

Université de Montréal

Signification clinique et biologique de l'évaluation du niveau de maladie
minimale résiduelle chez des patients atteints de Leucémie
Myéloïde Chronique suite à une greffe allogénique.

par

Francis Parent

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Août, 2001

© Francis Parent, 2001



W

4

U58

2002

v.042

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Signification clinique et biologique de l'évaluation du niveau de maladie
minimale résiduelle chez des patients atteints de Leucémie
Myéloïde Chronique suite à une greffe allogénique.

présenté par:

Francis Parent

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Guy Sauvageau
président-rapporteur

Denis-Claude Roy
directeur de recherche

Robert Delage
membre du jury

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

Afin d'évaluer la maladie minimale résiduelle chez des patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) et traités par une greffe allogénique, la RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) est devenue la méthode de choix. Par contre, l'interprétation des résultats obtenus par ces méthodes, qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, tend à être ambiguë et conflictuelle, surtout lorsque l'évaluation est faite dans les six premiers mois suivant la greffe. Dans le but de résoudre ce problème, une évaluation sérieuse du fardeau leucémique fut effectuée à courts intervalles durant la première année suivant une greffe allogénique HLA compatible chez des patients atteints de LMC. Afin de mieux caractériser le statut de la maladie minimale résiduelle, l'expression du gène *bcr-abl* fut évaluée dans les cellules mononucléées et les progéniteurs hématopoïétiques, déterminant ainsi la nature et la clonogénicité des cellules réarrangées. De plus, les paramètres cliniques furent couplés aux résultats moléculaires afin d'identifier des déterminants biologiques ayant un impact crucial sur le pronostic des patients. La majorité des échantillons de cellules mononucléées furent *bcr-abl* positifs (52%) bien que la quantification de ces échantillons démontre des niveaux d'expression faibles (ratio *bcr-abl / abl* de 55×10^{-6}). Parallèlement, 33% des patients furent positifs suite à la même évaluation effectuée sur des colonies de progéniteurs hématopoïétiques (CFC). La corrélation entre les résultats de PCR sur les cellules mononucléées et les CFCs fut très hautement significative ($p \leq 0.0001$) et l'addition des résultats sur les CFCs lors de l'évaluation de la maladie minimale résiduelle a permis une meilleure caractérisation de cette dernière dans 100% des cas. D'ailleurs, les différents paramètres cliniques ainsi que le statut clinique des patients furent très efficacement reflétés par les résultats de PCR sur les deux fractions cellulaires. En effet, ces dernières ont réagi de la même manière aux fluctuations cliniques de la maladie mais les CFCs démontrèrent une réaction ou une réponse plus rapide que les cellules de la fraction mononucléée et ce, dans 75% des cas étudiés. Ces résultats suggèrent donc que la détection de cellules leucémiques résiduelles tôt suivant une greffe, jumelée à la détermination de la nature et de la clonogénicité de ces dernières, permettraient une meilleure évaluation du pronostic du patient, et ce, plus rapidement que les méthodes conventionnelles, et pourraient aider à définir plus adéquatement le besoin et le type de traitements additionnels et/ou préventifs nécessaires.

Table des matières

Sommaire.....	iii
Table des matières	iv
Liste des Tableaux	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations	viii
La leucémie myéloïde chronique	10
<i>Caractéristiques cliniques.....</i>	<i>10</i>
<i>Caractéristiques moléculaires.....</i>	<i>12</i>
<i>Mécanismes et interactions moléculaires</i>	<i>13</i>
Introduction.....	16
Matériel et méthodes.....	22
<i>Population à l'étude.....</i>	<i>22</i>
<i>Échantillons cliniques.....</i>	<i>22</i>
<i>RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction). Étape de détection.....</i>	<i>24</i>
<i>RT-PCR quantitative.....</i>	<i>26</i>
<i>Méthode de culture des colonies de cellules progénitrices.....</i>	<i>28</i>
<i>PCR Multiplex sur colonies de progéniteurs</i>	<i>29</i>
Résultats.....	31
<i>RT-PCR sur les cellules mononucléées.....</i>	<i>31</i>
<i>Quantification des échantillons.....</i>	<i>33</i>
<i>Évaluation de la maladie résiduelle dans les progéniteurs</i>	<i>35</i>
<i>Expression du gène bcr-abl dans les échantillons.....</i>	<i>35</i>
<i>Expression du gène bcr-abl en fonction du type de colonies</i>	<i>38</i>
<i>Niveaux de corrélation entre l'expression du gène bcr-abl dans les cellules mononucléées et les progéniteurs.....</i>	<i>41</i>
<i>Résultats combinés des données de PCR et des données cliniques.....</i>	<i>43</i>
Discussion	46

Perspectives futures 63

Liste de références 65

Liste des Tableaux

<u>Tableau I</u> : Caractéristiques de la population à l'étude.....	23
<u>Tableau II</u> : Taille des séquences de produits de PCR.....	27
<u>Tableau III</u> : Correspondance entre les résultats de détection de l'expression du gène <i>bcr-abl</i> dans la fraction des cellules mononucléées (MNC) et la fraction des cellules progénitrices (colonies).....	42

Liste des figures

Figure 1: Graphique représentant les pourcentages de patients atteints de LMC exprimant le gène *bcr-abl* tel que détecté par PCR à différents intervalles de temps suivant une greffe allogénique32

Figure 2: Graphique représentant les résultats de quantification des niveaux d'expression du gène *bcr-abl* sous la forme de ratio *bcr-abl / abl* ($\times 10^{-6}$), chez des patients LMC à différents intervalles de temps suivant une greffe allogénique..... 34

Figure 3: Graphique représentant les résultats de PCR sur les colonies de progéniteurs (CFCs) évalués à différents intervalles de temps suivant une greffe allogénique..... 36

Figure 4: Graphique représentant sur une échelle logarithmique le pourcentage de chacun des types de colonies *bcr-abl* positives évaluées par PCR chez les patients LMC à différents intervalles suivant un greffe allogénique..... 39

Figure 5: Graphique représentant le suivi post greffe dans le temps de la maladie minimale résiduelle de quatre patients représentatifs (A, B, C et D) à l'aide de l'évaluation du pourcentage de colonies (CFCs) *bcr-abl* positives, des ratios *bcr-abl / abl* quantifiés dans les cellules de la fraction mononucléées et les variations de niveaux de CsA, stéroïdes et de GvHD..... 45

Liste des sigles et abbreviations

BFU-E: *burst forming unit-erythroid*

BMT: *bone marrow transplantation*

Bu: Busulphan

CFC: *colony forming cell* (désigne l'ensemble des CFU-GM, BFU-E et CFU-GEMM)

CFU-GEMM: *colony forming unit-granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte*

CFU-GM: *colony forming unit-granulocyte-monocyte*

CsA: Cyclosporine A

Cy: Cyclophosphamide

DLI: *Donor lymphocyte infusion*

dNTP: di-nucleotides-triphosphates

GvHD: *Graft-versus-host disease*

GvL: *Graft-versus-leukemia*

INF: Interferon

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

M-bcr: *Major breakpoint cluster region*

MNC: *mononuclear cells* (cellules mononucléées)

MRD: *minimal residual disease* (maladie minimale résiduelle)

PCR: *Polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)

PCT: *Progenitor cells transplantation*

Ph: Chromosome de Philadelphie

PMNC: *Polymorphonuclear cells*

Q-RT-PCR: *Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

RT: *reverse transcriptase* (transcriptase inverse)

RT-PCR: *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne avec transcriptase inverse)

SD: *standard deviation* (écart-type)

TBI: *total body irradiation* (irradiation pancorporelle)

\bar{x} : moyenne

La leucémie myéloïde chronique

Caractéristiques cliniques.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération clonale des progéniteurs hématopoïétiques primitifs et transformés (Hagop M.Kantarjian *et al*, 1993). En effet, les lignées myéloïdes, monocytaires, érythrocytaires, megakaryocytaires et lymphocytaires B sont les principales atteintes, cette maladie affectant rarement les cellules lymphocytaires T. (Eaves *et al*, 1998; Fialkow *et al*, 1977). La LMC, qui constitue environ 15% des leucémies à l'âge adulte, a une incidence équivalente à un à deux cas par 100000 personnes par année (Faderl *et al*, 1999). Bien que la maladie puisse se retrouver dans tous les groupes d'âges, moins de 10% des cas surviennent chez des patients âgés de moins de 20 ans, l'âge moyen des patients, lors de la présentation de la maladie, étant de 45 à 55 ans. Bien que 40% des patients n'ont pas de symptôme lorsque la maladie se présente, certains souffrent typiquement de fatigue, d'anorexie et de perte de poids (Sawyers, 1999). Toujours selon Sawyers, le diagnostic est habituellement basé sur un décompte de globules blancs anormal. Par contre, suite à cet examen physique, il est aussi possible de retrouver des leukocytoses, thrombocytoses et, jusqu'à chez 50% des patients, des splénomégalies. D'ailleurs, ces derniers symptômes

sont souvent associés à un pronostic moins favorable (Hagop M.Kantarjian *et al*, 1993).

La maladie est habituellement caractérisée par une évolution biphasique ou parfois triphasique (Cortes *et al*, 1997). Le diagnostic survient normalement lors de la phase chronique bénigne de la maladie, qui, lorsque traitée par chimiothérapie conventionnelle telle le busulphan et l'hydroxyurea, peut durer de 37 à 47 mois (Hehlmann *et al*, 1993). Par la suite, la maladie de 20 à 25% des patients se transforme directement en phase blastique, caractérisée par 30% et plus de cellules blastiques dans la moelle ou la périphérie et une maladie extramédullaire avec blastes immatures localisés; cette phase est habituellement fatale à l'intérieur d'une période de trois à six mois. Par contre, dans certains cas, cette dernière phase blastique peut être précédée d'une phase accélérée définie entre autre par la présence, en périphérie, de 15% et plus de blastes, 20% et plus de basophiles et une évolution cytogénétique clonale (Hagop M.Kantarjian *et al*, 1993). Vingt à 25% des patients mourront de complications due à la phase accélérée.

Caractéristiques moléculaires.

Un événement extrêmement important, depuis les débuts des études portant sur la LMC, fut sans contredit la découverte et la caractérisation du chromosome de Philadelphie (Ph) (Nowell & Hungerford, 1960; Rowley, 1973). En effet, ce marqueur chromosomique est en fait une translocation qu'il est possible de retrouver chez plus de 95% des cas de LMC et aussi, mais de façon moins importante, dans des leucémies myéloblastiques et lymphoïdes aiguës (Faderl *et al*, 1999). Le chromosome Ph est donc le résultat de bris sur les chromosomes 9 et 22, suivi d'une translocation réciproque du matériel génétique distal: t(9;22)(q34;q11). Lors de cette translocation, on assiste à la juxtaposition du proto-oncogène c-abl du chromosome 9, au locus M-bcr (*major breakpoint cluster region*) sur le chromosome 22 (Jorge E.Cortes & Susan O'Brien, 1994).

Les cellules LMC Philadelphie (Ph) positives expriment des variants du gène de fusion *bcr-abl* connus sous les noms de b2a2 et b3a2, dépendant de la position du point de bris au niveau du locus M-bcr sur le chromosome 22 (Thompson *et al*, 1992). Ces ARN messagers de fusion sont transcrits en une protéine chimérique de 210 kd nommée p210^{*bcr-abl*}, qui, contrairement à abl, est caractérisée par une localisation exclusivement cytoplasmique ainsi qu'une

activité tyrosine kinase anormalement élevée (Petzer *et al*, 1996; Verfaillie, 1998). Par conséquent, la protéine p210^{bcr-abl} active de manière constitutive différentes voies métaboliques impliquées dans les mécanismes cellulaires tels l'adhésion, la prolifération et la transformation, bien que l'implication de ces derniers mécanismes, dans la pathogénèse de la LMC, soit encore incertaine (Chomel *et al*, 1995; Faderl *et al*, 1999; Verfaillie, 1998).

Mécanismes et interactions moléculaires

La protéine c-Abl normale est divisée en deux régions importantes. Premièrement, la moitié N-terminale est caractérisée par les domaines SH1, SH2 et SH3 (*SH pour SRC homology domain*) qui sont responsables respectivement de l'activité tyrosine kinase, de l'interaction avec des protéines tyrosine phosphorylées et de la suppression de l'activité tyrosine kinase (Verfaillie, 1998). La portion C-terminale, pour sa part, contient des domaines de liaison à l'actine et un domaine de localisation nucléaire et de liaison à l'ADN (Chung *et al*, 1996). De son côté, la protéine chimérique Bcr-Abl contient, entre autres, les domaines 1B et 2B de la partie N-terminale de Bcr qui contribuerait à l'activité oncogénique de Abl (Chomel *et al*, 1995). En effet, le domaine 2B se lierait au domaine SH2 d'Abl et contribuerait à la dérégulation de la fonction tyrosine kinase (Muller *et al*, 1991; Pendergast *et al*, 1991). D'un

autre côté, le domaine 1B serait impliqué dans des réactions d'oligomérisation qui favoriseraient la formation de tétramères Bcr-Abl. Le tétramère ainsi formé posséderait quatre sites de liaison à l'actine et permettrait à l'oncoprotéine d'avoir une affinité accrue pour le cytosquelette (McWhirter & Wang, 1991). Conséquemment, la protéine Bcr-Abl aurait, comme mentionné précédemment, une localisation cytoplasmique plutôt que nucléaire. Bref, l'action oncogénique de Bcr-Abl découle de la fonction tyrosine kinase activée de Abl, maintenant, au niveau cytoplasmique (Chomel *et al*, 1995).

