

Détection du messager chimérique *abl-bcr* dans la leucémie myéloïde chronique

Marie-Hélène Delfau, Michel Garbarz, Isabelle Chaveroche, Bernard Grandchamp

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est liée à la prolifération clonale d'une cellule souche multipotente. Les cellules leucémiques de la grande majorité des patients atteints de LMC possèdent une anomalie caryotypique caractéristique: le chromosome Philadelphie qui résulte de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Au cours de cette translocation, le proto-oncogène *c-abl*, normalement présent sur le chromosome 9 est fusionné avec un gène dénommé *bcr* sur le chromosome 22. La transcription de ce gène hybride est à l'origine d'un ARNm chimérique codant pour une protéine de 210 kDa (kilodaltons) possédant une activité tyrosine kinase [1]. L'existence du gène et de l'ARNm hybride est un fait constant et ces anomalies peuvent donc constituer des marqueurs de clonalité chez les patients atteints de LMC. Récemment, le développement de protocoles thérapeutiques alliant les interférons à la chimiothérapie d'une part, et la pratique de greffe de moelle allogénique d'autre part, permet, dans les cas favorables, d'obtenir l'éradication des cellules leucémiques. Cependant, les techniques actuelles de détection (caryotype ou étude des fragments de restriction de la région *bcr*) ont un seuil de détection situé entre 1 et 5 % de cellules malignes résiduelles. Pour apprécier la qualité des rémissions obtenues, il apparaît donc utile de développer des techniques plus sensibles. Pour cela nous avons adapté la technique d'amplification de l'ADN *in vitro* [2] ou *polymerase chain reaction* (PCR) pour détecter de façon spécifique et extrêmement sensible la présence de l'ARNm chimérique *abl-bcr*. La variabilité des points de cassure d'un malade à l'autre interdisait l'application directe de la technique. Néanmoins, on détecte

seulement deux types d'ARNm chimérique *abl-bcr*: dans l'une des formes, l'exon 2 de *abl* est lié à l'exon 2 de *bcr* alors que dans l'autre forme il est fusionné à l'exon 3 de *bcr* [3]. La stratégie que nous avons utilisée consiste donc à extraire l'ARN des cellules à partir de sang de patients puis à synthétiser une copie d'ADNc. Cet ADNc est ensuite amplifié par la technique PCR. Le

produit de la réaction est analysé sur un gel d'agarose et révélé grâce à un oligonucléotide susceptible de s'hybrider avec le segment amplifié. Cette technique, mise au point sur les cellules de la lignée K 562, permet de détecter un signal à partir de 0,01 ng (nanogramme) d'ARN total extrait de ces cellules dilué dans 1 µg d'ARN de sujet témoin alors qu'un signal n'est obtenu qu'à partir d'ARN nor-

