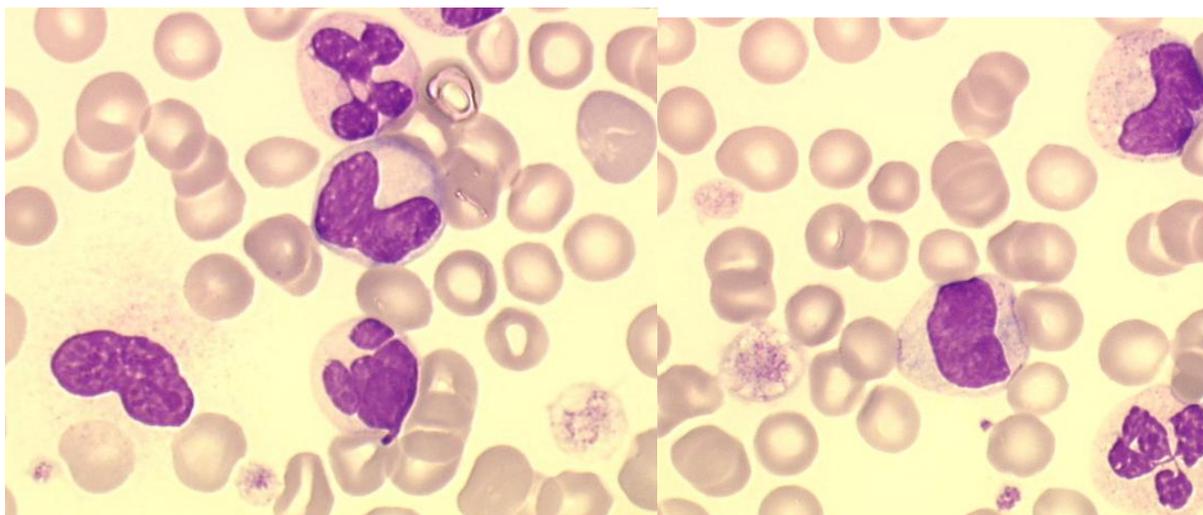


Figure 13 : Présence de plaquettes dégranulées et de plaquettes géantes

2- Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes :

Nom	FAB	Hb g/dL	Leucocyte G/L
GUE	M1	9,0	5,18
REN	M2	11,3	4,7
LOR	M4	10,8	12,4
BIT	M2	12,5	5,6

Tableau IX : Analyse de l'hémoglobine et des leucocytes des patients présentant une anomalie du gène PRDM16.

La valeur moyenne de l'hémoglobine est de = 10.9 g/dL

La valeur moyenne des leucocytes est de 34,87 G/L, tous les patients ont plus de 4 G/L leucocytes et ne sont donc pas leucopéniques.

IV – Analyse du myélogramme :

Nous avons pu relire les frottis de moelle osseuse de 14 des 17 patients présentant une anomalie du gène EVI1.

A – EVI1 :

Nom	FAB	%blaste	MPO CYTO	MPO CMF	Nbre méga	DMK	DGX	DEB
GRIM	M1	22	5%	NR	15	1;4	3	2
BAR	M4	28	1%	1%	16	1;4	0	3
MEV	M0	62	1%	1%	6	0	3	2
OLI	M4	58	0%	NR	inéval	inéval	inéval	inéval
VAL	M5b	6	7%	NR	10	1;4	3	3
ELU	M0	22	2%	1%	inéval	inéval	inéval	inéval
LE R	M0	NR	NR	NR	3	1;3	3	3
BEN dc	M0	91	2%	0%	12	0	2	2
BEN r	M0	68	1,50%	0%	4	1	3	inéval
FER	M2	26	2%	NR	>50	1;4	3	2
LE P	M0	90	1%	NR	10	4	3	2
JAH	ineval	20	12%	11%	inéval	ineval	ineval	ineval
MAR	M4	72	5%	8%	1	ineval	3	0
PLA	M2	28	NR	NR	15	3	0	0
LEM	M5b	67	38%	NR	29	1;4;3	3	ineval
DUR	M1	68	18%	NR	2	inéval	0	0
CHA	M2	29	NR	NR	2	inéval	2(pelger)	inéval
LUS	M4	40	1%	0%	10	4;1	0	3

Tableau X : Analyse du myélogramme des patients présentant une anomalie du gène EVI1**FAB** : classification french american british**MPO CYTO** : myéloperoxydase en cytochimie (% blastes positifs)**MPO CMF** : myéloperoxydase en cytométrie de flux (% blastes positifs)**DMK** : dystrophie des mégacaryocytes classés par ordre d'incidence décroissant**DMK0** : absence de dystrophie**DMK1** : micromégacaryocyte**DMK2** : mégacaryocyte monolobé, type « 5q- »**DMK3** : grand mégacaryocyte, à noyau fragmenté**DMK 4** : amas de mégacaryocytes unilobés de petite taille type « EVI 1 »**DGX0** : absence de dystrophie de la lignée granuleuse**DGX2** : dysgranulopoïèse modérée de la lignée granuleuse (10 à 50% des granuleux)**DGX3** : dysgranulopoïèse majeure (>50% des granuleux)**DEB** : dysérythroïèse**DEB0** : absence de dysérythroïèse**DEB2** : dysérythroïèse modérée (10 à 50% des érythroblastes)**DEB3** : dysérythroïèse majeure (>50% des érythroblastes)**Nbre méga** : nombre total de mégacaryocytes examinés par frottis1 - Le pourcentage de blastes :

Au diagnostic de LAM, les patients ont un pourcentage moyen de blastes à 45.5%.

Pour la cohorte de référence de la base de données nantaise, le pourcentage moyen est de 53.5%. La médiane est de 34.5% de blastes au diagnostic. Dans la population de référence, 1612 patients ont eu un myélogramme et 460 patients (28.5%) ont moins de 34.5% de blastes au diagnostic. La différence entre les 2 groupes n'est pas significative (p=0.107).

2 - Analyse de la dystrophie :

i - Les mégacaryocytes :

Nous avons pu revoir les frottis de moelle de 14 des 17 patients. Parmi ceux – là, nous avons pu analyser la dystrophies des mégacaryocytes chez 12 patients, à raison d'un frottis de moelle par patient, revu par deux cytologistes. Les frottis des 2 patients ne comprenaient pas de mégacaryocytes visibles permettant l'analyse de la dystrophie. Elle était présente chez 9 des 12 patients (75%). Nous avons observé des mégacaryocytes de petite taille, en amas, uni ou hypolobés (figure 14) comme décrit précédemment dans la littérature. Leur nombre était variable : 8 patients ont moins de 10 mégacaryocytes, 4 patients ont de 10 à 20 mégacaryocytes et 6 patients ont plus de 10 mégacaryocytes sur le frottis. Dans la cohorte de référence, 735 des 1608 patients (45.7%) n'ont pas de mégacaryocyte visibles sur le frottis de moelle au diagnostic. **Les patients présentant une anomalie des gènes EVI1 ont donc majoritairement plus de mégacaryocytes au diagnostic.**

La dystrophie des mégacaryocytes dans le groupe de référence est renseignée pour 741 patients. 342 patients n'ont pas de dystrophie (46.1%) et 26 patients ne sont pas évaluables.

373 patients ont des anomalies :

- type DMK1 (micromégacaryocyte) chez 120 patients (16.2%)
- type DMK2 (type 5q-) chez 11 patients (1,5%),
- DMK3 (noyaux fragmentés) pour 45 patients (6.1%)
- 12 patients ont des mégacaryocytes de type DMK4 (1.6%) (petite taille, en amas, unilobé). Seul 7 de ces 12 patients ont eu un caryotype. Parmi ces 7 patients, 6 ont une anomalie du gène EVI1 en 3q26.