Cette localisation cytoplasmique inhabituelle permet donc l'interaction de la protéine et de son activité kinase activée avec de nouveaux substrats. Il existe des évidences faisant le lien entre la p210 et certaines protéines cytoplasmiques. Par exemple, les protéines GRB2 et SOS jouent des rôles très importants au niveau de l'activation de RAS lorsqu'un complexe Bcr-Abl / GRB2 / SOS se forme, Bcr-Abl se liant au domaine SH2 de GRB2, le domaine SH3 de cette dernière se liant à SOS (Gordon & Goldman, 1996). Ce dernier complexe permet donc l'activation de RAS grâce à l'activité d'échange GTP/GDP de SOS. Activer RAS pourrait impliquer, par exemple, des voies métaboliques des MAPK (*mitogen-activated protein kinase pathway*) telles ERK (*extracellular-regulated kinases*), SAPK, aussi appelé *Jun kinase pathway* (JNK), ou encore la voie p38 kinase. La phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription est un des aboutissements de ces voies métaboliques

(Sawyers, 1997). Il fut démontré aussi que RAS peut activer des protéines tels RAC et RHO impliquées dans le "ruffling" de la membrane et l'établissement de points d'adhésion focaux qui pourraient donc altérer les propriétés adhésives de la cellule leucémique (Rosales *et al*, 1995). D'autres cascades de signalisation n'impliquant pas RAS, comme par exemple c-Myc, furent identifiées dans le passé (Faderl *et al*, 1999).

Bien que les origines de la maladie, la structure et la fonction des différentes parties de la protéine de fusion ainsi que l'influence de ces dernières sur les cellules des patients soient maintenant bien documentées, il est encore très difficile d'établir les liens entre les conséquences de ces dérangements moléculaires *in-vitro* et les aspects cliniques de la maladie tels le traitement, la rémission ou la rechute.

Introduction

Jusqu'à aujourd'hui, la seule approche thérapeutique ayant présenté un réel potentiel curatif chez les patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique (LMC) est la transplantation allogénique de cellules progénitrices (Passweg *et al*, 1998). En effet, une survie à long terme ne présentant pas de signes de la maladie peut être espérée chez 50% à 70% des patients greffés lors de la phase chronique de leur maladie (Hagop M.Kantarjian *et al*, 1993). Malheureusement, la rechute représente une cause majeure de l'échec des traitements, que ce soit tôt ou à plus long terme après le moment de la greffe. Plusieurs paramètres ont été identifiés comme ayant une valeur pronostique tel: l'âge du patient, la phase de la maladie, l'intervalle de temps du diagnostic à la greffe et le type de manipulation de la greffe, ces derniers ayant tous la capacité d'influencer le devenir des patients (Clift & Anasetti, 1997; Snyder & McGlave, 1990). En effet, une déplétion sélective des cellules T du greffon, qui confère au patient une protection supplémentaire contre une réaction du greffon-contre-l'hôte (GvHD), est associée à une incidence supérieure de rechutes leucémiques (Goldman *et al*, 1988; Horowitz *et al*, 1990). Toutefois, cet effet immunologique peut être contrôlé et utilisé avantageusement, chez des patients ayant reçu une greffe allogénique, à travers l'administration de lymphocytes du donneur afin d'induire une rémission suite à la rechute de ces patients. Malgré tout, le taux de rémissions et la durée de la réponse au traitement sont encore

inversement corrélés au fardeau leucémique des patients. Cette observation met l'emphase sur l'importance d'une détection rapide de la récurrence de la maladie, permettant ainsi l'identification de patients en rechute à un moment où la quantité de cellules LMC en prolifération est à son plus bas.

Les méthodes les plus sensibles utilisées pour la détection de cellules malignes reposent habituellement sur la capacité unique de la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (*polymerase chain reaction*) de détecter de façon fiable ces cellules à des niveaux inférieurs aux seuils de détection de la plupart des méthodes cliniques, lesquels peuvent atteindre 1% dans les meilleures conditions (Faderl *et al*, 1999). Les méthodes de PCR visant la détection de ce réarrangement ont permis l'évaluation de l'efficacité de différentes stratégies de traitement et une meilleure estimation de la réponse des patients aux interventions thérapeutiques (Cross, 1997; Cross, 1998). En effet, les techniques faisant l'utilisation de la PCR nichée peuvent amplifier jusqu'à une seule copie d'ADN réarrangé (*bcr-abl* positif) présente parmi 10^4 à 10^8 cellules normales, le niveau de sensibilité le plus élevé atteint par n'importe laquelle des méthodes (Faderl *et al*, 1999).

En utilisant une méthode de PCR nichée, deux équipes (Delage, Soiffer, *et al*. 1991; Roth *et al*, 1992), entre autres, ont conclu qu'un groupe de patients en apparente rémission clinique, mais possédant des copies détectables du gène

bcr-abl, feraient face à une probabilité significativement plus élevée de rechute. Toutefois, une fréquence élevée de patients *bcr-abl* positifs a pu être identifiée jusqu'à aussi tard qu'un an post greffe, ces résultats corrélant par contre très faiblement avec la rechute au niveau hématologique (Miyamura *et al*, 1993). Dans une étude à grande échelle, Radich *et al.* (Radich *et al*, 1995) ont clairement démontré que des patients PCR positifs (exprimant le gène *bcr-abl*) à deux reprises ou plus suivant leurs greffes, ont une probabilité accrue de rechute. De plus, quelques rares études semblent démontrer que des patients PCR positifs tôt suivant la greffe seraient confrontés à un risque de rechute plus élevé comparés à la même situation chez des patients à long terme (Guerrasio *et al*, 1992; Radich *et al*, 1995). Néanmoins, il existe un vaste consensus sur le fait qu'un résultat de PCR *bcr-abl* positif obtenu dans les six premiers mois suivant le traitement est de très faible ou d'aucune valeur prédictive, contrairement au même résultat à un temps ultérieur, et ce, peu importe la méthode d'évaluation utilisée, soit qualitative ou quantitative (Arnold *et al*, 1993).

Une explication potentielle de la divergence entre les conclusions de ces différentes études, sur la valeur pronostique d'un résultat de PCR *bcr-abl* positif post-greffe, pourrait découler du niveau de sensibilité particulièrement élevé de ces méthodes. En effet, pouvant varier de une cellule sur un million jusqu'à une infiltration totale, c'est à dire 100% de cellules leucémiques, la plage de détection, par PCR, des cellules réarrangées pourrait refléter des charges ou

fardeaux de cellules leucémiques extrêmement différents. D'un autre côté, un échantillon PCR positif tôt suivant la greffe pourrait correspondre à l'expression du gène *bcr-abl* dans des cellules non-clonogéniques ayant survécu au programme préparatoire de radio- et/ou chimiothérapie (Pichert *et al*, 1994). En fait, Faderl *et al*. (Faderl *et al*, 1999) ont déjà suggéré que l'analyse par PCR serait devenue trop sensible pour être utilisée adéquatement à des fins pronostiques. Effectivement, ceci fut confirmé par quelques études dans lesquelles des copies du gène *bcr-abl* ont été détectées chez des individus normaux et en santé (Biernaux *et al*, 1995; Bose *et al*, 1998).

La PCR, par l'entremise d'une méthode quantitative, pourrait donc être utilisée afin de clarifier l'impact d'un résultat de PCR positif qualitatif. D'ailleurs, quelques études ont procédé à une telle évaluation quantitative du gène *bcr-abl*, caractérisant et identifiant chez des patients des maladies minimales résiduelles croissantes, décroissantes ou encore stables, et établissant des corrélations entre ces dernières et la probabilité de rechute éventuelle (Branford *et al*, 1999; Cross *et al*, 1993; Delage *et al*, 1991; Lin *et al*, 1996; Lion *et al*, 1993). Par contre, malgré un niveau de sophistication très élevé, ces méthodes de PCR quantitatives n'ont pas encore permis d'élucider l'impact pronostique d'une évaluation *bcr-abl* positive à l'intérieur des six premiers mois suivant une greffe allogénique. Par conséquent, il serait possible d'émettre l'hypothèse que la solution serait une évaluation sériée à travers le temps des

populations cellulaires individuelles des patients. De plus, la détection de cellules réarrangées parmi les cellules clonogéniques devraient avoir un impact pronostique plus important que leur détection parmi des cellules matures.

Le nombre important de rechutes de LMC dans la première année suivant la transplantation, 5% dans les cas de greffes non manipulées (*unmanipulated grafts*) et 25% chez les patients recevant un greffon T-déplété (*T-depleted graft*) (Snyder & McGlave, 1990), souligne l'importance d'une évaluation de la maladie minimale résiduelle dans les six premiers mois suivant la greffe. De plus, le potentiel thérapeutique accru des infusions de lymphocytes provenant du donneur lorsque le fardeau leucémique est minimum fourni un argument supplémentaire pour supporter l'identification rapide des patients à haut risque de rechute (Barrett & van Rhee, 1997).

Dans le but de résoudre ce problème, une évaluation sérieuse du fardeau leucémique fut effectuée à courts intervalles durant la première année suivant une greffe allogénique HLA-compatible chez des patients LMC. Afin de déterminer la nature et la clonogénicité des cellules réarrangées qui persistent après la greffe, l'expression du gène *bcr-abl* fut évaluée dans des progéniteurs hématopoïétiques obtenus à ces mêmes intervalles de temps. La présence et les niveaux d'expression du gène *bcr-abl*, mesurés dans les cellules mononucléées et les progéniteurs, furent comparés afin d'identifier les cibles biologiques de l'effet du greffon-contre-la leucémie (*GvL effect*). De plus, les paramètres cliniques, le statut d'immunosuppression ainsi que le phénomène de réaction du

greffon-contre-l'hôte (*GvHD*) furent couplés aux résultats moléculaires, fournissant ainsi un aperçu des déterminants biologiques pouvant avoir un impact crucial sur le devenir des patients.

Matériel et méthodes.

Population à l'étude.

Un formulaire de consentement signé, approuvé par le comité d'éthique de l'Hospital Maisonneuve Rosemont, fut obtenu pour tous les patients inclus dans la présente étude. Les principales caractéristiques de la population à l'étude composée de 23 patients LMC, sont décrites dans le Tableau I.

Échantillons cliniques.

Des échantillons de sang périphérique ont été obtenus, avec l'accord des patients, à 1 mois, 1.5 mois, 2 mois, et une fois par mois par la suite, suivant une greffe allogénique de cellules progénitrices. Même si l'emphase a été mise sur les six premiers mois, des échantillons furent récoltés dans certains cas jusqu'à 14 mois suivant la greffe. La fraction de cellules mononucléées (MNC) fut isolée par centrifugation au travers d'un gradient de densité Ficoll-Hypaque (Pharmacia, New Jersey, USA) et divisée en deux échantillons dans le but de permettre la détection du réarrangement *bcr-abl* dans (1) les cellules mononucléées et (2) les progéniteurs hématopoïétiques.

Tableau I: Caractéristiques de la population à l'étude.

	Total
Total de patients	23
Âge, (moyenne)	21-59 ans (40ans)
Phase	
Chronique	21
Accélérée	2
Intervalle entre diagnostic et greffe (moyenne)	4-72 mois (14mois)
% Ph+ pre greffe	46-100 (91%)
Sexe des greffés	
Mâle	13
Femelle	10
Donneur apparenté	
6/6	14
5/6	1
Donneur non-apparenté	
6/6	8
5/6	0
Pré-traitement	
Hydrea / INF	12
Hydrea	9
INF	2
Régime de préparation	
Bu-Cy	23

Abréviations: Bu, busulphan; Cy, cyclophosphamide; INF, Interferon; Ph+, Philadelphie positif.

RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction). Étape de détection.

