

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 الاخوة منتوري قسنطينة 1

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

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

Intitulé :

APPLICATION DE LA CTOGENETIQUE ET DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE
DANS LA LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE

Présenté et soutenu par : Mme CHARAOUI Souha

Le : 13 /06/2024

Jury d'évaluation :

Année universitaire 2023/2024

- Président du jury Pr. REZGOUNE Mohamed LARBI
- Encadrant : Dr. LATRECHE Fethi
- Examineurs : Dr. Sedrati Khadidja

Pr-UFMC1

MAA-UFMC1

MCA-UFMC1



Remerciement



Tout d'abord, je remercie dieu qui m'a donnée la force, la patience, la persévérance et la sagesse nécessaires pour terminer ce travail. Sans sa grâce et ses bénédictions, ce mémoire n'aurait pas été possible.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadreur **Dr.LATRECHE FETHI** pour la qualité exceptionnelle de son encadrement, sa patience et sa disponibilité tout au long de la rédaction de mon mémoire, son expertise et ses précieux conseils.

Les plus sincères mots de remerciement, de respect, d'appréciation et de gratitude aux honorables membres du jury : **Pr.Rezgoune Mouhamed Larbi** et **Dr.Sedrati Khadija**.

Enfin, je tiens également à remercier tous les enseignants de la Faculté science de la nature et de la vie et surtout les enseignants de la spécialité génétique moléculaire pour avoir partagé leurs connaissances et leur expérience, et grâce à leurs conseils, j'ai pu approfondir mes compétences et mener à bien ce mémoire.



Dédicace



Je dédie mon travail :

*A ma chère maman **RAHIMA** pour son amour inconditionnel, sa patience tout au long de mes études, son encouragement et sa confiance en ma compétence ont été des sources inestimables de motivation et de force.

Elle a toujours été à mes coté me soutenant dans les périodes difficiles et partageant mes joies et mes réussites.

Maman je te remercie du fond du coeur pour tout ce que tu as fait pour moi.

*A mon cher père **kamel, pour** son amour, sa tendresse depuis ma naissance, sa générosité, sa compréhension,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que J'ai eu pour vous.

*A mon cher mari **Ramzi**, pour ses encouragements, son amour, son aide, son respect, ses efforts pour me rendre heureuse et son soutien constant.

*A mon frère **Mohamed** et mes soeurs **Meriem** et **Loudjein**

* A ma tante **Abla** et ma cousine **Djalila**

* A mon grand-père **Houcine** et ma grand-mère **Zhour**

*A tous les membres de ma famille, que ce soit par leurs encouragements ou par leur simple présence, leur contribution a été inestimable.

Souha



Sommaire

TABLE DES MATIERES

Remerciment	I
Dédicace.....	II
TABLE DES MATIERES	IV
LISTES DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABREVIATIONS.....	X
RESUME	XII
ABSTRACT	XIII
ملخص	XIV
INTRODUCTION	1

PARTIE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. GENERALITES SUR LA LMC

1.1. Rappels	3
1.1.1. Les lignées cellulaires	3
1.1.2. La leucémie	4
1.1.3. La leucémie myéloïde chronique (LMC)	4
1.2. EPIDEMIOLOGIE	6
1.3. HISTORIQUE	7
1.4. ETIOLOGIE	9
1.5. ASPECTS CLINIQUES.....	9

CHAPITRE 2. LMC ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1. PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE	13
2.1.1. Le chromosome Philadelphie	13
2.1.2. Le gène ABL et son protéine	14
2.1.3. Le gène <i>BCR</i> et son protéine	16
2.1.4. Le gène de fusion <i>BCR-ABL</i> et son protéine	17

CHAPITRE 3. DIAGNOSTIC DE LMC

3.1. Diagnostic clinique	20
3.2. Diagnostic biologique	20
3.2.1 Hémogramme	20
3.2.2 Myélogramme	21
3.3. Diagnostic cytogénétique	21
3.3.1. Caryotype	21
3.3.2. Technique FISH (Hybridation in situ en fluorescence)	22
3.4. Diagnostic Moléculaire.....	23
3.4.1. Le Southern-blot	23
3.4.2 RT-PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel ou quantitative	24

PARTIE II. PARTIE PRATIQUE
MATERIELS ET METHODES UTILISEES..... 26

1. ETUDE 1 : Les anomalies major route au diagnostique d'une leucémie myéloïde chronique.	26
1.1. Prélèvement et mise en culture	27
1.2. Caryotype en bande R standard	27
A. Etalement.....	28
B. Dénaturation et coloration au Giemsa	28
C. Analyse microscopique et classement.....	28
1. 3. Hybridation In Situ Par Fluorescence « FISH »	29
2. Etude 2: Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.	30
2.1. Prélèvement et Culture cellulaire	30
2.2. Marquage en bandes GTG	31
2.3. Caryotype spectral.....	32

2.4. Hybridation in situ en fluorescence.....	34
3. Etude 3: Recherche des différents transcrits de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR quantitative multiplex: intérêt diagnostique et suivi chez les patient's atteint de leucémie myéloïde chronique.	35
3.1. Préparation de l'ARN.....	36
3.2. Technique de RT-PCR Multiplexe pour le diagnostique des différents transcrits BCR/ABL.....	37
3.3. Quantification des transcrits BCR-ABL1	39
RESULTATS ET DISCUSSION.....	45
CONCLUSION	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	59

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Schéma du développement des cellules sanguines3

Figure 2 : Mécanismes moléculaires de la leucémie myéloïde chronique5

Figure 3 : Historique de la leucémie myéloïde chronique.....8

Figure 4 : Progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC)11

Figure 5 : Chromosome Philadelphie14

Figure 6 : Représentation schématique de la protéine Abl16

Figure 7 : Représentation schématique de la protéine Bcr17

Figure 8 : La translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11) dans la LMC18

Figure 9 : Hémogrammes de patients LMC (A) en phases chronique et (B) blastique.....20

Figure 10 : Examen cytogénétique de LMC.....22

Figure 11 : Hybridation in situ par fluorescence (FISH) pour la détection
De t (9 ; 22) (q34 ; q11)23

Figure 12 : Thermotron (température et degré d'humidité constants).....32

Figure 13 : Représentation schématique de la translocation t (9 ; 22) et les différents
types de transcrits BCR-ABL1 retrouvés dans la LMC.36

Figure 14 : Gel agarose Seeplexe.39

Figure 15 : A : Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes : Taqman assay).B: Hybridation
de 2 sondes (Hybridization probes). 40-41

Figure 16 : A : Balises moléculaires (Molecular Beacons).B: Amorces scorpion
(Scorpion primer). 41-42

Figure 17 : Définition de la réponse moléculaire selon l'échelle internationale.....43

Figure 18 : A) caryotype humain normal. B) caryotype typique d'une LMC montrant
une translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11.2).47

Figure 19 : Duplication du Ph1 (caryotype) et du bcr-abl (FISH) del (13q14).....47

Figure 20 : del (13q14)	48
Figure 21 : trisomie 12.....	48
Figure 22 : del 17p13.....	48
Figure 23 : caryotype bande G.	49
Figure 24 : Le caryotype spectral (SKY).	50
Figure 25 : Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur métaphases. ...	50
Figure 26 : Translocation t (9 ; 22) (q34.1 ; q11.2).....	51
Figure 27 : Identification du réarrangement du gène MSI2 dans la translocation t (7 ; 17) (p15 ; q22) par hybridation in situ en fluorescence.	51
Figure 28 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t (8 ,17) t (9 ; 22) et t (8 ; 17).	52
Figure 29 : Identification de la fusion MSI2-SOX17 dans la translocation t (8 ; 17) parhybridation in situ en fluorescence.....	52
Figure 30 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations Chromosomiques (9 ; 22) et t (2 ; 12).	53
Figure 31 : Identification d'un réarrangement du gène ETV6 par hybridation in situ fluorescence dans la t (2 ; 12) (q31 ; p13).	53
Figure 32 : Gel agarose Seeplex.	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Programme de l'amplification par PCR.....38

Tableau 2 : Détection et quantification du transcrit BCR-ABL1 chez les patients.....55

LISTE DES ABREVIATIONS

ABL:	Abelson
ACA :	Anomalies Chromosomiques Additionelles
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adénosine Tri- Phosphate
BCR:	Breakpoint Cluster Region
BET :	Bromure d'ethidium
CAC :	Centre Anti Cancer
CCA :	Aberration Cytogénétique Clonale
CYC5 :	Cyanine 5
CYC5.5 :	Cyanine 5.5
DAPI :	4 ,6 – Diamidino-2- Phenylindole
DPO :	Dual Oligo Primé
DTT :	Dithiothréitol
ELN :	Leuropean Leukemia Net
FISH :	Hybridation In Situ en fluorescence
GDP :	Guanosine Diphosphate
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage -Clony
Grb2 :	Growth factor receptor – bound protein 2
GTP :	Guanosine Triphosphate
HCL :	Acide chlorhydrique
ISCN :	International standing committe on humain cytogénétique
ITK :	Inhibiteur de la tyrosine kinase
KCI :	Solution hypotonique
LAL :	Leucémie aiguë lymphoïde
LMC:	Leucémie myéloïde chronique
M-BCR:	Major breakpoint cluster region
m-BCR:	minor breakpoint cluster region
MRAs :	Anomalie Major route
MIRAs :	Anomalie mineur route

LISTE DES ABREVIATIONS

- NCN** : Nombre de copies normalisé
- NFS** : Numération formule sanguine
- NLS** : Signal de localisation nucléaire
- PCR** : Polymérase Chain Reaction
- Ph** : Chromosome Philadelphie
- RCC** : Réponse cytogénétique complète
- PRB** : Protéine du rétinoblastome
- RQ-PCR** : Real-time quantitative-Polymerase chain réaction
- RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium
- RT-PCR** : Reverse Transcriptase -Polymerase chain réaction
- TKI** : Tyrosine Kinase
- SCC** : Salin Sodium citrate
- SCF** : Stem cell factor
- SH** : Homologie de la Src
- SKY** : Spectral karyotyping
- μ-BCR** : micro-bcr

Résumé

La Leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne chronique du groupe des syndromes myéloprolifératifs, elle 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.

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes techniques de la cytogénétique, cytogénétique moléculaire et de la génétique moléculaire, qui sont utilisées pour le diagnostic et le suivi de la leucémie myéloïde chronique.

Nous avons trouvé intéressant de présenter en un premier temps certaines techniques de cytogénétique et de cytogénétique moléculaire FISH qui permet l'identification des aberrations chromosomiques chez les patients de LMC et de présenter également quelques résultats émanant d'études algériennes et internationales.

La cytogénétique permis de diagnostiquer la LMC en détectant les anomalies de nombre et de structure. Cependant, elle possède des inconvénients et des limites. Par contre la FISH est une technique facile et rapide, elle permet de détecter plusieurs anomalies cryptiques grâce à l'utilisation de sondes spécifique.

Lors du diagnostic de LMC, il est très important de faire tout d'abord une recherche du type du transcrit par une RT-PCR multiplex suivie par une RT-PCR quantitative pour calculer le ratio BCR-ABL1/ABL1 qui définir la réponse moléculaire du patient

L'étude présentée a confirmé les données de la littérature en montrant une incidence plus élevée du transcrit majeur.

Mots clés : LMC, chromosome Ph1, BCR-ABL1, caryotype, FISH, PCR multiplex, RT-PCR quantitative.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is a chronic hematological malignancy belonging to the group of myeloproliferative syndromes, mainly caused by a chromosomal abnormality known as the Philadelphia (Ph) chromosome. This chromosome results from a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 : t (9 ; 22) (q34 ; q11.2), which leads to the creation of an oncogene called BCR-ABL1.

Our work consists in a bibliographical research concerning the various techniques of cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular genetics, which are used for the diagnosis and the follow-up of the chronic myeloid leukaemia.

We found it interesting to initially present certain cytogenetic and molecular cytogenetic FISH techniques that allow the identification of chromosomal abnormalities in CML patients and also to present some results from Algerian and international studies.

Cytogenetics can be used to diagnose CML by detecting numerical and structural abnormalities. However, it has its drawbacks and limitations. FISH, on the other hand, is a simple, rapid technique that can detect several cryptic abnormalities using specific probes.

When diagnosing CML, it is very important to first investigate the transcript type by multiplex RT-PCR, followed by quantitative RT-PCR to calculate the BCR-ABL1/ABL1 ratio, which defines the patient's molecular response.

The present study confirmed the data in the literature, showing a higher incidence of the major transcript.

Keywords : CML, Ph1 chromosome, BCR-ABL1, karyotype, FISH, multiplex PCR, quantitative RT-PCR.

الملخص:

ابيضاض الدم النخاعي المزمن هو ورم خبيث مزمن في الدم ينتمي إلى مجموعة المتلازمات لتكاثرية النخاعية، وهو ناتج بشكل رئيسي عن خلل كروموسومي يُعرف باسم كروموسوم فيلادلفيا (Ph) وينتج هذا الكروموسوم عن انتقال متبادل بين الكروموسومين 9 و 22 (t(9;22) : (q34;q11.2)، مما يؤدي إلى تكوين جين أورام يسمى BCR-ABL1.

يتألف عملنا من بحث بليوغرافي لمختلف التقنيات الوراثة الخلوية والوراثة الجزيئية والوراثة الجزيئية المستخدمة في تشخيص ومراقبة سرطان الدم النخاعي المزمن.

رأينا أنه سيكون من المثير للاهتمام أن نبدأ بعرض بعض التقنيات الوراثة الخلوية والجزيئية الوراثة الجزيئية FISH لتحديد الانحرافات الكروموسومية لدى مرضى سرطان الدم النخاعي المزمن بالإضافة إلى بعض نتائج الدراسات الجزائرية والدولية.

لقد أتاح علم الوراثة الخلوية إمكانية تشخيص سرطان الدم النخاعي المزمن من خلال الكشف عن التشوهات في الأعداد والبنية. ومع ذلك، فإن لها عيوبها وقيودها. أما تقنية FISH، من ناحية أخرى، فهي تقنية سهلة وسريعة، يمكنها الكشف عن العديد من التشوهات الخفية باستخدام مجسات محددة.

من المهم جداً عند تشخيص سرطان الدم النخاعي المزمن أن يتم أولاً التحقق من نوع النسخة عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد (RT-PCR)، متبوعاً بتفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي لحساب نسبة BCR-ABL1/ABL1، والتي تحدد الاستجابة الجزيئية للمريض.

أكدت الدراسة الحالية البيانات الواردة في الأدبيات التي تُظهر ارتفاع نسبة الإصابة بالنسخة الرئيسية.

الكلمات المفتاحية: سرطان الدم النخاع المزمن، كروموسوم فيلادلفيا، الجين BCR-ABL1، النمط النووي، FISH، تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد المضاعف، تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي.

INTRODUCTION

Introduction :

La Leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne chronique du groupe des syndromes myéloprolifératifs, elle 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.[45]

Des aberrations chromosomiques, qui se développent après le traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI), chez les patients de LMC pouvant se développer dans la présence du chromosome Philadelphie Ph(+), c'est le cas de ACA c.-à-d. Aberrations Chromosomiques Additionnelles. De plus, il existe également des anomalies chromosomiques chez les patients de LMC, mais, on absence du chromosome Philadelphie Ph(-), c'est le cas de CCA c.-à-d. Aberration Cytogénétique Clonale.[46]

Les CCAs et ACAs sont classés selon le pronostic de LMC en MRAs, anomalies « major route » et MiRAs : anomalie «mineur route ». Les MRAs regroupe les anomalies suivantes : trisomie 8 (+8), isochromosome 17q [i (17q)], Ph dupliqué (+Ph), trisomie 19 (+19), monosomie 7 (-7) et les réarrangements 3q26 (par exemple : inv(3) et t (3 ; 3) (q21q26). Alors que, les MiRAs regroupent le reste des anomalies chromosomiques. De plus, les MARs donne un mauvais pronostic par rapport au MIRAs.[47]

Basant sur la survie des patients, Hehlmann et al. ont classé les ACAs en anomalies à haute risque (+8, +Ph, i (17q), +17, +19, +21, 3q26.2, 11q23, -7/7q, et caryotype complexe.) et anomalies à faible risque (regroupe le reste d'anomalies).

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes techniques de la cytogénétique, cytogénétique moléculaire et de la génétique moléculaire, qui sont utilisées pour le diagnostic et le suivi de la leucémie myéloïde chronique.

Nous avons trouvé intéressant de présenter en un premier temps certaines techniques de cytogénétique et de cytogénétique moléculaire FISH qui permet l'identification des aberrations chromosomiques chez les patients de LMC et de présenter également quelques résultats émanant d'études algériennes et internationales.

CHAPITRE 1
GENERALITES SUR LA LMC

1.1. Rappels

1.1.1. Les lignées cellulaires

Il existe deux lignées cellulaires provenant des cellules souches hématopoïétiques :

La lignée myéloïde et la lignée lymphoïde.

- **La lignée myéloïde donnera**

- les plaquettes, qui forment des caillots dans les vaisseaux sanguins endommagés pour arrêter les saignements.
- Les globules rouges qui sont responsables du transport de l'oxygène.
- Les cellules progénitrices myéloïde se divisent en deux catégories distinctes de globules blancs, appelées granulocytes et monocytes. Ces globules blancs tuent les infections.

- **La lignée lymphoïde**

La lignée lymphoïde se différencie en lymphocyte, un type de globule blanc. Les lymphocytes jouent un rôle important dans la lutte contre les infections et l'élimination des cellules anormales. IL existe trois types de lymphocytes: les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules tueuses naturelles (NK). [1]

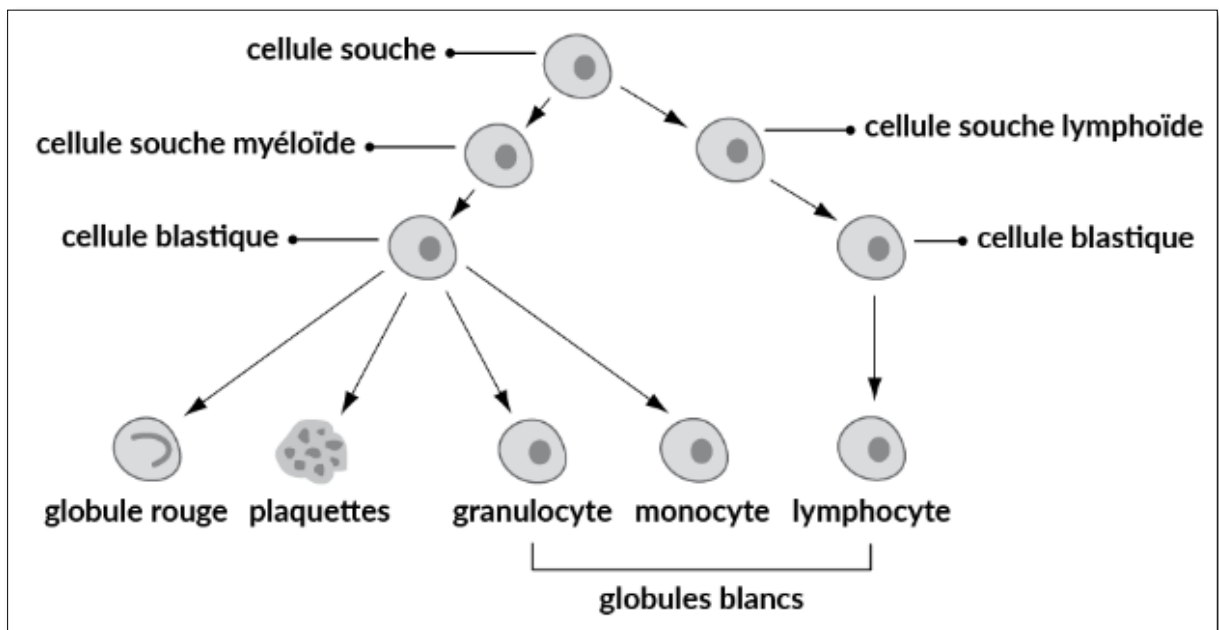


Figure 1 : Schéma du développement des cellules sanguines [1]

1.1.2. Leucémie

La leucémie est un type de cancer majeur qui se développe dans les tissus hématopoïétiques, notamment dans le système lymphatique et la moelle osseuse. Il existe de nombreux types de leucémie, qui peuvent même toucher les enfants.