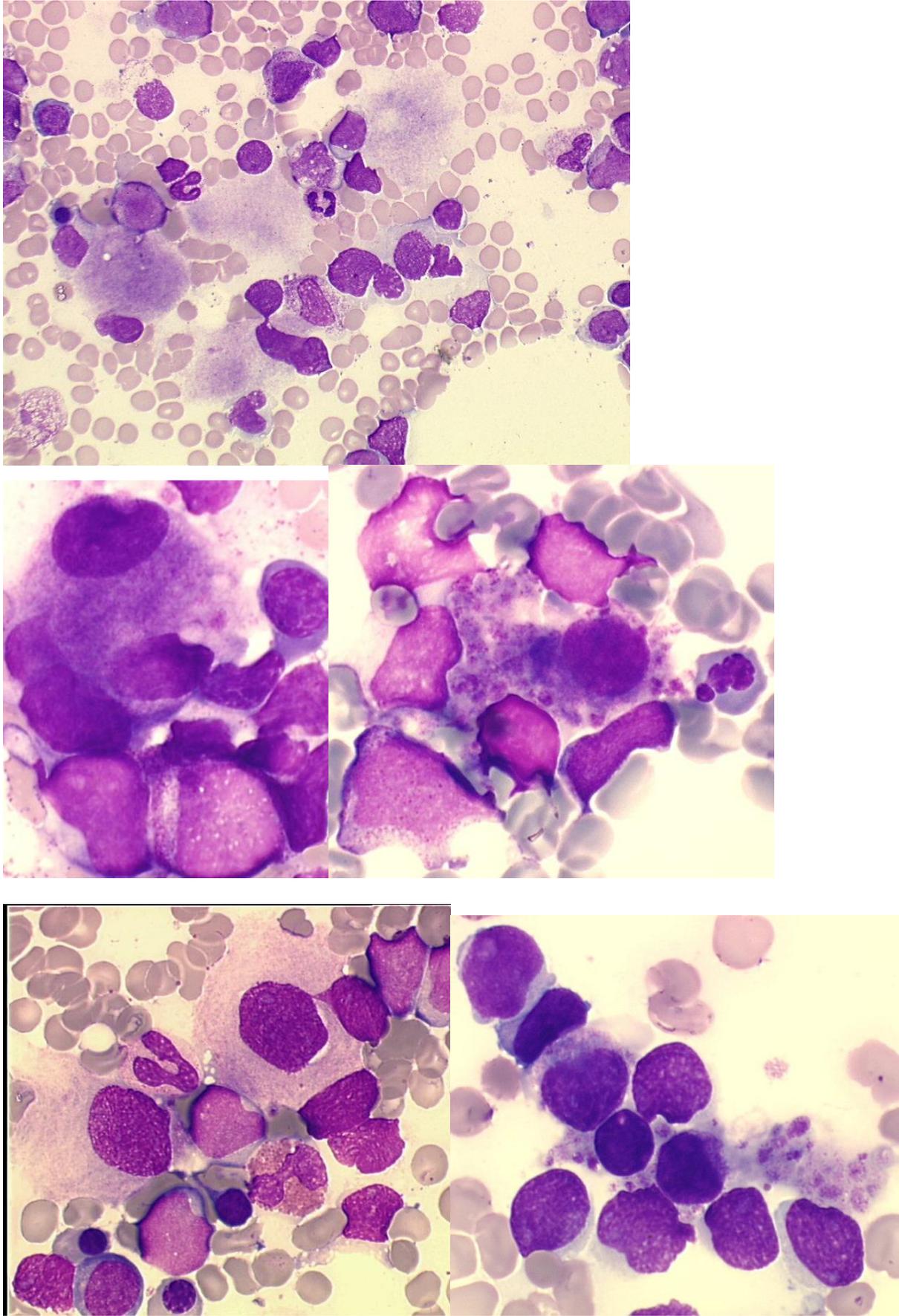


figure 14 : anomalie des mégacaryocytes : mégacaryocytes en amas, unis ou hypo lobés, de petite taille.

ii - La lignée granuleuse :

14 frottis de moelle ont pu être analysés pour apprécier la dystrophie de la lignée granuleuse.

11/14 (78.6%) des patients présentent une dysgranulopoïèse (figure 15). Elle est majeure (>50% des granuleux) pour 9 des 11 patients. En outre, pour certains patients, nous avons pu observer un déficit des granuleux en myéloperoxydase. Un patient (CHA) a présenté des anomalies de type Pelger – Huet, la LAM faisant suite à une transformation de LMC.

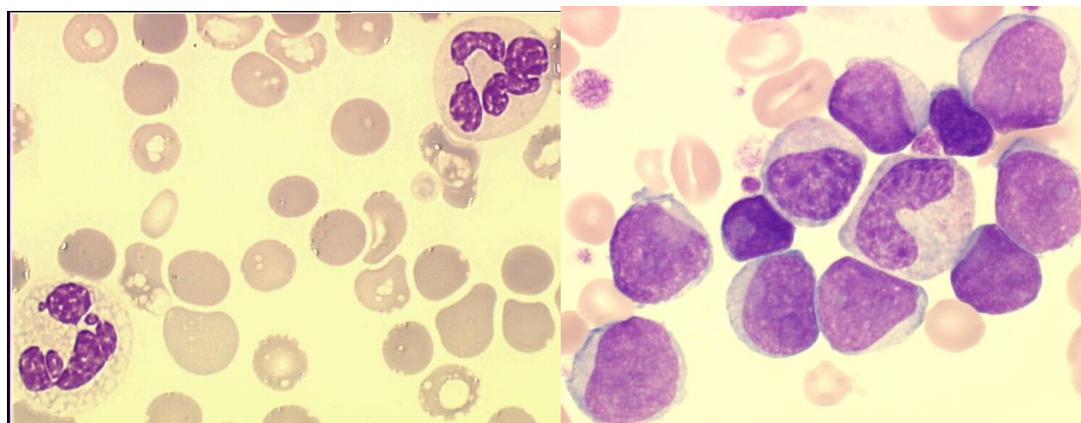


Figure 15 : dysplasie granuleuse, dégranulation des polynucléaires, des métamyélocytes et des myélocytes.

iii - La lignée érythrocytaire :

12 des 14 frottis ont permis l'analyse de la dysplasie de la lignée érythrocytaire. Elle était présente chez 9 des 12 patients (75%), mais cette dysplasie était modérée dans la plupart des cas.

Au total, les patients présentant une LAM avec anomalie des gènes EVI1 ont une dysplasie multi-lignée (DML) dans 75% des cas (9 des 12 patients analysables pour l'ensemble des lignées), c'est à dire plus de 50% de cellules dystrophiques d'au moins deux

lignées hématopoïétiques. Dans la cohorte de référence, 326 des 1844 LAM présentaient une DML (17.6%). **La différence est significative ($p < 0.001$).**

3 – Analyse de l'expression des myéloperoxydases :

Nous avons analysé l'expression des myéloperoxydases des blastes leucémiques en cytochimie pour 14 des 17 patients (figure 16) et en cytométrie en flux pour 7 des 17 patients. Les deux analyses sont corrélées. Pour un seuil de positivité des MPO en cytochimie de 3 % (recommandation de l'OMS), 8 des 14 patients ont une réaction négative. Mais 3 patients ont une positivité des blastes comprise entre 3 et 10 % (très faible). Lorsque les analyses en CMF ont été possibles, elles ont confirmé ces valeurs de faible positivité. Le pourcentage de patients négatifs dans notre série est de 57% et 78,5% des patients ont un seuil de positivité de moins de 10 %.

Dans notre série, seul 3 patients ont une réaction positive à plus de 10% en cytochimie. A noter que ces 3 patients étaient assez hétérogènes : JAH présente une LAM secondaire à un DLBCL, LEM a présenté une anomalie EVI1 lors de la transformation aiguë d'une LMMC alors que DUR a développé une LAM de novo.

Dans la cohorte de référence, le pourcentage moyen des MPO est de 40,4%. 309 des 1319 patients (23.4%) ayant eu une analyse en cytochimie ont une réaction négative (<3%). La différence est significative entre les 2 groupes ($p=0.008$).

Nous avons donc pu ainsi observer dans notre série que l'anomalie du gène EVI1 dans la LAM était associée à une hypo-expression des myéloperoxydases (visible à la fois dans les blastes et souvent aussi dans la maturation granuleuse).

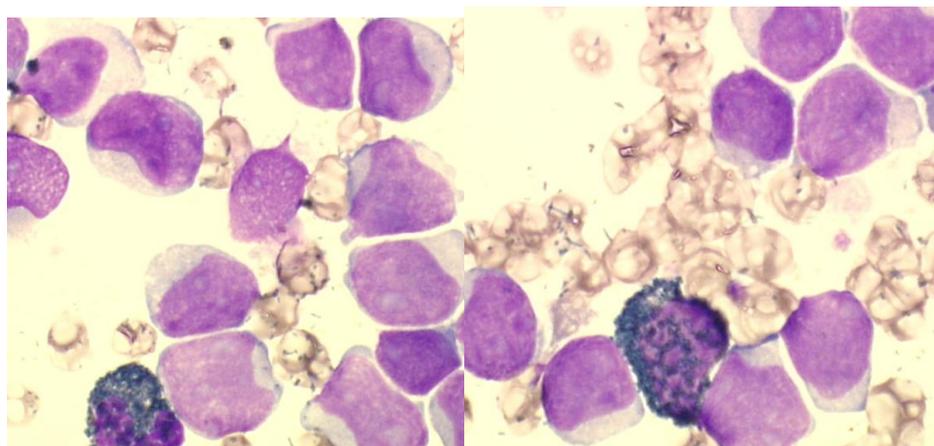


figure 16 : analyse de l'expression des myéloperoxydase en cytochimie

B – PRDM16:

Dans notre série, nous avons pu analyser les frottis de moelle des 4 patients présentant des anomalies du gène PRDM16. Les lames ont été relues par deux cytologistes.

