UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1993

N° 331

REARRANGEMENT DES GENES DES IMMUNOGLOBULINES ET DU RECEPTEUR T β, PAR LA TECHNIQUE DU SOUTHERN-BLOT, DANS LES LEUCEMIES AIGUES LYMPHOIDES.
Etude sur 11 cas

THESE

pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présenté et soutenu publiquement

le 8 Juillet 1993 à Bordeaux

par

Sophie LAFON

née le 5 Février 1963 à Talence

Jury

Monsieur E. JOUZIER	Professeur	Président
Monsieur Ph. BERNARD	Professeur	Juge
Mademoiselle C. BILHOU-NABERA	Docteur en Médecine	Juge
Madame F. LE MOIGNE	Docteur en Pharmacie	Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

- *Doyen de la Faculté* : Monsieur le Professeur **RABY**
- *Assesseurs :* Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)
  Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur).

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie,Parasitologie
OUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

REARRANGEMENT DES GENES DES IMMUNOGLOBULINES ET DU RECEPTEUR T β, PAR LA TECHNIQUE DU SOUTHERN-BLOT, DANS LES LEUCEMIES AIGUES LYMPHOIDES.

Etude sur 11 cas

A mes parents,

A François,

A ma famille,

A mes amis,

Remerciements

A Jackie,

Tu m'as initiée à la technique du Southern-blot. Ta compétence et ton dynamisme m'ont permis la réalisation de ce travail.

A Florence,

Pour tes précieux conseils tout au long de ces mois passés dans le laboratoire.

A Marie-Jo,

Pour tes conseils et ta disponibilité.

A Angèle et Annie, pour leur amicale présence.

A toutes les personnes du laboratoire qui m'ont conseillée pour cette étude.

A NOS JUGES,

Mademoiselle le Docteur C. BILHOU-NABERA
Maître de Conférences des Universités
Praticien Hospitalier

Ta compétence, ta disponibilité et ton inépuisable gentillesse nous ont été précieuses pour l'élaboration de ce travail. Sois assurée de ma gratitude et de toute ma sympathie.

Madame F. LE MOIGNE
Maître de Conférences des Universités
Praticien Hospitalier

Nous sommes heureuse de pouvoir vous compter parmi les membres de notre jury. Recevez tous nos remerciements.

A NOS JUGES,

Monsieur le Professeur Ph. BERNARD
Professeur d'Hématologie et de Transfusion
Praticien Hospitalier

Pendant les quelques mois passés dans votre service, nous avons particulièrement apprécié votre accueil et l'intérêt que vous portez à vos internes.
Vous nous avez fait confiance en nous proposant ce travail. En acceptant de juger cette thèse, vous nous faites un grand honneur. Veuillez trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur E. JOUZIER
Professeur de Biochimie Fondamentale et Clinique
Praticien Hospitalier, Chef de Service

Vous nous avez enseigné la biochimie à la Faculté de Pharmacie. Vos conseils ont toujours été précieux pendant nos études. Recevez cette thèse en témoignage de l'expression de notre vive reconnaissance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

RAPPELS 3

I - REARRANGEMENTS GENIQUES DES IMMUNO-GLOBULINES ET DU RECEPTEUR T 4

I-1 - Structure des immunoglobulines (Ig) 4

I-2 - Structure du récepteur T (Rec T) 4

I-2-1 - Récepteur α et β 4

I-2-2 - Récepteur γ et δ 6

I-3 - Organisation au niveau du génome 6

I-3-1 - Les différents types de réarrangements 6

I-3-1-1 - Réarrangement des gènes de la chaîne kappa des Ig 6

I-3-1-2 - Réarrangement des gènes de la chaîne lambda des Ig 7

I-3-1-3 - Réarrangement des gènes de la chaîne lourde des Ig 7

I-3-1-4 - Le modèle du Rec T 10

I-4 - Chronologie des événements 10

I-4-1 - Au niveau chromosomique 10

I-4-2 - Au niveau des gènes des Ig 12

I-4-3 - Au niveau des gènes du Rec T 12

I-5 - Le diagnostic de monoclonalité 12

I-6 - Réarrangements et leucémies aiguës lymphoblastiques 12

I-6-1 - Réarrangements des gènes des Ig 12

I-6-2 - Réarrangements des gènes du Rec T 13

I-6-2-1 - Récepteur α et β 13

I-6-2-2 - Récepteur γ et δ 13

II - MARQUEURS CELLULAIRES DES LIGNEES LYMPHOIDES 14
II-1 - Différenciation lymphoïde B 14
II-2 - Différenciation lymphoïde T 14

PATIENTS ETUDIES 15

MATERIEL ET METHODES D'ETUDE 20
I - MATERIEL 21
II - METHODES D'ETUDE : LE SOUTHERN BLOT 21
II-1 - Extraction de l'ADN 21
II-1-1 - Obtention de l'ADN 21
II-1-2 - Purification de l'ADN 22
II-1-3 - Analyse de l'ADN ainsi obtenu 22
II-2 - Digestions enzymatiques 24
II-2-1 - Les enzymes utilisées 24
II-2-2 - Digestion 24
II-3 - Electrophorèse 24
II-3-1 - Principe 24
II-3-2 - Réalisation 26
II-4 - Transfert 26
II-4-1 - Dépurinisation par l'acide chlorhydrique 26
II-4-2 - Dénaturation par la soude 26
II-4-3 - Transfert 26
II-4-4 - Neutralisation 28
II-5 - Hybridation 28
II-5-1 - Les sondes utilisées 28
II-5-2 - Marquage de la sonde 28
II-5-2-1 - Préparation de la sonde 28
II-5-2-2 - Vérification de la qualité du marquage 28
II-5-3 - L'hybridation 30
II-5-3-1 - Préhybridation 30
II-5-3-2 - Hybridation 30
II-5-4 - Les lavages 31

II-6 - Autoradiographie 31
II-7 - Déshybridation 31

RESULTATS 32
I - BREVIAIRE POUR UNE INTERPRETATION CORRECTE 33
I-1 - Taille des bandes germinales 33
I-2 - Analyse des différents Southern-blots 33
I-3 - Notions permettant l'analyse de nos résultats 36
I-3-1 - En théorie 36
I-3-2 - En pratique 36
I-3-3 - Les bandes partielles 36
II - PRESENTATION DES RESULTATS 36
II-1 - Illustration par quelques autoradiographies caractéristiques 36
II-2 - Résultats 39

INTERPRETATION - DISCUSSION 42
I - REARRANGEMENTS MONO OU BIALLELIQUES 43
II - ANALYSE DES DIFFERENTS CLONES 43
II-1 - Clones multiples 43
II-2 - Oligoclones 43
II-3 - Réarrangements illégitimes 44
II-4 - Cas particulier : le cas JOL 45

CONCLUSION 46

ANNEXES 48

BIBLIOGRAPHIE 68

ABREVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucléique
BM	Bain marie
bet	Bromure d'éthidium
°C	Degré celsius
DO	Densité optique
D.T.T.	Dithiothreitiol
dXTP	Monodéoxyribonucléoside 5'triphosphate(A,C,G,T)
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
Kb	Kilobases
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LGB	Lyse des globules blancs
M	Million
mn	Minute
µg	Microgramme
NaCl	Chlorure de sodium
ng	Nanogramme
NH_4Cl	Chlorure d'ammonium
nm	Nanomètre
P32	Phosphore 32
PK	Protéinase K
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Citrate trisodique
U	Unité
UV	Ultraviolet.

INTRODUCTION

Les leucémies aiguës lymphoblastiques sont des proliférations malignes de cellules précurseurs des lymphocytes. La confrontation des données de la cytologie et de l'immunophénotypage a permis de rattacher ces proliférations aux lignées B ou T. L'analyse, en biologie moléculaire, de ces pathologies a permis d'affiner et parfois même, d'affirmer le diagnostic quand la cytologie et l'immunophénotypage présentent des données discordantes. Les premières études ont porté sur les réarrangements des gènes des immunoglobulines comme marqueur de clonalité de la lignée B. Depuis quelques années, de nombreux travaux ont été consacrés au remaniement des gènes des récepteurs spécifiques de la lignée T.

Dans notre présent travail, nous avons tout d'abord rappelé les données moléculaires du réarrangement des gènes des immunoglobulines et du récepteur T puis décrit la technique du Southern-blot. Ensuite, sur un échantillonnage de 11 patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique, nous avons analysé les différents aspects de leurs réarrangements en fonction des données de la littérature.

RAPPELS

I - REARRANGEMENTS GENIQUES DES IMMUNO-GLOBULINES ET DU RECEPTEUR T

Les lymphocytes jouent un rôle fondamental dans les réponses immunitaires spécifiques cellulaires et humorales :

- Les lymphocytes B se différencient vers la synthèse des immuno-globulines (Ig).
- Les lymphocytes T portent à leur surface des récepteurs (Rec T) d'antigènes capables de reconnaître les antigènes étrangers au soi.

Les phénomènes de réarrangements géniques constituent une caractéristique fondamentale des cellules lymphoïdes à l'état physiologique. Les gènes concernés codent pour des molécules protéiques chargées de la reconnaissance des antigènes.

I-1 - Stucture des immunoglobulines (2)

Ce sont des glycoprotéines constituées de 4 chaînes polypeptidiques identiques 2 à 2 :

- 2 chaînes lourdes (H)
- 2 chaînes légères (L).

Les chaînes H et L sont liées par des ponts disulfures intercaténaires. Au sein de chaque chaîne, il existe des ponts disulfures intracaténaires. Chaque chaîne est constituée :

- à l'extrémité amino-terminale, de parties variables au sein desquelles existent des portions hypervariables.
- à l'extrémité carboxy-terminale, de parties constantes.

[cf. schéma n°1, Bach (2)].

I-2 - Stucture du récepteur T (12)

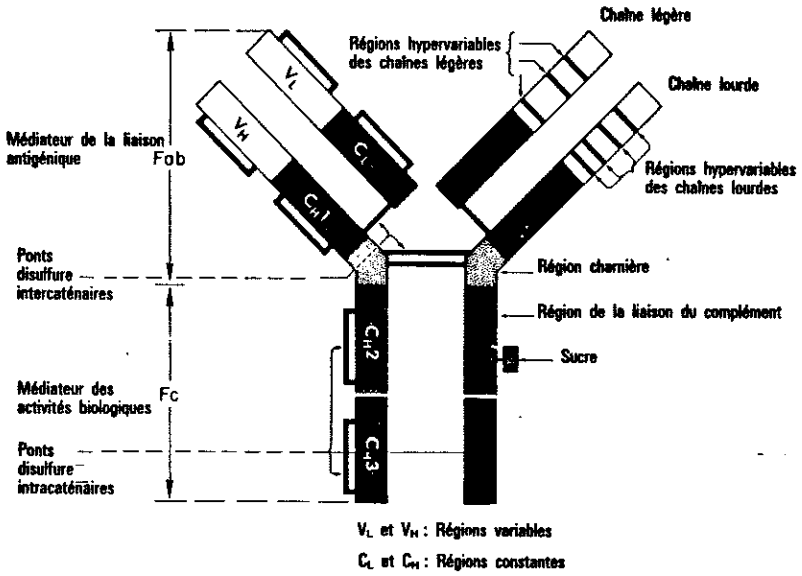
I-2-1 - Récepteur α et β

Il s'agit des récepteurs exprimés par la majorité des lymphocytes T.

Ils sont composés de 2 chaînes polypeptidiques α et β reliées par un pont disulfure. Ce récepteur est ancré dans la membrane par son extrémité carboxy-terminale. Comme dans le cas des immmunoglobulines, les chaînes sont reliées par des ponts disulfures inter et intra-caténaires. Elles sont constituées :

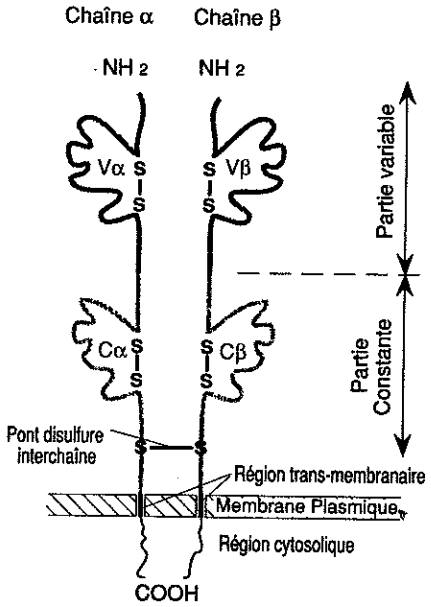
- d'une partie variable (à l'extrémité amino-terminale), spécifique de chaque récepteur.
- d'une partie constante.