La leucémie est principalement détectée chez les adultes.

Les cellules responsables du développement de la leucémie sont généralement les globules blancs.

Les globules blancs sont responsables de la lutte contre diverses maladies présentes dans le sang. Ils sont produits et décomposés en fonction des besoins de l'organisme et de son propre cycle de vie. Cependant, les personnes atteintes de leucémie connaissent une surproduction de globules blancs anormaux qui ne fonctionnent pas correctement.

L'ADN est celui qui demande à la cellule de générer et de se dégrader à un rythme particulier au cours d'une période donnée. Dans le cas de la leucémie, les globules blancs sont chargés de continuer à se diviser et à se générer par le processus de mutations non contrôlées.

La production de ces globules blancs devient incontrôlable. Les symptômes et les signes de la leucémie sont causés par un nombre réduit de globules rouges sains, de plaquettes et de globules blancs au fil du temps, car ces cellules sanguines anormales qui prennent la place des cellules sanguines normales dans la moelle osseuse.

Presque tous les cas de leucémie commencent à partir de la moelle osseuse, puis passent par le sang. D'autres parties du corps, comme la rate et les ganglions lymphatiques, peuvent également contenir des cellules leucémiques. [2]

1.1.3. La leucémie myéloïde chronique (LMC)

Le mot « myéloïde » fait référence à la moelle osseuse, qui est le tissu présent dans les os où toutes les cellules sanguines sont produites.

L'augmentation des globules blancs est causée par une anomalie chromosomique dans les cellules souches de la moelle, qui produisent les cellules sanguines.

Le terme « chronique » signifie que la maladie se stabilise progressivement et se développe lentement au début. [3]

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif clonal à prédominance granuleuse causé par la transformation d'une cellule souche pluripotente. [4]

LMC est représenté un modèle d'étude privilégié de la leucémogénèse car les cellules tumorales présentent une mutation chromosomique : la translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22 t (9 ; 22), qui entraîne la création d'un chromosome anormal appelé chromosome Philadelphie (ph).

L'identification du gène ABL, situé sur le chromosome 9 en 9q34, a permis de déterminer la nature précise de ce chromosome Philadelphie. L'analyse de la région surajoutée sur le bras long du chromosome 9 a conduit à l'identification d'un nouveau gène partenaire nommé BCR.

Lors de la translocation, le gène de fusion BCR-ABL est créé. D'après des tests in vitro et in vivo, il a été prouvé que la protéine BCR-ABL, grâce à son activité tyrosine kinase dérégulée, était à l'origine de la maladie. [5]

Cette protéine active plusieurs voies de signalisation, entraînant une augmentation de la prolifération, de la survie et de l'adhésion des cellules. Cela conduit à la transformation des cellules myéloïde et au développement de la LMC. [6]

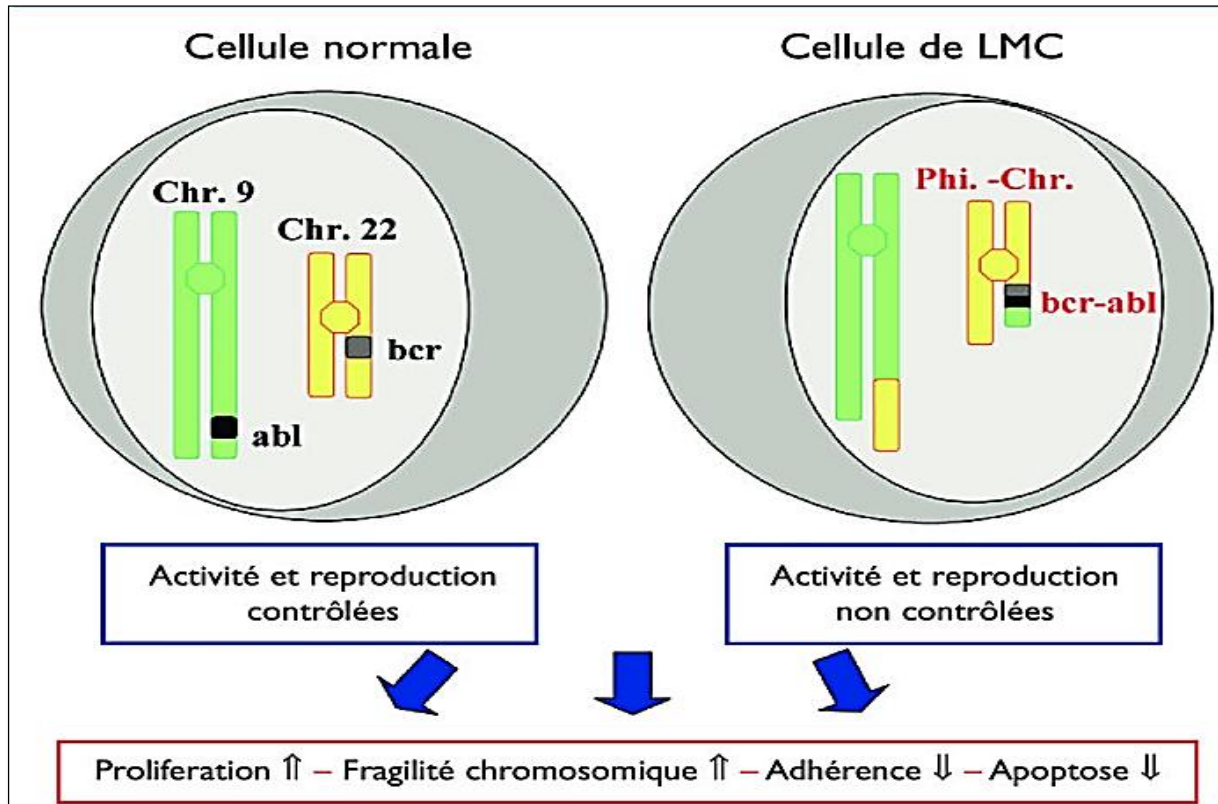


Figure 2 : Mécanismes moléculaires de la leucémie myéloïde chronique[32]

1.2. EPIDEMIOLOGIE

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif peu fréquent qui représente 2 à 5 % des leucémies chez les enfants et 15 % chez les adultes. [5]

Son incidence est de 1 ou 2 cas pour 100 000 personnes par an.

Les hommes sont plus fréquemment touchés que les femmes, mais ces dernières semblent avoir un avantage en termes de survie par rapport aux hommes. Il n'existe pas de différences géographiques ou ethniques évidentes, mais les différences de stratégies de gestion entre les pays pourraient dépendre de la disponibilité de médicaments coûteux et de technologies de diagnostic modernes. [7]

Une étude épidémiologique de LMC réalisée en Algérie a révélé un taux d'incidence élevé, passant de 0,19 en 1994 à 0,4 pour 100 000 habitants en 2004, puis à 0,44 en 2009. Le nombre moyen annuel de nouveaux cas de LMC est passé de 88 cas entre 1994 et 2004 à 155 cas entre 2005 et 2009. [8]

Entre 2010 et 2014, le taux d'incidence globale en Algérie était de 0,53 pour 100 000 habitants. L'âge médian au moment du diagnostic est de 48 ans.

L'étude indique également une légère prédominance masculine, avec un sexe-ratio de 1,2. [9]

Le nombre de cas augmente avec l'âge, pour atteindre trois cas par million d'habitants chez les personnes âgées et l'âge moyen est compris entre 30 et 50 ans. [5]

Dans le monde, les taux d'incidence de la leucémie myéloïde chronique varient entre 0,6 à 2,8 cas pour 100 000 habitants, avec une tendance à augmenter avec l'âge. [10]

En France, Environ 12 000 personnes sont touchées par la leucémie myéloïde chronique, avec environ 700 nouveaux cas déclarés chaque année. [11]

1.3. HISTORIQUE :

À partir du XIX^e siècle, la médecine se base sur les observations cliniques, anatomiques et expérimentales, se transformant ainsi en une véritable science.

En 1827, le français Alfred Velpeau a décrit le tout premier cas de leucémie, Il a observé chez un patient un agrandissement de la rate et du foie, accompagné de la fièvre, de la faiblesse générale, des pierres urinaires et un sang épais.

Par la suite, Alfred Donné s'intéressa à l'étude du vivant au microscope. Il mentionna le cas d'un individu qui avait montré une hypertrophie de la rate lors de l'autopsie et dont le sang semblait semi-purulent au microscope. Ce cas a été exposé sous la forme d'une anecdote dans son cours de microscopie complémentaire des études médicales en 1844.

En 1845, la première description de la leucémie est attribuée à John Hughes Bennett à Édimbourg, qui était le plus complet et scientifique dans son étude.[4]

Au cours de La même année, le médecin Rudolph Virchow examine un patient présentant une hypertrophie anormale de la rate, du foie, ainsi qu'un taux excessif de globules blancs dans le sang.

Rudolf Virchow, identifie que l'origine du problème réside dans la moelle osseuse.il nomme ce phénomène « leucémie », du grec leukos, signifiant « blanc ». [12]

En 1852, Bennett a décrit 37 cas de leucocytémie.

Par la suite, Virchow a constaté en 1856 que les leucémies splénomégalies étaient constituées de cellules sanguines granuleuses à noyau irrégulier ou divisé, tandis que les patients atteints de lymphadénopathie avaient déjà des cellules à noyau lisse. Deux types principaux de leucémie chronique ont été suggérés par Virchow : splénique et lymphatique, qui sont désormais reconnus respectivement comme leucémie et lymphome.

En 1878, Paul Ehrlich introduisit les méthodes de coloration des cellules sanguines, qui a révolutionné l'hématologie, en permettant de distinguer les divers types de leucocytes, donc, Ehrlich a fait la distinction entre les leucémies lymphoïdes et myéloïde.

En 1960, Un petit chromosome a été découvert par Peter Nowell et David Hungerford chez deux patients atteints de LMC, selon le comité de standardisation des chromosomes a nommé ce chromosome « chromosome de Philadelphie (Ph) », qui a proposé de nommer les chromosomes anormaux en leur donnant le nom de la ville où ils ont été trouvés.

La découverte de ce chromosome a donné une étape très importante dans la compréhension de la physiopathologie de la LMC.

En 1973, Janet Rowley montra que le chromosome Ph n'était pas une simple délétion, mais une translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22.[13]

Les années 1980-1990 ont été marquées par une intense activité de recherche en biologie cellulaire et moléculaire. Il a été démontré que les gènes ABL1 et BCR, situés respectivement sur les chromosomes 9 et 22, étaient impliqués dans la translocation t(9;22). Il a été également prouvé que le gène BCR-ABL1 était responsable de la maladie. L'activité tyrosine kinase dérégulée de la protéine BCR-ABL a été identifiée comme l'événement majeur de la leucémogénèse, et les diverses voies de signalisation induites par cette oncoprotéine ont été répertoriées.[14]

Avant les années 2000, en dehors de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (seul traitement réellement curatif), les traitements utilisés pour traiter la LMC étaient le busulfan, l'hydroxyurée et l'interféron-alpha.[15]

En 1998, un premier inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) d'ABL (de BCR-ABL) a été testé avec succès chez des patients atteints de LMC en phase chronique.

Ce médicament (imatinib) a permis d'ouvrir la voie à une thérapie ciblée particulièrement efficace. [14]

De nombreux autres inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ont été développés ou sont en cours de développement. [15]

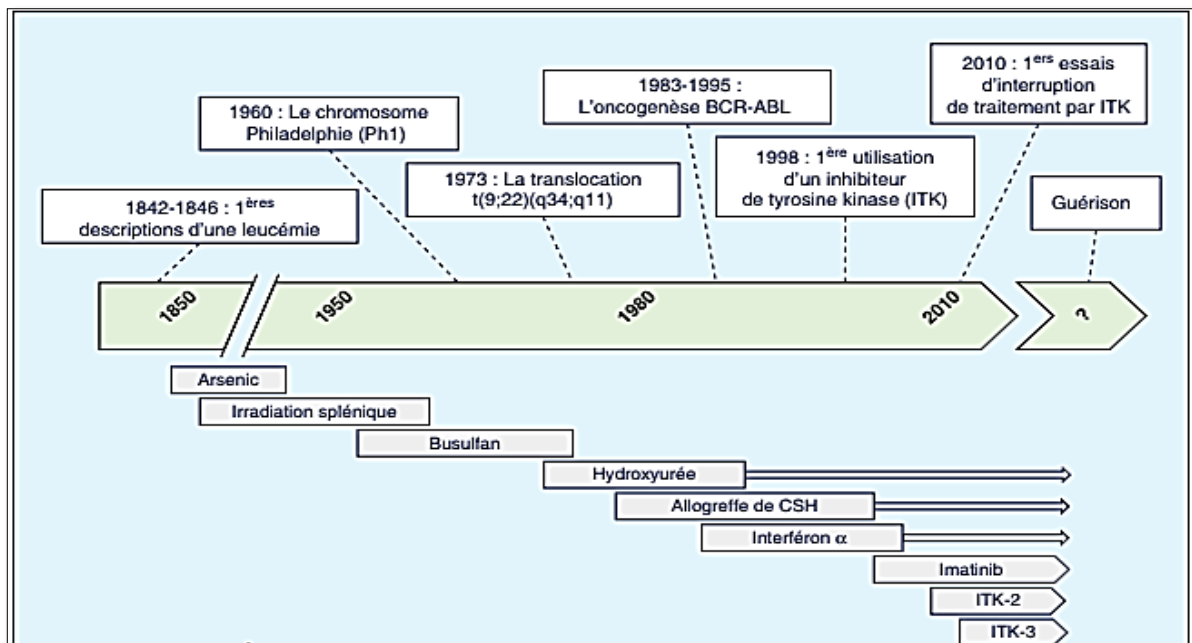


Figure 3 : Historique de la leucémie myéloïde chronique [14]

1.4. ETIOLOGIE

L'étiologie n'est pas identifiée dans la plupart des cas et l'anomalie génétique responsable de la maladie n'est pas héréditaire mais acquise au cours de la vie. [16]

Des facteurs génétiques ou environnementaux spécifiques peuvent provoquer la fusion des points de rupture du gène ABL sur le chromosome 9 avec certains points de rupture du gène BCR sur le chromosome 22, et des facteurs liés au mode de vie, comme le tabagisme et un indice de masse corporelle élevé ont été identifiés comme des facteurs de risque possibles pour la LMC.

Un lien entre l'exposition à des produits chimiques tels que le benzène, les solvants organiques, les agents alkylants, les inhibiteurs de la topoisomérase et la LMC de novo a été démontré à plusieurs reprises, mais les preuves ne sont pas entièrement cohérentes.

Une incidence accrue de LMC a été observée chez les travailleurs exposés au benzène ou à des solvants contenant du benzène. Le benzène lui-même n'est pas considéré comme génotoxique, mais ses principaux métabolites hépatiques sont suspectés d'induire des dommages à l'ADN dans les cellules de la moelle osseuse, ainsi que les agents alkylants et les inhibiteurs de la topoisomérase.

Les études sur les effets tardifs de la chimiothérapie pour diverses tumeurs malignes n'ont pas montré d'augmentation du risque de LMC secondaire. [10]

Les radiations ionisantes sont le seul facteur de risque connu avec un lien établi entre l'incidence de la LMC et le niveau d'exposition à ces radiations chez les survivants de l'explosion atomique à Hiroshima. [16]

1.5. ASPECTS CLINIQUES

La LMC est divisée en 3 phases : la phase chronique, la phase accélérée et la phase blastique. Elles sont reposées sur le nombre de cellules blastiques détectées dans le sang et dans la moelle osseuse, ainsi que de la gravité des symptômes qui y sont associés.

La phase chronique :

Représente la première phase de la maladie, Environ 85 % des patients sont diagnostiqués à ce stade, souvent de manière fortuite lors d'une analyse de sang révélant un grand nombre de globules blancs, ou lors d'un examen physique détectant une rate anormalement volumineuse. À ce stade de la maladie, les blastes dans la moelle osseuse et

le sang sont inférieurs à 10 %, tandis que les plaquettes sanguines restent à un niveau normal. La rate peut compenser la baisse du nombre de cellules sanguines dans la moelle osseuse en raison de l'encombrement liée aux blastes, mais cette augmentation de la production de cellules sanguines par la rate entraînera une augmentation significative de son volume (splénomégalie). les premiers signes qui poussent les patients à consulter sont : la fatigue liée à une perte de poids ou des douleurs abdominales. Cette phase est la plus facile à traiter car les patients réagissent le mieux aux traitements proposés, ce qui permet immédiatement de freiner le développement de la maladie.

La phase accélérée :

Lorsque la maladie se déplace vers la phase accélérée, il y a une forte augmentation du nombre de blastes dans la moelle osseuse, ce qui entraîne une perturbation significative de la production de globules rouges et de plaquettes sanguines. Cette phase est extrêmement brève par rapport à la phase chronique, s'étendant habituellement de quelques mois à une année.

Les symptômes de la LMC s'aggravent avec une perte de poids, de fièvre et des sueurs nocturnes.

L'augmentation de la perturbation de la formation des différents composants du sang (processus connu sous le nom d'hématopoïèse), entraîne également une augmentation des cas d'anémie, des problèmes de la coagulation ou encore des infections fréquentes (dues à une carence en globules blancs fonctionnels), ainsi l'augmentation du volume de la rate continue, ce qui entraîne une contribution accrue à la production de cellules sanguines. En outre, cette phase marquée par l'émergence de mutations secondaires et de défauts cytogénétiques liés à l'instabilité génomique provoquée par l'anomalie oncogénétique majeure de la maladie, et l'efficacité des traitements à ce stade est inférieure à celle de la phase chronique.

La phase blastique :

A ce stade, les blastes constituent plus de 20 % des cellules de la moelle osseuse ou du sang et se propagent de manière massive à travers le réseau sanguin dans l'organisme. Leurs proliférations deviennent si importantes qu'ils remplacent l'hématopoïèse normale, ce qui entraîne une diminution significative de la production des globules blancs et des thrombocytes, qui ne peuvent plus remplir efficacement leurs fonctions.

