



Article Original

Diagnostic et Évaluation de la Réponse Thérapeutique de la Leucémie Myéloïde Chronique au Mali par l'Hybridation *in situ* Fluorescente

Diagnosis and evaluation of the response to treatment of chronic myeloid leukaemia in Mali by fluorescent in situ hybridization

Sidibé CO¹, Samassékou O^{1*}, Bathily M², Ly M³, Diallo Y⁴, Landouré G^{1,5}, Traoré SF¹, Guinto CO^{1,5}, Traoré M^{1,6}

RÉSUMÉ

(¹) Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali
 (²) Service d'Hématologie et Oncologie médicale, CHU Point "G", Bamako, Mali
 (³) Service d'Oncologie Médicale CHU "Mère-Enfant" Le Luxembourg, Bamako, Mali
 (⁴) Service de Médecine et d'endocrinologie, Hôpital du Mali, Bamako, Mali
 (⁵) Service de Neurologie, CHU Point "G", Bamako, Mali
 (⁶) Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction, Institut National de Santé Publique, Bamako, Mali.

Auteur correspondant

Oumar Samassekou
 Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, Point "G", Bamako Mali.
 Tel : (223) 94226791
 Fax : (223) 20 22 96 58
 Email : oumar.samassekou@usherbrooke.ca

Mots clés: LMC - Réarrangements *ABL1/BCR* - FISH

Key words: CML - Chromosomal abnormalities – FISH – Mali.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie ou du gène de fusion *BCR/ABL1*. Au Mali, les approches génétiques de diagnostic et d'évaluation de la réponse thérapeutique de la LMC font défaut d'où l'intérêt de développer la méthode FISH (Hybridation *in situ* en Fluorescence) pour diagnostiquer et évaluer la réponse thérapeutique de la LMC. **Méthodes.** Nous avons analysé les cellules sanguines de 25 patients référés pour diagnostic ou évaluation thérapeutique de la LMC. Nous avons réalisé la FISH sur des cellules interphasiques et des métaphases, et la capture d'images cellulaires a été faite avec un microscope à épifluorescence. **Résultats.** Au total, 25 patients ont été inclus dont 16 pour diagnostic et 9 pour évaluation thérapeutique. Nous avons obtenu un taux de succès de 92% pour l'obtention des métaphases. En outre, nous avons observé des réarrangements *ABL1/BCR* à la FISH chez 22 des 25 patients. Parmi ces 22 patients, 16 ont présenté un patron de signaux typiques et 6 des patrons de signaux atypiques. **Conclusion.** Nous avons établi la technique FISH au Mali pour le diagnostic et l'évaluation thérapeutique de la LMC et identifié des formes atypiques de la translocation t(9;22).

ABSTRACT

Objective. Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematologic malignancy characterized by the presence of the Philadelphia chromosome or its molecular equivalent, the *BCR/ABL1* fusion gene. Diagnosis and monitoring of CML are done by detecting this chromosome, the *BCR/ABL1* gene, or the *BCR/ABL1* transcript. In Mali, genetic tools of diagnosis and follow-up are still lacking, so we did this study with the objectives of developing the FISH technique to diagnose, to follow up, and to characterize the cytogenetic profile of CML patients. **Methods.** We carried out FISH technique by using the dual color dual fusion probe for *BCR/ABL1* on interphase nuclei and metaphases. Slides were scanned with an epifluorescence microscope. **Results.** A total of 25 patients (16 for diagnostic and 9 for follow-up) were included. We achieved a 92% success rate for obtaining metaphases. The *BCR/ABL1* gene fusion signal was present in 22 patients. Among those 22 patients, 16 presented a typical signal pattern and 6 presented atypical signal patterns. **Conclusion.** We set up the FISH technique in Mali for the diagnosis and the follow-up of CML patients and identified atypical translocation of t(9;22).

INTRODUCTION

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération anormale des cellules souches hématopoïétiques et la présence du chromosome Philadelphie (Ph+) issu de la translocation entre les chromosomes 9 et 22. Cette translocation entraîne la fusion des gènes *BCR* et *ABL1* qui

donne une protéine chimérique *BCR/ABL1* (1). Au Mali, une enquête épidémiologique sur les hémopathies malignes, sur une durée de 8 ans, a retrouvé que la LMC occupe 16,67% des hémopathies malignes et 42,3% des leucémies (2).

Le diagnostic et l'évaluation de la réponse thérapeutique de la LMC reposent sur des signes cliniques, biologiques et l'identification du chromosome Philadelphie (Ph+) ou du gène de fusion *BCR/ABL1* par les techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) et/ou moléculaire (FISH ou PCR).