Nom	FAB	%blaste	MPO CYTO	MPO CMF	Nbre méga	DMK	DGX	DEB
GUE	M1	26	0%	NR	>50	1;4	2	2
REN	M2	45	3%	1%	30-50	1;4	3	3
LOR	M4	20	NR	NR	>50	1;4	3	2
BIT	M2	21	46%	21%	>50	1.4	3	3

Tableau XI: Analyse du myélogramme des patients présentant une anomalie du gène PRDM16

NR : non réalisé

FAB : classification french american british

MPO CYTO : myéloperoxydase en cytochimie (% blastes positifs)

MPO CMF : myéloperoxydase en cytométrie de flux (% blastes positifs)

DMK : dystrophie des mégacaryocytes classés par ordre d'incidence décroissant

DMK1 : micromégacaryocyte

DMK 4 : amas de mégacaryocytes unilobés de petite taille type « EVI 1 »

DGX : dystrophie de la lignée granuleuse

DGX2 : dysgranulopoïèse modérée de la lignée granuleuse (10 à 50% des granuleux)

DGX3 : dysgranulopoïèse majeure (>50% des granuleux)

DEB : dysérythropoïèse

DEB2 : dysérythropoïèse modérée (10 à 50% des érythroblastes)

DEB3 : dysérythropoïèse majeure (>50% des érythroblastes)

Nbre méga : nombre total de mégacaryocytes examinés par frottis

1 - Le pourcentage de blastes :

Le pourcentage moyen de blastes est de 28%. Il est inférieur à celui des LAM avec des anomalies des gènes EVI1 mais cette série est trop restreinte pour conclure formellement.

2 – Analyse de la dystrophie :

i - Les mégacaryocytes :

Il est important de noter que tous les patients présentaient un **très grand nombre** de mégacaryocytes au diagnostic de LAM. Cela diffère avec les patients de la cohorte EVI1.

Ces mégacaryocytes sont tous dystrophiques, de petites tailles, en amas, uni ou hypolobés comme décrit dans les anomalies EVI1 (figure 17) et dans la littérature (Bloomfield *et al*, 1985).

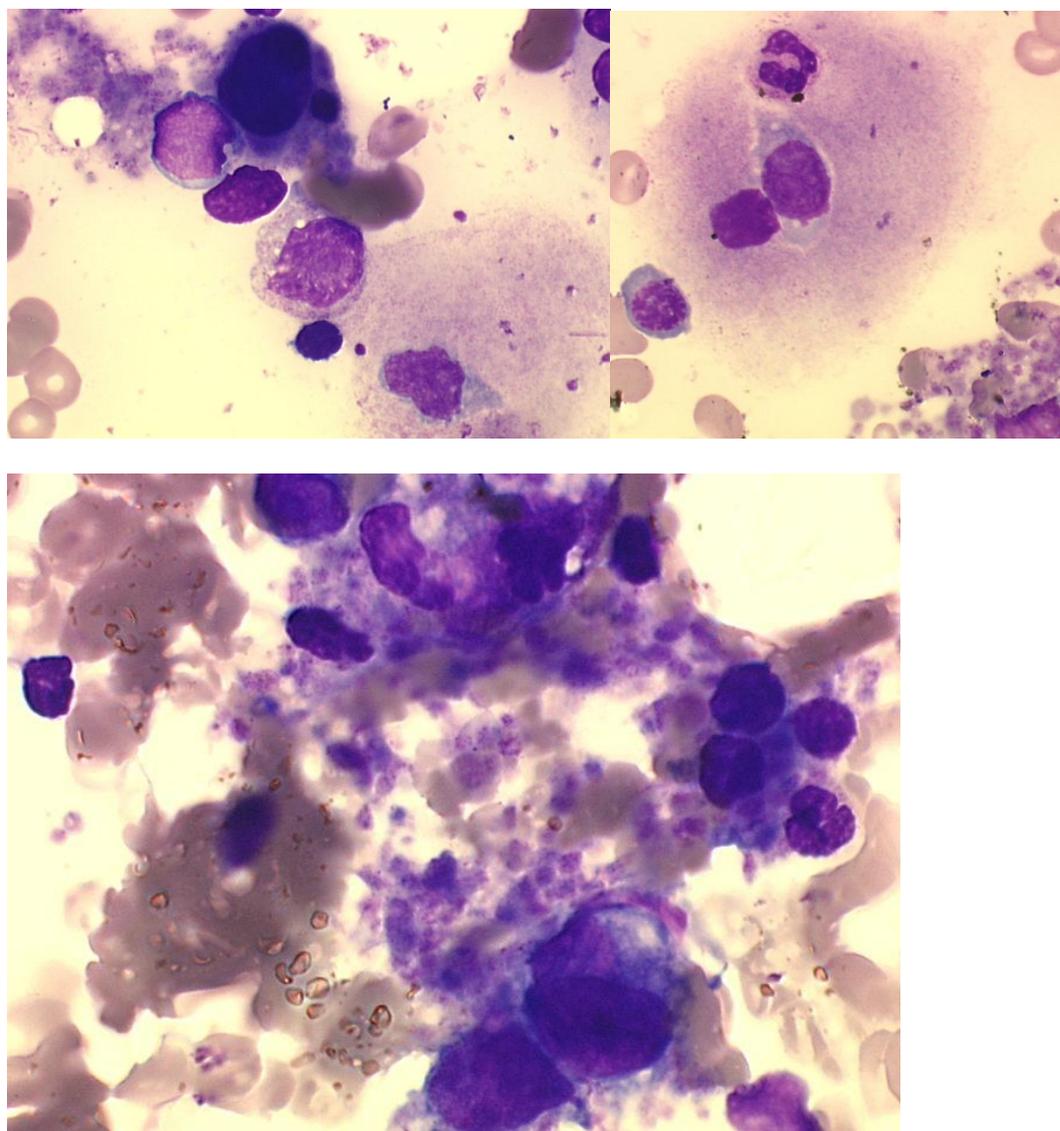


figure 17 : Mégacaryocytes en amas, unilobés ou hypo lobés, image d'empéripolèse

ii - La lignée granuleuse et la lignée érythrocytaire :

Tous les patients avaient une dystrophie des 2 autres lignées. Donc, **ces 4 patients** **présentaient une LAM avec DML (figure 18).**