[cf. schéma n°2, Kaplan (9)].



Structure des Immunoglobulines

Schéma n° 1



Structure du récepteur du lymphocyte T

Schéma n° 2

I-2-2 - Récepteur γet δ

Une faible proportion de cellules T périphériques (10 %) n'exprimant pas le récepteur α et β, exprime un autre type de récepteur composé par l'assemblage de 2 chaînes γ et δ unies ou non par un pont disulfure.

I-3 - Organisation au niveau du génome (21)

Les gènes codant pour les Ig et le Rec T présentent également un modèle d'organisation générale assez proche.

Il existe plusieurs familles de gènes situées sur des chromosomes différents, codant pour :

- les chaînes lourdes d'Ig : chromosome 14q32.
- la chaîne légère lambda : chromosome 22q11.
- la chaîne légère kappa : chromosome 2p11.

- les chaînes α du Rec T : chromosome 14q11.
- les chaînes β du Rec T : chromosome 7q35.
- les chaînes γ du Rec T : chromosome 7p15.
- les chaînes δ du Rec T : chromosome 14q11.

Chacun des gènes (codant pour les Ig ou le Rec T) présente une structure germinale non fonctionnelle caractérisée par de multiples segments géniques codant (exons classiques) séparés les uns des autres par des séquences non codantes (introns).

Ces différents gènes, initialement "morcelés" dans les cellules souches indifférenciées, vont être accolés par les réarrangements : il y a excision du matériel génétique intercalaire.

Ces phénomènes aboutissent à des gènes fonctionnels permettant la synthèse des molécules d'Ig ou de Rec T.

Nous détaillerons l'exemple le plus simple : le réarrangement des gènes de la chaîne kappa des Ig et ne décrirons que les particularités des autres réarrangements.

I-3-1 - Les différents types de réarrangements (9, 12, 15, 19, 20, 21)

I-3-1-1 - Réarrangement des gènes de la chaîne kappa des Ig

La synthèse d'une chaîne kappa nécessite l'intervention de 3 gènes :

- un gène V (variable).
- un gène J (jonction).
- un gène C (constant).

Il existe 300 gènes V, 5 gènes J , un seul gène C.

La formation d'un gène kappa fonctionnel résulte d'une recombinaison entre un gène V et un gène J : ces deux gènes pris au hasard, sont mis bout à bout.

Par ce mécanisme, le gène V est rapproché du gène C. Le complexe V-J est séparé de C par un court intron qui sera éliminé par épissage lors de la maturation de l'ARN messager.

[cf. schéma n° 3, Kaplan (9)].

La recombinaison V-J s'explique par l'existence de séquences complémentaires : le complexe *heptamère-nonamère.*

En 3' du gène V : la séquence heptamère est séparée de la séquence nonamère par 23 ± 1 paires de bases.

En 5' du gène J : l'heptamère est séparé du nonamère par 12 ± paires de bases.

Au cours de la recombinaison, les 2 séquences heptamères, complémentaires deux à deux, se mettent en regard l'une de l'autre et s'apparient. De même pour les séquences nonamères : il y a formation d'une "boucle".

Une recombinase qui reconnait le motif assure la ligature des gènes V et J. La nature de cette enzyme n'est pas encore parfaitement connue.

[cf. schéma n° 4, Kaplan (9)].

I-3-1-2 - Réarrangement des gènes de la chaîne lambda des Ig

Les mécanismes sont identiques mais le nombre de gènes ainsi que l'organisation des gènes J sont différents : en effet, il y a 6 gènes C et chacun d'entre eux est précédé d'un gène J qui lui est propre.

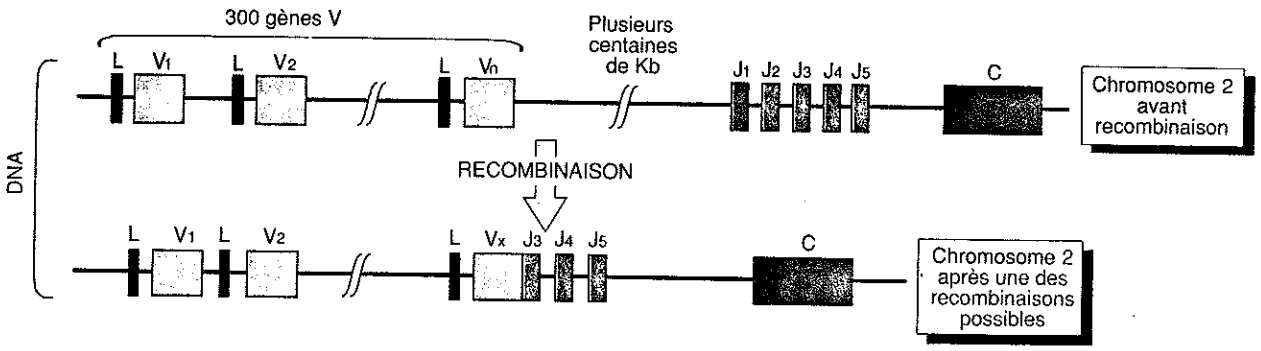
La recombinaison se fait au hasard entre un gène V et un gène J appartenant à l'un des 6 complexes J-C.

[cf. schéma n° 5, Kaplan (9)].

I-3-1-3 - Réarrangement des gènes de la chaîne lourde des Ig

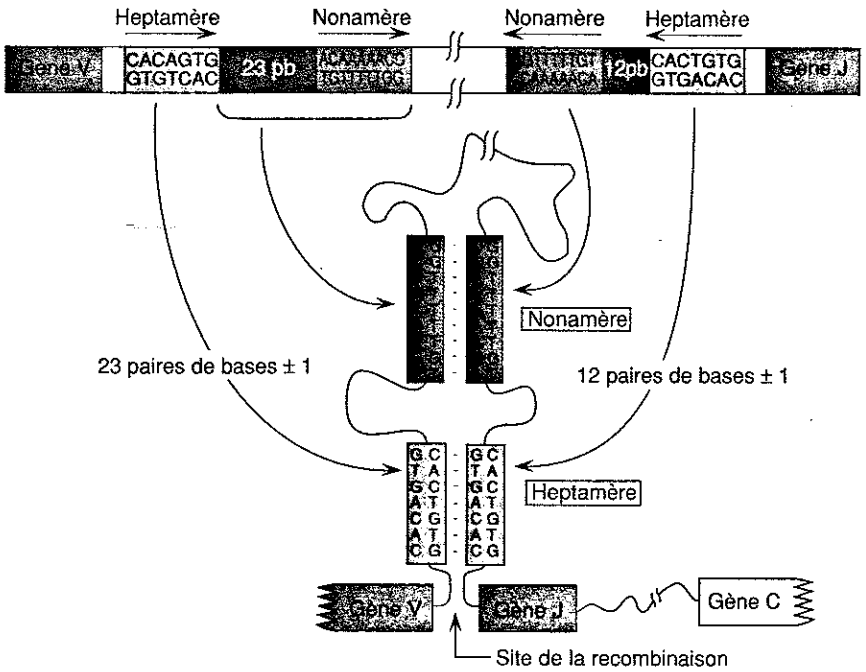
La recombinaison est plus complexe que celle des chaînes kappa :

- il existe un groupe de gènes supplémentaires, les gènes D (diversité) situés entre les gènes V et les gènes J.
- les gènes C sont organisés de manière différente de celle décrite précédemment.



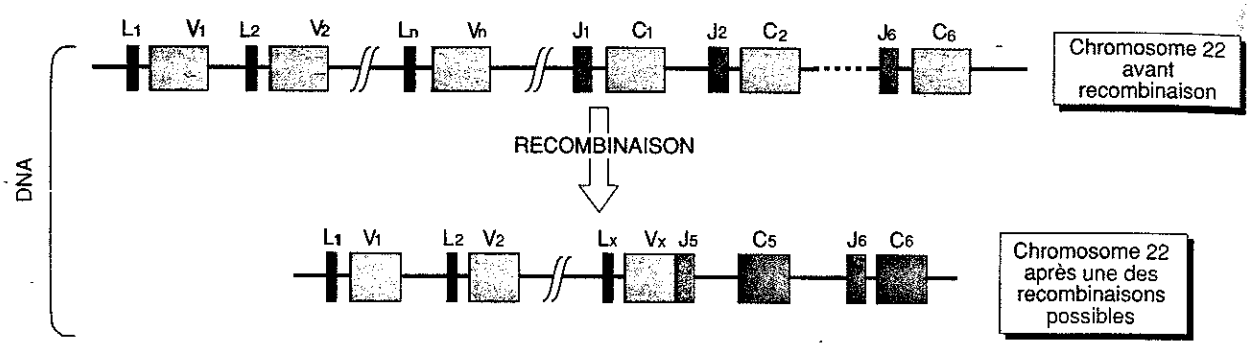
Organisation des gènes des chaînes kappa et mécanisme des recombinaisons

Schéma n° 3



Mécanisme de la recombinaison et signaux du DNA impliqués

Schéma n° 4



Organisation des gènes des chaînes lambda et mécanisme des recombinaisons

Schéma n° 5

Il y a deux recombinaisons successives :

- d'abord entre un gène D et un gène J.
- puis entre un gène V et le complexe D-J formé.

[cf. schéma n° 6, Kaplan (9)].

I-3-1-4 - Le modèle du Rec T

L'organisation des gènes est très proche de ce qui a été observé pour les immunoglobulines :

- les chaînes α et γ comportent les gènes V, J, C.
- les chaînes β comportent les gènes D en plus.

Au niveau des chaînes α et γ, la recombinaison est unique entre les gènes V et J. Par contre, au niveau des chaînes β comme pour les chaînes lourdes, il y a 2 recombinaisons.

Les différents mécanismes décrits permettent de comprendre la grande **diversité** des molécules d'Ig et du Rec T. Cette diversité est due :

- en grande partie à la multitude des recombinaisons possibles entre les différents fragments géniques.
- à la possibilité d'insertion mais également de délétion dans les zones d'accolements V-J de quelques nucléotides.
- à la possibilité de mutations au niveau des gènes V.

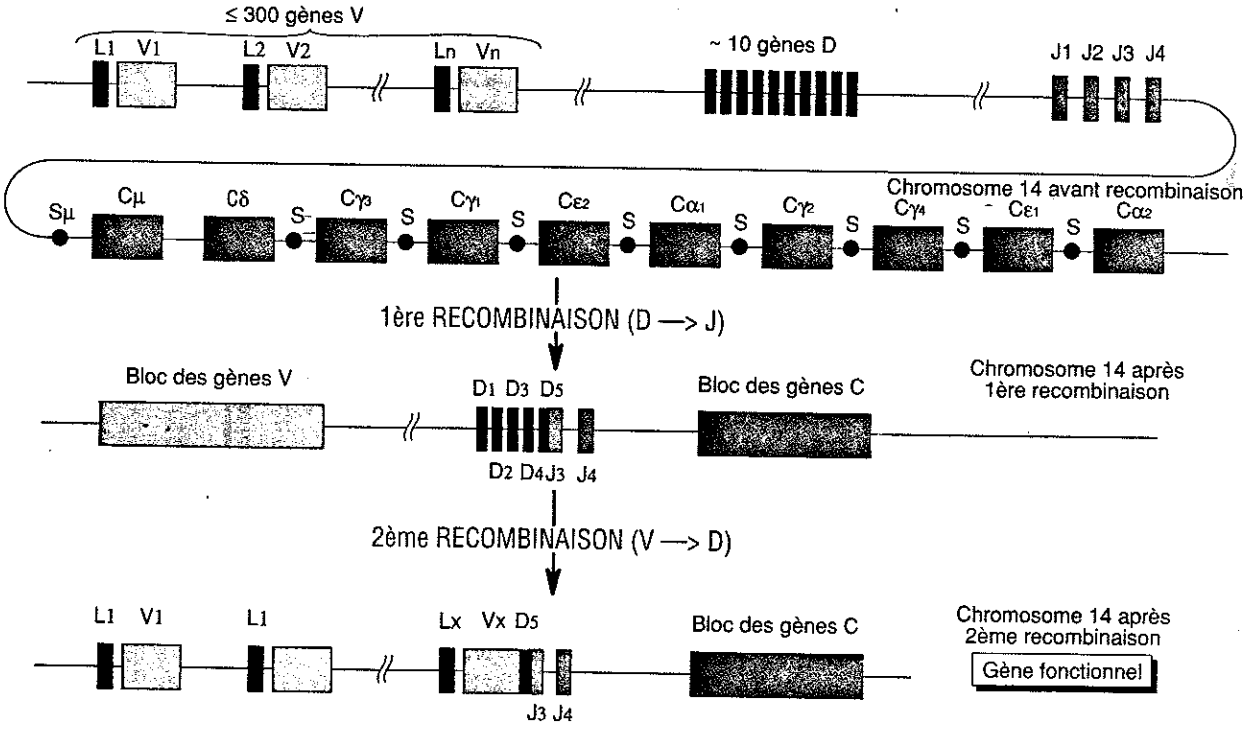
I-4 - Chronologie des événements (9, 21)

I-4-1 - Au niveau chromosomique

Un premier réarrangement survient sur l'un des allèles du chromosome concerné :

- S'il est fonctionnel, l'autre allèle n'est pas touché et reste en configuration germinale.
- S'il n'est pas fonctionnel, un second réarrangement est tenté sur l'autre allèle.
- Si ce second réarrangement n'est pas fonctionnel, la cellule est éliminée.