Il y a un danger pour la survie du patient avec une médiane de survie très faible, d'environ 3 à 6 mois, et les traitements à ce stade sont extrêmement limités, ce qui peut légèrement améliorer la situation, mais il n'est plus possible de stabiliser la maladie, sauf éventuellement par une greffe de moelle osseuse. Les symptômes sont une forte fièvre, une pancytopénie grave et des douleurs osseuses. [11]

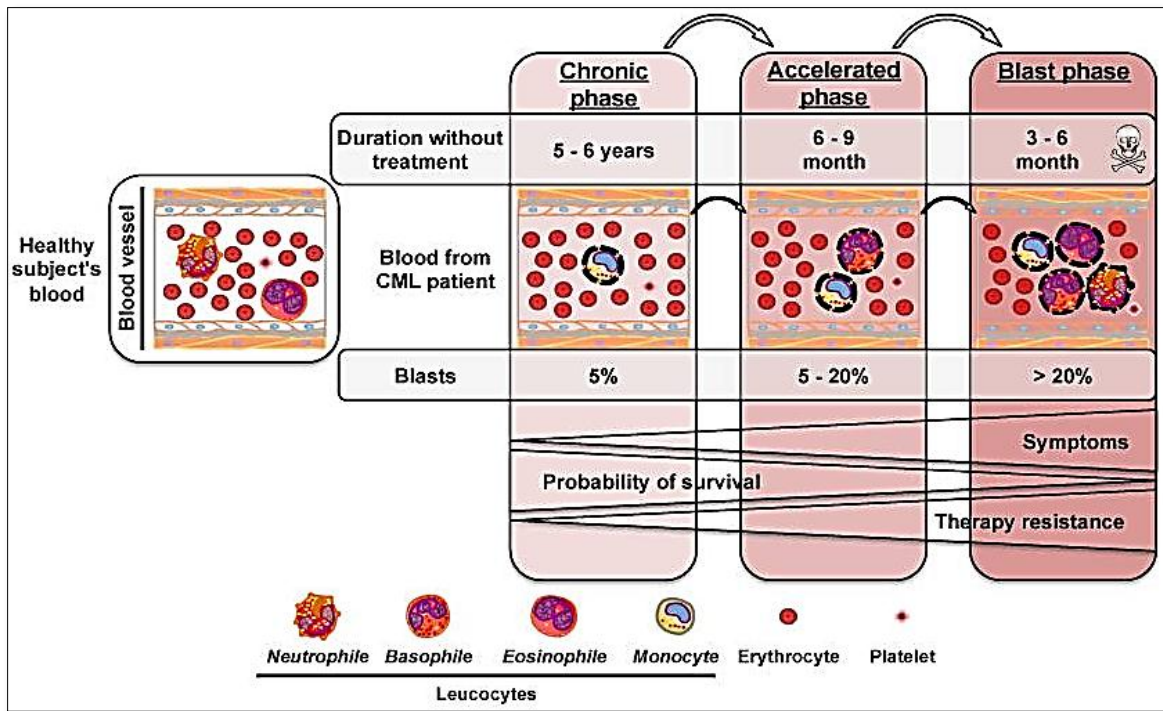


Figure 4 : Progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC) [33]

CHAPITRE 2
LMC ET BIOLOGIE
MOLECULAIRE

2.1. PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE

La leucémie myéloïde chronique est causée par une prolifération monoclonale résultant d'une mutation de cellule souche hématopoïétique pluripotente, ce qui signifie qu'elle est encore peu différenciée.[17]

La physiopathologie de la LMC est associée à la présence d'une translocation équilibrée particulière, la translocation t (9 ; 22), qui est responsable de la formation du chromosome Philadelphie, qui donne naissance au gène de fusion BCR-ABL. La protéine BCR-ABL a une activité tyrosine kinase et interagit avec de multiples voies de signalisation intracellulaires.[18]

Le chromosome Philadelphie (Ph), qui est un marqueur de la maladie, est présent dans toutes les cellules d'origine monocytaire, granulocytaire, érythroblastique, mégacaryocytaire, ainsi que lymphocytaire (B, T, NK).

Il n'est pas présent dans les fibroblastes et les cellules extra hématopoïétiques.[17]

2.1.1. Le chromosome Philadelphie

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée par la présence d'un marqueur chromosomique particulier, appelé chromosome Philadelphie (Ph).[19]

En 1960, Nowell et Hungerford publient la première description du chromosome de Philadelphie (Ph), qui porte le nom de la ville dans laquelle il a été initialement identifié. [20]

Ce chromosome est le résultat d'une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 t (9 ; 22) (q34 ; q11). et retrouvée dans 95 % de cas de LMC. Cette translocation produit sur le dérivé 22, le gène hybride BCR-ABL qui est le résultat de la fusion de la partie 5'BCR du gène BCR (située sur le chromosome 22) avec la partie 3'ABL du gène ABL (située sur le chromosome 9).

Le gène BCR-ABL code pour une protéine à activité tyrosine kinase jouant un rôle important dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.[19]

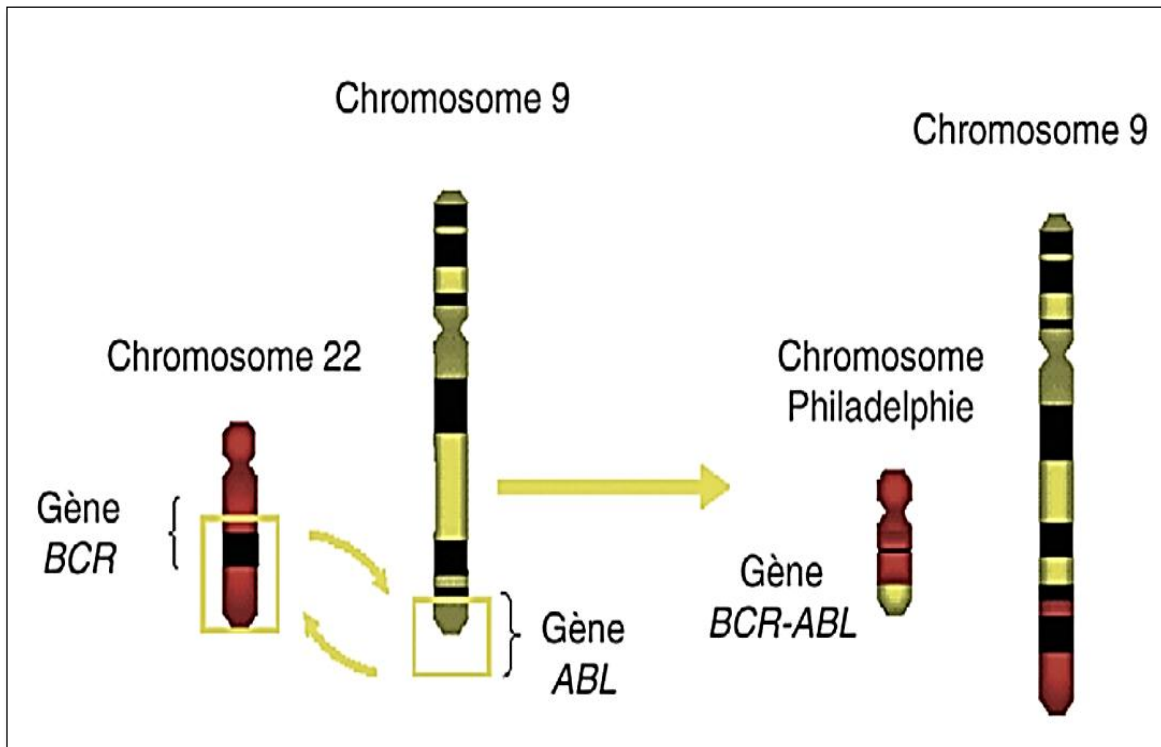


Figure 5 : Chromosome Philadelphie résultant d'une translocation réciproque [5]

2.1.2. Le gène *ABL* et son protéine

Le gène *ABL* est nommé d'après le virus d'Abelson de la leucémie murine (A-MuLV). Il se trouve dans de nombreux types de cellules différents, tels que les lignées hématopoïétiques, la rate, le thymus et le testicule. [21]

L'oncogène Abelson (c-*ABL*) se trouve sur le chromosome 9, en position 9q34. [5]

Le gène *ABL* est constitué de 11 exons et possède un site alternatif d'initiation de la transcription entre les exons 1a et 1b. [15]

Les ARN messagers produits ont respectivement une taille de 6 et 7 kb. Il existe deux variétés de protéines d'environ 145 kDa qui sont fabriqués en fonction du premier exon, soit 1a ou 1b.

La protéine *ABL* contenant l'exon 1b est myristoylée c'est à dire échangée par un groupement lipide de type acide gras saturé sur un résidu glycine ce qui entraîne une localisation membranaire.

Ce résidu glycine n'est pas présent dans la forme 1a est majoritaire ce qui indique une localisation nucléaire prédominante. [5]

Les protéines ABL sont des tyrosines kinases non réceptrices qui ont un rôle dans la transmission des signaux et la régulation de la croissance cellulaire. [22]

La partie N- terminale de la protéine ABL possède des domaines d'homologie SH (homologie de la Src) similaires à ceux de la protéine de la Src.

Le domaine SH1 est le support de l'activité tyrosine kinase, Il comprend le site de liaison de l'ATP, le site catalytique et la boucle d'activation avec le site principal d'autophosphorylation (Y393).

Le domaine SH2 facilite l'interaction avec des protéines contenant des résidus de tyrosines phosphorylés.

Le domaine SH3 est responsable des interactions avec des séquences contenant une grande quantité de proline. [15]

La partie C-terminale de la protéine, contient une séquence de localisation nucléaire (NLS pour signal de localisation nucléaire) et des domaines qui lui permettent de se fixer aux filaments d'actine et à l'acide désoxyribonucléique (ADN).

La protéine ABL présente une dualité structurale et fonctionnelle, avec des domaines de régulation qui lui permettent de jouer un rôle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule et de passer entre les deux compartiments.

Le rôle d'ABL dans le compartiment nucléaire est de réguler négativement le cycle cellulaire. Au stade G0, ABL se lie à l'ADN et forme un complexe avec des protéines inhibitrices du cycle comme pRb (protéine du rétinoblastome).

Pendant la transition G1/S, la protéine pRb est phosphorylée et se dissocie d'ABL, ce qui entraîne son activation.

Lorsqu'elle se trouve dans le cytoplasme, la protéine ABL joue un rôle crucial dans la croissance et la prolifération cellulaires, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs de facteurs de croissance. [5]

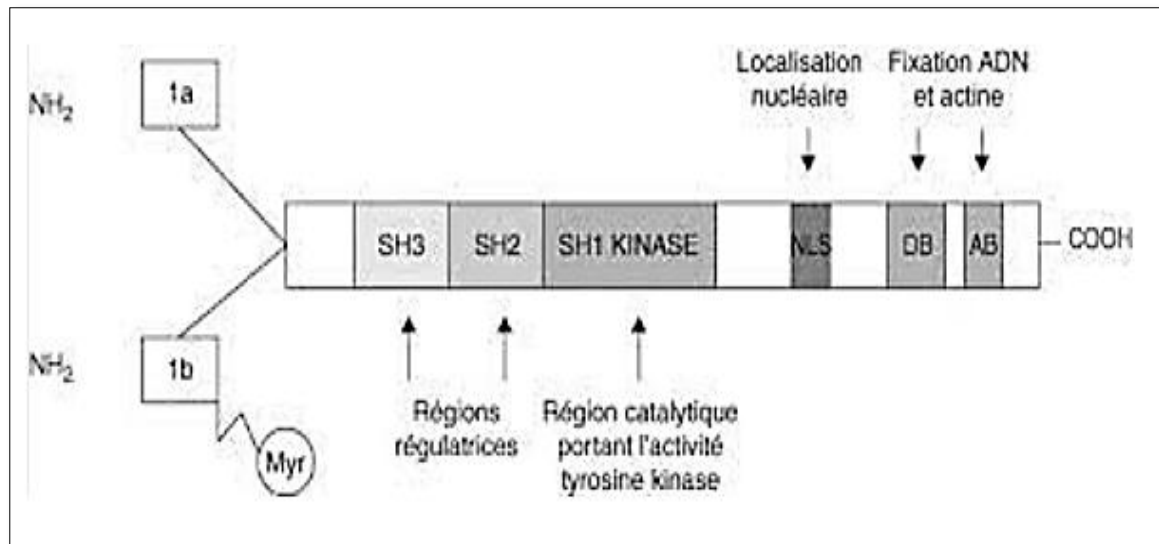


Figure 6 : Représentation schématique de la protéine ABL [5]

2.1.3. Le gène *BCR* et son protéine

Le nom du gène BCR est issu de la détermination du point de cassure du chromosome 22 dans la LMC, qui concerne une région très limitée appelée breakpoint cluster region.

Les cassures chromosomiques dans la LMC se produisent presque exclusivement dans la région de 5,8 kb du gène BCR, connue sous le nom de région M-BCR (major break point cluster region).[21]

Le gène BCR contient 23 exons, Il s'étend sur 135 kb, et autorise la transcription de deux types d'ARN messagers de taille 4,5 et 6,7 kb, qui codent une protéine de 160 kDa, cette protéine qui se localise dans le cytoplasme lorsque la cellule n'est pas en cycle, est exprimée de manière péri-chromosomique pendant la mitose, ce qui suggère son implication dans le cycle cellulaire. Elle est composée de plusieurs domaines.

Dans la partie N-terminale, le domaine 1B il permet la dimérisation de la protéine BCR-ABL ce qui entraîne l'ouverture de l'activité kinase, et le domaine 2B contient deux sites de liaison aux domaines SH2 tels que ceux portés par la protéine ABL et la protéine Grb2.

La partie centrale présente un domaine d'homologie avec les protéines Dbl (facteur d'échange guanosine triphosphate (GTP)/guanosine diphosphate (GDP)).

La partie C-terminale possède une fonction GAP (protéine activatrice de GTPase) et joue un rôle dans la bactéricidie des polynucléaires. [5]

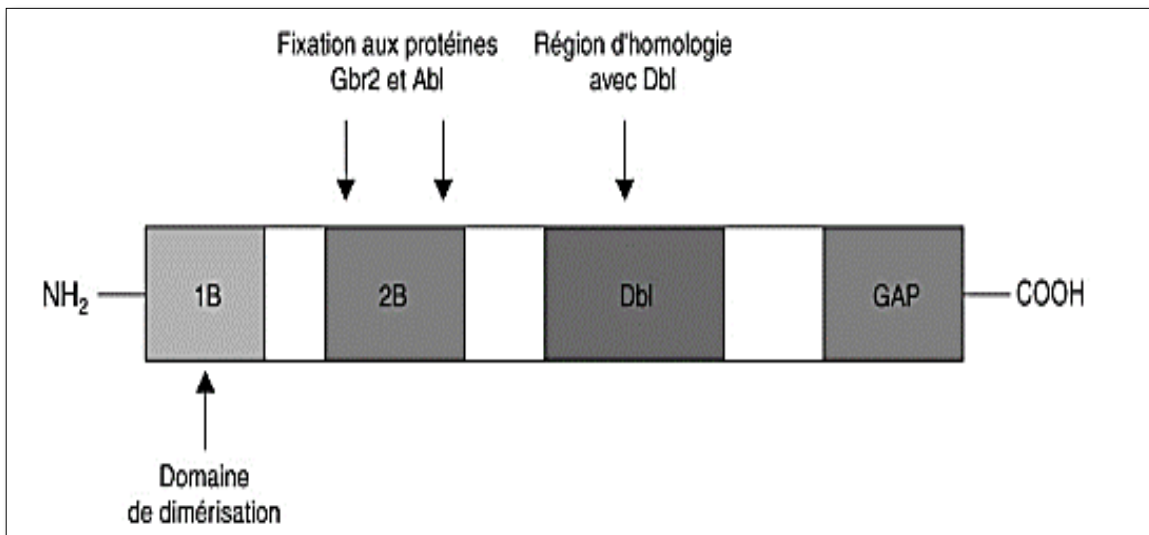


Figure 7 : Représentation schématique de la protéine BCR [5]

2.1.4. Le gène de fusion *BCR-ABL* et son protéine

Le gène hybride BCR-ABL est créé par la translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22 t (9 ; 22) (q34 ; q11), qui transpose une partie de l'oncogène ABL situé en position 9q34, à la place d'une partie du gène BCR situé en position 22q11. [23]

Les réarrangements les plus fréquents lors de la LMC sont les conséquences de la fusion du gène ABL qui a été rompu entre les exons 1 et 2 et du gène BCR qui a été rompu dans une région où les points de cassure sont variables, connue sous le nom de M-BCR (Major BCR). La zone correspondant aux exons 12 à 16 du gène BCR est subdivisée en cinq bandes, de b1 à b5, qui correspondent aux cinq exons impliqués (exons b1=12, exons b2=13..., exons b5=16). La présence de coupure dans cette région se produit principalement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4. Ainsi la formation des produits de fusion b2a2 et b3a2. [5]

Le gène de fusion BCR-ABL est fonctionnel, c'est-à-dire qu'il est transcrit en un ARNm, de taille 8,5 kb de type b2a2 ou (e13a2) ou b3a2 ou (e14a2) .

Il traduit en une protéine chimérique de 210 kDa, la P210 BCR-ABL. [23] [24]

La protéine codée par le variant b3a2 est plus fréquente ET contient 25 acides aminés de plus que celle du variant b2a2. Il y a d'autres variants de la translocation t (9;22), responsable dans la plupart des cas, de phénotypes leucémiques différents, La fusion e1a2 est due à une cassure dans la m-BCR (minor BCR), c'est-à-dire entre les exons 1 et 2 de BCR .

La fusion e1a2 produit une protéine chimérique de 190 kDa.[5]

Chez des patients atteints de LMC, la fusion e19a2 a été identifiée avec une hyperleucocytose modérée peu évolutive et une splénomégalie absente ou minime. Elle est le résultat d'une cassure entre les exons 19 et 20 de BCR, dans la région micro-bcr (μ -bcr), ce qui conduit à la production d'une protéine BCR-ABL de 230kDa.[23]

La protéine BCR-ABL, qui a une taille de 210 kDa, contient les trois domaines SH1, SH2, SH3 ainsi que tous les autres domaines d'ABL.

En ce qui concerne le BCR, le motif de dimérisation est la partie la plus importante. La présence de cette partie de BCR entraîne la dimérisation de la protéine BCR-ABL et à son auto-activation par transphosphorylation.

De plus, la perte de la partie N-terminale d'ABL élimine son auto-inhibition.

Ces deux changements protéiques sont responsables de l'activation permanente de la tyrosine kinase de BCR-ABL. [5]

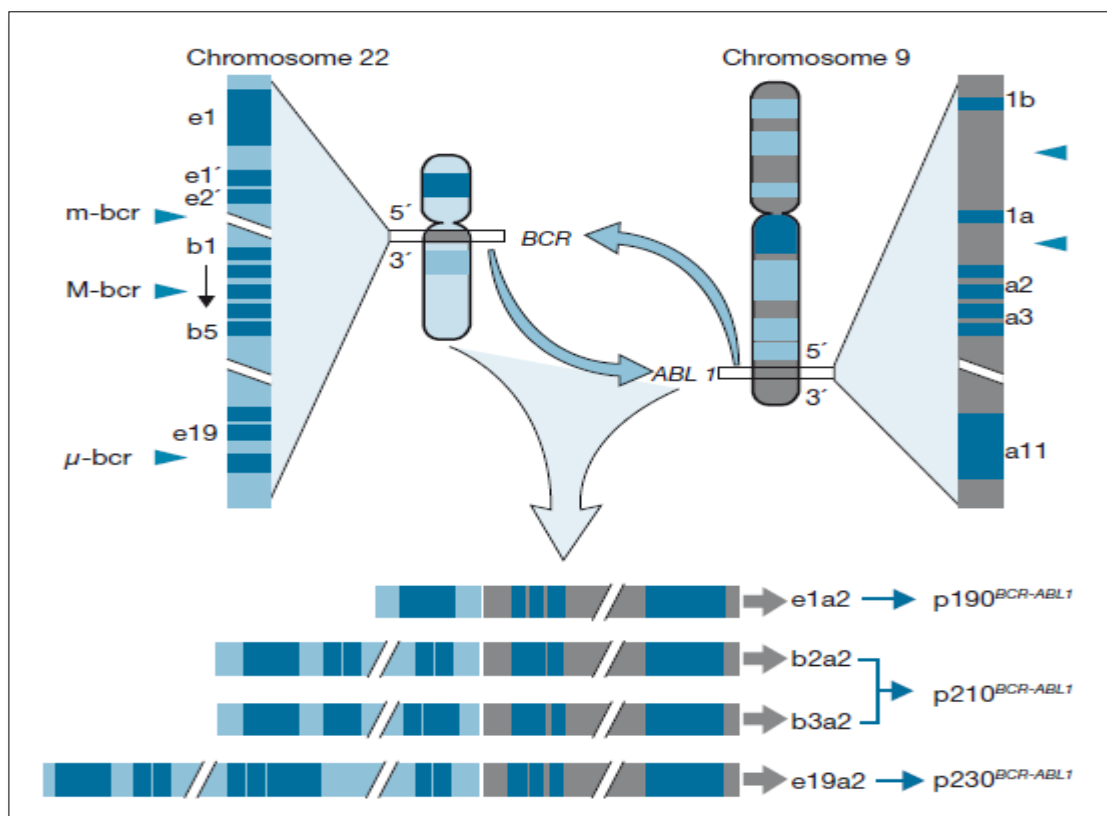


Figure 8 : La translocation t (9;22)(q34;q11) dans la LMC [34]

CHAPITRE 3
DIAGNOSTIC DE LMC

3.1. Diagnostic clinique

Début insidieux : Le diagnostic est souvent basé sur une numération formule sanguine (NFS).

