

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

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



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

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

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *Génétique*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Application de la cytogénétique dans la Leucémie Myéloïde
Chronique à la phase blastique.**

Présenté par : Allouche Ouahem Malek.

Le 20/06/2023

Ferkous Sara Nesrine .

Geurbaa Roumaïssa.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. Benhizia.H. (MCA - UFMC 1).

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

Examineur : Dr. Bechkri.S (MCA -UFMC 1).

**Année universitaire
2022– 2023**

Remerciements

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

ON REMERCIE DIEU LE TOUT PUISSANT DE NOUS AVOIR DONNE LA SANTE ET LA VOLONTE D'ENTAMER ET DE DETERMINER CE MEMOIRE

TOUT D'ABORD ; CE TRAVAIL NE SERAIT PAS AUSSI RICHE ET N'AURAIT PAS PU AVOIR LE JOUR SANS L'AIDE DE L'ENCADREMENT DE MR LATRECHE FETHI. ON TIENT A VOUS REMERCIER DE TOUT CŒUR POUR VOTRE QUALITE D'ENCADREMENTS EXCEPTIONNELS, VOTRE SOUTIEN ET VOTRE PATIENCE TOUT AU LONG DE LA REDACTION DE NOTRE MEMOIRE. VOTRE CONNAISSANCE APPROFONDIE DU SUJET, VOTRE EXPERTISE, VOTRE DISPONIBILITE ET VOTRE BIENVEILLANCE NOUS AIDE A AVANCER ET A PROGRESSER DANS MA REFLEXION.

NOUS REMERCIONS EGALEMENT LES MEMBRES DES JURYS DR. BENHIZIA.H ET DR. BECHKRI.S POUR VOTRE TRAVAIL ET VOTRE ENGAGEMENT LORS DE L'EVALUATION DE NOTRE MEMOIRE. MERCI POUR VOTRE TEMPS ET POUR LES EFFORTS QUE VOUS AVEZ DEPLOYES ; POUR L'ATTENTION QUE VOUS AVEZ PORTEE A NOTRE TRAVAIL NOUS SOMMES HONOREES QUE VOUS AYEZ PRIS LE TEMPS DE LIRE ET D'EVALUER NOTRE TRAVAIL.

NOUS REMERCIONS AUSSI LES PROFESSEURS POUR LA QUALITE DE L'ENSEIGNEMENT QU'ILS NOUS PRODIGUE AU COURS DE CES TROIS ANNEES PASSEES A UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI. AUSSI, NOUS TENONS A EXPRIMER NOTRE PROFONDE RECONNAISSANCE ENVERS L'UNIVERSITE ET TOUTES LES RESSOURCES QU'ELLE OFFRE. NOUS SOMMES RECONNAISSANTS DE CETTE OPPORTUNITE DE DEVELOPPEMENT PROFESSIONNEL ET PERSONNE.

NOUS VOULONS EGALEMENT REMERCIER NOS AMIS ET NOS FAMILLES QUI NOUS ONT SOUTENUS ET ENCOURAGES TOUT AU LONG DE NOTRE PARCOURS UNIVERSITAIRE. LEUR SOUTIEN INCONDITIONNEL NOUS A PERMIS DE SURMONTER LES OBSTACLES ET DE REALISER NOS OBJECTIFS.ET SANS OUBLIE TOUS LES PARTICIPANTS DE NOTRE ETUDE.

NOUS VOUS REMERCIONS ENCORE DE TOUT CŒUR POUR VOTRE TEMPS ET VOTRE CONTRIBUTION A NOTRE TRAVAIL.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

*À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre ... A cette source de tendresse, de patience et de générosité ... Ma mère **BOULAHIA SAMIRA** . Je tenais à vous exprimer ma profonde gratitude pour tout ce que tu m'avais fait pour moi. Tu es la personne extraordinaire qui a su m'accompagner tout au long de ma vie et me soutenir dans tous mes projets. Votre amour et votre soutien inconditionnels ont été pour moi un véritable pilier.*

*A mon très cher père **MAHMOUD ALLOUCHE OUAHEM**. Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.*

ALLOUCHE OUAHEM MALEK

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

À ceux qui me sont les plus chers :

Mon père : AMMAR GUERBAA

Il est clair pour moi que ton âme habite toujours mon cœur et que c'est dans mes veines de se manifester dans ma vie.

Ma mère : DJOHRA

Je ne trouverai de mots assez forts pour vous exprimer mon affection et mon estime pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis ma naissance.

Ces dédicaces ne seraient pas complètes sans une pensée pour mon frère, ma grande famille, mes amis et pour les personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

ROUMAISSA GUERBAA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes grands-parents « Que dieu ait pitié d'eux tous » et Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A ma mère BOULMIDAI FATIHA qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

À mon très cher père FERKOUS BOUJEMAA tuas toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

Que ce travail traduit ma gratitude.

À mon unique chère frère MAHYOU, sa femme HOUDA et ses deux fils MOUATEZ et ADEM ; Mes sœurs et leur maris DJIHED ET SAID , SELMA ET SAMIR , WISSEM ET ADLAN et leurs enfants TAIM, DJAD-Allah et YAZEN encore madouce petite sœur RAWNEk. Vous êtes ma joie, ma force, mon énergie positive... Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour votre soutien, votre compréhension et vos encouragements. Je souhaite que vous trouviez dans ce travail, le témoignage de l'attachement, de l'amour et des sentiments Les plus sincères et les plus affectueux que je porte pour Vous. Que dieu vous protège et vous réserve un bon avenir.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

Mes chères tantes Malika, Farida, Ghania, Fadila et leurs maris.

Mes chères cousines Amani, Nour, Amira, Djouhaina, Yousra, Salsabil, Nanou, Manel et LINA, Que dieu vous protège et vous réserve un bon avenir.

A tous mes collègues ROUMAÏSSA et MALEK qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

FERKOUS SARA NESRINE.

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) apparaît lorsqu'une cellule-souche pluripotente subit une transformation maligne et clonale, entraînant une surproduction de granulocytes matures et immatures.

