

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Application de la Biologie moléculaire dans la Leucémie Myéloïde Chronique

Présenté par : **BENBOUALIA** linaa
BERTIL Ibtissam
CHETTAH Chahinaz

Le 20/06/2023

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. REZGOUNE Mohamed LARBI (MCA- UFMC1).

Encadrant : Mr. LATRECHE Fethi (MAA - UFMC 1).

Examineur : Dr. SEDRATI Khadidja (MCA - UFMC 1).

Année universitaire
2022 - 2023

REMERCIEMENTS

Merci Avant tout, nous remercions le bon DIEU Tout-Puissant qui nous a donné la volonté, le courage et la santé pour terminer ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadrant, Mr. LATRECHE FETHI, pour sa patience, sa présence, ses avis et ses observations. Nous avons grandement motivé à cause de lui.

Les plus grands mots de remerciement et de gratitude pour l'honorable membre de jury :

- Dr. SADRATI Kadidja, notre enseignante et responsable du parcours master génétique moléculaire, vous êtes une excellente enseignante nous vous aimons beaucoup.
- Dr. REZGOUNE Mohamed Larabi, notre merveilleux et notre génie enseignant.

Nous remercions également tous les enseignants de faculté : science de la nature et de la vie, du département : biologie animal et surtout les enseignants de la spécialité de génétique moléculaire, qui ont partagé leurs expériences et leurs connaissances avec nous pendant notre parcours universitaire.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

À vous mes chers parents BENBOUALIA MOSTAPHA ET NADIA. Vous êtes mes guides, mes protecteurs et mes premiers enseignants. Votre amour inconditionnel et votre soutien indéfectible ont façonné la personne que je suis aujourd'hui.

À mes chers frères et sœur, Kakou, Mamou, Mina et Minou. Il est difficile de trouver les mots justes pour exprimer toute la reconnaissance, l'affection et l'aide précieuse que vous m'avez apportée.

Votre présence dans ma vie a été d'une valeur inestimable, et je suis profondément reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous aime énormément et je suis fière de pouvoir compter sur vous.

BENBOUALIA linaa

DEDICACES

Je vois que mon parcours universitaire a pris fin après un épuisement et des difficultés qui ont duré longtemps, et aujourd'hui je termine mes recherches de fin d'études avec toute mon énergie et mon énergie.

Je remercie Dieu Tout-Puissant en premier et en dernier. Louange à Lui, donc louange à Dieu au début et à la fin.

A ceux dont les yeux éveillent la fierté de notre réussite, et dont les prières sont le secret de ma réussite A mon grand-père et ma grand-mère « Zahia, Miloud, Hadda, Hamouda », que Dieu les bénisse.

A celui qui a souffert de la fatigue et enduré les épreuves de la vie pour notre bien, à mon soutien, mon soutien, ma force et mon inclination, mon cher père "Ali", que Dieu le protège

Ma source de fierté et de bonheur, mon soutien indéfectible à chaque étape de ma vie, ma chère maman, Rahima, que Dieu la perpétue.

A ceux qui ont eu un grand impact sur de nombreux obstacles, mes frères "Salim" et Iyad

Ma sœur et amie, partenaire sur la longue route, Hadeel

Aux compagnes de mon chemin, "Sofia, Noha, Fawzia, Nour Al-Yaqin, chahinez"

A ceux qui m'ont toujours donné la force et sur qui s'appuyer : Asia, Elham, Farida, Fayrouz

BERTIL Ibtissam

DEDICACES

Avant tout, j'ai remercié le « Dieu » Tout-Puissant et Miséricordieux pour sa volonté et sa patience. J'espère recevoir des éloges pour m'avoir aidé à terminer mes études et m'avoir orienté dans la bonne direction dans ma vie.

Je dédie cet humble travail à Baba **MuhammadAl-Sharif**, et à Mama **soaad**, symbole d'amour et de tendresse, qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me guider. Merci pour l'amour inconditionnel, le soutien que vous m'avez apporté et les sacrifices que vous avez faits et continuez de faire pour moi depuis mon enfance.

Mon cher mari **soufyane** est une source de positif, de patience et de soutien qui m'a beaucoup aidé à terminer ce travail et a sacrifié son temps libre pour moi.

A mes frères et collègue **Ibtisam** pour votre gentillesse et votre patience.

CHETTAH Chahinaz

ملخص:

إبيضاض الدم النخاعي المزمن هو نوع من سرطان الدم الذي يؤثر على الخلايا الجذعية المكونة للدم في نخاع العظام. يتميز بالإنتاج المفرط لخلايا الدم البيضاء الغير ناضجة و التي تحل محل الخلايا الدم الطبيعية تدريجيا.

ينتج سرطان الدم النخاعي عن بشكل رئيسي عن خلل في الكروموسومات يسمى كروموسوم فيلاديلفيا. ينتج هذا الكروموسوم عن تبادل المادة الوراثية بين الكروموسومات 9 و 22 مما يؤدي إلى جين غير طبيعي يسمى BCR-ABL 1 (q34;q11.2)(9;22)t

ينتج هذا الجين بروتين هجين، يعمل على تكاثر الخلايا الجذعية المكونة للدم، مما يؤدي إلى زيادة إنتاج الخلايا الغير ناضجة.

يتلخص عملنا البحثي في دراسة نظرية تهدف في البداية إلى إستخلاص بيانات وبائية سريرية و جزيئية في تشخيص ورصد سرطان الدم النخاعي المزمن.

بالإضافة إلى ذلك تم إثبات أهمية RT-PCR MULTIPLEXE

في مراقبة الجزيئية المرضى المصابين بسرطان الدم النخاعي المزمن

بما أنه ليس لدينا فرصة لإجراء دراسة عملية بسبب نقص الكواشف و العتاد المخبري فقد قدمنا نتائج لدراسات جزئية التي تمت مناقشتها بعد ذلك وفق البيانات العلمية العالمية

RESUME :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un type de cancer du sang qui affecte les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Elle est caractérisée par la production excessive de globules blancs immatures, appelés cellules blastiques, qui remplacent progressivement les cellules sanguines normales.

La LMC est principalement causée par une anomalie chromosomique appelée chromosome Philadelphie (Ph). Ce chromosome résulte de l'échange de matériel génétique entre les chromosomes 9 et 22: t(9;22)(q34;q11.2), ce qui conduit à la création d'un gène anormal appelé BCR-ABL. Ce gène produit une enzyme qui stimule la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, entraînant ainsi la surproduction de cellules immatures.

Dans notre travail de recherche se résume en une étude bibliographique ayant pour objectifs dans un premier temps de tirer les données épidémiologiques, cliniques, biologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire dans le diagnostic et le suivi de LMC. De plus, on a mis en évidence l'intérêt et l'indispensabilité de la RT-PCR Multiplex dans le suivi moléculaire chez les patients atteint de LMC.

Comme nous n'avons pas la chance de réaliser une étude pratique, à cause du manque de réactifs et/ou de matériels, on a présenté des résultats émanant d'études algériennes qui ont été ensuite discutés en fonction des données de la littérature.

Mots clés : LMC, t(9;22)(q34;q11.2) , fusion transcript BCR-ABL 1, RT-PCR Multiplex.

SUMMARY

Chronic myeloid leukemia (CML) is a type of blood cancer that affects hematopoietic stem cells in the bone marrow. It is characterized by the excessive production of immature white blood cells, called blast cells, which gradually replace normal blood cells.

CML is mainly caused by a chromosomal abnormality called the Philadelphia (Ph) chromosome. This chromosome results from the exchange of genetic material between chromosomes 9 and 22: t(9;22)(q34;q11.2), which leads to the creation of an abnormal gene called BCR-ABL. This gene produces an enzyme that stimulates the proliferation of hematopoietic stem cells, resulting in the overproduction of immature cells.

In our research work is summarized in a bibliographic study in the first objectives was to extract the epidemiological, clinical, biological, cytogenetic and molecular biology data in the diagnosis and follow-up of CML. In addition, In addition, the interest and essentiality of Mutiplex RT-PCR in the molecular monitoring of patients with CML has been demonstrated.

As we do not have the chance to do a practical study, because of the lack of reagents and/or materials, we have presented results from Algerian studies which were then discussed according to the data of the literature.

Keywords: CML, t(9;22)(q34;q11.2) , transcrits de fusions BCR-ABL 1, RT-PCR Multiplex,

TABLE DES MATIERES

LISTE DE FIGURES

LISTE DE TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: GENERALITES SUR LA LMC.....	2
1.1 Rappels.....	3
1.1.1 Moelle osseuse, la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde :	3
1.1.2 La leucémie, un cancer.....	4
1.1.3 La leucémie myéloïde chronique (LMC).....	5
1.2 Epidémiologie.....	7
1.3 Historique.....	8
1.4 Etiologie.....	9
1.5 Aspects cliniques.....	10
CHAPITRE 2 : LMC ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	12
2.1 Physiopathologie moléculaire :.....	13
2.1.1 Le chromosome de Philadelphie: :.....	13
2.1.2 Fonctions de la protéine ABL.....	14
2.1.3 Fonction de la protéine BCR :.....	15
2.1.4 Le gène de fusion hybrid BCR/ABL1:.....	16
CHAPITRE 3: DIAGNOSTIQUE DE LMC.....	19
3.1 Diagnostic biologique :.....	20
3.1.1 Hémogramme.....	20
3.1.2 Myélogramme.....	21
3.2 Diagnostic cytogénétique.....	21
3.3 Cytogénétique moléculaire, Technique FISH (Hybridation in situ par fluorescence):.....	22
3.4 Biologie moléculaire :.....	23
3.4.1 Le Southern-blot.....	23
3.4.2 RT-PCR (Polymérase Chain Reaction en temps réel ou quantitative) Multiplex :.....	23
CHAPITRE 4 : LMC ET TRAITEMENT.....	25
4.1 Historique de traitement :.....	26
4.2 Score pronostique :.....	27
4.3 Réponse au traitement.....	28
4.3.1 Réponses hématologiques.....	29

4.3.2 Réponses cytogénétiques	29
4.3.3 Réponses moléculaires	30
METHODOLOGIE	32
1. Les objectifs de notre travail :	33
2. Matériels et méthodes des études 01, 02 et 03 :	34
2.1 Extraction de l'ARN total :.....	35
2.2 Dosage des ARN :	36
2.3 Technique de RT-PCR Multiplexe :	36
2.3.1 La rétro-transcription :.....	36
2.3.2 Amplification des produits par la RT :.....	36
2.4 Interprétation des résultats	37
2.4.1 Validation de la PCR :	37
2.4.2 Validation des échantillons :.....	37
2.5 Quantification des transcrits BCR-ABL1 :.....	38
RESULTATS DES ETUDES 01, 02 ET 03	39
1. Etude 01 :	40
1.1 Prévalence	40
1.2 Incidence.....	40
1.3 Age :.....	42
1.4 Le sexe :	42
1.5 La répartition géographique :	43
1.6 Répartition selon la profession	44
1.7 Données biologiques :.....	44
1.8 Le score de Sokal	45
2. Etude 02 :	45
2.1 RT-PCR Multiplex	45
2.2 Résultats épidémiologiques et moléculaires	46
3. Etude 03 : les données épidémiologiques, biologiques et moléculaires	47
DISCUSSION	50
1. Epidémiologie de la LMC :	51
2. La LMC et la biologie moléculaire :	53
CONCLUSIONS	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	59

LISTE DE FIGURES

Figure 01. Compartiment de l'hématopoïèse de la leucémie myéloïde.	03
Figure 02. Translocation t(9; 22)-(q34.1 ; q11.2) et les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl dans LMC.	06
Figure 03. Schéma de progression de Leucémie Myéloïde Chronique.	10
Figure 04. Le chromosome de Philadelphie.	13
Figure 05. La protéine ABL.	14
Figure 06. DTK d'ABL et mécanisme d'action.	14
Figure 07. La protéine BCR.	15
Figure 08. Différents gènes de fusion BCR-ABL et leur protéine résultantes.	17
Figure 09. Aspect du frottis sanguin et de l'étalement médullaire, (b) montrant une hyperplasie granuleuse pour une LMC en Phase chronique.	19
Figure 10. Myélogramme montrant une hyperplasie granuleuse.	20
Figure 11. Le résultat FISH de la translocation t(9 ;22). A : FISH interphasique. B : FISH métaphasique (illustration du métaphase d'un de nos patient présentant la translocation t(9,22) avec la sonde dual FISH.....	21
Figure12: Mode d'action des Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITK).	26
Figure 13. Schéma récapitulatif des réponses souhaitées.	29
Figure 14. Réponse moléculaire idéale avec un traitement par ITK.	30
Figure 15. Représentation schématique de la translocation t(9 ;22) et les différents types de transcrits BCR-ABL1 retrouvés dans la LMC. Les transcrits b2a2 (e13a2) ou b3a2 (e14a2) (coupure dans le Mbc) sont retrouvés dans plus de 95% des cas. Plus rarement on retrouve les transcrits e1a2, e8a2, e6a2, e19a2, e1a3, b2a2 et b3a3.	34
Figure 16. Gel agarose Seeplexe. N : contrôle négatif. M : marqueur de taille. 1 à 7. Echantillons : 1(e1a2), 2 et 6 négatifs. 3(b3a2), 4(c3a2 ou e19a2), 5 et 7(b2a2).	37

Figure 17. Définition de la réponse moléculaire selon l'échelle internationale.	37
Figure 18. Répartition des nouveaux cas de LMC par année.	40
Figure 19. Variation de l'incidence.	40
Figure 20. Répartition des patients selon les tranches d'âges.	41
Figure 21. Répartition des patients selon le sexe.	41
Figure 22. Répartition selon les tranches d'âge et le sexe.	42
Figure 23. Répartition géographique (1457 cas).	42
Figure 24. Répartition selon la profession.	43
Figure 25. Répartition des patients selon la classification pronostique de Sokal.	44
Figure 26. Produits de la RT-PCR Multiplex des échantillons étudiés.	48
Figure 27. Profil du gel agrose montrant bien l'amplification du gène de contrôle ABL1 (600 pb). Msep : marqueur seeplex. MVI marqueur VI. RT- : Temoin négatif de la RT. K562 : Temoin positif de la lignée cellulaire K562. Tsep : Temoin du Kit seeplex. P- : patient négatif. Photo service biochimie/EHU Oran.	52
Figure 28. Profil du gel agarose montrant l'amplification transcrit e19a2 (position 1) et du transcrit b2a2 (401 pb) (position 5). Photo service de biochimie/EHUOran.	53

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 01. Définitions des réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires.	28
Tableau 2. Programme de l'amplification par PCR.	36
Tableau 03. Incidence annuelle et globale de la leucémie myeloïde chronique en Algérie durant la période : 1994 -2004.	39
Tableau 04. Incidence annuelle et globale de la leucémie myéloïde chronique en Algérie durant la période : 2005 -2009.	39
Tableau 05. Répartition des patients selon les tranches d'âge.	41
Tableau 06. Résultats de la RT-PCR multiplex au diagnostic et au suivi.	44
Tableau 07. Caractéristiques épidémiologiques et moléculaires des patients atteints de LMC.	45
Tableau 08. Détection et quantification du transcrit BCR-ABL1 chez les patients.	46
Tableau 09. Données biologiques et moléculaires de 107 patients avec la LMC.	47

LISTE DES ABREVIATIONS

ABL :	Décrit par Abelson
ACA :	Anomalies cytogénétiques additionnelles
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	Adénosine triphosphate
BCR :	Break point cluster region
BCR-ABL :	Gène de fusion
LB :	Lymphocyte B
CCyR :	Réponse cytogénétique complète
CHR :	Réponse hématologique complète
CMR :	Réponse moléculaire dite complète
CSL :	Cellules souches leucémiques
FISH :	Hybridation in situ en fluorescence
ETOS :	European Treatment and Outcome Study for chronic Myeloid leukemia
IFN α :	Interféron α
IM :	Imatinab
ITK :	Inhibiteur de la tyrosine kinase

KD :	Kilo dalton
KB :	Kilobase
LMC :	Leucémie myéloïde chronique
MDR :	Multidrug-resistance
M-bcr :	Major breakpoint cluster region
m-bcr :	Minor breakpoint cluster
NK :	Natural killer
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Ph :	Chromosome Philadelphie
RT-QPCR :	Rétrotranscription quantitative real time polymerase Chain reaction
RT-PCR :	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
RCC :	Rémission cytogénétique complète
RM :	Réponse moléculaire
RMC :	Réponse moléculaire complète
RMM :	Réponse moléculaire majeure
RMP :	Réponse moléculaire profonde
LT :	Lymphocyte T
TK :	Tyrosine kinase
Mbcr :	Micro breakpoint cluster

INTRODUCTION

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par l'accumulation de cellules progénitrices myéloïdes dans la moelle osseuse, le sang et les tissus corporels. C'est une maladie très rare dans le monde, représentant environ 15% de tous les cas.

Toutes les leucémies. Elle se caractérise par une anomalie génétique acquise. Dans LMC cette anomalie est la découverte d'un chromosome anormalement petit, le chromosome de Philadelphie, causé par une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Le chromosome 22 résultant porte un gène d'une fusion anormale appelée BCR-ABL qui produit une activité protéique chimérique avec une tyrosine kinase (1).

La leucémie myéloïde chronique est une maladie sanguine "chronique" comportant trois phases cliniques : la première est une phase chronique structurée relativement bénigne qui peut durer des années, suivie d'une phase accélérée et enfin d'une phase fatale (phase blastique).

Le diagnostic de leucémie myéloïde chronique repose le plus souvent sur des arguments cliniques (âge, splénomégalie essentielle) et hématologiques. Il est confirmé soit par la recherche de chromosomes PH en cytogénétique, qui peut détecter des aberrations chromosomiques complémentaires (ACA), soit par FISH, qui peut également détecter des cas de PH et des délétions ABL masquées. La biologie moléculaire utilise la RT-PCR qualitative pour détecter de manière fiable les transcrits de fusion bcr-abl

Dans notre travail de recherche se résume en une étude bibliographique ayant pour objectifs dans un premier temps de tirer les données épidémiologiques, cliniques, biologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire dans le diagnostic et le suivi de LMC. De plus, on a mis en évidence l'intérêt et l'indispensabilité de la RT-PCR Mutiplex dans le suivi moléculaire chez les patients atteint de LMC.

CHAPITRE 1: GENERALITES SUR LA LMC

1.1 Rappels

1.1.1 Moelle osseuse, la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde :

La moelle osseuse (MO) est un organe chez l'adulte pesant entre 1,6 kg et 3 kg, situé dans la cavité médullaire des os suivants :

- Les os plats (crâne, ilium, os du bassin, côtes, sternum et colonne vertébrale) (1).
- Les os longs comprennent ; l'os le plus long en largeur tel que le fémur (le plus gros os du corps humain), ces os fonctionnent pour supporter le poids du corps et son mouvement. Son emplacement principal est la structure osseuse des extrémités, qui comprend les extrémités des os des membres inférieurs (tibia, péroné, fémur) et les extrémités supérieures (humérus, radius, zinda) (2).