Mais une étude allemande récente (14 bis) a montré que le premier réarrangement non fonctionnel n'est pas définitif. Une recombinaison nouvelle est possible de part l'existence d'un équivalent de la séquence heptamère-nonamère.



Organisation des gènes des chaînes lourdes et mécanisme des recombinaisons

Schéma n° 6

I-4-2 - Au niveau des gènes des immunoglobulines

Au sein du lymphocyte pré-B, les gènes des chaînes lourdes sont d'abord réarrangés. La chaîne correspondante est synthetisée.

La recombinaison des gènes de la chaîne légère est ensuite effectuée, ce qui permet la synthèse d'immunoglobulines complètes.

I-4-3 - Au niveau des gènes du récepteur T

Le premier événement est la recombinaison entre les gènes D et J des chaînes β. Dans le même temps, les gènes des chaînes γ sont réarrangés. Puis a lieu la recombinaison V et D-J des chaînes β. Sitôt réarrangées, les chaînes γ et β sont transcrites.

Les gènes α ne sont recombinés qu'en dernier. Pour les chaînes δ, il semblerait qu'elles deviennent fonctionnelles en même temps que les chaînes γ.

I-5 - Le diagnostic de monoclonalité (15, 21)

Nous venons donc de voir que les phénomènes de réarrangements des Ig et du Rec T sont des processus physiologiques. Ils témoignent de l'entrée d'une cellule immature dans la voie de différenciation lymphoïde (B ou T). Le clone engendré par la suite, est porteur d'un réarrangement génique identique à celui de la cellule mère.

Dans une **population lymphoïde polyclonale**, du fait du grand nombre possible de combinaisons V D J, les clones sont indénombrables, en quantité restreinte et sensiblement équivalente.

Chaque clone est caractérisé par un réarrangement spécifique mais aucun ne concernera un nombre de cellules suffisant pour être détectable par Southern-blot : en effet, chacun d'eux représente moins de 1% de la population cellulaire totale alors que le seuil de sensibilité de la technique est de 2 à 5 % .

Au cours d'un **processus leucémique**, une cellule lymphoïde, bloquée à un certain stade de sa maturation, prolifère et donne naissance à un clone qui devient largement majoritaire (au moins 2 à 5 % de la population cellulaire). Il sera alors visible au Southern-blot, signant la monoclonalité de la prolifération.

I-6 - Réarrangements et leucémies aiguës lymphoblastiques (16)

I-6-1 - Réarrangements des gènes des Ig

Comme le réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig (IgH) survient précocement au cours de la différenciation lymphoïde (stade pre

B), il devient un marqueur de la lignée impliquée dans les proliférations malignes immatures. En effet, dans l'immense majorité des proliférations aiguës de la lignée B, un réarrangement des gènes IgH est retrouvé.

Mais les réarrangements des gènes IgH ne sont pas strictement spécifiques de la lignée B : des réarrangements dits **"illégitimes"** ou **"infidèles"** ont été observés dans les LAL T typiques et quelques cas de leucémies aiguës myéloblastiques.

Le réarrangement des gènes des chaînes légères des Ig (IgL) prend place à des étapes plus tardives de la différenciation B, et se retrouve moins fréquemment dans les LAL B.

I-6-2 - Réarrangements des gènes du Rec T

I-6-2-1 - Récepteur α et β

A l'heure actuelle, peu d'informations concernent le réarrangement des gènes du Rec T α.

Le réarrangement des gènes du Rec T β a lieu dans l'immense majorité des LAL T . Dans les rares cas où les gènes du Rec T β ne sont pas réarrangés, l'appartenance à la lignée T des cellules leucémiques est discutable.

Mais, des réarrangements "illégitimes" des gènes du Rec T α et β ont été décrits dans les LAL de la lignée B.

I-6-2-2 - Récepteur γ et δ

Dans les LAL T les gènes du Rec T γ sont réarrangés aussi souvent que les gènes du Rec T β. Il en est de même pour les gènes du Rec T δ.

Les réarrangements illégitimes des gènes Rec T γ sont fréquents dans les LAL B.

Les gènes du Rec T δ sont souvent réarrangés dans les proliférations immatures de la lignée B.

II - MARQUEURS CELLULAIRES DES LIGNEES LYMPHOIDES

Au cours de leur différenciation et de leur maturation, les cellules lymphoïdes acquièrent à leur surface des molécules qui constituent des marqueurs cellulaires. Elles sont étudiées par des techniques immunologiques et analysées par des techniques de cytométrie en flux. Ces molécules reconnues par des anticorps monoclonaux ont été regroupées en classes de différenciation ou C D (8).

II-1 - Différenciation lymphoïde B

Elle est caractérisée par 3 éléments :

- au niveau moléculaire, réarrangements des chaînes lourdes et légères des Ig.
- acquisition des stuctures de surface caractérisant les cellules lymphoïdes comme l'antigène CD19 puis CD20 qui persisteront sur toutes les cellules de la lignée B à l'exception des plasmocytes.
- acquisition d'immunoglobulines intracytoplasmiques puis de surface (Ig M ou D).

L'ordre d'apparition des marqueurs dans la maturation lymphoïde B est la suivante :

CD34 - DR - 19 - 10 - 9 - 24 - 20 - Ig intracytoplasmique - Ig de surface →

Une classification est proposée :

- LAL indifférenciée DR+
  CD34+
  CD10 -
  CD19 -
- LAL très immature, à orientation B : CD19+
- LAL pré-B : CD10+
- LAL B : CD20+

II-2 - Différenciation lymphoïde T

Elle est marquée par les éléments suivants :

- réarrangements des gènes du Rec T.
- acquisition de structures de surface qui persisteront sur l'ensemble des cellules T : CD2, CD5, CD3.
- différenciation terminale en deux sous-populations : lymphocyte auxiliaire (CD4+) et lymphocyte suppresseur(CD8+).

PATIENTS ETUDIES

Le groupe de patients comporte 11 sujets atteints de leucémie aiguë (LA). Les critères de sélection sont les suivants :

- *il s'agit de leucémies aiguës lymphoblastiques,*
- *diagnostiquées (hormis le cas JOL) en 1992 et début 1993, dans le service d'Hématologie Clinique, CHR de Haut-Lévêque (Professeur Broustet).*
- *les patients sont étudiés au moment du diagnostic.*
- *l'ADN extrait des cellules leucoblastiques doit être en quantité suffisante pour effectuer une analyse en biologie moléculaire.*
- *les patients doivent être inclus dans un protocole thérapeutique.*
- *les autres critères de cytologie et d'immunophénotypage sont décrits dans les tableaux I, II et III.*

Le patient JOL est répertorié deux fois :

- *JOL 1 : LA au diagnostic (1990)*
- *JOL 3 : LA en rechute (1993).*

Patient	Age	Date de diagnostic	Cytologie % de leucoblastes	Immunophénotypage			Diagnostic
CHA	37 ans	3/09/92	***MO :*** 92 % leucoblastes	DR : 95,5 % CD19 : 96 % 10 : 96 % 9 : 86,5 % 24 : 95 % 20 : 1 %	CD2 : 1 % 5 : 1 % 7 : 0,5 %	CD34 : 88 % 33 : 1 % 13 : 1 %	LAL pré B
MAU	31 ans	14/09/92	***MO :*** 98 % leucoblastes	DR : 93,5 % CD19 : 93 % 10 : 93,5 % 9 : 80 % 24 : 94 % 20: - Igs : 1,5 %	CD2 : 3 % 5 : 2,5 % 7 : 1,5 %	CD34 : 4 % 33 : 0,5 % 13 : 0	LAL pré B
BAUD	32 ans	17/04/92	***MO :*** 87 % leucoblastes	DR : 92 % CD19 : 91 % 10 : 1 % 24 : 94 %		CD34 : 86 %	LAL pré B
GRA	19 ans	28/07/92	***MO :*** > 90 % leucoblastes	DR : 92 % CD19 : 90,5 % 10 : 89 % 9 : 89,5 % 24 : 91 % 20 : 80 %	CD2 : 7 % 5 : 5,5 % 7 : 6 %	CD34 : 17 % 33 : 3 % 13 : 2 %	LAL B
LON	21 ans	18/06/92	***MO :*** > 95 % leucoblastes	DR : 89 % CD19 : 89 % 10 : 88 % 9 : 88 % 24 : 89 % 20 : 61 %	CD2 : 1,5 % 5 : 1,5 % 7 : 21,5 %	CD34 : 6 % 33 : 1 % 13 : 3 %	LAL B

MO : Moëlle osseuse.

Tableau I

Patient	Age	Date de diagnostic	Cytologie % de leucoblastes	Immunophénotypage			Diagnostic
VER	61ans	10/12/92	***MO :*** 96 % leucoblastes	DR : 20 % CD19 : 41 % 10 : - 9 : - 24 : - 20 : -	CD2 : 1 % 3 : - 5 : 1 % 7 : 78 %	CD34 : 40 % 33 : - 13 : 8 %	LA immature à orientation B
BER	17 ans	15/12/92	***MO :*** 84 % leucoblastes	DR : 93 % CD19 : 95 % 10 : 94 % 9 : 80 % 24 : 95,5 % 20 : 1 %	CD2 : 25 % 5 : 2,5 % 7 : 3 %	CD33 : 0,5 % 34 : 73 % 13 : -	LAL pré B
BAUV	36 ans	18/03/93	***MO :*** 100 % leucoblastes	DR : 89,5 % CD19 : 85,5 % 10 : 84 % 9 : 85,5 % 24 : 86,5 % 20 : 15 %	CD2 : 94,5 % 3 : 10,5 % 7 : 6 % 4 : 5,5 % 8 : 7 % 1 : 0,5 %	CD34 : 79 % 33 : - 13 : 0,5 %	LAL biphénotypique
GUI	38 ans	12/03/93	***MO :*** 100 % leucoblastes	DR : 93,5 % CD19 : 92 % 10 : 0,5 % 9 : 91,5 % 24 : 37 % 20 : 1 %	CD2 : 5 % 5 : 5,5 % 7 : 5 %	CD34 : 11 % 33 : 0,5 % 13 : 0,5 %	LAL pré B

Tableau II

Patient	Age	Date de diagnostic	Cytologie % de leucoblastes	Immunophénotypage	Diagnostic
JOL 1	38 ans	22/06/90	***MO :*** 98 % leucoblastes	DR : 93 % CD19 : 93 % 10 : 68,5 % 9 : 94,5 % 24 : 94,5 % 20 : 9 % CD2 : 2 % 5 : 2 % 7 : 2 % CD34 : 6,5 % 33 : 8 % 13 : -	LAL pré B
JOL 3	41 ans	11/02/93	***MO :*** 80 % leucoblastes	DR CD19 10 9 24 similaires au diagnostic 20 : 45 % CD34 : 90 % 33 : 90 %	LAL biphénotypique

Tableau III

MATERIEL ET METHODES D'ETUDE

I - MATERIEL

Notre étude a été effectuée sur l'ADN obtenu à partir de cellules de moëlle osseuse, prélevées sur flacon hépariné.

Les éléments nuclées sont extraits, dénombrés, aliquotés en culot sec. Ils sont conservés au congélateur à - 20°C en attendant les étapes ultérieures (cf. annexe n° 1).

II - METHODES D'ETUDE : LE SOUTHERN-BLOT

Cette technique permet de visualiser une région du génome grâce à l'utilisation combinée :

- d'enzymes de restriction.
- de sondes moléculaires radioactives, spécifiques de la région à analyser.

Nous allons examiner les étapes de cette méthode (tous les détails techniques sont exposés en annexes).

II-1 - Extraction de l' ADN

II-1-1 - Obtention de l' ADN

Les leucocytes sont traités par un mélange de :

- Solution de LGB.
- Détergent SDS.
- Solution de protéinase K.
- EDTA.