Elle est caractérisée par la translocation t(9;22)(q34;q11.2) qui résulte en la formation du chromosome de Philadelphie et du réarrangement BCR-ABL. Le réarrangement BCR-ABL se détecte de préférence par biologie moléculaire. Initialement asymptomatique, la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC) est insidieuse, avec des manifestations non spécifiques "bénignes" (sensation de malaise, anorexie, perte de poids) aboutissant finalement à une phase d'accélération ou phase blastique avec des signes plus inquiétants tels qu'une splénomégalie, une pâleur, des ecchymoses, des hémorragies, une fièvre, des adénopathies, des lésions cutanées. Les frottis sanguins et médullaires, ainsi que la mise en évidence du chromosome Philadelphie confirment le diagnostic. Le traitement repose sur les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK), tels que l'imatinib, le dasatinib, le nilotinib et le bosutinib, qui améliorent considérablement la réponse et prolongent la survie. Les agents myélosuppresseurs, la transplantation de cellules-souches et l'interféron alpha peuvent aussi parfois être utiles.

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes anomalies chromosomiques de la leucémie myéloïde chronique en la phase chronique et la phase blastique (accutisation). Nous avons présenté l'apport de la cytogénétique et la cytogénétique moléculaire de la LMC, nous basant sur des résultats et des études différentes dans l'objectif est de comprendre les différents techniques de cytogénétique et cytogénétiquemoléculaire utiliser dans le diagnostic et le suivie de la LMC dans les différents stades de la maladie, chronique, accélération et surtout la phase blastique (accutisation).

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) occurs when a pluripotent stem cell undergoes malignant and clonal transformation, resulting in overproduction of mature and immature granulocytes.

It is characterized by the t(9;22)(q34;q11.2) translocation which results in the formation of the Philadelphia chromosome and the BCR-ABL rearrangement. The BCR-ABL rearrangement is preferably detected by molecular biology. Initially asymptomatic, the progression of chronic myeloid leukemia (CML) is insidious, with "mild" non-specific manifestations (feeling sick, anorexia, weight loss) eventually leading to an acceleration phase or blast phase with more signs worrying such as splenomegaly, pallor, bruising, haemorrhage, fever, lymphadenopathy, skin lesions. Blood and bone marrow smears, as well as the demonstration of the Philadelphia chromosome confirm the diagnosis. Treatment is with tyrosine kinase (TKI) inhibitors, such as imatinib, dasatinib, nilotinib, and bosutinib, which significantly improve response and prolong survival. Myelosuppressive agents (eg, hydroxyurea), stem cell transplantation, and interferon alpha may also sometimes be helpful.

ملخص.

يحدث سرطان الدم النخاعي المزمن (CML) عندما تخضع الخلايا الجذعية متعددة القدرات لتحول خبيث ونسيلي ، مما يؤدي إلى زيادة إنتاج الخلايا الحبيبية الناضجة وغير الناضجة.

يتميز بـ t(9;22)(q34;q11.2) مما يؤدي إلى تكوين كروموسوم فيلادلفيا وإعادة ترتيب BCR-ABL. يفضل اكتشاف إعادة ترتيب BCR-ABL بواسطة البيولوجيا الجزيئية. في البداية بدون أعراض ، يكون تطور ابيضاض الدم النخاعي المزمن (CML) خادعاً ، مع ظهور مظاهر غير محددة "خفيفة" (الشعور بالغثيان ، فقدان الشهية ، فقدان الوزن) تؤدي في النهاية إلى مرحلة التسارع أو مرحلة الانفجار مع المزيد من العلامات المقلقة مثل تضخم الطحال والشحوب ، كدمات ، نزيف ، حمى ، اعتلال عقد لمفية ، آفات جلدية. تؤكد مسحات الدم ونخاع العظام ، بالإضافة إلى مظاهر كروموسوم فيلادلفيا التشخيص. يتم العلاج باستخدام مثبطات التيروسينكيناز (TKI) ، مثل imatinib و dasatinib و bosutinib و nilotinib ، مما يحسن الاستجابة بشكل كبير ويطيل البقاء على قيد الحياة. قد تكون العوامل المثبطة للنخاع العظمي (على سبيل المثال ، هيدروكسي يوريا) ، وزرع الخلايا الجذعية ، وإنترفيرون ألفا مفيدة في بعض الأحيان.

SOMMAIRE :

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction : 1

Partie théorique

Chapitre 1 : Généralités sur LMC 3

1. Le sang: 3

2. La moelle osseuse : 4

3. La lignée myéloïde : 5

4. la leucémie un cancer : 6

5. la leucémie myéloïde chronique (LMC) : 7

6. Epidémiologie : 8

7. Historique : 10

8. Etiologie : 11

9. Aspect clinique des LMC : 11

10- Diagnostique biologique : 13

10.1. L'hémogramme : 13

10.2. Le myélogramme : 14

10.3. Cytogénétique : 14

10.4. Cytogénétique moléculaire : 15

10.5. Biologie moléculaire : 17

CHAPITRE 2 : LMC et biologie moléculaire 20

1. Chromosome PHILADELPHIA : 20

2. Le gène ABL et sa protéine : 20

3. La gène BCR et sa protéine : 21

4. Gène fusion BCR_ABL et la protéine de fusion : 22

5. Autre gènes impliqués dans la LMC : 23

5.1 Implication d 'AML1/EVI1 : 23

5.2. Implication de gène AXL : 23

5.3. Implication de RB : 25

CHAPITRE 3 : LMC ET TRAITEMENT 26

1. Historique du traitement : 26

2. Score pronostic : 27

2.1. Le score de sokal : 28

2.2. Score de Sokal modifié : 28

2.3. Score de Hasford : 29

2.4. Score ELTS : 29

3. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase : 30

3.1. Imatinib (Gleevec®) :.....	31
3.2. Dasatinib (Sprycel®) :.....	31
3.3. Nilotinib (Tasigna®) :.....	31
3.4. Bosutinib (bosulif®) :.....	32
3.5. Ponatinib(Iclusig®) :.....	32
4. Réponses au traitement :.....	32
4.1. La réponse hématologique :.....	33
4.2. Réponse cytogénétique :.....	33
4.3. Réponses moléculaires :.....	34
Partie pratique	
1. Méthodologie	37
2. Matériel et méthode.....	38
Etude 1: Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (Sawcène Hazourli, 2012).	38
1. Échantillons de lignées et de cellules étudiés dans ce projet :.....	38
2. Caryotype en bandes G obtenu suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa :	42
3. Caryotype spectral :.....	43
4. Hybridation in situ en fluorescence :.....	45
Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs (CohortStudy)(Turk J Hematol ,2022).....	48
3. RÉSULTATS :.....	49
Etude 1 : Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (Sawcène Hazourli, 2012).	49
1. La translocation t(1;21)(p36.3;q22.1) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H056) :	49
2. Investigation de la translocation t(7;17)(p15;q22) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 06H006) :	51
3. Investigation de la translocation t(8;17)(q11;q22) en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H037) :	53
4. Investigation de la translocation t(2;12) dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H052)	55
Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs (CohortStudy)(Turk J Hematol ,2022).....	57
4. Discussion	58
Etude 01 :Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (Sawcène Hazourli, 2012).	59
1. Caractérisation de la translocation t(1;21) et identification des fusions <i>RUNX1-PRDM16</i> , des formes tronquées de <i>RUNX1</i> et activation de <i>PRMD16</i> :	59
2. Caractérisation de la translocation t(7;17) et identification des fusions <i>MSI2-HOXA</i> , des formes tronquées de <i>MSI2</i> et activation de plusieurs gènes du cluster <i>HOXA</i> :	61