La totalité de l'ARN fut extrait d'un des deux échantillons sanguins par la méthode au TRIzol, suivant les instructions du manufacturier (Gibco BRL, Rockville, MD). Pour sa part, le second échantillon fut mis en culture afin d'obtenir des colonies de cellules progénitrices. L'ARN obtenu fut quantifié et sa pureté évaluée par spectrophotométrie. Une réaction de RT-PCR fut effectuée sur quatre échantillons de 250 ng chacun afin de détecter l'expression d'un des deux transcrits de *bcr-abl*, soit b2a2 ou b3a2. L'intégrité de l'ARN fut contrôlée et vérifiée par l'amplification du gène *abl* à l'aide d'un cinquième échantillon de 250 ng de matériel. Un contrôle positif consistant en une dilution 10^{-6} d'ARN de la lignée cellulaire K562 dans l'ARN normal (provenant d'un sujet normal) fut utilisé afin d'assurer le niveau de sensibilité désiré pour cette technique. Finalement, plusieurs contrôles négatifs, étant en fait de l'ARN normal, furent inclus et dispersés dans le but de contrôler la contamination et les résultats faux-positifs.

Les réactions de RT-PCR furent effectuées en utilisant une trousse commerciale de One-Step RT-PCR (Quiagen, Mississauga, Ontario, Canada), tout en apportant de légères modifications au protocole du manufacturier. De plus, tous les oligonucléotides (amorces) utilisés dans cette étude furent obtenus

de Gibco BRL (Rockville, MD). Le mélange ou la préparation de RT-PCR était constitué de 250 ng d'ARN de départ, de tampon "One-Step RT-PCR" (1X), d'une concentration finale de 200µM de chaque dNTP, 12.5 pmol de chaque oligonucléotide, 0.5µl de "Enzyme Mix" et 6 unités d'inhibiteur de Rnase (Rnase-Out, Gibco BRL, Rockville, MD) tout en complétant à un volume final de 25 µl avec de l'eau exempte de Rnase. Les oligonucléotides utilisés pour la synthèse et l'amplification de *bcr-abl* furent Fbcr ext (5'-TACACGTTCTGATCTCCTCTGAC-3'sense) et Fabl ext (5'-TAGCCTAAGACCCGGAGCTTTTCA-3'antisense), et pour la synthèse et l'amplification de l'ADNc de *abl*: Fc1 ext (5'-TTCAGCGGCCAGTAGCATCTGACT-3'sense) et Fc3 ext (5'-GCAGTGTGATCCTGTAATGG-3'antisense). La réaction de RT (reverse transcriptase) a duré 30 minutes à 50° et fut suivie par une étape initiale d'activation de la PCR à 95°C pendant 15 minutes et 35 cycles de PCR consistant chacun de 10 secondes à 94°C, 10 secondes à 60°C et 15 secondes à 72°C. La réaction se terminait par une extension finale de 5 minutes à 72°C.

Une seconde PCR (nichée) fut par la suite réalisée sur 1/5 du produit de la première RT-PCR en utilisant des oligonucléotides internes (*bcr-abl*: Fbcr int 5'-TGACTATGAGCGTGCAGAGTG-3'sense, et Fabl int 5'-AGTGTTATCTCCACTGGCCA-3'antisense; *abl*: Fc2 int 5'-TTGTGGCCA GTGGAGATAACA-3'sense, and Fc3 int 5'-TATCTCAGCGAGATGGACCT-

3' antisense). La trousse Qiagen Taq DNA Polymerase kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) fut utilisée pour la PCR nichée composée de tampon à PCR (1X), 200 μ M de chaque dNTP (Gibco BRL, Rockville, MD), 12.5 pmol de chaque oligonucléotides, 2.5 unités de Taq DNA polymerase, le tout, complété jusqu'à un volume final de 50 μ l avec de l'eau exempte de Dnase. Les conditions de PCR furent les mêmes que la première ronde à l'exception de la RT et de l'étape d'activation qui ont été remplacées par une étape de dénaturation de 3 minutes à 94°C.

RT-PCR quantitative

Les échantillons exprimant *bcr-abl* ont été subséquentement quantifiés en utilisant une méthode de RT-PCR compétitive. Les niveaux de copies de *bcr-abl* et *abl* furent mesurés par coamplification de l'échantillon d'ARN du patient avec une quantité déterminée d'un compétiteur. Les compétiteurs A1(-) et Abl(-) sont en fait des séquences de *bcr-abl* et de *abl* respectivement, de poids moléculaires légèrement inférieurs et amplifiables avec les mêmes amorces ou oligonucléotides (voir Tableau II). Le plasmide A1(-) est utilisé pour compétitionner les deux fragments de *bcr-abl*, soit b3a2 et b2a2.

Tableau II: Taille des séquences de produits de PCR

Séquences	Longueur des produits de PCR (paire de base)	
	1 ^{ère} amplification	2 ^{ème} amplification (nichée)
Abl	450	285
Abl(-)	386	221
B3a2	452	390
B2a2	377	315
A1(-)	311	249

De multiples aliquots de 250ng d'ARN du patient à analyser furent tout d'abord transcrits en ADN par une étape de transcriptase inverse et ensuite amplifiés dans la même préparation de PCR décrite précédemment. La réaction de RT de la mixture fut effectuée à 50°C pendant 30 minutes et le produit ensuite aliquoté avec au moins six différentes concentrations de compétiteur s'étalant approximativement sur une plage de 2 logs, cette plage étant définie pour chaque échantillon de patient par une évaluation semi-quantitative avant de procéder à l'amplification multiplex. Deux aliquots ont été utilisés comme contrôles. Les paramètres de la réaction de PCR en multiplex furent une étape initiale de dénaturation à 94°C pour 10 minutes, suivie par 35 cycles de 10 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 45 secondes à 72°C, se terminant par une extension finale à 72°C pendant 5 minutes. Pour les échantillons possédant une quantité de copies trop faible ne pouvant pas permettre une détection en

une seule amplification, une réaction de PCR nichée fut effectuée à l'aide de la trousse commerciale Qiagen Taq DNA Polymerase kit (Quiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Cette dernière s'est faite dans un volume total de 50µl composé de tampon PCR (1X), 200µM de chaque dNTP (Gibco BRL, Rockville, MD), 6.25pmol de chacune des amorces internes, 2.5 unités de Taq Polymerase et 1/5 du produit de la première réaction de PCR. Les paramètres de la PCR nichée furent les mêmes que lors de la première amplification et les amorces utilisées pour la quantification de *bcr-abl* et *abl* les mêmes que dans la méthode de détection par RT-PCR. Les deux produits de PCR furent visualisés sur un gel d'agarose de 2% contenant du bromure d'éthidium et le point d'équivalence auquel l'intensité du signal du compétiteur est égal à celle du signal de soit *bcr-abl* ou *abl* a été déterminé par une analyse densitométrique. Les résultats de la quantification du nombre de copies *bcr-abl* furent par la suite exprimés en tant que ratio entre le nombre de copies de *bcr-abl* et le nombre de copies de *abl* (ratio *BCR-ABL / ABL*). Cette méthode a permis la quantification du gène *bcr-abl* jusqu'à un minimum de deux copies

Méthode de culture des colonies de cellules progénitrices

De 1×10^5 à 2×10^5 cellules provenant de la fraction MNC du patient à analyser ont été mises en plaque dans des pétris de 35-mm contenant 1 ml de milieu semi-solide de méthylcellulose (MethoCult H4434; StemCell

Technologies Inc, Vancouver, Canada). Après 14 jours de culture à 37°C dans un incubateur (5% de CO₂ et humidifié), à l'aide d'un microscope à phase inversé, les colonies furent dénombrées et classifiées en: CFU-GM (colony forming unit-granulocyte-monocyte), BFU-E (burst forming unit-erythroid) et CFU-GEMM (colony forming unit-granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte). Ces trois types de colonies ont été récoltées individuellement à l'aide d'une pipette munie d'embouts exempts de RNase et de Dnase et placées directement dans des tubes à PCR contenant les produits nécessaires pour effectuer une RT-PCR (voir PCR Multiplex sur colonies de progéniteurs).

PCR Multiplex sur colonies de progéniteurs

Chaque réaction de PCR contenant une colonie individuelle fut traitée par une réaction de transcriptase inverse et amplifiée à l'aide d'une trousse commerciale (OneStep RT-PCR kit, Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) permettant de réaliser ces deux procédés à l'intérieur d'un seul tubes en une seule étape. Dans un volume final de 25µl, la réaction se compose de l'échantillon de départ (la colonie récoltée) , soit environ 2µl, le tampon RT-PCR OneStep (1X), une concentration finale de 200µM de chaque dNTP, 12.5pmol de chacune des quatre amorces, 6 unités d'inhibiteur de Rnase (RNaseOUT, Gibco BRL, Rockville, MD), 0.5µl d'Enzyme Mix et 14.35µl

d'eau DEPC. Les paramètres de cette PCR furent les mêmes que ceux de la RT-PCR de détection sur la fraction MNC. Une PCR nichée fut par la suite effectuée sur 1/5 du produit de la première réaction en utilisant la trousse Qiagen Taq Polymerase kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) avec encore une fois les mêmes conditions que lors de la RT-PCR de détection. Les oligonucléotides utilisés comme amorces pour la reverse transcription et l'amplification des copies de *bcr-abl* furent encore Fbcr ext, Fabl et Fbcr int, Fabl int. Les copies du gène *abl* ont été co-amplifiées avec *bcr-abl* afin de contrôler l'intégrité de l'ARN et les résultats faux négatifs. Les amorces qui furent utilisées, pour la reverse transcription ainsi que l'amplification de *abl* sont 3'Abl ext: 5'-CTTTGGGGCTGGATAATGGA-3'antisense; 5'ABL ext:5'-CACAATGGGGAATGG TGGA-3'sense, pour la première PCR, et 3'Abl int: 5'-GCCACCGTTGAATGATGATG-3'antisense; 5'Abl int: 5'-TGGAGAAACACTCCTGGTAC-3'sense, pour la PCR nichée. Cette PCR nichée à été effectuée pendant 35 cycles avec les mêmes paramètres et conditions que la méthode de détection.

Résultats

RT-PCR sur les cellules mononucléées

Comme mentionné précédemment, la Q-RT-PCR est, depuis déjà un certain temps, une des méthodes les plus utilisées afin d'évaluer la maladie minimale résiduelle (*MRD*) suite à une greffe de moelle osseuse (BMT) ou une greffe de cellules progénitrices (PCT) chez des patients atteints de LMC. Dans cette étude, les ratios du nombre de copies du gène *bcr-abl* sur le nombre de copies du gène *abl* ont été déterminés par quantification sur la fraction des cellules mononucléées (MNC) de 23 patients LMC à différent temps suivant une PCT. Comme démontré dans la Figure 1, la majorité des patients ($\bar{x}=67\%$) furent *bcr-abl* positifs (PCR positifs), et ce, pour chacun des temps évalués. Le quatrième mois post-PCT a montré la plus haute proportion de patients PCR positifs (83%) contrairement au neuvième mois pendant lequel seulement 11% des patients furent testés positifs. Une moyenne de 11 échantillons furent évalués à chacun des temps post-PCT.

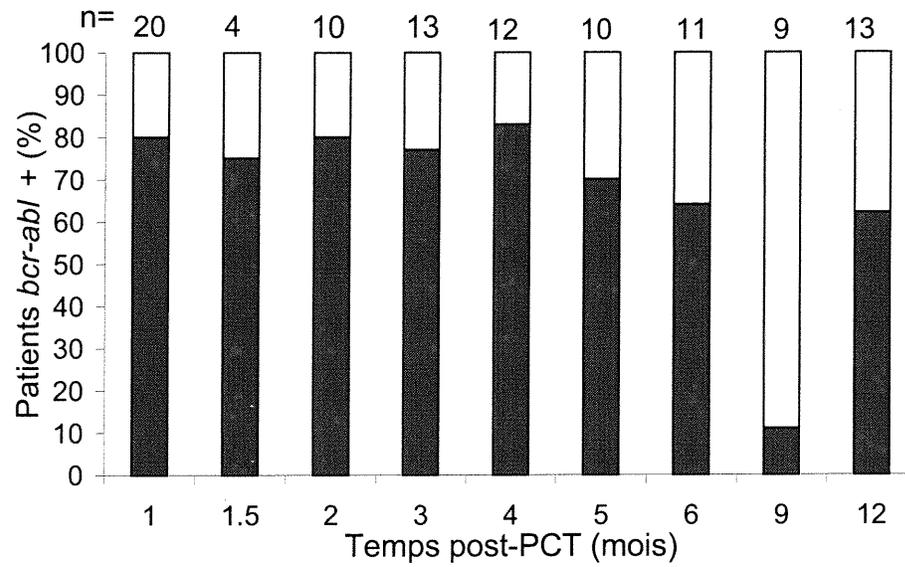


Figure 1: Graphique représentant les pourcentages de patients LMC exprimant le gène *bcr-abl* tel que détecté par PCR à différents intervalles de temps suivant une greffe allogénique.

n = nombre de patients testés à chacun des intervalles de temps.