La moelle osseuse est constituée de cellules souches hématopoïétiques multipotentes myéloïdes et lymphoïdes, qui sont l'origine de toutes les cellules du sang.

- **La lignée myéloïde donnera :**

- Plaquettes qui aident au processus de coagulation du sang,

- Les globules rouges qui transportent l'oxygène,

- Deux types de globules blancs : les granulocytes (ou cellules polymorphonucléaires) et les monocytes, jouent un rôle dans le système immunitaire qui combat les infections.

- **La lignée lymphoïde donnera :** elle est l'origine d'un autre type de globules blancs : les lymphocytes Jouent un rôle dans les processus du système immunitaire (Figure 1). (3)

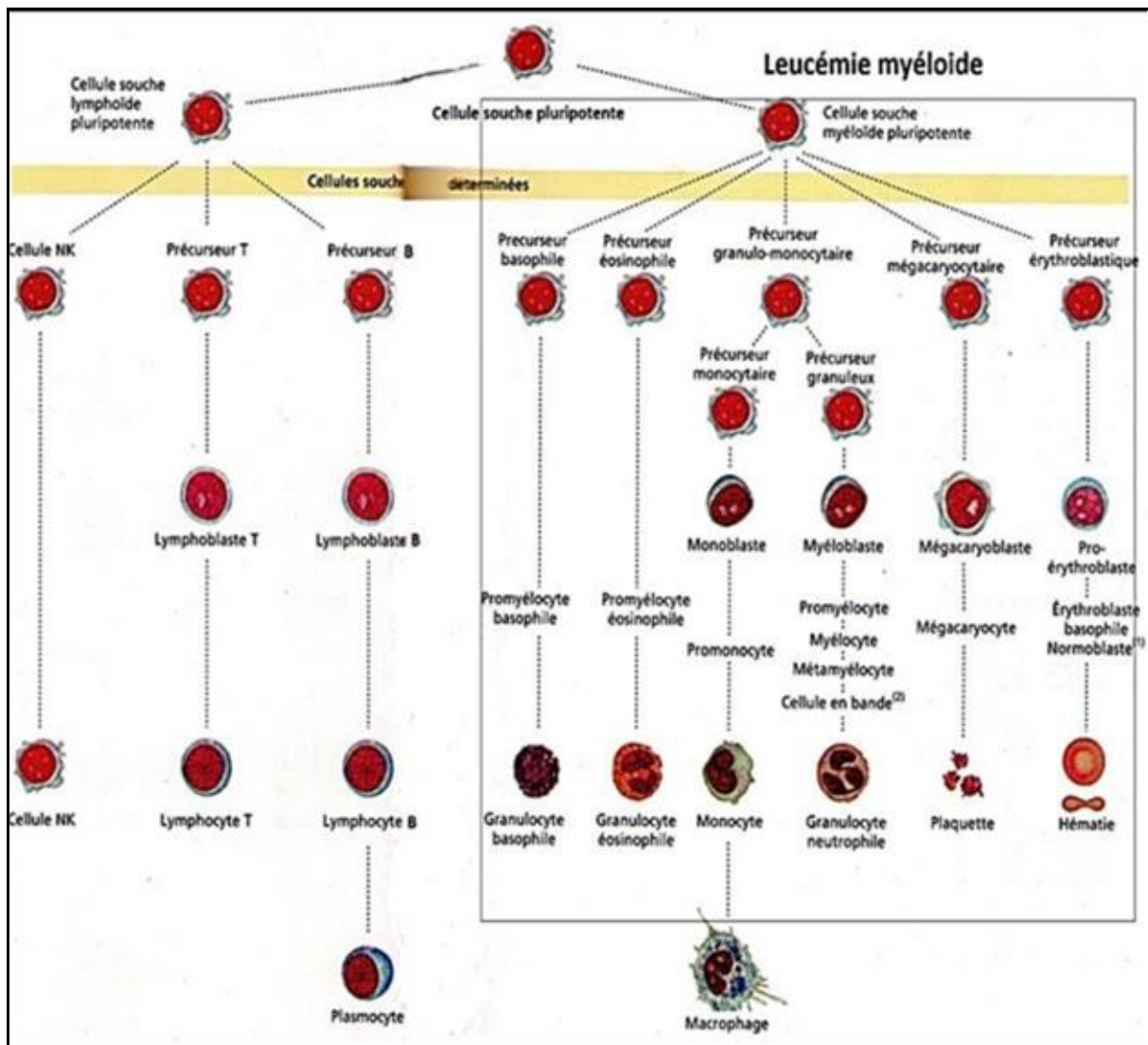


Figure 01. Compartiments de l'hématopoïèse et de la leucémie myéloïde (4).

1.1.2 La leucémie, un cancer

La leucémie est caractérisée par des troubles sanguins caractérisés par une prolifération cellulaire anormale de leucocytes (5.6).

La maladie est localisée dans la moelle osseuse, la source des cellules sanguines (globules blancs, globules rouges et plaquettes). Le cancer survient lorsque les cellules normales de la moelle osseuse mutent (7).

1.1.3 La leucémie myéloïde chronique (LMC)

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne rare appartenant au groupe de néoplasies myéloprolifératives (8), qui construisent potentiellement des globules blancs au stade de la différenciation. La maladie peut être transmise entre deux principaux types de maladies : la maladie peut affecter aiguë et chronique (9).

Le terme « chronique » décrit la progression progressive ou graduelle Lente, et « myéloïde » indique qu'il provient des cellules myéloïdes.

Dans la leucémie myéloïde chronique, la moelle osseuse produit beaucoup trop de cellules sanguines myéloïdes à différents stades de maturation, comprenant notamment des cellules connues sous le nom de granulocytes, de métamyélocytes et de myéloblastes immatures. Les plaquettes et les basophiles (différentes cellules myéloïdes responsables, en partie, des réponses allergiques) sont souvent également en excès lors du diagnostic. La production excessive de cellules sanguines myéloïdes dans la moelle osseuse empêche la production normale de globules rouges, dont le rôle dans le transport de l'oxygène à destination des cellules de l'organisme est essentiel. Cette surproduction peut aussi réduire le nombre de plaquettes (thrombocytopénie). Or, les plaquettes sanguines jouent un rôle crucial en cas de saignement (10).

La LMC est diagnostiqué chez les patients lorsque l'on retrouve plusieurs symptômes tels que : manque de tonus ou anémie, saignements, douleurs ou inconfort au niveau de l'abdomen, ainsi qu'une perte d'appétit, un peu de poids et des nausées, puis des signes de pâleur apparaissent, des ecchymoses à la suite de numération plaquettaire insuffisante, hypertrophie de la rate, lymphadénopathie, fièvre, lésions cutanées, essoufflement, douleurs osseuses, satiété précoce (10).

La plupart des patients subissent une numération formule sanguine, la leucopénie (le nombre de globules blancs circulant dans le sang) est plus élevée que la normale (11). En plus du déséquilibre génétique, de sorte que deux chromosomes échangent par erreur des parties de leurs gènes, ce qu'on appelle la translocation réciproque. Pour LMC, les gènes du chromosome 9 sont permutés avec les gènes du chromosome 22, le gène de la leucémie d'Abelson (ABL) sur le chromosome 9 et le gène BCR porté sur le chromosome 22 formant le chromosome de Philadelphie (translocation des chromosomes 9 et 22, En bref t(9 ;22)).

Cette mutation peut être détectée dans 95% des patients qui souffrent de LMC, elle provoque un dysfonctionnement de l'enzyme tyrosine kinase, qui induit un comportement anormal des cellules atteintes. Cela se traduit par la formation de cellules immortelles, le renouvellement et la reproduction accélérée. La LMC touche un peu plus les hommes que les femmes, et avec l'âge, le risque de développer une leucémie myéloïde chronique augmente **(12)**.

Quant au développement de la LMC, il passe par trois stades fondamentaux :

- Stade chronique : À ce stade, la plupart des patients reçoivent un diagnostic de la maladie. Au cours de cette étape, la leucémie se développe lentement et il y a peu ou pas de symptômes de leucémie. Certains globules blancs anormaux restent dans la moelle osseuse et le sang. En l'absence de traitement, cette étape se poursuit au rythme de quatre ans.
- Phase accélérée : l'augmentation des pourcentages de globules blancs correspond à des anomalies du sang et de la moelle osseuse, et à une augmentation de la charge BCR-ABL ou à l'apparition de nouvelles anomalies chromosomiques. Les symptômes non spécifiques sont plus fréquents, tels que la fatigue et la léthargie, l'appétit involontaire et la fièvre **(13)**.
- Le stade dit « d'éclatement » ou la phase blastique de la maladie, qui est atteint lorsqu'il y a plus de 30 % de cellules anormales dans le sang. Au-delà du jeu de la vie du patient **(14)**.

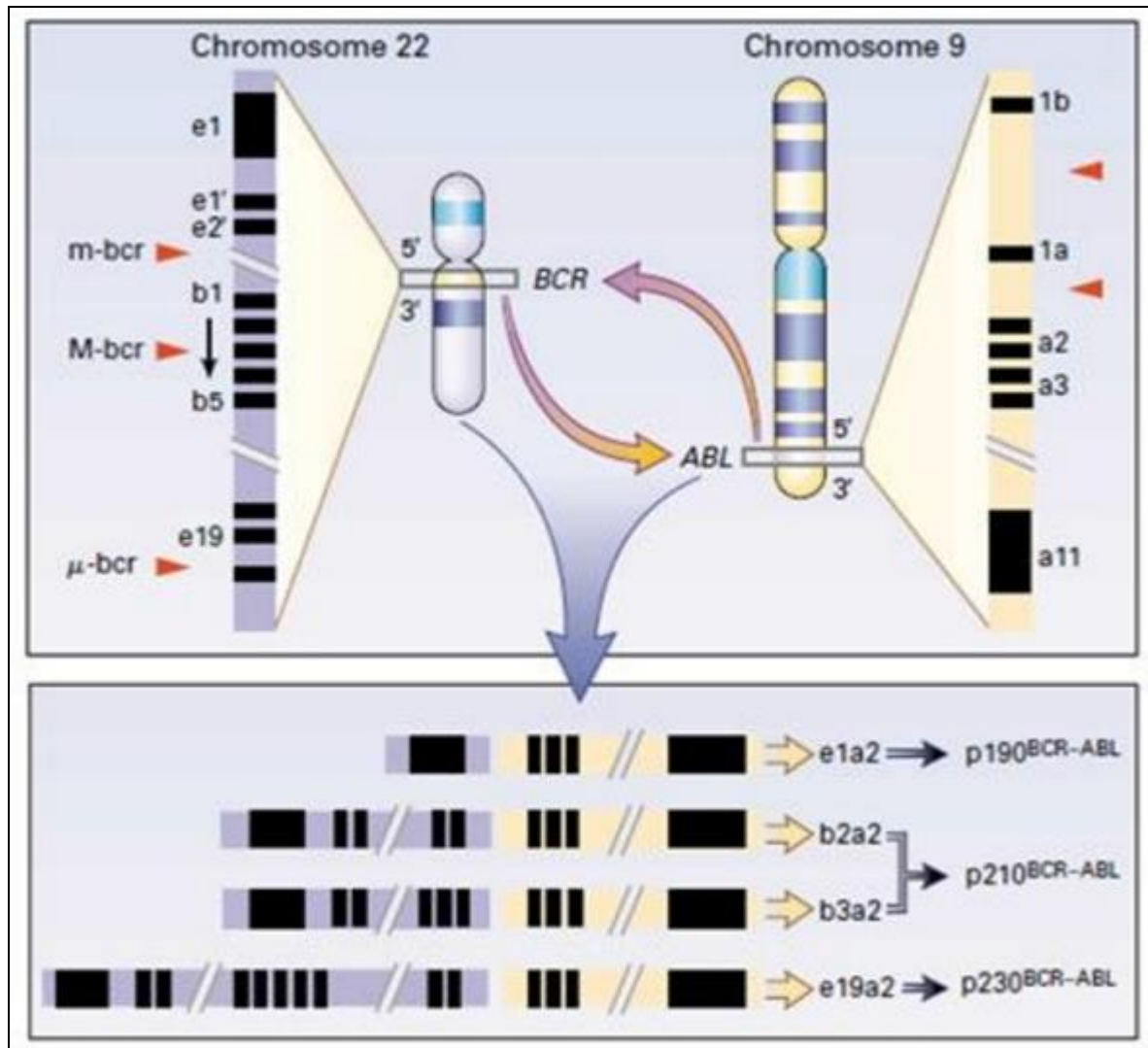


Figure 02. Translocation t(9; 22)-(q34.1 ; q11.2) et les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl dans la LMC (15).

1.2 Epidémiologie

La LMC représente 15% des leucémies de l'adulte, avec une incidence évaluée entre 10 et 15 cas/million/an, sans aucune restriction géographique majeure ou différence ethnique (16).

Cette incidence est faible en Algérie, mais, a commencé à augmenter ces dernières années. Une étude épidémiologique de 1994 à 2004 a montré une augmentation de 0,19 cas en 1994 à 0,4/100 000 habitants en 2004. La répartition annuelle des nouveaux cas de leucémie myéloïde chronique est passée de 53 en 1994 à 130 en 2004, soit une moyenne de 88 nouveaux cas par an. L'étude a montré une légère prédominance masculine, avec un ratio de 1,12. L'âge moyen au diagnostic est de 44 ans Selon la Société Algérienne d'Hématologie (SAH), il y a 250 nouveaux cas par an (17).

Le premier registre des cancers a été créé en France en 1975. (19) En 2012, 807 nouveaux cas de LMC ont été recensés, soit une incidence estimée entre 0,6 et 1 pour 100 000 habitants. De plus, les personnes de plus de 50 ans ont une nette prédominance masculine. Quant aux enfants et adolescents, elle est moins fréquente puisqu'elle ne représente que 3 % des nouveaux cas diagnostiqués. Leucémie infantile (18).

LMC aux États-Unis en 2021 : environ 9 110 nouveaux cas ont été diagnostiqués (5150 hommes, 3960 femmes) et environ 1220 Mourront de la LMC (680 hommes et 540 femmes) Environ 15 % de tous les nouveaux cas de leucémie sont des leucémies myéloïdes chroniques (20).

1.3 Historique

Le Français Alfred Velpeau a décrit le premier cas de leucémie en 1827, il a observé chez un patient un agrandissement de la rate et du foie associé à de la fièvre, une faiblesse généralisée, ainsi qu'un sang épais (22).

La LMC a été premièrement décrite par Hughes Bennett en 1840, un médecin d'Edinburgh, qui pensait que la maladie était une infection. Lorsqu'il étudiait des patients décédés, il constata un lien entre les signes cliniques : la splénomégalie, l'hépatomégalie et le sang qu'il qualifie de « suppurant » ou même de « sang blanc ». Quelques semaines plus tard, R. Virchow, qui a publié un cas similaire, a postulé que la maladie n'était pas infectieuse et a estimé que la cause de la maladie était une altération dans l'hématopoïèse. Il a inventé le terme descriptif « Weisses blut » ou « sang blanc » qui est devenu en allemand « Leukamie » (23).

Plus tard, Alfred Donné décrivit le cas d'un patient présentant à l'autopsie une hypertrophie de la rate et dont le sang semblait semi-purulent au microscope. La première description de leucémie fut néanmoins créditée à John Hughes Bennett décrivit la leucémie à Édimbourg en 1845 (22).

En 1846, Fuller a décrit le premier cas de diagnostic chez un patient vivant et le terme de « leucocythaemia » a été proposé en 1848. Neumann, en 1870, affirme que l'origine des cellules responsables de cette pathologie est la moelle osseuse (24).

La prochaine grande avancée dans l'histoire de la leucémie myéloïde chronique aura lieu 100 ans plus tard. Au début des années 1960, avec l'avènement de la cytogénétique, deux chercheurs Philadelphie : Peter Nowell et David Hungerford découvrent un petit chromosome dans les cellules tumorales de patients atteints de LMC. Ils ont donné le nom de la ville trouvée : Philadelphie (Ph). C'est la première fois qu'une anomalie chromosomique est liée à une maladie maligne (25), cette translocation réciproque t(9;22)(q34.12;q11.23) se trouve dans les cellules leucémiques des patients atteints de LMC et est elle a été décrite par Janet Rowley, en 1974, comme la première anomalie cytogénétique acquise et caractérisation du processus tumoral (21). Avec l'avènement de la technologie Molécule, proto-oncogène ABL (Abelson) présente au niveau de rupture Le chromosome 9 a été identifié par De Klein en 1982. (26, 28)

À partir de 1996, l'équipe de Drucker a commencé un essai clinique en phase chronique d'un inhibiteur de la tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique. En 1998, les laboratoires Novartis ont lancé un médicament anti-tyrosine kinase qui agirait précisément au niveau de la protéine abl. Ce médicament est l'imatinib qui a révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique (27).

1.4 Etiologie

L'étiologie de la leucémie myéloïde chronique est plus ou moins connue à ce jour, alors que l'anomalie génétique à l'origine de la maladie n'est pas héréditaire mais acquise avec le temps. L'étude a montré qu'il n'y avait pas de données dans le registre du cancer et le registre suédois de la LMC multigénérationnelle (29). En particulier, plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette condition, y compris : Facteurs génétiques : Le regroupement familial a été décrit dans divers types d'anémie pernicieuse, en particulier dans la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome. Les clusters regroupent souvent plusieurs types de leucémies lymphocytaires spécifiques, et aucune étude génétique n'a documenté de tels clusters de LMC. Facteurs environnementaux : jouent un rôle dans le risque de LMC. De fortes doses de rayonnement. La chimiothérapie ionisante et le cancer peuvent également être à l'origine d'un déficit immunitaire acquis ou humoral (30). Parmi ces facteurs : Le rayonnement ionisant était le seul facteur de risque. Il existe une association bien établie entre le développement du myélome cancéreux chronique et le niveau d'exposition aux radiations chez les survivants du bombardement atomique d'Hiroshima (31). Il a été rapporté que les produits contenant du

benzène étaient significativement associés à une augmentation de la morbidité et de la mortalité (32).

1.5 Aspects cliniques

La LMC passe par trois stades fondamentaux au cours de son développement normal. Ces phases sont la : phase chronique, la phase accélérée et enfin la phase blastique.

La phase chronique :

Comme pour la première étape, qui dure plusieurs années (3 à 5 ans en moyenne) les cellules sont surveillées durant cette phase la moelle osseuse et le sang contiennent moins de 5% de blastes et les plaquettes sanguines sont encore à un taux normal. Il y a du sang blanc à ce stade et une hypertrophie de la rate est observée. La plupart des patients présentent des symptômes tels qu'une perte de poids et des douleurs abdominales (33).

