

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Génétique*

Intitulé :

*Etude de l'association entre le polymorphisme Arg72pro du gène
de la p53 et le risque des leucémies*

Présenté et soutenu par : CHIED Hanene
MOKHNACHE Kaouther

Le 24/10/2019

Jury d'évaluation :

Président : Dr Gharzouli Razika (MCA - UFM, Constantine 1).

Encadreur : Dr SEDRATI Khadidja (MCB - UFM, Constantine 1).

Examineur : Mme BOUDOKHANE Ibtissem Mouna (MAA- UFM, Constantine 1).

**Année universitaire
2018 - 2019**

Remercîment

Au terme de ce mémoire, nous remercîent avant tout Dieu tout puissant de nous avoir guidé de suivre le chemin de la science et nous avoir donné le courage pour la réalisation de ce présent travail, sans sa miséricorde ce travail n'aura pas abouti.

*Nous voudrions remercîer du fond du cœur **Dr SEDRATI Khadidja** qui a encadré ce travail, pour ses conseils avisés, son aide, sa gentillesse et ses encouragements qui ont constitués un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nous adressons aussi nos remercîments à **Dr Gharzouli** d'avoir accepté de présider ce jury, et à **Mme BOUDOKHANE** d'avoir accepté d'examiner ce travail et participer à la commission de jury à fin de le juger.*

*Notre entière reconnaissance à **Pr SATTA Dallila** et **Dr REZGONE Mohamed Larbi** de nos avoir négligé aucun efforts pour nous apporter soutien et recommandation leurs conseils et leur qualité de rigueur scientifique ont largement contribué à notre formation.*

*Nos vifs remercîements vont également à **Mlle LAOUAR Rania**, on vous remercie pour votre précieuse aide lors de la réalisation de ce mémoire.*

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*Mon très cher **papa**, et ma très chère **maman** décédés trop tôt, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, et dans le sombre chemin de la vie.*

J'espère qu'ils apprécient cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de ces âmes, puisse Dieu, le tout puissant les avoir en sa sainte miséricorde.

*Je tiens à exprimer mes dédicaces les plus chaleureuses à mon frère **Mohamed***

*Mes sœurs **Keltoum, Dalel, Ibtissem, Zina**, pour ses grandes disponibilités à mes côtés, ses encouragements, ses soutiens, ses compréhensions et de m'avoir poussé jusqu'au bout.*

*À mes meilleures amies qui ont toujours été à mes côtés et soutenues contre vents et marées, celle dont le sourire et la présence réchauffe mon cœur, **Hadjer** et **Kouka** vous êtes et vous serez les meilleures amies de tous les temps.*

À tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.

Hanene.

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire :

*À ma mère **Fatima El Zohra** la plus belle chose
dans ma vie*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente
pour exprimer ce que tu mérites pour tous les
sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis
ma naissance, à ce jour la.*

*À mon père **Youcef** pour sa patience, sa confiance et son respect de
mes choix, rien au monde ne vont les efforts fournis jour et nuit pour
mon éducation et mon bien être.*

*À mes frères : **Badreddine** et **Anis**, à mes sœurs **Hadjer**, **Nesrine** et
Rokia.*

*Mon binôme **Hanane**, pour la sœur agréable qu'elle était et qu'elle restera
pour moi.*

À tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime.

Kaouther.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Partie bibliographique

1. Les leucémies.....	2
1.1. Définition	2
1.2. Classification	2
1.3. Epidémiologie	7
1.4. Génétique des leucémies	10
1.5. Symptômes	12
1.6. Diagnostic.....	12
1.7. Traitement	13
2. La p53	15
2.1. Historique	15
2.2. Gène p53.....	15
2.3. Protéine p53.....	16
2.4. Régulation de p53.....	17
2.5. Les fonctions de p53.....	17
2.6. Polymorphisme et mutations de la p53.....	18
2.7. Relation entre leucémies et polymorphisme Arg72 de la p53.....	20

Partie pratique

Patients et méthodes.....	22
1. Population d'étude	22
2. Méthodologie	22
2.1. Recueil de l'ADN	23
2.2. Amplification de l'ADN par PCR.....	23

2.3. Contrôle des produits PCR	24
2.4. Digestion enzymatique des produits PCR	25
2.5. Electrophorèse des produits de la digestion	26
2.6. Etude statistique analytique	26
Résultats	28
1. Profil RFLP obtenus.....	28
2. Résultats du géotypages	29
Discussion	34
Conclusion	36
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	
ملخص	
Abstract	

Liste des abréviations

BBP : Bleu de Bromo Phénol.

BET : Bromure d’Ethidium.

CSH : Cellules souches hématopoïétiques.

HCL : *hairy cell leukemia*.

HDM2 : *Human Double Minute 2*.

HM : Hémopathies malignes.

Ig : immuno-globuline.

LA : Leucémie aiguë .

LA-bi : Leucémie aiguë biphénotypique.

LC : Leucémie chronique .

LLA : Leucémie lymphoïde aiguë .

LLC : Leucémie lymphoïde chronique .

LMA : Leucémie myéloïde aiguë .

LMC : Leucémie myéloïde chronique.

LT : Leucémie à tricholeucocytes.

MDM2 : Murin Double Minute 2.

MFP: Myélofibrose primitive.

MO : Moelle osseuse.

NK : *Natural Killer*.

OR: odds ratio.

PCR : *polymerase chain reaction*.

PCR-RFLP : *Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism*.

PH : *Philadelphie Chromosome*

RFLP : *Restriction fragment length polymorphism*.

SEERS : *Surveillance Epidemiology and End Results*.

SLP: Syndromes lymphoprolifératifs.

SMP: Syndromes myéloprolifératifs.

SNC : Système nerveux central.

SNP : *Single Nucleotide Polymorphisms*.

Taq : *Thermophilus Aquaticus*

TBE : Tris Borat EDTA.

TCR: *T cell Récepteur*

Liste des figures

Figure 01 :	Les hémopathies principales.....	3
Figure 02 :	Répartition épidémiologique des cancers dans les pays développés.....	8
Figure 03 :	Structure du gène p53.....	16
Figure 04 :	Structure schématique et domaines fonctionnels de la protéine p53.....	16
Figure 05 :	Le pourcentage des mutations de P53 par type d'organe.....	18
Figure 06 :	Les différents polymorphismes de gène P53.....	19
Figure 07 :	Contrôle des produits PCR.....	25
Figure 08 :	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par le clivage du <i>BshI236I</i>	28
Figure 09 :	Fréquences génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin.....	29
Figure 10 :	Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin.....	30
Figure 11 :	Fréquences génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.....	31
Figure 12 :	Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.....	31
Figure 13 :	Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin et la population malade.....	32
Figure 14 :	Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin et la population malade.....	33

Liste des tableaux

Tableau01 : Principaux réarrangements chromosomiques décrits dans les leucémies humaines.....	10
Tableau02 : Réarrangements chromosomiques équilibrés spécifique aux leucémies responsable de la création de gènes chimères.....	11
Tableau03 : Composants du mélange réactionnel de PCR.....	23
Tableau04 : Programme de la PCR.....	24
Tableau05 : Mix de digestion.....	26
Tableau06 : Tableau de contingence.....	26
Tableau07 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins.....	29
Tableau08 : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.....	30
Tableau09 : Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malades.....	33

Introduction

Les leucémies sont des maladies génétiques, caractérisées par une prolifération anormale et incontrôlée de cellules sanguines de la moelle osseuse ; ces dernières deviennent plus nombreuses, empêchant ainsi leur fonctionnement adéquat (Diebold et *al.*, 2008).

Le gène p53 est situé sur le chromosome 17q13.1, il a été très conservé pendant l'évolution, et appartient à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs (appelée anti-oncogènes), il est muté dans près de 50% des cancers (Aylon et *al.*, 2007). L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 est l'événement génétique connu le plus fréquent en cancérologie humaine. Elle résulte d'une double altération génétique affectant les deux allèles du gène avec pour conséquences la perte de la fonction suppresseur de tumeur et dans certains cas l'acquisition de propriétés transformantes.

C'est le polymorphisme le plus étudiés dans le gène P53; la variation de Proline en arginine au niveau du codon 72 est appelée p53-72Pro ou p53-72Arg, localisé sur l'exon 4 du gène P53. Ce SNP est dû à un changement dans la séquence d'ADN codant (CCC ou CCG). Ce codon est situé dans un domaine riche en proline, ce qui est essentiel pour sa capacité de liaison à l'ADN à induire l'apoptose. Les deux formes polymorphes (Pro72 et Arg72) du gène P53 ont des structures primaires et des propriétés de migration électrophorétiques différentes (Sreeja et *al.*, 2008).

L'allèle arginine (Arg 72) augmente la capacité de p53 à se situer dans les mitochondries et à induire la mort cellulaire, alors que l'allèle proline (Pro 72) présente un potentiel apoptotique plus faible et un arrêt cellulaire accru en G1 du cycle cellulaire (Bergamaschi et *al.*, 2006).

Notre travail de recherche comporte une étude transversale et une étude analytique moléculaire. Il a pour principaux objectifs:

- ✓ tenter d'apporter une approche dans la compréhension et l'exploration d'une composante de processus de cancérisation, la P53.
- ✓ Maitriser les outils et les techniques de bases de biologie moléculaire (l'amplification en chaîne par polymérase ou PCR et polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP).
- ✓ Déterminer une possible association entre le polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 et le risque de la survenu du des leucémies.

Partie

Bibliographique

1. Les leucémies

1.1. Définition

Le terme leucémie désigne des affections hématologiques malignes caractérisées par la prolifération et la spécialisation anormale des cellules sanguines dans la moelle osseuse (MO). Les leucémies constituent un groupe hétérogène de proliférations néoplasiques de cellules médullaires, précurseurs des leucocytes, bloquées à différents stades de différenciation; il en résulte un envahissement progressif de la moelle, du sang, voire de certains organes. Cet envahissement est à l'origine du tableau clinique d'insuffisance médullaire (Diebold et *al.*, 2008).

La prolifération des cellules anormales (leucémiques) perturbe la production de globules blancs normaux et baisse la réaction du système immunitaire cela implique un manque de globules rouges et de plaquettes, le sang extrait des patients atteints par une leucémie était d'aspect blanchâtre, du fait de l'augmentation du nombre de globules blancs, d'où le nom de leucose (Lanz, 2011).

1.2. Classification des leucémies

Le système hématopoïétique doit produire tout au long de la vie des cellules spécialisées en quantité très importante pour assurer le renouvellement des cellules lymphoïdes (lymphocytes) et myéloïdes (érythrocytes, plaquettes sanguines, polynucléaires et monocytes). Tous les éléments figurés du sang proviennent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui par définition; assurent deux fonctions : leur propre renouvellement (ou autorenouvellement) et la production de cellules différenciées (Coman et *al.*, 2014).

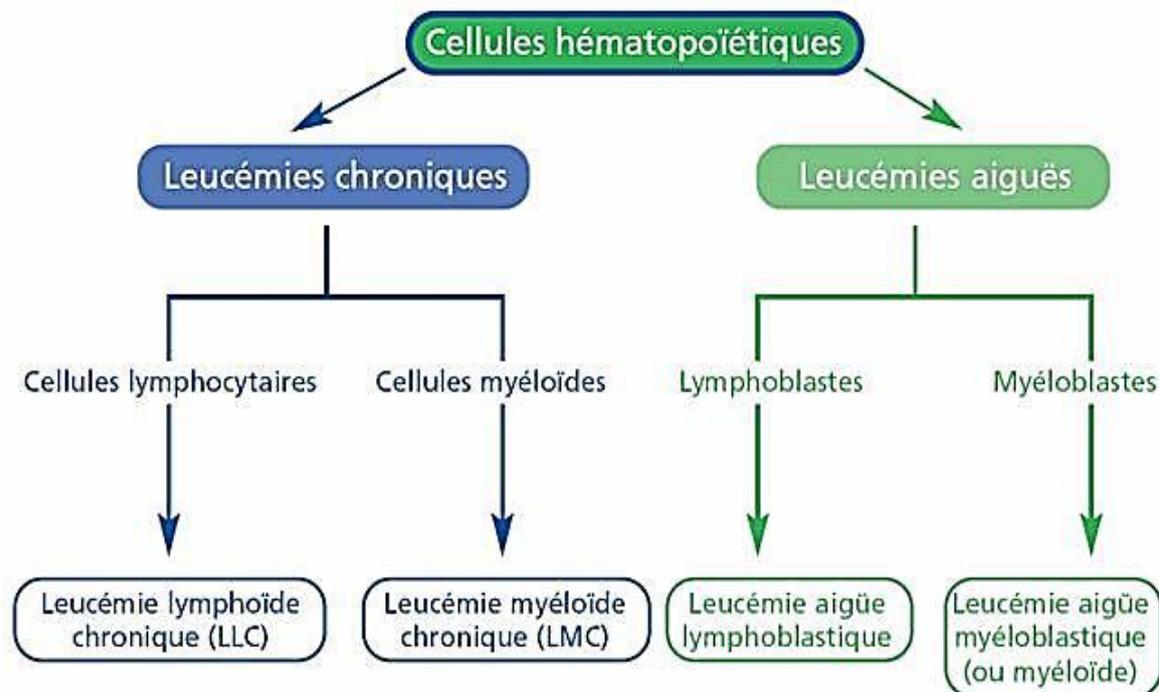


Figure01: Les hémopathies principales (Coman et *al.*, 2014).