- bcr-abl positif
- bcr-abl négatif

Quantification des échantillons

Comme il est possible de constater dans la Figure 2A, la majorité (52%) des échantillons positifs sont à des niveaux de 10×10^{-6} à 99×10^{-6} copies de *bcr-abl / abl*. Les échantillons avec des ratios de 1×10^{-6} à 9×10^{-6} sont les deuxièmes plus nombreux, suivis par les échantillons de 100×10^{-6} à 999×10^{-6} et de 1000×10^{-6} et plus, ces deux derniers représentant environ 5% de tous les échantillons testés. Le nombre de patients avec des niveaux *bcr-abl* positifs dépassant 10×10^{-6} est le plus élevé au cours des 5 premiers mois après la greffe, à l'exception des deuxièmes et troisièmes mois. Ainsi à partir du sixième mois, seulement environ 20% des patients présentent de tels niveaux d'infiltration.

En fait, bien que la majorité des échantillons de la fraction MNC étaient *bcr-abl* positifs, les niveaux d'infiltration de ces échantillons sont plutôt faibles, variant de 8×10^{-6} copies de *bcr-abl / abl* $\pm 2 \times 10^{-6}$ à 233×10^{-6} copies de *bcr-abl / abl* $\pm 233 \times 10^{-6}$ ($\bar{x} \pm SD$), aux troisième et neuvième mois respectivement (Figure 2B). En effet, en considérant la totalité de la période de "follow-up", l'échantillon moyen aurait un ratio de 55×10^{-6} copies de *bcr-abl / abl* $\pm 25 \times 10^{-6}$. De plus, il est intéressant de souligner que les ratios de quantification semblent diminuer graduellement du premier mois au quatrième mois, à partir

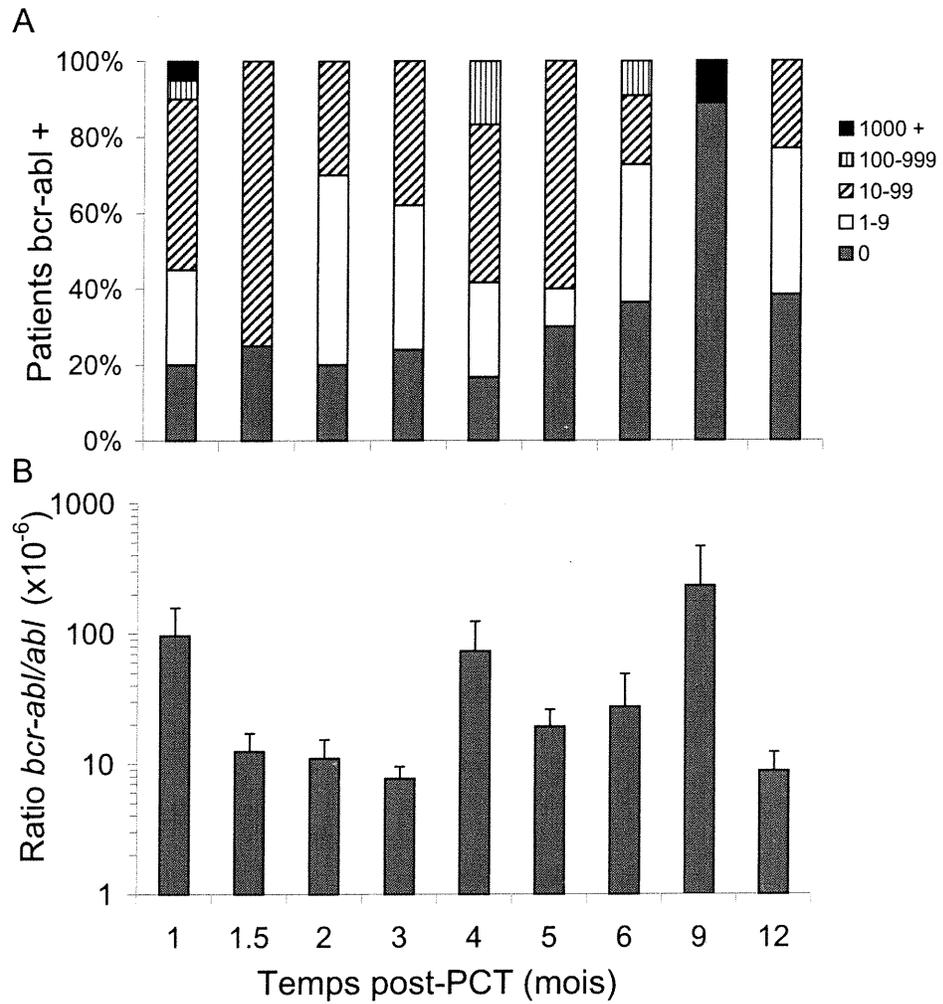


Figure 2: Graphique représentant les résultats de quantification des niveaux d'expressions du gène *bcr-abl* sous la forme de ratio *bcr-abl/abl* ($\times 10^{-6}$), chez des patients LMC à différents intervalles de temps suivant une greffe allogénique; A: classification des patients quantifiés à chacun des intervalles de temps en quatre classes de ratios *bcr-abl/abl* (voir légende); B: moyenne des niveaux d'infiltrations en ratios *bcr-abl/abl* retrouvés chez les patients quantifiés à chacun des intervalles de temps.
(T) = écart-type.

duquel ils semblent légèrement plus élevés jusqu'au 6^{ème} mois. Au 9^{ème} et 12^{ème} mois, ces ratios sont de retour à des niveaux plus faibles. Finalement, il est important de mentionner que la moyenne des ratios, au mois 9, semble être élevée, cette situation étant imputable à seulement un échantillon sur neuf testés (ratio de 2100×10^{-6} copies de *bcr-abl / abl*), les huit autres étant négatifs, comme le démontre très clairement la figure 2A.

Évaluation de la maladie résiduelle dans les progéniteurs

Expression du gène bcr-abl dans les échantillons

En plus d'avoir été évaluée dans la fraction MNC, la maladie résiduelle fut aussi étudiée au niveau plus précoce des cellules progénitrices. Des colonies dérivées de progéniteurs myéloïdes (CFCs) ont donc été évaluées pour l'expression du gène *bcr-abl*. Une colonie fut considérée *bcr-abl* positive à partir du moment où un signal fut détecté au poids moléculaire attendu dans une réaction où sont aussi amplifiables des contrôles positifs limites de sensibilité (dilution 10^{-6} d'ARN de la lignée K562 dans de l'ARN de sujet normal). Comme démontré dans la Figure 3A, 20% à 55% ($\bar{x}=33\%$) des patients ont testés positif à chacun des temps évalués, à l'exception du cinquième mois post PCT, période durant laquelle aucun échantillon positif ne fut détecté.

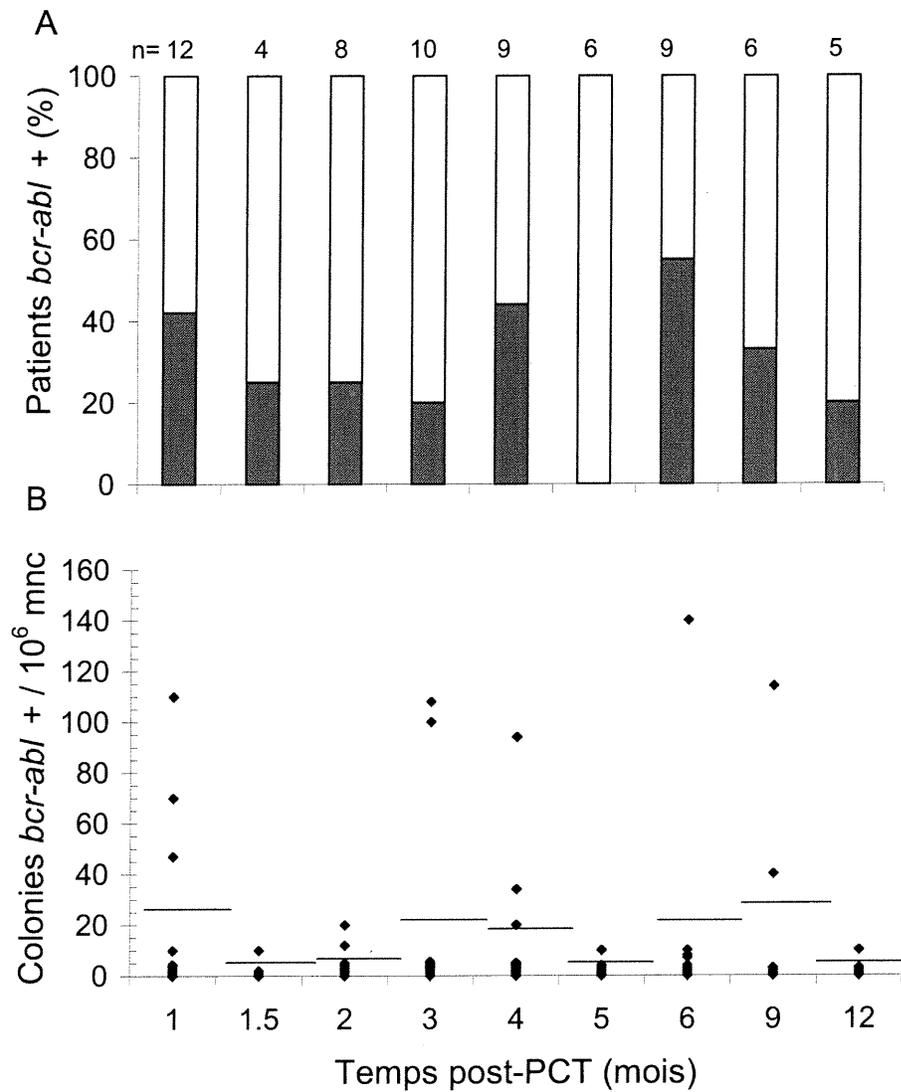


Figure 3: Graphique représentant les résultats de PCR sur les colonies de progéniteurs (CFCs) évalués à différents intervalles de temps suivant une greffe allogénique. A: Pourcentage de patients *bcr-abl* positifs à chacun des intervalles de temps étudiés; B: Nombre de colonies *bcr-abl* positives, par million de cellules mononucléées mises en culture de méthylcellulose, pour chacun des 72 échantillons testés (♦) à différents intervalles de temps post-greffe

bcr-abl positif
 bcr-abl négatif
 moyenne par intervalle de temps

Une moyenne de huit échantillons furent testés par intervalles de temps. Aussi, il est important de mentionner la proportion plus faible, environ la moitié, d'échantillons de patients positifs dans les colonies progénitrices par rapport à la fraction MNC.

De plus, la proportion de CFCs exprimant le gène de fusion *bcr-abl* fut déterminée en évaluant, par RT-PCR, une moyenne de 50 colonies par patients (SD: ± 2). Une moyenne de 8 patients (range: 5 à 11, SD: ± 1) furent testés à chacun des intervalles de temps post PCT. En premier lieu, le nombre absolu de colonies *bcr-abl* positives, dérivant de 10^6 MNC mises en culture, a été déterminé pour 72 échantillons post PCT (Figure 3B). Le nombre moyen de colonies positives a varié de 2 à 26 colonies / 10^6 MNC, au mois cinq et au mois neuf respectivement. Ces résultats furent examinés tout au long de la période de suivi post greffe. En effet, la moyenne de colonies *bcr-abl* positives / 10^6 MNC mises en culture fut de 22 colonies au premier mois, ce nombre diminuant immédiatement à des niveaux inférieurs jusqu'au 9^{ème} mois, période à laquelle la moyenne de colonies positives atteint 26 avant de retomber à 2 au 12^{ème} mois. Il est aussi important de souligner qu'au 3^{ème} mois et, bien que de façon moins marquée, au 4^{ème} mois, les moyennes de colonies positives furent relativement élevées.