Altération de l'état général, la fièvre et la splénomégalie (augmentation du volume de la rate).

Complications : principalement pendant la période chronique :

- l'hyperuricémie (crise de goutte)
- hémorragies secondaires à la thrombopathie.
- les complications spléniques (infarctus, rupture de la rate, hématome sous-scapulaire).
- les thromboses (priapisme, thrombose portale).
- la leucostase (trouble visuel ou insuffisance respiratoire).[25]

3.2. Diagnostic biologique

3.2.1. Hémogramme

L'hémogramme, ou numération-formule sanguine (NFS) est l'examen le plus important car c'est le seul qui permette de poser un diagnostic.

- L'hyperleucocytose est franche, dépassant $20 \times 10^9/l$ principalement constituée de polynucléaires neutrophiles, accompagnée de basophilie et d'éosinophilie.
- La myélémie est constante et harmonieuse, sans hiatus de différenciation, et la blastose est faible pendant la phase chronique ($< 5\%$).
- L'anémie (normocytaire et normochrome) est modérée et peu courante.
- La thrombocytose est habituelle et souvent dépassant les $500\ 000/mm^3$. Parfois extrêmement élevée, elle est rarement responsable d'incidents thrombotiques par thrombopathie associée. [5]

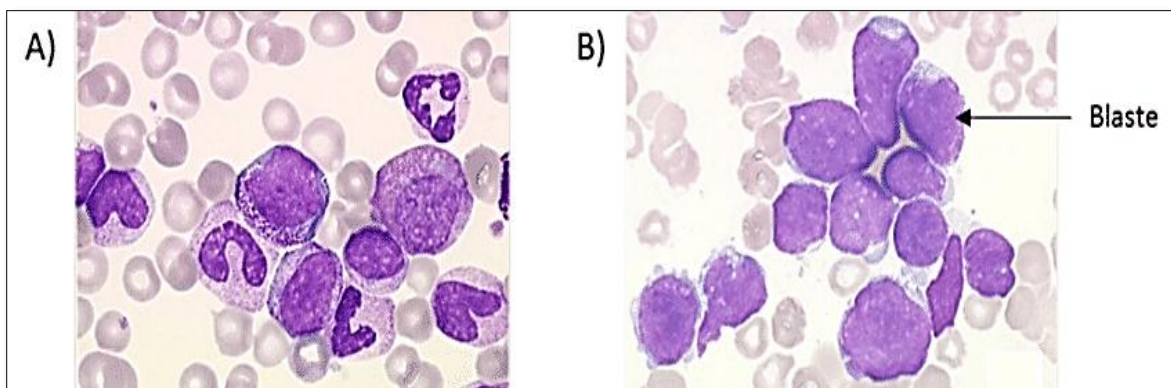


Figure 9 : Hémogrammes de patients LMC (A) en phases chronique et (B) blastique [35]

3.2.2. Myélogramme

Le myélogramme permet de réaliser le caryotype initial et confirmer la phase de la maladie.

La moelle présente une augmentation de la richesse cellulaire, avec une hyperplasie granuleuse marquée et une blastose médullaire inférieure à 10 % en phase chronique.

On peut trouver, comme dans le sang, une basophilie, et une éosinophilie.

Et souvent, une augmentation des mégacaryocytes de petite taille. [5]

3.3. Diagnostic cytogénétique

L'analyse cytogénétique joue un rôle crucial dans le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC). car elle permet non seulement de poser le diagnostic avec la mise en évidence de la translocation réciproque t (9; 22)(q34;q11), mais aussi d'identifier les translocations différentes et la présence éventuelle d'anomalies cytogénétiques additionnelles qui peuvent influencé la qualité de la réponse au traitement.[26]

3.3.1. Caryotype :

C'est un examen essentiel pour diagnostiquer la LMC. il est réalisé sur un échantillon médullaire.

Le caryotype permet de mettre en évidence le chromosome Ph dans 95 % des cas. [5] Il permet aussi de détecter les anomalies associées à la translocation t (9 ; 22) dans le clone Ph-positif. Leur survenue pendant l'évolution de la LMC est classiquement précurseur ou lié à l'accélération de la maladie.

Les schémas classiques d'évolution clonale comprennent l'apparition d'une trisomie 8, d'une trisomie 19, d'un isochromosome 17q et de la duplication du chromosome Ph. [19] Dans environ 5 % des cas, le chromosome de Philadelphie ne peut être détecté et la confirmation du diagnostic dépend de la découverte du transcrite BCR-ABL par hybridation fluorescente in situ ou par PCR de la transcriptase inverse. [7]

Cette technique présente plusieurs inconvénients : elle nécessite un prélèvement médullaire, elle est lourde et longue. [27]

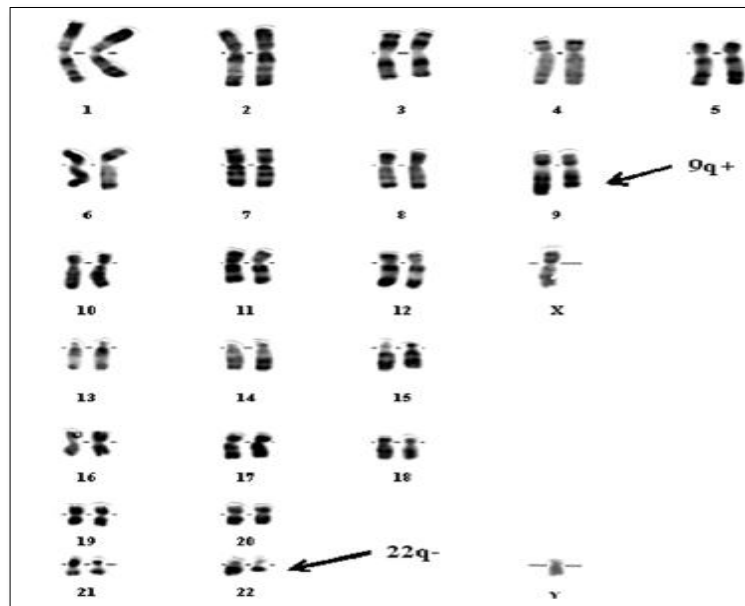


Figure 10 : Examen cytogénétique de LMC [36]

3.3.2. Technique FISH (Hybridation in situ en fluorescence)

La FISH (hybridation in situ fluorescente) utilise des sondes spécifiques fluorescentes pour détecter la fusion des gènes BCR et ABL. Elle permet d'identifier les chromosomes Ph "masqués" qui ne sont pas visibles avec le caryotype conventionnel. Cette technique s'applique aux cellules sanguines en interphase, elle est plus sensible que la cytogénétique classique. [27]

Le principal avantage de la technique FISH réside dans sa capacité à analyser rapidement un grand nombre de cellules, même lorsque les échantillons contiennent un nombre insuffisant de métaphase. [28]

Aucun protocole ne recommande la FISH sur les cellules médullaires ou sanguines pour évaluer la réponse cytogénétique.

La seule situation où la réponse cytogénétique ne peut être évaluée que par FISH sur cellules médullaires lorsque la leucémie myéloïde chronique (LMC) est Ph-négative mais BCR-positif.

Les résultats de la FISH en interphase ne sont pas superposables à ceux de la FISH en métaphase. La FISH métaphasique explore, comme le caryotype et le compartiment des cellules en division, tandis que la FISH interphasique explore le compartiment des cellules quiescentes.

La sensibilité de la FISH dépend du nombre de cellules analysées. Il est nécessaire d'analyser au minimum 200 (voire 500) noyaux.

La sensibilité de la FISH métaphasique est comparable à celle de la cytogénétique conventionnelle, mais la FISH interphasique est comprise entre 10^{-2} et 10^{-3} , donc très inférieure au seuil de sensibilité des techniques moléculaires (10^{-5}) requises pour quantifier la maladie résiduelle. [19]

Les sondes de première génération, qui couvrent spécifiquement les gènes BCR et ABL, sont marquées avec deux fluorochromes différents (vert et rouge). La présence de la translocation se manifeste par un spot de fusion vert-rouge ou jaune, localisé sur le dérivé 22q-. [29]

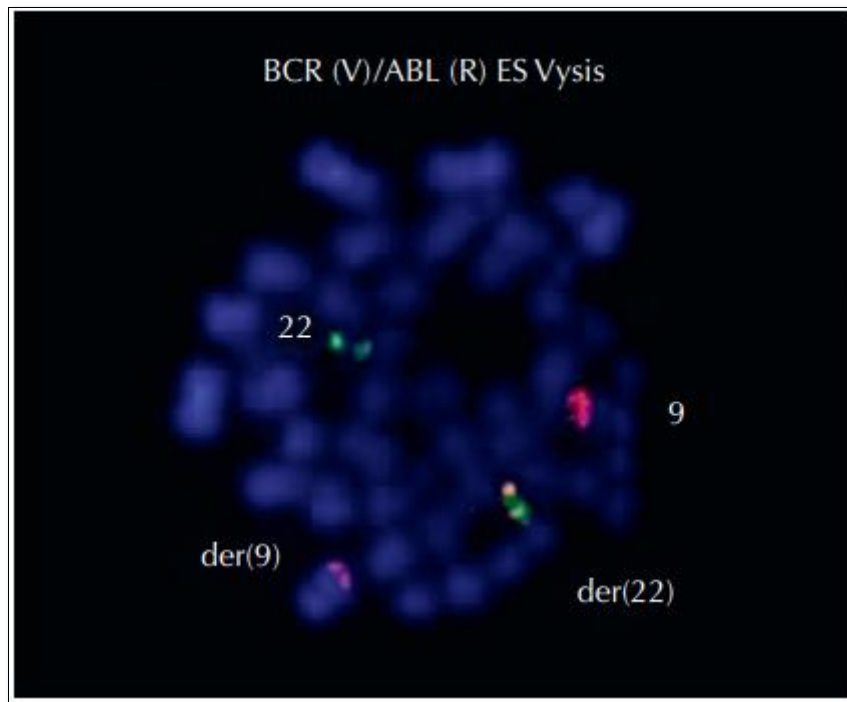


Figure 11 : Hybridation in situ par fluorescence (FISH) pour la détection de t (9 ; 22) (q34 ;q11)[37]

3.4. Diagnostic Moléculaire

3.4.1. Le Southern-blot

Cette méthode a été la première à permettre une analyse moléculaire de la translocation BCR-ABL. Elle met en évidence les réarrangements chromosomiques de BCR-ABL en identifiant les modifications des fragments obtenus après digestion enzymatique et hybridation avec une sonde spécifique BCR.

Cette technique commence par la digestion de l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction, suivie de le fragmenter puis le colorer.

On sépare d'abord les fragments d'ADN par électrophorèse, puis on dénature l'ADN

bicaténaire. Ensuite, l'ADN est transféré sur une membrane de nitrocellulose. L'échantillon est alors mis en contact avec une sonde marquée spécifique au gène BCR (radioactive ou fluorescente). Après hybridation, la sonde dans l'excédent est éliminé et l'hybridation est visualisée sur un film autoradiographie.[30]

3.4.2. RT-PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel ou quantitative

Le diagnostic moléculaire est réalisé à partir d'un prélèvement sanguin. [27]

La RQ-PCR (PCR quantitative sur ADN c) est la méthode de référence pour le suivi des patients souffrant de LMC. Elle est basée sur une méthode de PCR en temps réel développée à la fin des années 1990. [31]

La RQ-PCR qui permet de détecter le transcrite de fusion BCR-ABL et sa quantification, et permettant ainsi d'adapter le traitement du patient.

La, RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR, examen qualitatif) qui recherche tous les transcrits de fusion BCR-ABL et identifie pour un patient donné le transcrite en présence (b2a2, b3a2 selon le point de cassure sur le gène BCR). Elle permet de confirmer le diagnostic en cas de chromosome Philadelphie "masqué" ou d'échec du caryotype.[27]

**PARTIE
PRATIQUE**

METHODOLOGIE

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes techniques de la cytogénétique, cytogénétique moléculaire et de la génétique moléculaire, qui sont utilisées pour le diagnostic et le suivi de la leucémie myéloïde chronique.

Nous avons trouvé intéressant de présenter en un premier temps certaines techniques de cytogénétique et de cytogénétique moléculaire FISH qui permet l'identification des aberrations chromosomiques chez les patients de LMC et de présenter également quelques résultats émanant d'études algériennes et internationales.

Pour cela nous avons utilisé les études suivantes :

Etude 1 : Les anomalies major route au diagnostic d'une leucémie myéloïde chronique (LMC). [38]

Etude 2 : Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.[39]

Dans un deuxième volet, nous avons trouvé très intéressant de présenter l'apport de la génétique moléculaire (RT-PCR multiplexe et RT-PCR quantitative) dans le diagnostic et le suivi de la LMC. Pour cela nous avons choisi l'étude suivante :

Etude 3 : 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. [40]

MATERIELS ET METHODES UTILISEES :

1. ETUDE 1 : Les anomalies major route au diagnostique d'une leucémie myéloïde chronique.

Cette étude réalisée au niveau du laboratoire de cytogénétique du service d'hématologie du centre Anti cancer (CAC) de Blida, durant une période de 4 mois du 01 février au 30 mars, du 01 juin au 30 Juillet 2020.

Elle est concernée 34 patients atteints de leucémie myéloïde chronique (23 hommes et 11 femmes) âgés de 21 à 85 ans.

1.1. Prélèvement et mise en culture

La moelle osseuse a été prélevée à partir des os plats dans des conditions d'asepsie et sous anesthésie locale. Après ponction à l'aide d'un trocart, sur lequel est adaptée une seringue préalablement héparinée, elle a été aspirée puis mise dans un tube contenant un milieu de transport (RPMI).

Après comptage, les cellules de la moelle osseuse ont été mises en culture à 37°C dans une étuve à CO₂ (24 H synchronisation) à raison de 2×10^6 cellule / ml dans milieu de culture RPMI complet.

La culture cellulaire a été utilisée pour les deux techniques cytogénétiques : le caryotype en bande R et la FISH.

60 µL de colchicine ont été ajoutés dans chaque flasque 30 minutes avant la fin de l'incubation. La colchicine a perturbé les fuseaux mitotiques et a bloqué les cellules en métaphase de la mitose, Après la fin du temps d'action de la colchicine, les flasques ont été retirés de l'étuve d'incubation.

Les cellules ont été centrifugées dans un tube Falcon de 15 mL à une vitesse de 1300 tours/min pendant 8 minutes, puis le surnageant a été éliminé. Le reste du culot cellulaire a été mélangé à 15 mL de solution hypotonique (KCl) et centrifugé à 1300 tours/min pendant 8 minutes, puis séché dans une étuve sèche à 37°C pendant 25 minutes. Les cellules en mitose ont été gonflées grâce à la solution hypotonique.

Par la suite, Le culot cellulaire a ensuite été pré-fixé par une solution de Carnoy, centrifugé à 1300 tours/min pendant 8 minutes, puis fixé à l'aide d'un mélange fixateur (1/3 acide acétique, 2/3 méthanol) et centrifugé une deuxième fois dans le même mélange. Cette étape de fixation a été répétée deux fois pour obtenir un culot cellulaire clair.

1.2. Caryotype en bande R standard

Le caryotype correspond à une analyse morphologique au microscope, des chromosomes d'une cellule. Il permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques, comme des trisomies, ou de définir certaines caractéristiques de l'individu, comme le sexe génétique.

Il permet aussi de révéler d'éventuelles anomalies génétiques, Cet examen a non seulement confirmé le diagnostic en montrant dans plus de 90% des cas, la translocation classique réciproque t (9 ; 22) (q34.1 ; q11.2) spécifique à la LMC, mais a également identifié dans

moins de 10% des cas, les translocations variantes t (9 ; 22) impliquant plusieurs autres chromosomes partenaires, ou la présence d'éventuelles anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)/(ACA Ph+) dans cette pathologie.

Ce réarrangement chromosomique n'a pas été visible dans environ 5% des cas de LMC atypique (a-LMC) (LMC Ph I négatif). Dans ces cas, il a fallu avoir recours à d'autres techniques de type FISH ou RT-PCR.

L'identification des chromosomes a été faite après un marquage en bandes R (Reverse) qui a correspondu à un marquage des segments non variables (euchromatine). Le marquage en bandes R a mis en évidence des bandes sombres et claires, principalement basé sur un traitement thermique à 87°C en milieu salin (NaH₂PO₄) et une coloration au Giemsa.

A. Etalement

L'étalement du culot cellulaire ou « étalement chromosomique » consiste à étaler la suspension cellulaire fixée sur une lame pour le caryotype. Il a été fondé sur la présence d'un taux d'humidité idéal. Deux gouttes distinctes de culot ont été étalées sur des lames propres humidifiées à l'aide de la vapeur du bain-marie. Les lames ont été égouttées puis séchées à l'air libre.

B. Dénaturation et coloration au Giemsa :

Les lames ont d'abord été réhydratées par incubation dans de l'eau distillée pendant 5 minutes. La dénaturation s'est faite par NaH₂PO₄ au bain-marie à 87°C selon le climat extérieur. La dénaturation a été arrêtée par incubation des lames dans de l'eau distillée à 18°C (choc thermique).

Elles ont ensuite été colorées au Giemsa pendant 5 minutes, puis séchées et observées au microscope.

La coloration de Giemsa a entraîné l'apparition de bandes sombres et claires alternées sur les chromosomes métaphasiques : le « G-banding ». La topographie des bandes a été caractéristique d'un chromosome et a permis de l'identifier (les deux chromosomes d'une même paire ont eu la même topographie de bandes).

C. Analyse microscopique et classement :

Le caryotype obtenu a été traité par un logiciel (IKAROS) qui a permis de classer les chromosomes.

Lors d'une étude cytogénétique par, plusieurs cas ont été rencontrés :

- Au diagnostic : il a été nécessaire d'analyser au moins 20 mitoses.
- En cas d'anomalie non clonale : il a été souhaitable de confirmer ou infirmer une éventuelle clonalité en analysant plus de mitoses ou en réalisant une étude FISH.
- En cas de maladie résiduelle : il a été recommandé caryotype d'analyser au moins 30 mitoses ou de réaliser une analyse ciblée en cytogénétique moléculaire si une analyse de 20 mitoses n'a pas révélé l'anomalie recherchée.

1.3. Hybridation In Situ Par Fluorescence « FISH » :

La FISH est une technique cytogénétique qui se réalise par hybridation de sondes génomiques fluorescentes complémentaires des gènes BCR (sonde verte) et ABL1 (sonde rouge). Elle permet de visualiser directement la fusion sur des métaphases ou des noyaux cellulaires en interphases. Ainsi la fusion BCR-ABL1 est visualisée sous forme d'un signal ou spot jaune résultant de la fusion des deux couleurs. Elle aurait une sensibilité supérieure au caryotype en bandes R conventionnel dans le suivi de la réponse thérapeutique : définition de la réponse cytogénétique complète (RCC). Elle aurait une meilleure corrélation avec la réponse moléculaire.

La FISH a été réalisée en 6 étapes successives :

D'abord le culot cellulaire a été étalé sur une lame similaire au processus du caryotype mais avec une seule goutte.