3. Caractérisation de la translocation t(2;12) et identification de la fusion <i>ETV6-HOXD11</i> , d'une forme tronquée de <i>ETV6</i> et activation de <i>HOXD9</i> :	63
4. Caractérisation de la translocation t(8;17) et identification de l'altération des gènes <i>MSI2</i> et <i>SOX17</i>	64
Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs (Cohort Study)(Turk J Hematol ,2022).....	66
5. CONCLUSIONS :	67
Bibliographie	Erreur ! Signet non défini. 68

LISTE DE FIGURE:

Figure 1: L'hématopoïèse (11)	5
Figure 2 : la Difference entre une personne normale et personne atteinte de la LMC.	6
Figure 3 : un hémogramme normal et l'hémogramme d'un patient LMC non traité (21). Erreur ! Signet non défini.	
Figure 4 : Caryotype médullaire montrant un chromosome 22 raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (23).	15
Figure 5 : FISH raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (23).	16
Figure 6 : La technique du Southern Blot (27)	Erreur ! Signet non défini.
Figure 7 : chromosome Philadelphia (30).	20
Figure 8 : Représentation schématique de la protéine Abl.....	21
Figure 9 : Représentation schématique de la protéine Bcr(32).....	22
Figure 10 : Translocation 9/12 fusion gène (abl-bcr)(26).....	23
Figure 11 : Translocation 9/12 fusion gène (abl-bcr)(26).	24
Figure 12 : positionnement du gène MYC(34)	24
Figure 13 : Le gène supprimeur de tumeur RB(35).....	25
Figure 14 : Evolution des traitements de la LMC(45).....	27
Figure 15 : Les pourcentage du BCR-ABL aux réponse du traitement (21).....	35
Figure 16 : Le caryotype spectral (SKY).....	50
Figure 17 : Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur métaphases,.....	50
Figure 18 : Les résultats de l'analyse FISH suggèrent une fusion	51
Figure 19 : translocation t(9;22)(q34.1;q11.2)	52

Figure 20 : Identification du réarrangement du gène <i>MSI2</i> dans la translocation t(7;17)(p15;q22) par hybridation in situ en fluorescence.....	52
Figure 21 : Identification des transcrits de fusion <i>MSI2-HOXA9</i> dans la translocation.t (7;17).	53
Figure 22 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations t (8 ,17).....	54
Figure 23 : Identification de la fusion <i>MSI2-SOX17</i> dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.....	54
Figure 24 : Les résultats de l'analyse FISH suggèrent une fusion <i>MSI2-SOX17</i> sur le chromosome dérivé 17, der(17), et une fusion potentielle <i>SOX17-MSI2</i> sur le chromosome dérivé 8, der(8).	55
Figure 25 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations.....	56
Figure 26 : Identification d'un réarrangement du gène <i>ETV6</i> par hybridation in situ en fluorescence dans la t(2;12)(q31;p13) chez le patient 02H052.....	56
Figure 27 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(1;21) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (58).	60
Figure 28 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(7;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (58).	62
Figure 29 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(2;12) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (56)	64
Figure 30 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(8;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (55).	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Phases de la maladie (26).....	13
Tableau 2 : score pronostic de Sokal (48).....	28
Tableau 3 : score pronostic de Hasford(48).....	29
Tableau 4 :Score ELTS de Hasford(48).....	30
Tableau 5 : Liste des échantillons étudiés dans ce projet et technique utilisée.....	41
Tableau 6 : Liste des sondes Abbott utilisées dans ce projet (58).....	47

LISTE DES ABREVIATIONS

AB : actin binding.

ACA : anomalies cytogénétiques additionnelles.

ADN : acide désoxyribonucléique.

ASR : age-standardized rates.

AVCI : années de vie corrigées de l'incapacité.

BACs : Bacterial artificial chromosomes.

CBF : core binding factor.

CyR : réponse cytogénétique.

DOP-PCR: Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR.

EVI1 : Ecotropic Viral Integration site 1.

FISH : fluorescence in situ hybridization.

GBD :Global Burden of Disease.

IM : d'imatinib.

ISD : l'indice sociodémographique.

LAL : leucémie aiguë lymphoïde.

LAM : leucémie aiguë myéloïde.

LMC: leucémie myéloïde chronique.

M-bcr : major breakpoint cluster region xiv.

m-bcr : minor breakpoint cluster region.

MCyR : réponse cytogénétique majeur.

MYR : myristoyl.

PCR : polymerase chain reaction.

PACs : Phage P1-derived artificial chromosomes.

Ph : chromosome Philadelphie.

PNEo : Polynucléaires Éosinophiles.

PNB : Polynucléaires Basophiles.

PNN : Polynucléaires Neutrophiles .

SMD : syndromes myélodysplasiques.

INTRODUCTION :

Leucémie myéloïde chronique, aussi appelée leucémie mésoblastique chronique ou granulocytaire chronique, est une hémopathie maligne appartenant au groupe des Syndromes Myéloprolifératifs Chroniques, caractérisée par une prolifération médullaire, monoclonale, prédominante sur la lignée granuleuse. La population cellulaire pathologique en cause porte une anomalie chromosomique dans 95% des cas, qui est le chromosome Philadelphie, et qui entraîne la mise en contact d'un site oncogénique (abl) situé sur le chromosome 9 et d'une région particulière du chromosome 22 (bcr). La plupart des patients (85 à 90%) l'arborent durant la phase chronique. Cette pathologie acquise est liée à une prolifération dont l'expression hématologique caractérisée par une surproduction de cellule de la série myéloïde. Ce phénomène va s'accompagner d'un envahissement du sang et de la rate par des cellules médullaires(1) (2).