Il existe plusieurs types hétérogènes de leucémies. On peut distinguer les leucémies selon leur évolution (aiguë ou chronique) et l'origine des cellules néoplasiques (lymphoïde ou myéloïde). Lorsque le progéniteur/précurseur a perdu sa capacité de différenciation, les cellules du clone tumoral, appelées « blastes », s'accumulent dans la moelle : c'est une leucémie aiguë (myéloïde ou lymphoïde). le terme « aigu » désigne un type de cancer qui, sans traitement, peut progresser assez rapidement, parfois en quelques mois. À l'inverse, le terme « chronique » désigne une forme de cancer qui évolue généralement beaucoup plus lentement.

Donc quatre principaux types sont distingués :

- Leucémies lymphoïdes aiguë
- Leucémies myéloïdes aiguë
- Leucémies lymphoïdes chronique
- Leucémies myéloïdes chronique

Étant donné que les cellules des leucémies sont d'emblée situées dans le sang, elles peuvent se développer dans l'ensemble du corps : contrairement aux tumeurs solides, la notion de métastases n'existe pas dans cette sorte de cancer (Flandrin, 2001).

1.2.1. Les leucémies aiguës (LA)

Les leucémies aiguës (LA) sont des proliférations monoclonales de précurseurs hématopoïétiques bloqués à un stade précoce de leur maturation. Les leucémies aiguës se voient à tout âge. Les leucémies lymphoïdes aiguës (LLA) représentent 30 % des LA. Ce sont surtout des pathologies de l'enfant. Environ 75 % des cas surviennent chez les moins de 18ans avec un pic de fréquence entre 2 et 5ans. Le deuxième pic de fréquence se situe chez l'adulte, autour de 70ans (Valensi, 2002).

L'évolution clinique des leucémies aiguës est caractérisée par la division rapide en espace de quelques semaines donc plusieurs organes sont envahis et les patients sont alors touchés par une multitude de symptômes, et par la prolifération de cellules bloquées a un stade précoce de leur différenciation (blastes) dans la moelle osseuse avec un passage habituel dans le sang et envahissement des autres organes homogènes hématopoïétiques (les ganglions et la rate); ces précurseurs évoluent rapidement, mettant en jeux la vie des patients à court terme en l'absence de traitement (Bernstein et *al*,1990). Selon cette différenciation les LA sont classées en fonction de leur lignée d'origine (lymphoïde : LLA ou myéloïde : LMA) (Patenaude, 1997). Il existe plusieurs classifications :

La classification FAB (Franco-Américano-Britannique) est fondée sur les critères morphologiques et cytochimiques (peroxydases et estérases). Cette classification FAB a été revue par l'OMS en 2000, abandonnant la distinction morphologique pour une classification immunologique et cytogénétique en lien avec la présence récurrente d'anomalies génétiques, et permettant une distinction plus fine des sous-groupes de LLA (Jaffe et *al.*, 2001).

1.2.1.1. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

LAM Constituent un ensemble de proliférations clonales incontrôlée de blastes anormaux normalement destinées à devenir des polynucléaire, des monocytes des plaquettes ou des globules rouges aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes (hématopoïétiques et non hématopoïétiques), de précurseurs hématopoïétiques de nature myéloïde (lignées granuleuses et monocytaires) avec blocage à un stade précoce de leur différenciation en éléments figurés du sang et de réponse aux facteurs de croissances (Pui et *al.*, 2004).

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est plus fréquente que la LAL (70 % des cas de LA sont myéloïdes 25% des cas sont diagnostiqués avant 25 ans ; elle est plus rare chez l'enfant

et plus volontiers chez l'adulte surtout après 40 ans (75 à 80 % des LA chez l'adulte et 15 à 20 % chez l'enfant) (Yasmeen et *al.*, 2009).

Les différents types de LAM reposaient initialement sur des critères morphologiques (FAB). La classification de l'OMS définit 5 classes de leucémies prenant en compte différents facteurs qui participent au pronostic de la maladie; elle intègre des données génétiques et cliniques aux données morphologiques et immunophénotypiques déjà utilisées dans les précédentes classifications. La classification de l'OMS a été modifiée en 2008, pour inclure de nouvelles entités d'intérêt clinique et diagnostique, dont la LAM avec mutation de la nucléosphomine (NPM1) qui représente 30 % des LAM.

Les conséquences de cette maladie sont la survenue d'une anémie en raison de la diminution des globules blancs (polynucléaires, neutrophiles) donc l'organisme devient plus sensible aux infections (Vardiman et *al.*, 2009 ; Falini et *al.*, 2010).

1.2.1.2. Leucémie aiguë lymphoïde (LLA)

Sont caractérisées par la prolifération incontrôlée des lymphoblastes anormaux normalement destinées à devenir des lymphocytes B qui sont les responsables de la production des anticorps, ou des lymphocytes T qui ont plusieurs fonctions, ou bien des cellules tueuses naturelles NK qui attaquent les cellules infectées par un virus et les cellules tumorales (Merle-Béral et *al.*, 2008).

Parmi les conséquences de LAL :

- L'anémie : résultat de la diminution des globules rouges dans le sang.
- La neutropénie : résultat de la diminution des globules blancs (neutrophiles) dans le sang.
- La thrombocytopénie : résultat de la diminution de nombre des plaquettes dans le sang.
- Pancytopénie : résultat de la diminution des trois composants du sang.

La LLA prend naissance dans les cellules souches lymphoïdes anormales et évolue rapidement. C'est le type de leucémie le plus fréquemment diagnostiqué chez les jeunes enfants et il affecte plus souvent les garçons que les filles. Plus de 40 % des LLA sont diagnostiquées chez les moins de 15 ans (Yasmeen et *al.*, 2009).

1.2.2. Les leucémies chroniques (LC)

Les LC sont peut agressives généralement les globules se divisent lentement (plusieurs années), l'accumulation de cellules originaires de la MO se fait à un stade avancé de leur différenciation en globules du sang, suivant qu'il s'agisse de cellules lymphocytaires ou myéloïdes (Patenaude, 1997).

1.2.2.1. Leucémie myéloïde chronique (LMC)

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une prolifération monoclonale sur la lignée granuleuse au niveau médullaire et splénique (Gonon-Demoulian, 2014). Les LMC est un syndrome de myélo-prolifératif rare représentent 15 % des leucémies de l'adulte et de 2 à 5% des leucémies de l'enfant. C'est la première pathologie cancéreuse dans laquelle une anomalie génétique a été établie : dans plus de 90 % des cas, une translocation entre les chromosomes 9 et 22 (chromosome Philadelphie) (Ph) est observée. Cette translocation conduit à la formation du gène de fusion *BCR-ABL* (Leguay et *al.*, 2005).

Cette maladie touche surtout l'adulte entre 30 et 50 ans. Le début de la maladie est souvent dénué de symptômes

L'évolution de LMC se fait classiquement en trois phases :

- Phase chronique : avec peu de signes cliniques et symptômes gênants
- Phase accélérée. le nombre de globules blancs et de cellules immatures circulantes augmente, les symptômes apparaissent et la maladie devient plus difficile à contrôler. En l'absence de traitement, l'espérance de vie est de 6 à 9 mois.
- Phase de crise blastique : la phase de transformation aiguë blastique durant laquelle plus d'un tiers des cellules circulantes et de la moelle sont immatures. À ce stade avancé, les cellules cancéreuses peuvent former des tumeurs au niveau des os ou des ganglions lymphatiques. En l'absence de traitement, l'espérance de vie est de 3 à 6 mois. (Mahon, 2001).

1.2.2.2. Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) un syndrome lymphoprolifératif chronique caractérisé par l'accumulation de petits lymphocytes B monoclonaux mûrs dans le sang, la moelle osseuse, la rate et les ganglions. (Bergerat et *al.*, 1996 ; Travade et *al.*, 2000).

Elle touche les gens autour de 60 ans et 2 fois plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, et représente le ¼ des leucémies de l'adulte (Patenaude, 1997).

1.2.3. Les leucémies biphénotypiques (leucémies mixtes)

Les leucémies aiguës biphénotypiques (LA-bi) myéloïdes et lymphoïdes sont des formes rares de leucémies aiguës qui s'observent chez l'adultes et l'enfant. elles représentent de 3,6 à 8% des cas de LA dans la littérature (Buccheri et *al.*, 1993). Le besoin d'une définition précise est important, car un pourcentage important de LAM ou LAL peuvent exprimer un antigène d'une autre lignée. Cette expression anormale est généralement considérée comme une infidélité de lignée et non comme une LA-bi vraie avec implication de deux lignées (Drexler et *al.*, 1993; Pui et *al.*, 1998).

1.2.4. La leucémie à tricholeucocytes

La leucémie à tricholeucocytes (LT) ou hairy cell leukemia (HCL), décrite en 1958 (Bouroncle et *al.*, 1958) représente environ 2 % de l'ensemble des leucémies (Bernstein et *al.*, 1990), survient préférentiellement chez l'homme (huit fois sur dix) à partir de la cinquième décennie avec une étiologie inconnue. Néanmoins, l'existence de formes familiales suggère dans certains cas, une prédisposition génétique (Casado et *al.*, 1998; Virchis et *al.*, 1997) et le rôle de facteurs environnementaux reste à préciser. Par ailleurs, une étude française sur les facteurs de risque professionnels a mis en cause l'activité des agriculteurs, en particulier la culture de fourrage et l'exposition aux insecticides organophosphorés. Cette étude a noté un lien négatif avec la consommation de tabac chez les hommes (Clavel et *al.*, 1995).

1.3. Epidémiologie

Les leucémies, toutes formes confondues, concernent : environ 9 000 personnes chaque année (3 700 leucémies aiguës et 5 200 leucémies chroniques en 2012); essentiellement des enfants ou des personnes âgées (Maynadié et *al.*, 2013).

Depuis 1980, l'incidence des leucémies (c'est-à-dire le nombre de cas déclarés dans une population de 100 000 habitants) a augmenté chaque année de 0,9 %, aussi bien chez les hommes que chez les femmes (Buccheri et *al.*, 1993).

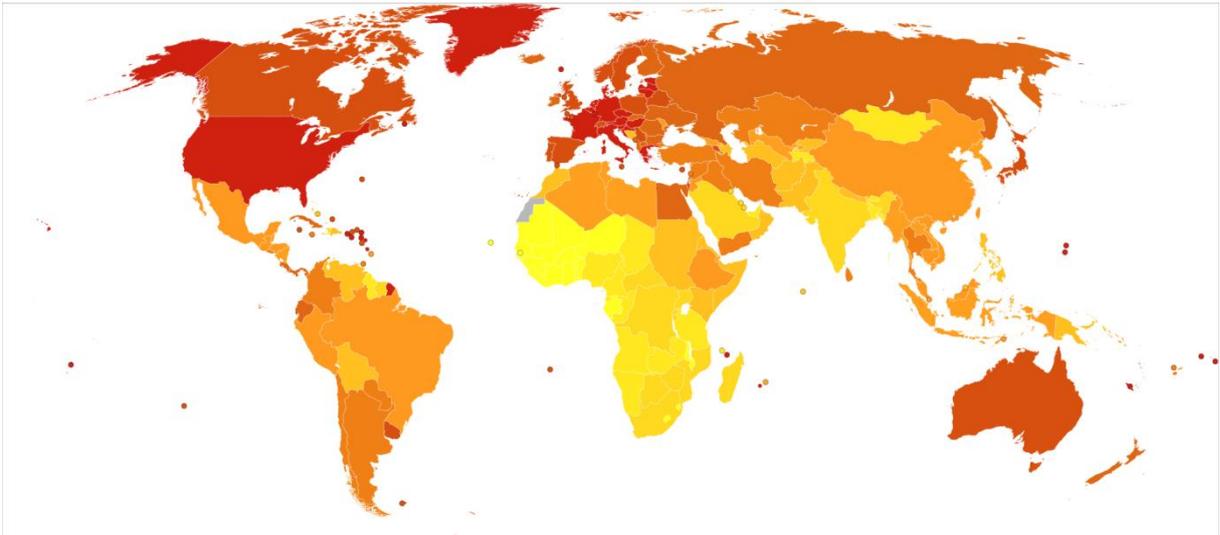


Figure 02 : épidémiologie des leucémies dans le monde (*World Health Organization Estimated Deaths 2012*)

Les caractéristiques épidémiologiques en fonction de type de leucémie sont comme suit :

1.3.1. Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

Les LAL sont le premier cancer de l'enfant, représentent 80% des leucémies aiguës chez l'enfant et 20% des leucémies chez l'adulte. L'incidence annuelle de l'adulte est estimée à 1/100000 par an. Il s'agit le plus souvent d'un homme que d'une femme avec une fréquence qui s'accroît avec l'âge, un critère de gravité important. En outre, la LAL est considérée comme étant une maladie orpheline chez l'adulte (Farnault et *al.*, 2015).

C'est avec cette leucémie que les plus grands progrès ont été obtenus, le taux de guérison atteignant aujourd'hui près de 80 % chez les enfants (mais seulement 53 % chez les 15-25 ans).

1.3.2. Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)

Elles représentent 1% des cancers et 80% des leucémies aiguës chez l'adulte dont l'incidence est en augmentation constante (Bernstein et *al.*, 1990). L'incidence annuelle selon les données américaines du programme SEERS (*Surveillance Epidemiology and End Results*) est de 4/100000 habitants dans la population générale et de 18/100000 habitants au-delà de 65

ans. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans et les hommes semblent plus fréquemment atteints que les femmes avec un sexe ratio de « 3 : 2 » (Huguet et *al.*, 2012).