Expression du gène bcr-abl en fonction du type de colonies

Au départ, les échantillons de cinq patients pré-greffe furent évalués et la moyenne des pourcentages de colonies *bcr-abl* positives fut de $58\% \pm 12\%$ (un total de 193 colonies fut évalué). Afin d'étudier chaque type de colonies individuellement, le pourcentage de colonies *bcr-abl* positives fut déterminé en fonction du temps suivant la greffe. Un total de 3726 colonies (CFU-GM: 1158, BFU-E: 1823, CFU-GEMM: 745) furent évaluées pour évaluer l'expression du gène *bcr-abl*. Étant donné la très grande quantité de résultats, nous avons exprimé les résultats en proportion de colonies *bcr-abl*⁺ en fonction du temps. Dans la Figure 4A, les pourcentages moyens de CFU-GM positives sont illustrés. Une moyenne de 7 patients (SD: ± 1) par temps étudiés démontrait $3 \pm 1\%$ ($\bar{x} \pm SD$) de colonies positives. En effet, l'observation de chacun des temps, pris séparément, démontre que dans quatre de ces derniers (mois 1.5, 2, 5 et 12), aucune colonie CFU-GM positive n'a été détectée. Par contre, des pourcentages plus élevés, se démarquant des autres, ont semblé être présents aux mois 3 et 4. En plus des CFU-GM, les colonies érythroïdes (BFU-E) furent analysées pour l'expression du gène *bcr-abl* (Figure 4B). Les proportions de colonies positives intrinsèques à chacun des échantillons analysés furent plutôt faibles, variant de 0% à 9% en moyenne ($\bar{x}=4\% \pm 1\%$). En somme, à l'exception du cinquième mois durant lequel aucune BFU-E positive n'a été détectée, l'expression du gène *bcr-abl* fut présent à tous les autres temps

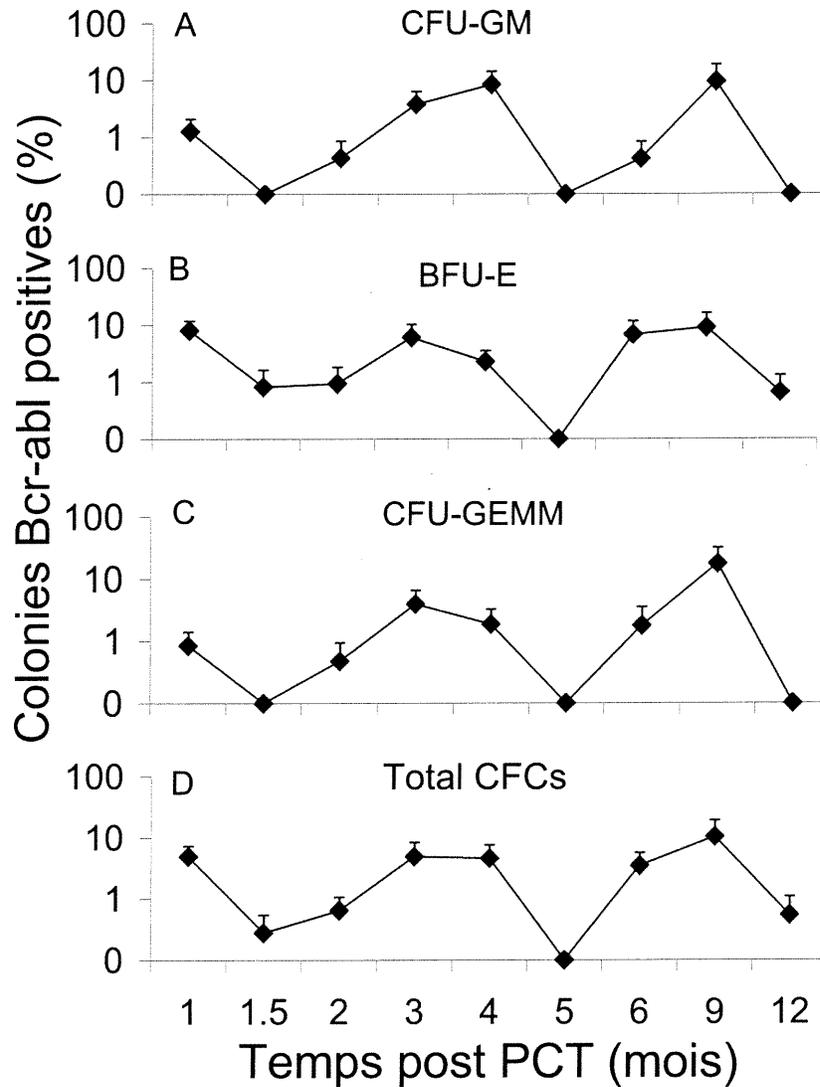


Figure 4: Graphique représentant sur une échelle logarithmique le pourcentage de chacun des types de colonies *bcr-abl* positives (A, *colony forming unit-granulocyte-monocyte*; B, *burst forming unit-erythroid*; C, *colony forming unit-granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte*; D, *colony forming cell*, i.e. tous les types) évaluées par PCR chez les patients LMC à différents intervalles suivant une greffe allogénique.

(T) = écart-type

étudiés à des pourcentages variant de 1% (SD: $\pm 1\%$) à 9% (SD: $\pm 7\%$). De façon similaire aux CFU-GM, les mois 3 et 6 semblèrent présenter des proportions de colonies positives plus importantes. Cette dernière observation s'avère encore vraie pour le dernier type de CFCs qui furent analysées: les CFU-GEMM. En effet, comme le démontre la Figure 4C, des valeurs plus élevées furent trouvées aux mois 3 et 4. De plus, aucune CFU-GEMM positives n'ont été détectées aux mois 1.5, 2, 5 et 12. Une moyenne de 6 patients (SD: ± 1) furent analysés aux différents temps prédéterminés et les résultats obtenus ont varié de 0% à 17% ($\bar{x}=3\% \pm 2\%$).

Finalement, la distribution des pourcentages de colonies *bcr-abl* positives en fonction du temps ne fut pas significativement différente selon le type de CFC analysé, en l'occurrence, CFU-GM, BFU-E et CFU-GEMM. Conséquemment, ces trois types de colonies pourraient être considérées, lors de l'analyse de ces résultats, comme étant un seul groupe, soit des CFCs. Ces résultats sont d'ailleurs représentés dans la figure 4D. Comme constaté précédemment, les pourcentages moyens de CFCs *bcr-abl* positives furent plutôt faibles, variant de 0% à 11% ($\bar{x}=4\% \pm 1\%$) en fonction du temps observé. Aussi, de ces neuf temps analysés, deux semblèrent encore une fois être caractérisés par des pourcentages sensiblement plus élevés (mois 3 et 4).

*Niveaux de corrélation entre l'expression du gène *bcr-abl* dans les cellules mononucléées et les progéniteurs.*

Puisque les résultats de ratios *bcr-abl / abl* et les pourcentages de CFCs furent tous deux utilisés pour évaluer les mêmes échantillons, il serait intéressant de vérifier le niveau de corrélation entre ces deux derniers et ainsi déterminer si ces résultats sont en accord ou en contradiction. En analysant chacun des types de CFCs séparément, les valeurs de corrélation entre ces types de colonies et les ratios *bcr-abl / abl* furent respectivement 0.6398 ($p \leq 0.0001$) pour les CFU-GM, 0.3626 ($p = 0.002$) pour les BFU-E et 0.7832 ($p \leq 0.0001$) pour les CFU-GEMM. Une fois les trois types de colonies regroupées en CFCs, la corrélation avec les valeurs de ratios fut de 0.6089 ($p \leq 0.0001$). De plus, il serait très intéressant, sinon essentiel, de combiner ces deux paramètres afin d'évaluer l'évolution de chaque patient suite à leur greffe. Ces résultats sont présentés dans le Tableau III selon la présence (+) ou l'absence (-) de copies de *bcr-abl* dans 68 échantillons et ce, dans les deux fractions cellulaires évaluées, soit les MNCs et les CFCs.

Tableau III: Correspondance entre les résultats de détection de l'expression du gène *bcr-abl* dans la fraction des cellules mononucléées (MNC) et la fraction des cellules progénitrices (colonies).

MNC	Nombre d'échantillons	
+	18 (26,5%)	26 (38,3%)
-	3 (4,4%)	21 (30,8%)
	+	-
	Colonies	

*Symboles "+" et "-" représentent respectivement des résultats de PCR *bcr-abl* positifs et négatifs; négatif signifiant des niveaux inférieurs au seuil de détection de la méthode déterminé par un contrôle d'ARN limite.

Aussi, de 15 patients avec au moins un échantillon MNC *bcr-abl* positif et CFC *bcr-abl* négatif, à quelque temps que se soit post greffe, trois ont conservé ce résultat le reste de la période de suivi. Par contre, il fut éventuellement possible de détecter des colonies (CFCs) *bcr-abl* positives chez 12 de ces 15 patients, le temps moyen d'apparition de la première détection de CFCs positives post greffe étant de 3 mois (1 à 8 mois). Finalement, seulement un patient a eu continuellement des échantillons MNC *bcr-abl* positifs et CFC *bcr-abl* positifs et ce, jusqu'au 9ème mois, moment où le patient était en rechute.

Résultats combinés des données de PCR et des données cliniques

Dans le but de déterminer si les résultats de PCR représentent adéquatement le statut clinique des patients, différents suivis de la maladie minimale résiduelle, de 1 mois jusqu'à au moins 6 mois post greffe, chez quatre patients, sont illustrés à la Figure 5 accompagnés de leurs niveaux respectifs de CsA, de stéroïdes, ainsi que de leurs statut cliniques de GvHD. La sélection de ces quatre patients fut basée sur le critère suivant: au moins cinq échantillons testés à l'intérieur des six premiers mois suivant la greffe et pour chacun desquels, des résultats de PCR furent obtenus de la fraction MNC et CFC. De ces quatre patients, trois ont souffert d'une GvHD aiguë (Figure 5 A, B et C) ce qui correspondait, dans tous les cas, avec soit une diminution ou une suppression du nombre de copies de *bcr-abl* exprimées dans les MNCs et du nombre de colonies *bcr-abl* positives. Suivant la disparition des symptômes de GvHD aiguë, les niveaux d'expression du gène *bcr-abl* dans les MNCs de même que les pourcentages de colonies positives remontèrent chez deux patients (Figure 5 B et C) et demeurèrent bas ou absents chez le troisième patient (Figure 5 A). Par ailleurs, les patients B et C développèrent par la suite des GvHD chroniques qui, elles aussi, induisirent une diminution des cellules réarrangées. La présence de cellules réarrangées à des niveaux élevés pourrait aussi s'expliquer par un état d'immunosuppression induit par la Cyclosporine A. Ainsi, la diminution du nombre de cellules *bcr-abl* positives serait associée à

la diminution de l'immunosuppression, qui permettrait aux cellules du système immunitaire du donneur de réagir de façon plus importante contre les cellules de l'hôte. Cette possibilité est d'ailleurs bien illustrée chez le quatrième patient (Figure 5 D), où une régression de la quantité de cellules leucémiques est survenu sans que le patient ne démontre aucun signe ou symptôme de GvHD aiguë ou chronique. Finalement, des doses décroissantes de stéroïdes furent administrées aux trois patients ayant soufferts de GvHD aiguës jusqu'à la disparition des symptômes à l'exception du patient A, pour lequel le traitement fut prolongé. La CsA pour sa part, fut donnée à tous les patients comme prophylaxie de la GvHD de base en doses décroissantes dans le temps, à l'exception, encore une fois, du patient A pour qui un dosage constant fut administré tout au long de sa période de suivi.

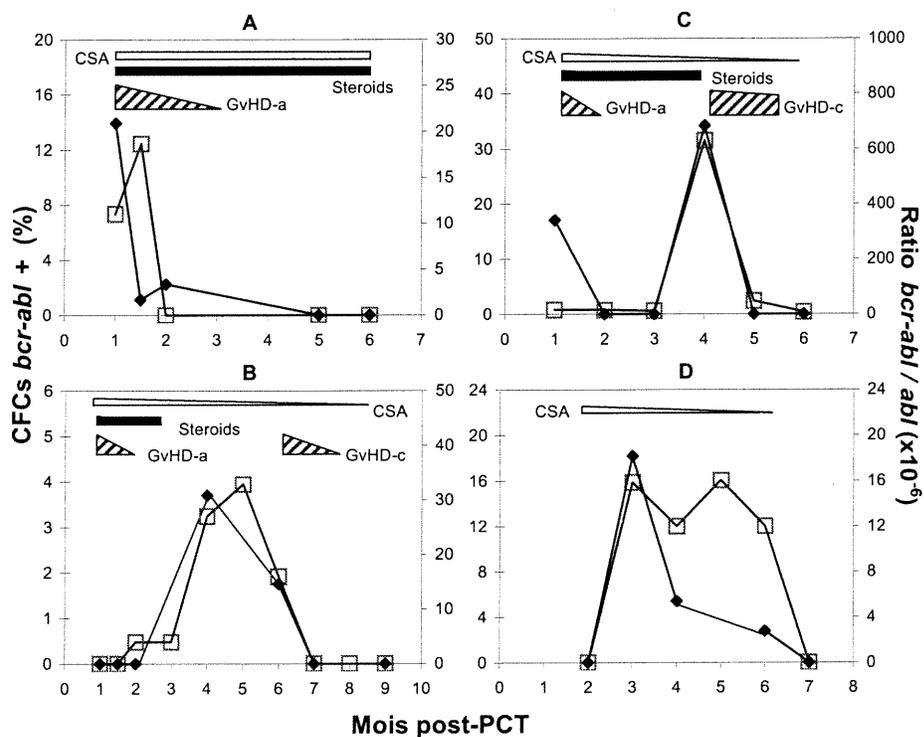


Figure 5: Graphique représentant le suivi post greffe dans le temps de la maladie minimale résiduelle de quatre patients (A, B, C et D) à l'aide de l'évaluation du pourcentage de colonies (CFCs) *bcr-abl* positives, des ratios *bcr-abl*/*abl* quantifiés dans les cellules de la fraction mononucléées et les variations de niveaux de CsA, stéroïdes et de GvHD.