LMC est une maladie qui présente généralement trois phases cliniques : la première est une phase chronique d'installation relativement bénigne qui peut durer plusieurs années, suivie d'une phase d'accélération et, enfin, d'une phase d'accusation (crise blastique) fatale en l'absence de traitement. La première médication utilisée dans ce contexte était la chimiothérapie (busulfan, hydroxyurée), puis l'interféron alpha, plus efficace. Au début du 21ème siècle, l'introduction dans la thérapeutique des inhibiteurs de tyrosine kinase, l'Imatinib, de première génération, puis le Dasatinib, le Nicotine de seconde génération, a complètement révolutionné la prise en charge de cette et maladie(3). Là encore, la cytogénétique permet d'évaluer l'efficacité du traitement par le suivi de la maladie résiduelle . L'analyse hématologiques cytogénétique (classique et moléculaire), complétée éventuellement par des techniques pointues de biologie moléculaire permettent un suivi correct de la LMC et une meilleure prise en charge des patients. Mais, ce sont les caractéristiques cliniques et biologiques, et surtout le chromosome Philadelphie, marqueur de la maladie, et son équivalent moléculaire, qui ont permis de définir les différents critères de réponse au traitement(4).

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes anomalies chromosomiques de la leucémie myéloïde chronique en la phase chronique et la phase blastique (accutisation). Nous avons présenté l'apport de la cytogénétique et la cytogénétique moléculaire de la LMC, nous basant sur des résultats et des études différentes dans l'objectif est de comprendre les différents techniques de cytogénétique et cytogénétiquemoléculaire utiliser dans le diagnostic et le suivie de la LMC dans les différents stades de la maladie, chronique, accélération et surtout la phase blastique (accutisation).

Partie Théorique

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LMC**1. Le sang :**

Sang en latin sanguis, est un tissu conjonctif spécialisé, d'origine mésenchymateuse, de consistance liquide et de couleur rouge due à la présence très majoritaire de globules rouges, ou hématies, riches en hémoglobine. Légèrement alcalin (pH 7,35 à 7,45), il a une saveur salée, et son odeur, qui est toute particulière, est un peu nauséuse. Les cellules qui le composent sont en suspension dans le plasma ; un liquide complexe constitué d'eau, de sels minéraux et de molécules organiques. Après coagulation, le plasma dépourvu de fibrinogène constitue le sérum. Le sang remplit le système vasculaire entier composé de vaisseaux artériels et veineux. Ce tissu très particulier assure le transport des gaz respiratoires (par les hématies), la défense de l'organisme (par les leucocytes) ainsi que la cicatrisation (par les thrombocytes) (6) (7) . On distingue dans le sang deux parties :

- **La phase liquide (plasma)** : la phase liquide du sang, le plasma, représente 55% du volume sanguin, est composée d'eau (90%) et de substances solubles ; protéines (albumine, globulines), glucides, lipides et sels minéraux. Sorti du système vasculaire ou sous l'effet de certains stimuli, le plasma coagule ; l'une de ses protéines, le fibrinogène, soluble, se transforme en une molécule insoluble, la fibrine. Ce qui reste liquide après coagulation du plasma est le sérum. Le plasma garantit la pression oncotique par le biais des protéines (l'albumine en particulier), assurant ainsi le maintien du plasma dans le système vasculaire. Différentes protéines du plasma participent à l'hémostase, à la défense de l'organisme vis-à-vis des agents infectieux (immunoglobulines) ainsi qu'au transport de diverses molécules (8) .
- **Les éléments figurés (cellules)** : le sang contient des cellules anucléées, les hématies (également nommées globules rouges ou érythrocytes), des cellules nucléées, les leucocytes (ou globules blancs : Polynucléaires Neutrophiles (PNN), Polynucléaires Éosinophiles (PNEo), Polynucléaires Basophiles (PNB), Monocytes (Mono) et les lymphocytes) et des fragments de cytoplasme, les plaquettes(ou thrombocytes). Leur origine est médullaire, provenant toutes d'une même Cellule Souche Hématopoïétique (CSH) pluripotente, après intervention directe ou indirecte de facteurs de croissance

hématopoïétiques agissant sur la différenciation et la maturation de lignées cellulaires médullaires, avec passage dans le sang d'éléments ayant fini leurs maturations (8).

2. La moelle osseuse :

La moelle osseuse est un tissu vivant, spécialisé, également d'origine mésenchymateuse, à consistance « onctueuse », situé au centre des os, responsable de la production des différents types de cellules sanguines. Ce tissu, anatomiquement diffus, s'étend à l'intérieur des espaces médullaires des os du squelette, séparé du tissu osseux proprement dit par une couche mésenchymateuse particulière, l'endoste. Dans cette couche, ostéoclastes et ostéoblastes assurent un remaniement perpétuel du tissu osseux. La moelle osseuse est composée d'un tissu hématogène (hématopoïétique ou moelle rouge) et d'un tissu adipeux (graisseux ou moelle jaune)(9).

- **La moelle rouge** : véritable construction hématogène composée de différentes structures en disposition concentrique, composée de l'extérieur vers l'intérieur d'un cadre osseux (ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes), d'un compartiment vasculaire, d'un microenvironnement ou trame conjonctivo-vasculaire et enfin d'un parenchyme hématopoïétique. La moelle osseuse hématopoïétique assure plusieurs fonctions : Hématogène (production des cellules du sang), immunologique (organe lymphoïde primaire, lieu de différenciation et de maturation des lymphocytes B) et ostéogène (formation, croissance et remodelage du tissu osseux).
- **La moelle jaune** : tissu adipeux, elle provient de la transformation de la moelle rouge dont la croissance est achevée. Elle est formée de grosses cellules adipeuses (96%), sa principale fonction est celle d'une réserve de lipides.
- **La moelle grise** : c'est un tissu fibreux qui se trouve chez les personnes âgées. En effet, les tissus hématopoïétiques et adipeux peuvent se transformer secondairement en un tissu conjonctif de type fibreux (10). La moelle va être localisée différemment, suivant qu'on parle du fœtus, d'un nouveau-né, d'un jeune ou d'un adulte : chez le fœtus, elle est située à l'intérieur de toutes les cavités osseuses. Chez l'adulte, on la trouve dans les logettes de l'os spongieux de certaines épiphyses, dans les vertèbres, les côtes, les os plats (sternum, os iliaque) et le crâne.

Un balancement existe entre la moelle hématogène et la moelle adipeuse. L'involution médullaire, se produit avec l'âge, et se traduit par une réduction progressive de la moelle rouge hématogène, remplacée par la moelle jaune adipeuse. La moelle grise s'installe progressivement au-delà de 60 ans (10) (9).