1.3.3. Les Leucémies lymphoïdes chroniques (LLC)

Elles représentent 1% des cas de cancers et 12,5% des hémopathies malignes (HM), elle est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux, quels que soient le sexe et la race. Sa fréquence augmente avec l'âge avec une incidence de 5/100 000 après 50 ans, de 30/100 000 après 80 ans et très rare avant 40 ans. En revanche, le taux standardisé d'incidence ajusté à la population mondiale est de 3,6/100 000 habitants en 2005 pour les hommes et de 20/100 000 pour les femmes (Sant et *al.*, 2010).

1.3.4. Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC)

Les LMC sont une HM rare, classée parmi les néoplasies myéloprolifératives. Elle représente 15 % de l'ensemble des leucémies. Son incidence annuelle est estimée entre 0,6 et 2/100 000 habitants. Elle peut survenir à tous les âges de la vie, y compris chez l'enfant ; cependant, l'âge médian lors du diagnostic est d'environ 65 ans (Hehlmann, 2007).

Les hommes sont plus fréquemment atteints que les femmes, ratio hommes/femmes étant estimé entre 1,3 et 1,8 (Rohrbacher et *al.*, 2009). La gravité de cette hémopathie est liée à son évolution inexorable vers la leucémie aiguë fatale, en l'absence de traitement adapté (Rea et *al.*, 2014).

1.4. La génétique des leucémies

La biologie moléculaire des leucémies humaines est dominée par la présence au sein des cellules blastiques, d'anomalies chromosomiques, principalement des translocations et des inversions mais également des délétions ou des amplifications intéressants des portions de chromosomes (17,18). (tableau 01 et 02)

Tableau01: Principaux réarrangements chromosomiques décrits dans les leucémies humaines (Gisselbrecht, 2003).

Type de gène	Translocation	Gènes affectés	Fonction	Type de leucémie
Facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL</i> (12p13) <i>AML1</i> (21q22)	Facteur ETS Sous-unité du CBF ou CBF α fixant l'ADN (domaine runt)	LAL pro-B
	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1</i> (21q22) <i>ETO</i> (8q22)	Sous-unité CBF α du CBF Protéine nucléaire à doigts de zinc	LAM
	t(3;21)(q26;q22)	<i>AML1</i> (21q22) <i>EVII</i> (3q26)	Sous-unité CBF α du CBF Protéine nucléaire à doigts de zinc	LAM secondaires
	Inv(16)(p13;q22)	<i>CBFβ</i> (16q22) <i>SMMHC</i> (16p13)	Sous-unité CBF β du CBF Chaîne lourde des chaînes de myosine du muscle lisse	LAM à éosinophiles
	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A</i> (19p13) <i>PBX1</i> (1q23)	Facteur de transcription de type bHLH Facteur de transcription à homéodomaine	LAL pré-B
	t(17;19)(q22;p13)	<i>E2A</i> (19p13) <i>HLF</i> (17q22)	Facteur de transcription de type bHLH Facteur de transcription à <i>leucine zipper</i>	LAL pro-B
	t(15;17)(q21;q12)	<i>PML</i> (15q21) <i>RARα</i> (17q12)	Protéine à doigts de zinc de type <i>ring</i> (corps nucléaires) Récepteur α de l'acide rétinoïque	Leucémies aiguës promyélocyaires (LAP)
	t(11;17)(q23;q12)	<i>PLZF</i> (11q23) <i>RARα</i> (17q12)	Protéine nucléaire à doigts de zinc Récepteur α de l'acide rétinoïque	apparenté aux LAP
	t(11;17)(q13;q12)	<i>NuMA</i> (11q13) <i>RARα</i> (17q12)	Protéine de la matrice nucléaire Récepteur α de l'acide rétinoïque	apparenté aux LAP
	t(5;17)(q35;q12)	<i>NPM</i> (5q35) <i>RARα</i> (17q12)	Nucléophosmine (protéine nucléolaire) Récepteur α de l'acide rétinoïque	apparenté aux LAP
	t(17;17)(q11;q12)	<i>STAT5B</i> (17q11) <i>RARα</i> (17q12)	Facteur de transcription de la famille STAT Récepteur α de l'acide rétinoïque	apparenté aux LAP
	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL</i> (11q23) <i>AF4</i> (4q21)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	Leucémies bi-phénotypiques de l'enfant
	t(6;11)(q27;q23)	<i>MLL</i> (11q23) <i>AF6</i> (6q27)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Fonction mal connue	LAM myélo-monocytaires et monoblastiques
	t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL</i> (11q23) <i>AF9</i> (9p22)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	LAM myélo-monocytaires et monoblastiques Leucémies secondaires (inhibiteurs de topo-isomérase II)
	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL</i> (11q23) <i>ENL</i> (19p13)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	LAM, LAL B et leucémies bi-phénotypiques de l'enfant
	t(7;11)(p15;p15)	<i>NUP98</i> (11p15) <i>HOXA9</i> (7p15)	Nucléoporine (protéine associée au pore nucléaire) Facteur de transcription à homéodomaine	LAM secondaires
	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK</i> (6p23) <i>CAN</i> (9q34)	Facteur de transcription NUP214 (protéine associée au pore nucléaire)	LAM à basophiles
	t(1;22)(p13;q13)	<i>OTT</i> (1p13) <i>MAL</i> (22q13)	Protéine nucléaire de la famille Spen Co-activateur du facteur SRF	Leucémies aiguës mégacaryocytiques de l'enfant
	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS</i> (16p11) <i>ERG</i> (21q22)	Protéine se liant à l'ARN Facteur de transcription famille ETS	LAM

Tableau02: Réarrangements chromosomiques équilibrés spécifique aux leucémies responsable de la création de gènes chimères (Read et *al.*, 2008).

Réarrangements	Gènes	Maladie
t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15/MKL1</i>	Leucémie aiguë mégacaryoblastique (FAB-M7)
t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3/FKHR</i>	Rhabdomyosarcome alvéolaire
t(3;8)(p21;q12)	<i>PLAG1/CTNNB1</i>	Adénome pléiomorphe des glandes salivaires
inv(3)(q21q26)	<i>RPN1/EVI1</i>	Leucémie myélomonocytaire aiguë
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL/AFF</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë
t(6;11)(q27;q23)	<i>MLL/MLLT4</i>	Leucémie myélomonocytaire aiguë
t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL/AF9</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë
t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL/MLLT1</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë
t(7;11)(p15;p15)	<i>NUP98/HOXA11, HOXA13, HOXA9</i>	Leucémie myéloblastique aiguë
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL1</i>	Leucémie myéloïde chronique
t(11;14)(q13;q32)	<i>IGH/CCND1</i>	Leucémie lymphocytaire chronique, Lymphome à cellule de Mantle
t(15;17)(q22;q12)	<i>PML/RARA</i>	Leucémie promyélocytaire aiguë (FAB-M3)
t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS/DDIT3</i>	Liposarcome
inv(16)(p13q22)	<i>CBFB/MYH11</i>	Leucémie myélomonocytaire aiguë
t(X;18)(p11;q11)	<i>SS18/SSX1, SSX2, SSX4</i>	Sarcome synovial
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH/BCL2</i>	Lymphome folliculaire
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1)</i>	Leucémie lymphoblastique aiguë
t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1/ETO</i>	Leucémie myélomonocytaire aiguë

Ces anomalies ne sont pas aléatoires, et dans une majorité de cas sont spécifiquement associées à un type histologique ou immun phénotypique de leucémie ce qui a conduit à inclure certaines d'entre elles dans les classifications des leucémies, les translocations chromosomiques ont un intérêt pronostic évident dans certaines formes de leucémies (Lacave et *al.*, 2005).

Le clonage moléculaire de remaniements chromosomiques récurrents a permis d'identifier de nombreuses altérations géniques qui constituent des outils diagnostiques et de suivi thérapeutique maintenant pris en compte dans les nouveaux critères de classification des leucémies. Le développement récent de thérapeutiques ciblées sur l'activité ou la stabilité d'une protéine oncogénique a été récemment illustré par les succès thérapeutiques obtenus dans le traitement des leucémies aiguës promyélocytaires et de la leucémie myéloïde chronique. (Arber et *al.*, 2016; Rao et *al.*, 2015; Creutzig et *al.*, 2012).

1.5. Les symptômes

Les symptômes de la leucémie peuvent varier en fonction de type de leucémie dont le patient est atteint soit : aiguë ou chronique.

- **LA** : Ses signes et ses symptômes semblables à ceux de la grippe et peuvent apparaissent dans quelques jours ou quelques semaines.
- **LC** : Généralement peu ou pas de symptômes, le patient atteint d'une LC ne sent pas qu'il est atteint d'une leucémie.

Donc le patient atteint d'une LC ou d'une LA a généralement les signes suivants :

- Perte de poids.
- Fièvre.
- Transpiration excessive la nuit.
- Fatigue.
- Infections fréquentes des sinus et des poumons.
- Parfois des anémies.
- Augmentation de volume des ganglions, la rate et le foie mais ce changement ne provoque pas des douleurs chez le patient atteint d'une LLC contrairement au patient qui souffre d'une LMC ou LA se plaindront de douleurs dorsales et osseuses et parfois des maux de tête (Patenaude, 1997).

1.6. Diagnostic

Une leucémie peut être suspectée suite à l'apparition d'un ensemble de symptômes évocateurs ou au détour d'une simple prise de sang. Néanmoins, pour les deux grandes formes de leucémies existantes, il est possible de mener des examens afin d'établir un diagnostic : Le diagnostic des leucémies est suspecté devant une prise de sang montrant :

- ✓ Une analyse de numération formule sanguine (FNS) anormale.
- ✓ Une anémie; baisse du nombre de globules rouges, plaquettes, polynucléaires.
- ✓ Une thrombopénie ; diminution, augmentation des leucocytes.

Si les résultats de cette analyse du sang laissent suspecter une leucémie, le patient doit confirmer ces résultats grâce à un Myélogramme (analyser les cellules de la MO au microscope). Le diagnostic est confirmé quand la MO contient plus de 20% de cellules immatures.

On peut définir les sous-catégories des leucémies après une analyse cytogénétique et moléculaire, cryométrie de flux, cytochimie et la morphologie des cellules. Par ailleurs, l'analyse morphologique des cellules permet de classer précisément la leucémie aiguë et de déterminer :

- s'il s'agit d'une leucémie aiguë myéloblastique (notamment si le taux de blastes médullaires – cellules malignes – est supérieur à 20 %) et duquel des trois sous-types existants il s'agit ;
- s'il s'agit d'une leucémie aiguë lymphoblastique (notamment si le taux de blastes médullaires est supérieur à 25 %) et duquel des huit sous-types existants il s'agit ;
- le pronostic ;
- le traitement de la leucémie à adopter.

En raison de la difficulté à cerner cette maladie, le diagnostic à mener doit être particulièrement irréprochable et précis (Bossuyt et *al.*, 2001).

1.7. Traitement

Les traitements actuels ont permis une réduction remarquable du taux de mortalité, principalement pour les leucémies lymphoblastiques de l'enfant, dont le taux de guérison atteint près de 80 %. Mais ces traitements sont en général très lourds car ils prennent les éléments suivants en considération :

- ✓ Le type de leucémie
- ✓ L'âge
- ✓ La présence d'anomalies chromosomiques (génétiques)
- ✓ L'état de santé global

En présence d'une leucémie, on peut avoir recours aux options de traitement suivantes.

- **La chimiothérapie** : est le traitement principal de nombreux types de leucémie.
- **La greffe de cellules souches** : une option pour certaines personnes âgées de moins de 55 ans. Une approche thérapeutique qui consiste à éliminer les cellules cancéreuses en greffant des défenses immunitaires au malade comme rempart contre la maladie.
- **La radiothérapie** : est le plus souvent administrée pour prévenir la propagation de la leucémie au système nerveux central (SNC) ou pour traiter une leucémie qui s'est

propagée au SNC. On y a aussi recours pour préparer la moelle osseuse à une greffe de cellules souches.

- **Le traitement ciblé** : est offert en présence de certains types de leucémie.
- **L'observation vigilante** : est une option de traitement pour certaines personnes atteintes de LLC. Des hémogrammes de surveillance répétés pour prévenir une pancytopenie - c'est à dire une diminution du nombre des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes - trop profonde ; Si indiqué, des myélogrammes sont réalisés après la cure d'induction, puis en fonction des schémas protocolaires (parfois pour expliquer une cytopénie trop prolongée).
- **Le traitement de soutien** : permet de maîtriser les complications prévues de la leucémie et de ses traitements.

Les progrès thérapeutiques se poursuivent avec de nouvelles associations, et des recherches sur les possibilités d'arrêt du traitement sont en cours. C'est dire l'importance d'une prise en charge par les centres académiques, associés au groupe, l'inclusion des patients dans les essais thérapeutiques étant toujours d'actualité et conseillée (Passweg *et al.*, 2008).

2. La p53

2.1. Historique

La protéine P53 a été découverte pour la première fois en 1979 comme un antigène spécifique de certains sarcomes induits chimiquement dans les souris (DeLeo et *al.*, 1979).

Elle a été également trouvée dans les cellules cancéreuses ou transformées par certains virus (Lane et *al.*, 1979). Son expression est augmentée dans le cas de stimulation de la prolifération cellulaire. Elle a été considérée comme un proto-oncogène (Lodish et *al.*, 2000). Cependant au 1989 la p53 est identifiée comme suppresseur de tumeur suite à l'observation de la perte de son activité dans de nombreuses tumeurs humaines et murines. (Hollstein et *al.*, 1991).