Phase d'accélération :

Correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée 12 à 18 mois en moyenne. (34). Elle est caractérisée par échec du traitement, aggravation de l'anémie, thrombopénie ou thrombocytose progressives ou aggravation persistante de la splénomégalie, évolution clonale, augmentation des basophiles du sang, et augmentation des blastes osseux ou sanguins (jusqu'à 19%). (35)

La phase plastique : Celle-ci est considérée comme le stade ultime de la maladie, semblable à la leucémie aiguë myéloïde, qui survient après un délai moyen de 4 ans dans la progression de la maladie (sans traitement) et entraîne la mort dans 2 à 6 mois après le diagnostic des cellules blastocytaires.(36) Correspond cliniquement à une augmentation des signes de la phase accélérée, tels que (situation générale variable, splénomégalie, anémie, thrombocytopenie, myélofibrose) et parfois à des signes d'insuffisance médullaire et de syndromes néoplasiques (fièvre, hépatomégalie, gonflement des ganglions lymphatiques, douleurs osseuses) peut survenir de manière explosive, c'est-à-dire de la phase chronique à la phase aiguë sans passer par la phase accélérée (37). Elle est déterminée par la présence de plus de 20 % de Explosions de moelle osseuse (34)

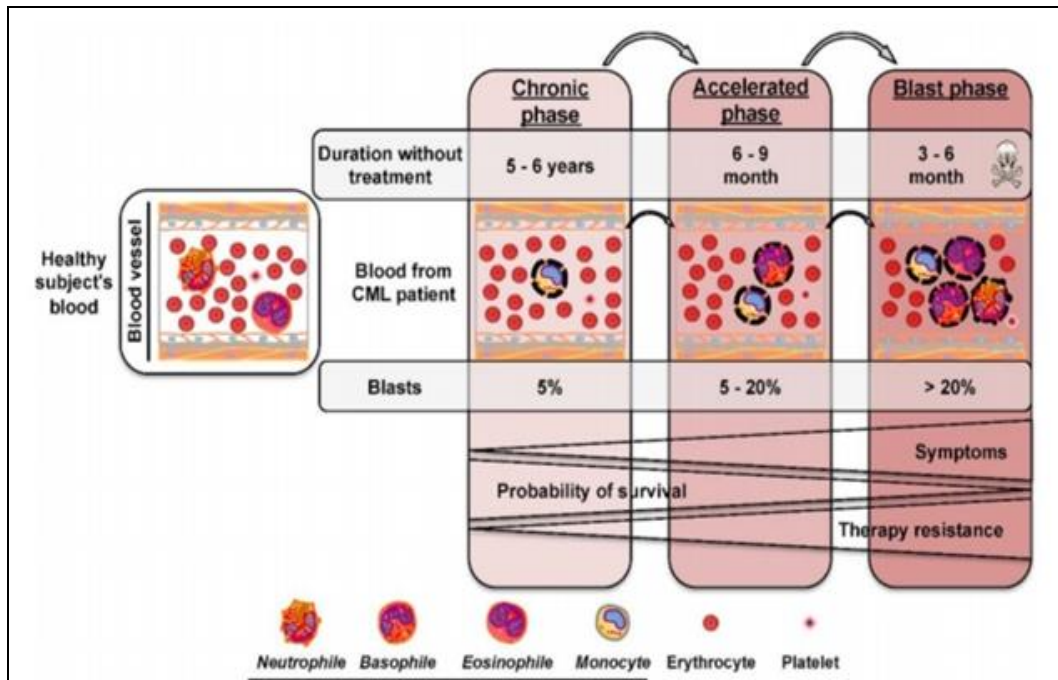


Figure 03. Schéma de progression de Leucémie Myéloïde Chronique (38)

CHAPITRE 2 : LMC ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

2.1 Physiopathologie moléculaire :

La prolifération est due à une anomalie acquise de la cellule souche hématopoïétique : c'est une anomalie cytogénétique due à la présence du chromosome Philadelphie (ph1) qui résulte d'une translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22, t(9;22)(q34.12;q11.23), et qui est quasi constante dans la LMC.

Toutes les cellules d'origine myéloïde, granuleuses, érythroblastiques, mégacaryocytaires, ainsi que les lymphocytes B sont porteuses de la translocation t(9;22). Cette anomalie, la t(9;22) met en contact un site oncogène (ABL) situé sur le chromosome 9 et une région du chromosome 22 appelée < major break cluster région > (M-BCR) mise en évidence sur le caryotype des cellules médullaires et surtout par les techniques de biologie moléculaire : chromosome de Philadelphie, il s'agit d'un gène hybride BCR-ABL dont le produit est un ARN messager dont la traduction code pour une protéine responsable de son activité oncogène, dont l'activité tyrosine kinase est un élément essentiel de sa fonction leucémogène (39,40).

2.1.1 Le chromosome de Philadelphie:

Une anomalie chromosomique acquise, le chromosome dit de Philadelphie (Ph1), est caractéristique de la LMC. Le terme Philadelphie vient du fait que le raccourcissement du bras long du chromosome 22 a été décrit à Philadelphie, en 1960. Cette translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 a constitué le premier marqueur chromosomique décrit dans une affection maligne (40).

Cette translocation, notée par les scientifiques par la formule t(9;22)(q34.12;q11.23), aboutit à la fusion de deux gènes normaux, ABL1 du chromosome 9 et BCR du chromosome 22. Les points de cassure se situent :

- Sur le chromosome 9 en amont de l'exon 2 de l'oncogène d'Abelson ABL1 est localisé en position 9q34. Son nom est dérivé de son homologue viral, le gène Abelson (v-ABL), responsable d'une forme de leucémie chez la souris.
- Sur le chromosome 22, au niveau du gène BCR (Break Cluster Region). Le gène BCR, positionné sur le bras long du chromosome 22, a été découvert en clonant la région appelée Major-Break point Cluster Region ou M-BCR, lieu de la majorité des points de cassure.

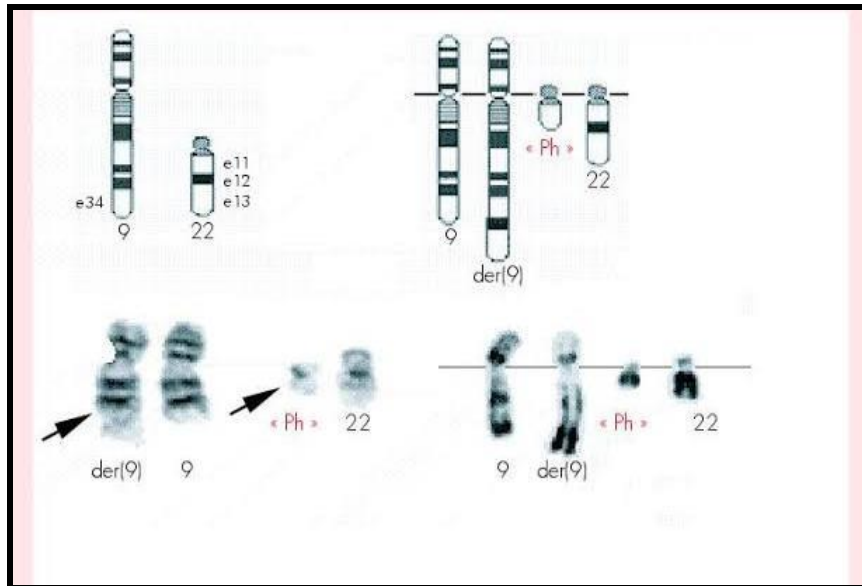


Figure 04. Le chromosome de Philadelphie (39)

2.1.2 Fonctions de la protéine ABL

Le gène ABL code une protéine tyrosine kinase de 145 kDa, sans fonction de récepteur (cette protéine est l'homologue de l'oncogène v-abl du virus leucémogène murin Abelson). Elle est exprimée de façon ubiquitaire et est retrouvée dans le noyau et dans le cytoplasme. Dans le compartiment nucléaire, Abl joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire. Lors de la phase G₀, Abl se lie à l'ADN et forme un complexe avec des protéines inhibitrices du cycle telles que pRb (protéine du rétinoblastome). Lors de la transition G₁/S, la protéine pRb est phosphorylée et se dissocie d'Abl, ce qui permet son activation. Quand elle est localisée dans le cytoplasme, la protéine Abl joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance (40,41).

La région N-terminale de la protéine comporte deux domaines d'interaction SH₂, SH₃, ainsi que le domaine catalytique SH₁ qui présente l'activité tyrosine kinase. Un domaine central riche en prolines permet des interactions avec des protéines possédant des domaines SH₃, à l'exemple de la protéine Crk. La région C-terminale présente un domaine de liaison à l'ADN (DNABD), trois signaux de localisation nucléaire NLS et un site de liaison à l'actine.

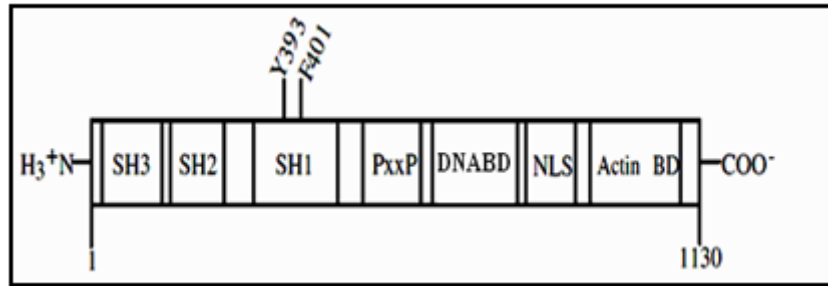


Figure 05. La protéine ABL (41).

Dans le cas normal, ABL se trouve dans un état inactif à cause de l'interaction à la kinase « auto-inhibition ». Il peut être activé par l'intervention d'autres protéines, dont d'autres kinases, qui s'associeront à l'ABL, et viseront à la rouvrir, modifiant ainsi sa conformation de sorte que son substrat et l'ATP puissent avoir un accès au site de phosphorylation.

La protéine ABL est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réponse au stress génotoxique et la transmission de l'information passant par les intégrines. En plus, La protéine ABL peut induire l'apoptose en stabilisant la protéine p73 et/ou la protéine p53.

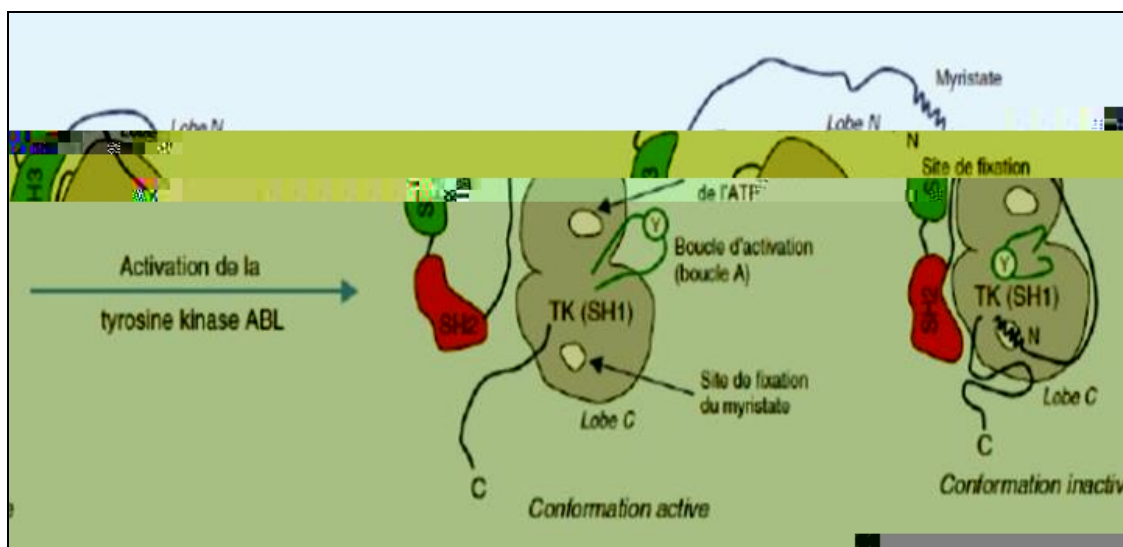


Figure 06. DTK d'ABL et mécanisme d'action (42)

2.1.3 Fonction de la protéine BCR :

Le gène bcr code pour deux protéines de 160 et de 130 kDa, provenant de la traduction de deux ARNm de 6,7 et de 4,5 kb. La protéine BCR a une expression ubiquitaire avec des quantités élevées au niveau des cellules hématopoïétiques et du cerveau 35. Elle est

essentiellement cytoplasmique mais, dans certaines phases du cycle, elle est aussi détectable dans le noyau où elle pourrait se lier à l'ADN (42). Les fonctions biologiques normales de la protéine BCR sont encore mal connues.

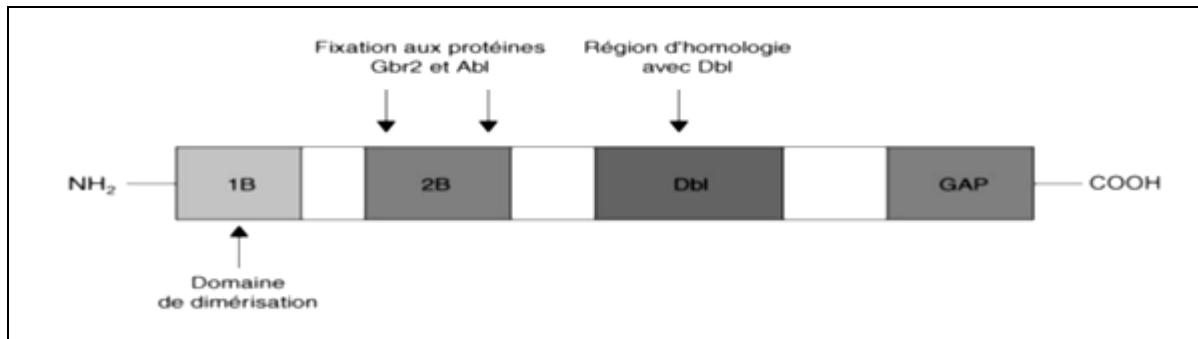


Figure 07. La protéine BCR (43)

La région N-terminale présente un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine d'oligomérisation. Le domaine d'oligomérisation est responsable de l'homotétramérisation de la molécule et est indispensable à l'activité transformante de la molécule. On retrouve dans la région centrale un domaine composé de séquences DBL-like et homologues à la pleckstrine qui stimulent l'échange GTP-GDP par les Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). La région C-terminale présente des séquences homologues aux domaines catalytiques des protéines GAP (GTPases-activating protein) agissant sur Rac et régulant la polymérisation de l'actine ainsi que l'activité NADPH oxydase des macrophages et granulocytes neutrophiles. La protéine BCR peut être phosphorylée sur plusieurs résidus tyrosyl notamment, dans la région N-terminal, sur le résidu Tyr 177 qui lui permet d'interagir avec différentes protéines adaptatrices via leur domaine SH2 (43).

2.1.4 Le gène de fusion hybrid BCR/ABL1:

Le gène chimérique BCR-ABL1 résulte de l'hybridation du segment 5' (N-terminal) du gène BCR et du segment 3' (C-terminal) du gène ABL1. Il sera transcrit en ARN messager BCR-ABL1 qui sera ensuite traduit en une protéine oncogénique BCR-ABL1 dotée d'une forte activité enzymatique tyrosine kinase. Cette protéine de fusion BCR-ABL1 est localisée au niveau cytoplasmique. On parle d'une activité tyrosine kinase active de façon constitutive car la conservation du domaine 1B issu de BCR lui confère une capacité de dimérisation. Elle possède également une capacité d'auto-activation par transphosphorylation. La perte de la région N-terminale, comprenant la partie régulatrice inhibitrice d'ABL1, empêche la

régulation négative de cette protéine. En résulte ainsi une activation permanente de la tyrosine kinase d'ABL1.

Alors que les points de cassure dans ABL1 se situent généralement entre les exons 1a et 1b (44), il existe différents points de cassure possibles sur le gène BCR, entraînant ainsi des transcrits de taille variable

Le point de cassure se situant majoritairement (95 % des cas) dans la région M-BCR, on observe deux types d'ARNm BCR-ABL1, e13a2 (ou b2a2) ou e14a2 (ou b3a2) suivant si le point de cassure se situe dans l'intron 13 ou 14 de BCR. Ces deux ARNm seront traduits ensuite en la même protéine de fusion de 210 kDa : la p210 BCR-ABL1. Dans de plus rares cas, le point de cassure se situe dans une zone différente, aboutissant à une protéine de fusion de poids moléculaire différent. Si le point de cassure se situe entre les exons 1 et 2 de BCR, dans la région m-BCR (< 5 % des cas de LMC), l'ARNm (e1a2) codera pour une protéine de fusion possédant un poids moléculaire de 190 kDa dite p190 BCR-ABL1. Cette protéine est retrouvée beaucoup plus fréquemment dans les leucémies aiguës Lymphoblastiques (LAL) à chromosome Philadelphie. Si le point de cassure se situe entre les Exons 19 et 20, région μ -BCR (< 1 % des cas de LMC), l'ARNm (e19a2) sera traduit en une Protéine de fusion de 230 kDa, dite p230 BCR-ABL1.

Plus rarement le point de cassure dans ABL1 peut survenir dans l'intron 2 entraînant alors la Juxtaposition de l'exon 13/14 de BCR avec l'exon 3 d'ABL1 (e13a3, e14a3) (45).

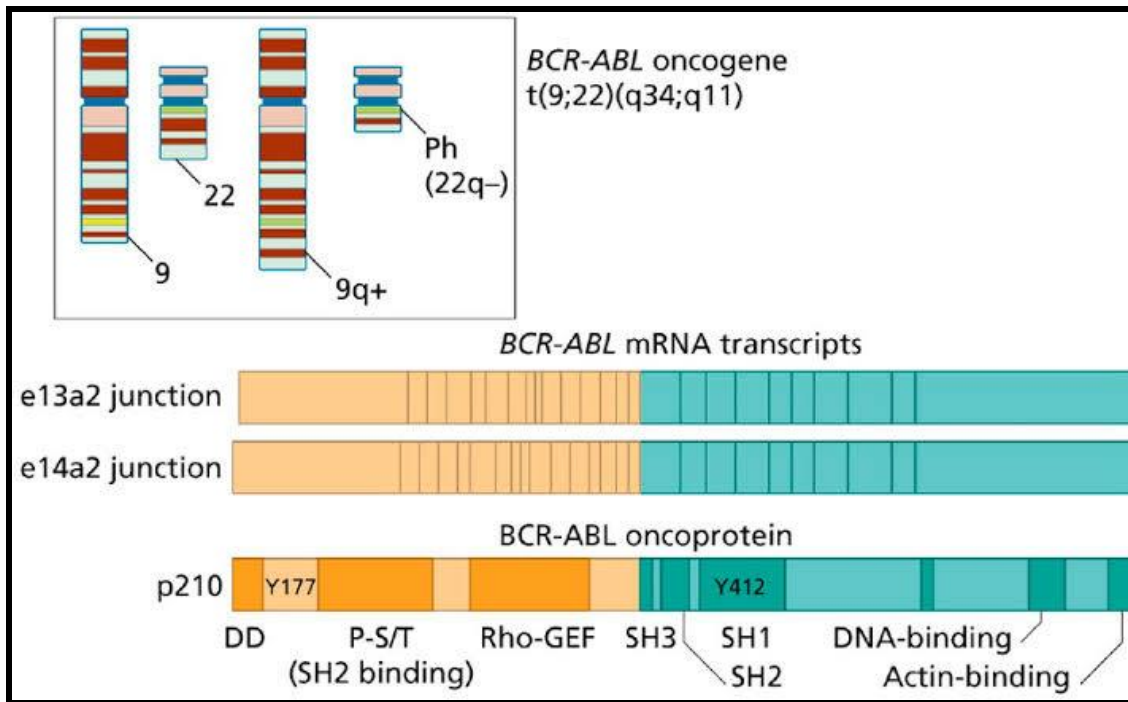


Figure 08. Différents gènes de fusion BCR-ABL et leur protéine résultantes (44)

CHAPITRE 3: DIAGNOSTIQUE DE LMC

3.1 Diagnostic biologique :

3.1.1 Hémogramme

L'hémogramme ou Numération–Formule Sanguine (NFS) est le test biologique pour La référence qui seule permet de rappeler la LMC (39, 40).