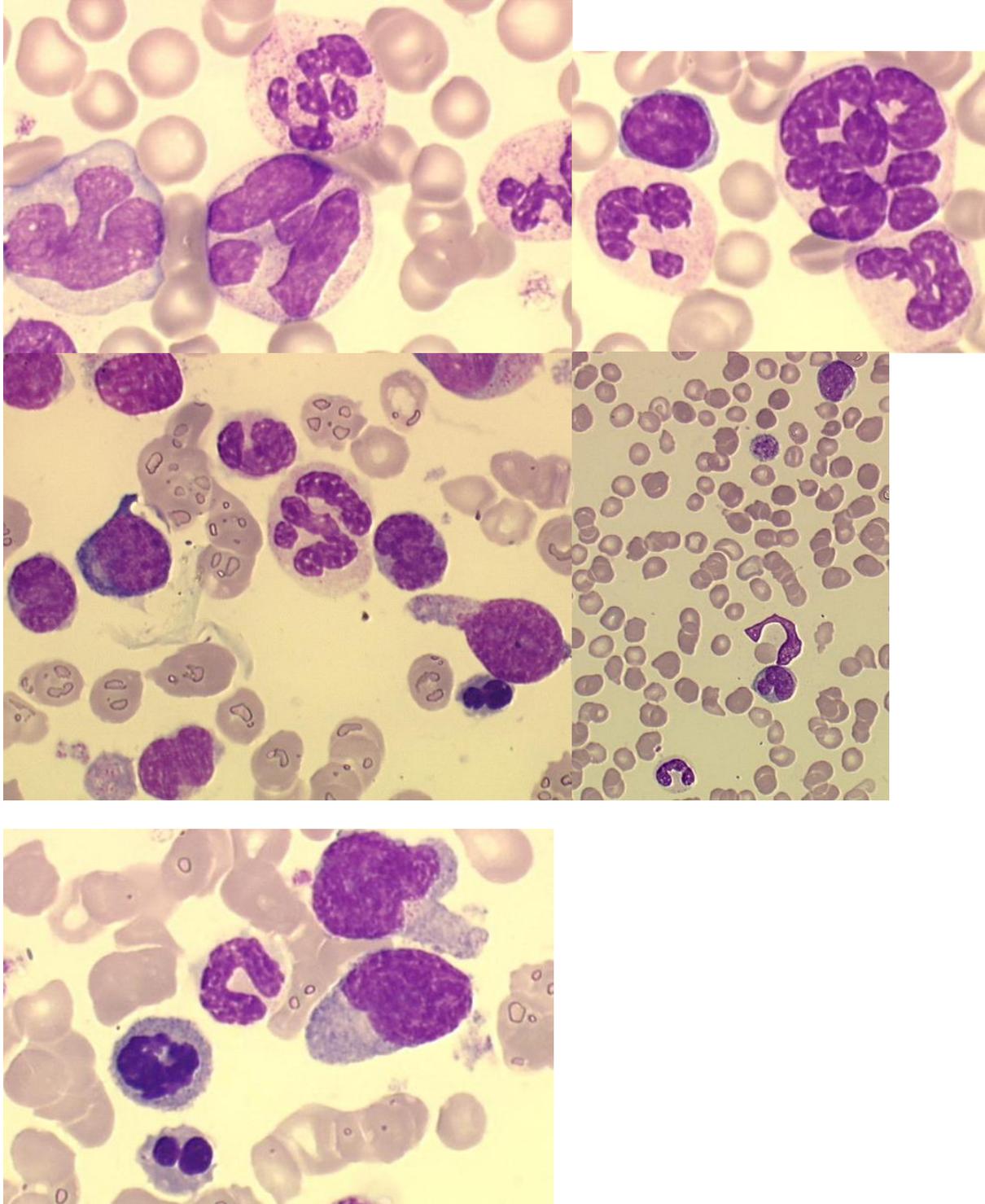


Figure 18 : dystrophie de la lignée granuleuse et érythrocytaire des patients avec anomalie du gène PRDM16.

3 – Analyse de l'expression des myéloperoxydases

Seul, 3 des 4 patients ont pu être analysés en cytochimie (figure 19) et 2 des 4 patients en immunochimie.

2 des 3 patients ont une réaction négative, de manière comparable à la série EVI1.

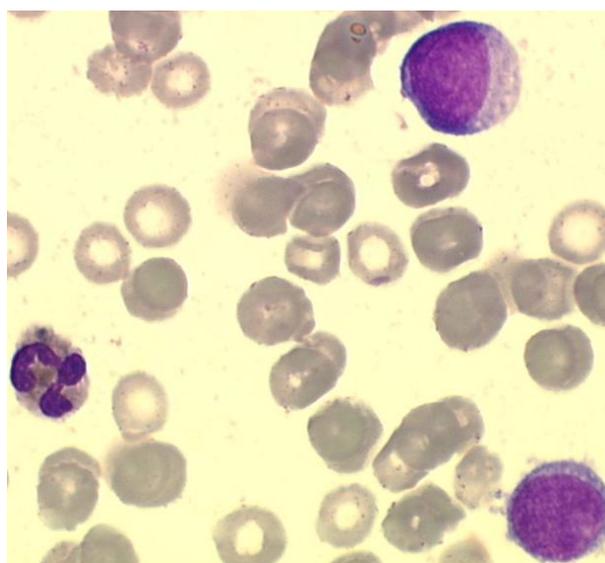
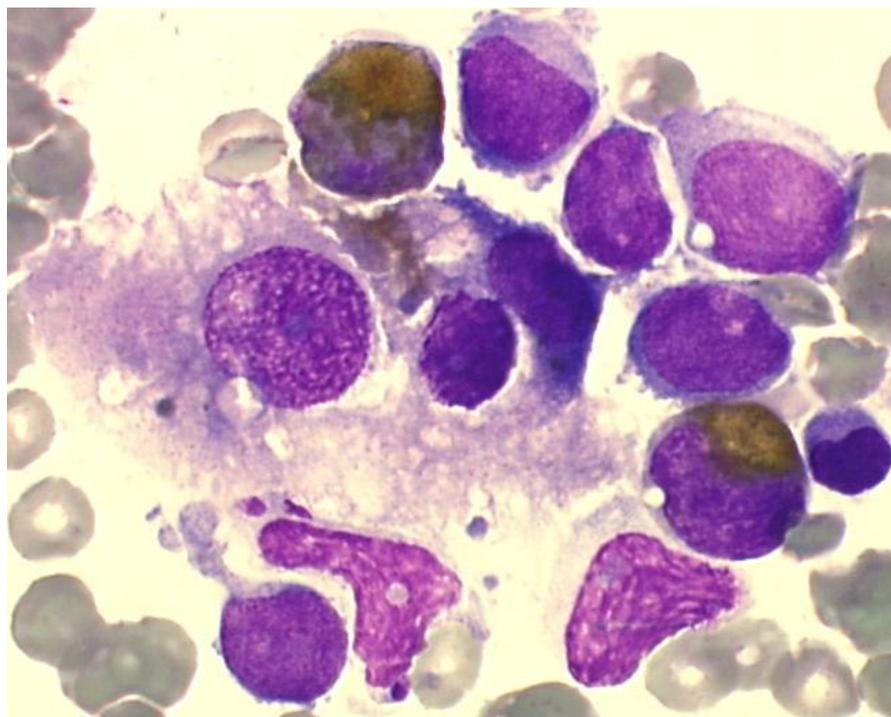


Figure19 : Immunohistochimie des patients ayant une anomalie PRDM16.

V –Analyse de la survie globale :

EVII					
FAB	DATE Dc	Age au dc	Date dernière nouvelle	état	survie m
M1	19/11/1998	41	01/08/2009	vivant	132
M4	12/02/1999	31	24/08/1999	décédé	6
M0	13/04/2001	51	26/01/2002	décédé	10
M4	02/01/2004	67	12/06/2004	décédé	5
M5b	30/05/2005	39	18/04/2006	décédé	11
M0	16/05/2007	72	16/05/2007	inconnu	*
M0	31/07/2007	43	24/11/2007	décédé	4
M0	03/04/2007	8	03/06/2008	décédé	14
M0	02/02/1996	65	30/03/1996	décédé	2
ineval	06/06/1997	61	02/05/1998	décédé	11
M4	07/08/2007	62	20/08/2008	décédé	12
M2	26/11/2007	59	07/06/2008	décédé	6
M5b	27/12/2006	56	27/12/2006	inconnu	*
M1	05/05/2000	79	nov-00	décédé	6
M2	31/05/2005	56	13/05/2009	vivant	48
M4	19/01/2009	51	24/08/2009	vivant	7
M2	29/06/2009	18	31/08/2009	vivant	3

PRDM16					
FAB	DATE Dc	Age au dc	Date dernière nouvelle	état	survie m
M1	03/11/2005	74	01/12/2005	décédé	1
M2	24/12/2008	69	01/08/2009	vivant	8
M4	12/02/2000	77	21/03/2000	décédé	1
M2	23/06/1998	65	31/03/1999	décédé	9

Tableau XII : Analyse de la survie

m : mois

FAB : French American British

Dc : diagnostic

Ineval : inévaluable

A - L'âge moyen au diagnostic :

La moyenne d'âge au diagnostic pour les patients EVII est de 50,5 ans et de 71,2 ans pour les patients avec l'anomalie PRDM 16.

La médiane d'âge au diagnostic est de 56 ans pour la série EVII et 71,5 ans pour la série PRDM16. Les patients avec anomalie de PRDM16 tendent donc à être plus âgés au diagnostic.

B - Analyse de la survie :

Les survies globales ont été calculées selon la méthode de Kaplan et Meier (Kaplan *et al*, 1958). Nous avons pu obtenir les données de survie pour 19 des 21 patients. La détection de l'anomalie EVI1 a été réalisée au laboratoire de cytogénétique de Nantes pour ces 2 patients mais leur prise en charge a été effectuée dans des centres périphériques et ces patients ont été perdus de vue.