2.2. Le gène p53

Le gène p53 code pour un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans la régulation de cycle cellulaire, il est situé en17q13. Ce gène est constitué de 11 exons. La séquence codante commence dans le deuxième exon et se termine dans le dernier exon. Il code pour une protéine nucléaire de poids moléculaire de 53.000 daltons, constitué de 393 acides aminés (AA). C'est une protéine ubiquiste présente dans tous les tissus normaux étudiés à des taux cytoplasmiques faibles (Aylon et *al.*, 2007).

Le gène P53 appartient à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs (appelée anti-oncogènes). Ces gènes dans les cellules normales sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Ils empêchent ainsi une prolifération excessive. Lorsqu'ils sont absents ou déficients, ils peuvent être à l'origine de certains cancers. Ces gènes agissent selon le mode récessif. En effet l'inactivation des deux allèles est nécessaire pour produire la perte de fonction (Rivlin et *al.*, 2011).

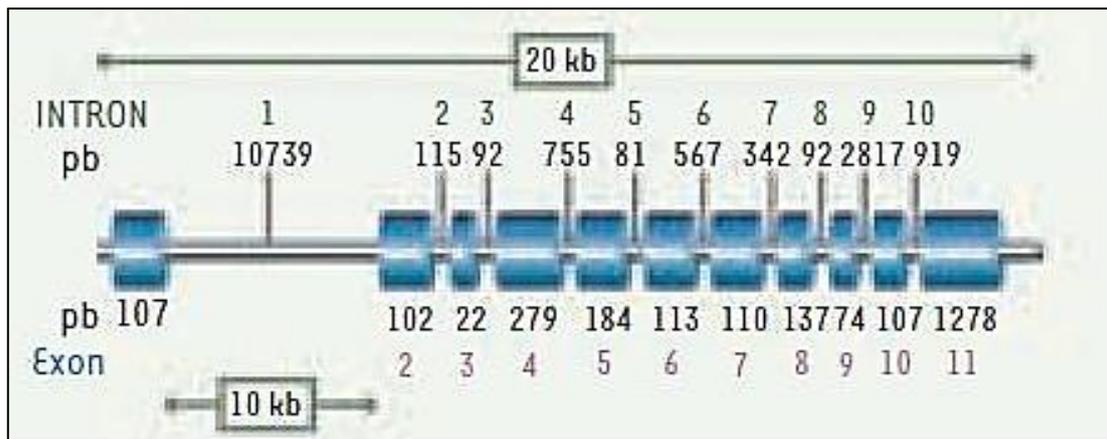


Figure 03 : Structure du gène p53 (Aylon et *al.*, 2007).

2.3.La protéine p53

La protéine p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 AA d'une masse moléculaire de 53 kDa, On la trouve en très petite quantité dans les cellules normales, mais en grande abondance dans les cellules transformées en culture ou dans les tumeurs humaines, et qui induit la transcription de certains gènes lorsqu'elle est sous forme de tétramère (Heron, 2009).

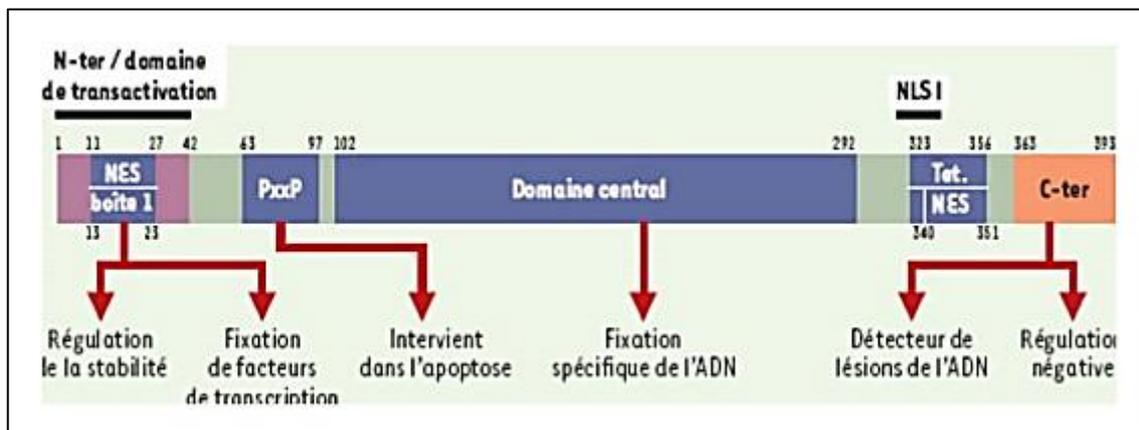


Figure 04: Structure schématique et domaines fonctionnels de la protéine p53 (Toledo et *al.*, 2006).

Elle est constituée de cinq domaines principaux:

- Le domaine de transactivation (acides aminés 1-42) en N-terminal.
- Le domaine riche en proline (63-97).
- Le domaine de liaison à l'ADN (102-292).
- Le domaine de tétramérisation (335-356) .
- le domaine C-terminal (363-393) (Toledo et *al.*, 2006).

2.4. La régulation de P53

La protéine p53 peut être régulée à différents niveaux. Ceci est possible grâce à l'action de nombreux régulateurs positifs et négatifs souvent capables d'induire des boucles de rétrocontrôle. Cette régulation se produit à trois niveaux : au niveau de la stabilisation de la protéine, au niveau de son activité et au niveau de sa distribution cellulaire. Le principal régulateur de p53 est le proto oncogène HDM2 (Human Double Minute 2), l'analogue humain de MDM2 (Murin Double Minute 2). L'importance de cette protéine dans la régulation négative de p53 est telle que l'interaction HDM2-p53 est une cible thérapeutique séduisante pour le développement de nouveaux traitements. HDM2 est transcrit par p53, ainsi, p53 induit sa propre inhibition par une boucle de rétrocontrôle négative. La fixation de p53 à HDM2 conduit à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. En plus d'induire sa dégradation, HDM2 masque le domaine de transactivation de p53. L'interaction avec HDM2 est indispensable à la dégradation de p53, en empêchant cette interaction, p53 est stabilisé dans la cellule (Shangary et *al.*, 2008). La régulation de P53 se fait de façon quantitative aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, mais aussi qualitative car P53 est régulée par des modifications post traductionnelles par phosphorylation, l'acétylation, méthylation et l'ubiquitination. (Dai et *al.*, 2010).

2.5. Les fonctions de P53

La fonction clé de la protéine p53 est de protéger les cellules et les empêcher de devenir cancéreuses (Laptenko et *al.*, 2006). La p53 est impliquée dans de nombreux processus comme :

2.5.1. L'arrêt du cycle cellulaire

La protéine P53 peut induire un arrêt dans la progression du cycle cellulaire, soit en G1, soit en G2/M). L'arrêt du cycle en G1 empêche l'ADN endommagé d'être répliqué et l'arrêt en G2 permet la suspension du cycle avant la ségrégation des chromosomes. (Teyssier et *al.*, 1999).

2.5.2. L'apoptose

La p53 agit comme un régulateur du processus apoptotique qui peut moduler les points clés de contrôle dans les deux voies extrinsèques et intrinsèques. Le lien le plus incitatif entre p53 et apoptose médiée par transactivation provient de sa capacité à contrôler la transcription des

membres pro apoptotiques de la famille Bcl-2, dont les promoteurs de ces gènes peuvent se lier à la p53, leur effet net est d'augmenter le taux de protéines pro- apoptotiques des familles Bcl 2, qui favorisant ainsi la libération de protéines apoptogènes des mitochondries, l'activation de caspase donc l'activation de l'apoptose (Fridman et *al.*, 2003). La protéine p53 peut inhiber la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou induire des gènes pro-apoptotiques comme Bax (Miyashita et *al.*, 1994).

2.5.3. Réparation de l'ADN

La protéine p53 à la capacité de reconnaître certains types de lésions d'ADN et donc représente l'un des mécanismes par lesquels cette protéine module la réponse cellulaire aux dommages causés par l'ADN (Subramanian et *al.*, 2005).

2.6. Polymorphismes et mutation de la p53

Le gène P53 est muté dans 50% des cancers sporadiques dans la moitié des cas sa fonction est inhibée par des antagonistes oncogènes tels que MDM2 (Murine double minute 2 homologue).

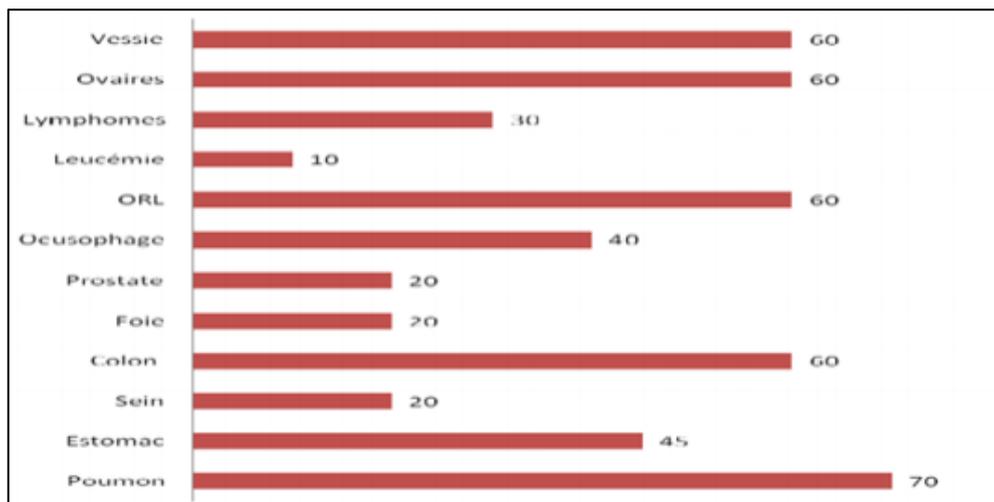


Figure 05: Le pourcentage des mutations de P53 par type d'organe. (Soussi et *al.*, 2000)

Le polymorphisme est une variation de la séquence d'ADN qui se produit dans une population avec une fréquence de 1% ou plus est appelée polymorphisme (Brookes, 1999).

L'incidence plus élevée dans la population suggère qu'un polymorphisme est naturel, avec un effet neutre ou bénéfique. Les polymorphismes peuvent également être d'un ou plusieurs changements de nucléotides, tout comme les mutations (Aerts et *al.*, 2002). De nombreux

Singal nucleotid polymorphisms (SNPs) sont présents au niveau du locus P53, ils peuvent augmenter le risque de cancer et affecter la réponse à des schémas thérapeutiques.

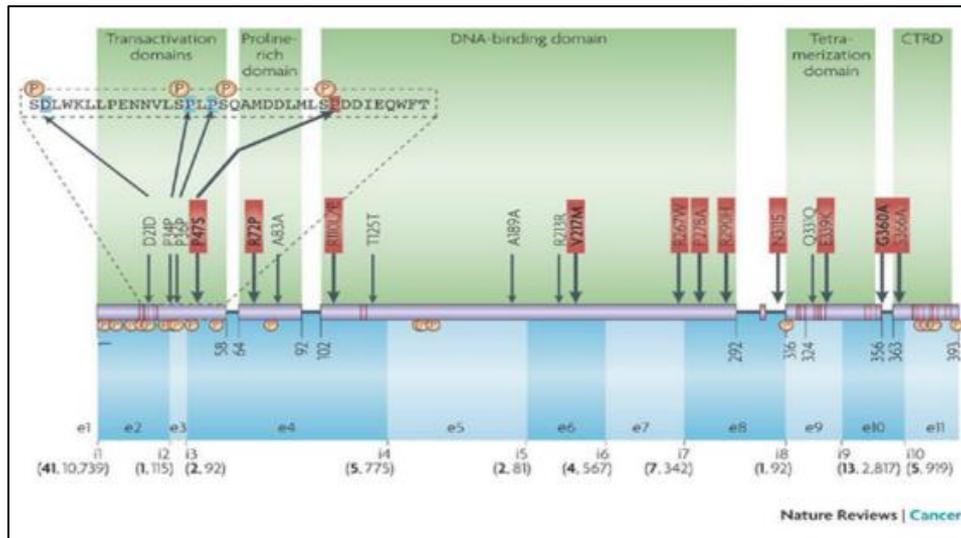


Figure 06: Les différents polymorphismes de gène P53 (Wright et *al.*, 2009)

2.6.1. Le polymorphisme Pro 47 Ser

Le polymorphisme Pro 74 Sérine (dénommé ci-après p53-47Pro ou p53-47Ser), est le résultat d'une substitution d'une C par une T à la position 1 du codon 47. La variante p53-47Ser, diminue l'induction de certains gènes pro-apoptotique en réduisant le niveau de phosphorylation à la sérine 46 résidu adjacent (Li et *al.*, 2005).

2.6.2. Le polymorphisme Val 217 Met et Gly 360Ala

Le polymorphisme p53-217 valine / méthionine est le seul polymorphisme trouvé dans le DBD de p53, qui pourrait être susceptible d'influer sur l'activité de protéine. Une étude effectuée sur la levure montre que l'induction de certains gènes p53 est légèrement diminué avec la variante p53-360Ala. Cependant, il n'y a pas de confirmation du rôle de ces SNPs dans un système de mammifère ou même dans les cancers humains (Kato et *al.*, 2003).