- Une hyperleucocytose à prédominance surtout granulocytaire (au moment du diagnostic le taux des leucocytes est généralement de l'ordre $100 \cdot 10^9$ /litre pour une normale comprise entre $4 \cdot 10^9$ /litre et $10 \cdot 10^9$ /litre)
- Une anémie (taux d'hémoglobine inférieur à 11g/dl, dont la norme varie entre 12g/l et 18g/l),
- Une thrombocytose, le taux normal des plaquettes varient entre $400 \cdot 10^9$ /litre à $700 \cdot 10^9$ /litre pour une valeur normale comprise entre $150 \cdot 10^9$ /litre et $400 \cdot 10^9$ /litre)
- Thrombopénie, cas rare pour les patients LMC, dont, le taux des plaquettes est très inférieurs de limite inférieure $150 \cdot 10^9$ /litre
- La myélémie est la présence de nombreuses cellules jeunes immature dans le sang, pour la phase chronique elle est moins de 6%, pour la phase accélérée est entre 6% à 30% et la à phase blastique elle est plus de 30% (116).

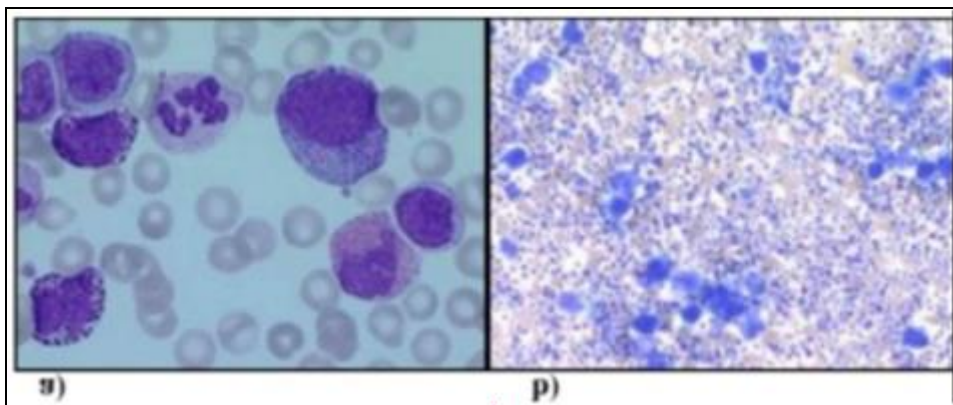


Figure 09. Aspect du frottis sanguin et de l'étalement médullaire, (b) montrant une hyperplasie granuleuse pour une LMC en Phase chronique (39)

3.1.2 Myélogramme

Cette dernière est l'un des tests qui étayent l'hypothèse diagnostique de la LMC, car elle montre une cellularité accrue de la moelle osseuse, une hyperplasie granulomateuse marquée et moins de 10 % de gonflement de la moelle osseuse en phase chronique. Nombre et volume de mégacaryocytes. Cet examen est très important pour déterminer le stade de la maladie, et pour mettre en place le traitement initial, une ponction est réalisée au niveau de l'ilium sous anesthésie locale, sous trocart de Mallarmé (41,42).

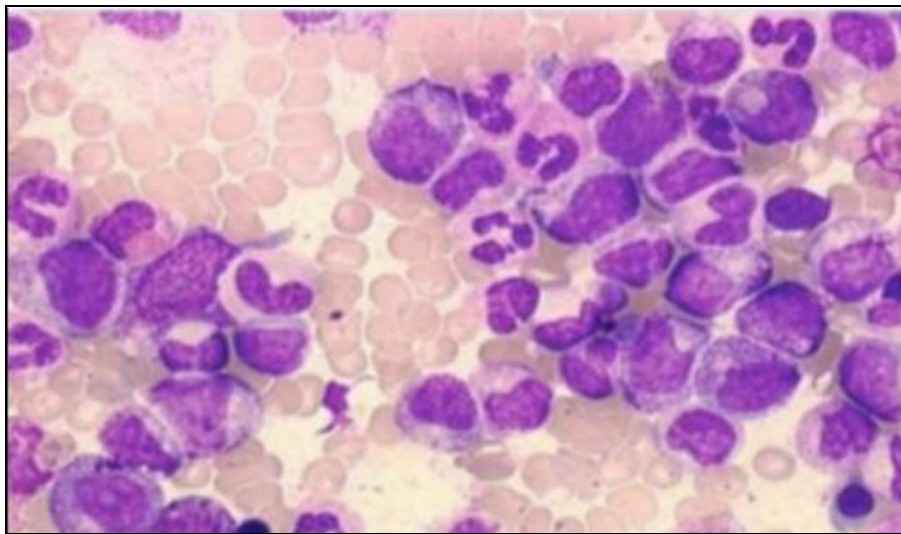


Figure 10. Myélogramme montrant une hyperplasie granuleuse(43)

3.2 Diagnostique cytogénétique

Le sujet de cette étude est le chromosome de Philadelphie (Ph), qui représente une grande proportion de 95 % des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Cependant, les patients de LMC à la phase blastique, qui est considéré comme un échec au traitement et un critère d'évolution de la maladie, présentent d'autre type d'anomalie chromosomique en plus de la translocation réciproque $t(9;22)(q34.12;q11.23)$, par exemple, la duplication du chromosome Philadelphie, les trisomies 8 et 19 et un isochromosome (17q), $t(1;21)$, $t(7;17)$, $t(8;17)$, $t(2;12)$;etc. (51,48)

3.3 Cytogénétique moléculaire, Technique FISH (Hybridation in situ par fluorescence):

La FISH est un test volontaire qui détecte les chromosomes masqués par les caryotypes conventionnels (44). Il nous montre clairement le gène de fusion BCR-ABL dans le noyau et nécessite l'utilisation de sondes avec des colorants fluorescents. Pour différencier les gènes BCR et ABL de première génération, nous avons utilisé deux types de colorants fluorescents (rouge et vert) et jaune pour détecter le point de fusion en présence d'une translocation sur le dérivé 22q (45).

Le test, utilisé sur des échantillons de sang, détecte 95 % des cellules capables de réarranger BCR-ABL. Il est également utilisé dans les cas difficiles, car, la majorité des cas confiant de caryotype normal (46,47) Bien que l'imagination directe soit basée sur les gènes de fusion BCR-ABL1 dans le noyau (interphase FISH) ou en mitose (métaphase FISH), ce dernier est requis en cas de leucémie myéloïde chronique à chromosome PH négatif et doit être couplé au caryotype. Il s'agit d'une technique plutôt ciblée qui ne permet pas d'analyser la totalité du génome et donc ne permet pas la détection d'anomalies chromosomiques supplémentaires (49, 50) puisque, la technologie repose sur le principe de l'utilisation d'un capteur fluorescent qui se lie à l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ceci a été fait en utilisant des sondes capables de détecter les gènes BCR et ABL. Chaque sonde est associée à un colorant fluorescent spécifique, où chaque couleur identifie le chromosome (9 ou 22) de chacun des deux gènes, et l'oncogène BCR-ABL peut être détecté en superposant ces deux couleurs.

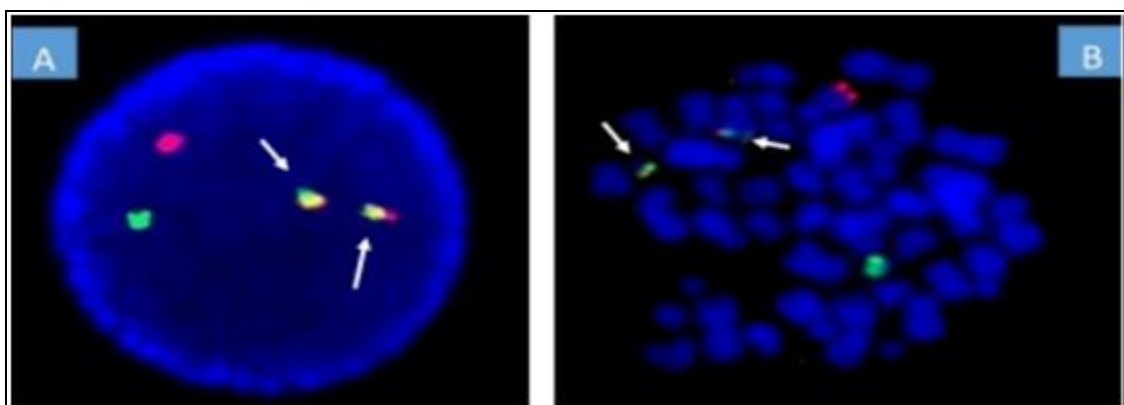


Figure 11. Le résultat FISH de la translocation t(9 ;22). **A** : FISH interphasique. **B** : FISH métaphasique (illustration du métaphase d'un de nos patient présentant la translocation t(9,22) avec la sonde dual FISH.(52)

3.4 Biologie moléculaire :

Le diagnostic moléculaire permettra l'identification et la quantification des transcrits BCR-ABL qui existe dans la moelle osseuse et le sang. Ceci est indispensable pour assuré le bon suivi moléculaire des patients atteint de LMC, avec la possibilité de changement thérapeutique à temps avant sa formation aigue.

3.4.1 Le Southern-blot

Cette méthode a été la première disponible pour l'analyse moléculaire de la translocation BCR-ABL. Elle permet la mise en évidence des réarrangements chromosomiques de BCR-ABL sous forme de modifications des fragments obtenus après digestion enzymatique et hybridation avec une sonde BCR.

Cette technique consiste tout d'abord à digérer l'ADN par des enzymes de restriction, le fragmenter puis le colorer. On effectue une électrophorèse pour séparer les fragments, une dénaturation de l'ADN bicaténaire, puis on réalise le transfert de l'ADN sur une membrane en nitrocellulose. On met en contact l'échantillon avec une sonde marquée (composés radioactifs, fluorescents) spécifique, ici le gène *BCR*. Après hybridation, la sonde en excès est éliminée et l'hybridation est visualisée sur un film autoradiographique.

Cette technique est actuellement peu employée en pratique quotidienne et a été largement supplantée par la RT-PCR (53).

3.4.2 RT-PCR (Polymérase Chain Reaction en temps réel ou quantitative) Multiplex :

La RT-PCR multiplex possède des avantages considérables par rapport à la RT-PCR conventionnelle notamment en termes de gain de temps de réalisation (Technique plus rapide), et de sensibilité (seuil de détection 0,1%) grâce à l'utilisation de plusieurs amorces de manière simultanée, elle permet de détecter plusieurs transcrits de fusion BCR-ABL1. Par exemple, le Kit seeplexTM Leukemia BCR/ABL (Seegene, Seoul, Korea) permet en utilisant plusieurs amorces de détecter huit (08) types de transcrit dans une seule réaction de PCR : Mb2a2, Mb3a2, me1a2 et les autres variant, b1a1, b3a3, e19a2, b2a3, c3a2 et e1a3. (108,109)

Les transcrits BCR/ABL1 peuvent être détectés par RT-PCR dans la moelle osseuse ou échantillon de sang afin que les résultats puissent être exprimés sous forme de ratio

transcrits BCR-ABL1/ABL1, ce dernier est un ratio très important à surveiller les patients traités peuvent être évalués pour une maladie résiduelle minimale, sang ou moelle osseuse, pour déterminer la réponse au traitement. **(54-56).**

La RT-PCR est basé sur le principe de l'amplification par PCR de l'ADN complémentaire (ADNc), qui est généré à partir de l'ARN de la séquence d'ADN cible à l'aide d'enzymes spéciales. Quant à l'extraction de l'ARN, c'est une étape plus difficile en raison de la sensibilité des molécules analysées par les ribonucléases, et le processus nécessite trois étapes. La première étape de la lyse cellulaire peut conduire à la libération d'ARN, suivie de l'élimination des protéines de la solution à l'aide d'une technique appelée phénol chloroforme, qui utilise un outil simple et rapide, suivie d'une étape d'inhibition de la transcription inverse en stimulant la polymérase et la destruction ou l'altération de l'ARN hybridé par taq utilise deux types de complément, l'un pour BCR et l'autre pour ABL. **(57)** **(58)** Il permet également l'analyse des produits de la réaction en chaîne de la polymérase de deux manières, l'une sur gel de bromo Agarose directement après la coloration à l'éthidium, l'autre après l'hybridation par transfert de Southern blot.

CHAPITRE 4 : LMC ET TRAITEMENT

4.1 Historique de traitement :

Au fil des ans, le traitement de la LMC a évolué grâce à la découverte de traitements et à l'amélioration des soins aux patients. Les objectifs du traitement dans ce cancer sont la rémission hématologique, cellulaire, cytogénétique et moléculaire, incluant la présence de marqueurs moléculaires qui facilitent cette évaluation.

La splénectomie et l'arsenic ont constitué les tout premiers traitements. Le busulfan en 1953 puis l'hydroxyurée (HYDREA®) dans les années 1970 ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique. Le traitement reposait alors sur une cytoréduction grâce à ces agents alkylants. La durée moyenne de la phase chronique était de l'ordre de 3 ans et la LMC était une affection constamment mortelle (59).

Ce n'est qu'en 1980 que l'interféron-alpha (IFN-G) a permis une amélioration de la survie globale des patients avec obtention de rémissions cytogénétiques complètes et durables. Au début des années 1980 également, il a été établi que la greffe de moelle allogénique était un traitement curatif permettant la disparition du chromosome Ph mais applicable chez une minorité de patients en raison de leur âge avancé ou de l'absence de donneur. La possibilité de faire disparaître le chromosome Ph a permis alors d'envisager des stratégies d'autogreffe avec ou sans mobilisation de cellules souches avec une amélioration de la survie démontrée dans une méta-analyse (démarche consistant à rassembler les résultats de plusieurs essais cliniques conduits séparément). Néanmoins le taux de rechute étant plus important, l'allogreffe classique ou non-myéloablative ou encore à conditionnement d'intensité réduite est aujourd'hui la référence en matière de greffe. (60)

La démonstration de l'effet synergique entre l'IFN-G et l'aracytine par le groupe d'études de la LMC en France a représenté, jusqu'à l'introduction des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), le traitement standard hors greffe. La découverte récente des ITK, plus spécifiques, tel que le mésylate d'imatinib (IM) a réellement bouleversé la prise en charge des malades en modifiant leur médiane de survie mais également la surveillance du traitement. Néanmoins certains patients sous IM présentent des résistances ou une absence de réponse thérapeutique en dépit de l'expression avérée de la molécule cible. (61)

Les inhibiteurs de la tyrosine kinase sont le traitement de référence de LMC quel que soit la phase de la maladie. Ils sont divisés en 3 générations (62) (figure 10) :

- première génération (Imatinib),
- deuxième génération (Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib),
- troisième génération (Ponatinib)

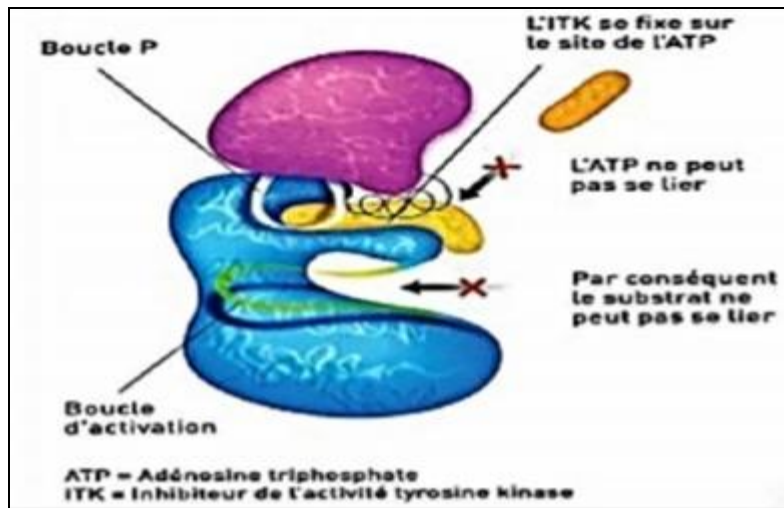


Figure12: Mode d'action des Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITK) (101)

4.2 Score pronostique :

Chez les patients en phase chronique, trois scores ont été développés pour évaluer le pronostic du patient. Cependant, le score Sokal (63) et le score Hasfor (64) ont été développés avant d'entrer sur le marché des ITK. Leur utilisation de la valeur prédictive de la survie a été remise en question. Ils sont basés sur l'âge, la taille de la rate, le nombre de plaquettes et le pourcentage de blastes. Les patients ont été répartis en trois groupes de risque : faible, intermédiaire et élevé.

L'étude EUTOS (European Treatments and Outcomes Study) (65) a été développée à partir d'une cohorte de 2060 patients traités par imatinib entre 2002 et 2006. Contrairement aux résultats de Sokal et Hasford, elle était basée uniquement sur la proportion de basophiles et le volume splénique.

4.3 Réponse au traitement

Le suivi biologique des patients LMC est bien standardisé, Il est en général recommandé d'effectuer une NFS tous les 15 jours jusqu'à obtention de la rémission hématologique complète (RHC) puis tous les 3 mois, un caryotype médullaire à partir de 3 mois jusqu'à l'obtention d'une rémission cytogénétique (RCG), et une quantification du transcrit BCR-ABL1 par RT-qPCR tous les 3 mois jusqu'à au moins l'obtention d'une rémission moléculaire majeure (RMM) définie par un taux de BCRABL1/ABL1 $\leq 0,1$ % confirmé à 3 mois, puis tous les 3 à 6 mois **(66)**.

Différents critères de réponse au traitement ont été définis en tenant compte des caractéristiques cliniques et biologiques de la maladie et surtout de son marqueur, le chromosome Philadelphie et son équivalent moléculaire **(67, 68)**. Ces différents critères sont résumés dans le Tableau ci dessous.