Prétraitement des lames par le tampon 2xSCC (Saline-sodium citrate buffer) suivie d'alcool éthylique de degrés croissants (70%, 85% et 100%). Le SCC a été utilisé comme tampon d'hybridation, pour contrôler la stringence des étapes de lavage et aider à maintenir la structure cellulaire (membranes et cytoplasme) pour que les cellules puissent tolérer une température élevée. Les lames ont été déshydratées dans les bains d'ordre croissant (70%, 85% et 100%) pendant 2 min chacun, puis séchées à l'air libre.

Application des sondes cytocell à double sonde BCR et ABL1 (10µl) et ont été couvertes par des lamelles.

L'hybridation des sondes s'est déroulée dans le ThermoBrite, un système programmable automatisant les étapes de dénaturation et d'hybridation. Le programme de ThermoBrite a débuté par une dénaturation à 65-70°C pendant 5 minutes, puis une réduction progressive de la température jusqu'à 37°C pour une hybridation pendant une nuit dans un récipient humide.

Le lavage post-hybridation a été réalisé par des solutions salines d'IGEPAL à 0,1 M et à 0,3 M pendant 2 minutes, suivi d'un lavage par une solution de Tween à température ambiante pendant 30 secondes. Ensuite, les lames ont été déshydratées par passage dans des bains d'alcool éthylique de degrés croissants pendant 1 min chacun (70%, 85% et 100%).

Le fluorochrome DAPI a été appliqué sur chaque lame dans l'obscurité, se liant fortement aux bases A et T de l'ADN, émettant une fluorescence bleu brillante détectable entre 450 et 490 nm ce qui a permis la détection de l'ADN au microscope à fluorescence.

La lecture s'est faite au microscope à fluorescence (ZEISS), et à l'abri de la lumière. L'analyse des résultats a été faite par le logiciel ISIS tout en se référant au design de la sonde pour effectuer la lecture.

2. Etude 2 : Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.

2.1. Prélèvement Culture cellulaire:

Les cellules mononuclées du sang ou de la moelle sont récupérées par centrifugation suite à l'utilisation du milieu Ficoll-Paque. Les cellules mononuclées se retrouvent dans une couche blanchâtre entre deux couches, une couche supérieure contenant le plasma et une couche inférieure contenant le Ficoll et les autres types cellulaires. La culture des cellules mononuclées pour les leucémies aiguës se fait à différents temps : 24 heures, 48 heures et 72 heures. Nous utilisons comme milieu soit le MarrowMax (Gibco ; cat. n° 12260-014) ou le RPMI 1640 (Invitrogen ; cat. n° 11875-093).

Le MarrowMax est un milieu complet spécifique pour la culture des cellules hématopoïétiques. Il est composé de sérum de veau foetal, de L-glutamine, d'antibiotiques ainsi que de facteurs de croissance pour les cellules hématopoïétiques. Le RPMI 1640 est un milieu de base auquel nous ajoutons du sérum de veau foetal, de la L-glutamine et de la pénicilline (100 UI/ml). Pour favoriser la croissance des cellules myéloïdes, des facteurs de croissance peuvent également être utilisés, dont le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), le SCF (Stem Cell Factor) et le ligand-FLT3. Les cellules sont cultivées à 37°C, et à une teneur en CO₂ de 5%. Un agent intercalant de l'ADN

L'actinomycine D, peut être ajouté 30 minutes avant la fin de la culture. Cet agent inhibe la condensation de l'ADN, améliorant ainsi le niveau de résolution du marquage chromosomique. Enfin, la colcémide (KaryoMAX Colcemid™Solution, Life technologies) un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules du fuseau mitotique, est ajouté à la fin de la culture pour une durée de 15 minutes, bloquant les cellules en métaphase.

Toutes les lignées cellulaires leucémiques ont été cultivées à 37°C dans le RPMI 1640 auquel nous ajoutons du sérum de veau foetal, de la L-glutamine et de la pénicilline (100 UI/ml).

Les cellules sont centrifugées pendant 8 minutes à 1000 rpm et le culot est suspendu dans une solution hypotonique de chlorure de potassium (KCl 0.56%) à 37°C pendant 15 minutes. On centrifuge pendant 8 minutes à 1000 rpm et les cellules sont resuspendues dans du Carnoy 3 :1 composé de 3 volumes de méthanol et 1 volume d'acide acétique glacial. Deux étapes successives de fixation au Carnoy et de centrifugation sont réalisées. Suite à la fixation, les cellules sont gardées à -20°C jusqu'à utilisation

2.2. Marquage en bandes GTG:

Idéalement l'étalement des cellules sur lames se fait au Thermotron, sinon il faut prendre en considération l'humidité et la température pour un étalement optimal.

Les lames vieilles sont traitées à la trypsine, rincées à l'éthanol 70% et colorées au Giemsa 4% pendant 3 à 5 minutes avant d'être rincées dans deux bains d'eau et séchées à la température de la pièce. L'analyse des lames au microscope permet la capture d'au moins une vingtaine d'images de mitoses, réalisée à l'aide d'une caméra et d'un logiciel de capture et d'analyse d'images (CytoVision, Leica Microsystems).



Figure 12 : Thermotron (température et degré d'humidité constants) [41]

Le caryotype permet la détection d'anomalies chromosomiques suite à un classement des chromosomes par paires. La formule chromosomique est écrite selon les normes établies par le système international de nomenclature de cytogénétique ISCN 2009 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009).[42]

2.3. Caryotype spectral:

Le principe du SKY est le même que celui de l'hybridation in situ en fluorescence « FISH ». La technique de SKY « Spectral karyotyping » permet une analyse de l'ensemble des chromosomes suite à une seule hybridation in situ avec 24 sondes de peinture chromosomique. Ceci permet la visualisation de chaque paire chromosomique avec une couleur distincte.

Le marquage des sondes de peinture spécifique à chaque chromosome est effectué grâce à plusieurs combinaisons de cinq fluorochromes : le Spectrum vert, le Spectrum orange, le Texas red, la Cyanine 5 (Cy5) et la Cyanine 5.5 (Cy5.5). Ainsi, chaque chromosome a une

combinaison unique de fluorochromes. La visualisation de tous les chromosomes ayant chacun une couleur distincte, nécessite une analyse des signaux d'hybridation par un interféromètre et l'attribution d'une couleur de classification pour chaque chromosome par le logiciel d'analyse.

2.3.1. Préparation des lames :

Les lames sélectionnées sont d'abord déshydratées dans l'alcool en concentration croissante de 70%, 80% et 100% puis traitées à la RNase A/2x SSC (4 mg RNase/40 ml 2x SSC) à 37°C pendant 45 minutes et sont lavées dans le tampon 2x SSC à température pièce pendant 5 minutes à 3 reprises. Les lames sont ensuite trempées dans une solution de 0.6mg pepsine/50 ml de 0.01M HCL à 37°C pendant 2 minutes, puis lavées dans une solution 1x PBS à température pièce pendant 5 minutes à 2 reprises. Puis, les lames sont lavées dans une solution de 1x PBS/MgCl₂ (5 ml de 1M Mgcl₂ plus 95 ml 1x PBS) à température pièce pendant 5 minutes et traitées dans une solution de 1% formaldéhyde/1x PBS/MgCl₂ (2,7 ml de formaldéhyde 37% ad 100 ml avec du 1x PBS /Mgcl₂) à température pièce pendant 10 minutes.

Elles sont enfin lavées dans du 1x PBS à température pièce pendant 5 minutes puis déshydratées dans des solutions d'éthanol 70%, 80% et 100% pendant 2 minutes.

2.3.2. Dénaturation de l'ADN double brin de la sonde et de la cible sur lame :

La dénaturation des lames se fait à 70°C (+ ou- 20°C) dans la formamide 70%/2x SSC (35 ml formamide + 10 ml H₂O distillée + 5 ml 20X SSC) durant 1 minute, puis elles sont déshydratées dans trois bains successifs d'alcool froid à 70%, 80% et 100% pendant 2 minutes et séchées à l'air libre. La sonde du caryotype spectral est dénaturée séparément dans le bain-marie à 80°C pendant 7 minutes puis gardée à 37°C pendant 1 heure (jusqu'à utilisation).

2.3.3. Hybridation de la sonde à l'ADN cible et lavages :

On dépose la sonde sur la lame et on incube dans une chambre humide à 37°C pour 36 à 48 heures. Suite à l'incubation des lames, une série de lavages est effectuée dont trois lavages dans la formamide 50%/2X SSC à 45°C pendant 5 minutes et deux lavages dans du 1X SSC à 45°C pendant 5 minutes, puis les lames sont trempées dans une solution 4x

SSC/0.1% Tween 20 pour 2 minutes. Le colorant Cy5 (80 µl) est appliquée, la lame est recouverte d'une lamelle et incubée dans une chambre humide à 37°C pendant 45 minutes.

Ensuite, trois lavages sont effectués dans du 4XSSC/ 0,1% Tween 20 à 45°C pendant 3 minutes. Puis, 80 µl de colorant Cy5.5 est appliqué sur la lame qui est couverte d'une lamelle et incubée dans une chambre humide à 37°C pendant 45 minutes. Trois lavages successifs de 4xSSC/0.1% Tween 20 sont ensuite effectués pour 3 minutes et les lames sont rincées avec de l'eau distillée dans un bain avec une légère agitation constante, puis sécher à l'air libre. Le DAPI est appliqué sur la lame comme contre colorant, puis la lame est couverte avec une lamelle.

2.3.4. Détection des sondes et analyse des images :

L'analyse est effectuée avec un logiciel de capture Spectral Imaging 2.3 et le logiciel d'analyse SKYview 1.6.1 de Applied Spectral Imaging (San Jose, CA). La fluorescence générée par la combinaison de différents fluorochromes est analysée par le logiciel et une couleur spectrale est assignée à chaque combinaison grâce à un système à filtre triple (SKY CUBE™, Applied Spectral Imaging) permettant l'identification des chromosomes.

2.4. Hybridation in situ en fluorescence:

Le principe du FISH « fluorescence in situ hybridization » repose sur l'hybridation moléculaire d'une sonde d'ADN marquée avec un fluorochrome, permettant sa visualisation suite à son hybridation spécifique à une séquence cible complémentaire d'ADN, au niveau des noyaux interphasiques ou des chromosomes métaphasiques.

2.4.1. Dénaturation de la sonde et de l'ADN cible sur lame :

La dénaturation se fait grâce à la chaleur et la formamide, cette dernière déstabilise les liaisons hydrogènes liant les deux brins d'ADN permettant une dissociation des deux brins à des températures qui n'affectent pas la structure des chromosomes et des noyaux.

La dénaturation des lames se fait dans la formamide 70%/2X SSC à 73°C pendant 5 minutes, suivie par une déshydratation à l'alcool 70%, 85% et 100% pendant une minute puis un séchage à l'air libre. La dénaturation de la sonde à l'abri de la lumière, se fait à la même température, 73°C, pendant 2 à 5 minutes dépendamment de la sonde utilisée.

2.4.2. Hybridation et lavages

L'hybridation entre la sonde et l'ADN cible se fait durant une incubation de 16 heures à 37°C dans une chambre humide dans la noirceur. Le lendemain, un premier lavage est fait avec la solution 0,4X SSC/0,3% NP-40 à 73°C. Le temps du lavage (quelques secondes à 2 minutes) dépend du type de sonde utilisée.

2.4.3. Détection des sondes et analyse des images

Suite à la contre coloration des lames au DAPI, la visualisation et l'analyse des lames de FISH sont effectuées en utilisant une combinaison de filtres qui permettent la visualisation des différents fluorochromes utilisés dans le marquage des sondes. Les images sont capturées à l'aide du logiciel CytoVision® version 3.6 (Leica Microsystems).

3. Etude 3 : Recherche des différents transcrits de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR quantitative multiplex : intérêt diagnostique et suivi chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique.

Cette étude a démontré l'intérêt de l'application de la RT-PCR Multiplexe et de RT-PCR quantitative pour le diagnostic moléculaire, le suivi moléculaire et pronostique chez les patients atteints de la LMC. La détermination de l'isotype moléculaire et leur quantification, par l'utilisation des amorces spécifiques, est nécessaires au diagnostic et suivi moléculaire de LMC.

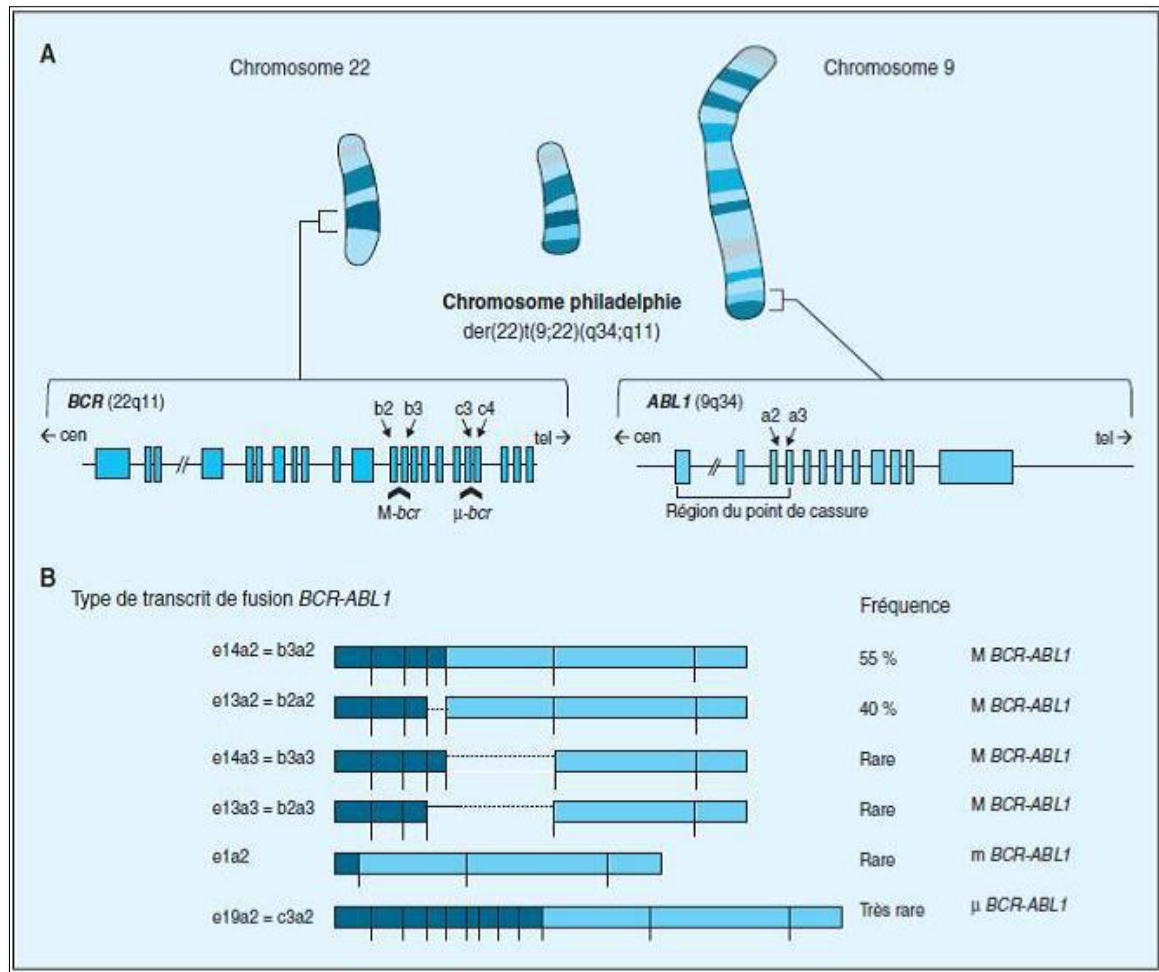


Figure 13 : Représentation schématique de la translocation t (9 ; 22) et les différents types de transcrits BCR-ABL1 retrouvés dans la LMC. Les transcrits b2a2 (e13a2) ou b3a2 (e14a2) (coupure dans le M-bcr) sont retrouvés dans plus de 95% des cas. Plus rarement on retrouve les transcrits e1a2, e8a2, e6a2, e19a2, e1a3, b2a2 et b3a3[40]

La quantification des différents variant du transcrit BCR-ABL1 nécessite deux étapes principales :

3.1. Préparation de l'ARN

Cette étape est très importante et sensible, elle consiste à faire l'extraction d'ARN total et de s'assurer de sa pureté.

A- Extraction de l'ARN total

A partir du sang total (2.5 ml), tout d'abord on lyse les globules rouges, en laissant les leucocytes intacts. Ensuite, sur l'automate Maxwell 16 « Promega » qui met en œuvre une cartouche de 8 puits dans lesquels sont successivement réalisées les étapes suivantes :

- on capte d'ARN contenu dans l'échantillon, par des billes magnétiques recouvertes de silice présentes dans la cartouche.
- on traite à la DNase et à la protéinase K pour éliminer toute trace de protéines et d'ADN.
- on lave de l'ARN par différents réactifs contenus dans différents puits de la cartouche
- en fin, l'élution de l'ARN.

B- Dosage des ARN

Après l'extraction de l'ARN, on doit s'assurer de leur pureté par une quantification en spectrophotométrie UV après une double lecture de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm. Le rapport 260/280 doit être compris entre 1.8 à 2.

3.2. Technique de RT-PCR Multiplexe pour le diagnostic des différents transcrits BCR/ABL

A- Rétro-transcription

Il faut d'abord faire la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN par une transcription inverse qui est réalisée par un protocole proposé par le groupe EAC selon les étapes suivantes :

- 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.

B- Amplification des produits par la RT

On utilise le Kit seplex™ Leukemia BCR/ABL (Seegene, Seoul, Korea), qui présente un double avantage :

- on utilisant plusieurs amorces ce Kit permet 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 de poids moléculaire.

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

Tableau 1 : Programme de l'amplification par PCR

Dénaturation		T° : 94°C, 14 min
37 CYCLES :	Dénaturation	T° : 94°C, 30 secondes
	Hybridation	T° : 60°C, 1 min 30 secondes
	Elongation	T° : 72°C, 1 min 30 secondes
	Extension finale	T° : 72°C, 10 min
	Maintien	T° : 8 °c

C- Interprétation des résultats

- 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).

- 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 pb). (**Figure 14**)

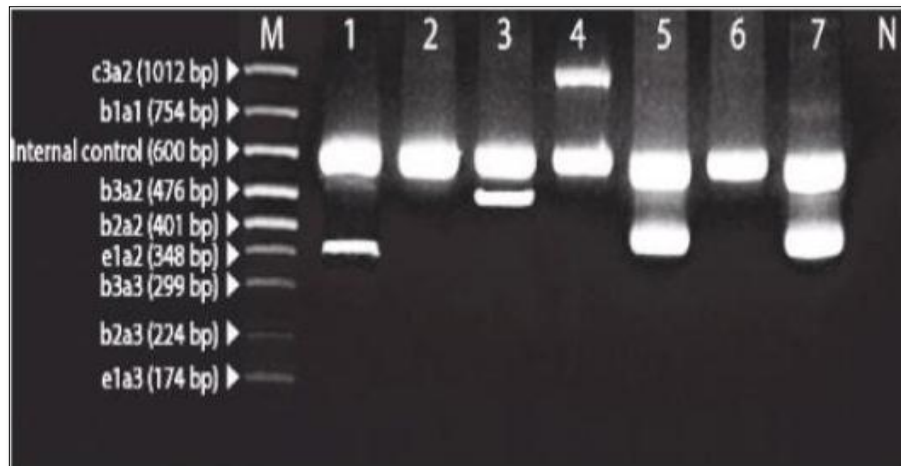


Figure 14 : Gel agarose Seeplex. N : contrôle négatif. M : marqueur de taille. 1 à 7. Echantillons : 1(e1a2), 2 et 6 négatifs. 3(b3a2), 4(c3a2 ou e19a2), 5 et 7(b2a2) [40]

3.3. Quantification des transcrits BCR-ABL1

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons :

3.3.1. Les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I)

SYBR Green I Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent rencontrer deux exigences : augmenter en fluorescence lorsque lié à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR. Le SYBR Green I, dont le mécanisme de liaison n'est pas bien défini, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile à utiliser.[43]

3.3.2. Les sondes fluorescentes

Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales :

- **Hydrolyse de sondes (Taqman assay),**
- **Hybridation de 2 sondes (Hyb Probes),**
- **Balises moléculaires (Molecular Beacons).**

- Amorces scorpion (Scorpion primers).

Ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité [43].

A- La sonde Taqman

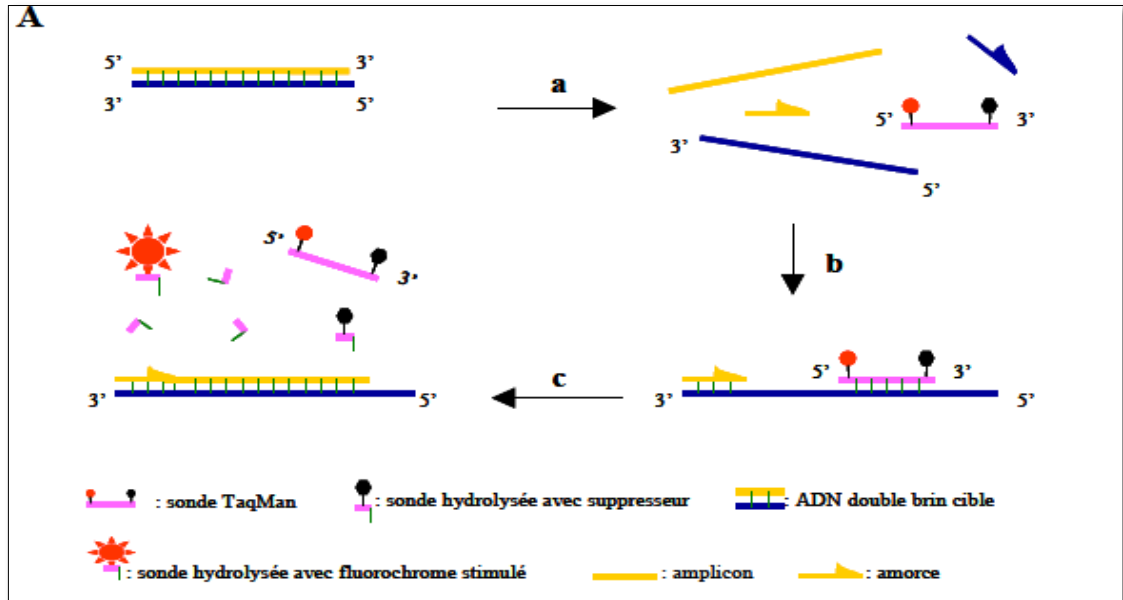


Figure 15 : A : *Hydrolyse de sondes (Hydrolysis : Taqman assay)* (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du supprimeur permettant ainsi l'émission de la fluorescence [43]

B- Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

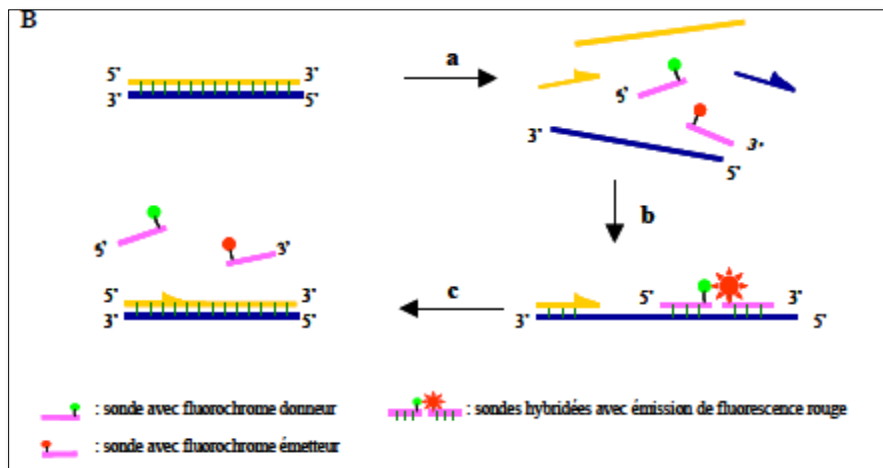


Figure 15 B : Hybridation de 2 sondes (**Hybridization probes**) (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution [43]

C- Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux : **Molecular Beacons**):

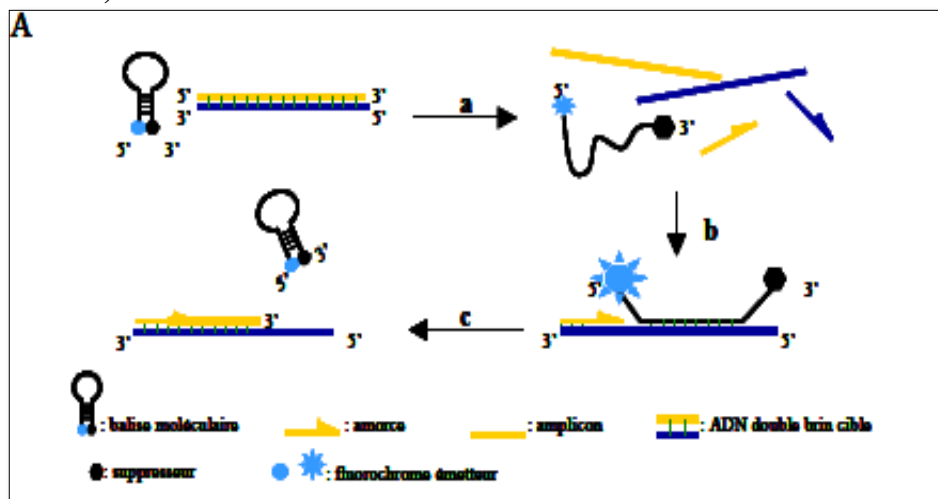


Figure 16 A : Balises moléculaires (**Molecular Beacons**). (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. b) Lorsque la sonde s'hybride à sa séquence cible, le fluorochrome émetteur est suffisamment éloigné de son suppresseur pour permettre l'émission de fluorescence (c) À l'étape de polymérisation, la balise moléculaire retourne en solution sous forme d'épingle à cheveux [43]

D- Amorces scorpion (Scorpion primer: self-fluorescing amplicon) :

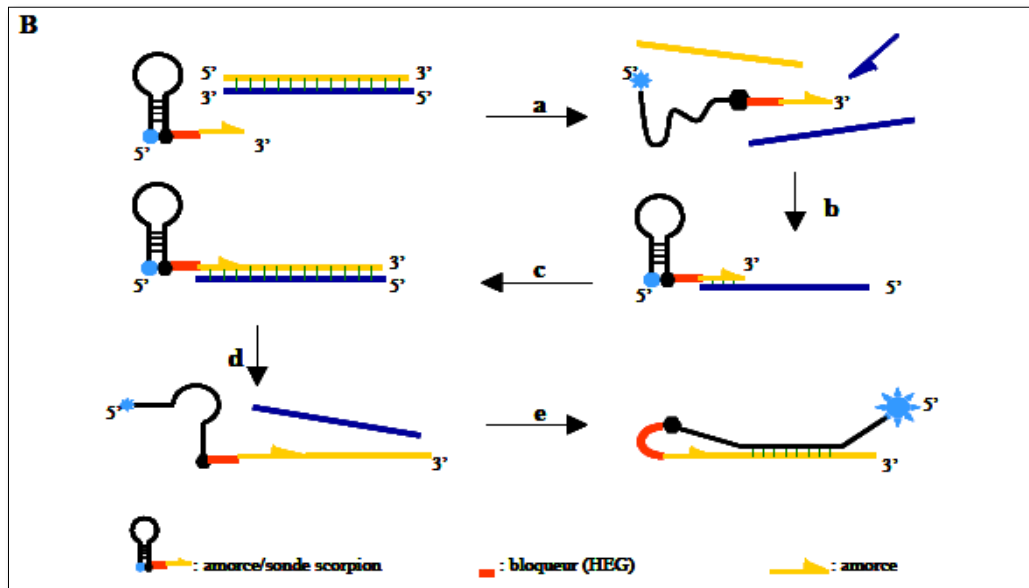


Figure16 B : Amorces scorpion (*Scorpion primer*). (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) L'amorce scorpion se fixe à sa séquence complémentaire cible. (c) Polymérisation du brin complémentaire. (d) Dénaturation des brins d'ADN. (e) Hybridation de la séquence complémentaire de la partie balise moléculaire à sa séquence cible permettant l'émission de fluorescence [43]

Dans cette étude l'évaluation moléculaire des enceins patients est faite par la quantification des transcrits BCR-ABL1. Cette quantification a permis de les stratifier en fonction des définitions de réponse au traitement du ELN. Pour le transcrit majeur, ils ont utilisé 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, ils ont utilisé le même mode opératoire mais avec des amorces spécifiques recommandées par EAC. [44]

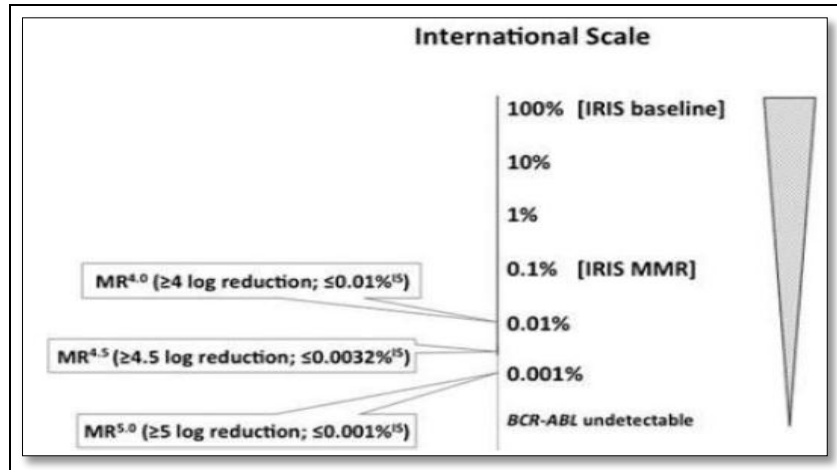


Figure 17 : Définition de la réponse moléculaire selon l'échelle internationale [44]

**RESULTATS ET
DISCUSSIONS**

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La cytogénétique, la cytogénétique moléculaire et la génétique moléculaire représentent de moyens de diagnostic, pronostique et suivi très important pour les patients de LMC dans les différentes phases d'évolution de LMC. Malheureusement l'utilisation de ses techniques en Algérie au cours du diagnostic et du suivi de LMC reste très limités, à cause, de problèmes techniques, surtout en cytogénétique, et de problèmes financiers, on trouve que ces analyses de diagnostic génétique sont coûteuses que se soit pour le patient et également pour le laboratoire qui se retrouve obligé à faire des investissements important dans le domaine de diagnostic génétique (appareillages et kits de réactifs) mais qu'il n'est pas rentable, à cause de la réticence des patients à faire ces tests génétiques.

La Leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne chronique du groupe des syndromes myéloprolifératifs. C'est une maladie de la cellule souche hématopoïétique caractérisé par une prolifération médullaire de cellules granuleuses matures et immatures avec un passage en blocs sanguin.

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.[45]

Des aberrations chromosomiques chez les patients de LMC pouvant se développées dans la présence du chromosome Philadelphie Ph(+), c'est le cas de **ACA** c.-à-d. Aberrations Chromosomiques Additionnelles. De plus, il existe également des anomalies chromosomiques chez les patients de LMC, mais, on absence du chromosome Philadelphie Ph(-), c'est le cas de **CCA** c.-à-d. Aberration Cytogénétique Clonale.

Il a été établi que ces aberrations CCAs et ACAs, se développent après le traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI), et elles sont très fréquentes chez les patients atteints de LMC en phase plus avancée (accélération et/ou blastique). [46]

Les CCAs et ACAs sont classés selon le pronostique de LMC en **MRAs**, anomalies « major route » et **MiRAs** : anomalies «mineur route ». Les MRAs regroupe les anomalies

suivantes : trisomie 8 (+8), isochromosome 17q [i(17q)], Ph dupliqué (+Ph), trisomie 19 (+19), monosomie 7 (-7) et les réarrangements 3q26 (par exemple : inv(3) et t(3;3)(q21q26). Alors que, les **MiRAs** regroupent le reste des anomalies chromosomiques. De plus, les **MARs** donne un mauvais pronostic par rapport au **MiRAs** . [47]

Basant sur la survie des patients, Hehlmann et al. ont classé les ACAs en anomalies à haute risque (+8, +Ph, i (17q), +17, +19, +21, 3q26.2, 11q23, -7/7q, et caryotype complexe.) et anomalies à faible risque (regroupe le reste d'anomalies).

La cytogénétique permet d'étudier tout le génome et de détecter les anomalies de nombre et de structure. Cependant, elle possède des inconvénients et des limites, leur résolution maximale de 5 millions de paires de bases (5Mpb), elle rencontre des difficultés pour caractériser certaines anomalies dites cryptiques, l'interprétation nécessite d'avoir des mitoses en nombre suffisant et de bonne qualité, de plus, elle exige absolument des réactifs de bonne qualité, en fin l'humidité et la température ont été des facteurs essentiels pour un bon étalement et ont dépendu d'un climat favorable, rendant l'étalement parfois très difficile à réaliser d'où la nécessité de l'utilisation de thermotron lors de l'étalement.

Par contre, la FISH est une technique facile et rapide, elle permet de détecter plusieurs anomalies cryptiques. De plus les sondes peintures marquent la totalité du chromosome, pour le Caryotype spectral, sont très utiles.

Cependant il existe des inconvénients, dans la cytogénétique moléculaire, où on ne peut pas détecter que l'anomalie recherchée contrairement au caryotype qui permet de détecter plusieurs anomalies en même temps, de plus, certains réactifs sont potentiellement toxiques ou cancérogène (DAPI) et en fin, ces techniques sont coûteuses à cause de l'absence du savoir.

Apartir de la 1^{er} étude, on a trouvé que le caryotype et la FISH ont détecté la translocation (9 ; 22) et d'autres anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA). On trouve :

- Ph1 positif + del der 9 anomalies à faible risque selon Hehlmann et al,
- Ph1 positif + iso (17q) anomalies à haute risque selon Hehlmann et al,
- Ph1 positif et dupliqué anomalies à haute risque selon Hehlmann et al,
- Ph1 positif + del der 22 anomalies à faible risque selon Hehlmann et al.

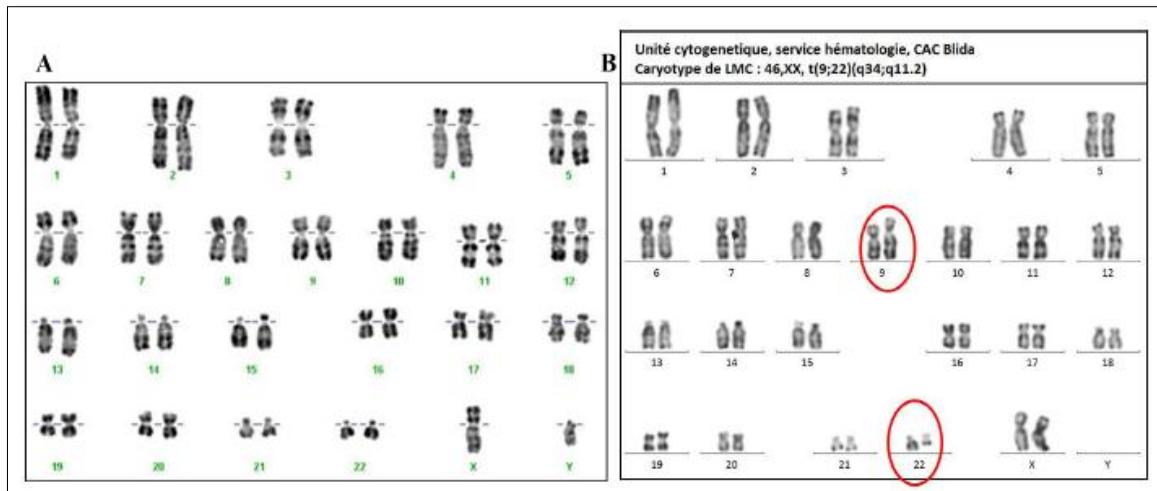


Figure 18 : A) Caryotype humain normal. B) Caryotype typique d'une LMC montrant une translocation $t(9;22)(q34;q11.2)$ [48]

Dans autre étude publié par l'unité de cytogénétique, service Hématologie, CAC Blida .ils ont pu identifier d'autre anomalie chromosomique chez des patient LMC :[49]

- Ph1positif et dupliqué, del (13q14), trisomie 12, del 17p13

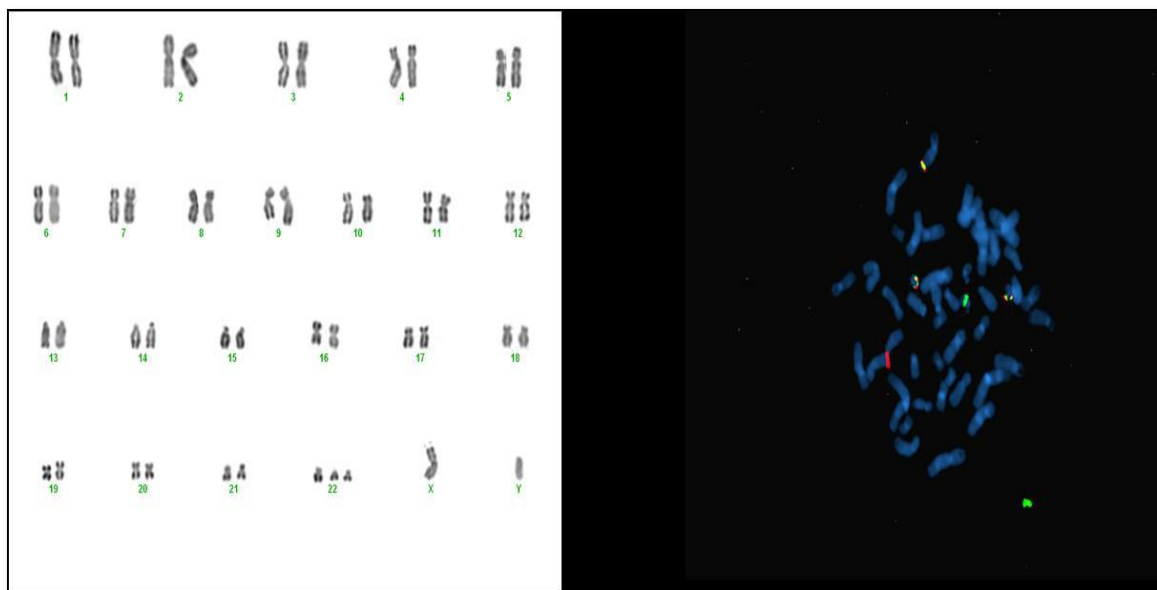


Figure 19 : Duplication du Ph1 (caryotype) et du bcr-abl (FISH) del (13q14)[38]