(cf. annexe n° 2).

Ce traitement permet de :

- libérer l'ADN nucléaire dans le milieu.
- digérer les protéines qui lui était associées.
- éliminer par inhibition, grâce à l'EDTA, les DNases contaminantes.

L'ADN est ensuite extrait selon le principe de la différence de solubilité entre l'ADN et les protéines contaminantes.

II-1-2 - Purification de l'ADN

Des précipitations successives permettent d'obtenir un ADN le plus purifié possible.

Dans un premier temps, l'utilisation de NaCl permet de précipiter sous forme solide toutes les protéines. L'ADN se trouve encore sous forme soluble dans la phase aqueuse surnageante.

Dans un second temps, l'ADN est récupéré sous forme solide par précipitation par l'alcool éthylique. On obtient un filament blanc appelé "méduse".

Ce précipité est :

- lavé à l'éthanol 70%, pour éliminer les traces de sels.
- séché, pour éliminer l'éthanol.

L'ADN, extrait, purifié est mis en solution dans de l'eau distillée stérile. Il peut être conservé ainsi à - 20° C.

II-1-3 - Analyse de l'ADN ainsi obtenu

☞ ***Analyse qualitative***

Elle se fait par migration sur mini-gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE 1 X. (cf. annexe n° 3) (cf. photographie n° 1).

☞ ***Analyse quantitative***

Elle est effectuée par spectrophotométrie, l'ADN absorbant fortement dans l'UV à 260 nm.

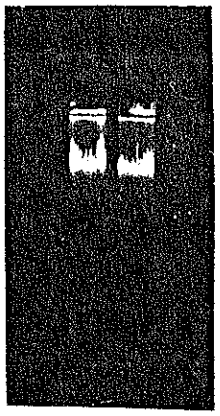
Une unité de DO correspond à une concentration de 50 µg/ml.

Une seconde lecture se fera à 280 nm : en effet les protéines, éventuellement contaminantes, absorbent aussi à 280 nm.

Le rapport R = DO 260 nm/DO 280 nm doit être compris entre 1,7 et 2 pour un ADN correctement purifié.

Ce dosage de l'ADN est important pour les étapes ultérieures :

- Si l'ADN est contaminé par des protéines ($R < 1,7$), l'action des enzymes de restriction n'est pas optimale. Dans ce cas, une seconde extraction sera nécessaire.
- Si l'ADN est trop concentré, la consistance devient visqueuse, rendant le pipetage difficile, à l'origine de nombreuses erreurs. Dans ce cas une dilution plus importante de l'ADN sera effectuée.



Photographie n° 1

Analyse qualitative de l'ADN extrait par migration sur mini-gel d'agarose.

II-2 - Digestions enzymatiques

II-2-1 - Les enzymes utilisées

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui coupent l'ADN double brin de manière définie et reproductible au niveau de séquences qui leur sont spécifiques. Elles réduisent le génome à une série de fragments caractéristiques.

Il s'agit d'enzymes de restriction de type II : elles coupent l'ADN *au niveau* de la séquence reconnue. La longueur de ces séquences est comprise entre 4 et 8 paires de bases (le plus souvent 4 ou 6). Une caractéristique est importante : les séquences reconnues sont palindromiques. La coupure s'effectue donc sur les 2 brins d'ADN, au même site.

Pour cette étude, nous allons utiliser 3 enzymes :

- Bam H I.
- Eco R I.
- Hind III.

Leurs sites de coupure au niveau des gènes IgH et du Rec T β sont représentés sur les schémas n° 7 et 8.

II-2-2 - Digestion

Chaque échantillon de 10,5 µg d'ADN est mis en présence de chaque enzyme, à raison de 5 U d'enzyme par µg d'ADN, dans un tampon spécifique de concentration 1 X. (cf. annexe n° 5).

Une vérification des coupures sur mini gel d'agarose (0,5 µg d'ADN) est nécessaire afin de s'assurer que la digestion a été correctement effectuée (cf. annexe n° 3).

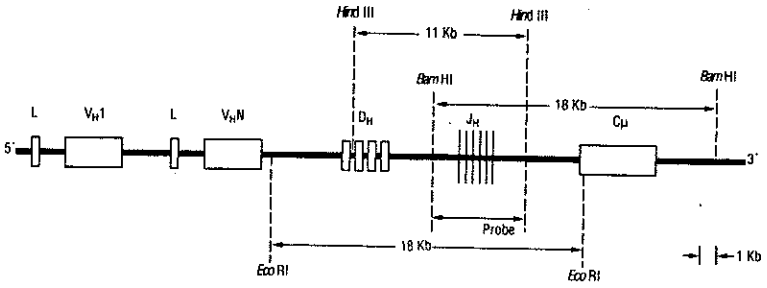
II-3 - Electrophorèse

II-3-1 - Principe

Les différents fragments d'ADN générés par digestion enzymatique sont séparés selon leur taille, par migration dans un champ électrique.

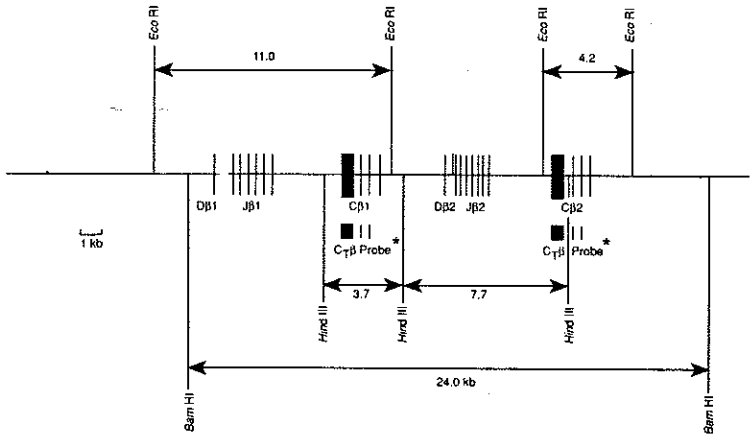
Nous utilisons un grand gel d' agarose à 0,8 % en tampon TAE 1 X. Le gel est coulé dans un moule transparent aux UV afin de suivre périodiquement la migration.

Cette visualisation est rendue possible par l'utilisation de bromure d'éthidium (bet).



Sites de restriction des enzymes
Zone d'hybridation de la sonde J H

Schéma n° 7



Sites de restriction des enzymes
Zone d'hybridation de la sonde Cβ2

Schéma n° 8

Le bet est une drogue qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques qui deviennent alors fluorescents. Pour notre étude, nous rajoutons le bet dans le bac de migration 1 heure avant la fin de la migration. Sous illumination UV, l'ADN est visualisé sous l'aspect d'un "smear" (cf. photographie n° 2).

II-3-2 - Réalisation

10 µg d'ADN coupé sont déposés dans chaque puits sous un voltage constant de 40 volts pendant 18 heures.

Un étalonnage du gel est réalisé à l'aide de marqueurs de taille connue :

- 1 µg du phage lambda, coupé par Hind III.
- 4 µg de 1 Kb ladder.

(cf. annexe n° 6), (cf. photographie n° 2).

II-4 - Transfert

C'est l'idée originale de cette technique : transférer les fragments d'ADN, présents dans le gel d'agarose, sur un support solide (ici une membrane de nylon). Le transfert est assuré par un phénomène de capillarité.

II-4-1 - Dépurinisation par l'acide chlorhydrique

Cette étape permet de casser les fragments d'ADN et faciliter le passage vertical de ces fragments du gel sur la membrane, en particulier lorsqu'ils sont de grande taille.

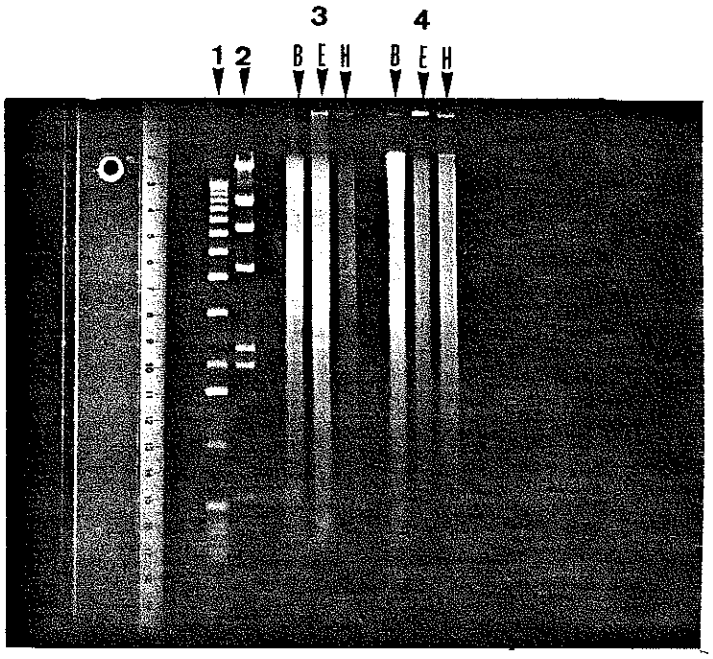
II-4-2 - Dénaturation par la soude

Elle a pour but de faire passer l'ADN sous la forme de simple brin, étape indispensable pour l'hybridation.

II-4-3 - Le transfert

L'ADN, cassé, dénaturé, est transféré facilement.

Les liaisons entre les fragments d'ADN et la membrane sont de nature covalente.



1 : 1 Kb ladder
2 : λ Hind III

B : Bam H I
E : Eco R I
H : Hind III

3 ⎤
4 ⎦ ADN de patients

Photographie n° 2

Electrophorèse sur grand gel d'agarose
Migration des marqueurs de taille et des fragments d'ADN.

II-4-4 - Neutralisation

Une fois le transfert terminé, la membrane est neutralisée (pH ramené à 7). Ceci est important car l'hybridation ne peut pas s'effectuer si la membrane est imprégnée de soude.

L'ensemble de ces opérations permet de récupérer la totalité du génome, séparé en fragments, sur une membrane solide, supportant bien les traitements nécessaires à l'hybridation (cf. annexe n° 7).

II-5 - Hybridation

II-5-1 - Les sondes utilisées

JH (1, 5, 10) : il s'agit, d'un fragment de 2,5 Kb, inséré dans l'ADN du phage M18 au niveau de 2 sites de coupures Eco R I. Cette sonde reconnait *la zone des 6 gènes J* de la chaîne lourde des immunoglobulines (cf. schéma n° 7).

CB2 (13, 18) **:** il s'agit d'un fragment de 2,1 Kb, inséré dans l'ADN du phage Mp18 au niveau de 2 sites de coupures de Sac I et Eco R I. Cette sonde reconnait *la zone Cβ1* du gène du Rec T β mais ausssi *la zone Cβ2* presque identique (cf. schéma n° 8).

II-5-2 - Marquage de la sonde

II-5-2-1 - Préparation de la sonde

Nous utilisons la technique du multi-amorcage au hasard (9) : après séparation des 2 brins de la sonde par chauffage, suivi d'un refroidissement brutal, on ajoute un "cocktail" d'oligonucléotides synthétiques dont les séquences correspondent à toutes celles possibles : quelques unes s'hybrideront obligatoirement avec la sonde. Ces petits oligonucléotides hybridés servent d'amorce pour la fraction kleenow de l'ADN-polymérase qui synthétise le second brin complémentaire de la matrice. Puis on rajoute les dXTP dont un seul (la cytosine) est marqué au P 32. Le brin ainsi néoformé est radioactif (cf. annexe n° 8), [cf. schéma n° 9, Kaplan (9)].

II-5-2-2 - Vérification de la qualité du marquage

Elle se fait par passage de la sonde marquée sur une colonne de résine G 50. Les nucléotides non incorporés vont être piégés par cette résine : c'est une étape de purification de la sonde.

Une évaluation de la radioactivité, avant et après passage sur la colonne, permet d'apprécier l'activité spécifique de la sonde (cf. annexe n° 9).

II-5-3 - L' hybridation

II-5-3-1 - Pré-hybridation

☞ *Principe*

L'ADN transféré n'a saturé qu'une faible partie des sites de fixation potentiels de la membrane. Si la sonde radioactive était apportée directement, elle se fixerait de manière covalente sur tous ces sites et la membrane entière serait radioactive. La pré-hybridation consiste à saturer tous ces sites potentiels par de l'ADN hétérologue.

☞ *Réalisation*

La membrane est mis dans un milieu de pré-hybridation, qui servira plus tard de milieu d'hybridation. Ce milieu contient :

- Sulfate de dextran.
- NaCl.
- SDS.
- ADN de sperme de saumon.