	Définitions	
Réponse hématologique	Complète (RHC) Plaquettes < 450 G/L Leucocytes < 10 G/L Absence de myélémie et < 5% de basophiles Absence de splénomégalie	
Réponses cytogénétiques (% de métaphases Ph1+)	Complète (RCC) Ph1+ = 0% Partielle (RCyP) Ph1+ = 1-35% Mineure (RCym) Ph1+ = 36-65% Minime Ph1+ = 66-95% Absence Ph1+ > 95%	Majeure (RCyM) Ph1+ ≤ 35%
Réponses moléculaires (ratio BCR-ABL1/ABL1)	Majeure (RMM) : ≤ 0,1% (SI) RM ⁴ : ≤ 0,01% (SI) ou un transcrite indétectable avec 10 000 copies ABL1 totales RM ^{4,5} : ≤ 0,0032% (SI) ou un transcrite indétectable avec 32 000 copies ABL1 totales RM ⁵ : ≤ 0,001% (SI) ou un transcrite indétectable avec 100 000 copies ABL1 totales	

Tableau 01. Définitions des réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires (68), (69)

4.3.1 Réponses hématologiques

La réponse hématologique complète (RHC) est définie par la normalisation de la NFS (hémogramme dans les valeurs biologiques de référence) et par la disparition des signes et symptômes cliniques de la maladie (disparition notamment de la splénomégalie). De plus, on évoque une réponse hématologique partielle (RHP) lorsque la diminution de la leucocytose atteint des valeurs entre 10 et 20 g/l ou lorsqu'il y a une normalisation de la NFS mais une persistance de la thrombocytose, de la myélémie ou de la splénomégalie (70).

4.3.2 Réponses cytogénétiques

La réponse cytogénétique est évaluée lors de l'analyse du caryotype médullaire (comprenant au minimum 20 métaphases), selon le pourcentage de cellules porteuses du chromosome Philadelphie. En fonction de cette analyse, cinq groupes sont établis. (Voir tableau 01)

4.3.3 Réponses moléculaires

Les différents niveaux de réponse moléculaire sont établis selon le pourcentage du transcrite de fusion BCR-ABL1 résiduel plasmatique, reporté sur l'échelle internationale. On parle de rémission moléculaire majeure (RMM) lorsque l'on observe une diminution d'au moins 3 log (logarithmes décimaux) du ratio BCR-ABL1/ABL1 par rapport à un seuil standardisé ou un taux inférieur ou égal à 0,1 % IS (sur l'échelle internationale).

Des critères de réponse moléculaire profonde ont été établis en tenant compte du nombre de copies totales d'ABL1 amplifiées et de la détection ou non du transcrite BCR-ABL1. Ces réponses sont décrites dans le tableau 6 et correspondent également à une diminution de log, respectivement : de 4 log pour la RM4, de 4,5 log pour la RM4,5 et de 5 log pour la RM5

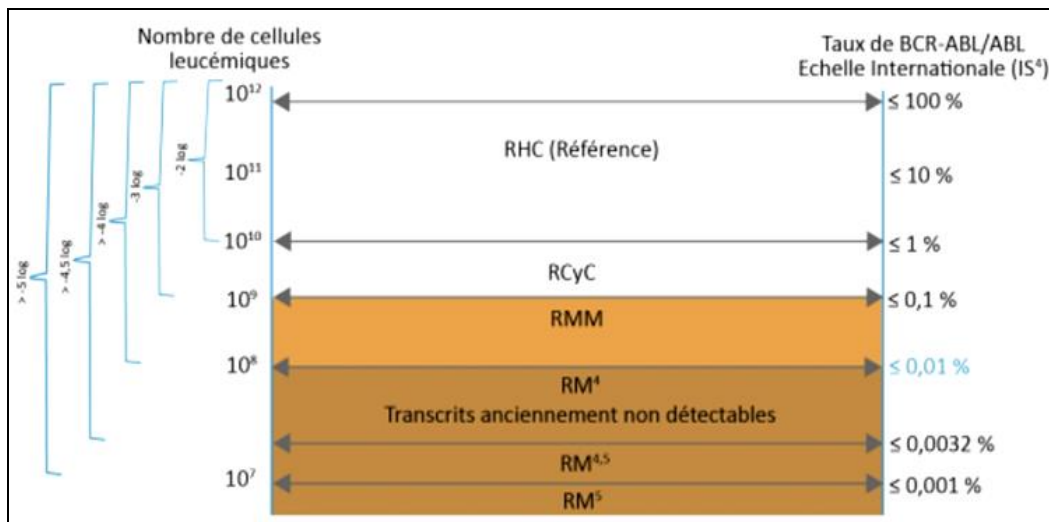


Figure 13. Schéma récapitulatif des réponses souhaitées (70)

A noter que les patients traités par Imatinib présentent une réponse moléculaire biphasique. Il y a une chute initiale rapide du niveau de BCR-ABL1, reflétant la clairance de la descendance mature de la LMC, suivie d'une deuxième phase avec un gradient peu profond reflétant l'épuisement progressif des précurseurs cellulaires de la LMC moins sensible à l'Imatinib (71).

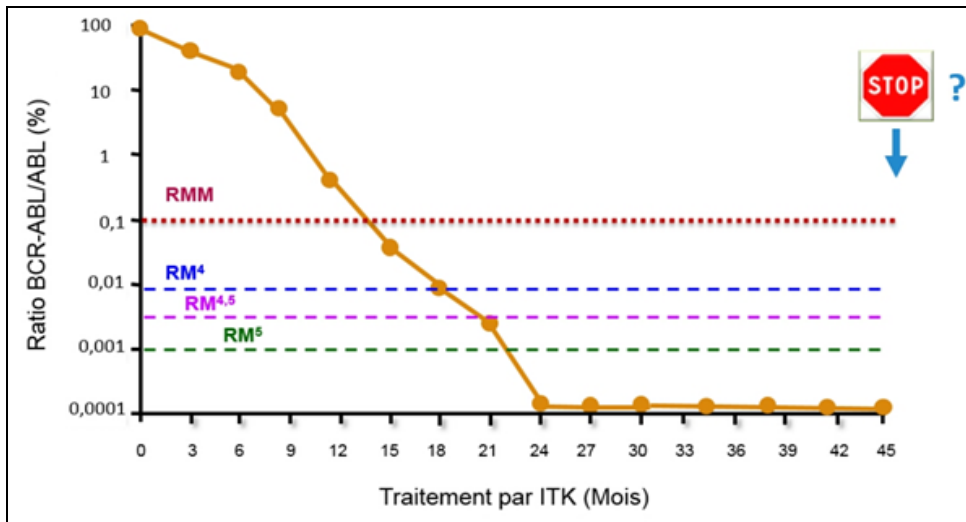


Figure 14 : Réponse moléculaire idéale avec un traitement par ITK (71).

METHODOLOGIE

1. Les objectifs de notre travail :

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant l'application de biologie moléculaire dans le diagnostique, le suivi, évaluations et pronostic de la leucémie myéloïde chronique.

Pour cela nous avons utilisé les résultats des études suivantes :

Etude 01 :

Etude épidémiologique nationale de la leucémie myéloïde chronique en Algérie :travail coopératif et multicentrique sur une période de 16 ans. A propos 1927 Cas (1994 – 2009). (72)

Il s'agit d'une étude épidémiologique de type rétrospective ayant inclus 1927 patients, réalisé au service d'hématologie de l'hôpital central de l'Armée (HCA)

Etude 02 :

Recherche des différents transcrits de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR quantitative multiplex : intérêt diagnostique et suivi chez les patients atteint de leucémie myéloïde chronique. (73)

Etude réalisée au niveau de service de biochimie, EHU 1^{er} novembre, Oran-Algérie et service d'hématologie et de Thérapie Cellulaire, EHU 1^{er} novembre, Oran-Algérie

Il s'agit d'une recherche quantitative des transcrit de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR Multiplexe pour les nouveaux cas suspects et pour les anciens patients non typés.

Etude 03:

Frequency of BCR-ABL 1 Fusion Transcripts Variant in Chronic Myeloid Leukemia Algerian patients. (74)

Fréquence des transcrits de fusion BCR-ABL 1 chez les patients Algériens atteints de la Leucémie Myéloïde chronique (74).

Il s'agit d'une étude descriptive monocentrique portant sur 167 patients de l'ouest de l'Algérie (Oran, Mostaganem, Mascara, Sidi Bel Abbès, Aïn Temouchent, Relizane, Tiaret et El Bayedha) sur une période de 6 ans (2013-2019). Elle est réalisée au niveau du service de biochimie de l'Etablissement hospitalier et Universitaire d'Oran, par la technique d'amplification en chaîne par polymérase après rétro-transcription (RT-PCR). Dans cette ils ont décrit les différents types de transcrits de fusions BCR-ABL 1 retrouvés chez les patients de la leucémie myéloïde chronique (LMC) de l'ouest Algérien.

2. Matériels et méthodes des études 01, 02 et 03 :

Etude 01 :

Cette étude est basée sur l'exploitation des données épidémiologiques, cliniques, thérapeutiques et biologiques de la LMC. Quatorze (14) services d'hématologie ont participé et au total 1927 fiches sont exploitées et sont réparties comme suit sur les différents Services d'hématologie : centre Pierre et Marie Curie d'Alger 370, CHU Constantine 238, CHU Blida : 267, CHU Annaba : 200, Sétif : 156, CHU Oran : 118, CHU Beni Messous : 126, CHU Tizi Ouzou : 113, CHU Tlemcen : 83, Sidi Belabbès : 73, HCA: 58, Batna : 77, EHA Oran : 24, EPH Mascara : 24. (72)

Etudes 02 et 03 :

Ces études ont démontré l'intérêt de l'application de la RT-PCR Multiplexe pour le diagnostic de la LMC et également pour l'identification de l'isotope moléculaire. La détermination de l'isotope moléculaire au diagnostic permettrait de bien choisir les amorces spécifiques nécessaires au suivi moléculaire. Ce suivi est assuré en quantifiant les transcrits BCR-ABL1 à l'aide d'une technique sensible, la PCR quantitative en temps réel (qPCR) (73, 74).

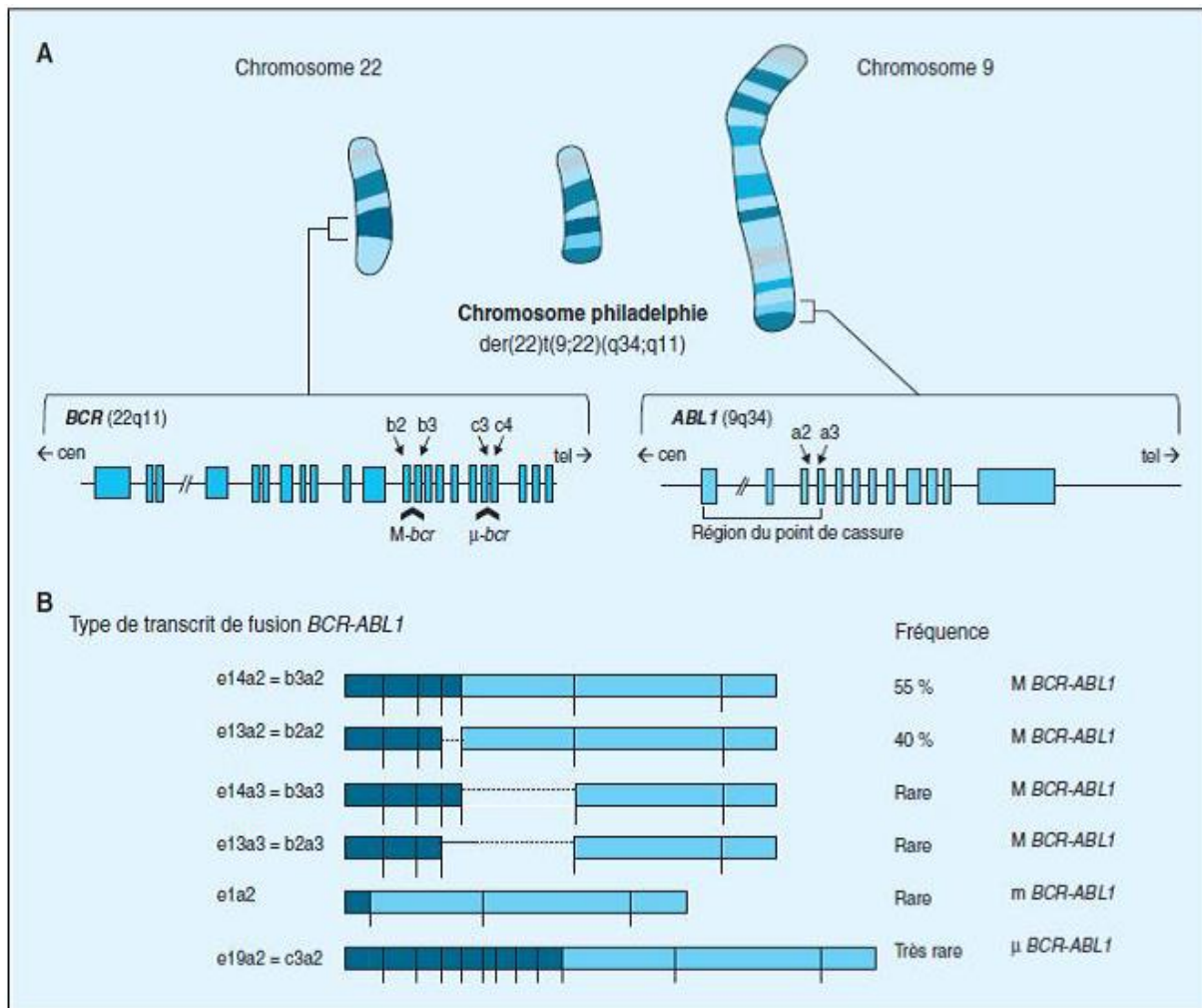


Figure 15. Représentation schématique de la translocation t(9 ;22) et les différents types de transcrits BCR-ABL1 retrouvés dans la LMC. Les transcrits b2a2 (e13a2) ou b3a2 (e14a2) (coupure dans le Mbcrr) sont retrouvés dans plus de 95% des cas. Plus rarement on retrouve les transcrits e1a2, e8a2, e6a2, e19a2, e1a3, b2a2 et b3a3. (75)

2.1 Extraction de l'ARN total :

Cette étape est réalisée à partir du sang total (2.5 ml) sur un extracteur automatique Maxwell 16 « Promega » qui met en œuvre une cartouche de 8 puits dans lesquels sont successivement réalisés, après une étape préliminaire de lyse cellulaire différentielle (les globules rouges sont lysés, en laissant les leucocytes intacts) :

- Une capture d'ARN contenu dans l'échantillon, par des billes magnétiques recouvertes de silice présentes dans la cartouche.

- Un traitement à la DNase et à la protéinase K pour éliminer toute trace de protéines et d'ADN
- Des lavages de l'ARN par différents réactifs contenus dans différents puits de la cartouche
- L'éluion de l'ARN

2.2 Dosage des ARN :

Une fois extrait, l'ARN est quantifié en spectrophotométrie UV après une double lecture de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm. Le rapport 260/280 nous renseigne sur la pureté de l'échantillon, il doit être compris entre 1.8 à 2.

2.3 Technique de RT-PCR Multiplexe :

2.3.1 La rétro-transcription :

La synthèse des ADNc par transcription inverse est réalisée par le protocole proposé par le groupe EAC.

a) 10 µl d'ARN (1µg) préalablement incubé pendant 10 min à 70 °C, est mélangé avec 10µl de la solution mix contenant 4µl de Tampon RT 5x, 2µl de DTT 10 mM, 2µl de dNTP 1mM, 1µl de mélange d'amorces, 0.5µl de Rnase inhibiteur et 0.5 µl de la Multiscribe™ Reverse Transcriptase.

b) Dans un thermocycleur pré-PCR, on lance le programme de la RT suivant :

- Incubation pendant 60 min à 37°C
- Dénaturation pendant 03 min à 95°C
- Refroidissement à 04°C

2.3.2 Amplification des produits par la RT :

Nous avons utilisé le Kit seeplex™ Leukemia BCR/ABL (Seegene, Seoul, Korea), qui présente un double avantages :

- Il permet en utilisant plusieurs amorces de détecter huit (08) types de transcrit dans une seule réaction de PCR : Mb2a2, Mb3a2, me1a2 et les autres variant, b1a1, b3a3, e19a2, b2a3, c3a2 et e1a3, avec une limite de détection estimée à 0.1%.
- Il possède une grande spécificité et sensibilité grâce à la technologie employée de double amorçage DPO™ (Dual OligoPrimer).

-Un témoin négatif (contrôle eau), un témoin positif Kit seeplex (PC) (b2a2, me2a2 et le gène de référence ABL), et un témoin de la lignée cellulaire K562 (transcrit Mb3a2) sont intégrés dans chaque série d'analyse et traités dans les mêmes conditions que les échantillons des patients. Les produits d'amplification obtenus sont ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 3% en présence de Bromure d'Ethidium (BET) et d'un marqueur se poids moléculaire.

Les conditions de l'amplification par PCR sont résumées dans le tableau ci-dessous

Dénaturation	T° : 94° c, 15min
37 cycles	
Dénaturation	T° : 94° c, 30 sec
Hybridation	T° : 60° c, 1 min30
Elongation	T° : 72° c, 1 min30
Extension finale	T° : 72° c, 10 min
Maintien T°	T° : 08° c

Tableau 2. Programme de l'amplification par PCR

2.4 Interprétation des résultats

2.4.1 Validation de la PCR :

- Vérifier l'absence de contamination des réactifs : absence de bande dans le témoin eau
- Vérifier la positivité du témoin positif (PC) et de la lignée cellulaire K562 : obtention d'une bande à la taille attendue du témoin Seeplexe (e1a2, B2a2) et de témoin K562 pur (Mb3a2)

2.4.2 Validation des échantillons :

La quantité de l'ARN extrait et l'efficacité de la transcription inverse sont vérifiées par la présence des bandes correspondantes au gène contrôle ABL1 (600 pb). En cas de positivité d'un échantillon, on compare la taille obtenue à celle attendue pour en déduire le type de transcrit obtenu : Mb3a2 (476 pb), Mb2a2 (401pb) e1a2 (348pb) et C3a2 ou e19a2 (micro : 1012 pd) voir figure.

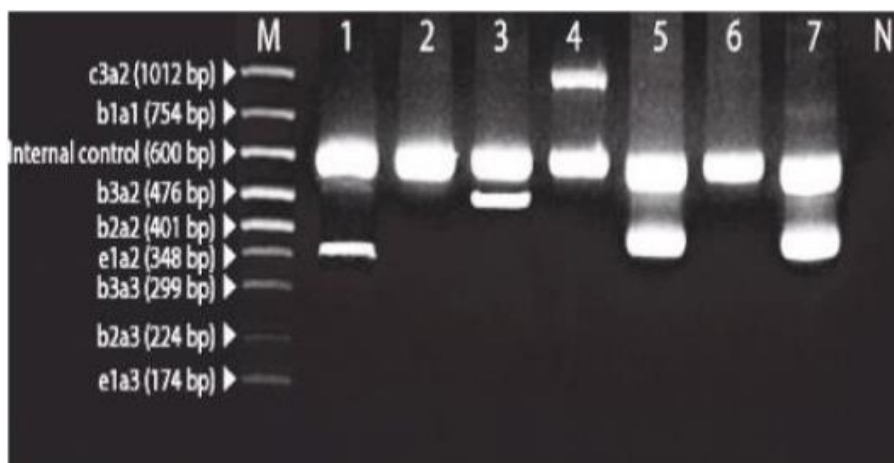


Figure 16. Gel agarose Seeplexe. N : contrôle négatif. M : marqueur de taille.