Bien vrai qu'une étude pilote a été menée au Mali sur le diagnostic cytogénétique de la LMC au Mali (3), actuellement, il n'existe pas de test génétique permettant de diagnostiquer ou d'évaluer la réponse thérapeutique des patients atteints de la LMC au Mali, d'où l'intérêt de cette étude. Les objectifs de ce présent travail sont de développer la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) pour le diagnostic et l'évaluation de la réponse thérapeutique et de déterminer le profil cytogénétique de réarrangements du gène de fusion *BCR/ABL1* chez les patients souffrant de la LMC.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons mené une étude prospective et descriptive, allant du 1^{er} novembre 2018 au 31 août 2019, pour valider la technique FISH enfin de diagnostiquer et d'évaluer la réponse thérapeutique (traitement à base d'Imatinib Mesylate) de la LMC au Mali. Les patients ont été référés par les services d'hématologie ou d'oncologie des Hôpitaux du Point G, du Gabriel Touré et de Mère-Enfant « Le Luxembourg ». L'analyse cytogénétique des échantillons a été faite dans le Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction de l'Institut National de Santé Publique (INSP), l'évaluation microscopique et l'analyse des données ont été effectuées dans le laboratoire de la Neurosciences de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie.

Nous avons inclus tous les patients référés au Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction de l'INSP pour la FISH de *ABL1/BCR*. Les patients chez lesquels la technique FISH n'a pas pu être réalisée ont été exclus de l'étude. Nous avons obtenu le consentement de tous les patients inclus dans cette étude.

Quatre millilitres de sang périphérique ou de la moelle osseuse ont été prélevés dans un tube à héparine chez chaque patient. Cinq cents microlitres de ce prélèvement ont été mis en culture dans 5 mL de milieu de culture MarrowMAX (Thermo Fisher, USA) et incubé dans un environnement de 5% CO₂ à 37°C pendant 24 heures. Après une culture cellulaire de 24 heures, la récolte des chromosomes a été faite selon le protocole standard de récolte des cellules leucémiques (4). Ensuite, les chromosomes ont été étalés sur des lames qui ont été vieillies à 37°C pendant 24 heures. Par la suite, les lames ont été prétraitées avec la solution tampon de 1X TBS (Tris: 20 mM et NaCl: 150 mM), puis déshydratées avec de l'éthanol à 80%, 90% et 100%. Une solution d'hybridation de 10 µL contenant 1µL de la sonde *BCR/ABL1* double fusion double couleur de Vysis (Abbott, USA) et 9 µL de tampon d'hybridation a été appliquée sur les lames. La dénaturation a été faite à 78°C pendant 5 minutes et l'hybridation à 37°C pendant 24 heures. Enfin, les lames ont été lavées dans une solution de 1X TBS/0.05% Tween 20 et contre colorées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).

L'observation des lames et la capture des images ont été effectuées avec un microscopique à épifluorescence Axio Imager 2 (Zeiss, USA) dotée du système de capture et de traitement d'images *ISIS* de Metasystems (Metasystem, USA). Pour chaque échantillon, 200 noyaux interphasiques et 20 métaphases lorsqu'elles ont pu être obtenues, ont été analysés. La sonde *BCR/ABL1* est composée de deux types de sondes marquées par des fluorochromes différents: la sonde *ABL1* qui colore le gène *ABL1* situé sur le chromosome 9 en rouge (R) et la sonde *BCR* qui colore le gène *BCR* situé sur le chromosome 22 en vert (V). Ainsi, les gènes *ABL1* et *BCR* sont identifiés à l'observation microscopique grâce à la présence de signaux rouges et verts, respectivement. La présence d'une fusion *BCR/ABL1* est observée lorsqu'il y a une co-localisation des signaux vert et rouge, appelée signal de fusion (F).

Nous avons interprété les patrons de signaux en fonction des instructions fournies par Abbott et Primo D *et al.* (5,6). L'interprétation des signaux a été faite de la manière suivante: 2R2V pour les cellules ne présentant pas de translocation, les signaux 1R1V2F pour les cellules leucémiques présentant un patron de signaux typique, et les autres patrons de signaux ont été considérés comme des signaux atypiques de cellules leucémiques.

Le sexe, l'âge, le pourcentage des cellules interphasiques et/ou des métaphases et la caractérisation des différents patrons de signaux observés étaient les principales variables étudiées.