La médiane de survie globale pour ces 2 anomalies (EVI1 et PRDM16) est de 9 mois (figure 20). 5 des 19 patients sont toujours en vie à la fin de l'étude. Parmi ces 5 patients, 2 ont été allogreffés (GRI, LUS), deux sont des diagnostics récents (FER, REN) et le dernier patient (CHA) est traité par un inhibiteur de tyrosine kinase car l'anomalie EVI1 est apparue lors de la transformation de sa LMC.

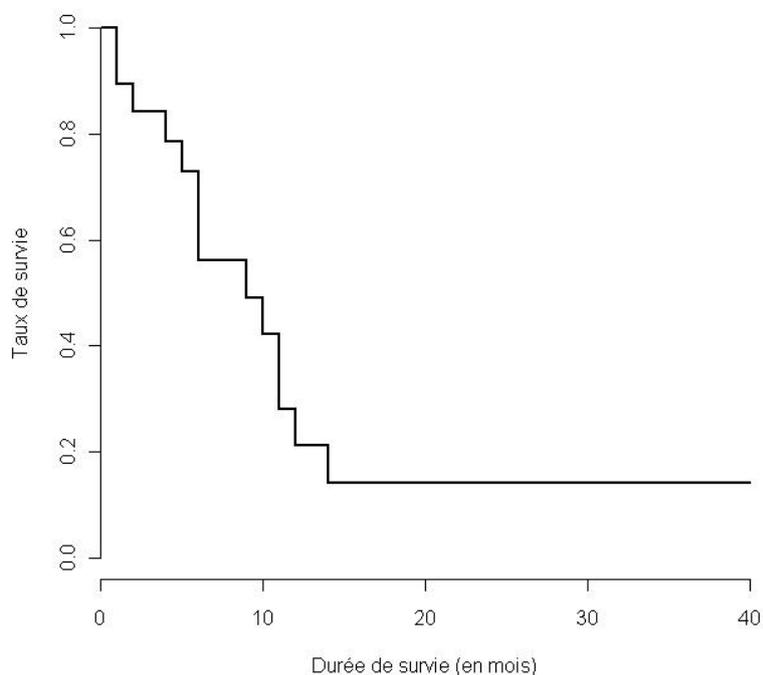


Figure 20 : Analyse de la survie médiane par la méthode de Kaplan-Meier de notre série.

La médiane de survie globale de l'ensemble des LAM dans la littérature est de 12 à 18 mois (Thomas, 2002). Cette comparaison confirme le mauvais pronostic associé aux LAM avec une anomalie des gènes EVI1 et PRDM16

Le taux de survie globale à 5 ans est de 44% pour l'ensemble des LAM de la cohorte du MRC AML de 1998. Les patients de cette cohorte présentant des anomalies en 3q ont une survie globale à 5 ans de 12% . La survie globale dans notre série à 40 mois est de 26.3%.

DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons montré dans cette étude que les patients présentant une LAM avec anomalies des gènes EVI1 et PRDM16 ont des caractéristiques cytologiques, cytochimiques et pronostiques particulières par rapport à notre cohorte de LAM de référence nantaise.

En effet, nos résultats, en accord avec ceux rapportés dans la littérature montrent que les patients présentant une LAM avec anomalie en 3q26 de type EVI1 sont plus fréquemment des LAM secondaires, EVI1 étant un événement tardif dans l'évolution du clone (Wieser *et al*, 2007). Ceci a aussi été observé chez les patients présentant une anomalie de PRDM16 de notre série. Comme la plupart des rares cas rapportés précédemment dans la littérature (Huret *et al*, 1997) nos 4 patients étaient tous porteurs d'une hémopathie antérieure. D'autre part, les patients de notre série présentant un réarrangement du gène EVI1 semblent plus jeunes que les patients porteurs de l'anomalie PRDM16.

Au diagnostic, l'analyse de l'hémogramme de nos patients montre que l'une des principales caractéristiques des LAM à anomalie EVI1 et PRDM16 est l'absence de thrombopénie significative (la plupart des patients ayant plus 100 000 plaquettes lors du diagnostic), contrastant avec la dystrophie des plaquettes. Ces résultats sont comparables aux données de la littérature (Bitter *et al*, 1985 ; Cornillet-lefebvre *et al*, 2000). En effet, comme nous, ces auteurs retrouvent ces caractéristiques plaquettaires dans la majorité de leurs cas.

L'analyse du myélogramme de nos patients montre une autre grande caractéristique de ces LAM EVI1/PRDM16 : les anomalies qualitatives et quantitatives particulières de la lignée mégacaryocytaire. Ainsi quantitativement, la lignée mégacaryocytaire est sur-représentée par rapport à la cohorte de référence. Dans notre étude, ceci est observé dans les 2 séries (EVI1 et

PRDM16). Qualitativement, les mégacaryocytes sont très dystrophiques, hypo - lobés, en amas, et de petite taille comme décrit dans la littérature (Grigg *et al*, 1992 ; Secker-Walker *et al*, 1995 ; Huret *et al*, 2004). Ainsi, dans une LAM, ces caractéristiques mégacaryocytaires et plaquettaires sont très fortement évocatrices d'une anomalie de ces gènes et doivent les faire rechercher systématiquement en cytogénétique.

Cette dystrophie de la lignée des mégacaryocytes s'accompagne de la dystrophie des autres lignées chez 75% des patients de la série EVI1 et 100 % des patients de la série PRDM16. Dans la littérature, la fréquence des LAM avec dysplasie multilignée oscille entre 20,8% et 24% selon les études (Bao *et al*, 2006 ; Wakui *et al*, 2008). De manière intéressante, plusieurs séries de la littérature ont rapporté le pronostic plus sombre des LAM associées à la présence d'une DML (Brito-Babapulle *et al*, 1987 ; Goasguen *et al*, 1992).

La plus grande originalité de notre travail réside dans l'analyse de l'expression de la myéloperoxydase à la fois en cytochimie et en immunophénotypage jamais rapporté antérieurement dans la littérature. Celle-ci a permis d'observer que les blastes hypo-. exprimaient l'enzyme dans 78.5% des cas (<10% de blastes positifs). De plus, nous avons aussi observé un déficit de l'activité MPO dans la maturation granuleuse. Enfin, la fréquence des LAM 0, parmi les LAM EVI1, est très significativement supérieure à celle de l'ensemble des LAM de notre cohorte de référence. La responsabilité de l'anomalie chromosomique 3q26 EVI1 dans le déficit enzymatique de la MPO est suggérée par Moroshita *et al* dans une étude réalisée sur lignées cellulaires, montrant une diminution de l'expression des myéloperoxydases. Les cellules de cette lignée hyper-exprimant EVI1 devenaient insensibles au G – CSF et il en résultait un blocage de maturation de la lignée granuleuse. Le mécanisme exact de cette inhibition n'est pas encore connu. EVI1 étant considéré comme un oncogène et

un facteur de transcription de par sa structure protéique (Nucifora *et al*, 2006), il y a probablement des interactions complémentaires avec d'autres protéines.

De manière intéressante, certaines données de la littérature suggèrent que ce déficit en MPO pourrait avoir un impact pronostic péjoratif. Ainsi Matsuo *et al* retrouve un pronostic significatif plus défavorable (survie sans événement et survie globale plus courte) dans le groupe de LAM exprimant le plus faiblement les MPO (< 50%) . D'autre part, le sous-type M0, défini par la négativité des MPO des blastes, est significativement associé à un pronostic plus sombre (Lee *et al*, 1987 ; Amadori *et al*, 1996, Garand *et al*, 1996).

Une autre caractéristique retrouvée dans notre travail et en accord avec les données des précédentes séries de la littérature est la grande fréquence de la monosomie 7 ou de la délétion du bras long du chromosome 7 associée à l'anomalie EVI1 (52.9% de nos cas) . De même, 2 de nos LAM PRDM16 présentaient une del 5q. Ceci a été décrit par Bloomfield *et al* en 1985 chez 2 des 3 patients présentant une t(1 ;3)(p36 ;q21) sans que le gène ne soit isolé, à cette époque. Ces observations sont importantes car ces anomalies supplémentaires des chromosome 5 et 7 sont, à elles seules, de mauvais pronostic (Swerlow *et al*, 2008).

Les deux anomalies, EVI1 et PRDM16, sont associées à un pronostic péjoratif. Ainsi, la survie globale à 5 ans est de seulement 12% dans ce cas. Par comparaison, celle des 1612 patients inclus dans le protocole MRC AML 10 anglais, considéré comme une référence en la matière, est de 42% pour les LAM à caryotype normal et de 61 à 69% pour les LAM à cytogénétique favorable (Grimwade *et al*, 1998).