1 à 7. Echantillons : 1(e1a2), 2 et 6 négatifs. 3(b3a2), 4(c3a2 ou e19a2), 5 et 7(b2a2)

2.5 Quantification des transcrits BCR-ABL1 :

Dans le cadres de l'évaluation moléculaire des enceins patients, ils ont effectué une quantification des transcrits BCR-ABL1. Cette évaluation nous a permis de les stratifier en fonction des définitions de réponse au traitement du ELN. Pour le transcrit majeur, nous utilisons un kit standardisé (kit ipsogen BCR-abl 1 MbcR IS-MMR). Ce test exploite le principe de la qPCR par hydrolyse des sondes TaqMan™ et met en œuvre un témoin hautement positif et un étalon IS-MMR standardisé, d'après l'échelle internationale IS (pour International Scale), qui permet de convertir les résultats de nombre de copies normalisé (NCN) selon cette échelle. Pour la transcrit variant e19a2, nous utilisons le même mode opératoire mais avec des amorces spécifiques recommandées par EAC.

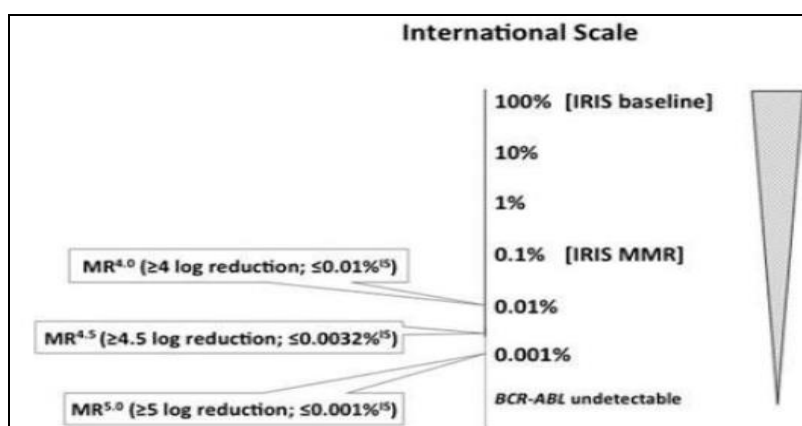


Figure 17. Définition de la réponse moléculaire selon l'échelle internationale (76).

RESULTATS DES ETUDES 01, 02 ET 03

1. Etude 01 :

1.1 Prévalence

La prévalence absolue de la LMC en Algérie en décembre 2009 est de 806 cas alors qu'elle n'était que de 472 en 2004. La prévalence relative passe de 1,8 cas /100000 habitants par an en 2004 à 2,3 cas /100000 habitants par an en 2009.

1.2 Incidence

Année	Nombre de cas	Population en million	Taux d'incidence	Population (âge>14 ans)	Incidence spécifique
1994	53	27	0,19	18,9	0,28
1995	69	27,5	0,25	19,2	0,35
1996	85	28	0,30	19,6	0,43
1997	68	28,5	0,31	19,95	0,34
1998	89	29	0,30	20,3	0,43
1999	74	29,5	0,25	21	0,35
2000	78	30	0,26	21,2	0,36
2001	99	30,5	0,32	21,35	0,46
2002	118	31	0,38	21,7	0,54
2003	105	31,5	0,33	22,05	0,47
2004	130	32	0,4	22,4	0,58
Total	968	26,2	0,29	20,6	0,42

Tableau 3. Incidence annuelle et globale de la leucémie myeloïde chronique en Algérie durant la période : 1994 -2004

Année	Nombre de cas	Population en million	Taux d'incidence	Population (âge>14 ans)	Incidence spécifique
2005	121	32,5	0,37	22,7	0,53
2006	150	33	0,45	23,1	0,64
2007	170	33,5	0,50	23,4	0,72
2008	182	33,7	0,54	23,5	0,77
2009	155	35,1	0,44	24,5	0,63
Total	778	33,5	0,46	23,4	0,69

Tableau 4. Incidence annuelle et globale de la leucémie myéloïde chronique en Algérie durant la période : 2005 -2009

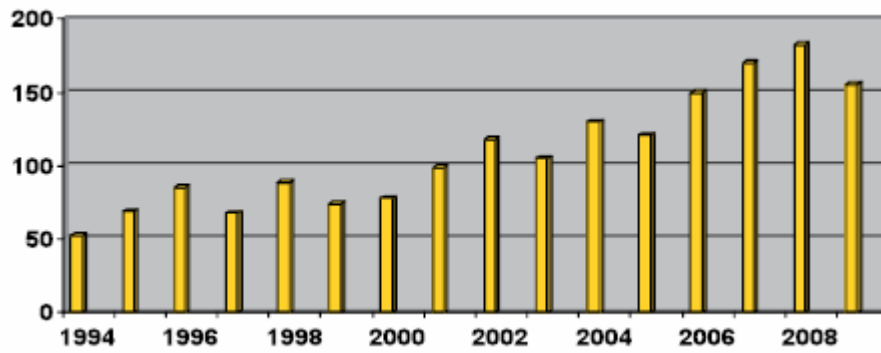


Figure 18. Répartition des nouveaux cas de LMC par année

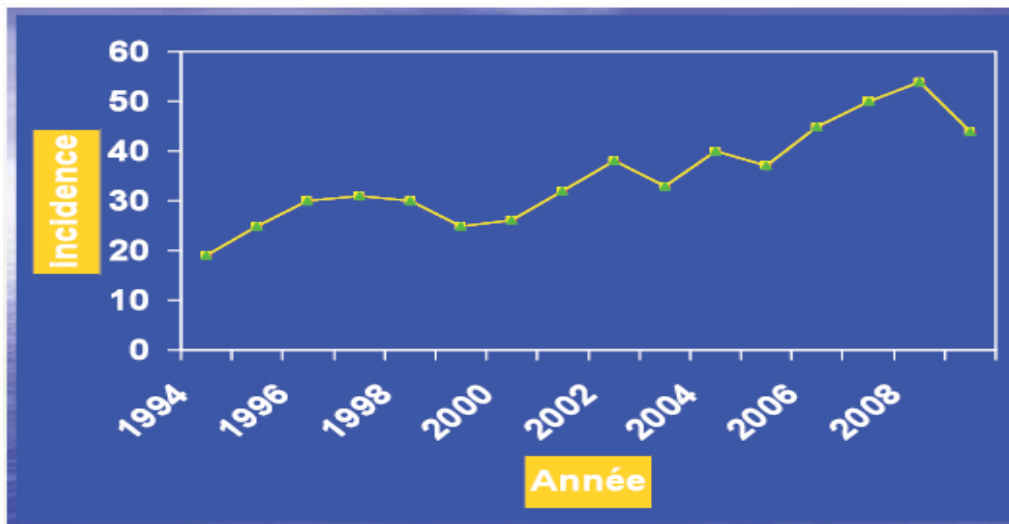


Figure 19. Variation de l'incidence

1.3 Age :

Tranche d'âge	0-15 ans	16-25 ans	26-35 ans	36-45 ans	46-55 ans	56-65 ans	>65 ans	Total
Nombre	9	147	449	544	196	438	117	1900
%	0,47	7,73	23,63	28,63	10,31	23,05	6,15	100

Tableau 05. Répartition des patients selon les tranches d'âge

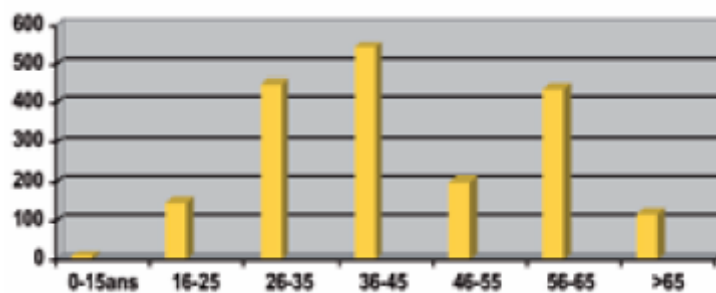


Figure 20. Répartition des patients selon les tranches d'âges

1.4 Le sexe :



Figure 21. Répartition des patients selon le sexe

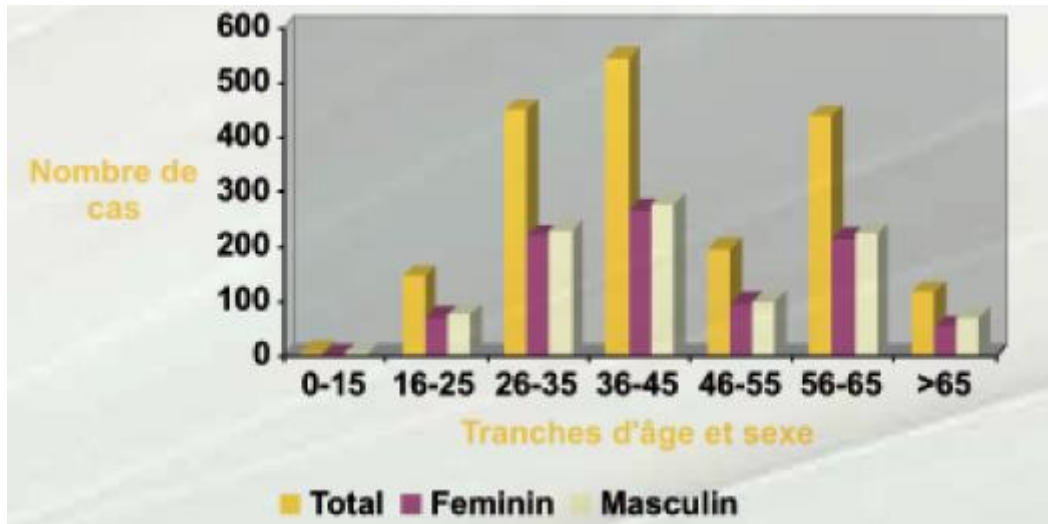


Figure 22. Répartition selon les tranches d'âge et le sexe

1.5 La répartition géographique :

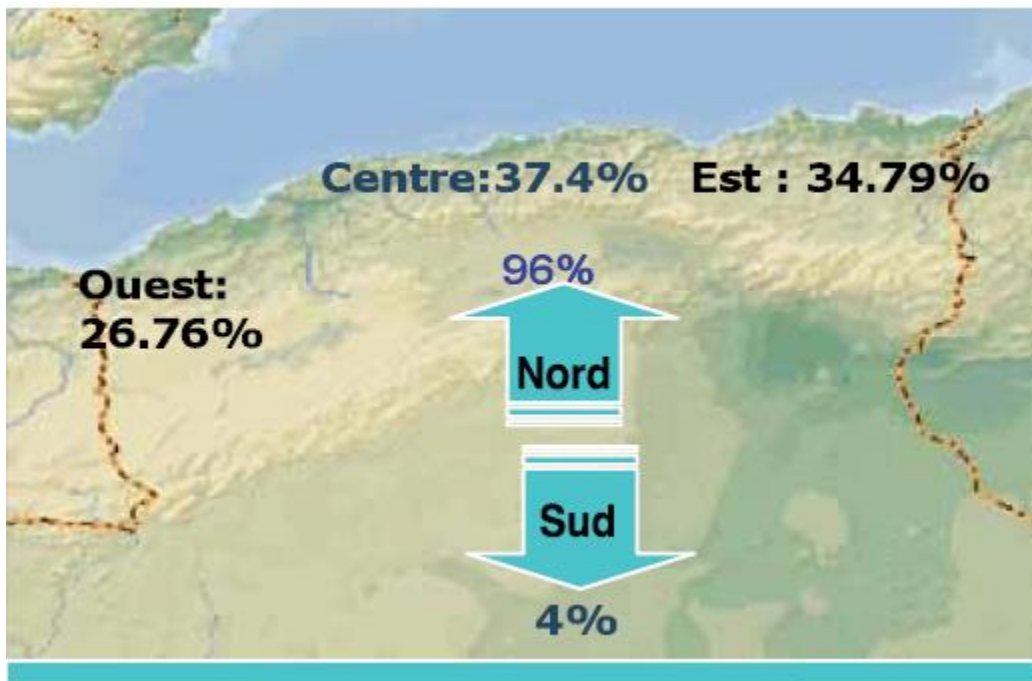


Figure 23. Répartition géographique (1457 cas)

1.6 Répartition selon la profession

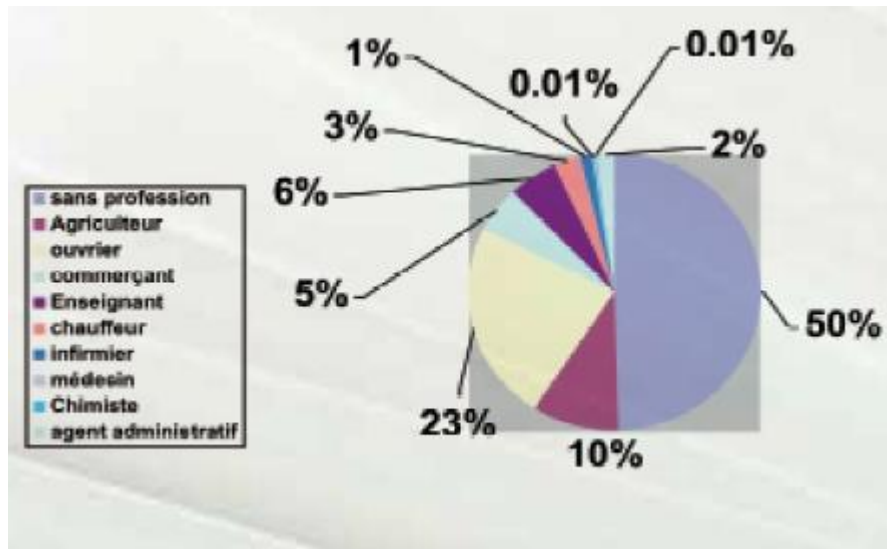


Figure 24. Répartition selon la profession

1.7 Données biologiques :

Hémogramme : le taux moyen des globules blancs est de 182 737.33 élt/mm³ avec des extrêmes allant de 41500 à 206000; le taux moyen des plaquettes est de 295 798.67 élt/mm³ avec des extrêmes allant de 132000 à 1 042 000 et le taux moyen d'hémoglobine est de 9 g/dl.

Caryotype: Le caryotype à la recherche du chromosome Philadelphie et / ou d'autres anomalies additionnelles n'est pas encore un examen de pratique courante en Algérie, en effet il n'est pratiqué dans notre série que chez 190 patients soit 10% des cas.

Biologie moléculaire : la recherche du transcrite bcr/abl par RT-PCR n'est pas également un examen de routine en Algérie. Il n'est pratiqué que chez 214 patients, soit 11% des cas.

1.8 Le score de Sokal

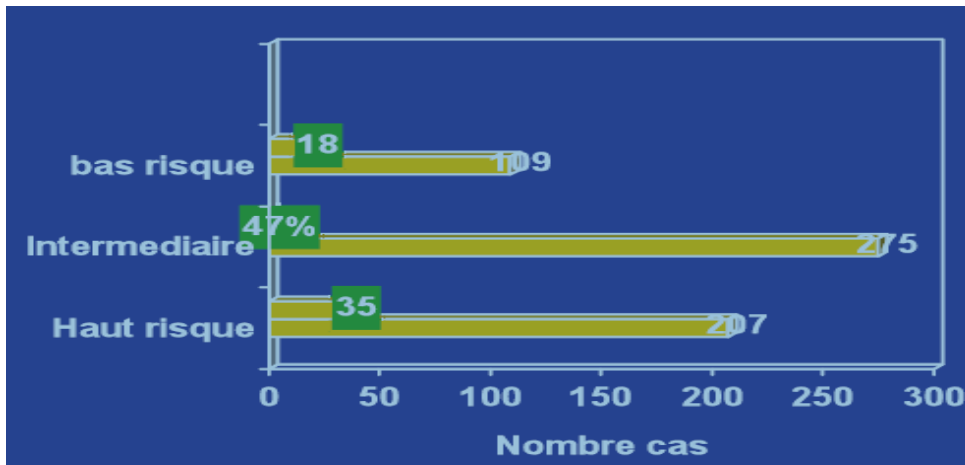


Figure 25. Répartition des patients selon la classification pronostique de Sokal

2. Etude 02 :

2.1 RT-PCR Multiplex

L'étude moléculaire par RT-PCR Multiplex a permis de mettre en évidence le transcrit de fusion et de le caractériser chez 46 patients parmi les 66 suspicions de LMC, il s'agit :

- Transcrit majeur de type b3a2 identifié chez 27 patients (58,70%).
- Transcrit majeur de type b2a2 identifié chez 18 patients (39,13%).
- Transcrit micro de type e19a2 (μ e19a2) identifié chez un patient (2,17).

Variables	Au diagnostic	Au suivi	Totalité
Effectif Patients			
N	66	26	92
%	71.73	28.27	100
Transcrit détectable			
N	46	18	64
%	69.69	69.23	69.56
Transcrit indétectable			
N	20	08	28
%	30.3	30.76	30.43

Tableau 06. Résultats de la RT-PCR multiplex au diagnostic et au suivi

2.2 Résultats épidémiologiques et moléculaires

Le tableau ci-dessous résume les différents résultats moléculaires et épidémiologiques de 92 patients :

Patients LMC	Variables	Au diagnostic	Au suivi	Totalité
Effectif	N %	46 63.88	26 36.12	72 100
Sexe	F/M Sex-ratio (h/f)	22/24 1.09	14/12 0.85	36/36 1
Age (ans)	Médiane [Intervalle]	47 [16-78]	49 [17-85]	47 [16-85]
b3a2	N %	27 58.70	12 66.67	39 60.94
b2a2	N %	18 39.13	05 27.77	23 35.93
e19a2	N %	1 2.17	1 5.56	2 3.12

Tableau 07. Caractéristiques épidémiologiques et moléculaires des patients atteints de LMC

De plus, les différents résultats de la RT-PCR quantitative et de la RT-PCR mutiplex sont représentés dans le tableau suivant :

RT-PCR quantitative	RT-PCR multiplex	
	Transcrit détectable	Transcrit indétectable
Ratio BCR-ABL1/ABL1 > 0.1%	N= 18 [0.29-68.30%]	
Ratio BCR-ABL1/ABL1 ≤ 0.1%	-	N= 3 0.018 à 12 mois 0.09 et 0.047 à 18 mois
Ratio BCR-ABL1/ABL1 ≤ 0.01 %	-	N= 4 0.005 à 12 mois 0.0095 à 36 mois 0.004 à 48 mois 0.008 à 48 mois
Ratio BCR-ABL1/ABL1 ≤ 0.001 %	-	N= 1 0.001 à 36 mois

Tableau 08. Détection et quantification du transcrit BCR-ABL1 chez les patients

3. Etude 03 : les données épidémiologiques, biologiques et moléculaires

Au total, 167 patients ont été inclus dans cette étude. Le diagnostic moléculaire de LMC a été confirmé chez 107 patients (64 %) avec un âge moyen 47, 60 ± 13, 76 ans et des extrêmes entre 19 et 78 ans. Le sex ratio (m/w) est de 1,05. Cependant, l'étude moléculaire nous a permis d'exclure le diagnostic de LMC chez 60 patients (36%). L'étude moléculaire par multiplex RT-PCR a révélé que 103 patients (96 %) avaient le Transcrit majeur. Deux patients ont exprimé le Transcrit micro rare e19a2 (1,8%) et deux autres avaient une co-expression de b3a2 / b2a2 (1,8%) (Voir Figure partie méthodologie).