3. La lignée myéloïde :

Est une des deux lignées principales de cellules sanguines, l'autre étant la lignée lymphoïde. Elle comprend les cellules qui dérivent de la moelle osseuse et qui se différencient en diverses cellules myéloïdes, telles que :

- **Des plaquettes.**
- **Les globules rouges** (transportent l'oxygène vers tous les tissus du corps).
- **Deux types des globules blancs** : appelés granulocytes et monocytes (Ces globules blancs détruisent les bactéries et d'autres envahisseurs étrangers et aident à combattre les infections) (Figure 1).

Cette ligne est importante pour la défense de l'organisme contre les infections et les maladies.

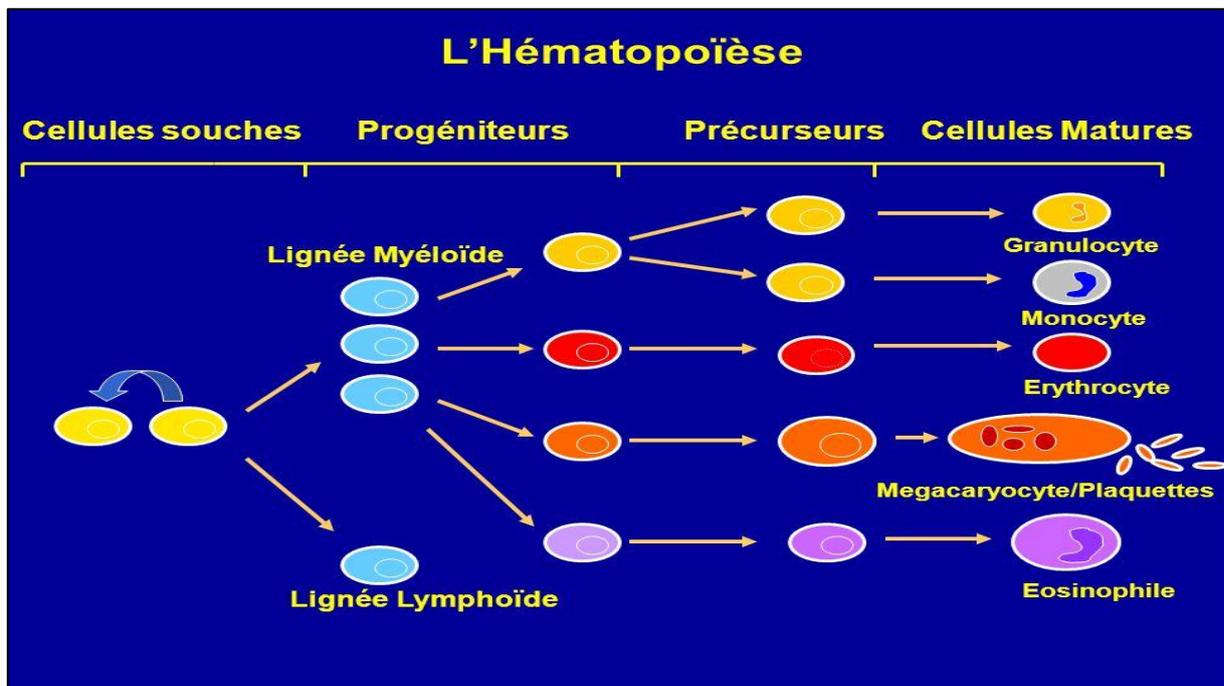


Figure 1: L'hématopoïèse (11) .

4. la leucémie un cancer :

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assure le développement harmonieux de notre organisme.

En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des cellules totalement indisciplinée, suite à une agression ou un dommage et liée à une modification de la structure d'une gène ; c'est ce qu'on appelle une « mutation » La cellule n'arrête plus de se multiplier, et reste en vie dans un organe où habituellement les cellules meurent et se renouvellent rapidement. Cette prolifération va aboutir à la formation de la tumeur, qui, en se développant arrive à détruire les cellules normales avoisinantes. Alors même les cellules sanguines peuvent être concernée et donne des cancers du sang de type leucémie.

La leucémie est un type de cancer du sang ; il existe plusieurs formes de leucémie en fonction du type de cellules sanguines touchées.

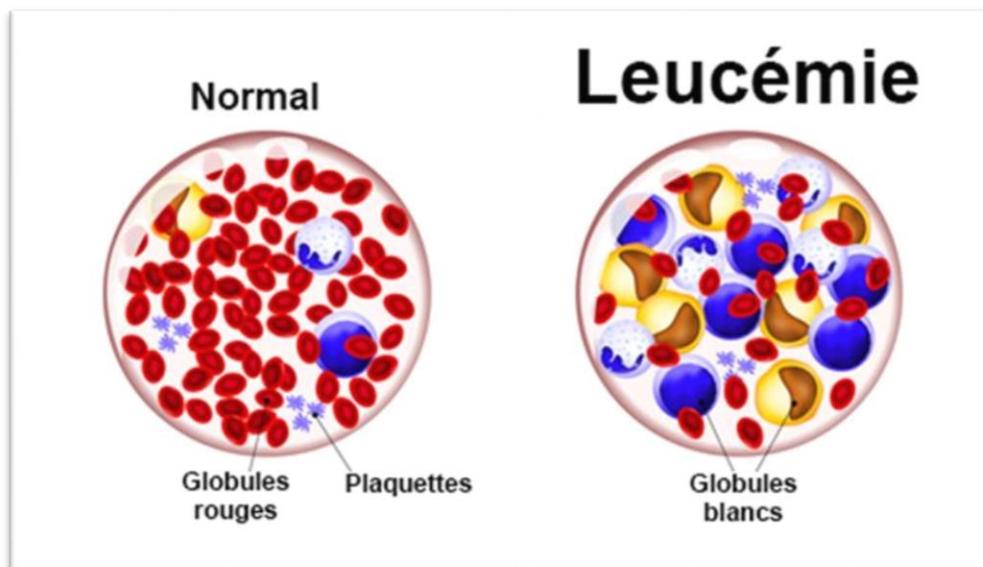


Figure 2 : la Différence entre une personne normale et personne atteinte de la LMC.

5. la leucémie myéloïde chronique (LMC):

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un type de cancer du sang qui se développe dans les cellules souches de la moelle osseuse. Cette maladie est caractérisée par la production excessive de globules blancs immatures, appelés les cellules souches myéloïdes.