Le dextran favorise la spécificité de l'appariement par augmentation de la concentration locale de la sonde au niveau des fragments d'ADN. L'hybridation se fait à 65°C. La température d'hybridation pourrait être rabaissée à 42°C par utilisation de formamide.

Le NaCl favorise, par modification de la force ionique, la vitesse de réassociation.

L'ADN de sperme de saumon sature les sites non spécifiques de la membrane.

Le SDS, agent tensioactif, renforce l'action de l'ADN de sperme de saumon.

Le bruit de fond final dépend de cette étape (cf. annexe n° 10).

II-5-3-2 - L' hybridation

La sonde est :

- dénaturée par la chaleur.
- rajoutée au milieu de pré-hybridation pendant une nuit (cf. annexe n° 11).

II-5-4- Les lavages

Cette étape est fondamentale car la spécificité et la stabilité des hybrides dépend de la composition saline des milieux de lavages : on parle de **stringence.** Une solution est d'autant plus stringente qu'elle est plus diluée, elle déstabilise l'appariement sonde-fragment d'ADN.

Nous procédons de manière progressive : la stringence est augmentée au fur et à mesure des lavages.

☞ *Les premiers lavages* sont à une concentration de 2 X SSC : cette faible stringence de départ associée à une élévation de la température (65°C) déstabilise les hybridations non spécifiques sans altérer les appariements spécifiques.

☞ *Les derniers lavages* de forte stringence (0,1 X SSC) permettent d'éliminer les dernières hybridations non spécifiques (cf. annexe n° 12).

II-6 - Autoradiographie

Les hybrides sont repérés par autoradiographie en présence d'écrans renforcateurs. La portion d'ADN hybridée avec la sonde est visualisée sous la forme d'une ou plusieurs bandes .

(cf. annexe n° 13).

II-7 - Deshybridation

Cette étape éventuelle permettra une nouvelle utilisation de la membrane avec une autre sonde. Effectuée en milieu alcalin à 65°C, suivie d'une neutralisation par un tampon acide, il y a destruction des liaisons hydrogènes établies entre la sonde et les fragments d'ADN.

(cf. annexe n° 14).

RESULTATS

I - BREVIAIRE POUR UNE INTERPRETATION CORRECTE

I-1 - Taille des bandes germinales

Elles correspondent (cf. Rappels), à la configuration de base de l'ADN non soumis aux remaniements.

Sonde JH :	. Bam H I :	18 Kb	
	. Eco R I :	18 Kb	(cf. schéma n° 7)
	. Hind III :	11 Kb	
Sonde Cβ2 :	. Bam H I :	24 Kb	
	. Eco R I :	11Kb	
		4,2 Kb	
		(partielle : 8,5 Kb)	(cf. schéma n° 8)
	. Hind III :	7,7 Kb	
		3,7 Kb	
		(partielle : 11 Kb)	

I-2 - Analyse des différents Southern-blots

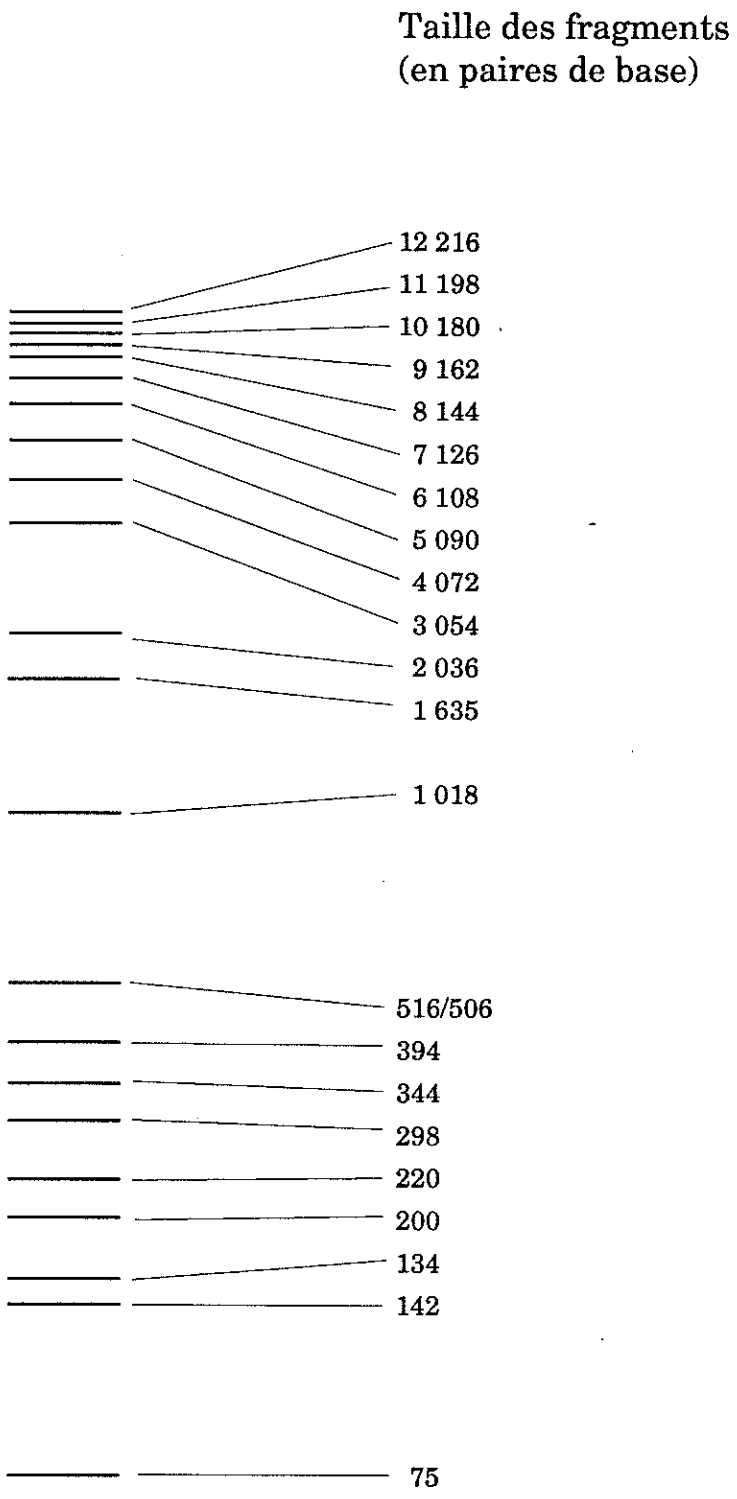
Pour étudier les réarrangements, on utilise des sondes qui décèlent les fragments de restriction en configuration germinale (cf. schémas n° 7 et 8). Un réarrangement dans la zone correspondant à la zone d'hybridation de la sonde se matérialise par l'apparition de bandes réarrangées.

Pour interpréter un Southern-blot, à partir des films d'auto-radiographie obtenus, il s'agit de situer :

- les bandes germinales.
- les bandes réarrangées.

Nous avons vu (cf. Matériel et Méthodes), qu'une fois l'électrophorèse sur grand gel terminée, une photographie sous illumination U V était prise. Elle permet de :

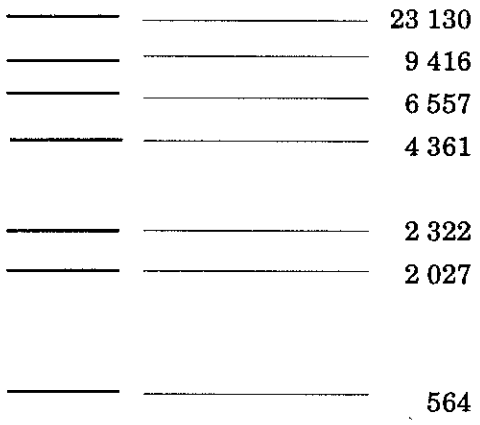
- visualiser les bandes des marqueurs de taille (dont le profil est connu) (cf. schémas n° 10 et 11).
- apprécier la qualité de la digestion enzymatique de l'ADN (cf. photographie n° 2).



Bandes de références du marqueur 1 Kb ladder

Schéma n° 10

Taille des fragments
(en paires de base)



Bandes de références du marqueur λ Hind III

Schéma n° 11

Sur cette photographie, nous mesurons la distance parcourue par les différents fragments des marqueurs, ce qui nous permet d'établir la courbe de correspondance : distance parcourue (exprimée en cm) en fonction de la taille du fragment (exprimée en paires de bases).

Sur cette courbe, nous rapportons la distance des bandes par rapport aux puits de dépôt. Ainsi la taille de chaque bande est connue.

Toute bande qui ne correspond pas en taille à celle des bandes germinales est dite réarrangée.

I-3 - Notions permettant l'analyse de nos résultats

I-3-1 - En théorie

Pour affirmer qu'il y a réarrangement, les bandes surnuméraires doivent être présentes au moins au niveau de 2 enzymes pour éviter les problèmes dus au polymorphismes de restriction.

I-3-2 - En pratique

Cette notion dépend des enzymes utilisées :

- Bam H I est une enzyme dite informative. Toute bande supplémentaire à son niveau, permet d'affirmer le réarrangement.
- Il en est de même pour Eco R I.
- Par contre pour Hind III, une bande réarrangée à ce niveau ne suffit pas toujours pour affirmer le réarrangement. L'interprétation se fait le plus souvent en fonction de la nature des bandes détectées à l'autoradiographie et des autres enzymes.

I-3-3 - Les bandes partielles

Il s'agit de bandes de taille connue, différentes des bandes germinales. Elles ne sont pas toujours présentes et correspondent à une modification du site de reconnaissance sur l'ADN de certaines enzymes.

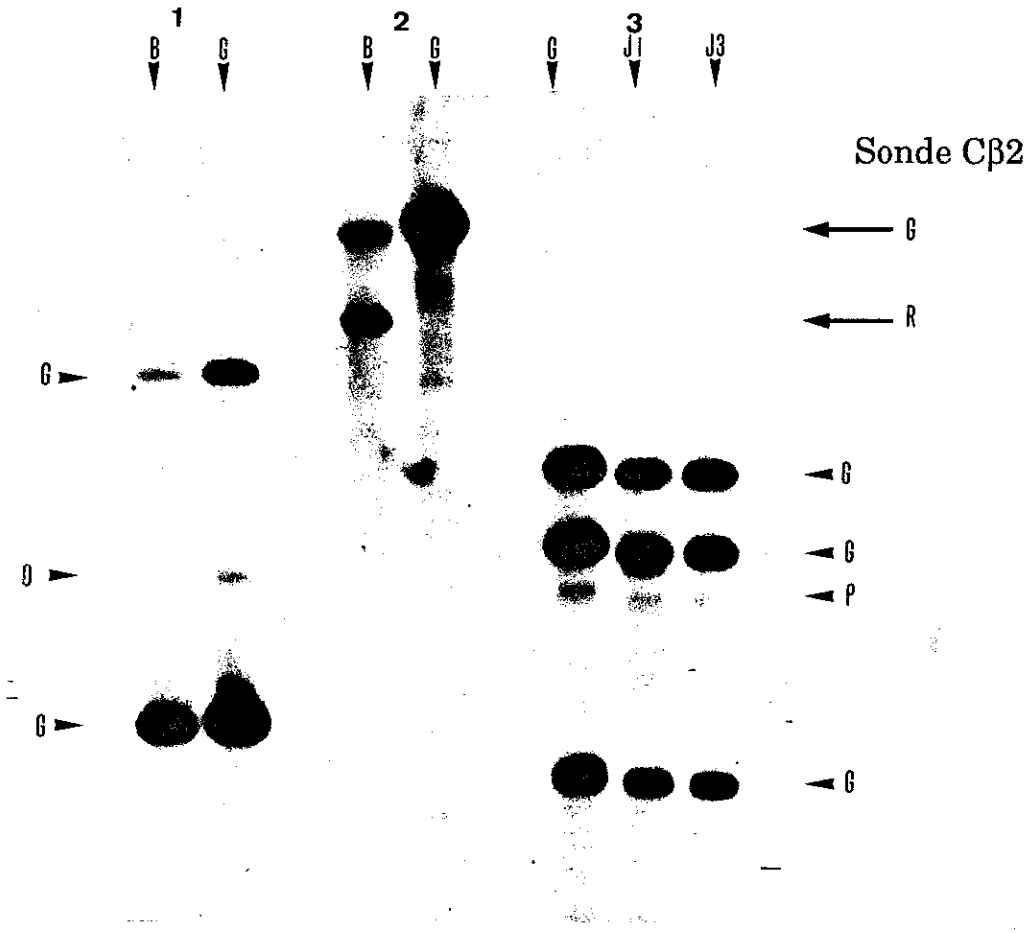
II - PRESENTATION DES RESULTATS

II-1 - Illustration par quelques autoradiographies caractéristiques

(cf. photographies n° 3, 4, 5 et 6).