L'évolution clinique et épidémiologique caractéristiques et les résultats du multiplex RT-PCR de notre groupe d'étude sont présentés dans le tableau suivant :

<u>Gender, N (%)</u>	
• Men	55(51%)
• Women	52 (49%)
<u>Age</u>	
Median age (range)	48 [19-78]
<u>Disease phase, N (%)</u>	
• Chronic	100 (93)
• Accelerated	05 (05)
• Blastic	02 (02)
<u>BCR-ABL1 fusion transcripts, N (%)</u>	
• Mb3a2	64 (59.8)
• Mb2a2	39 (36.4)
• e19a2	02 (1.8)
• b3a2/b2a2	02 (1.8)
<u>Sokal score, N (%)</u>	
• Low	30 (28)
• Intermediate	51 (48)
• High	26 (24)
<u>EUTOS score, N (%)</u>	
• Low	85 (79)
• High	22 (21)
<u>WBC count, 10⁹/L median (range)</u>	141.9 [3.4-2210]
<u>Hb , g/dL median (range)</u>	10 [5.3-14]
<u>PLT count, g/L median (range)</u>	419 [90-710000]
<u>Myelemia, median (range)</u>	33.5 [0-80]

Tableau 09. Données biologiques et moléculaires de 107 patients avec la LMC

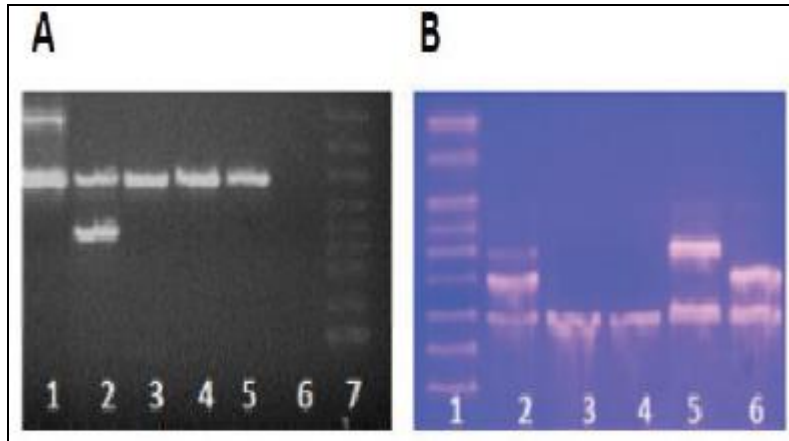


Figure 26. Produits de la RT-PCR Multiplex des échantillons étudiés

A- 1: e19a2; 2:b2a2; 3, 4, 5: Negative patient; 6: Negative control; 7: Size marke

B- 1: Size marke; 2:b3a2/b2a2; 3 and 4: Negative patient; 5:b2a2; 6:b3a2

DISCUSSION GENERALE

1. Epidémiologie de la LMC :

L'**incidence** est en progression lente et s'organise presque en plateau entre 1994 à 2002 et à partir de 2003 la progression est plutôt exponentielle allant de 0,3 à 0,55. Cette progression est nette si l'on se réfère également au nombre moyen de nouveaux patients par an qui passe de 88 cas entre 1994 et 2004 à 155 cas entre 2005 et 2009 et à l'incidence globale qui passe de 0,29 à 0,46. Cette augmentation peut s'expliquer par l'augmentation de la population, le caractère jeune de cette dernière, la meilleure couverture sanitaire dans le domaine de l'hématologie et le retour progressif de la sécurité en Algérie à partir de 2003

L'incidence globale, si on considère la période 1994 -2009, est de 0.34/100 000 habitants et le nombre moyen des nouveaux cas par année est de 109. Ce taux d'incidence reste très en deçà des séries rapportées dans la littérature, en effet l'incidence de la LMC dans le monde est comprise entre 0.7, l'incidence la plus basse rapportée en Suède et en Chine, à 1.7 à 2 en Suisse et aux Etats Unis (71, 77)

La pyramide des âges en Algérie peut expliquer en partie cette faible incidence, en raison de la prédominance de la population âgée de moins de 30 ans (78), D'où l'intérêt de mener une étude prospective tenant compte de tous ces paramètres.

La prévalence de la LMC en Algérie a pratiquement doublé entre 2004 et 2009, en effet la prévalence absolue passe de 472 cas en 2004 à 806 cas en décembre 2009, avec une prévalence relative qui passe de 1,8 cas/100000 habitants par an en 2004 à 2,3 cas /100000 habitants par an. Cette augmentation franche pourrait s'expliquer d'une part par l'augmentation de l'incidence et d'autre part par **l'introduction de l'imatinib** utilisé en Algérie depuis 2005 dans le traitement de la LMC.

Une légère prédominance masculine est retrouvée dans l'étude 1 et 03 avec un sex ratio de 1,01 et 1.05 respectivement, ce dernier varie entre 1,4 et 2,2 dans les séries de la littérature (79). **L'âge** moyen au diagnostic est de 48 ans, avec des extrêmes entre 19 ans et 78 ans, pour la 2^{ème}, tandis qu'il est de 43.5 ans pour la 1^{ère} étude avec un pic de fréquence entre 36 et 45 ans, ce qui fait de la LMC une affection de l'adulte jeune. L'âge médian au moment du diagnostic se situe entre 30 et 60 ans selon les séries publiées (71,79).

La fréquence est élevée au Nord qui s'explique par la répartition très inégale de la population entre le Nord et le Sud du pays, il est de même pour la fréquence plus élevée au Centre par rapport à l'Est et à l'Ouest selon la 1^{ère} étude.

Dans l'étude 01 :

- Les moyens diagnostiques de la LMC pour sont très insuffisants et se limitent dans 90% des cas à un hémogramme et un frottis sanguin.
- Le caryotype et la recherche du transcrite BCR/ABL par biologie moléculaire ne sont pratiqués que dans 10% des cas ce qui compromet complètement le suivi thérapeutique des patients.
- La classification pronostique des patients selon le score de Sokal est insuffisamment appliquée (30%) et montre une prédominance du risque intermédiaire. Cette classification est nécessaire voire indispensable d'autant plus que son application est aisée puisqu'elle tient compte de paramètres très simples et rapidement disponibles (âge, taille du débord splénique en cm, % de blastes sanguins, taux de plaquettes, taux d'hématocrite et sexe) **(71,77,79)**

Dans l'étude 02 :

- Les moyens diagnostiques biologiques, cliniques et moléculaires sont développés et bien appliqués
- 93% des patients sont à la phase chronique de la maladie, 05% à la phase accélérée et 02% à la phase blastique
- La LMC représente un bon pronostic selon le Sokal score et EUTOS score, à cause, de la bonne pris en charge des patients par traitement anti tyrosine kinase, qui est mis Algérie depuis 2005.
- Le taux des globules blancs est élevé (hyperleucocytose), avec une moyenne de $141,9 \times 10^9$ par litre et des extrémités de $3,4 \times 10^9$ par litre et 2210×10^9 par litre, alors que la norme est de 4×10^9 par litre et 11×10^9 par litre.
- Le taux d'hémoglobine est dans les normes, il varie entre 5,3 g/dl et 14 g/dl avec une moyenne de 10 g/dl (dans la norme, il varie entre 12g/dl et 18 g/dl)
- Le taux des plaquettes varie entre l'extrémité de 90 g/l qui représente la thrombopénie (puisque'elle est inferieur de la limite 150 g/l, cas rare chez les

patient de la LMC) et l'extrémité 710.000 g/l qui représente la thrombocytose (puisque'elle est plus de la norme supérieure : 500.000 g/l)

- La moyenne de la myélémie est 33,5% avec des extrémités de 0% et 80%, résultats confirmant les 93% des patients à phase chronique et 05% des patients à la phase accélérée et les 02% de la phase blastique

La myélémie est la présence de nombreuses cellules jeunes immature dans le sang, pour la phase chronique elle est moins de 6%, pour la phase accélérée est entre 6% à 30% et la à phase blastique elle est plus de 30% (80).

2. La LMC et la biologie moléculaire :

Etude 02 :

Ils ont effectué une recherche qualitative des transcrit BCR-ABL1 chez 92 patients Algérien afin de confirmer le diagnostic et d'identifier le profil moléculaire. Les résultats de l'étude interprétables dans les deux séries. La qualité de l'ARN et l'efficacité de la rétro-transcription ont été confirmées par l'amplification du gène de contrôle ABL1 (Figures ci-dessous). Pour les nouveaux patients, la technique de RT-PCR multiplex a confirmé de diagnostic de LMC chez 46 patients (69,69%) pour l'étude 02 et chez 107 patients (64 %) de l'étude 03.

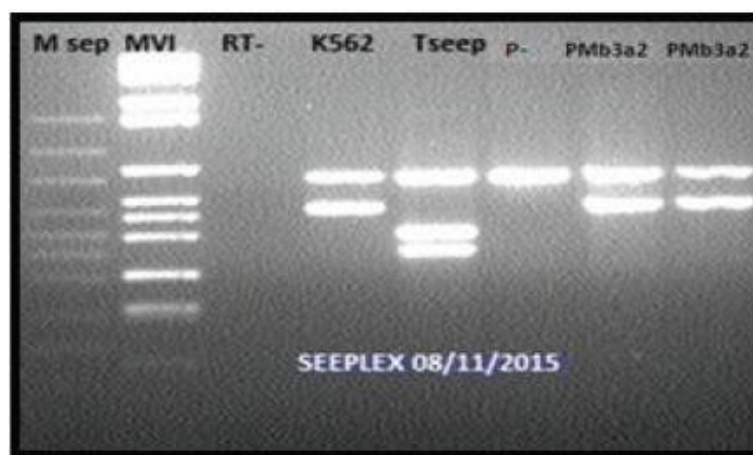


Figure 27. Profil du gel agrose montrant bien l'amplification du gène de contrôle ABL1 (600 pb). Msep : marqueur seeplex. MVI marqueur VI. RT- : Temoin négatif de la RT. K562 : Temoin positif de la lignée cellulaire K562. Tseep : Temoin du Kit seeplex. P- : patient négatif. **Photo service biochimie/EHU Oran.**

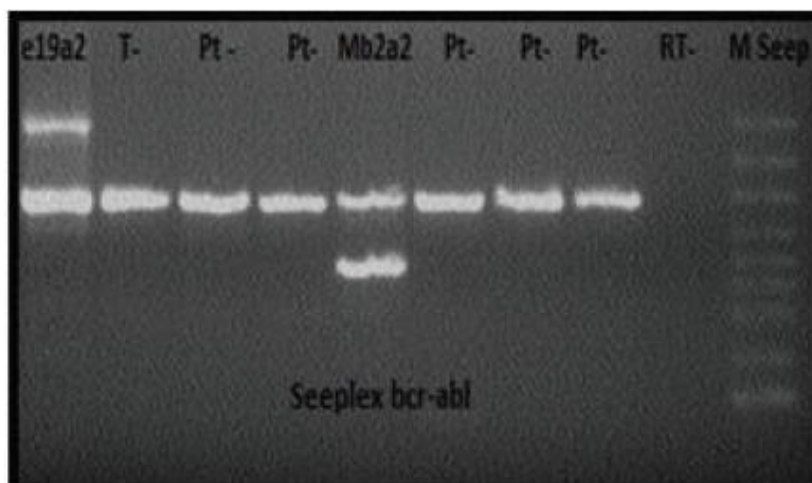


Figure 28. Profil du gel agarose montrant l'amplification transcrite e19a2 (position 1) et du transcrite b2a2 (401 pb) (position 5). **Photo service de biochimie/EHUOran**

Les résultats de la RT-PCR multiplex sont très proches pour les études 02 et 03

1- Etude 02

- Au total sur les 64 patients où le transcrite a été identifié, 62 (96,87%) avaient le transcrite majeur avec 60,94% de type M b3a2 et 35,93% de type Mb2a2.
- Deux patients (3,12%) avaient un transcrite rare de type e19a2. Par contre, nous n'avons pas trouvé de co-expression b3a2/b2a2.

2- Etude 03

- 103 patients (96 %) avaient le Transcrit majeur, avec 59,8% de type M b3a2 et 36,4% de type Mb2a2, deux patients ont exprimé le Transcrit micro rare e19a2 (1,8%) et deux autres avaient une co-expression de b3a2 / b2a2 (1,8%).

Les pourcentages des patients ayant le transcrite majeur sont presque identiques pour les deux études 02 et 03 et partagent l'anomalie rare, le transcrite e19a2, cependant, la co-expression b3a2/b2a2 n'est présente que dans la troisième étude. Mais, on mentionne que le nombre de patients de l'étude 03 (103 patients) est supérieur par rapport au nombre de patients de l'étude 02 (64 patients), ce qui peut être expliqué par l'absence de patients exprimant une co-expression de b3a2 / b2a2, pour l'étude 02.

Pour les patients de l'étude 02, l'analyse par RT-PCR multiplex a montré son intérêt dans le typage moléculaire dans le suivi des patients. En effet, dans l'étude 02, ils ont pu identifier le

type de transcrit chez 18 parmi les 26 patients anciens (69,23%) patients dont 17 (94,44%) avaient un transcrit majeur.

Chez les 17 patients (94,44%) de l'étude 02, le transcrit majeur a été quantifié au dessus de 0,1% ce qui correspond au seuil de détection de la méthode de typage. Ces patients étaient soit :

- En réponse optimale au traitement, défini par une diminution du taux de BCR-ABL1 $\leq 1\%$ à trois mois, $\leq 1\%$ à six mois et $\leq 0,1\%$ à douze mois.
- En état alarme, défini par un taux de BCR-ABL1 $\geq 10\%$ à trois mois, entre 1%-10% à six mois et 0,1 -1% à douze mois
- En état d'échec thérapeutique, défini par un taux de BCR-ABL1 $> 10\%$ à six mois, $> 1\%$ à douze mois, puis, par perte de la réponse moléculaire à tout moment.

Un patient dans l'étude 02 est suivi comme ayant un transcrit majeur et adressé pour une évaluation moléculaire, ils ont détecté un transcrit rare de type micro e19a2. Ce transcrit a pu être quantifié à 68,30% grâce à l'utilisation d'amorce spécifiques. Ceci démontre l'intérêt de la recherche du type du transcrit au diagnostic. En effet, si le type de transcrit avait un meilleur suivi avec la possibilité de changement thérapeutique à temps avant sa formation aigue.

Une discordance a été notée entre deux méthode (RT-PCR qualitative et quantitative) chez huit (08) anciens patients dont les transcrits n'ont pas été identifiés (TABLEAU 4). Chez ces patients, il est envisageable que leur durée de traitement ait induit une réponse suffisante pour abaisser le niveau d'expression des transcrits BCR-ABL1 en dessous du seuil de détection de la méthode. En effet, leur quantification par le kit (Kit ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR) a montré que le transcrit majeur a bien été détecté mais en dessous du seuil de détection de la méthode de typage:

- Trois patients (37,5%) étaient en RMM (Réponse Moléculaire Majeur)
- Quatre (50%) en RM4.0, qui correspond à une réduction de plus de 4 log ($\leq 0,01$ IS) du taux de transcrit BCR-ABL1.
- Un patient (12,5%) en RM5, qui correspond à une réduction de plus de 5 log ($\leq 0,001\%$) du taux de transcrit BCR-ABL1.

Si on compare les résultats des études 02 et 03 avec ceux de la littérature : plusieurs groupes ont rapporté des fréquences variables des transcrit M b3a2, b2a2 et e19a2 :

Dans une méta-analyse de 26 articles, 22 (85 %) avaient une incidence plus élevée de la transcription b3a2 mais dans seulement 4 travaux, l'incidence de b2a2 était plus élevée **(81)**. Dans une série de 45 503 patients atteints de LMC nouvellement diagnostiqués signalés par 45 pays, il a été constaté que la proportion de b2a2 et b3a2, incluant les cas co-exprimant b3a2 et b2a2, était de 37,9% et 62,1%, respectivement. D'autres transcriptions rares ont été signalées dans 666/34561 patients (1,93%) **(82)**.

Dans l'étude de la population tunisienne de Bennour et al, des résultats similaires ont été trouvés, avec une fréquence de b3a2 (63,63%) deux fois plus que de b2a2 (36,36%) **(83)**. Une autre étude algérienne de 87 patients avec CML, avait trouvé des taux de 54 ; 44,60 et 1,20% respectivement pour les transcrits b3a2, b2a2 et la co-expression b3a2 / b2a2 **(84)**.

Dans les pays d'Extrême-Orient et du Moyen-Orient (Corée, Inde, Iran, Syrie et Irak), les fréquences sont presque similaires avec également une incidence plus élevée de b3a2 que de b2a2 **(85,86,87)** similaire des fréquences avaient également été trouvées dans des études de populations européennes (Allemagne et Italie) **(88,89)**

Paradoxalement, dans certaines populations, l'incidence de b2a2 était supérieure à celle de b3a2 avec fréquences variables : population syrienne (57,1 vs 14,3%) **(90)**, Population mexicaine (48 vs 35%) **(91)** population soudanaise 53,5 vs 41,9%) **(92)**, population américaine (42 vs 41%) **(93)** et population équatorienne population (95 vs 5 %, P = 0,01) **(94)**. Cela pourrait être expliqué par la différence des profils génétiques de ces populations comparées aux autres.

La différence de fréquence des réarrangements b3a2 et b2a2 observé dans ces différentes études pourrait s'expliquer par différents facteurs : origine géographique et ethnique, environnement facteurs et la sensibilité de détection de la méthode utilisée. Le la co-expression b3a2/b2a2 trouvée dans notre étude pourrait être expliquée par le processus d'épissage alternatif.

Dans Autres études; des co-expressions complexes atypiques ont été trouvées comme ceux de l'étude mexicaine (e1a2/b3a2/b2a2 et e1a2/ b2a2 / e19a2). Ces co-expressions complexes reflètent l'existence de plusieurs clones leucémiques **(91)**.