2.6.3. Le polymorphisme Arg 72 Pro

Ce polymorphisme a un impact sur la fonction apoptotique de p53 de manière spécifique au tissu; de tels effets spécifiques de tissus de variants polymorphes représentent un défi supplémentaire pour les études d'association de risque de cancer chez l'homme (Azzam et *al.*, 2011; Dumont et *al.*, 2003).

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 est l'événement génétique connu le plus fréquent en cancérologie humaine. Elle résulte d'une double altération génétique affectant les deux allèles du gène avec pour conséquences la perte de la fonction suppresseur de tumeur et dans certains cas l'acquisition de propriétés transformantes.

C'est le polymorphisme le plus étudiés dans le gène P53; la variation de Proline en arginine au niveau du codon 72 est appelée p53-72Pro ou p53-72Arg, localisé sur l'exon 4 du gène P53. Ce SNP est dû à un changement dans la séquence d'ADN codant (CCC ou CCG). Ce codon est situé dans un domaine riche en proline, ce qui est essentiel pour sa capacité de liaison à l'ADN à induire l'apoptose. Les deux formes polymorphes (Pro72 et Arg72) du gène P53 ont des structures primaires et des propriétés de migration électrophorétiques différentes (Sreeja et *al.*, 2008).

Avec des potentiels biochimiques et biologiques différents, y compris la liaison à la machinerie de transcription et à l'activation de la transcription, mais ils ne diffèrent pas en ce qui concerne les propriétés de liaison à l'ADN (Dumont et *al.*, 2003).

L'allèle arginine (Arg 72) augmente la capacité de p53 à se situer dans les mitochondries et à induire la mort cellulaire, alors que l'allèle proline (Pro 72) présente un potentiel apoptotique plus faible et un arrêt cellulaire accru en G1 du cycle cellulaire (Bergamaschi et *al.*, 2006).

En outre, plusieurs études ont également indiqué que le variant de la proline activait plus efficacement les gènes liés à la réparation de l'ADN dépendant de TP53 dans différents dosages basés sur des cellules. De plus, les cellules portant le variant Pro72 présentaient également une formation réduite de micronoyaux, suggérant qu'elle favorisait une plus grande stabilité génomique (Siddique et *al.*, 2006).

2.7.La relation entre les leucémies et le polymorphisme Arg72pro de la p53

La protéine p53 est une protéine suppressive de tumeur dont le gène est altéré dans 50% des cancers humains où elle est l'agent le plus important de la protection de la cellule contre la cancérisation. L'inactivation de p53 peut amène à la cancérisation, si p53 est muté, la cellule devient bien plus à risque de transformation maligne (Soussi et Wiman, 2007).

De très nombreux polymorphismes ont été décrits pour le gène p53 et parmi eux le polymorphisme qui se définit au niveau du codon 72 responsable de la diminution de l'activité de la protéine, c'est le polymorphisme le plus étudiés dans le gène P53 (Soussi, 2010).

À ce jour, de nombreuses études ont étudié la relation entre le polymorphisme P53 Arg72Pro et la prédisposition à la leucémie, mais l'impact de ce dernier sur la survenue des leucémies était toujours contradictoire (Tian *et al.*, 2016).

Partie pratique

Patients et méthodes

1. Population étudiée

Cette partie d'étude a concerné 45 échantillons d'ADN collectés de la banque d'ADN du laboratoire de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire de l'université Constantine 3, cet échantillon unit 2 populations :

- Une population de témoins, comprend 35 échantillons d'ADN qui sont des sujets âgés de 30 à 75 ans et sans antécédents familiaux de cancer.
- Une population de patients regroupant 10 échantillons d'ADN de patients atteint par différents types de leucémies.

2. Méthodes

Nous avons entrepris une étude sur le polymorphisme du codon 72 au niveau de l'exon 4 du gène de la p53 par une étude analytique des profils génotypiques de 10 patients par la méthode de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

La réalisation pratique s'est effectuée au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université des Frères Mentouri Constantine 1.

Notre méthodologie applique le plan suivant :

- Un recueil d'ADN.
- Une amplification de l'ADN par PCR.
- Un contrôle des produits de PCR de l'exon amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose.
- Une digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction *Bsh1236I*.
- Une Electrophorèse sur gel d'agarose.

2.1. Recueil d'ADN

Notre échantillon d'ADN a été ramené directement de la banque d'ADN du laboratoire de recherche de Biologie et Génétique Moléculaire de l'université Constantine 3. Cet échantillon respect les conditions d'utilisation pour cette étude.

2.2. Amplification de l'ADN par PCR

La réaction de PCR permet l'amplification exponentielle d'une région d'intérêt connue en utilisant un mélange réactionnel contenant tous les réactifs nécessaires (tableau 03), l'ensemble est soumis à une succession de réactions appelées cycles de réplifications; chaque cycle est composé de 3 étapes :

- Une dénaturation des brins d'ADN.
- Une hybridation des amorces.
- Une élongation.

2.2.1. Préparation du milieu réactionnel (le mix)

Tableau 03 : Composants du mélange réactionnel de PCR.

Réactifs	Volumes nécessaires pour un échantillon (μL)
Eau distillée	16.7
Tampon 10X	2.5
MgCl ₂ (25mM)	1.5
dNTP (5mM)	2.0
OligoF 5'-TCC CCC TTG CCG TCC CAA-3' (10 PM)	0.5
OligoR 5'-CGT GCA AGT CAC AGA CTT-3' (10 PM)	0.5
Taq polymérase	0.3

Après avoir préparé le mix, 24 μL de ce mélange ont été additionnés à 1 μL d'ADN pour chaque échantillon (Un témoin négatif a été ajouté à chaque réaction de PCR).

Les cycles correspondant aux différentes températures de la PCR ont été programmés dans un thermocycleur en nombre de 35 cycles, le déroulement de l'amplification est présenté dans le tableau 04.

Tableau 04 : Programme de la PCR.

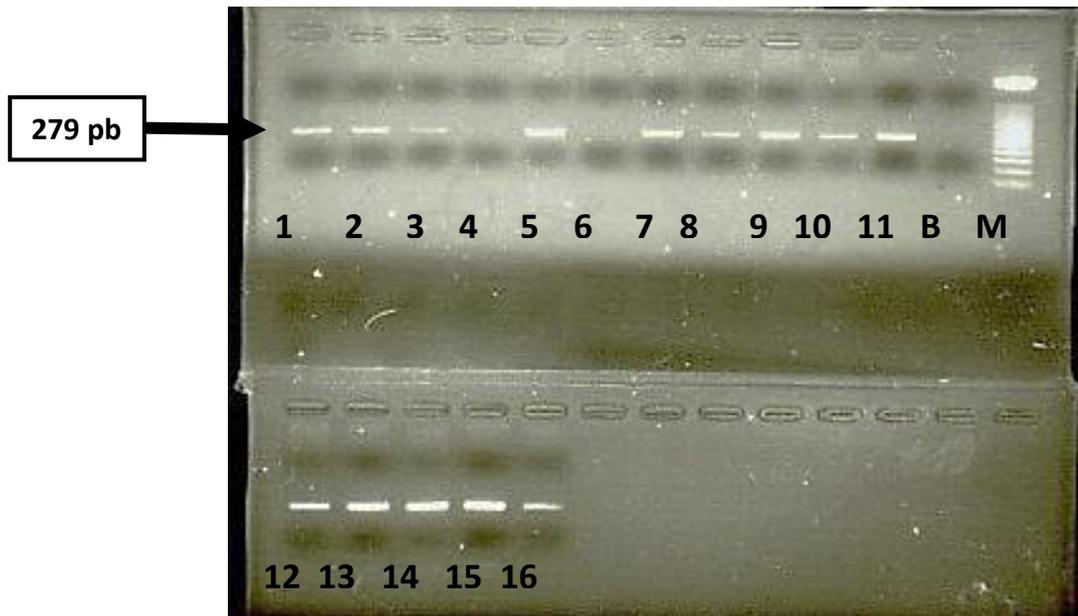
Etapes	Températures °C	Durée
Dénaturation initiale	94	6 min
Dénaturation	94	30 sec
Hybridation	58	30 sec
Elongation	72	30 sec
Elongation finale	72	5 min

2.3. Contrôle des produits PCR

Une électrophorèse est nécessaire pour le contrôle de l'amplification des fragments d'ADN par PCR et la détection d'une éventuelle contamination de l'ADN.

L'électrophorèse est assurée sur gel d'agarose à 2% dans une cuve horizontale, le gel a été préparé en mélangeant 2g d'agarose avec 100ml du TBE (Tris Borat EDTA) dans lequel a été additionné 10 μ l de BET (Bromure d'Ethidium); agent intercalant se fixant entre les bases nucléiques, rendant l'ADN fluorescent suite à une exposition au UV (Ultra-Violet) pour visualiser les bandes résultantes.

La migration dans un champ électrique d'une molécule d'ADN dépend de sa taille et de la concentration du gel d'agarose; le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 min. dans chaque puit du gel la quantité de 10 μ l du produit de PCR mélangée à 2 μ l de tampon de charge a été déposée.



Photographie 07 : Contrôle des produits PCR.

M : marqueur de taille ; **B :** Blanc (témoin négatif)

1-16 : les échantillons d'ADN .

2.4. La digestion des produits de PCR par l'endonucléase de restriction *Bsh1236I*

Les produit de PCR sont soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restrictions. Cette digestion enzymatique se fait par l'enzyme *Bsh1236I* extraite du *Bacillus spharius*. Elle reconnaît la séquence palindromique 5'...CG/CG...3' et clive la séquence comme suit :

Pour cela nous préparons une quantité d'un mix pour digestion selon le nombre des amplifias à être digérés. Ce mix contient un tampon, H₂O, l'enzyme de restriction *Bsh1236I* (tableau 04). Les tubes contenant les produits d'amplification et le mix de digestion est incubé pendant une nuit à 37C°.

Tableau 05: Mix de digestion.

Composant	Volume
Mélange réactionnel de PCR	10 µl
Nucléase sans eau	18 µl
Tampon 10X R	2 µl
<i>Bsh1236I</i>	2 µl

2.5. Electrophorèse des produits de digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme *Bsh1236I* sont séparés par électrophorèse, la petite taille de ces fragments, a nécessité la préparation d'un gel d'agarose plus résolutif à 3% (3g d'agarose dans 100ml de TBE à 1X). Dans chaque puits, +/- 20µl du produit digéré et 3µl de BBP sont déposés. La migration s'effectue sous un courant de 100volts pendant 30min. Les fragments résultants sont ensuite visualisés sous UV, Le gel est ensuite photographié.

2.6. Etude analytique statistique

Dans ce travail nous avons effectué une étude statistique vérifiant si une éventuelle association entre le polymorphisme du codon 72 de l'exon 4 du gène de la p53 et la survenue du leucémie. L'étude statistique est basée sur l'évaluation d'un odds ratio (OR) et des P valu.

Les calculs statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que tous les paramètres considérés ont été obtenu par le logiciel Epi info version 5.01

Pour le calcul de l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

Tableau 06: Tableau de contingence.

	Patients	Témoins	Total
Exposé	A	b	a + b
Non exposé	C	d	c + d
Total	a + c	b + d	a+ b+ c+ d

L'OR est calculé comme suit:

$$\text{OR} = a*b / c*d$$

Si :

OR = 1 : pas d'association entre l'exposition et la maladie.

OR < 1 : association négative.

OR > 1 : association positive.

Pour la valeur p , le seuil critique *à priori* est de 0,05 (vu que l'IC pour l'OR est de 95%). Si la valeur de p calculée *à posteriori* est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

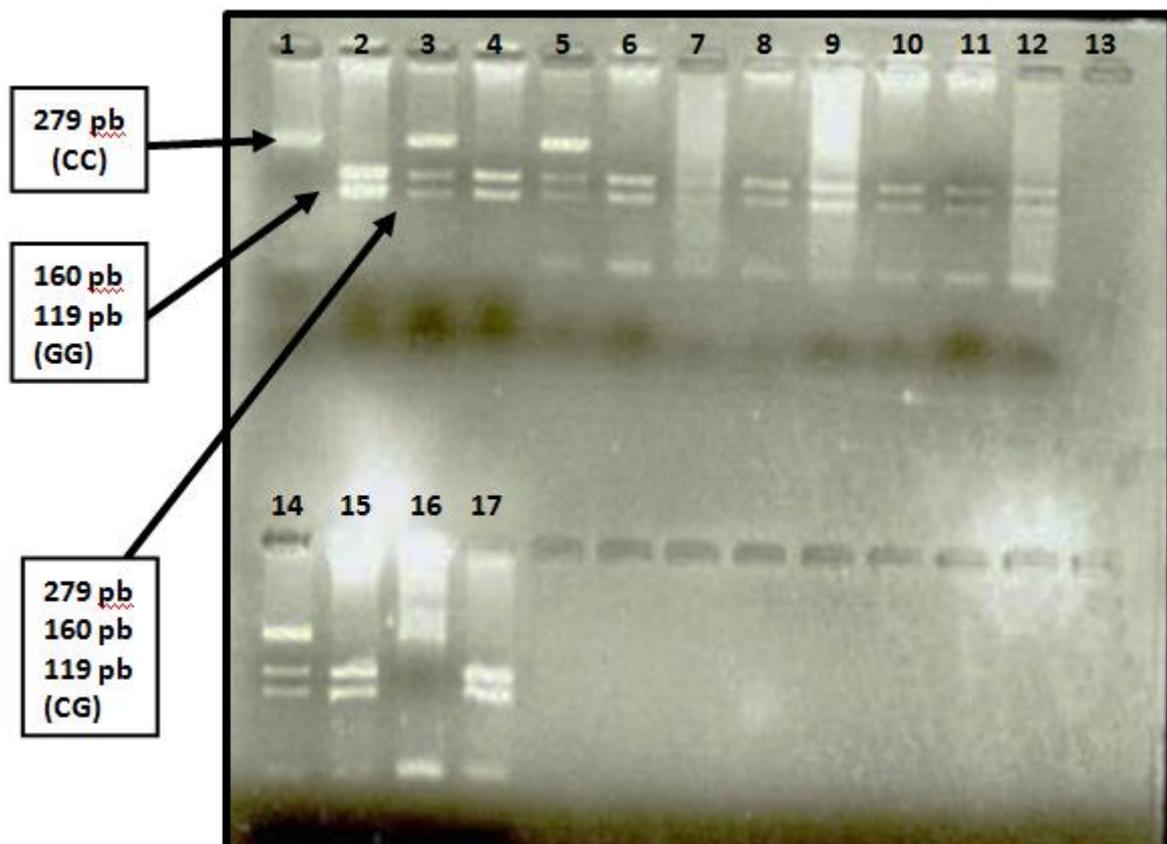
Résultats

1. Le profil RFLP obtenus

Le polymorphisme Arg72Pro correspond à une variation de Proline en Arginine au niveau du codon 72 localisé sur l'exon 4 du gène P53.