◆ CFCs

□ Ratios *bcr-abl*/*abl*

Abbreviations: CsA, Cyclosporine A; GvHD-c; chronic graft versus host disease; GvHD-a, acute graft versus host disease

Discussion

La détection de l'expression du gène *bcr-abl* en utilisant la PCR fut la méthode privilégiée par plusieurs groupes afin de surveiller la maladie minimale résiduelle (MRD) chez des patients atteints de LMC suivant leur greffe allogénique. Cette évaluation de la MRD fut, dans bien des cas, une tentative de prédiction de la rechute le plus tôt possible suivant la greffe des patients. En effet, la méthode de PCR étant plus sensible que les méthodes de cytogénétiques conventionnelles, de plus faibles quantités de cellules leucémiques pourraient être détectées permettant, ainsi, une détection plus rapide de ces dernières, peut-être même précédant, ou du moins dans les premiers stades, de leur prolifération clonale. Par contre, ces résultats se sont avérés plutôt discordant, comme le souligne Faderl et al. (Faderl *et al*, 1999). Dans la présente étude, nous avons procédé à un suivi, tôt post greffe, chez 23 patients LMC. Au cours de ce suivi, l'expression du gène *bcr-abl* fut détectée et quantifiée dans les fractions mononucléées et progénitrices du sang périphérique afin de surveiller et d'évaluer la MRD et ainsi, permettre d'expliquer les discordances retrouvées dans les études précédentes.

En premier lieu, il fut démontré que la majorité des patients post PCT étaient PCR positifs dans la fraction MNC, c'est à dire que des copies du gène *bcr-abl* furent détectées par PCR (figure 2A). Ces résultats sont tout à fait

similaires à ceux de Hughes et al. (Hughes *et al*, 1991) et Roth et al. (Roth *et al*, 1992) qui ont démontré, respectivement, que de 3 à 6 mois suivant une greffe de moelle osseuse, 6 patients sur 9 étaient PCR positifs, et que 58% des patients (37/64) possédaient des copies du gène *bcr-abl* post greffe. Par contre, Radich et al. (Radich *et al*, 1995) ont, pour leur part, rapporté des pourcentages plus faibles d'échantillons PCR positifs de l'ordre de 45% à 3 mois post greffe et 26% de 6 à 12 mois. Il est important de souligner que ces différences dans les résultats de tous ces groupes pourraient être attribuables aux différents régimes préparatoires (incluant ou non la radiothérapie, le Busulfan et la Cyclophosphamide), la prophylaxie de la GvHD, ou encore au suivi de l'expression du gène *bcr-abl*.

De façon évidente, ceci démontre hors de tout doute le besoin de pousser l'évaluation de la maladie par PCR un peu plus loin et confirme par le fait même la nécessité pour une quantification des niveaux d'expressions du gène de fusion. En effet, il serait possible de concevoir un groupe de patients chez qui, presque la totalité des échantillons posséderaient de faibles niveaux d'expression de *bcr-abl* contrairement à un second groupe, chez qui une très faible proportion des patients présenteraient des niveaux d'infiltration très élevés. Dans ce cas, l'évaluation du statut des patients et la voie de traitement à considérer pour ces derniers pourraient significativement différer selon le scénario rencontré.

En conséquence, tous les échantillons PCR positifs furent quantifiés par RT-PCR compétitive et les résultats exprimés sous forme de ratios *bcr-abl* / *abl*. Ces derniers résultats furent en général faibles, comme le démontre la Figure 3. Donc, la population à l'étude s'apparenterait davantage à la première situation mentionnée précédemment où la majorité des patients possèdent, post PCT, des échantillons positifs caractérisés, par contre, par de faibles niveaux d'infiltration. De façon intéressante, la plupart des études qui ont utilisé l'évaluation de la MRD afin de prédire la rechute post greffe sembleraient avoir rencontré des situations similaires (Cross *et al*, 1993; Lin *et al*, 1996; Lion *et al*, 1993). Dans ces études, de bonnes corrélations furent obtenues entre les résultats de PCR quantitatives et les probabilités de rechutes éventuelles. La théorie derrière ces résultats est que la vaste majorité des patients va démontrer une augmentation constante de leurs nombres de copies du gènes *bcr-abl* lors de la période précédant la rechute. Par contre, une lacune de cette méthode de prédiction est l'écart de temps entre le premier résultat PCR positif et le moment où une augmentation suffisante du nombre de copies survient. Ces augmentations minimum ont été établies à différents niveaux comme par exemple, un accroissement de l'expression relative du gène testé de l'ordre de 10 fois et ce, dans trois analyses consécutives et indépendantes (Lion *et al*, 1993; Roman *et al*, 2000), ce qui pourrait signifier plusieurs mois avant qu'une rechute soit finalement diagnostiquée. Bien que cette méthode semble être efficace afin de prédire la rechute, il serait préférable d'établir un plan de

traitement approprié à un patient en rechute comme l'INF- α ou une infusion de lymphocytes du donneur (DLI) le plus rapidement possible, peut-être, par exemple, dans les six premiers mois. Comme il fut mentionné précédemment, la majorité des patients à l'intérieur de ce laps de temps suivant leur greffe sont PCR positifs, ce qui pourrait rendre difficile et peu fiable la prédiction d'une rechute basée uniquement sur ces résultats de PCR.

Afin de résoudre ce problème, le potentiel clonogénique des cellules *bcr-abl* positives résiduelles fut examiné par l'analyse de colonies individuelles de progéniteurs cultivées à court terme dans un milieu de méthylcellulose. En effet, il a déjà été suggéré qu'un résultat de PCR post greffe positif pourrait être causé par des lymphocytes ou des monocytes, possédant le réarrangement *bcr-abl*, qui auraient survécu au régime ablatif (Pichert *et al*, 1994). Par contre, ces cellules différenciées et non-pluripotentes auraient un faible potentiel d'induire une rechute contrairement à des cellules progénitrices myéloïdes qui elles, ont un potentiel prolifératif et de différenciation important, et donc, pourraient avoir la capacité d'entraîner cette rechute éventuelle.

Lors d'une étude précédente (Pichert *et al*, 1994), nous avons été capables de détecter des copies du gène *bcr-abl* dans 5.2% des colonies de cellules progénitrices, chez quatre de cinq patients évalués, des années après leur greffe allogénique. Donc, ceci démontrerait que la MRD pourrait être

soutenue par la persistance de précurseurs myéloïdes, clonogéniques et leucémiques, qui auraient résistés au régime ablatif préparatoire à la greffe. De plus, il fut conclu dans une étude de cas qu'un faible nombre de cellules souches leucémiques pourraient être impliquées dans les étapes initiales de la rechute suivant une greffe de moelle osseuse chez des patients LMC (Frassoni *et al*, 1999). Dans la présente étude, jusqu'à 10% de CFCs *bcr-abl* positives ont pu être détectées (Figure 4D) chez environ 33% des échantillons testés dans les six premiers mois suivant la greffe, ce qui représente approximativement la moitié des échantillons positifs dans la fraction MNC (Figure 2). Ces résultats soulèvent une question importante: est-ce que les résultats de CFCs apportent une information supplémentaire ou ne font-ils que confirmer celle obtenue en testant la fraction MNC?

Dans le but de répondre à cette question, la fraction MNC et les colonies furent comparées pour ce qui est de la présence (+) ou l'absence (-) du réarrangement *bcr-abl* selon les résultats de PCR. En regardant chacun des échantillons indépendamment, 57% de ces derniers ont eu le même résultat pour les deux tests de PCR (i.e. +/+ ou -/-), ce qui indiquerait que la PCR sur les colonies confirmerait simplement les résultats obtenus par PCR sur la fraction MNC. Par contre, il reste tout de même 43% des échantillons qui démontrèrent une divergence de résultats entre les deux fractions testées (i.e. +/- ou -/+), ce qui pourrait prouver le contraire. Donc, en se basant uniquement

sur ces résultats, il pourrait être dit que pour presque la moitié des échantillons, tester les colonies a permis de recueillir davantage d'information.

Toutefois, en faisant une analyse plus approfondie de ces résultats, d'autres conclusions pourraient être tirées. En effet, une façon différente de traiter ces résultats pourrait être de déterminer, pour tous les échantillons PCR positifs dans la fraction MNC, lesquels sont aussi positifs dans les colonies (i.e. +/+). Ceci pourrait permettre de discriminer les patients possédant seulement des cellules pré greffe matures résiduelles et leucémiques, de ceux qui, en plus, posséderaient de plus inquiétantes cellules progénitrices clonogéniques qui ont un potentiel plus grand d'induire une rechute. Conséquemment, il serait possible de juger et classer 96% des échantillons testés dans cette étude en se basant sur l'addition de l'analyse par PCR des colonies. En effet, des échantillons "+/+" (26%) chez un patient pourraient être une indication d'une recrudescence plus importante de la maladie que des échantillons "+/-" (38%) ou encore davantage que des échantillons "-/-" (31%). Par contre, il est important de mentionner que des échantillons PCR négatifs le sont à l'intérieur des limites de la technique, et donc, un échantillon pourrait posséder des cellules leucémiques qui ne seraient pas détectées. En conséquence, la "classification" qui pourrait être tirée de ces tests ne serait valide qu'en comparant les échantillons les uns aux autres. En termes plus clairs, un échantillon "+/-" pourrait signifier un meilleur pronostic qu'un échantillon "+/+", puisqu'il démontre un niveau plus faible de cellules

progénitrices leucémiques que ce dernier. Pourtant, un résultat "+/-", par lui seul, ne prédit pas nécessairement un bon pronostic étant donné que des cellules progénitrices leucémiques pourraient être présentes, mais en trop faible quantité pour avoir été détectées. De plus, il fut démontré que des colonies de progéniteurs peuvent être négatives en RT-PCR (signifiant l'absence de l'expression du gène *bcr-abl*) bien que Ph positives par analyse cytogénétique (Keating *et al*, 1994; Schulze *et al*, 1995), ce qui pourrait être la conséquence d'une expression différentielle du gène *bcr-abl* en fonction du niveau de maturité des cellules progénitrices Ph⁺ (Bedi *et al*, 1993).

Néanmoins, il est intéressant de souligner qu'il reste 4% des échantillons qui n'ont pas encore été traités; ces derniers étaient PCR négatifs dans la fraction MNC et PCR positifs dans les colonies (-/+). De nouveau, des résultats semblables furent par le passé publiés (Schulze *et al*, 1995) et ont été interprétés comme étant peut-être des progéniteurs malins persistant chez un patient et ces derniers, *in vivo*, seraient inhibés par la greffe allogénique ou encore des médicaments, tel l'IFN. Par contre, lorsque libérés de ces conditions répressives, ces progéniteurs proliféreraient et exprimeraient le gène *bcr-abl*, dans le cadre d'une stimulation par des facteurs de croissance externes lors de leur culture en milieu semi-solide. Peut-être encore plus intéressant serait le fait que la PCR sur les cellules qui n'ont pas été mises en culture fut effectuée sur la fraction mononucléée (MNC). En effet, les progéniteurs leucémiques détectés

pourraient s'être différenciés préférentiellement vers les lignées de cellules polymorphonucléées (PMNC) comme par exemple les granulocytes ou les éosinophiles. Or, ces types cellulaires (PMNC) ne furent pas évalués par la PCR étant donné que l'ARN fut extrait seulement de la fraction MNC isolée à l'aide d'une centrifugation par gradient de densité. De toute manière, ces résultats "-/+", obtenus chez trois patients, semblent indiquer que si l'évaluation des colonies n'avait pas été faite, ces patients auraient été classifiés comme présentant aucun signe de maladie minimale résiduelle au moment du test. D'un autre côté, en tenant compte du suivi dans le temps de ces patients, la MRD aurait été détectée à des temps suivant ou précédant les résultats "-/+".