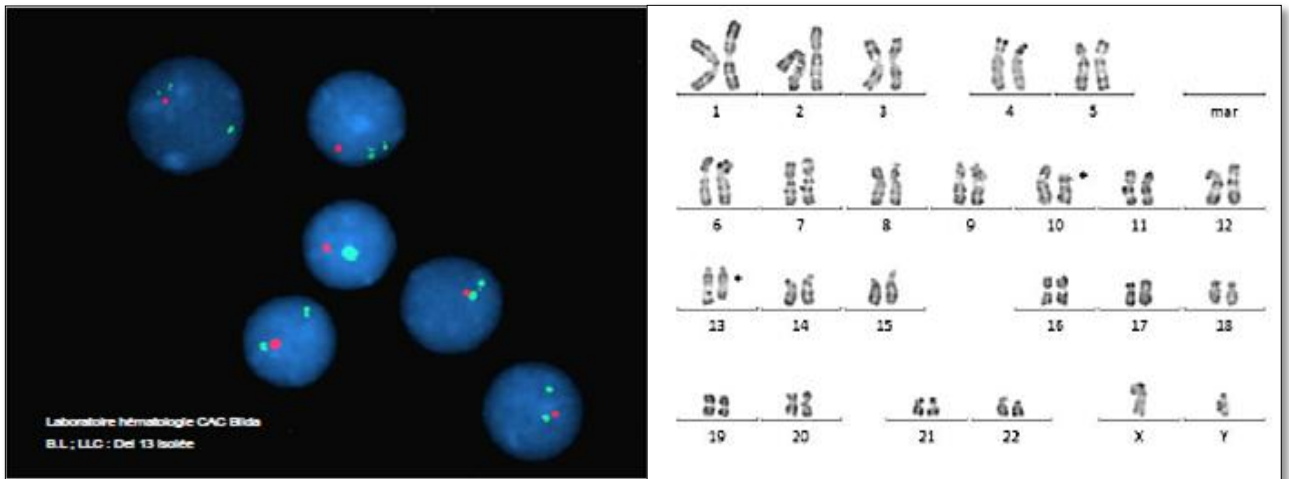


Figure 20 : del (13q14)[48]

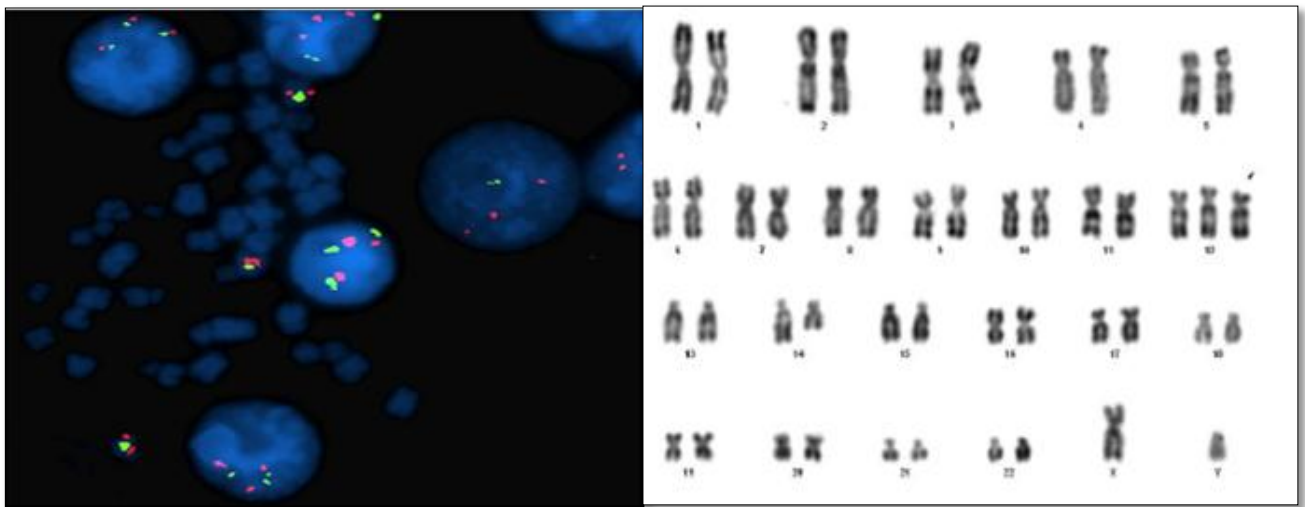


Figure 21 : trisomie 12 [48]

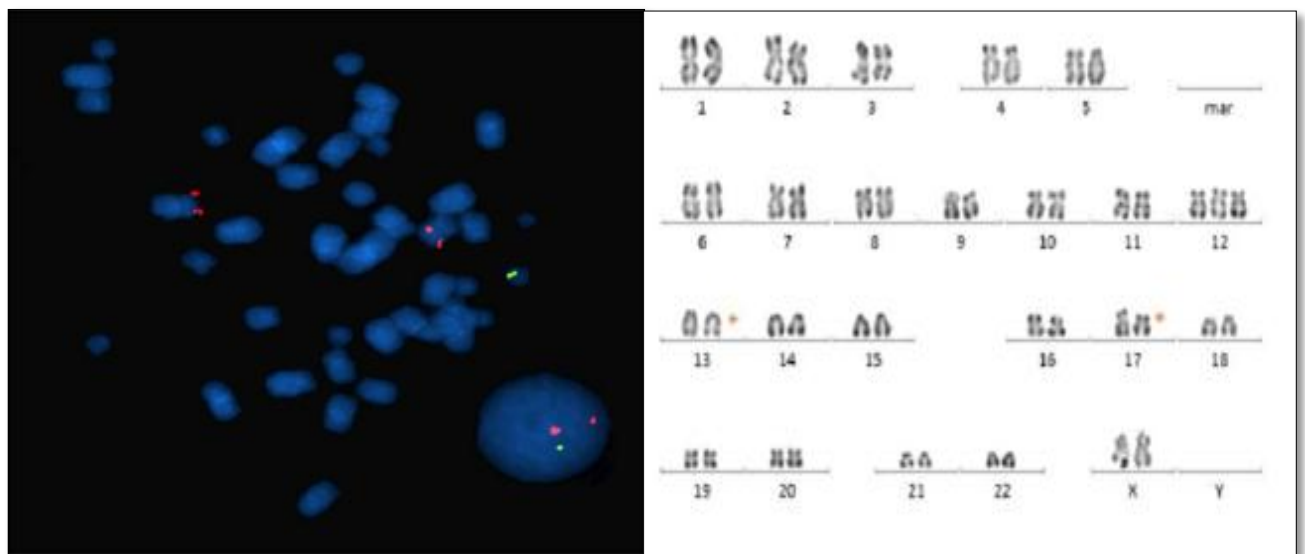


Figure 22 : del(17p13)[48]

Alors que pour la 2^{ème} étude, ils ont identifié, quatre nouvelles translocations chromosomiques additionnelles (ACA) dans des caryotypes complexes à mauvais pronostic selon la classification de Hehlmann et al, on trouve les anomalies : t(1;21)(p36;q22), t(7;17)(p15;q22), t(8;17)(q11;q22) et t(2;12)(q31;p13) dans les cellules leucémiques de patients en phase blastique de LMC résistants au traitement : t(1;21)(p36;q22)

Une patiente de 60 ans LMC avec la formule chromosomique est la suivante : 46, XX, t(9;22)(q34;q11.2),?del(21)(q22).

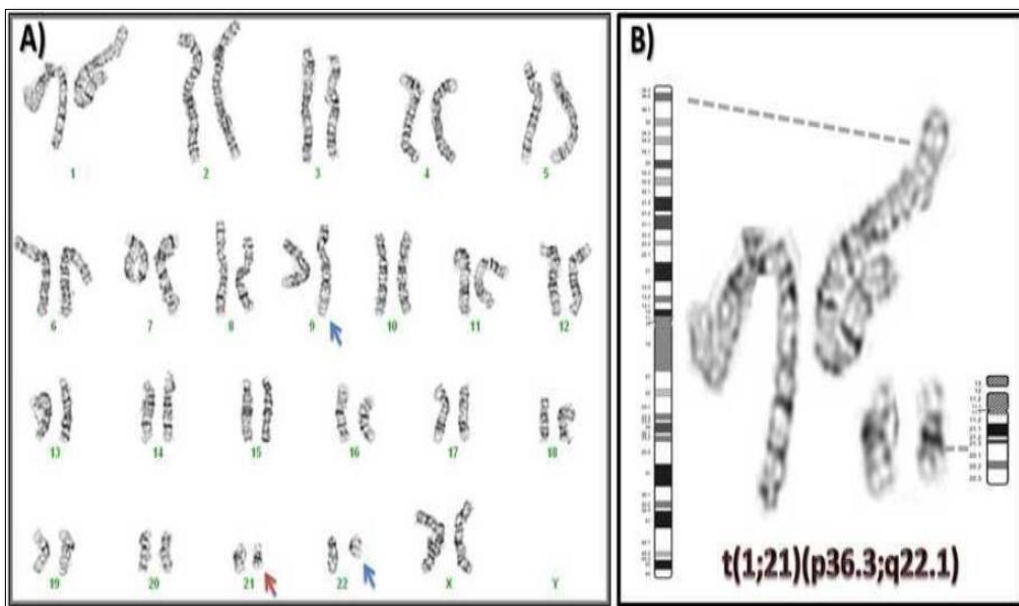


Figure 23 : Caryotype bande G montre une translocation chromosomique t(9;22) (q34.1;q11.2) (flèches bleues) ainsi qu'une asymétrie au niveau des bras longs du chromosome 21 (flèche rouge) suggérant une délétion ou une translocation chromosomique cryptique [39]



Figure 24 : Le caryotype spectral (SKY) [39]

révèle la présence du dérivé 9 de la translocation $t(9; 22)$ (flèche bleue) ainsi que la présence d'un dérivé 1 d'une translocation chromosomique cryptique $t(1; 21)$, avec la peinture spécifique du chromosome 21 présente sur le chromosome dérivé 1, der(1) (flèche rouge).



Figure 25 : Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur métaphases.

La sonde du locus *RUNX1* (couleur verte) hybride au niveau du chromosome 21 normal et des chromosomes réarrangés dérivés, der(1) et der(21) [39]

- Un patient âgé de 37 ans t(7;17)(p15;q22)

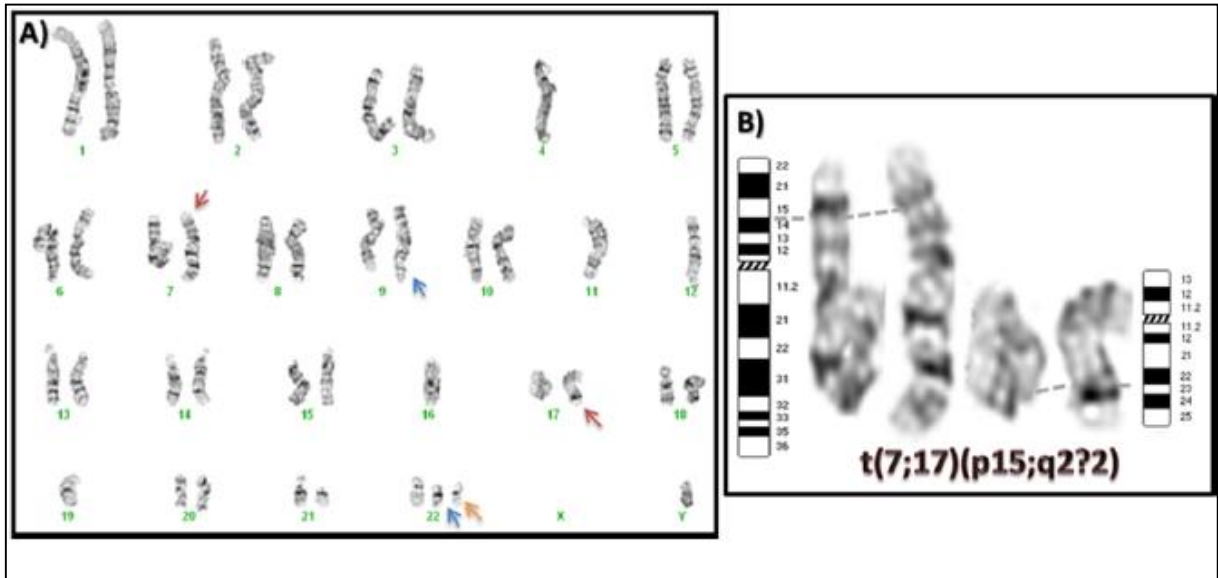


Figure 26 : Translocation t(9;22)(q34.1;q11.2).

(flèches bleues), un deuxième Ph (flèche orange), ainsi qu'une translocation chromosomique entre les bras courts du chromosome 7 et les bras longs du chromosome 17 (flèches rouges), t(7;17)(p15,q22) [39]

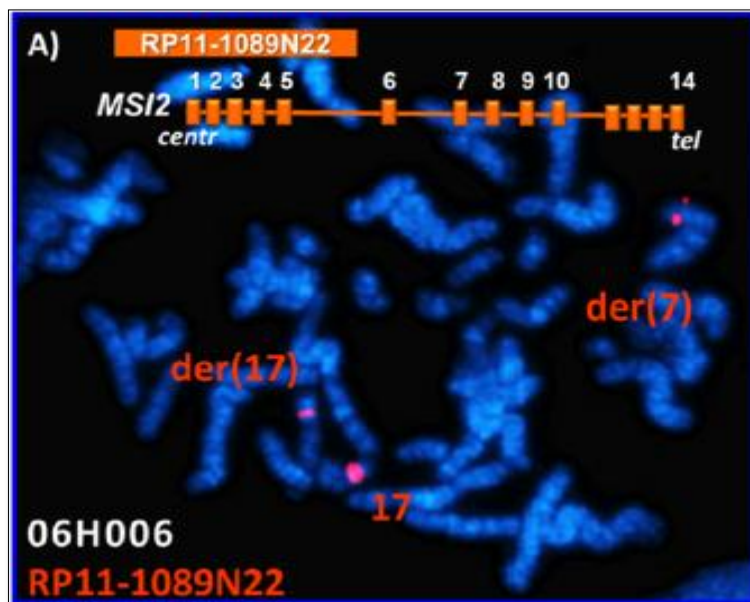


Figure 27 : Identification du réarrangement du gène MSI2 dans la translocation t(7;17)(p15;q22) par hybridation in situ en fluorescence [39]

-Un patient de 40 ans t(8;17)(q11;q22)

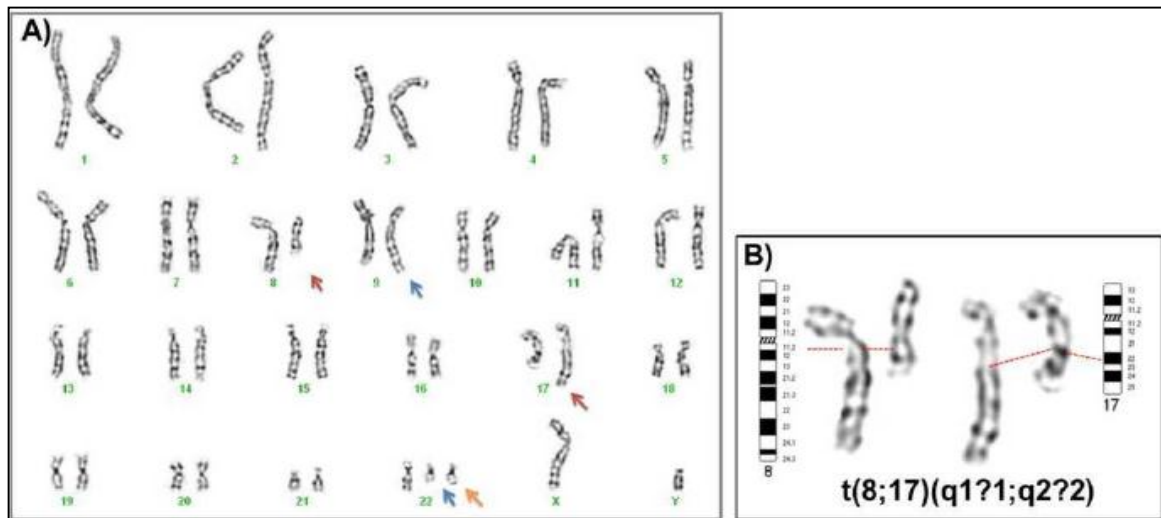


Figure 28: Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t (8 ,17)t(9;22) et t(8;17) chez le patient 02H037 : une translocation t(9;22)(q34.1;q11.2) (flèches bleues), un deuxième Ph(flèche orange), ainsi qu’une translocation chromosomique entre les bras longs deschromosomes 8 et 17 (flèches rouges)[39]

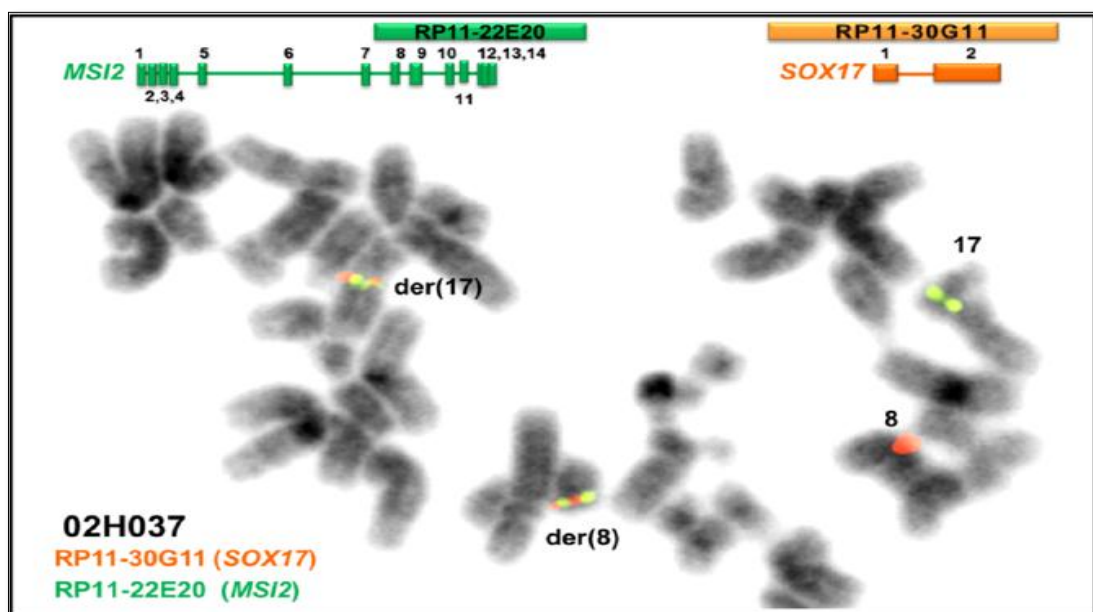


Figure 29 : Identification de la fusion *MSI2-SOX17* dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence [39]

-Il s'agit d'un patient de 49 ans t(2;12)(q31;p13)

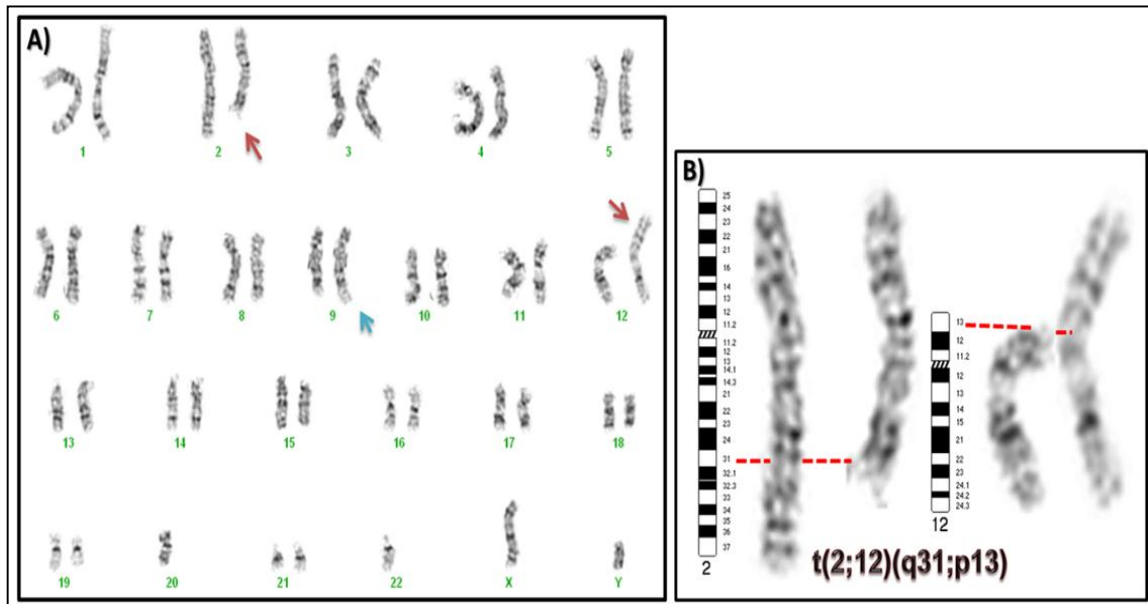


Figure 30 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(2;12) chez le patient 02H052[39]