Photographie n° 3

R : Réarrangée
G : Germinale
P : Partielle
O : Oligoclone
B : BAUV
G : GUI

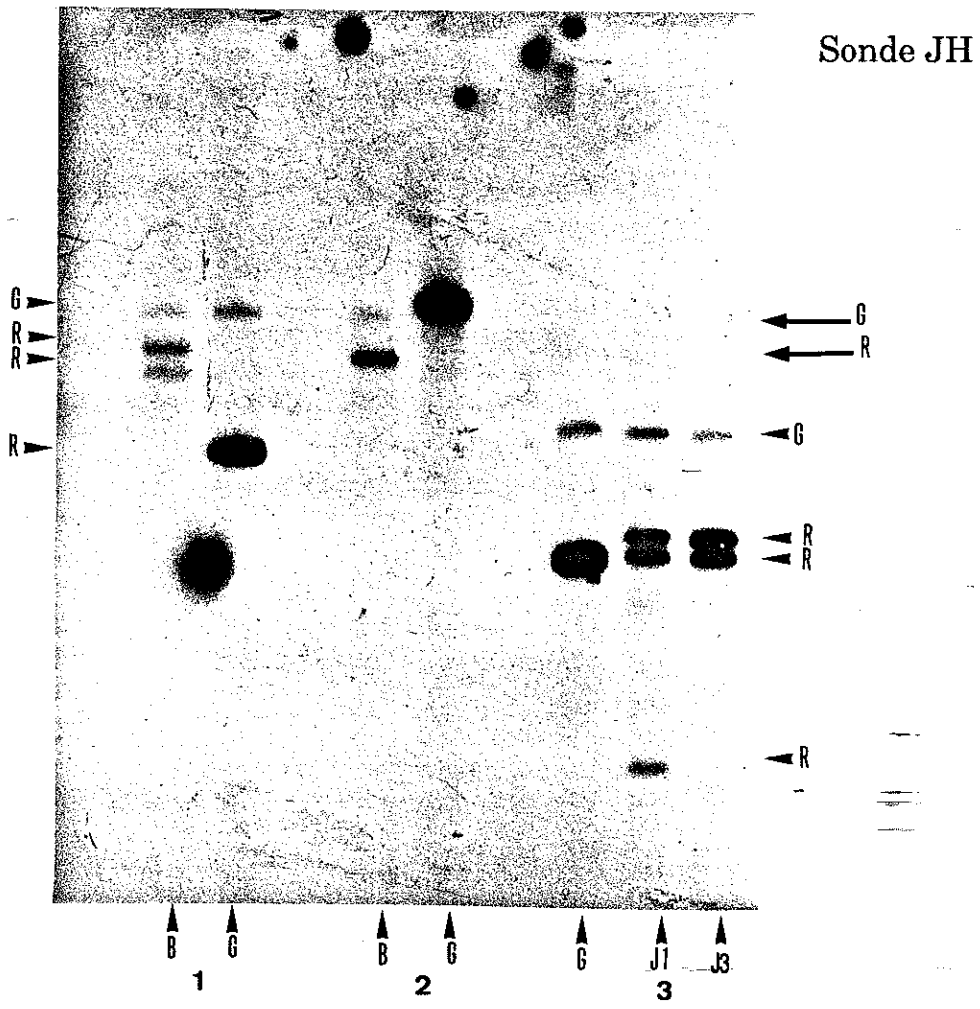


Localisation des bandes germinales et réarrangées.

J1 : JOL 1
J3 : JOL 3

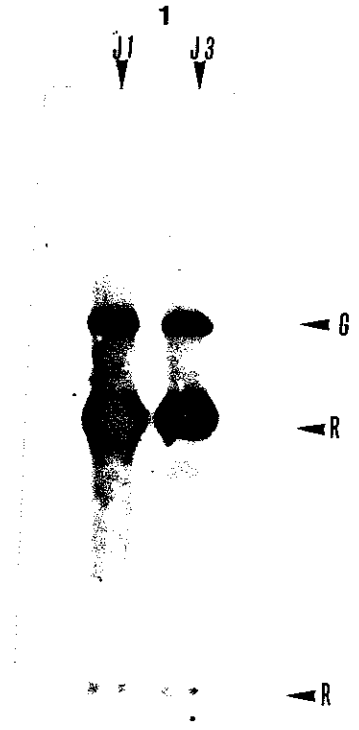
Photographie n° 4

1 : Eco R I
2 : Bam H I
3 : Hind III



Sonde Cβ2

Photographie n° 5



Sonde JH

Photographie n° 6

Localisation des bandes germinales et réarrangées.

G : Germinale
R : Réarrangée
1 : Eco R I
P : Partielle

J1 : JOL 1
J3 : JOL 3

II-2 - Résultats (cf. tableaux IV et V)

Pour les différents cas nous avons indiqué :

- la présence ou non de bandes germinales.
- la présence éventuelle de bandes partielles.
- le nombre de bande réarrangées.

Sur 11 patients :

- 11 sont réarrangés en JH.
- 8 sont réarrangés en Cβ2.

- 8 sont réarrangés en JH et Cβ2.
- 3 ne sont réarrangés qu'avec JH.

4 patients seulement présentent le même nombre de bandes réarrangées entre les différentes enzymes (il s'agit toujours d'une seule bande). Les 7 autres présentent des discordances complètes.

Sonde JH

Patient	Bam H I	Eco R I	Hind III	
BER	1G 1R	1G 3R	1G 2R	®
VER	1G 1R	1G 1R	1G 1R	®
MAU	1G 1R	1G 1R	1G	®
CHA	1G 1R	1G 2R	1G	®
LON	1G 1R	1G 2R	NF	®
GRA	1G 1R	1G 2R	NF	®
BAUD	1G 1R	1G 2R	NF	®
BAUV	1G 1R	1G 2R	NF	®
GUI	1G	1G 1R	1G 1R	®
JOL 1	1G 1R	1G 2R	1G 3R	®
JOL 3	1G 1R	1G 2R	1G 2R	®

® : réarrangement
R : réarrangée

G : germinale

NF : non fait (par manque de matériel)

Tableau IV

	Cβ2			
Patient	**BAMHI**	**ECORI**	**HindIII**	
BER	1G 1R	2G	3G	®
VER	1G 1R	2G	3G	®
MAU	1G	2G	3G	-
CHA	1G	2G 1P	3G	-
LON	1G 1R	2G 1R	NF	®
GRA	1G	2G 1P 1R	NF	®
BAUD	1G 1R	2G 1P	NF	®
BAUV	1G 1R	2G	NF	®
GUI	1G	2G	3G 1P	-
JOL 1	NF	2G 2R	3G 1P	®
JOL 3	NF	2G 2R	3G 1P	®

® : réarrangement P : partielle G : germinale NF : non fait (par manque de matériel)
R : réarrangée

Tableau V

INTERPRETATION - DISCUSSION

I - REARRANGEMENTS MONO OU BIALLELIQUES

Dans le chapitre rappels, nous avons vu que le réarrangement pouvait avoir lieu sur l'un ou les deux allèles d'un chromosome. Ainsi au niveau du Southern-blot :

- un réarrangement sur un allèle se traduit par la présence de la bande germinale (correspondant à l'allèle non réarrangé) et d'une bande surnuméraire.
- un réarrangement sur les 2 allèles d'un même chromosome se traduit par la disparition de la bande germinale avec la présence de bandes surnuméraires.

Les 11 cas étudiés ont conservé les bandes germinales pour les 3 enzymes de restriction : les réarrangements sont monoalléliques.

Les diverses publications (6, 14, 20) mentionnent le caractère mono ou biallélique des réarrangements, sans apporter d'interprétation.

II - ANALYSE DES DIFFERENTS CLONES

II-1 - Clones multiples

Théoriquement, à chaque bande réarrangée correspond l'existence d'un clone. Prenons l'exemple de VER : pour chaque enzyme il y a une bande réarrangée donc un seul clone est présent.

Ainsi, nous pourrions penser que plusieurs bandes surnuméraires correspondent à autant de clones de cellules lymphoïdes réarrangées.

Mais, prenons l'exemple de BER : en sonde JH, pour Bam H I, il existe 1 bande réarrangée (donc 1 clone), en Eco R I, il en existe 3 (donc 3 clones) : ces 2 données sont discordantes et aucune interprétation n'est possible.

Il semblerait donc difficile d'utiliser le Southern-blot pour apprécier la détection et l'évolution des différents clones.

II-2 - Le problème des oligoclones

La présence d'une bande en autoradiographie qu'elle soit germinale ou réarrangée se traduit par un trait net plus ou moins épais. Aucun problème d'interprétation ne se pose.

Mais parfois la lecture des autoradiographies devient difficile du fait de la présence de bandes de très faible intensité. On parle alors d'oligoclones. Dans notre étude nous avons été confrontés plusieurs fois à ce problème.

Quand ces bandes se trouvent au niveau attendu d'une bande germinale, nous les considérons comme germinales.

Si par contre ces bandes sont surnuméraires, plusieurs questions se posent :

- est-ce une digestion partielle de l'enzyme ?
- est-ce une évolution du clone majoritaire ?
- s'agit-il de l'émergence d'une nouvelle population ?
- est-ce un artefact ?

Pour une interprétation correcte :

- une exposition prolongée en autoradiographie (48 h à 15 j), permet parfois d'accentuer l'intensité de cette bande, et ainsi éliminer un artefact.
- les coupures enzymatiques peuvent être renouvelées pour éliminer les digestions partielles.

La littérature (4, 6, 11, 14, 16, 23) ne mentionne pas ce problème et ne s'attarde que sur les bandes évidentes.

II-3 - Réarrangements illégitimes

Nous les analyserons en fonction de l'immunophénotypage. Le patient JOL est traité à part.

6 cas (BAUD, CHA, MAU, BER, GUI, JOL 1) sur les 11 cas de notre étude, sont des leucémies aiguës, bloquées au stade pré B de la différenciation lymphoïde (CD10 + sauf BAUD). 3 patients (BAUD, BER, JOL 1) présentent un réarrangement pour les gènes IgH et pour les gènes du Rec T β.

1 cas (VER) sur 11 est au stade indifférencié (DR+, CD34+, CD7+) mais à orientation B (CD19+) présente aussi un double réarrangement (JH et Cβ2).

Ce phénomène de réarrangement illégitime est connu. Toutes les études (4, 8bis, 10, 13, 14, 15, 19) faites à ce sujet évaluent à environ 30 % la proportion de ces réarrangements dans les LAL B. Pour notre étude, le pourcentage est plus élevé (73 %), mais notre série ne permet pas d'études statistiques.

Une hypothèse semble retenir l'attention de certains auteurs (4, 6, 10, 13, 14, 19, 21) : les recombinaisons illégitimes ont lieu au niveau de cellules immatures de la différenciation B (exprimant ou non le CD10, mais jamais le CD20). Ces observations les ont amenés à penser que ces réarrangements étaient liés à l'étape d'excision de la boucle par une recombinase de haute activité, commune aux lignées B et T. Cette enzyme n'agit qu'à l'occasion d'un changement de structure chromatinienne qui est, lui, spécifique du type cellulaire.

L'équipe de Sigaux (14) va plus loin dans cette hypothèse : les protéines liant l'ADN (histones) rendraient les séquences heptamères-nonamères (sites de reconnaissance) plus accessibles aux différents acteurs de la recombinaison au stade pré B.

Mais, l'équipe japonaise de Nosaka (13) a mis en évidence une proportion plus importante de réarrangements infidèles au niveau des LAL B, stade B (CD20+) qu'au stade pré B. Leur explication est que la chromatine serait alors plus accessible à la recombinase commune.

Dans notre étude, 2 cas seulement sont au stade B (GRA, LON). Ils présentent tous les deux des réarrangements illégitimes.

II-4 - Cas particulier : le cas JOL

☞ *Au diagnostic*

A l'immunophénotypage, ce patient présente les marqueurs caractéristiques de la lignée B au stade pré B.

Le Southern-blot montre un double réarrangement au niveau des gènes IgH et des gènes du Rec T β.

☞ *A la rechute*

A l'immunophénotypage, les marqueurs du diagnostic sont conservés mais des marqueurs supplémentaires apparaissent :

- CD20 (marqueur de maturité de la lignée B).
- CD34 (marqueur d'immaturité).
- CD33 (marqueur spécifique de la lignée myéloïde).