La confidentialité des données a été garantie et nous ne notons aucun conflit d'intérêts.

RÉSULTATS

Durant les 9 mois d'étude, nous avons inclus 25 patients dont 16 pour diagnostic et 9 pour évaluation de la réponse thérapeutique. Les hommes étaient légèrement moins représentés que les femmes avec un sex-ratio de 0,92 (Figure 1).

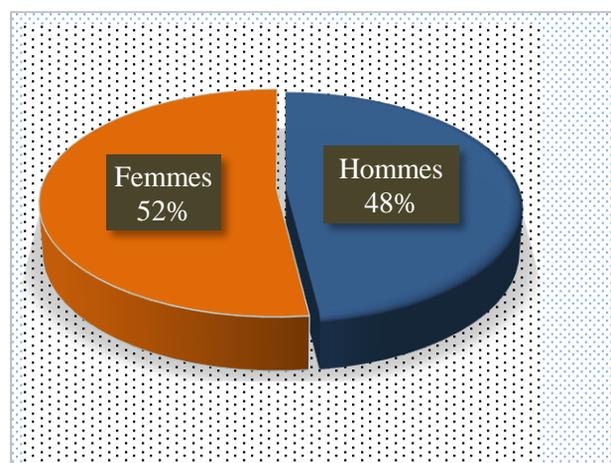


Figure 1 : Répartition des patients en fonction du sexe

L'âge moyen des patients était de 33,48 ans (extrêmes de 15 à 53 ans). La tranche d'âge de 35 à 49 ans était la plus représentée au moment du diagnostic, soit 62,5% des 25 patients (Tableau I).

Tableau I : Répartition des patients en fonction de l'âge

Tranches d'âge (ans)	Patients		Total
	Diagnostic	Évaluation	
Moins 20	1	2	3
20-34	4	7	11
35-49	9	-	9
50 et plus	2	-	2
Total	16	9	25

La culture cellulaire a permis d'obtenir des métaphases chez 23 patients, soit 92% de la population d'étude. La technique FISH a été réalisée chez l'ensemble des patients. Nous avons noté la présence du réarrangement *BCR/ABL1* chez tous les 16 patients référés pour le test de diagnostic et 6 des 9 patients pour l'évaluation de la réponse thérapeutique (Tableau II).

Tableau II: Répartition des patients selon les réarrangements *ABL1/BCR*

Réarrangements <i>ABL1/BCR</i>		Patients		Total
		Diagnostic	Évaluation	
Présence	Typique	13	3	16
	Atypique	3	3	6
Absence		0	3	3
Total		16	9	25

Les patients en évaluation thérapeutique qui ne présentaient pas de réarrangement *BCR/ABL1* (3 patients) étaient considérés comme étant en rémission cytogénétique complète c'est-à-dire ces patients ne présentaient pas de cellules leucémiques selon la technique FISH (Figure 2).

Les 6 autres patients en évaluation thérapeutique chez lesquels les cellules avaient le réarrangement *BCR/ABL1* (cellules leucémiques) étaient en rémission cytogénétique partielle ou présentaient une absence de réponse thérapeutique cytogénétiquement.

Nous avons retrouvé des signaux atypiques de la translocation t(9;22) dans les échantillons de 6 patients sur les 25, soit 24% de la population d'étude (Tableau II et Figure 2). Parmi ces patients, trois étaient en évaluation thérapeutique et ceux-ci ont présenté le même patron de signaux atypiques.

En outre, nous avons retrouvé chez un patient référé pour évaluation thérapeutique la présence de clones en fonction de la translocation t(9;22). En effet, ce patient a présenté des patrons de signaux correspondant à des cellules normales (6,5% des cellules), le patron de signaux typiques de la translocation t(9;22) (81,5% des cellules) et un patron de signaux atypiques de la translocation t(9;22) (12% des cellules).

DISCUSSION

Cette étude a porté sur une population de 25 patients dont 16 référés pour diagnostic et 9 pour évaluation réponse thérapeutique de l'Imatinib Mesylate. Le petit nombre de patients dans cette cohorte d'étude s'expliquerait par le fait que la LMC est une maladie rare avec une incidence annuelle estimée à 1-1,5 cas pour 100000 habitants (7,8), mais aussi le manque d'accès des patients aux spécialistes pouvant établir le diagnostic clinique. A noter que tous les spécialistes en hématologie sont concentrés à Bamako qui a été le site d'enrôlement de l'étude.