Des études complémentaires d'analyse d'expression d'EVI1 et de MDS1/EVI1 auraient été intéressantes chez les patients ne présentant pas d'anomalie en 3q26 en cytogénétique conventionnelle. En effet, plusieurs auteurs ont montré que l'hyper expression d'EVI1 n'était pas uniquement liée au réarrangement chromosomique en 3q26 (Russel *et al*,1994 ; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-khosrovani *et al*,2003). L'étude de l'expression de ces gènes dans une cohorte de 319 LAM de novo a montré qu'ils étaient sur exprimés, en dehors des réarrangements ; dans 13.8% des cas (EVI1, MDS1/EVI1 ou les 2). En outre, seulement 9% des patients porteur de ces anomalies ont un réarrangement en 3q26. Aucun mécanisme n'est pour l'instant décrit pour expliquer cette hyper expression d'EVI1, en l'absence de réarrangement, excepté la reconnaissance d'anomalies cryptiques sur le caryotype standard. Un des patients de notre cohorte présentait cette anomalie et seule une technique de FISH a permis de mettre en évidence le réarrangement. La dérégulation du promoteur du gène EVI1 est probablement en cause (Nucifora *et al*, 2005). Les indices cytologiques au diagnostic peuvent donc orienter l'utilisation de la sonde spécifique d'EVI1 afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique.

L'étude d'un groupe hollandais (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-khosrovani *et al*) a mis en évidence des valeurs pronostiques des deux formes d'EVI1 (MDS1/EVI1 et EVI1). Le groupe EVI1 + et MDS1/EVI - est de plus mauvais pronostic. Le pourcentage de rémission complète est de 50% mais la survie globale à 60 mois est de 0%. Les patients ne présentant aucune anomalie (EVI1- MDS1/EVI1-) ont un taux de rémission complète à 80% et une survie globale à 60 mois de 30%. D'après cette étude, l'hyper-expression d'EVI1 est un facteur indépendant de mauvais pronostic. La perte d'activité de MDS1/EVI1 décrite auparavant comme inhibiteur de tumorigénèse est probablement à l'origine du mauvais pronostic de ce groupe. En effet, une étude réalisée par Lugthart *et al* en 2008 confirme que le

groupe porteur de l'anomalie EVI1+/MDS1/EVI1- est de plus mauvais pronostic que les patients porteurs de la seule anomalie EVI1. Il serait donc intéressant de connaître les profils d'expression d'EVI1 et de MDS1/EVI1 des patients de notre série.

En conclusion, une constellation de facteurs à impact pronostic défavorables pourrait contribuer à expliquer le pronostic péjoratif de l'anomalie EVI1, incluant la forte prévalence des LAM0, le déficit en MPO des blastes et de la lignée granuleuse, la présence d'une dysplasie multilignée, le caractère secondaire de l'apparition de l'anomalie EVI1 plutôt que de novo ainsi que l'association fréquente à une anomalie du chromosome 7 (monosomie 7 ou del 7q).

L'implication du gène PRDM16 dans les LAM étant plus récente, aucune étude sur son expression, à notre connaissance, n'a été réalisée à ce jour. 3 patients présentant l'anomalie t(1 ;3)(q26 ;q21) ont été décrits par Bloomfield *et al* en 1985 sans que le gène ne soit encore connu. Ces patients, tout comme nos 4 patients, présentaient des anomalies morphologiques des lignées myéloïdes, en particulier plaquettaires, similaires à celles des patients EVI1. L'étude de Nishikata *et al* de 2003 sur les cellules de lignée dépendante à l'IL3 montre que la présence MEL1S ou PRDM16, dont le domaine PR est manquant, provoque un blocage de maturation des lignées en présence de G-CSF alors que la forme longue du gène contenant le domaine PR (MEL1) n'induit pas ce blocage. Le domaine PR de ces protéines correspond donc à un gène inhibiteur de tumorigénèse en favorisant la différenciation cellulaire.

La valeur pronostique de l'anomalie PRDM16 reste à établir sur de plus grandes séries, même si l'évolution de nos quatre patients était plutôt défavorable (3 des patients sont en effet décédés après 1, 1 et 8 mois). En outre, chacun de ces patients présentaient également

plusieurs facteurs défavorables associés tels que le caractère secondaire de ces LAM (4/4 patients), la présence d'une dysplasie multilignée (4/4 patients), le déficit en MPO des blastes de la lignée granuleuse (2/3 patients) et une anomalie surajoutée du chromosome 5 (2/4 patients).

Des outils complémentaires de biologie moléculaire pourraient permettre d'affiner le diagnostic et le pronostic. En effet, une étude réalisée par Santamaria *et al* en 2009 propose un modèle pronostique de stratification des anomalies moléculaires dans le groupe des LAM à caryotype normal. 9 marqueurs ont été étudiés : ERG, EVI1, MLL, PTD, MN 1, PRAME, RHAMM, WT, FLT3 et NPM1. En analyse multivariée, l'hyper - expression de ERG, d'EVI1 et l'hypo - expression de PRAME sont corrélées à un mauvais pronostic.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les anomalies des gènes EVI1 et PRDM16 restent des entités rares (3% de l'ensemble des LAM de notre laboratoire sur cette période d'analyse de 1987-2009), mais il est important de les diagnostiquer du fait de leur pronostic péjoratif. La présentation cytologique particulière lors du diagnostic peut orienter la cytogénétique.

Une étude complémentaire est réalisée actuellement par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique portant sur les réarrangements chromosomiques en 1p36 dans les hémopathies malignes variées, dont le gène PRDM16. Elle a pour but d'identifier les gènes impliqués ainsi que les gènes partenaires, de cartographier les régions détectées et de les corrélérer avec le type d'hémopathie (myéloïde ou lymphoïde). Cette étude est nationale. En effet, le nombre de cas étant très faible, il est difficile d'émettre des conclusions même si le pronostic semble plus défavorable que celui d'EVI1.

Les LAM avec anomalies des gènes EVI1 et PRDM16 sont associées à une résistance au traitement. Des innovations thérapeutiques pour la prise en charge de ces LAM à pronostic péjoratif sont nécessaires, comme, par exemple, la recherche d'activateurs du domaine PR.

ANNEXE

ANNEXE 1: Caryotype du patient FER



BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amadori S., Venditti A., Del Poeta G. 1996. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-MO) : a distinct clinico-biologic entity with poor prognosis. *Ann Hematol.* 72: 208-215.

Bao L., Wang X, Ryder J, Ji M, Chen Y, Chen H, Sun H, Yang Y., Du X, Kerzic P, Gross SA, Yao L, Lv L, Fu H, Lin G, Irons RD. 2006 Prospective study of 174 de novo acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. *Eur J Haematol* 77(1) : 35-45.

Barjesteh van Waalwijk van Door-Khosrovani S., Erpelinck C., Van Putten W.L., Valk P.J., Van der Poel-van de Luytgaarde S., Hack R., Slater R., Smit EM., Beverloo H.B., Verhoef G., Verdonck L.F., Ossenkoppele G.J., Sonneveld P., de Greef G.E., Lowenberg B., Delwel R. 2003. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia : a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 101 : 837-845.

Baron B., Nucifora G., McCabe N., Espinosa R., LeBeau M., McKeithan T. 1993. Cloning of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3 ;14)(q27 ;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 5262-5267.

Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33:451-458.

Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: A report of the French-American-British (FAB) co-operative group. *Ann. Intern. Med.* 103:626-629.

Bennet J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. 1985. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megacaryocyte lineage (M7): A report of the French-American-British (FAB) co-operative group. *Ann. Intern. Med.* 103:460-662.

Bitter M.A., Neilly M.E., Le Beau M.M., Mearson M.G., Rowley J.D. 1985 . Rearrangements of chromosome 3 involving bands 3q21 and 3q26 are associated with normal or elevated platelet counts in acute non – lymphocytic leukemia. *Blood* 66 : 1362-1370.

Bloomfield C.D., Garson O.M., Volin L., Knuutila S., De la Chapelle A. 1985. t(1 ;3)(p36 ;q21) in acute nonlymphocytic leukemia : a new cytogenetic-clinicopathologic association. *Blood.* 66 : 1409-1413.

Brito-Babapulle F., Catovsky D., Galton D.A.G. 1987. Clinical and laboratory features of de novo acute myeloid leukemia with trilineage myelodysplasia. *Br J Haematol* 66: 445-450.