Cette leucémie devient biphénotypique ou biclonale (myéloïde et lymphoïde).

Au niveau du Southern-blot, les bandes restent identiques à celles du diagnostic pour les gènes du Rec T β. Par contre, pour les gènes IgH, il y a modification du profil au niveau de l'enzyme Hind III, signant un réarrangement différent.

Comme il y a conservation des réarrangements du diagnostic, nous pouvons parler d'une véritable **rechute** de la leucémie initiale. L'immunophénotypage le confirme. Pourtant l'apparition simultanée de marqueurs B (matures et immatures), et de marqueurs myéloïdes montre une évolution de la pathologie initiale : la rechute est **biphénotypique**.

CONCLUSION

Les données de la biologie moléculaire, par la technique du Southern-blot fournissent des arguments supplémentaires pour déterminer l'origine immunologique B ou T d'une leucémie aiguë lymphoïde.

Mais de nombreux problèmes peuvent se poser : il s'agit tout d'abord :

- d'une technique lourde (utilisation de radioactivité) dont les étapes sont longues (la manipulation s'étale sur 10 jours).
- le seuil de sensibilité est relativement élevé (2 à 5 %).
- et parfois l'interprétation des autoradiographies, quand il y a présence d'oligoclones, est difficile.

Le Southern-blot, tout en restant une méthode de référence tend à être supplanté par la PCR (Polymerase Chain Reaction) dont les avantages sont multiples : rapidité, sensibilité, coût.

Dans le laboratoire, notre étude a été complétée en technique PCR. La comparaison Southern-PCR montre des résultats similaires et parfois résout nos problèmes : c'est le cas pour JOL où la PCR confirme la présence d'un réarrangement différent.

Le suivi des patients pour la détection de la maladie résiduelle ne peut se faire qu'en technique PCR, le taux de cellules présentant le réarrangement n'étant pas détectable par Southern-blot.

Mais les manipulations de la PCR sont délicates :

- les contaminations fréquentes peuvent être à l'origine de faux positifs.
- par excès de sensibilité, des populations normales de lymphocytes sont amplifiées (15).

C'est pour cela que de très nombreux laboratoires utilisent encore le Southern-blot pour le diagnostic de clonalité des pathologies lymphoïdes.

Au-delà de notre étude, il est important de séparer les notions monoclonalité-malignité. Dans le cas des LAL, la présence de réarrangements est un marqueur de clonalité fiable et corrélé à la malignité. Mais pour de nombreuses pathologies lymphoïdes, considérées cliniquement comme bénignes, la présence de population monoclonale n'est pas synonyme de malignité. C'est le cas des lésions lymphoproliférative cutanées (pityriasis lichenoïde, papulomatose lymphomatoïde) qui montrent des réarrangements clonaux de type T, alors que leur évolution peut être favorable (21).

ANNEXES

ANNEXE N° 1
LYSE DES GLOBULES ROUGES

☞ *Solutions :*

- lyse des hématies :
  - . NH4CL : 0,144 M
  - . DTT : 0,003 M
- ammonium hydrogénocarbonate :
  - . NH4HCO3 : 0,01 M

☞ *Technique :*

- Prélevement veineux ou de moëlle recueilli sur héparine ou EDTA.
- Vérifier l' absence de caillots en transférant le sang ou la moëlle dans des tubes en polypropylène de 12 ml.
- Centrifuger : 1100 tr/mn, 4°C, 8 mn.
- Prélever l'interface hématie-surnageant (éléments nucléés).
- S'il persiste trop d'hématies, faire une seconde centrifugation, pendant 5 mn. Prélever l'interface après avoir enlevé le surnageant.
- Ajouter goutte à goutte 4 ml de tampon de lyse des hématies et 0,4 ml du tampon NH4HCO3 puis homogénéiser.
- Laisser dans la glace ou à 4°C pendant 20 à 30 mn.
- Centrifuger : 1100 tr/mn , 4°C, 5 mn.
- Décanter le surnageant.
- Refaire une seconde lyse des hématies.
- Compter les éléments en cellule de malassez.
- Après centrifugation, remettre le culot en suspension dans 1 ml de RPMI (GIBCO-BRL).
- Transvaser la suspension cellulaire dans un cryotube: 20 $\overline{M}$ par tube au maximum.
- Centrifuger : 1100 tr/mn ,4°C, 5mn.
- Décanter le surnageant.
- Congeler le culot sec en le plongeant dans l'azote liquide.
- 10 mn après, placer le tube identifié dans le congélateur à -80°C.
- En l'absence de congélateur, laisser le tube dans l'azote liquide.

ANNEXE N°2
EXTRACTION DE L'ADN

☞ *Solutions :*

- LGB : Tris HCl : 0,01 M
  NaCl : 0,4 M
  EDTA : 0,002 M

- SDS : 100 g electrophoresis-grade SDS.
  solution à 20 %.

- EDTA : 0,5 M.

☞ *Extraction d'ADN :*

Pour 50 $\overline{M}$ de cellules mettre 6 ml de LGB :

- Ajouter SDS 20% :

0,2 ml	pour	6 ml LGB
0,166 ml		5 ml LGB
0,133 ml		4 ml LGB
0,1 ml		3 ml LGB

- Ajouter la solution de PK :

PK (20mg/ml)	200 µl
SDS 20%	50 µl
EDTA 0,5 M	4 µl
qsp 1ml	

1 ml PK	pour	6 ml LGB
0,83 ml PK		5 ml LGB
0 66 ml PK		4 ml LGB
0,5 ml PK		3 ml LGB

- Mettre en agitation toute la nuit entre 37°C et 42°C dans un BM ou un four. Si la dissolution du culot cellulaire n'est pas correcte, rajouter LGB, SDS 20 %, PK.

- Le lendemain ajouter du NaCl 5 M dans les proportions suivantes :

2,4 ml	6 ml LGB
2 ml	5 ml LGB
1,6 ml	4 ml LGB
1,2 ml	3 ml LGB

- Agiter pour obtenir une émulsion.

- Mettre dans la glace 30 mn.

- Centrifuger à 10 000 tr/mn, 30 mn.

- Récupérer le surnageant avec précaution en évitant de prendre les déchets du culot.

- Ajouter un volume d'alcool éthylique équivalent au volume de LGB de départ.

- Agiter doucement.

- Des filaments blancs apparaissent : c'est la "méduse".

- Récupérer la "méduse", la rincer dans 2 bains successifs d'alcool 70 % (1 ml), la sécher (quelques minutes au four à vide) et la reprendre par agitation pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile (entre 100 et 500 µl selon la concentration d'ADN appréciée subjectivement à ce moment de la manipulation par sa viscosité).

ANNEXE 3
TECHNIQUE DU MINI GEL

Elle peut être appliquée à la vérification qualitative :

- de l'ADN extrait.
- des digestions enzymatiques.

☞ *Matériel :*

- Agarose (ultra pure GIBCO-BRL).
- Tampon TBE 1 X : . 0,089 M Trizma-Base.
  . 0,089 M Acide Borique.
  . 0,002 M EDTA.
  . pH 8,3.

☞ *Technique :*

- Pesage de l'agarose selon la capacité de la cuve, de manière à obtenir une concentration de 0,8%.
- Préparation du gel au micro ondes et coulage dans la cuve (sans oublier le peigne).
- Dépôt dans les puits :
  - 2 µl d'ADN
  - 2 µl de bleu de bromophénol
  - 5 µl d'eau .
- Migration 90 mn à 60 Volts.
- 15 mn avant la fin de la migration, rajouter 2 µl de bromure d'éthidium. (il est possible de l'ajouter au moment du dépot en même temps que l'ADN).
- La migration de l'ADN est ensuite examinée sous une lampe UV, avec présence d'un trait net si l'ADN est de bonne qualité (cf. photographie n° 1).
- Aliquoter l'ADN pour le conserver soit pour quelques heures à 4°C soit au congélateur à -20°C.

☞ *Précautions :*

- Manipuler le bromure d'éthidium avec des gants, son pouvoir mutagène étant trés important.
- Porter des lunettes de protection au moment de l'utilisation de la lampe à UV.

ANNEXE 4
VERIFICATION QANTITATIVE DE L'ADN

Nous avons vu précédemment que l'ADN absorbait à 260 nm.

Nous allons utiliser cette propriété.

- Dilution au 1/20 de la solution d'ADN en eau distillée stérile.
- Agitation pendant 20 mn.
- Chauffage au BM à 60°C, 10 mn.
- Centrifugation rapide.
- Lecture au spectrophotomètre à 260 et 280 nm.
- Rapport R = DO260/DO280.
- Pour obtenir la concentration d'ADN, il suffit de multiplier la DO 260 par 20 (inverse de la dilution) puis par 50.

ANNEXE N° 5
DIGESTIONS ENZYMATIQUES

☞ *Solutions :*

- TBE 1 X.
- Agarose
- Enzymes : Bam H I, Eco R I, Hind III.
- Tampons : . N° 3 pour Eco R I et Bam H I.
  . N° 2 pour Hind III.

GIBCO-BRL

☞ *Technique :*

Dans des tubes eppendorf on met en présence :

- Spermidine : 4 mM.
- Tampon : 1X.
- ADN : 10,5 µg.
- H2O : qsp 50 µl.
- Enzyme : 52,5 U.

La digestion s'effectue au BM à 37°C pendant au moins 12 heures.

☞ *Précautions :*

- Chaque enzyme doit être utilisée avec son tampon spécifique.
- Le volume final (50 µl) peut être adapté d'une part en fontion de la concentration d'ADN, d'autre part en fonction de la quantité de glycérol (< 5 %), agent de conservation de l'enzyme (une trop forte concentration de glycérol inhibe l'action enzymatique).
- Les enzymes sont conservées au congélateur à -20°C. Ajoutées au dernier moment, elles doivent être transportées dans la glace.
- Bam H I est une enzyme qui coupe mal :
  . Avant d'ajouter l'enzyme, il faut chauffer la solution (ADN, tampon, spermidine) 10 mn à 65°C.
  . La digestion se fera sur 24 heures : après minimum 6 heures de digestion, il faut rajouter la quantité d'enzyme de départ.

- Il est indispensable de vérifier la qualité des coupures, une fois la digestion enzymatique terminée :
  - . Centrifuger quelques secondes.
  - . Avec 0,5 µg d'ADN coupé, une migration sur mini gel d'agarose en tampon TBE 1 X est effectuée (cf. annexe n° 3). Un "smear" sur chaque piste du gel correspondant à chaque enzyme, témoigne d'une bonne activité de l'enzyme.

ANNEXE N°6
ELECTROPHORESE SUR GRAND GEL

☞ *Solutions :*

- TAE 1 X : . 0,04 M Trizma-Base.
  . 0,002 M EDTA.
  . pH 7,6.

☞ *Technique :*

Elle est peu différente de la technique du mini gel :

- Le gel est toujours à 0,8 % d'agarose.
- Le tampon de migration utilisé est le TAE 1 X.
- Centrifuger les tubes eppendorf 10 mn à 10000 tr/mn.
- Faire évaporer sous vide de manière à avoir un volume final d'environ 15 µl (si la manipulation est différée, il est possible de stocker les tubes à -20°C).
- Ajouter 2 µl de bleu de bromophénol dans chaque tube.
- Faire chauffer 10 mn à 65°C.
- En parallèle, préparer les 2 marqueurs de taille :
  . λ Hind III : 10 µl.
  . Bleu de bromophénol : 2 µl.
  Faire chauffer 10 mn à 65°C.

  . 1 Kb ladder (GIBCO-BRL) : 3 µl.
  . Bleu de bromophénol : 2 µl.
  . H_2O : 6 µl.
  Surtout ne pas faire chauffer.
- Pour faciliter la migration des échantillons il est préférable de rajouter, au moment du dépot, à chaque prélèvement, 4 µl d'agarose 1,5 % à bas point de fusion (ou low melting). Préalablement chauffée à 65°C, elle est de consistance liquide.
- Déposer les échantillons dans les puits du grand gel .
- Migration à 40 Volts pendant 18 heures.
- 1 heure avant la fin de la migration rajouter 40 µl de bet dans le tampon de migration.

☞ ***Précautions :***

- L'étape du dépot est délicate à réaliser en raison du low melting agarose qui a tendance à se reprendre en masse dès que la température de l'échantillon devient inférieure à 65°C.
- Entre les puits réservés aux 2 marqueurs et ceux des échantillons, laisser toujours un puits d'écart.