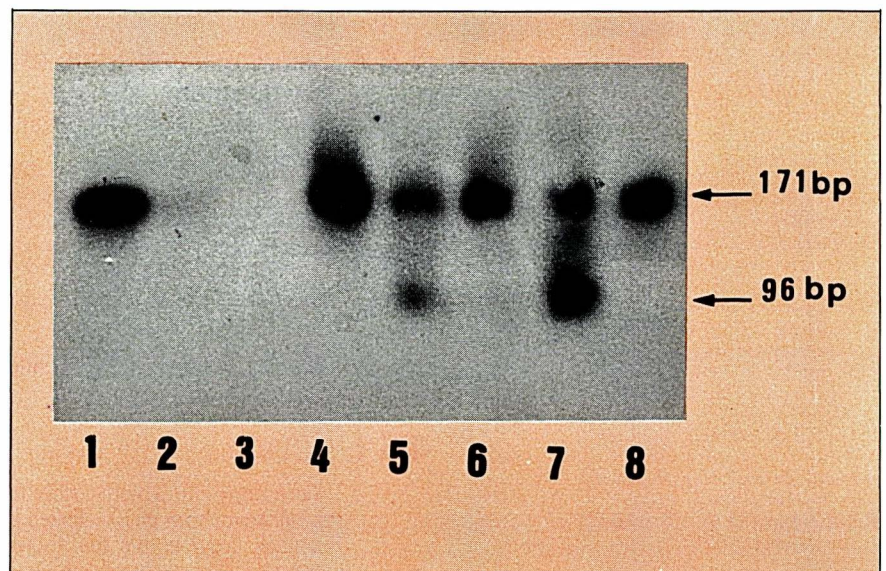


Figure 1. **Amplification de l'ARN chimérique *abl-bcr*.** L'ARN cytoplasmique est préparé à partir de cellules K 562 ou de leucocytes périphériques (4), le premier brin d'ADNc est synthétisé en utilisant la transcriptase inverse de MMLV et 100 pmoles de l'oligonucléotide CTGAGGCTCAAAGTCAGATG complémentaire de l'exon 2 d'*abl* comme amorce, dans un mélange réactionnel de 10 µl (Gibco BRL, focus vol. 9 n 1). La PCR est ensuite réalisée dans les conditions décrites (3) après avoir ajouté un second oligonucléotide TCGTGTGTGAAACTCCAGAC correspondant à l'exon 2 de *bcr* (100 pmoles) en présence de deux unités de Taq polymérase dans un volume final de 100 µl. Après 30 cycles (dénaturation : 1 minute à 91°C, hybridation : 1,5 minute à 40°C, élongation : 1,5 minute à 60°C), 10 µl du mélange réactionnel sont déposés sur un gel d'agarose à 2 %, puis l'ADN est transféré sur membrane de nylon (Zeta probe, Biorad). Les fragments sont hybridés avec un oligonucléotide AGCCCTTCAGCGGCCAGTA marqué au ³²P (5.10⁵ cpm/ml, 1-2. 10⁹ cpm/µg). Le filtre est préhybridé en 5.SSEP, 0,5 % SDS, 5.Denhard's, 50°C 30 minutes. L'hybridation est effectuée pendant deux heures dans les mêmes conditions. Après lavage en 2.SSEP deux fois 20 minutes à 20°C puis en 5.SSEP, 0,1 % SDS à 50°C 4 minutes, le filtre est autoradiographié 6h à -80°C avec un écran Cronex Quanta III. 1 = ARN de K562 (10 ng) ; 2 = ARN de K562 (0,01 ng dilué dans 1 µg d'ARN témoin) ; 3 = ARN de sujet normal (1 µg) ; 4, 5, 6, 7, 8 = ARNs de patients atteints de LMC (100 ng).

mal seul. On peut donc estimer qu'il est possible, dans nos conditions expérimentales, de détecter une cellule pathologique sur 100 000 environ à partir de 1 µg d'ARN total. L'étude de l'ARN de certains malades permet de visualiser deux bandes correspondant à la présence dans les cellules des deux formes d'ARNm hybride : la forme contenant l'exon 3 de bcr donne un produit d'amplification de 171 bp, tandis que la forme ne comprenant pas cet exon conduit à un fragment amplifié de 96 bp. Il apparaît vraisemblable que l'amplification constituera la technique de choix pour la recherche de cellules malignes résiduelles chez les patients en rémission et que son application s'étendra à d'autres hémopathies dès lors qu'un événement moléculaire constant, caractéristique du clone malin, aura été identifié ■

Summary

CML is characterized by a chromosomal translocation t(9q34,22q11) resulting in the formation of a chimeric gene abl-bcr. We used a modification of the polymerase chain reaction technique to detect the abl-bcr transcript in the K562 cell-line and in some patients. The sensibility of the method makes it potentially useful to detect minimal disease after bone marrow transplantation.

ADRESSES

M.-H. Delfau, B. Grandchamp : laboratoire de génétique moléculaire, faculté Bichat, 16, rue Huchard, 75018 Paris, France.

M. Garbarz, I. Chaverroche : Inserm U. 160, hôpital Beaujon, 92110 Clichy, France.

RÉFÉRENCES

1. Kahn A. Oncogènes et leucémies *médecine/sciences* 1985 ; 1 : 390-1.

2. Shtivelman E, Gale RP, Dreazen O, *et al.* bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987 ; 69 : 971-3.

3. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 ; 239 : 487-90.

4. Berger SL. Isolation of cytoplasmic ARN. In : Berger SL, Kimmel AR, eds. *Methods in Enzymology*. Vol. 152. London : Academic Press, 1987 : 227-34.

TIRÉS A PART

M.-H. Delfau.

Cher lecteur,

médecine/sciences est maintenant lue par plusieurs dizaines de milliers de personnes en Europe et au Canada. Indexée régulièrement dans les *Current Contents* (série *Life Sciences*), son sommaire est porté à la connaissance de l'ensemble de la communauté scientifique. Nous pensons qu'il est par conséquent possible de profiter de cette position originale de *médecine/sciences* pour développer avec vous deux des rubriques de notre revue.

- **Les « lettres à médecine/sciences »** tout d'abord.

Il s'agit de communications préliminaires originales de résultats importants d'une signification biologique large. L'indexation de ces communications dans les *Current Contents* permettra aux auteurs de les utiliser comme notes d'antériorité dans leurs travaux ultérieurs. La décision du comité de rédaction concernant ces lettres sera prise dans les 10 jours suivant la réception des manuscrits, la publication devant intervenir dans les deux mois. Publiés sur une page de *médecine/sciences*, les manuscrits devront être limités à 4 500 signes typographiques, 1 ou 2 figures, 1 tableau et 10 références bibliographiques. Un résumé anglais d'environ 400 signes devra être fourni.

- **Les « nouvelles »** portant sur certains de vos travaux dont vous êtes particulièrement fiers. Vos résultats peuvent être publiés dans une prestigieuse revue de votre spécialité dont la diffusion reste néanmoins limitée en dehors de cette spécialité. *médecine/sciences* constitue un moyen particulièrement efficace de présenter vos résultats à un large public de médecins et de biologistes : si vous nous faites parvenir vos manuscrits en voie de publication, nous indiquant la revue devant publier l'article et la date prévue de publication, nous pourrions, si l'information nous semble le mériter, rédiger une « nouvelle » sur votre travail paraissant en même temps que ou après l'article original.

Nous espérons qu'ainsi *médecine/sciences* assumera mieux encore sa mission qui est tout à la fois de diffuser — en français — la pensée scientifique de haut niveau en biologie et en médecine, et de promouvoir, pour un large public scientifique et médical, la recherche de pointe en ces domaines.

Pour la Rédaction
Axel KAHN
Rédacteur en Chef (Paris)