Les symptômes de la LMC peuvent inclure une faiblesse, une fatigue, une perte de poids, une fièvre, des douleurs osseuses, de l'anémie ou une augmentation de la taille de la rate ou du foie.

La cause exacte de la LMC n'est pas connue avec certitude, mais elle est associée à une anomalie génétique appelée chromosome de Philadelphie (Ph). Cette anomalie est présente dans les cellules cancéreuses de la moelle osseuse. Les traitements actuels pour la LMC incluent l'administration de médicaments, tels que l'imatinib et le dasatinib et la greffe de moelle osseuse peut également être envisagée pour les patients atteints de forme avancée de la maladie **(109)**.

Le diagnostic précoce de la LMC peut contribuer à améliorer l'efficacité du traitement. Il est important de consulter un médecin pour toute manifestation de symptômes de la maladie. Le diagnostic de la LMC est généralement effectué par un hématologue ou un oncologue et comprend plusieurs étapes, notamment :

- **Examen physique** : un examen physique complet, comprenant un examen des ganglions lymphatiques, de la rate et du foie, peut être effectué pour détecter tout signe de leucémie.
- **Analyse sanguine** : une analyse sanguine peut être réalisée pour mesurer le nombre de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes dans le sang. Les personnes atteintes de leucémie présentent souvent une augmentation du nombre de globules blancs et une diminution du nombre de globules rouges et de plaquettes.
- **Ponction de moelle osseuse** : une ponction de moelle osseuse peut être réalisée pour prélever un échantillon de moelle osseuse et l'examiner au microscope. Cette procédure permet de déterminer si les cellules souches myéloïdes sont anormales ou présentes en quantités anormales.
- **Biopsie de moelle osseuse** : une biopsie de moelle osseuse peut être réalisée pour prélever un petit échantillon de moelle osseuse et l'examiner au microscope. Cette

procédure permet de déterminer le stade de la leucémie et le type de cellules leucémiques présentes.

- **Analyse génétique** : une analyse génétique peut être réalisée pour déterminer si certaines anomalies génétiques sont présentes dans les cellules leucémiques. Ces anomalies peuvent aider les médecins à déterminer les options de traitement les plus appropriées.

Lors du diagnostic, la plupart des patients présentent une numération leucocytaire (nombre de globules blancs circulant dans le sang) supérieure à la normale. L'apparition de la LMC a été largement étudiée dans la littérature scientifique. Plusieurs études ont montré que la maladie affecte principalement les adultes, avec un âge moyen de diagnostic autour de la cinquantaine. Les symptômes initiaux peuvent être vaguement définis et peuvent inclure de la fatigue, une perte de poids, une douleur osseuse et des douleurs abdominales. Cependant, certains patients ne présentent aucun symptôme et leur LMC est détectée lors d'un examen de routine **(109)**.

6. Epidémiologie :

Selon Le Cene international de recherche sur le cancer (CIRC) de l'organisation mondiale de la santé (qui produit des estimations mondiales pour tous les cancers contenus dans la base de données GLOBOCAN) : La leucémie était le 15eme cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la 11eme cause de mortalité par cancer dans le monde en 2018, représentant 437.033 cas de cancer et 309.006 décès par cancer. À l'échelle mondiale, la charge de morbidité de la leucémie est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. En 2018, le taux d'incidence normalisé selon L'âge était de 6,1 pour 100 000 hommes, contre 4,3 pour 100000 femmes. La mortalité était également plus élevée chez les hommes (4,2 pour 100 000) que chez les femmes (2,8 pour 100000) **(12)**.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est le syndrome myéloprolifératif le plus fréquent ,généralement unim dale représentant 15 à 20% de tous les cas de leucémie Selon des données qui ont été recueillies sur la LMC entre 1990 et 2018 dans le cadre de l'étude Global Burden of Disease (GBD) de2018, notamment sur l'incidence annuelle, la mortalité liée à la maladie et les années de vie corrigées de l'incapacité (AVCI), ainsi que sur les taux correspondants standardisés en fonction de l'âge (ASR= age-standardized rates). Pour résumer les résultats, les pays ont été classés par l'indice sociodémographique (ISD) et 21 régions du GBD.

En 2018, environ 34 179 cas d'incident de LMC ont été enregistrés, et 24 054 décès liés à la LMC ont été signalés dans le monde entier. Le taux d'incidence standardisé selon l'âge (TAS) et le taux de mortalité standardisé selon l'âge (TMPS) ont tous deux diminué de façon constante de 1990 à 2017, avec des variations annuelles en pourcentage estimées de -2,39 à -2,74, respectivement. L'incidence globale et la mortalité de la LMC étaient plus élevées chez les hommes que chez les femmes avec un Sex-ratio 1,5. Les ASR ont varié considérablement d'une région à l'autre, les plus lourdes conséquences se situant en Amérique latine andine, en Afrique subsaharienne centrale et en Asie du Sud-est.

En outre, les ASR ont diminué de façon plus évidente dans les régions à ISD élevé que dans les régions à ISD non élevé.

En outre, plus l'ISD n'est faible, plus la proportion de décès dans les groupes d'âge les plus jeunes sont élevées. Les rapports de plusieurs registres européens de la LMC montrent systématiquement une incidence annuelle de 0,7-1,0/100 000, des variations géographiques sont observées allant de 0,4 pour 100 000 personnes- années dans certains pays non occidentaux jusqu'à 1,75 pour 100 000 personnes- années aux Etats-Unis, un âge médian au moment du diagnostic de 57-60 ans et un ratio homme/ femme de 1,2-1,7.

Chez l'enfant et l'adolescent, La LMC représente 2 à 3 % des leucémies pédiatriques avec une incidence évaluée entre 0,6 et 1,2 par million d'enfants par an. Son incidence augmente avec l'âge : elle est extrêmement rare dans la petite enfance (incidence de 0,7/million d'enfants/an) pour les enfants âgés de 1 à 14 ans mais plus fréquente chez les adolescents (incidence de 1,2/million d'enfants/an) pour représenter 9 % des hémopathies malignes chez l'adolescent.

En Algérie, les hémopathies malignes représentent actuellement environ 10% des cancers. L'incidence de la LMC en Algérie est très faible mais en augmentation. Selon la Société algérienne d'hématologie (SAH-2018), 250 nouveaux cas sont signalés chaque année en Algérie. Des études épidémiologiques menées entre 1994 et 2004 ont montré une augmentation de l'incidence, de 0,19 en 1994 à 0,4/100 000 habitants en 2004, avec une moyenne de 88 nouveaux cas par an.