La digestion enzymatique de notre amplifiant par la *Bsh1236I* a donné 3 types de profils différentes :

- le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande de 279 pb qui correspond au type homozygote (CC)
- le deuxième génotype du type homozygote (GG) apparaît avec deux bandes de taille 160 pb et 119 pb.
- apparition de trois bandes 279 pb, 160 pb et 119 pb; corresponde au type hétérozygote (CG) (Photographie 2).



Photographie 08: profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments issus par le clivage du *Bsh1236I*.

1-17 : les échantillons.

2. Les résultats du génotypage

l'analyse moléculaire des échantillons d'acide nucléiques des témoins et des patients a permis de mettre en évidence le polymorphisme du codon 72 de l'exon 4 du gène de la p53, les fréquences alléliques des deux allèles C et G dans l'ensemble de nos échantillons ainsi que les fréquences génotypique, homozygotes C/C (Pro/Pro) , les hétérozygotes C/G (Pro/Arg) , et les homozygotes G/G (Arg/Arg) chez les deux populations témoin et malade.

2.1. Dans la population témoin

Les fréquences génotypiques et alléliques des témoins ont été calculées (Tableau 7).

Tableau07: Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins.

Génotype	Témoins n(%) N =35
CC	10 (28.57%)
CG	08 (22.85%)
GG	17 (48.57%)
Allèle C	28 (40%)
Allèle G	42 (60%)

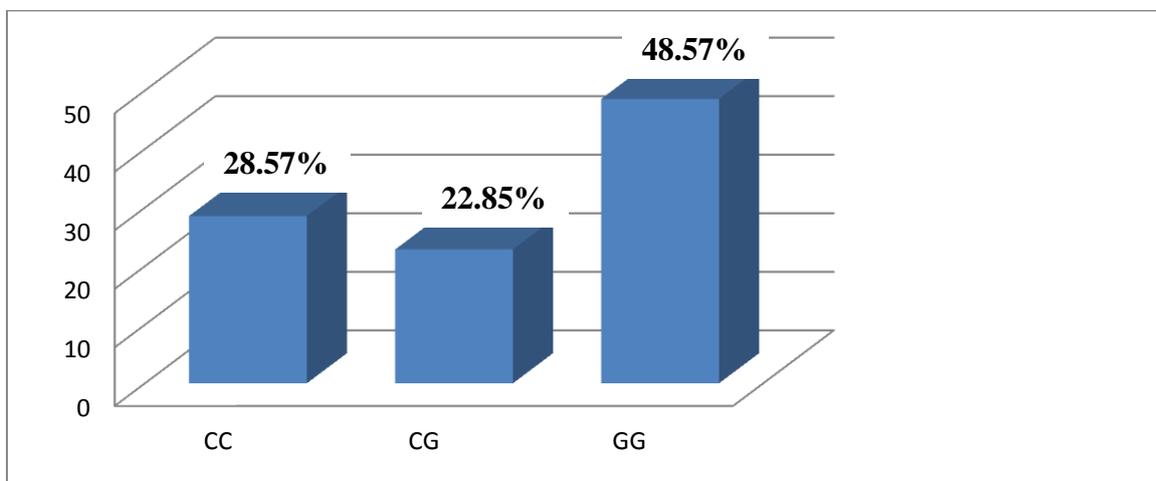


Figure 9 : Fréquences génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin.

Nous avons noté une prédominance de la fréquence du génotype muté GG avec un taux de 48,57 % chez les témoins, par contre, la fréquence du génotype homozygote sauvage CC représente un taux de 28,57 % qui est considérablement équiprobable à la fréquence des hétérozygotes CG avec un taux de 22,85 %.

Après le calcul des fréquences génotypiques, nous avons calculé les fréquences alléliques. Ceci à révéler une fréquence plus importante de l'allèle G par rapport à l'allèle C par un taux de 60 %.

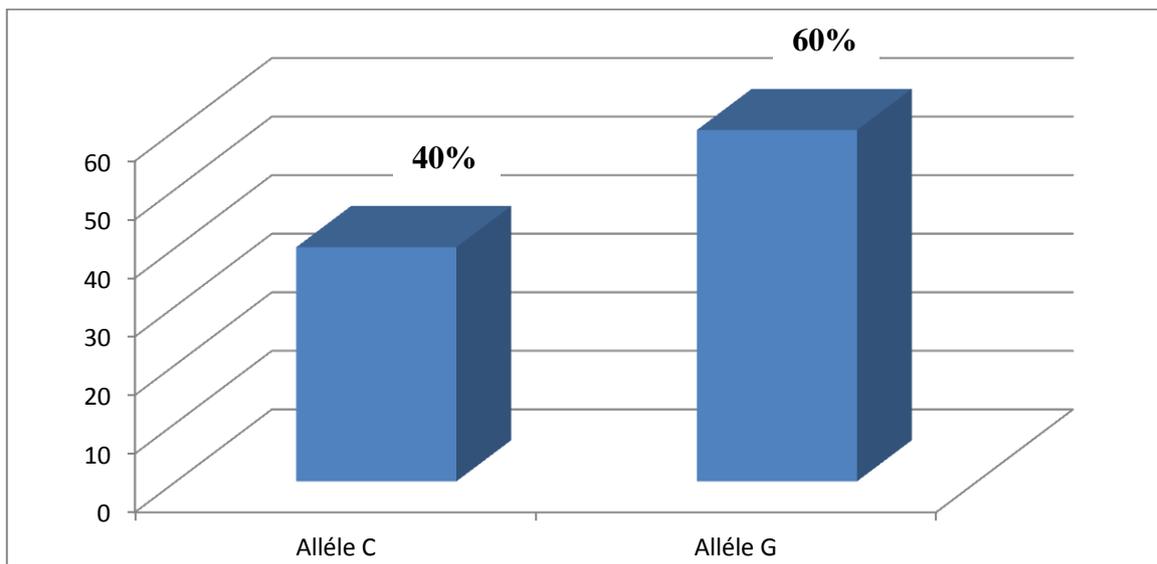


Figure 10: Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin.

2.2 Dans la population des patients

Les fréquences génotypiques et alléliques des patients ont été calculées (Tableau 8).

Tableau 08 : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.

Génotype	Malades n(%) N =10
CC	02 (20 %)
CG	05 (50 %)
GG	03 (30 %)
Allèle C	09 (45 %)
Allèle G	11 (55 %)

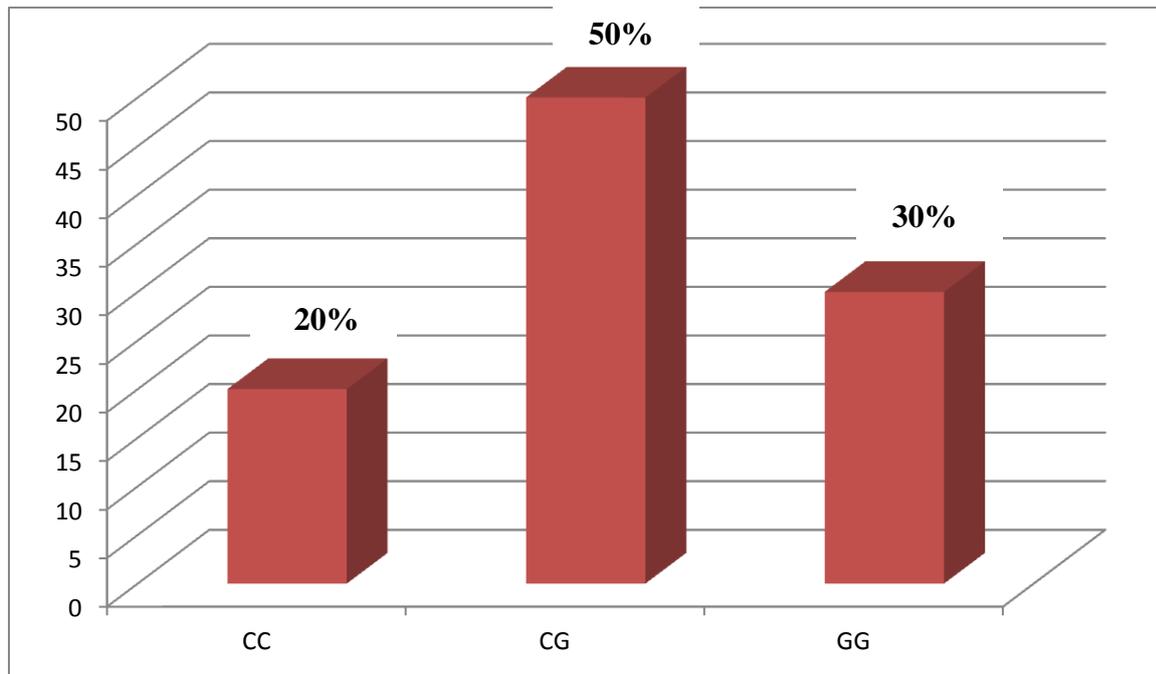


Figure 11 : Fréquences génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.

Dans la population des patients, les hétérozygotes CG représentent le pourcentage le plus élevé avec un taux de 50%, par contre, les homozygotes CC représentent un pourcentage faible (20%) par rapport aux homozygotes GG avec un taux de 30%.

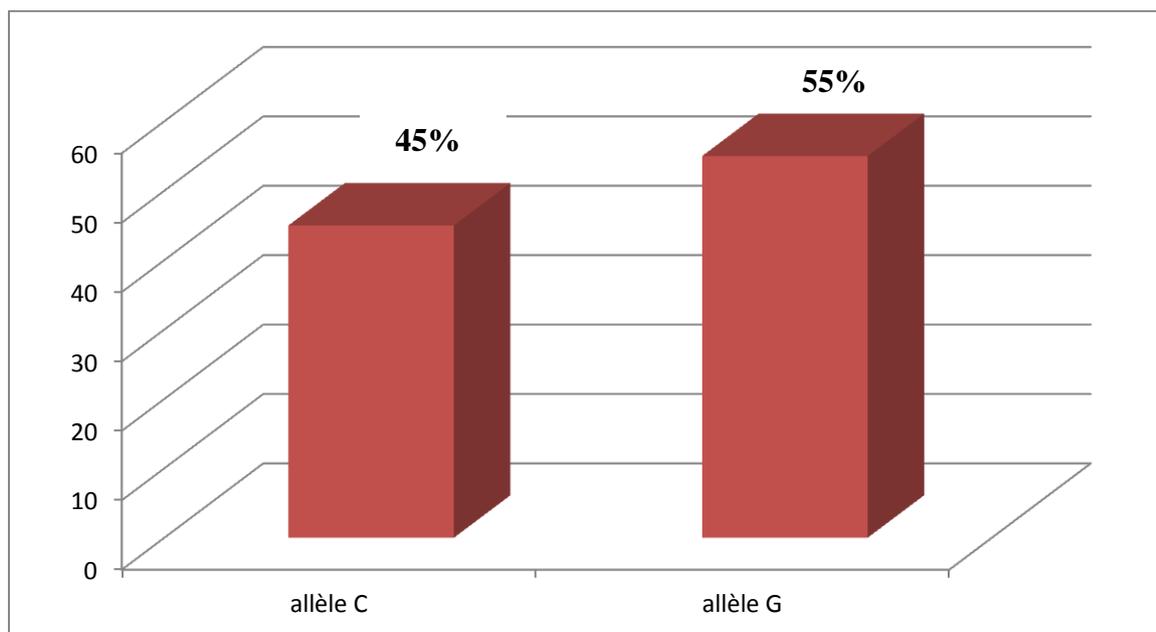


Figure 12: Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.

En calculant les fréquences alléliques, nous avons noté que les taux de ces derniers sont presque les mêmes (45% d'allèle C et 55% pour l'allèle G).

2.3 La comparaison entre les deux populations témoins et patients

La comparaison entre les fréquences génotypiques des témoins et des malades, montre qu'il y a une différence significative des taux des hétérozygotes CG (50% chez les malades et 22.85% chez les témoins). D'autre part, les fréquences des homozygotes CC chez les témoins et les malades sont équiprobables (28.57% et 20%), par contre, les fréquences génotypiques des homozygotes GG chez les deux populations représentent une légère différence (48.57% et 30%).