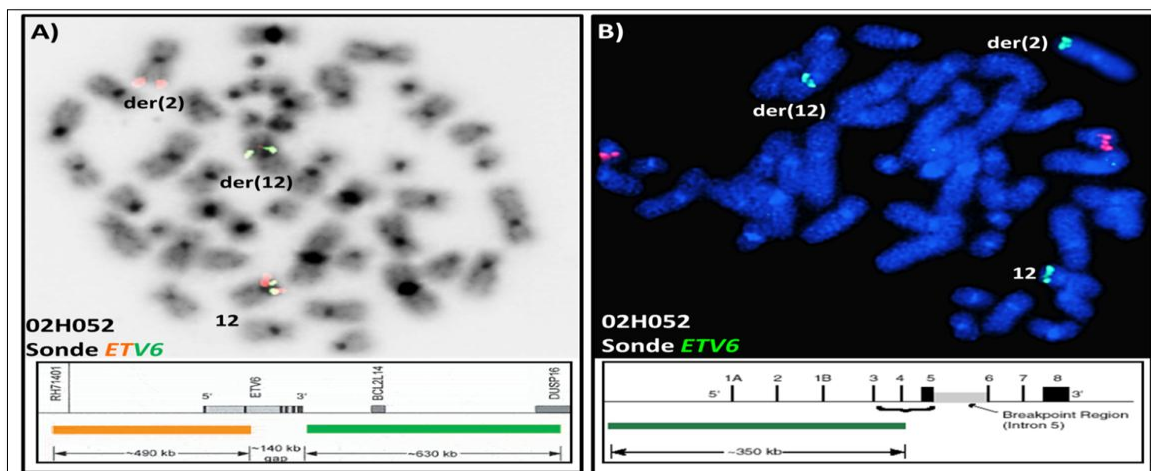


Figure 31 : Identification d'un réarrangement du gène *ETV6* par hybridation in situ fluorescence dans la t(2;12)(q31;p13) chez le patient 02H052 [39]

Dans l'étude 03

La RT-PCR multiplex a montré son intérêt dans le typage moléculaire et dans le suivi des patients LMC. Au total sur les 64 patients où le transcrit a été identifié, 62 (96,87%) avaient le transcrit majeur, avec 60,94% de type M b3a2 et 35,93% de type Mb2a2, et deux patient (3,12%) avaient un transcrit rare de type e19a2. Par contre, ils n'ont pas trouvé une co-expression b3a2/b2a2. Cependant, dans une autre étude réalisé plustard, ils ont détecté la co-expression de b3a2 / b2a2 avec un pourcentage de 1,8%. [50]

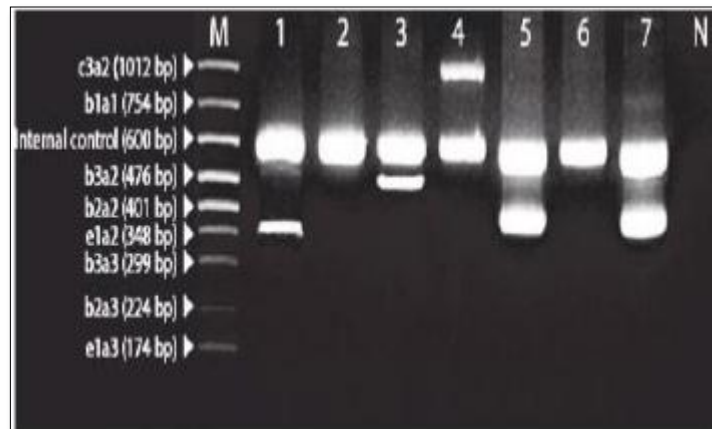


Figure 32 : Gel agarose Seeplex. N : contrôle négative, M: marqueur de taille.
 1 à 7 Echantillon. 1 : (e1a2), 2 et 6 : négatif, 3 : (b3a2), 4 : (c3a2 ou e19a2),
 5 et 7 : (b2a2) [40]

Les résultats de la RT-PCR quantitative classe les patients LMC en 3 groupes :

- 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.

Cependant, Lors du diagnostique de LMC, il est très important de faire tout d'abord une recherche du type du transcrit par une RT-PCR multiplex suivie par une RT-PCR quantitative pour calculer le ratio BCR-ABL1/ABL1 qui définir la réponse moléculaire du patient.

Tableau 2 : Détection et quantification du transcrit BCR-ABL1 chez les patients

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

Un patient (parmi 18 anciens patients) 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 grâce à l'utilisation d'amorce spécifique. 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 méthodes (RT-PCR qualitative et quantitative) chez huit (08) anciens patients dont les transcrits n'ont pas été identifiés. 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.

CONCLUSION

CONCLUSION

La Leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne chronique du groupe des syndromes myéloprolifératifs. C'est une maladie de la cellule souche hématopoïétique caractérisé par une prolifération médullaire de cellules granuleuses matures et immatures avec un passage en blocs sanguin

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

La cytogénétique, la cytogénétique moléculaire et la génétique moléculaire représentent de moyens de diagnostique, pronostique et suivi très important pour les patients de LMC dans les différentes phases d'évolution de LMC.

La cytogénétique permis de diagnostiqué la LMC en détectant les anomalies de nombre et de structure. Cependant, elle possède des inconvénients et des limites. Par contre la FISH est une technique facile et rapide, elle permet de détecter plusieurs anomalies cryptiques grâce à l'utilisation de sondes spécifique.

Lors du diagnostique de LMC, il est très important de faire tout d'abord une recherche du type du transcrit par une RT-PCR multiplex suivie par une RT-PCR quantitative pour calculer le ratio BCR-ABL1/ABL1 qui définir la réponse moléculaire du patient

L'étude présenter a confirmé les données de la littérature en montrant une incidence plus élevée du transcrit majeur.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

1. Société canadienne du cancer. Qu'est-ce que la leucémie ? [enligne].2022 [Consulté :12/02/2024]. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/leukemia/what-is-leukemia>.
2. Gokulkannan K, Mohanaprakash T.A, DafniRose J,Sriman B . Multiscale adaptive and attention-dilated convolutional neural network for efficient leukemia detection model with multiscale trans-res-UNET3+ -based segmentation network. Biomed Signal Process Control .2024;90. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2023.105847>.
3. Société Française d'Hématologie. la leucémie myéloïde chronique [enligne].2009[Consulté15/02/2024].https://sfh.hematologie.net/sites/sfh.hematologie.net/files/medias/documents/leucemie_myeloide_chronique2.pdf.
4. Gonon-Demoulian R, Goldman JM, Nicolini FE. Historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer. Bull Cancer. 2014;101(1):56-67. <https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1876> .
5. Leguay T, Mahon FX. Leucémie myéloïde chronique. EMC – Hématologie.2005;2(3):187-205.<https://doi.org/10.1016/j.emch.2005.07.001> .
6. Segbena AY, Kueviakoe IMD, Agbetiafa K, Padaro E, Layibo Y, Dorkenoo A, et al . Leucémie Myéloïde chronique et imatinib, expérience du CHU Campus de Lome au Togo. Med Sante Trop. 2012;22:307-311.<https://doi.org/10.1684/mst.2012.0083>.
7. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. Lancet. 2007;370:342-350.[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61165-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61165-9) .
8. djouadi K-Lahlou. Étude 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). Revue Algérienne d'Hématologie.2010;n°3.
9. Djouadi K, Abdennebi N , Harieche F, Nacer Ahmed R, Hamladji RM, Bouchakour A, et al . Approche épidémiologique de la Leucémie Myéloïde Chronique étude Algéro-Tunisienne à propos de 1349 cas sur 05 ans (2010 à 2014). Revue Algérienne d'Hématologie. 2017;n°13-14.
10. Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology and Etiology of Chronic Myeloid Leukemia. In:Wiernik P, Dutcher J, Gertz M, editors. NeoplasticDiseases of the Blood,2018.https://doi.org/10.1007/978-3-319-64263-5_2.

11. Fabien M. Nouvelles stratégies de sensibilisation des Cellules Souches Leucémiques en ciblant l'axe BCR-ABL/BMI1.[Thèse en ligne]:Université Côte d'Azur ;2020[consulté : 19/02/2024].1-219.Disponible sur : <https://theses.hal.science/2020COAZ6048/document>.
12. Historique de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Leucemie Myeloide Chronique France.[enligne]. (s.d) [consulté:25/02/2024].Disponible sur : <https://www.lmc-france.fr/la-lmc/historique-de-la-lmc/>.
13. Ferreira LA M. Chronic myeloid leukemia.In: Zhan He Wu, editor. Rare Diseases[enligne]. Rijeka : Intech Open ; 2020 [consulté : 25/02/2024].Disponible sur : <https://www.intechopen.com/chapters/70989>.
14. Sorel N, Cayssials É, Brizard F, Chomel JC. Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management. *Ann Biol Clin*. 2017;75(2):129-145. <https://doi.org/10.1684/abc.2017.1233>.
15. Chomel J-C, Sorel N, Mayeur-Rousse C, Turhan AG. Les syndromes myéloprolifératifs. *Immunol anal biol spec*. 2009;24:69-85.<https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.10.007>.
16. Foulon S. Prévalence, qualité de vie et cout de la leucémie myloide chronique en France [thèse en ligne].Villejuif : université Pris- saclay ;2019[consulté : 29/02/2024].1-231.Disponible sur:<https://theses.hal.science/tel-03275314v1/document>.
17. Herlet S. Les inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myeloïde chronique chez l'adulte : Du Glivec® aux traitements de deuxième génération. Conséquence de la sortie de la réserve hospitalière pour le pharmacien d'officine.[thèse en ligne]. France: Université Henri Poincaré, NANCY 1; 2010[consulté : 03/03/2024].1-159.Disponible sur <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738807>.
18. Ugo V, James C, Vainchenker W. Une mutation unique de la protéine kinase JAK2 dans la polyglobulie de Vaquez et les syndromes myéloprolifératifs non-LMC. *Med Sci*. 2005;21: 669-670. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005216-7669>
19. Chryste B-N, Carole B, Alain B, Nicole D, Virginie E, Claude L,et al. Recommandations pour la prise en charge cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) établies par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique

- (GFCH). *Patho Biol.* 2004;52(5):238-240.
<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.04.004>.
20. Haider M Z, Anwer F. *Genetics, Philadelphia Chromosome.StatPearls.2023*.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32809524/>.
21. Costello RT , Bouabdallah R, Sainty D, Gastaut JA, Gabert J. La leucémie myéloïde chronique, aspects biologiques. *Rev Med Interne.*1996;17(3): 213-223.
[https://doi.org/10.1016/0248-8663\(96\)81248-3](https://doi.org/10.1016/0248-8663(96)81248-3).
22. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R., Kantarjian HM. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N Eng J Med* .1999;341(3):164-172.
<https://doi.org/10.1056/nejm199907153410306>.
23. Rea D, Cayuela J-M. la leucémie myéloïde chronique. *Encycl Med Chir Hématologie.*2014;9(4):1-12.[https://dx.doi.org/10.1016/S1155-1984\(14\)62425-0](https://dx.doi.org/10.1016/S1155-1984(14)62425-0).
24. Mahon FX. Leucémie myéloïde chronique et inhibiteurs de tyrosine kinase. *Rev Med Interne.*2001;22(9): 894-899. [https://doi.org/10.1016/s0248-8663\(01\)00441-6](https://doi.org/10.1016/s0248-8663(01)00441-6).
25. Couic-Marinier F, Pillon F. Traitement d'une leucémie myéloïde chronique. *Actualités Pharmaceutiques.*2015; n°547. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2015.03.026>.
26. Roche-Lestienne C, Boudry-Labis E, Mozziconacci JM . Cytogenetics in the management of “chronic myeloid leukemia” : an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin.*2016;74(5):511-515.
<https://doi.org/10.1684/abc.2016.1151>.
27. Treuil P. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. *Actualités Pharmaceutiques.*2008; n°547. [https://doi.org/10.1016/s0515-3700\(08\)70237-4](https://doi.org/10.1016/s0515-3700(08)70237-4).
28. Tchirkov A, Goumy C, Bonnet-Dupeyron M, Travade P, Jaffray JY, Vago P, Perissel B. Leucémie myéloïde chronique : maladie résiduelle au cours du traitement par Imatinib. *Morphologie.*2004;106-107. [https://doi.org/10.1016/s1286-0115\(04\)98125-8](https://doi.org/10.1016/s1286-0115(04)98125-8).
29. Eclache V , Lejeune F. Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Rev Fr Lab* .2002;339: 27-31.
[https://doi.org/10.1016/s0338-9898\(02\)80137-8](https://doi.org/10.1016/s0338-9898(02)80137-8).

30. Allouche OM, Ferkous SN, Geurbaa R. Application de la cytogénétique dans la Leucémie Myéloïde Chronique à la phase blastique. [mémoire de master]. Constantine: université frères mentouri ;2023 [Consulté:16/04/2024].1-97.Disponible sur :<http://fac.umc.edu.dz/>.
31. Chomel J. Biologie moléculaire de la leucémie myéloïde chronique : dernières avancées. Rev Fr Lab.2017; n° 492 . [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(17\)30162-4](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(17)30162-4).
32. Gratwohl H, Favre G. La leucémie myéloïde chronique. Rev med suisse.2005 ; 1(24) :1631-1635.Disponible sur : https://www.revmed.ch/view/605570/4746207/RMS_24_1631.pdf [consulté : 18/04/2024].
33. Losson H, Schneckenger M, Dicato M, Diederich M. HDAC6-An emerging target against chronic myeloid leukemia ? Cancers.2020;12(318):1-37.<https://doi.org/10.3390/cancers12020318>.
34. Cayuela J-M, Huguet F. Chronic myeloid leukemia (CML) diagnosis in 2012. Oncologie. 2012;14:561-8.<https://doi.org/10.1007/s10269-012-2211-4>.
35. Florence L. Identification et caractérisation de polymorphismes génétiques impliqués dans la réponse à l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique [thèse en ligne]. Université de Bordeaux; 2019[consulté: 21/04/2024]. 1-271.Disponible sur : <https://theses.hal.science/tel-03228257v1/document>.
36. Gratwohl A, Heim D, Bergetzi M, Baerlocher G, Chalandon Y, Duchosal M, et al. Traitement de la leucémie myéloïde chronique 2007. Recommandations du groupe suisse de travail de la LMC. Forum Med Suisse. 2007;7:934-940. <https://doi.org/10.4414/fms.2007.06334>.
37. Ledoux MP, Natarajan-Ame S. Leucémie myéloïde chronique : des réponses et des questions. mt. 2013;19(2):128-38.<https://doi.org/10.1684/met.2013.0406>.
38. Draï YR. Les anomalies majeures route au diagnostic d'une leucémie myéloïde chronique (LMC) [mémoire en ligne]. Blida: Université Blida 1; 2020. [consulté: 12/05/2024]. 21-28.Disponible sur : <https://di.univblida.dz/xmlui/bitstream/handle/123456789/7379/01%20M.PM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

39. Hazourli S. Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique [thèse en ligne]. Canada : Université de Montréal ; 2012. [consulté : 12/05/2024].66-71.disponible sur :
https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/9131/Hazourli_Sawcenne_2012_these.pdf?sequence=4.
40. Nachi N, Guelaa B, Belmir I, Bekadja MA, Abaou O. Recherche des différents transcrits de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR quantitative multiplex : intérêt diagnostique et suivi chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Rev Algérienne d'hématologie. 2017;n 13-14:22-28.
41. Gersen SL, Keagle MB. The principal of clinical cytogenetics. 3rd ed. SpringerLink; 2013 [consulté le 31/05/2024]. Disponible sur: <https://link.springer.com/book>.
42. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature. Editor: Lionel Willatt, Sian M. Morgan. 2009;126:603–604. DOI: 10.1007/s00439-009-0726-6.
43. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. Rev Biol Biotechnol. 2002 ; 2(2) :2-11.
44. Cross NCP, White HE, Müller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2012 ; 26(10) :2172-5. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/leu.2012.104>.
45. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. Annu Rev Immunol. 2007 ; 25:745–85. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538.
46. Hazourli S, Chagnon P, Sauvageau M, Fetni R, Busque L, Hebert J. Overexpression of PRDM16 in the presence and absence of the RUNX1/PRDM16 fusion gene in myeloid leukemias. Genes Chromosomes Cancer. 2006;45:1072-1076.
47. Zhang SJ, Shi JY, Li J. GATA-2 L359 V mutation is exclusively associated with CML progression but not other hematological malignancies and GATA-2 P250A is à novel single nucleotide polymorphism. Leuk Res. 2009;33:1141-1143.
48. Taoussi S. Image caryotype et FISH. Unité cytogénétique, Service d'Hématologie, CAC Blida, Algérie. 2020.

49. Cherfi N, Taoussi S, Djouabi I, Abad MT. Cytogénétique en Hématologie : Enjeux et méthodes d'étude. Unité de cytogénétique, Service Hématologie, CAC Blida. [Consulté le 07/05/ 2024]. Disponible sur : www.hematologie-dz.com.
50. Nachi M, Kihel I, Enta-soltane B, et al. Fréquence des transcrits de fusion BCR-ABL1 chez les patients algériens atteints de leucémie myéloïde chronique. JFMO. 2020;4(1):8.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : CHARAOUI Souha

**APPLICATION DE LA CITOGENETIQUE ET DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LA
LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE**

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique

La Leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne chronique du groupe des syndromes myéloprolifératifs, elle 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.

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes techniques de la cytogénétique, cytogénétique moléculaire et de la génétique moléculaire, qui sont utilisées pour le diagnostic et le suivi de la leucémie myéloïde chronique.

Nous avons trouvé intéressant de présenter en un premier temps certaines techniques de cytogénétique et de cytogénétique moléculaire FISH qui permet l'identification des aberrations chromosomiques chez les patients de LMC et de présenter également quelques résultats émanant d'études algériennes et internationales.

La cytogénétique permis de diagnostiqué la LMC en détectant les anomalies de nombre et de structure. Cependant, elle possède des inconvénients et des limites. Par contre la FISH est une technique facile et rapide, elle permet de détecter plusieurs anomalies cryptiques grâce à l'utilisation de sondes spécifique.

Lors du diagnostic de LMC, il est très important de faire tout d'abord une recherche du type du transcrit par une RT-PCR multiplex suivie par une RT-PCR quantitative pour calculer le ratio BCR-ABL1/ABL1 qui définir la réponse moléculaire du patient

L'étude présenter a confirmé les données de la littérature en montrant une incidence plus élevée du transcrit majeur.

Mots-clefs : LMC, chromosome Ph1, BCR-ABL1, caryotype, FISH, PCR multiplex, RT-PCR quantitative.

Président du jury : Pr/ REZGOUNE Mohamed LARBI Pr-(UFMC1 - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Dr. LATRECHE Fethi MAA-UFMC1 – (UFM Constantine 1).

Examineur(s) Sedrati Khadidja MCA-UFMC1 – (UFM Constantine 1),