L'étude a également montré une légère prédominance masculine avec une sex-ratio de 1,12. L'âge moyen au moment du diagnostic était de 44 ans (13) .

Dans une évaluation de fréquence menée dans 13 des 16 services d'hématologie adulte de la région sur une période de 3 ans (2011, 2012, 2013), le lymphome non hodgkinien était le premier, représentant 24 %, et la maladie de Hodgkin était la plus fréquente. Il est montré à suivre. Viennent ensuite la leucémie aiguë (18 % chacun), le myélome multiple (15,5 %), la leucémie lymphoïde chronique (8,5 %) et la LMC (7 %). Les autres SMPC et syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent respectivement 5 % et 4,5 % **(14)**.

7. Historique :

En 1845, le médecin allemand Rudolf Virchow étudie le cas d'un patient souffrant d'une augmentation anormale de la rate, du foie et présentant un taux excessif de globules blancs dans le sang. Pour Rudolf Virchow, le problème se situe au niveau de la moelle osseuse, siège de la fabrication du sang. Il donne à ce phénomène le nom de « leucémie », du grec leukos, Blanc.

Un siècle plus tard, en 1960, deux chercheurs américains de l'université de Philadelphie, Peter Nowell et David Hungerford découvrent sur le caryotype de patients atteints de LMC la présence d'un petit chromosome anormal qu'ils vont nommer

« Chromosome de Philadelphie » du nom de la ville où la découverte est faite. C'est la première fois qu'une anomalie chromosomique est associée de façon spécifique à une pathologie hématologique.

Il faudra encore attendre 1970 pour pouvoir identifier clairement ce chromosome. Trois ans plus tard, à Chicago, le Docteur Janet D. Rowley réussit à montrer que cette anomalie résulte d'une « translocation », c'est-à-dire d'un échange de fragments génétiques entre un chromosome 9 et un chromosome 22, lors de la division cellulaire.

Au début des années 1980, les gènes impliqués dans cette translocation sont identifiés. Sur le chromosome 9, le gène s'appelle Abelson, noté « abl 1 » ; sur le chromosome 22, il s'appelle « bcr ».

Dans la leucémie myéloïde chronique, la translocation entre ces deux chromosomes conduit au rapprochement et à la fusion des gènes abl et bcr qui, à l'état normal, sont séparés. Cette translocation anormale donne naissance à un gène de fusion nommé « bcr-abl » qui produit une protéine ayant une activité « tyrosine kinase » durable. Cette protéine est responsable de la

division incontrôlée des globules blancs. La conséquence moléculaire de cette anomalie génétique récurrente est l'emballage de cette protéine qui active les autres protéines de façon débridée. C'est ainsi qu'une LMC se déclenche. Pour empêcher cet emballage, en 1998, les laboratoires Novartis ont commercialisé un médicament anti tyrosine kinase qui va agir précisément au niveau de la protéine abl1. Ce médicament est l'imatinib (Glivec). Il a révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique. De même année l'Européen group for the Immunological of Leukemias (EGIL) propose la classification immunophénotypique .La classification EGIL a permis de standardiser les critères de définition d'une leucémie myéloïde lymphoïde de lignée T ou B et biphénotypique.

8. Etiologie :

L'étiologie de la LMC est en grande partie inconnue.

L'anomalie génétique à l'origine de la maladie n'est pas héréditaire mais acquise au cours de la vie. Une étude basée sur les données du registre de cancer et du registre multigénérationnel suédois n'a pas retrouvé d'agrégation familiale de cas de LMC.

Ils y'a des facteurs de risque, notamment environnementaux. Les radiations ionisantes sont le seul facteur de risque connu et confirmé par différentes études avec un lien établi entre l'incidence de la LMC et le niveau d'exposition aux radiations ionisantes chez les survivants de l'explosion atomique à Hiroshima.

Une exposition au benzène et aux produits contenant du benzène a été rapportée comme étant significativement associée à une augmentation de la morbidité et à la mortalité due à la LMC, bien qu'une méta-analyse d'études cas témoins.

9. Aspect clinique des LMC :

Les indices qui conduisent à la découverte d'une leucémie sont peu caractéristiques. Elle est, dans 40% des cas, découverte incidemment au cours d'un examen hématologique de routine. Moins souvent, la LMC est diagnostiquée lors de la découverte de complications telles que la thrombose veineuse, la crise de goutte, l'infarctus splénique ou encore des troubles de la vision ou une détresse respiratoire par leucostase (15).

La leucémie myéloïde chronique passe par 3 phases :

- **Phase chronique** : une phase indolente initiale qui peut durer 5 à 6 ans. Elle répond très bien aux thérapeutiques peu ou pas intensives. Elle reste contrôlée par celles-ci. Bon nombre des malades sont asymptomatiques ou peu symptomatiques à ce stade **(16)** .

- **Phase d'accélération** : Elle se caractérise par une résistance progressive au traitement et précède la survenue de la transformation aiguë. Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne **(17)** .

Les principaux signes de cette étape sont :

- L'augmentation du volume de la splénie et la fièvre.

- L'évolution cytogénétique clonale marquée par un accroissement en nombre de chromosome Philadelphie dans l'organisme, ce qui est l'élément clef de cette phase.

- Le caryotype peut faire apparaître des anomalies surajoutées, telles que des trisomies des chromosomes 8 ou 19 ou des doubles chromosomes Philadelphie**(26)**.

- **La phase blastique** : Aussi appelée crise blastique, ou phase de transformation en leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient. La phase blastique est le stade final de la maladie dont l'espérance moyenne de vie est de 3 à 6 mois avec une résistance accrue au traitement.

Par manque de traitement ou en cas d'épuisement ou d'inefficacité du traitement, tous les patients atteignent cette phase de pronostic très sombre puisqu'elle mène au décès du patient. C'est dans ce stade que l'on observe le plus de résistance au traitement **(26)**.

Phase de maladie (selon l'OMS) Phase myélocytaire chronique	Leucémie myéloïde chronique sans signes d'accélération ou de transformation blastique
Phase accélérée	<ul style="list-style-type: none"> • 10-19% de blastes dans le sang périphérique ou dans la moelle • Basophilie >20% • Thrombocytopenie persistante ($< 100 \times 10^9/l$) sans relation avec le traitement ou • Thrombocytose persistante ($< 1000 \times 10^9/l$) sous traitement • Progression de la splénomégalie et de la leucocytose sous traitement • Anomalies cytogénétiques surajoutées * un ou plusieurs critères doivent être remplis
Phase blastique	>20% de blastes dans le sang périphérique ou dans la moelle présentation extramédullaire

Tableau 1 : Phases de la maladie (26).