Buonamici S., Chakraborty S., Senyuk V., Nucifora G. 2003. The role of EVI1 in normal and leukemic cells. *Blood cells, Molecules, and diseases* 31 : 206-212.

Buonamici S., Li D., Mikhail F.M. 2005. EVI 1 abrogates interferon alpha response by selective blocking PML induction . *J. Biol. Chem.* 280 : 428-436.

- Byrd J.C., Dodge R.K., Carroll A., Baer M.R., Edwards C., Stamberg J., Qumsiyeh M., Moore J.O., Mayer R.J., Davey F., Schiffer C.A., Bloomfield C.A. . 1999. Patients With t(8;21)(q22;q22) and Acute Myeloid Leukemia Have Superior Failure-Free and Overall Survival When Repetitive Cycles of High-Dose Cytarabine Are Administered. *JCO* 17 (12): 3767-3775.
- Byrd J.C. Mrozek K., Dodge R.K., Carroll A.J., Edwards C.G., Arthur D.C., Pettani M.J., Patil S.R., Rao K.W., Watson M.S., Koduru P.R., Moore J.O., Stone R.M., Mayer R.J., Feldman E.J., Davey F.R., Bloomfield C.D. 2002. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia : result from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461) . *Blood* 100 : 4325-4336.
- Caligiuri M.A., Bloomfield C.D. et al . 2001. Molecular biology of leukemia in cancer. *Principles and Practice of Oncology*.
- Cornillet-Lefebvre P., Daliphard S., Stroski S. 2000. t(1;3)(p36;q21). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* . <http://AtlasGeneticsOncology.org> .
- De Weer A., Poppe B., Cauwelier B., Carlier A., Dierick J., Verhasselt B., Philippe J., Van Roy N., Speleman F. 2008. EVI1 activation in blast crisis CML due to juxtaposition to the rare 17q22 partner region as part of a 4-way variant translocation t(9;22).
- De Weer A., Speleman F., Cauwelier B., Van Roy N., Yigit N., Verhasselt B., De Moerloose B., Benoit Y., Noens L., Selleslag D., Lipper E., Struski S., Bastard C., De Paepe A., Vandenberghe P., Hagemeyer A., Dastugue N., Poppe B on the Groupe Français de cytogénétique Hématologique (GFHC). 2008. EVI 1 overexpression in t(3;17) positive myeloid malignancies results from juxtaposition of EVI 1 to the MSI 2 locus at 17q22. *Haematologica* 93(12) : 1903-1907.
- Estey E., Pierce S. 1993 Treatment of myelodiplastic syndromes with AML – type chemotherapy. *Leuk lymphoma* 11 (suppl 2) : 59-63.
- Farag S.S. Archer K.J., Mrózek K., Ruppert A.S., Carroll A. J., Vardiman J.W., Pettenati M.J., Baer M.R., Qumsiyeh M.B., Koduru P.R., Ning Y., Mayer R.J., Stone R.M., Larson R., Bloomfield C.D. 2006. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 108(1): 63-73.
- Fonatsch C., Gudat H., Lengfelder E., Wandt H., Silling-Engelhart G., Ludwig W.D., Thiel E., Freund M., Bodenstern H., Schwieder G. 1994. Correlation of cytogenetics finding with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia* 8 : 1318-1326.
- Fröhling S., Schlenk R. F, Kayser S., Morhardt M., Benner, A. Döhner K., Döhner H., for the German-Austrian AML Study Group. 2006. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98. *Blood* 108 (10): 3280-3288.

Garand R., Robillard N. 1996. Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hemato Cell Ther* 38 (6):471-486.

Goasgen J.E., Matsuo T., Cox C. 1992. Evaluation of the dysmyelopoiesis in 336 patients with de novo acute myeloid leukemia : Major importance of dysgranulopoiesis for remission and survival. *Leukemia* 6:520-525.

Goyama S., Kurokawa M. 2009. Pathogenic significance of ecotropic viral integration site-1 in hematological malignancies. *Cancer Sci* 100 (6) : 990-995.

Greenberg P.L., Lee S.J. 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89 (6) :2079-2088.

Grigg A.P., Gascoyne R.D., Phillips G.L., Horsman D.E. 1993. Clinical, haematological and cytogenetic features in 24 patients with structural rearrangements of the Q arm of chromosome 3. *Br. J. Haematol.* 83 : 158-165.

Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A. 1998. The importance of diagnostic cytogenetic on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 92 (7):2322-2333.

Grimwade D., Walker H., Harrison G., Oliver F., Chatters S., Harrison C.J., Wheatley K., Burnett A.K. 2001. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial . *Blood* 98(5): 1312-1320.

Hoyt P.R. . 1997. The EVI 1 proto oncogene is required at midgestation for neural, heart, and paraxial mesenchyme development. *Mech. Dev.* 65:55-70.

Huret J.L., Senon S. 2004. PRDM16 (PR domain containing 16). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol.* <http://AtlasGeneticsOncology.org>.

Huret J.L. 1997. t(1;3)(p36;q21). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* <http://AtlasGeneticsOncology.org>.

Jaffe S., Lee Harris N., Stein H., Vardiman J.W. 2001. World Health Organization Classification Of Tumours. Pathology and genetics, Tumours of Haematopoietics and lymphoid tissues. 351p. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Jenkins R.B. Tefferi A., Sodberg L.A., Dewald G.W. 1989. Acute leukemia with abnormal thrombopoiesis and inversions of chromosome 3. *Cancer Genet Cytogenet* 39 : 167 – 179.

Jiang G.L., Huang S. 2000. The yin-yang of PR domain family genes in tumorigenesis. *Histol. Histopathol.* 15 : 109-117.

Kaplan E., Meier P. 1958. Non parametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical association.* 53 : 457-481.

Lahortiga I., Vazquez I., Agirre X., Larrayoz M.J., Vizmanos J.L., Gozzeti A., Calasanz M.J., Odero M.D. 2004. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. *Gene Chromosomes Cancer* 40: 179-189.

Lahortiga I., Agirre X., Brilloni E., Vazquez I., Larrayoz M., Gasparini P., Lo Coco F., Pelicci G., Calasanz M., Odero M. 2004. Molecular characterization of a t(1;3)(p36;q21) in a patient with MDS. MEL1 is widely expressed in normal tissues, including bone marrow, and it is not overexpressed in the t(1;3) cells. *Oncogene* 23 : 311-316.

Lee E.J., Pollak A., Leavitt R.D., Testa J.R., Schiffer C.A. 1987. Minimally differentiated acute non lymphocytic leukemia : a distinct entity. *Blood*. 70: 1400-1406.

Lin Y., Wong K., Calame K. 1997. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276: 569-596.

Lodé L., Avet-Loiseau H. 2007. Anomalies chromosomiques et géniques dans les hémopathies malignes. EMC(Elsevier Masson SAS, Paris) Hématologie, 13-000-K-10.

Look A.T. 1998. genes altered by chromosomal translocation in leukemias and lymphomas. *Leukemia* 10(6):937-942.

Matsuo T, Kuriyama K, Miyazaki Y, Yoshida S, Tomonaga M, Emi N, Kobayashi T, Miyawaki S, Matsushima T, Shinagawa K, Honda S, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group. 2003. The percentage of myeloperoxidase-positive blast cells is a strong independent prognostic factor in acute myeloid leukemia, even in the patients with normal karyotype. *Leukemia*. 17(8):1538-1543.

Modlich U., Schambach A., Brugman M.H., Wicke D.C., Knoess S., Li Z., Maetzig T., Rudolph C., Schlegelberger B., Baum C. 2008. Leukemia induction after a single retroviral insertion in EVI1 or PRDM 16. *Leukemia* 22 : 1519-1528.

Morishita K., Parker D.S., Mucenski M.L., Copeland N.G., Ihle J.N. 1988. Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3 dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* 54: 831-840.

Morishita K., Parganas E., Douglass E.C., Ihle J.N. 1990. The unique expression of human EVI1 gene in endometrial carcinoma cell line : sequence of cDNA and structure of alternatively spliced transcripts . *Oncogene* 5 : 963-971.

Morishita K., Parganas E., Matsugi T., Ihle J.N., 1992. Expression of the EVI 1 zinc finger gene in 32Dc13 myeloid cell blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony stimulating factor. *Mol. Cell. Biol.* 12 :183-189.

Mucenski M.L., Taylor B.A., Copeland N.C., Jenkins N.A. 1988. Chromosomal location of EVI1 in the DNA of AKXD murine myeloid tumors. *Oncol. Res.* 2 : 219 – 233.