CONCLUSIONS

La LMC est principalement causée par une anomalie chromosomique appelée chromosome Philadelphie (Ph). Ce chromosome résulte d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22: t(9;22)(q34;q11.2), ce qui conduit à la création d'un oncogène appelé BCR-ABL1

L'étude 01 avec un échantillon de 1927 patients, nous donne un profil très représentatif de l'épidémiologie de la leucémie myéloïde chronique en Algérie.

Pour l'étude 02 et l'étude 03, la RT-PCR multiplex possède des avantages considérables par rapport à la RT-PCR conventionnelle notamment en termes de gain de temps de réalisation et de la sensibilité (seuil de détection 0,1%)

La RT-PCR Multiplex, dans l'étude 02 et l'étude 03, a permis de confirmer le diagnostic de LMC et également de confirmer les données de la littérature. De plus, cette technique a prouvé son intérêt dans l'identification des différents types de transcrite BCR-ABL1 et donc elle est indispensable dans le diagnostique et le suivi moléculaire sous traitement des patients affectés par LMC.

A la lumière des ses trois études et malgré la mise au points et la maîtrise de la RT-PCR conventionnelle et la RT-PCR Multiplex, les données spécifiques de LMC en Algérie restent encore très insuffisantes et méritent d'être développées sur le plan clinique, biologique, cytogénétique, biologie moléculaire et le séquençage pour assurer le bon suivi moléculaire des patient affectés par LMC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- 1: Biga, L. M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M&Runyeon, J. Diseases, 1.3. HISTORIQUE and Injuries of the Integumentary System. Anatomy& Physiology. (2019)
- 2: Gray. Anatomy of the Human Body. Atlas d'anatomie humaine Edition de 1918.
- 3 : Agharbi FZ. La leucémie myéloïde chronique, avancées diagnostiques et thérapeutiques (à Propos de 23 cas), Thèse de doctorat en médecine, FES, Maroc.
- 4 : Theml H., Diem H., Haferlach T. Atlas de poche d'hématologie : Diagnostic pratique Morphologique et clinique. Medicine-Science Flammarion. 2^e éd, 2006. 197.
- 5: Gonon-Demoulian R, Goldman J, Nicolini F. History of chronic myeloid leukemia : A paradigm in the Treatment of cancer. Bull Cancer (Paris). Janv 2014 ;101(1) :56,67.
- 6 : Recommandations pour la prise en charge cytogénétique de la leucémie myéloïde Chronique (LMC) Etablies par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). Pathol Biol. 1 juin2004 ;52(5) :238,40.
- 7 : Laurette Fugain, Rétrospective des projets de recherche soutenues entre 2004 et 2018
- 8: Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J. , Le Beau M.M., et al « The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms And Acute leukemia », Blood, vol. 127, no 20, p. 2391,2405, mai 2016.
- 9: <https://dspace.univ-guelma.dz/jspui/handle/123456789/1936>
- 10: ASHKAN Emadi, JENNIE York Law. Leucémie myéloïde chronique; Le Manuel MSD (Juin 2022). <https://www.msmanuals.com>.
- 11: ASHKAN Emadi, JENNIE York Law. Leucémie myéloïde chronique; Le Manuel MSD (juillet 2022). <https://www.msmanuals.com>.
- 12: LMC : un guide pour les patients – Basé sur les recommandations de l'ESMO – v.2013.68.13-Fiche d'information rédigée par les médecins de la Société Française d'Hématologie (mars 2009)

13 : ACTION-LEUCEMIE. Les leucémies chroniques. (Avril 2013). <https://www.action-leucemies.org>

14 : Collection comprendre et agir. Les leucémies chez l'adulte, Fondation AEC pour la recherche sur le cancer. (Décembre 2013)

15 : Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R. et al. The biology of chronic myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341(3), 164-72.

16: HAMLADJI A. 2014. National epidemiological study of acute myeloid leukemia (AML) in Algeria over a period of 5 years (2006-2010) -a multicentric cooperative Study of the AML and myelodysplasia Algerian work group. *Revue Algérienne D'Hématologie.* Mai 2014.

17 : DJOUADI-LAHLOU K. 2009. Approches épidémiologiques des aplasies médullaires En Algérie. *Revue Algérienne d'Hématologie.*

18 :<https://www.slcanada.org/leucemie/leucemie-myeloide-chronique/la-lmc-chezles-Enfants-et-les-jeunes-adultes>)

19: Labeit AM, Copland M, Cork LM, et al. Assessment of Quality of Life in the NCRI Spirit Study Comparing Imatinib with Dasatinib in Patients with Newly-Diagnosed Chronic Phase Chronic Myeloid Leukaemia. *Blood.* 2015; 126(23):4024

20: Kantarjian, H., Pasquini, R., Lévy, V., Jootar, S., Holowiecki, J., Hamerschlak, N., ...& Shah, N. P. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloidLeukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily : two-year Follow-up of a randomized Phase 2 study(START-R). *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* (2009).

21: Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* janv 1984;36(1):93-9.

- 22 :Gonon-Demoulian R, Goldman JM, Nicolini FE. (2014). Historique de la leucémie Myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer. Bull Cancer. 101(1) : 56-67.
- 23: Piller G. Leukaemia – a brief historical review from ancient times to 1950. Br J Haematol. Févr 2001; 112(2):282,92.
- 24: Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. Leukemia. Janv 2008; 22(1) :3,13.
- 25: Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. J Clin Invest. 1 août 2007 ;117(8) :2033,5.
- 26 : BERGERAT J P. 1996. Onco-hématologie ; Heures de France. ISBN: 2853851699, 9782853851695.
- 27: Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. (1990) Induction of chronic myelogenous Leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 247.
- (28)** : M. SIDIBE Cheick Oumar; Mahamadou TRAORE; Oumar SAMASSEKOU. Exploration Cytogénétique de la Leucémie Myéloïde Chronique par la Technique FISH Au MALI. Thèse doctorat Médecine. 2020
- 29 :Guest JF, Naik N, Sladkevicius E, Coombs J, Gray EJ. Utility values for chronic Myelogenous leukemia chronic phase health states from the general public in the United Kingdom. Leuk Lymphoma. 2012 ;53(5) :928-933. Doi :10.3109/10428194.2011.631155
- 30 : AFSSET-INSERM. 2008. Cancer et environnement (rapport d'expertise collective).Les éditions Inserm-Paris. 889 p. ISBN: 2-8559-8868-3
- 31: Heyssel R, Brill AB, Woodbury LA, et al. Leukemia in Hiroshima Atomic Bombé Survivors. Blood. 1960; 15(3):313.
- 32: Mehlman MA. Dangerous and cancer-causing properties of products and Chemicals in the oil refining and petrochemical industries. Part XXX: Causal Relationship between chronic myelogenous leukemia and benzene-containing Solvents. Ann N'Y Acad Sci. 2006 ;1076 :110-119. Doi :10.1196/annals.1371.065

33 :Nachi M., Guella D., Dali-Ali A., Abed A., Moussaoui R., Boukhatmi Y., et al.

« Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge de la leucémie myéloïde Chronique : expérience du service de biochimie de l'EHU d'Oran-Algérie » Journal d'Épidémiologie et de Santé Publique, JESP N°20, Décembre 2018.

34: Leguay T., Mahon F.X. Chronic myelogenous leukaemia. EMC-Hématologie. 2005: 2(3), 187-205.

35: Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 Update on diagnosis, monitoring, and management. Am. J. Hematol. 2012 : 87(11), 1038-1045.

36 : Treuil P. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. Actual Pharm. Avr 2008 ;47(473) :25-30.

37 : Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [Cité 19 déc 2019]. Disponible sur : <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/60-enseignement-delhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologiegranulocytairesyndromesmyeloproliferatifs/105-leucemie-myeloide-chronique>.

38: Losson, H., et al. (2020). « HDAC6-an Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia? » Cancers (Basel) 12(2).

39 : Arcagy organisation infocancer localisations hemopathies malignes cancers du sangleucemie myéloïde chronique .

40 : Leguay T, Mahon F-X. Leucémie myéloïde chronique. EMC. 2005 Sept ; 2(3) : 187,205.

41 : Rejali L, Poopak B, Hasanzad M, Sheikhsofla F, Varnoosfaderani AS, Safari N, et al. Characterizing of Four Common BCR-ABL Kinase Domain Mutations (T315I, Y253H, M351T and E255K) in Iranian Chronic Myelogenous Leukemia Patients With Imatinib Resistance. Iran J Cancer Prev. mai 2015; 8(3):e2334.

42: Sorel N, Cayssials É, Brizard F, Chomel J-C. Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management. Ann Biol Clin (Paris). 20173-4;(2):129–145.

43: Burmeister, T., Reinhardt, R. (2008). "A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts." Leuk Res 32(4): 579-585.

44: Lichty BD, Kamel-Reid S. Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2. Biochem J. 15 mai 2000; 348 Pt 1:63,9.

45: Van der Velden, V. H. J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., Van Dongen, J.J.M. (2003). "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects." *Leukemia* 17, 1013–1034.

46: Sorel N, Cayssials É, Brizard F, Chomel J-C. Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2017;4;(2):129–145.

47: Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *2000*; 96(10):15.

48: Richard E. Clarck, Jane F. Apperley, Mhairi Copland, Silivia Ciccon. Additional chromosomal abnormalities et chronic myeloid leukemia diagnosis predict an increased risk of progression. *Blood advances*. (2021)

49: Lichty BD, Kamel-Reid S. Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2. *Biochem J*. 15 mai 2000;348 Pt 1:63-9.

50: Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. déc 2002;21(56):8547-59.

51 : Hazourli S, Hébert J. Caractéristique cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de LMC. Thèse(2012). Université de Montréal,

52: Savage, D. G., Szydlo, R. M., Chase, A., Apperley, J. F., and Goldman, J. M. (1997). Bone Marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia : the effects of differing criteria for Defining chronic phase on probabilities of survival and relapse. *British journal of haematology*99, 30-35.

53: Leguay T., Mahon F.X. Chronic myelogenous leukaemia. *EMC-Hématologie*. 2005 : 2(3), 187-205

54 : EL MOUHDI G. 2015. Les aspects cliniques et cytogénétique de la leucémie myéloïdeChronique, Thèse en ligne N° 186/15. Université Sidi Mohammed Ben Abdelah.pagination multiple.

55: Losson, H., et al. (2020). « HDAC6-an Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia? » *Cancers (Basel)* 12(2).

56: Ponceau JF, Villarese P. Leucémie Myéloïde Chronique : diagnostic et suivi. <http://www.technicienscytogenetique.com/presentations/2008%20et%20anterieures/Diagnosti%20cetsuiviLMCNeckerEM.pdf>.

57: Jain, P. P., Parihar, M., Ahmed, R., Abraham, A., Vishwabandya, A., George, B., Mathews, V., Srivastava, A., and Srivastava, V. M. (2012). Fluorescence in situ hybridization patterns Of BCR/ABL1 fusion in chronic myelogenous leukemia at diagnosis. *Indian journal of Pathology & microbiology* 55, 347-35.

58 : Haute Autorité de Santé « Évaluation de l'acte de recherche ou de quantification du gène de fusion BCR-ABL par RT-PCR dans le diagnostic et le suivi thérapeutique des leucémies myéloïdes chroniques Et des leucémies lymphoblastiques aiguës » Article, p.50, 2017.

59 : Smith AG, Painter D, Howell DA., Evans P, Smith G, Patmore R, et al. (2014).Determinants of survive in patients with chronic myeloid leukaemia treated in the new era of oral therapy: findings from a UK population-based patient cohort. *BMJ open*. 4(1):e004266

60 : Gratwohl A, Favre G. (2005). La leucémie myéloïde chronique. *Revue Médicale Suisse*.

61 : 1631-561 :-Shah, N. P. and C. L. Sawyers (2003). "Mécanisme of resistance to STI571 in Philadelphia chromosomeassociated leukemias." *Oncogene* 22(47): 7389-7395.

62 : Turhan A. (2005). Leucémie myéloïde chronique : actualités biologiques et thérapeutiques. *Bull Cancer*. 92 : 75-82.63- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984; 63(4):789-799.

63: Sokal JE, Cox EB, Baccani M, Thiele J. Chronic myelogenous leukemia BCR-ABL& positive in: Swerdlow S, Campo E, Harris N eds. WHO classification of tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; IARC 2008:32-37.

- 64: Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(11):850-858. doi:10.1093/jnci/90.11.850
- 65: Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood.* 2011; 118(3):686-692.doi:10.1182/blood-2010-12-319038
- 66: Branford S. Monitoring and defining early response: Where to draw the line? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016; 29(3):284, 94.
- 67: Preudhomme C, Cayuela J-M, Chomel J-C, Corm S, Hayette S, Mahon F-X, et al. Recommandations du groupe FI-LMC pour la prise en charge des patients présentant des mutations du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL dans les hémopathies malignes à chromosome Philadelphie. *Hématologie.* 1 janv 2010; 16(1):65, 79.
- 68: Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* nov 2007;8(11):1018,29.
- 69: Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Soverini S, Albeer A, et al. The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia.* 2019; 33(5):1173-83.
- 70: Crossman LC, Druker BJ, Deininger MWN. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood.* 1 août 2005;106(3):1133-4.
- 71 : J. Tanzer, F. Guillot. Leucémie myéloïde chronique. L'hématologie de Bernard Dreyfus, édition 1992 :619-637.
- 72 : K. Djouadi, Lahlou, Approche épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique en Algérie, travail coopératif et muticentrique sur une période de 16. A propos 1927 cas (1994_2009). *Revue Algérienne d'hémopathie* N 03. Sept 2009: 6-10.

73 : N. Nachi, et al. Recherche des différents transcrit de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR quantitative multiplex Interets diagnostique et de suivi chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Revue Algérienne d'hématologie, N 13-14, Decembre 2017:22-28

74 : Mourad Nachi, Ibtissem Kihel, Badra Enta-soltane, et al, Fréquence des transcrits de fusion BCR-ABL 1 chez les patients Algérien atteints de leucémie myéloïde chronique. JFMO: Vol 4, Numéro 1(8), juin 2020.

75 : (Gendron N, Belhouachi N, Morel V, et al. Leucémie myéloïde chronique avec transcrit de fusion variant BCR-ABL1 e19a2 : intérêt de l'identification moléculaire au diagnostic pour le suivi de la maladie résiduelle. Annales de Biologie Clinique ; 2014.)

76 : (Cross N, White H, et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. 2012; 26(10):2172-5)

77: chronique Myelogenous leukemia and Related Disorders: Overview. Williams Haematology 2007; Part IX. Malignant Diseases ; Chapitre 88.

78 : Démographie de l'Algérie. Office national des statistiques (Algérie). Editeur : Wikipédia.

79: Cortes .J.E, Talpaz M, Kantarrjian H. Chronique myelogenous leukemia: A review American journal of medicine. 1996 ;100 : 555-570.

80 : Leucémie de l'adulte : les symptômes et le diagnostique.Site : [http// :fondation-arc.org](http://fondation-arc.org))

Leucémie de l'adulte : les symptômes et le diagnostique.Site : [http// :fondation-arc.org](http://fondation-arc.org))

81: Ercaliskan A, Eskazan AE. The impact of BCR-ABL1 transcript type on tyrosine kinase inhibitor responses and outcomes in patients with chronic myeloid leukemia. Cancer. 2018; 124(19):3806-18.

82: Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Soverini S, Albeer A, et al. The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. Leukemia. 2019; 33(5):1173-83.

- 83: Bennour A, Ouahchi I, Achour B, Zaier M, Youssef YB, Khelif A, et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Medical oncology*. 2013;30(1):348.
- 84 :Harieche F. PCR quantitative en temps réel : application au diagnostic et à l'étude de la maladie résiduelle dans les leucémies myéloïdes chroniques [Thèse]. Université d'Alger 2008.
- 85 : Goh H-G, Hwang J-Y, Kim S-H, Lee Y-H, Kim Y-L, Kim D-W. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Translational Research*. 2006; 148(5):249-56.
- 86: Yaghmaei M, Ghafari S, Ghavamzadeh A, Ali MK, Jahani M, Mousavi S, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. 2008.
- 87:Kagita S, Mamidi TK, Digumarti L, Gundeti S, Digumarti R. Assessment of BCR-ABL1 fusion transcripts and their association with response to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia patients. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2018; 39(2):165.
- 88: Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *haematologica*. 2014; 99(9):1441-7.
- 89: Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, Iurlo A, Levato L, Albano F, et al. The BCR-ABL1 transcript type influences response and outcome in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *American journal of hematology*. 2017; 92(8):797-805.
- 90: Farhat-Maghribi S, Habbal W, Monem F. Frequency of BCR-ABL transcript types in Syrian CML patients. *Journal of oncology*. 2016;2016.
- 91 : Arana-Trejo R, Sanchez ER, Ignacio-Ibarra G, De La Fuente EB, Garces O, Morales EG, et al. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clinical & Laboratory Haematology*. 2002; 24(3):145-50.

92: Osman E-AI, Hamad K, Elmula IMF, Ibrahim ME. Frequencies of BCRABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genetics and molecular biology*. 2010; 33(2):229-31.

93: Jain P, Kantarjian H, Patel KP, Gonzalez GN, Luthra R, Shamanna RK, et al. Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016; 127(10):1269-75.

94: Paz-y-Miño C, Burgos R, Morillo SA, Santos JC, Fiallo BF, Leone PE. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2002; 132(1):65-7.

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par : **BENBOUALIA** Inaa
BERTIL Ibtissam
CHETTAH Chahinaz

Application de la Biologie moléculaire dans la Leucémie Myéloïde Chronique

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en GENETIQUE MOLECULAIRE

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un type de cancer du sang qui affecte les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Elle est caractérisée par la production excessive de globules blancs immatures, appelés cellules blastiques, qui remplacent progressivement les cellules sanguines normales.

La LMC est principalement causée par une anomalie chromosomique appelée chromosome Philadelphie (Ph). Ce chromosome résulte de l'échange de matériel génétique entre les chromosomes 9 et 22: t(9;22)(q34;q11.2), ce qui conduit à la création d'un gène anormal appelé BCR-ABL. Ce gène produit une enzyme qui stimule la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, entraînant ainsi la surproduction de cellules immatures.

Dans notre travail de recherche se résume en une étude bibliographique ayant pour objectifs dans un premier temps de tirer les données épidémiologiques, cliniques, biologiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire dans le diagnostic et le suivi de LMC. De plus, on a mis en évidence l'intérêt et l'indispensabilité de la RT-PCR Mutiplex dans le suivi moléculaire chez les patients atteint de LMC.

Comme nous n'avons pas la chance de réaliser une étude pratique, à cause du manque de réactifs et/ou de matériels, on a présenté des résultats émanant d'études algériennes qui ont été ensuite discutés en fonction des données de la littérature.

Mots-clefs : LMC, t(9;22)(q34;q11.2) , transcrits de fusion BCR-ABL1, RT-PCR Multiplex.

Laboratoire de recherche:

Président du jury : Dr. REZGOUNE Mohamed LARBI (MCA- UFMC1).
Encadrant : Mr. LATRECHE Fethi (MAA - UFMC 1).
Examineur : Dr. SEDRATI Khadidja (MCA - UFMC 1).