ANNEXE N° 7
LE TRANSFERT

☞ *Solutions :*

- Solution de dépurinisation : HCl 0,25 N
- Solution de transfert : - NaOH : 0,25 N
  - NaCl : 0,6 M
  - H_2O
- Solution de neutralisation :
  - Tris-HCl : 0,5 M
  - NaCl : 1 M

☞ *Technique :*

- Une fois la migration sur grand gel terminée, une photographie après illumination UV, est prise.
- Le gel est découpé de manière à éliminer la partie de gel contenant la migration des marqueurs.
- Ce gel va subir plusieurs bains successifs :
  . 15 mn dans la solution de dépurinisation, sous agitation douce.
  . Rinçage avec un peu de solution de transfert.
  . 30 mn dans la solution de transfert, sous agitation douce.
- Pendant ce temps : découpage de la membrane de nylon (Gene Screen Plus Dupont) aux dimensions du gel.
- Imprégnation du nylon :
  . 2 mn dans l'eau.
  . 15 mn dans la solution de transfert.

Le transfert est prêt à lancer :

- Sur la plaque de l'appareil de transfert, on dispose le nylon que l'on recouvre avec le gel. Le vide à 40 mm de mercure est fait.
- Un dispositif de goutte à goutte contenant la solution de transfert est mis en place afin que le gel soit toujours humidifié.

- Une fois cette étape terminée, le nylon est récupéré :
  . Bain de 30 mn dans la solution de neutralisation.
  . Séchage au four à vide 1 heure.

Il est possible :

- soit de passer à l'étape suivante (l'hybridation).
- soit de conserver ce nylon sous plastique à -4°C.

☞ *Précautions :*

- Penser à faire une encoche à la fois sur le gel et sur le nylon afin de situer la ligne des puits.
- Toujours s'assurer que le gel pendant le transfert est parfaitement humide.

ANNEXE N° 8
PREPARATION DE LA SONDE

- 20 ng de sonde, conservés au congélateur à -20°C sont mis à bouillir (10 mn) puis plongés dans la glace (5 mn) après une centrifugation de quelques secondes.
- Dans un tube en verre, on prépare la solution :
  - . 4 µl dCTP (marqué au P32/40 µcuries)
  - . 3 µl dXTP (X = A, T, G)
  - - 2 µl tampon 6 (10 X)
  - - 1,5 µl de kleenow

  Kit Boehringer Mannheim
- Quand la sonde est prête, elle est incorporée à la solution et mise à incuber pendant 3 ou 4 heures au BM à 37°C.
- Le volume final est de 20 µl.

ANNEXE N° 9
EVALUATION DE LA RADIOACTIVITE

☞ *Solutions :*

- T E :
  - . 1 mM EDTA.
  - . 10 mM Tris-HCl.
- Résine G 50 :
  - . Sephadex G 50 (Pharmacia).
  - . TE.

☞ *Technique :*

Préparation de la colonne :

- On dispose d'une seringue à insuline que l'on bouche par du coton cardé. Elle est remplie par la résine G 50. On fait centrifuger quelques mn, pour tasser la résine. L'expérience est renouvelée plusieurs fois jusqu'à ce que la résine atteigne le niveau 0 de la seringue.Un tube éppendorf est placé au bas de la colonne.

Quand l'incubation des 3 heures est terminée :

- 10 mn à 65°C.
- On rajoute à la sonde 230 µl de TE pour ajuster le volume à 250 µl.
- 1 µl de ce mélange est déposé sur du papier : radioactivité *avant* passage sur la colonne.
- Le mélange sonde+TE est déposé sur le sommet de la colonne.
- Centrifugation.
- Rinçage du tube de départ par 250 µl de TE que l'on dépose sur le sommet de la colonne.
- Centrifugation.
- Le volume final récupéré au bas de la colonne est de 500 µl.
- 1 µl est prélevé : radioactivité *après* passage sur colonne.
- La sonde peut être utilisée immédiatement ou bien alors congelée à - 20°C quelques jours.

- L'évaluation des 2 radioactivités *avant* et *après* se fait au compteur Geiger. La radioactivité *après* doit être environ 1/3 de celle d'*avant*. Elle est évaluée en nombre de coups (c'est le taux de radioactivité multiplié par le volume final) : cela permet d'évaluer la qualité du marquage de la sonde.

☞ *Précautions :*

- Toujours manipuler avec des gants.
- Travailler délicatement derrière les écrans de protection et respecter toutes les consignes de sécurité.

ANNEXE N° 10
LA PREHYBRIDATION

☞ *Solutions :*

- milieu:
  - 50 % H_2O
  - 10 % sulfate de dextran (50 %)
  - 1 M NaCl
  - 1 % SDS (20 %)
- ADN de sperme de saumon : 100 µg /ml de milieu d'hybridation

☞ *Technique :*

La membrane et le milieu de préhybridation sont mis en contact dans un tube en verre et mis à incuber 1 heure à 65°C sous agitation.

ANNEXE N° 11
L'HYBRIDATION

- Dénaturation de la sonde par ébullition pendant 10 mn.
- 5 mn dans la glace.
- La rajouter au milieu de préhybridation.
- L'hybridation s'effectue à 65°C sous agitation pendant 24 heures.

ANNEXE N° 12
LES LAVAGES

☞ *Solutions :*

N° 1 : - 2 X SSC
- 1 % SDS (20 %)

N° 2 : - 0,1 X SSC
- 0,5 % SDS (20 %)

☞ *Technique :*

- 2 lavages de 2 fois 5 mn à température ambiante avec la solution N° 1.
- 2 lavages de 2 fois 30 mn à 65°C avec la solution N° 1.
- 2 lavages de 2 fois 15 mn à température ambiante avec la solution N° 2.
- Les lavages terminés, la membrane est mise sous sachet plastique, prête pour l'autoradiographie.

☞ *Précautions :*

Le SDS doit toujours rester à une température supérieure à 20°C sinon il cristallise.

La température de 65°C doit être respectée.

ANNEXE N° 13
L'AUTORADIOGRAPHIE

☞ *Technique :*

- La membrane est mise au contact du film entre les 2 écrans renforçateurs dans une cassette, à -80°C pendant 24 heures.
- La révélation se fait selon les techniques habituelles de photographie (fixation /révélation).

☞ *Précautions :*

- Le film utilisé est de très grande sensibilité ; sa manipulation doit se faire sous infra-rouges de faible puissance.
- Toujours faire attention à repérer la ligne des puits (bord à bord avec le film).

ANNEXE N° 14
DESHYBRIDATION

- NaOH 0,4 N : 30 mn à 65°C sous agitation

- Solution : . SSC 0,1 X
  . SDS 0,1%
  . Tris HCl 2M

  30 mn à 65°C.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ARNOLD A et al. Immunoglobulin gene rearrangement as using clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N. Eng. J. Medecine* 1983;309:1593-1599.

2 - BACH. Immunologie. *Flammarion - Médecine Sciences.*

3 - BENSUSSAN A. Les lymphocytes T humains : un modèle unique de reconnaissance. *Medecine / Sciences* 1988;n° spécial:21-26.

4 - BIONDI A, DI CELLE PF, ROSSI V et al. High prevalence of T cell receptor Vδ2(D)-Dδ3 or Dδ1/2-Dδ3 Rearrangements in B - Precursor Acute Lymphoblastic Leukemias. *Blood* 1990;75,9 (May1):1834-1840.

5 - CLEARY ML et al. Immunoglobulin gene rearrangment as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:593-597.

6 - DEANE M, PAPPAS H, NORTON JD. Immunoglobulin Heavy Chain Gene Fingerprinting Reveals Widespread Oligoclonality in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Leukemia* 1991;5,10 :832-838.

7 - FLANAGRAN JG, RABBITS TH. The Sequence of a human immunoglobulin epsilon heavy chain constant region gene, and evidence for three non allelic genes. *The Embo Journal* 1982;1,5: 655-660.

8 - IMBERT M. Marqueurs cellulaires des lignées lymphoïde et myéloïde normales. *Revue francaise des laboratoires*, Février 1991;218.

8bis- KAHN A, DEGOS L. *Medecine / Sciences* 1989;Supplément n° 1:5-11.

9 - KAPLAN JC, DELPECH M. Biologie Moléculaire et Médecine. *Flammarion - Médecine Sciences.*

10 - KORSMEYER SJ et al. Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J Clin Invest* 1983;71:301-313.

11 - LEBIEN TW, ELSTROM R., MOSELEY M., KERSEY JH, GRIESINGER F. Analysis of Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Rearrangements in Human Fetal Bone Marrow B Lineage Cells. *Blood* 1990;76,6 :1196-1200.

12 - LEFRANC MP. Organisation des gènes des récepteurs αβ et γδ des lymphocytes T humains. *Medecine / Sciences* 1989;5:754-761.

13 - MINDEN M. Somatic rearrangement of T cell antigen receptor gene in human T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1224-1227.

14 - NOSAKA T, KITA K, MIWA H et al. Cross-Lineage Gene Rearrangements in Human Leukemic B-Precursor Cells Occur Frequently With V-DJ Rearrangements of IgH Genes. *Blood* 1989; 74,1:361-368.

14bis- RETH M, GEHRMANN P, PETRAC E, WIESE P. A novel Vh to Vh-D-Jh joining mechanism in heavy-chain negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* 1986;322:840-2.

15 - SIGAUX F. Recombinaisons somatiques des gènes codant pour les récepteurs des cellules T pour l'antigène : de la physiopathologie au diagnostic moléculaire des hémopathies lymphoïdes malignes. *European school of Hematology*, 23-25 Mars 1993 - Pr. F. Sigaux, Hôpital Saint-Louis, Paris.

16 - SIGAUX F. Réarrangement des gènes de la super famille des immunoglobulines dans les leucémies aiguës : intérêt pour la définition de la lignée impliquée dans le processus tumoral et pour l'étude de sa clonalité. *4eme journée Scientifique Coulter*, 17 Décembre 1987 - Fascicule 2.

17 - SIMS JE, TUNNACLIFFE A, SMITH WJ, RABBITS TH. Complexity of human T cell antigen receptor β-chain constant and variable-region genes. *Nature* 1984;312, 6.

18- SIU G et al. The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity and joining gene segment that rearrange to generate a complete V gene.*Cell* 1984;37:393- 401.

19 - SKLAR J, LONGTINE J. The Clinical Significance of Antigen Receptor Gene Rearrangements in Lymphoid Neoplasia. *Cancer* 1992;Supplement 15,vol 70,6.

20 - WALDMANN TA, DAVIS MM, BONGIOVANNI K, KORSMEYER S. Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *The New-England Journal of Medecine* 1985;26:313-776.

21- XERRI L, HORSCHOWSKI N, GABERT J, HASSOUN J. Analyse genotypique des lymphomes malins. *Ann. Path.* 1991;II,4:212-223.

22 - YANCOPOULOS GD, BLACKWELL TK, SUH H, HOOD L. Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells : evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* 1986;31,44:251-259.

23 - YANO T, PULLMAN A, ANDRADE R et al. A common Vδ2-Dδ2-Dδ3 T cell receptor gene rearrangement in precursor B acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 1991;79: 44-49.

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

RESUME :

Les phénomènes de réarrangements géniques constituent une caractéristique fondamentale des cellules lymphoïdes à l'état physiologique. Les gènes concernés (V, J et dans certains cas D) codent pour des molécules protéiques chargées de la reconnaissance des antigènes : les immunoglobulines, pour les lymphocytes B et le récepteur T, pour les lymphocytes T.

Les multiples segments géniques de l'ADN germinal sont séparés les uns des autres par des séquences non codantes.

Le réarrangement consiste à juxtaposer les gènes V et J ou V D et J avec élimination du matériel génique intercalaire. Les multiples possibilités recombinatoires sont responsables de la diversité des molécules finales. Au sein d'une population lymphoïde polyclonale, les multiples clones, issus des réarrangements, ne sont pas détectables. Par contre dans les proliférations lymphoïdes si l'un des clones devient majoritaire, il deviendra visible.

L'étude de ces recombinaisons a été étudiée par la technique du Southern-blot : l'ADN est extrait des cellules leucoblastiques, soumis à l'action d'enzymes de restriction. Ces différents fragments sont séparés suivant leur taille par électrophorèse, transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec une sonde spécifique.

Notre travail porte sur 11 cas de patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques. Nous avons étudié les recombinaisons au niveau des chaînes lourdes des immunoglobulines (sonde JH) et du récepteur Tβ (sonde Cβ2).

Nous soulevons les problèmes de réarrangements mono ou bialléliques, oligoclonaux et illégitimes.

MOTS-CLES :

- Réarrangement
- Cellules lymphoïdes
- Immunoglobuline
- Récepteur T
- Clone
- Southern-blot
- Leucémie aiguë lymphoblastique