Mucenski M.L., Taylor B.A., Ihle J.N., Hartley J.W., Morse III H.C., Jenkins N.A., Copeland N.G. 1988. Identification of a common ecotropic viral integration site, EVI 1 in the DNA of AKXX murine myeloid tumors. *Mol. Cell. Biol.* 8:301-308.

- Nishikata I., Sasaki H., Iga M., Tateno Y., Imayoshi S., Asou N., Nakamura T., Morishita K. 2003. A novel EVI 1 gene family, MEL 1, lacking PR domain (MELS) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21) –positive AML and blocks G-CSF induced myeloid differentiation. *Blood*. 102 : 3323-3332.
- Nucifora G. et al. 1994. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3 ;21)(q26;q22) translocations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4004-4008.
- Nucifora G., Laricchia-Robbio L., Senyuk V. 2006. EVI1 and hematopoietic disorders : history and perspectives. *Gene* 368: 1-11.
- Raza A., Buonamici S., Lisak L., Tahir S., Li D., Imran M., Chaudary N.I., Pervaiz H., Gallegos J.A., Alvi M.I., Mumtaz M., Gezer S., Venugopal P. Reddy P., Galili N., Candoni A., Singer J., Nucifora G. 2004. Arsenic trioxide and thalidomide combination produces multilineage hematological responses in myelodysplastic syndromes patients, particularly in those with high pre-therapy EVI1 expression. *Leuk Res* 28:791-803.
- Reiter E., Greinix H., Rabitsch W., Keil F., Schwarzinger I., Jaeger U., Lechner K., Worel N., Streubel B., Fonatsch C., Mitterbauer G., Kalhs P. 2000. Low curative potential of bone marrow transplantation for highly aggressive acute myelogenous leukemia with inv(3)(q21q26) or homologous translocation t(3;3) (q21;q26). *Ann Hematol* 79 : 374-377.
- Sandler D.P., Ross J.A. 1997. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin. Oncol.* 24 (1) :3-16.
- Santamaría M.C., Chillón m.C., García-Sanz R., Pérez C., Caballero M.D., Ramos F., García de Coca A., Alonso M.J., Giraldo P., Bernal T., Queizán J., Rodríguez J.N., Fernández-Abellán P., Báez A., Peñarrubia M., Balanzategui A., Vidriales M.B., Sarasquete M.E., Alcoceba M., Díaz-Mediavilla J., San Miguel J.F., Gonzalez M. 2009. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*: 114: 148-152.
- Secker-Walker L.M., Mehta A., Bain B. 1995. Abnormalities of 3q21 and 3q26 in myeloid malignancy: a United Kingdom Cancer Cytogenetic Group study. *Br J Haematol* 91:490-501.
- Sherif S. Farag, Kellie J. Archer, Krzysztof Mrózek, Amy S. Ruppert, Andrew J. Carroll, James W. Vardiman, Mark J. Pettenati, Maria R. Baer, Mazin B. Qumsiyeh, Prasad R. Koduru, Yi Ning, Robert J. Mayer, Richard M. Stone, Richard A. Larson, and Clara D. Bloomfield 2006. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 2006 108: 63-73.
- Shi G., Weh H.J., Duhrsen U., Zeller W., Hossfeld D.K. 1997. Chromosomal abnormality inv(3)(q21q26) associated with multilineage hematopoietic progenitor cells in hematopoietic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 96 : 58-63.
- Sitailo S., Sood R., Barton K., Nucifora G. 1999. Forced expression of the leukemia-associated gene EVI 1 in ES cells : a model for myeloid leukemia with 3q26 rearrangements. *Leukemia* 13 : 1639-1645.

- Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A., Harrington D.H., Theil K.S., Mohamed A., Paietta E., Willman C.L., Head D.R., Rowe J.M., Forman S.J., Appelbaum F.R. 2000. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a southwest oncology Group/Eastern cooperative oncology group study. *Blood* 96 : 4075-4083.
- Sood R., Talwar-Trikha A., Chakrabarti S.R., Nucifora G. 1999. MDS1/EVI1 enhances TGF beta1 signaling and strengthens its growth-inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/EVI1, product of the t(3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF-beta1. *Leukemia* 13 :348-357.
- Stevens-kroef MJPL, Schoenmakers E., Van Kraaij M., Huys E., Vermeulen S., Van der Reijden B., Geurts van kessel A. 2006. Identification of truncated RUNX1 and RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a case of t(1;21)(p36;q22)-positive therapy-related AML. *Leukemia* 20 : 1187-1189.
- Suzakawa K., Parganas E., Gajar A., Abe T., Takahashi S., Tani K., Asano S., Asou H., Kamada N., Yokota J. 1994. Identification of a break point cluster region 3' of the robophorinI gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the EVI 1 gene in acute myelogenous leukemias with inv(3)(q21q26). *Blood* 84: 2681-2688.
- Sweet D.L., Golomb H.M., Rowley J.D., Vardiman J.M. 1979. Acute myelogenous leukemia and thrombocytopenia associated with abnormality of chromosome no3. *Cancer Genet Cytogenet* 1:33-37.
- Swerdlow H., Campo E., LEE Harris N., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. 2008. WHO Classification of Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 439 p. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Thomas X. 2002. Nouvelle approche thérapeutique des leucémies aiguës de l'adulte. *RFL*, 344 :55-65.
- Wakui M, Kuriyama K, Miyazaki Y, Hata T, Taniwaki M, Ohtake S, Sakamaki H, Miyawaki S, Naoe T, Ohno R, Tomonaga M. 2008. Diagnosis of acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol. *Int J. Hematol.* 87(2) :144-151.
- Wheatley, Burnett et al. 1999. A simple, robust, validation and highly predictive index for the determination of risk directed therapy in acute myeloid leukemia derived from the MRC AML 10 trial. *Br J. Haematol* 107(1): 69-79.
- Wieser R. 2007. The oncogene and developmental regulator EVI1: Expression, biochemical properties, and biological functions. *Gene* 396 :346-357.

Nom – Prénoms : EVEILLARD Marion ; Anne

Titre du mémoire – thèse :

Impact des réarrangements des gènes EVI1 et PRDM 16 sur les caractéristiques clinico-morphologiques et pronostiques des leucémies aiguës myéloblastiques.

Résumé du mémoire – thèse :

Les réarrangements des gènes EVI1 et PRDM16 sont présents dans environ 3% à 5% des LAM et sont associés à un pronostic défavorable. Ces anomalies sont corrélées à la présence de particularités clinico-morphologiques.

Pour évaluer la répercussion de ces réarrangements sur l'aspect cytologique, clinique et pronostique, nous avons analysé une série de 17 patients porteurs de l'anomalie EVI1 et 4 patients avec l'anomalie PRDM16, diagnostiqués au laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes entre 1996 et 2009. Ces 21 patients ont été comparés aux données de l'ensemble des LAM diagnostiquées au laboratoire entre 1987 et 2009 (n=1844).

Nous avons ainsi mis en évidence, de façon significative, des caractéristiques particulières associées à ces anomalies : la plus grande fréquence de LAM secondaires, l'absence de thrombopénie significative au diagnostic contrastant avec la dystrophie plaquettaire, des anomalies qualitatives et quantitatives de la lignée mégacaryocytaire (mégacaryocytes en amas, de petite taille et hypolobés) ainsi que la présence de dysplasie des autres lignées (DML dans 75% des LAM EVI1 et 100% des LAM PRDM16).

Le point le plus important de l'étude réside dans l'analyse de l'expression des myéloperoxydases (MPO). En effet, nous avons retrouvé un déficit d'expression de l'enzyme dans les blastes et dans la lignée granuleuse de la majorité des LAM EVI1 (78.5% ont moins de 10% de blastes positifs au diagnostic), d'où une plus grande fréquence de LAM0 (selon la classification FAB).

La survie globale à 5 ans dans notre série est de 12%, confirmant la valeur pronostique défavorable des réarrangements des gènes EVI1 et PRDM16 dans les LAM.

MOTS CLES : LAM, EVI 1, PRDM 16 , myéloperoxydase

JURY

PRESIDENTS : Mme Virginie FERRE, Professeur de Virologie,
Faculté de Pharmacie de Nantes

DIRECTEUR : M. Hervé AVET LOISEAU, Professeur d'Hématologie-
Faculté de Médecine de Nantes

ASSESEURS: M. Richard GARAND, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Mme Laurence LODÉ, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Mme Pascaline TALMANT, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

M. Jacques DELAUNAY, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 18 rue Raymond Soulas, 44400 Rezé