Il serait important de rappeler à ce point-ci que les résultats représentant les niveaux d'infiltrations dans la fraction MNC du sang furent exprimés en ratio du nombre de copies du gène *bcr-abl* sur le nombre de copies du gène *abl*. Donc, un ratio d'infiltration pour un échantillon *bcr-abl* positif de 10×10^{-6} ne signifie pas nécessairement que 10 cellules sur 1 million sont *bcr-abl* positives. En effet, ces résultats de quantification sont en fonction d'une quantité d'ARN et non pas en fonction d'un nombre de cellules comme c'est le cas pour les échantillons de colonies où les résultats sont rapportés à 1 millions de cellules mises en culture. Donc, lorsque en moyenne 10 colonies positives furent détectées par million de cellules mises en plaque et qu'en moyenne des ratios de 10×10^{-6} copies de *bcr-abl* / *abl* furent détectés dans les MNCs, cela ne signifie

pas que le même nombre de cellules leucémiques fut détecté dans les deux fractions cellulaires. Cette dernière éventualité serait d'ailleurs peut probable étant donné que malgré le fait que la majorité des cellules de la fraction MNC, les lymphocytes T, n'expriment habituellement pas la translocation *bcr-abl*, il reste encore 10 à 20% des cellules composant cette fraction MNC qui sont reconnues comme ayant la capacité d'exprimer la translocation (i.e. les monocytes, les cellules NK et les lymphocytes B). Or, les progéniteurs composent habituellement, au plus, 0.1 à 0.5% des cellules d'un échantillon de sang total, c'est-à-dire incluant les PMNCs. Par contre, on pourrait supposer que dans certains cas, les cellules leucémiques détectées dans les MNCs étaient les mêmes progéniteurs détectés à l'aide du test sur les colonies. En effet, des tests de chimérisme, à la suite d'une greffe allogénique de moelle osseuse chez des patients atteints de LMC, ont démontré clairement que la proportion de cellules matures provenant du donneur, donc *bcr-abl* négatives, augmente très rapidement tôt suivant la greffe (Guimond *et al*, 2000; Gyger *et al*, 1998). En effet, cela est bien représenté par nos résultats qui démontrent que les ratios *bcr-abl / abl* ont diminué du premier mois au troisième mois (Figure 2B). À partir du troisième mois, ces valeurs commencèrent à augmenter pour atteindre des niveaux plus élevés aux mois suivants, ces valeurs plus élevées correspondant avec l'apparition, en moyenne, des premières colonies positives. Il serait donc possible de croire que ces niveaux légèrement plus élevés de cellules positives dans le sang, aux 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} mois, découleraient de la

détection de ces premières colonies positives qui se mobilisent préférentiellement, puisque la majorité des cellules matures devraient alors être du donneur, et donc, *bcr-abl* négatives.

Conséquemment, il est important de souligner que l'évaluation de la MRD, ou la progression de la maladie chez les patients, semblerait nécessiter une interprétation des résultats de PCR quantitatives et des PCR sur les colonies dans un contexte de suivi dans le temps de chacun des patients. De 15 patients avec au moins un échantillon "+/-", seulement trois ont eu ce résultat tout au long de leur période de suivi, les 12 autres ayant eu des CFCs positives détectées (+/+, -/+) à au moins une reprise. Les premières CFCs positives sont apparues après une moyenne de 3 mois suivant la greffe, ce qui semblerait indiquer qu'elles n'auraient probablement pas tiré leur origine de progéniteurs leucémiques matures en cycle, mais plutôt, de cellules souches quiescentes qui auraient survécu au régime de conditionnement à la greffe. En fait, ceci pourrait être une indication que ce dernier régime de conditionnement est plus efficace afin d'éliminer les progéniteurs en cycle que les cellules souches quiescentes. En effet, cette situation est tout à fait plausible puisqu'il est bien connu que les agents chimiothérapeutiques agissent de façon prédominante sur les cellules en division. Aussi, il aurait pu être intéressant d'effectuer des tests de détection du réarrangement sur des LTC-IC afin de confirmer si ces dernières seraient vraiment à l'origine des cellules leucémiques détectées. Par contre, le fait

qu'une période de trois mois se soit écoulée, avant que les premières CFCs *bcr-abl* positives ne fassent leur apparition post-greffe, est une indication claire de l'implication de cellules souches immatures dans ce phénomène. Par ailleurs, ces résultats de CFCs positifs sembleraient temporaires, ou du moins intermittents, puisqu'ils oscillent de positifs à négatifs durant la période de suivi. Par contre, il existe une exception pour laquelle tous les échantillons CFCs furent positifs et ce, menant jusqu'à la rechute du patient 7 mois après la greffe.

Ce dernier résultat semble indiquer que la PCR sur les colonies pourrait être un bon indicateur de rechute éventuelle étant donné que le seul patient ayant obtenu des résultats positifs de PCR sur les CFCs tout au long de son suivi est aussi le seul patient ayant rechuté dans cette étude. D'ailleurs, il est important de se demander: est-ce que les colonies peuvent aider l'identification des patients qui feront éventuellement face à une rechute? En fait, qu'est ce qui différencie, au niveau des progéniteurs, le patient qui rechutera de celui qui demeurera en rémission?

En comparant tous les résultats individuels de PCR sur les colonies chez tous les patients testés, il est possible de remarquer que la proportion maximale de colonies *bcr-abl* positives retrouvée chez un patient n'ayant pas rechuté est de 36%. En effet, aucun patient ayant obtenu des valeurs égales ou inférieures à

cette dernière n'a rechuté. De son côté, le patient ayant rechuté à atteint un pourcentage de 55 colonies exprimant le gène *bcr-abl*. De toute évidence, comme un seul patient au cours de cette étude a rechuté, il est impossible de tirer une conclusion significative et d'établir un seuil de pourcentage de colonies positives au dessus duquel les patients rechuteraient. Par contre, un suivi à plus long terme des patients, ayant des résultats PCR positifs tôt post greffe et ensuite oscillants ou transitoires, pourrait probablement permettre l'identification d'un plus grand nombre de patients subissant une rechute puisque celles-ci peuvent survenir des années après le premier résultat de PCR positif (Cross *et al*, 1993). Puisque tous les patients dans cette étude, à l'exception d'un seul, sont en rémission, l'évaluation de la MRD par PCR n'a pu être utilisée à des fins de corrélation avec la rechute éventuelle.

D'un autre côté, ces résultats pourraient servir d'outils afin de refléter, chez ces patients, les fluctuations de la GvHD et donc, de l'effet GvL, deux phénomènes dont on a démontré l'influence sur la MRD, et, par conséquence, sur la probabilité de rechute (Sullivan *et al*, 1989; Weiden *et al*, 1981). En effet, plusieurs études ont évalué l'incidence de ces paramètres cliniques sur les résultats de PCR (Pichert *et al*, 1995; Radich *et al*, 1995) et il serait très intéressant de vérifier si les résultats de PCR sur les colonies sont influencés de façon similaire.

En regardant le suivi de différents patients dans le temps (Figure 5), il fut possible de constater que le phénomène de GvH peut affecter la MRD et que ces effets sont perçus tant dans la fraction MNC du sang que dans les CFCs. Une étude précédente a démontré qu'une réaction aiguë du greffon contre l'hôte (*acute GvHD*) serait efficace afin de réduire le fardeau de cellules leucémiques mais que des cellules malignes, détectables par PCR, pourraient réapparaître après quelques temps (Cross *et al*, 1993). Dans la présente étude, ceci fut le cas dans deux des trois patients (Figure 5: B et C) chez lesquels les niveaux d'expression de *bcr-abl* dans les cellules mononucléées (MNC) ainsi que les pourcentages de colonies *bcr-abl* positives furent soit faibles ou encore abaissés lors d'une GvHD aiguë; ces effets disparaissant lorsque la GvHD commença à s'estomper. Ces deux derniers patients se sont éventuellement dirigés vers le développement d'une GvHD chronique qui eut pour conséquence de ramener à des niveaux inférieurs leurs fardeaux de cellules leucémiques. D'ailleurs, des résultats soumis au "International Bone Marrow Transplant Registry" ont démontré qu'une diminution du risque de rechute pouvait être associée à une GvHD chronique, par elle-même ou suivant une GvHD aiguë (Horowitz *et al*, 1990). Malheureusement, des corrélations de cette nature n'ont pu être effectuées dans notre étude étant donné que tous les patients, à l'exception de un, sont demeurés en rémission pour toute la durée de l'étude.

Un autre paramètre dont l'influence sur les résultats de PCR sur les MNCs a été démontrée serait l'immunothérapie (Xu *et al*, 1994). Dans la présente étude, ceci est facilement perceptible à l'aide du suivi d'un patient qui n'a développé aucune des réactions du greffon contre l'hôte (GvHD) et est graduellement devenu PCR négatif suite à la discontinuation graduelle de son traitement au CsA (Figure 5: D). Ce résultat suggérerait qu'un effet du greffon contre la leucémie (GvL) pourrait être observé en l'absence d'une GvHD, et ce, en réduisant simplement l'immunosuppression et, potentiellement, en permettant aux clones alloréactifs de réagir en éliminant les cellules leucémiques.

Dans l'ensemble, ces résultats sont intéressants pour plusieurs raisons. Premièrement, comme ce fut le cas chez ce dernier patient, ces résultats ont permis de percevoir des mécanismes immunologiques tel l'effet GvL, indépendant de la GvHD, qui semblerait confirmer les résultats obtenus dans une étude précédente dans laquelle on avait émis l'hypothèse de la présence de mécanismes de cette nature (Pichert *et al*, 1995), hypothèse qui fut aussi soulevée par d'autres chercheurs (Cross *et al*, 1993). Deuxièmement, ces résultats font la preuve que la méthode de PCR sur les colonies (CFCs) reflète de manière tout aussi efficace le statut clinique et le traitement des patients que la méthode sur les MNCs, la fraction cellulaire généralement utilisée pour évaluer la maladie minimale résiduelle. En effet, l'influence de la GvHD et des

agents immunosupresseurs, tel la CsA, sur l'état de la maladie minimale résiduelle MRD semble être clairement souligné par les résultats de PCR, tant dans les CFCs que dans la fraction MNCs. Le troisième point, et probablement le plus intéressant et important, est le fait que les CFCs ne semblent pas seulement suivre le même patron de réaction que les MNCs, mais sembleraient en fait répondre plus rapidement aux variations cliniques, une tendance observable dans trois suivis de patients sur quatre (Figure 5: A,B et D). Une autre façon d'interpréter ce phénomène pourrait être que le statut clinique (GvHD, GvL) ou le traitement (immunothérapie) des patients interagiraient à des stades différents du système hématopoïétique, soit directement ou indirectement. En effet, et les cellules matures différenciées, et les cellules progénitrices pourraient être affectées par ces paramètres de manière identique, la différence provenant possiblement du temps de renouvellement plus long des cellules matures par opposition à celui beaucoup plus court des progéniteurs. La conséquence serait donc une réponse apparemment plus lente des cellules matures, ces dernières constituant la vaste majorité des cellules de la fraction mononucléée du sang testée par PCR, donnant ainsi l'impression d'une réponse ou réaction plus rapide des CFCs testées, suite à ces différents événements cliniques. De plus, il serait aussi possible que l'effet GvL se produise de manière prédominante au stade précurseur des cellules. À travers un tel processus, les cellules leucémiques matures pourraient passer inaperçues et diminueraient en nombre seulement lorsque les derniers progéniteurs seraient

éliminés. Ceci pourrait expliquer la difficulté d'identifier des cibles antigéniques pour l'immunothérapie par les cellules T (T-cell immunotherapy) et pourrait mener à mettre plus d'emphasis sur l'évaluation et la caractérisation des antigènes sur les cellules progénitrices LMC.

En conclusion, il est important de souligner la publication récente d'un article dans lequel une étude à grande échelle fut effectuée sur la détection de l'expression du gène *bcr-abl*, par une méthode de PCR quantitative, à court terme suivant une greffe allogénique chez des patients LMC (Olavarria *et al*, 2001). En effet, les résultats de cette étude semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle une détection dans les cinq ou six premiers mois suivant la greffe peut être prédictive de la rechute. Pour trois groupes de patients testés dans les six premiers mois suivant leur greffe, dont les ratios *bcr-abl / abl* furent soit négatifs, faibles ou élevés, l'incidence de rechute trois ans plus tard fut respectivement de 16.7%, 42.9% et 86.4%. Cette étude vient donc confirmer la valeur prédictive de la PCR quantitative utilisée tôt suivant une greffe, ce qui fut difficile dans la présente étude étant donné la courte durée de l'étude et conséquemment le nombre presque nul de rechute.

De plus, nous avons démontré que tester les cellules progénitrices (colonies) par PCR, en plus de quantifier les niveaux d'infiltration dans la fraction MNC, a permis de caractériser et juger de façon plus efficace la

maladie minimale résiduelle (MRD), le statut et donc potentiellement le pronostique, de 100% des patients testés.

Aussi, il fut démontré que les colonies sembleraient refléter et réagir de la même façon, au statut clinique et au traitement du patient, que les cellules de la fraction MNC. De plus, l'influence de ces facteurs sur la maladie minimale résiduelle serait plus rapidement percevable chez les colonies par rapport aux cellules mononucléées. Ces colonies testées ont aussi mis en évidence la présence d'un ou de plusieurs mécanisme(s) immunologique(s), de nature GvL, indépendant(s) de la GvHD.