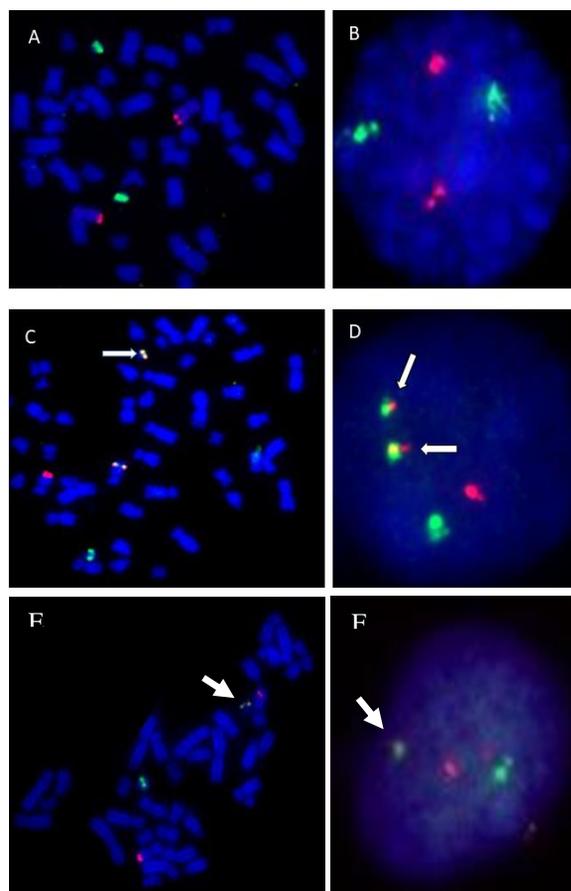


Figure 2 : Présentation des patrons des signaux des loci *ABL1* et *BCR*. Les images A) et B) représentent, respectivement, une métaphase et un noyau interphasique qui ne montrent pas de fusion *ABL1/BCR* (2R2V). Ces images proviennent de deux cellules normales d'un individu en rémission cytogénétique complète. Les images C) et D) représentent une métaphase et un noyau interphasique, respectivement, dans lesquels on retrouve un patron de signaux typique (1R1V2F). Ces images sont celles de deux cellules leucémiques d'un même individu. Les images E) et F) représentent, respectivement une métaphase et un noyau interphasique qui montrent un patron de signaux atypiques (2R1V1F). Ces images proviennent de deux cellules leucémiques d'un même individu. Les flèches indiquent le chromosome Philadelphie sur les métaphases et les signaux de fusion *ABL1/BCR* dans les noyaux interphasiques.

L'âge moyen des patients était de 33,48 ans alors qu'en occident, il varie entre 55-60 ans (9-12). Certaines données Africaines et du Moyen Orient aussi supportent une tendance plus jeune de patients atteints de LMC avec un âge médian inférieur à 40 ans au moment du diagnostic (13). L'espérance de vie basse dans nos contrées pourrait en partie expliquer la fréquence élevée de la LMC dans une population relativement plus jeune que celle de l'occident. En outre d'autres facteurs tels que génétiques ou environnementaux doivent être recherchés pour mieux expliquer l'apparition précoce de la LMC au Mali. Après la culture cellulaire, nous avons pu obtenir des métaphases analysables dans la plupart des échantillons. Les deux échantillons dans lesquels la culture cellulaire n'a pas permis d'obtenir des métaphases s'expliquent par le fait que ses patients étaient sous un traitement qui inhiberait la prolifération cellulaire *in vitro*. La réalisation de la technique FISH *BCR/ABL1* sur des métaphases a l'avantage de mieux décrire les différents types de signaux observés, leurs localisations sur les chromosomes, et le type et le

nombre de chromosome incriminés dans les réarrangements des loci *BCR/ABL1* (14–16).

Les cellules leucémiques que nous avons observées présentaient des patrons de signaux typiques ou atypiques. Le patron de signal typique résulte du réarrangement *ABL1/BCR* à partir des points de cassures communs aux deux loci *ABL1* et *BCR* (5) alors que plusieurs mécanismes conquerraient à l'émergence des patrons de signaux atypiques (5,17). Nous avons décelé des patrons de signaux atypiques chez un quart des patients, une proportion proche à celle de l'étude de Dewald *et al.* dont les patients présentant les patrons de signaux atypiques étaient 19% de la population d'étude (18). Les patients référés pour une évaluation de la réponse thérapeutique et qui présentaient un même patron de signaux atypiques n'étaient pas en rémission cytogénétique complète, indicateur précoce d'un échec thérapeutique. En effet, il a été démontré que les signaux atypiques sont associés à une résistance thérapeutique à l'Imatinib Mesylate (19,20). Nous avons aussi observé des signaux atypiques lors du diagnostic, et leur présence serait indicative d'une éventuelle une résistance primaire à l'Imatinib Mesylate (19,21). L'analyse FISH, en plus d'être extrêmement simple et rapide, est très informative et complémentaire au caryotype pour une évaluation cytogénétique complète de la LMC.