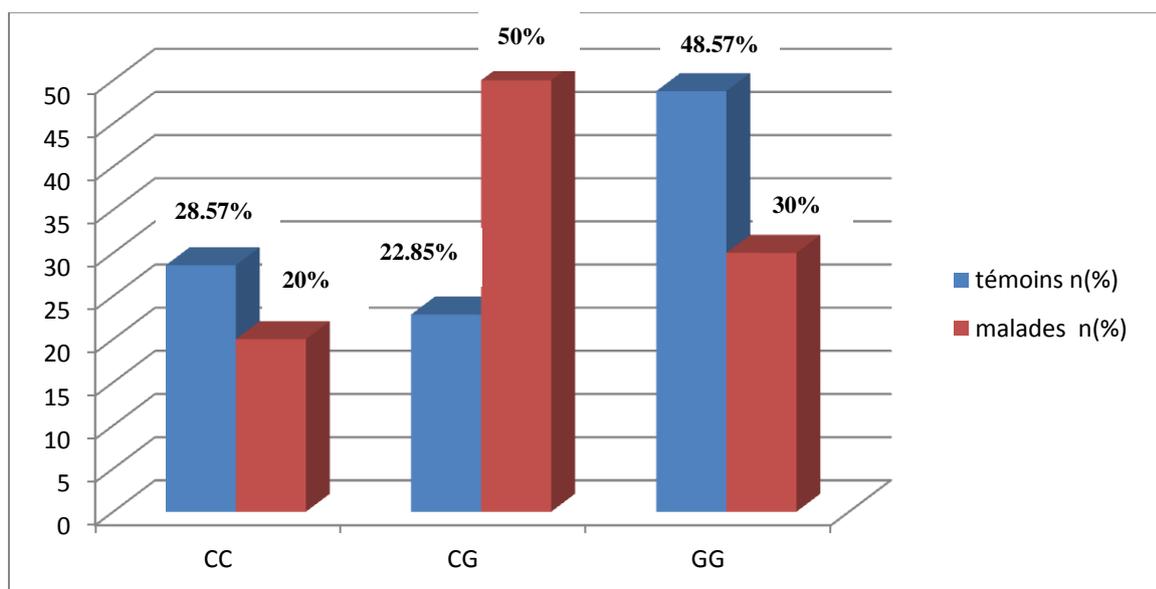


Figure 13: Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin et la population malade.

On comparant les fréquences alléliques, nous avons observé que la distribution des deux fréquences est relativement proche dans les deux populations. L'allèle C avec un pourcentage de 40% dans la population témoin et 45% chez les patients. Ainsi que la fréquence de l'allèle G dans la population témoins 60% et dans la population des patients 55%.

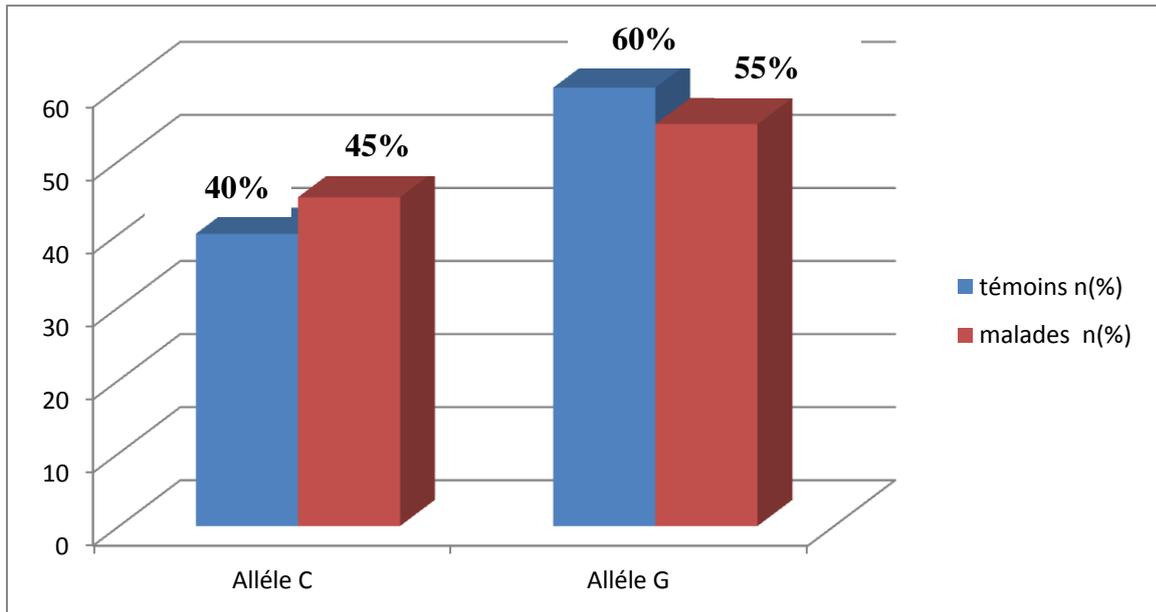


Figure14: Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin et la population malade.

Le tableau 9 représente les résultats statistiques obtenus de la comparaison des fréquences génotypiques et alléliques entre les deux populations, témoin et malade.

Tableau09 : Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin et la population malade.

	Témoins n(%) N =35	Malades n(%) N =10	OR	P value
CC	10 (28.57%)	02 (20%)	-----	-----
CG	08 (22.85%)	05 (50%)	3.13	0.22
GG	17 (48.57%)	03 (30%)	0.88	0.89
Allèle C	28 (40%)	09 (45%)	-----	-----
Allèle G	42 (60%)	11 (55%)	0.81	0.68

Le calcul des Odds ratio et des *P* value démontre que le polymorphisme Arg72Pro de la p53 ne représente pas un facteur de risque génétique à la survenue de la leucémie.

Discussion

Le gène p53 code pour un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans la régulation de cycle cellulaire, Ce gène dans les cellules normales est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Il empêche ainsi une prolifération excessive. Lorsqu'il est absent ou déficient par plusieurs polymorphismes, il peut être à l'origine de certains cancers, il agit selon le mode récessif. En effet l'inactivation des deux allèles est nécessaire pour produire la perte de fonction.

Parmi ces polymorphismes; le SNP Arg72Pro courant dans la P53 peut provoquer certaines tumeurs, comme le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer colorectal et les cancers du sang (les leucémies). Ces derniers ont fait l'objet de notre étude.

Dans notre étude, nous avons cherché à détecter la fréquence du polymorphisme Arg72Pro dans l'exon 4 de p53, et leur relation avec la survenue des leucémies, ce travail a été réalisé par une PCR-RFLP. Il est à noter que notre population des patients regroupe 10 échantillons d'ADN de patients atteints par différents types de leucémies.

Les résultats obtenus dans notre travail n'ont pas révélé une différence significative entre les deux groupes patients et témoins pour les différents génotypes hétérozygotes, ce qui nous a permis de conclure que le polymorphisme Arg 72 Pro ne constitue pas un facteur de risque dans la survenue des leucémies. Les travaux sur ce contexte ont montré des résultats contradictoires.

Une méta-analyse menée sur 924 patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques et 3832 témoins prouve que le polymorphisme du codon 72 peut ne pas être un facteur de risque. (Arg: OR=0.94; Pro/Pro vs. Arg/Arg: OR=0.93; Arg/Pro vs. Arg/Arg: OR=0.79, (Pro/Pro + Arg/Pro) vs. Arg/Arg: OR=0.84; Pro/Pro vs. (Arg/Arg + Arg/Pro): OR=1.06), Cette hypothèse est acceptée par Ley et al (2013) qui ont effectué leurs analyses en se basant sur des études menées auprès de populations asiatiques (huit études) et caucasiennes (cinq études). Ces méta-analyses ont été basées sur des estimations non ajustées (Xin Tian et al.,2016 et Ley T et al.,2013).

Une étude a démontré l'influence du polymorphisme Arg72Pro du gène de la P53 sur la capacité de réparation de l'ADN indiquant que le variant 72Pro active beaucoup plus les gènes cibles dépendants de la P53 impliqués dans la réparation de l'ADN et la réparation des dommages de l'ADN efficacement que les cellules exprimant le variant de 72Arg (Ellis et al., 2008).

Bilous et *al* (2014) ont mené une méta-analyse rapportant sur 261 échantillons, ils ont trouvés que le génotype 72Pro/Pro a été associé a une incidence accrue de mutations de P53 chez les patients précédemment traités (OR=2,503 ; P=0,001), cette étude a révélé que le polymorphisme du codon 72P53 pouvait être utilisé comme un facteur de risque de mutations de P53 dans les leucémies lymphoïdes chronique (Bilous N et *al.*,2014). Ce résultat est partagé avec une étude réalisée pour comprendre l'association du polymorphisme à 72 codon avec le développement des leucémies myéloïdes aiguës (Dunna et *al.*,2012).

Il convient de noter que la présente étude présente certaines limites. Une hétérogénéité significative, par exemple, est apparue parmi la plupart des types de leucémies. L'hétérogénéité inter-études peut être fréquente dans la méta-analyse d'études sur les associations génétiques, mais sa présence a aussi une certaine pertinence pour certains aspects, tels que différents critères de recrutement pour les sujets d'étude, diverses conditions environnementales, de multiples interactions entre gènes et facteurs environnementaux et diverses méthodes de génotypage. Une analyse plus précise pourrait être réalisée si des données individuelles étaient disponibles, une telle analyse nous aurait permis d'ajuster d'autres co-variables, tels que l'âge, les antécédents familiaux et les facteurs environnementaux. En fait, le polymorphisme Arg72pro du gène P53 pourrait influencer la susceptibilité à la leucémie avec d'autres facteurs, mais nous n'avons pas effectué de recherche relative (interaction gène-gène) et (gène-environnement).

Conclusion

Depuis la cellule souche jusqu'aux globules "mûrs", il se déroule une succession d'évènements biologiques dont l'ensemble est appelé hématopoïèse, ou genèse des globules sanguins. Une leucémie est l'accumulation et/ou la prolifération incontrôlée de cellules hématopoïétiques (c'est-à-dire d'une cellule à l'origine d'une lignée cellulaire) dans la moelle osseuse.

Ainsi, le développement du cancer est influencée par un certain nombre de facteurs, y compris le sexe, l'âge, les facteurs environnementaux, des conditions héréditaires, divers facteurs génétiques. Parmi ces derniers, le gène suppresseur de tumeur P53 qui représente un puissant candidat à moduler le risque de cancer est l'un des gènes les plus fréquemment muté dans tous les types de cancers (Dans 50 % des cancers humains). Dans ce travail nous avons cherché si le polymorphisme Arg72Pro du gène P53 à un effet potentiel sur la survenue des leucémies.

Nous n'avons pas trouvé une différence dans la distribution des fréquences génotypiques entre les deux populations, la population des témoins et celle des patients atteints des leucémies, les résultats de notre étude ont montré que le polymorphisme Arg72Pro du gène P53 ne peut pas être considéré comme un facteur de risque probable de la survenue des leucémies.

Ces résultats ne peuvent pas être confirmatifs, l'effectif de notre population est faible donc il est essentiel d'élargir l'échantillon des patients et des témoins. Eu égard à ces nouvelles possibilités ouvertes par la génétique et la biologie moléculaire, il sera utile de prendre en considération d'autres paramètres cliniques et génétiques.

Références
bibliographiques

- AERTS, J., WETZELS, Y., COHEN, N., ET AERSSSENS, J.** (2002). *Data mining of public SNP databases for the selection of intragenic SNPs. Hum. Mutat. 20: 162–173.*
- AYLON Y, ET OREN M.**(2007). *Living with p53, dying of p53. Cell 130: 597–600.*
- BERGERAT J P, DUFOUR P, OBERLING F.** (1996). *Onco-hématologie. Heures de France. Pagination multiples.*
- BERNSTEIN L, NEWTON PK, ROSJ R.** (1990). *Epidemiology of hairy cell leukemia in Los Angeles Country. Cancer Res.50: 3605-3609.*
- BERNSTEIN L, NEWTON P.K, ROSJ R.** (1990). *Epidemiology of hairy cell leukemia in Los Angeles Country. Cancer Res.50: 3605-3609.*
- BERNSTEIN L, NEWTON PK, ROSJ R.** (1990) *Epidemiology of hairy cell leukemia in Los Angeles Country. Cancer Res.50: 3605-3609.*
- BILOUS N.I, ABRAMENKO I.V, CHUMAK A. A, DYAGIL I. S, MARTINA Z.V.** (2014). *TP53 codon 72 single nucleotide polymorphism in chronic lymphocytic leukemia. Experimental oncology. 18: 709-730.*
- BINET J.L, AUQUIER A, DIGHIRO G, CHASTANG C, PIGUET H, GOASGUEN J, ET AL.** (1981). *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer.48:198–206.*
- BOSSUYT X, BOEYNAEMS J.M.** (2001). *Repres en diagnostic de laboratoire. Garant.Pagination multiple.*
- BOURONCLE B.A, WISEMAN B.K, DOAN C.A.** (1958). *Leukemic reticuloendotheliosis. Blood 13: 609-630.*
- BROOKES A.J.** (1999). *The essence of SNPs. Gene 234: 177–186.*
- BUCCHERI V, MATUTES E, DYER MJ, CATOVSKI D.** (1993) . *Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia, Leuk. 6: 919-927.*
- BUCCHERI V, MATUTES E, DYER M.J, CATOVSKI D.** (1993), *Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia, Leuk. 6: 919-927.*

- CASADO L.F, MOULEON P, VILLARRUBIA B, TOLEDO M.C, MARTINEZFREJO M.C.** (1998). *Familial hairy cell leukemia: a HLA-linked disease or farmers-linked disease? Haematologica.*83: 751-752.
- CLAVEL J, MANDEREAU L, CORDIER S, LE GOASTER C, HÉMON D, CONSO F ET AL.** (1995). *Hairy cell leukaemia, occupation, and smoking. Br J Haematol.* 91: 154-161.
- DAI C, ET GU W.** (2010). *p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. Trends Mol. Med.* 16: 528–536.
- DEBRU C, TRAIADOU P.** (1996). Les leucémies aiguës: une vue historique des - classifications. *Hématologie* 12: 491-495.
- DELEO A.B, JAY G, APPELLA E, DUBOIS GC, LAW L.W, ET OLD L.J.** (1979). *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 2420–24.
- DREXLER H.G, THIEL E, LUDWIG W.D.** (1993). *Acute myeloid leukemias expressing lymphoid-associated antigens : diagnostic incidence and prognostic significance, Leuk. Apr,* 7(4): 489-98.
- DUNNA N.R, VURE S, SAILAJA K, SUREKHA D, RAGHUNADHARAO D, RAJAPPA S, VISHNUPRIYA S.** (2012). *TP53 codon 72 polymorphism and risk of acute leukemia. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 13(1), 347-50.
- ELLIS N. A, HUO D, YILDIZ O, WORRILLOW L. J, BANERJEE M, LE BEAU M.M, LARSON R.A, ALLAN J.M, ONEL K.** (2019). *MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. Blood,* 112(3), 741-49.
- FARNAULT L, BOUDJARANE J, BACCINI V, COSTELLO R.** (2015) Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. *EMCHématologie.*10(1) :1-14.
- FLANDRIN G.** (2001). La nouvelle classification OMS des hémopathies malignes Hémopathies myéloïdes. *Hématologie,* 7(2): 136-41.