Finalement, non seulement la détection rapide de cellules leucémiques semble permettre une prédiction efficace et juste de la probabilité de rechute des patients, mais l'addition d'une évaluation des cellules clonogéniques pourrait permettre une caractérisation supplémentaire de la maladie minimale résiduelle, identifiant des patients plus à risque que d'autres de subir une rechute éventuelle et ce, encore plus rapidement dans la période de suivi. Ceci permettrait donc la mise en place plus rapide d'interventions thérapeutiques, tels les infusions de lymphocytes ou encore l'INF, dans le but de combattre la rechute et potentiellement induire une seconde rémission.

Perspectives futures

Bien que les résultats de l'évaluation de la maladie minimale résiduelle par la méthode de PCR, sur la fraction des cellules mononucléées et sur la fraction des cellules progénitrices, semblent très prometteurs, il reste tout de même à confirmer les résultats et les conclusions de la présente étude dans le cadre d'une étude à grande échelle. En effet, une plus grande population devra être étudiée et ce, sur une période s'étalant sur plusieurs années, permettant ainsi d'établir des corrélations précises entre la maladie minimale résiduelle, la rémission et la probabilité de rechute et ce, en parallèle avec les diverses interventions cliniques.

L'étude du groupe de Olavarria et al. (Olavarria *et al*, 2001) est des plus encourageante puisqu'elle a justement permis de confirmer pour la première fois, dans une étude à grande échelle, la validité d'une détection tôt suivant la greffe de cellules leucémiques dans le sang périphériques. L'étape suivante serait donc de procéder à l'addition de l'évaluation des colonies de cellules progénitrices (CFC) dans une étude de ce type. Néanmoins, la PCR quantitative serait probablement plus efficace à détecter des cellules leucémiques si elle était utilisée sur une fraction cellulaire incluant les cellules mononucléées et polynucléées. De plus, un raffinement de la méthode de PCR sur les colonies serait préalablement nécessaire. En effet, la méthode, bien qu'efficace du point

de vue de la sensibilité et de la reproductibilité, demande un investissement en temps très important, un facteur très limitant dans le contexte entourant l'utilisation de cette méthode.

Liste de références

1. Arnold, R., Janssen, J.W., Heinze, B., Bunjes, D., Hertenstein, B., Wiesneth, M., Kubanek, B., Heimpel, H. & Bartram, C.R. (1993) Influence of graft-versus-host disease on the eradication of minimal residual leukemia detected by polymerase chain reaction in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Leukemia*, **7**, 747-751.
2. Barrett, A.J. & van Rhee, F. (1997) Graft-versus-leukaemia. *Baillieres.Clin.Haematol.*, **10**, 337-355.
3. Bedi, A., Zehnbaauer, B.A., Collector, M.I., Barber, J.P., Zicha, M.S., Sharkis, S.J. & Jones, R.J. (1993) BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*, **81**, 2898-2902.
4. Biernaux, C., Loos, M., Sels, A., Huez, G. & Stryckmans, P. (1995) Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*, **86**, 3118-3122.
5. Bose, S., Deininger, M., Gora-Tybor, J., Goldman, J.M. & Melo, J.V. (1998) The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*, **92**, 3362-3367.
6. Branford, S., Hughes, T.P. & Rudzki, Z. (1999) Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br.J.Haematol.*, **107**, 587-599.
7. Chomel, J.C., Guilhot, F., Tanzer, J. & Kitzis, A. (1995) Mécanismes de l'action oncogénique de Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique. *Medecine / sciences*, **11**, 1669-1678.
8. Chung, S.W., Daniel, R., Wong, B.Y. & Wong, P.M. (1996) The ABL genes in normal and abnormal cell development. *Crit.Rev.Oncog.*, **7**, 33-48.

9. Clift, R.A. & Anasetti, C. (1997) Allografting for chronic myeloid leukaemia. *Baillieres.Clin.Haematol.*, **10**, 319-336.
10. Cortes, J., Kantarjian, H.M., Giralt, S. & Talpaz, M. (1997) Natural history and staging of chronic myelogenous leukaemia. *Baillieres.Clin.Haematol.*, **10**, 277-290.
11. Cross, N.C. (1997) Assessing residual leukaemia. *Baillieres.Clin.Haematol.*, **10**, 389-403.
12. Cross, N.C. (1998) Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Hematol.Cell Ther.*, **40**, 224-228.
13. Cross, N.C., Feng, L., Chase, A., Bungey, J., Hughes, T.P. & Goldman, J.M. (1993) Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*, **82**, 1929-1936.
14. Cross, N.C., Hughes, T.P., Feng, L., O'Shea, P., Bungey, J., Marks, D.I., Ferrant, A., Martiat, P. & Goldman, J.M. (1993) Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br.J.Haematol.*, **84**, 67-74.
15. Delage, R., Soiffer, R.J., Dear, K. & Ritz, J. (1991) Clinical significance of bcr-abl gene rearrangement detected by polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **78**, 2759-2767.
16. Eaves, C., Cashman, J. & Eaves, A. (1998) Defective regulation of leukemic hematopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Leuk.Res.*, **22**, 1085-1096.
17. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R. & Kantarjian, H.M. (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.*, **341**, 164-172.

18. Faderl, S., Talpaz, M., Kantarjian, H.M. & Estrov, Z. (1999) Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? [see comments]. *Blood*, **93**, 2755-2759.
19. Fialkow, P.J., Jacobson, R.J. & Papayannopoulou, T. (1977) Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am.J.Med.*, **63**, 125-130.
20. Frassoni, F., Podesta, M., Piaggio, G., Pitto, A., Figari, O., Soracco, M., Lint, M., Fugazza, G., Sessarego, M. & Bacigalupo, A. (1999) Relapse after allogeneic BMT for chronic myeloid leukemia (CML) may be sustained by a small number of leukemic 'stem cells': a hypothesis. *Bone Marrow Transplant.*, **24**, 689-691.
21. Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Champlin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobsen, S.J., Marmont, A.M. & McGlave, P.B. (1988) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann.Intern.Med.*, **108**, 806-814.
22. Gordon, M.Y. & Goldman, J.M. (1996) Cellular and molecular mechanisms in chronic myeloid leukaemia: biology and treatment. *Br.J.Haematol.*, **95**, 10-20.
23. Guerrasio, A., Martinelli, G., Saglio, G., Rosso, C., Zaccaria, A., Rosti, G., Testoni, N., Ambrosetti, A., Izzi, T. & Sessarego, M. (1992) Minimal residual disease status in transplanted chronic myelogenous leukemia patients: low incidence of polymerase chain reaction positive cases among 48 long disease-free subjects who received unmanipulated allogeneic bone marrow transplants. *Leukemia*, **6**, 507-512.
24. Guimond, M., Busque, L., Baron, C., Bonny, Y., Belanger, R., Mattioli, J., Perreault, C. & Roy, D.C. (2000) Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and paediatric populations. *Br.J.Haematol.* 2000.Apr.;109.(1.):130.-7., **109**, 130-137.

25. Gyger, M., Baron, C., Forest, L., Lussier, P., Lagace, F., Bissonnette, I., Belanger, R., Bonny, Y., Busque, L., Roy, D.C. & Perreault, C. (1998) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease. *Exp.Hematol.*, **26**, 426-434.
26. Hagop M.Kantarjian, Albert Deisseroth, Razelle Kurzrock, Zeev Estrov & Moshe Talpaz (1993) Chronic Myelogenous Leukemia: A Concise Update. *Blood*, **82** (3), 691-703.
27. Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H.J., Pralle, H., Hossfeld, D.K., Queisser, W., Loffler, H., Heinze, B. & Georgii, A. (1993) Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood*, **82**, 398-407.
28. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C. & Speck, B. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, **75**, 555-562.
29. Hughes, T.P., Morgan, G.J., Martiat, P. & Goldman, J.M. (1991) Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood*, **77**, 874-878.
30. Jorge E.Cortes & Susan O'Brien (1994) Chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Oncology*, **6**, 23-31.
31. Keating, A., Wang, X.H. & Laraya, P. (1994) Variable transcription of BCR-ABL by Ph⁺ cells arising from hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia [see comments]. *Blood*, **83**, 1744-1749.
32. Lin, F., van, R.F., Goldman, J.M. & Cross, N.C. (1996) Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood*, **87**, 4473-4478.

33. Lion, T., Henn, T., Gaiger, A., Kalhs, P. & Gadner, H. (1993) Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Lancet*, **341**, 275-276.
34. McWhirter, J.R. & Wang, J.Y. (1991) Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol.Cell Biol.*, **11**, 1553-1565.
35. Miyamura, K., Tahara, T., Tanimoto, M., Morishita, Y., Kawashima, K., Morishima, Y., Saito, H., Tsuzuki, S., Takeyama, K. & Koderu, Y. (1993) Long persistent bcr-abl positive transcript detected by polymerase chain reaction after marrow transplant for chronic myelogenous leukemia without clinical relapse: a study of 64 patients. *Blood*, **81**, 1089-1093.
36. Muller, A.J., Young, J.C., Pendergast, A.M., Pondel, M., Landau, N.R., Littman, D.R. & Witte, O.N. (1991) BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol.Cell Biol.*, **11**, 1785-1792.
37. Nowell, P.C. & Hungerford, D.A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, **132**, 1497
38. Olavarria, E., Kanfer, E., Szydlo, R., Kaeda, J., Rezvani, K., Cwynarski, K., Pocock, C., Dazzi, F., Craddock, C., Apperley, J.F., Cross, N.C. & Goldman, J.M. (2001) Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001.Mar.15.;97.(6.):1560.-5., **97**, 1560-1565.
39. Passweg, J.R., Rowlings, P.A. & Horowitz, M.M. (1998) Related donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.*, **12**, 81-92.
40. Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y. & Witte, O.N. (1991) BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell*, **66**, 161-171.

41. Petzer, A.L., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Ponchio, L., Barnett, M.J. & Eaves, A.C. (1996) Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. *Blood*, **88**, 2162-2171.
42. Pichert, G., Alyea, E.P., Soiffer, R.J., Roy, D.C. & Ritz, J. (1994) Persistence of myeloid progenitor cells expressing BCR-ABL mRNA after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **84**, 2109-2114.
43. Pichert, G., Roy, D.C., Gonin, R., Alyea, E.P., Belanger, R., Gyger, M., Perreault, C., Bonny, Y., Lerra, I. & Murray, C. (1995) Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J.Clin.Oncol.*, **13**, 1704-1713.
44. Radich, J.P., Gehly, G., Gooley, T., Bryant, E., Clift, R.A., Collins, S., Edmands, S., Kirk, J., Lee, A. & Kessler, P. (1995) Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood*, **85**, 2632-2638.
45. Roman, J., Alvarez, M.A. & Torres, A. (2000) Molecular basis for therapeutic decisions in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* 2000.Oct.;85.(10.):1072.-82., **85**, 1072-1082.
46. Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L. & Juliano, R. (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim.Biophys.Acta*, **1242**, 77-98.
47. Roth, M.S.; Antin, J.H., Ash, R., Terry, V.H., Gotlieb, M., Silver, S.M. & Ginsburg, D. (1992) Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by the polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **79**, 276-282.

48. Rowley, J.D. (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, **243**, 290-293.
49. Sawyers, C.L. (1997) Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillieres.Clin.Haematol.*, **10**, 223-231.
50. Sawyers, C.L. (1999) Chronic myeloid leukemia [see comments]. *N.Engl.J.Med.*, **340**, 1330-1340.
51. Schulze, E., Krahl, R., Thalmeier, K. & Helbig, W. (1995) Detection of bcr-abl mRNA in single progenitor colonies from patients with chronic myeloid leukemia by PCR: comparison with cytogenetics and PCR from uncultured cells. *Exp.Hematol.*, **23**, 1649-1654.
52. Snyder, D.S. & McGlave, P.B. (1990) Treatment of chronic myelogenous leukemia with bone marrow transplantation. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.*, **4**, 535-557.
53. Sullivan, K.M., Weiden, P.L., Storb, R., Witherspoon, R.P., Fefer, A., Fisher, L., Buckner, C.D., Anasetti, C., Appelbaum, F.R. & Badger, C. (1989) Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood*, **73**, 1720-1728.
54. Thompson, J.D., Brodsky, I. & Yunis, J.J. (1992) Molecular quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation. *Blood*, **79**, 1629-1635.
55. Verfaillie, C.M. (1998) Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.*, **12**, 1-29.
56. Weiden, P.L., Sullivan, K.M., Flournoy, N., Storb, R. & Thomas, E.D. (1981) Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.*, **304**, 1529-1533.

57. Xu, W.M., Piao, X.H., Addy, L., Jamal, M., Minden, M.D. & Messner, H.A. (1994) Minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, **14**, 299-306.