CONCLUSION

Nous avons établi la technique FISH pour le diagnostic et l'évaluation de la réponse thérapeutique de la LMC au Mali. Ensuite, nous avons observé des signaux atypiques de la translocation *BCR/ABL1* qui pourraient être associés à une résistance thérapeutique primaire et/ou secondaire à l'Imatinib Mesylate. Il est donc crucial de mener d'autres études sur des cohortes plus larges pour mieux évaluer l'impact des patrons de signaux atypiques de la translocation t(9;22).

Remerciements

Nous remercions les patients pour leur participation à cette étude.

Financement

Ce travail est soutenu par le numéro de subvention U01HG007044 financé par le National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) administré par le National Human Genome Research Institute dans le cadre du NIH Common Fund H3Africa Initiative, fonds intra-muros du NINDS, la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie, USTTB, Bamako, Mali, et le Centre Hospitalier Universitaire du Point G, Bamako, Mali.

RÉFÉRENCES

1. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 19 févr 2009;113(8):1619-30.
2. Diallo DA, Cissoko LS, Cissoko Y, Diallo Y, Baby M, Mouhaha J, et al. Epidémiologie actuelle des hémopathies malignes dans les services d'hématologie oncologie médicale et de médecine interne de l'hôpital du Point G, Bamako, Mali. *Mali Méd*. 2005;20(4):1-8.
3. Samassekou O, Diallo L, Traoré M, Sow S, Mai S. L'apport de la cytogénétique dans le diagnostic de la Leucémie Myéloïde Chronique au Mali. *Rev Algér D'Hématologie*. déc 2017;(13-14):2.
4. Dal Cin P, McLaughlin C. Metaphase harvest and cytogenetic analysis of malignant hematological specimens. *Curr Protoc Hum Genet*. avr 2012;Chapter 10:Unit 10.2.1-15.
5. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, Sayagués JM, Espinosa AB, Chillón MC, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia*. juin 2003;17(6):1124-9.
6. Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Kit [Internet]. [cité 11 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.molecularcatalog.abbott/int/en/Vysis-LSI-BCR-ABL-Dual-Color-Dual-Fusion-Translocation-Probe-Kit>
7. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. mars 2018;93(3):442-59.
8. RESERVES IU-TD. Orphanet: Leucémie myéloïde chronique [Internet]. [cité 30 avr 2021]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=521
9. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. avr 2020;34(4):966-84.
10. Hehlmann R, Lauseker M, Sauße S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb HJ, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia*. nov 2017;31(11):2398-406.
11. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2008.
12. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia*. juin 2015;29(6):1336-43.
13. Malhotra H, Radich J, Garcia-Gonzalez P. Meeting the needs of CML patients in resource-poor countries. *Hematology*. 6 déc 2019;2019(1):433-42.
14. Mark HFL, Sokolic RA, Mark Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Exp Mol Pathol*. août 2006;81(1):1-7.
15. Pelz A, Kröning H, Franke A, Wieacker P, Stumm M. High reliability and sensitivity of the BCR/ABL1 D-FISH test for the detection of BCR/ABL rearrangements. *Ann Hematol*. mars 2002;81(3):147-53.
16. Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RO, Zinsmeister AR, Jalal SM, et al. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1 mai 1998;91(9):3357-65.
17. Richebourg S, Eclache V, Perot C, Portnoi M-F, Van den Akker J, Terré C, et al. Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy. *Cancer Genet Cytogenet*. 15 avr 2008;182(2):95-102.
18. Dewald GW, Wyatt WA, Silver RT. Atypical BCR and ABL D-FISH Patterns in Chronic Myeloid Leukemia and their Possible Role in Therapy. *Leuk Lymphoma*. janv 1999;34(5-6):481-91.
19. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 22 déc 2011;118(26):6760-8.
20. Otero L, Ornellas MH, Dobbin J, de Souza Fernandez T. Double Philadelphia-chromosome: a resistance factor on the imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. août 2008;30(4):346-8.
21. Reid AG, Huntly BJP, Grace C, Green AR, Nacheva EP. Survival implications of molecular heterogeneity in variant Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. mai 2003;121(3):419-27.