- FREDDIE B, JIAN-SONG R, ERIC M, JACQUES F.**(2013).*Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. International Journal of Cancer, 132(5) :1133–45.*
- FRIDMAN J.S, ET LOWE S.W.** (2003). *Control of apoptosis by p53. Oncogene 22: 9030– 40.*
- GONON-DEMOULIAN R, GOLDMAN J, NICOLINI F.** (2014). Historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer. *Bull Cancer. 101: 56-67.*
- HEHLMANN R, HOCCHAUS A, BACCARANI M.** (2007). *on behalf of the European LeukemiaNet. Lancet.370:342–50.*
- HENRY J P, ET GOUYON P H.**(2008). Précis de génétique des populations - Cours, exercices et problèmes résolus (Dunod).
- HOLLSTEIN M, MARION MJ, LEHMAN T, WELSH J, HARRIS CC, MARTEL-PLANCHE G, KUSTERS I, ET MONTESANO R.** (1994). *p53 mutations at A:T base pairs in angiosarcomas of vinyl chloride-exposed factory workers. Carcinogenesis.15:1–3.*
- HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, ET HARRIS C.C.** (1991). *p53 mutations in human cancers. Science.253, 49–53.*
- HUGUET F, RECHER C.** (2012) Leucémies aiguës de l'adulte. EMC- Traité de Médecine Akos.7(3): 1-9.
- JAFFE E.S, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN J.W.** (2001). *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press.*
- LACAVE R, LARSEN CJ, ROBERT J.** (2005). *cancérologie fondamentale. John Libbey Eurotext. Pagination multiple.*
- LANE DP, ET CRAWFORD L.V.** (1979). *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature. 278: 261–263.*

- LANZ S.** (2011). Un guide de la ligue contre le cancer pour les personnes concernées et leurs proches. Ligue suisse contre le cancer, Berne Les leucémies de l'adulte. Paginations multiples.
- LAPTENKO O. ET PRIVES C.**(2006).*Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. Cell Death Differ. 13: 951–961.*
- LEGUAY T, MAHON F.X.** (2005). Leucémie myéloïde chronique. EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-011-B-10.
- LEY TJ, MILLER C, DING L.** (2013).*Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N Engl J Med.368(22):2059-2074.*
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY S.L, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, ET DARNELL J.**(2000). *Tumor Cells and the Onset of Cancer.*
- MAHON F.X.** (2001). Leucémie myéloïde chronique et inhibiteurs de tyrosine kinase. La Revue de médecine interne, 22(9) : 894-899.
- MAYNADIE M, TROUSSARD X.** (2013). Épidémiologie des leucémies aiguës. *Revue Francophone des Laboratoires, 2015(471), 29-33.*
- MERLE-BÉRAL H., LE GARFF-TAVERNIER M.** (2008). Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hématologie, 13-000-L-10.
- MIYASHITA T, HARIGAI M, HANADA M, ET REED J.C.**(1994). *Identification of a p53- dependent negative response element in the bcl-2 gene. Cancer Res. 54: 3131–3135.*
- PASSWEG J.R, CHALANDON Y, MATTHES T, BERIS P.** (2008). Les leucémies aiguës. *Revue Médicale Suisse, 4: 1272-8.*
- PATENAUDE R.**(1997).*Survivre à la leucémie une histoire vécu et un guide sur les maladies du sang (Québec/Amérique inc).* pagination multiples.
- PUI C H, RAIMONDI S C, HEAD D.R, SCHELL M.J, RIVERA G.K, MIRRO J, CRIST W.M, BEHM E.G.** (1991). *Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse, Blood. 78: 9-498.*

- PUI C-H, RELING M.V, DOWNING J.R.** (2004). *Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med* .350 :1535- 48.
- REA D, CAYUELA J.M.** (2014). Leucémie myéloïde chronique. EMC - Hématologie.9(4): 1-12.
- READ A, DONNAI D.** (2008). Génétique médicale: de la biologie à la pratique clinique. De Boeck Supérieur. Pagination multiple.
- RIVLIN, N., BROSH, R., OREN, M., ET ROTTER, V.**(2011). *Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. Genes Cancer* 2: 466–474.
- ROHRBACHER M, HASFORD J.** (2009). *Epidemiology of chronic myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol*.22: 295–302.
- RUAN XL, LI S, GENG P, ZENG XT.** (2015). *Association between TP53 gene codon 72 polymorphism and acute myeloid leukemia susceptibility: evidence based on a meta-analysis. Med. Sci. Monit.* 21: 3048-53.
- SANT M, ALLEMANI C, TEREANU C, DE ANGELIS R, CAPOCACCIA R, VISSER O, ET AL.** (2010). *Incidence of hematologic malignancies in Europe by Morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood*.116: 3724–34.
- SHANGARY S, ET WANG S.**(2008). *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14: 5318–5324.
- SHANGARY S, QIN D, MCEACHERN D, LIU M, MILLER R.S, QIU S, NIKOLOVSKACOLESKA Z, DING K, WANG G, CHEN J, ET AL.** (2008). *Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 3933–3938.
- SIDDIQUE M, SABAPATHY K.** (2006). *Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. Oncogene* 25: 3489.
- SOUSSI T.**(2010). *The history of p53. EMBO Rep.* 11, 822–826.
- SOUSSI T, WIMAN K.G.** (2007). *Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. Cancer Cell* 12, 303–312.

- SUBRAMANIAN D, ET GRIFFITH J.D.**(2005). *Modulation of p53 Binding to Holliday Junctions and 3-Cytosine Bulges by Phosphorylation Events. Biochemistry (Mosc.) 44: 2536–44.*
- TEYSSIER F, BAY J.O, DIONET C, ET VERRELLE P.** (1999). *Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. Bull. Cancer (Paris) 86: 345–357.*
- TIAN X, DAI S, SUN J, JIANG S, JIANG Y.** (2016). *Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and leukemia risk: a meta-analysis of 14 case-control studies. Scientific reports, 6, 24097.*
- TOLEDO F, ET WAHL G.M.**(2006).*Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat. Rev. Cancer 6: 909–923.*
- TRAVADE P, TOURNILHAC O ET DIGHIERO G.** (2000). *Leucémie lymphoïde chronique. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Hématologie, 13-013-B-20: 12.*
- VIRCHIS A.E, MEHTA A.B.** (1997). *Familial occurrence of hairy cell leukemia in a father and daughter: a case report. Blood. 90 (suppl 1) . 303B: 98.*
- WRIGHT A, HAWKINS C.H., ANGGÅRD E.E, ET HARPER D.R.** (2009). *A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibioticresistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy. Clin. Otolaryngol. Off. J. ENT-UK Off. J. Neth. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. Cervico-Facial Surg. 34:349–357.*

Annexe

La séquence de l' EXON 4 du gène de la P53 et la localisation de polymorphisme Arg72Pro :

Gtgggaagcgaaaattccatgggactgactttctgctcttgcctttcagacttctgaaaacaacgttctggtaagg
acaaggggtgggctggggacctggagggctggggacctggagggctggggggctggggggctgaggacct
ggtcctctgactgctcttttcaccactacag**TCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGA**
TGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTG
AAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGC
TCCCCCGGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCC
CCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTC
CCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTC
TTGCATTCTGGGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGgtcagttgccctga
gggctggcttccatgagacttcaatgcctggccgtatccccctgcattcttttgtttggaactttgggattcctcttc
accctttggcttctctgcagtgttt

Résumé

La p53 est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le développement de plusieurs types de cancer. il a été rapporté qu'une variation d'une base au niveau du codon 72 de ce gène à l'origine d'une substitution d'une proline (Pro) en arginine (Arg), pourrait accroître le risque de la carcinogénèse.

Notre objectif est d'étudier chez des patients, une étude génétique en recherchant par RFLP/PCR d'éventuelle association entre le polymorphisme Arg72pro de la p53 et les leucémies.

Les résultats obtenus dans notre étude n'ont pas révélé une différence significative entre les deux groupes patients et témoins, ce qui permet de conclure que polymorphisme Arg72Pro de la p53 ne constitue pas un facteur de risque dans la survenue de leucémies.

Cependant, la taille de l'échantillon ne permet pas d'infirmer ou de confirmer avec certitude la présence ou l'absence de cette association.

Mots-clefs : leucémie, p53, Arg72pro, PCR/RFLP.

ملخص

P53 هو مورثة مثبتة للورم مشاركة في تطور عدة أنواع من السرطان. إن التباين الحقيقي لقاعدة في الكودون 72 من هذا الجين والذي يسبب إحلال البرولين للأرجينين يمكن أن يزيد من خطر حدوث التسرطن

هدفنا من هذه الدراسة ، القيام بدراسة وراثية من خلال البحث عن طريق PCR / RFLP إمكانية الارتباط بين تعدد الأشكال Arg72pro من p53 وسرطان الدم.

النتائج التي تم الحصول عليها في دراستنا لم تكشف عن وجود فرق كبير بين المجموعتين المدروسة ، مما يجعل من الممكن استنتاج أن تعدد الأشكال Arg72Pro من p53 ليس عامل خطر في حدوث سرطان الدم. ومع ذلك ، لا يسمح حجم العينة بتأكيد وجود أو عدم وجود هذا الارتباط .

الكلمات المفتاحية: سرطان الدم ، p53 ، Arg72pro ، PCR / RFLP.

Abstract

P53 is a tumor suppressor gene involved in the development of several types of cancer, It has been reported that a base variation at codon 72 of this gene causing substitution of a protein (Pro) for Arginine (Arg) may increase the risk of carcinogenesis.

Our objective is to study in patients, a genetic study by researching by RFLP / PCR possible association between Arg72 polymorphism of p53 and leukemias.

The results obtained in our study did not reveal a significant difference between the two patient and control groups, which makes it possible to conclude that Arg72Pro polymorphism of p53 is not a risk factor in the occurrence of leukemias. However, the size of the sample does not allow confirming with certainty the presence or absence of this association.

Key words: leukemia, p53, Arg72pro, PCR/RFLP.

Année universitaire : 2018 - 2019	Présenté par :CHIED Hanene MOKHNACHE Kaouther
<p align="center"><i>Etude de l'association entre le polymorphisme Arg72pro du gène de la p53 et les leucémies</i></p>	
<p align="center">Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique</p>	
<p>Résumé :</p> <p>La p53 est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le développement de plusieurs types de cancer. il a été rapporté qu'une variation d'une base au niveau du codon 72 de ce gène à l'origine d'une substitution d'une proline (Pro) en arginine (Arg), pourrait accroître le risque de la carcinogénèse.</p> <p>Notre objectif est d'étudier chez des patients, une étude génétique en recherchant par RFLP/PCR d'éventuelle association entre le polymorphisme Arg72pro de la p53 et les leucémies.</p> <p>Les résultats obtenus dans notre étude n'ont pas révélé une différence significative entre les deux groupes patients et témoins, ce qui permet de conclure que polymorphisme Arg72Pro de la p53 ne constitue pas un facteur de risque dans la survenue de leucémies.</p> <p>Cependant, la taille de l'échantillon ne permet pas d'infirmer ou de confirmer avec certitude la présence ou l'absence de cette association.</p>	
<p>Mots-clefs : leucémie, p53, Arg72pro, PCR/RFLP.</p>	
<p>Laboratoires de recherche : Laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire (UC3), Laboratoire de biologie moléculaire de la faculté des sciences et de la nature et de la vie (UFMC1)</p>	
<p>Président : Dr GHARZOULI Razika (MCA - UFM, Constantine 1).</p> <p>Encadreur : Dr SEDRATI Khadidja (MCB - UFM, Constantine 1).</p> <p>Examineur : Mme BOU-ELDOUKHANE Ibtissem Mouna (MAA- UFM, Constantine 1).</p>	