10. Diagnostique biologique :

10.1. L'hémogramme :

L'hémogramme ou numération-formule sanguine (NFS) est l'examen le plus important car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic (19). Une hyperleucocytose, une anémie et un thrombocyte, sont les anomalies sanguines les plus souvent rencontrées

- **L'hyperleucocytose** est franche, comprise entre 20×10^9 et 500×10^9 leucocytes/L. Elle est en moyenne de 120×10^9 leucocytes/L, majoritairement composée de polynucléaires neutrophiles (30% à 40%), une éosinophilie plus discrète (5% à 10%) et une basophilie plus marquée (3% à 10%) (19).
- **L'anémie** (normocytaire et normochrome) est peu courante et modérée.
- **Le thrombocyte** est habituel, et souvent supérieure à $500\,000/mm^3$. Parfois très élevée, elle est rarement responsable d'incidents thrombotiques par thrombopathie associée. (20)
- **La myélémie** (c'est-à-dire le passage dans le sang de cellules myéloïdes à tous les stades de différenciation) est constante, sans hiatus de différenciation représente 10 et 50% des éléments (17) constituée de métamyélocytes, de myélocytes et quelques promyélocytes et plus rarement de myéloblastes.

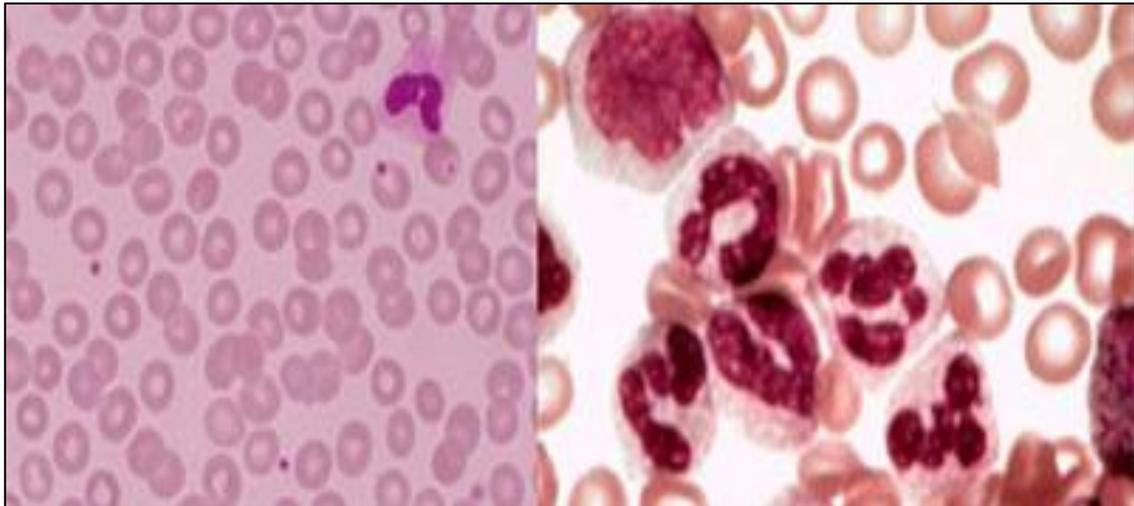


Figure 3 : un hémogramme normal et l'hémogramme d'un patient LMC non traité (21).

10.2. Le myélogramme :

Il révèle une moelle dont la richesse cellulaire est importante, avec une hyperplasie granuleuse marquée, une blastose médullaire inférieure à 10 % en phase chronique et parfois même une basophilie et une éosinophilie peuvent être détectées dans le sang. En revanche, les mégacaryocytes sont souvent en nombre élevé et de petite taille, cela est donc inutile pour le diagnostic de LMC. Le myélogramme permet cependant, de confirmer la phase de la maladie et de réaliser le caryotype initial (22).

10.3. Cytogénétique :

La cytogénétique est devenue un examen indispensable dans de nombreuses hémopathies malignes, faisant partie intégrante du bilan diagnostique. C'est aussi un facteur pronostique majeur, permettant une action thérapeutique adaptée au pronostic individuel ainsi défini. De plus, cette investigation peut également avoir un intérêt diagnostique par la mise en évidence d'anomalies spécifiques.

Depuis la découverte du chromosome Philadelphie dans la LMC en 1960, de très nombreuses anomalies récurrentes ont été décrites dans la quasi-totalité des hémopathies (24) (110).

10.4. Cytogénétique moléculaire :

- **Caryotype :**

Un caryotype médullaire conventionnel sera systématiquement réalisé afin de mettre en évidence la présence du chromosome Philadelphie (95 % des cas) et confirmer ainsi le diagnostic. Il permet également la détection d'éventuelles anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) et donc de préciser la phase de la maladie (26).

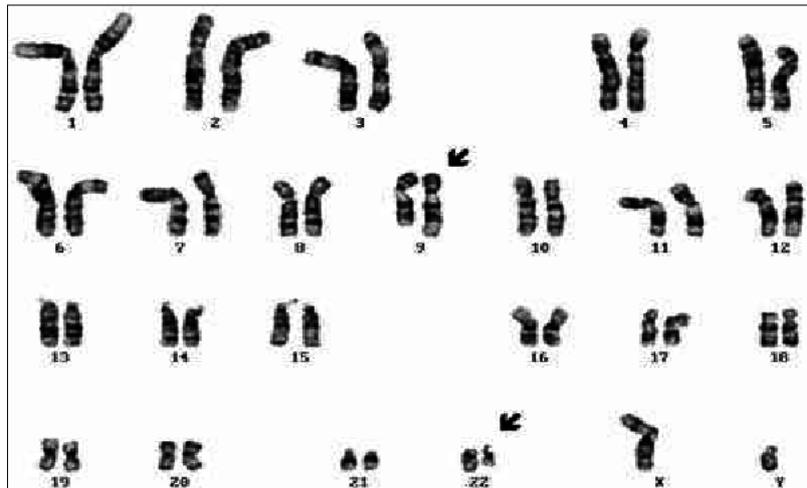


Figure 4 : Caryotype médullaire montrant un chromosome 22 raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (23).

Cette technique comporte quand même quelques inconvénients : elle nécessite dans la plupart des cas le prélèvement médullaire et elle est longue. En pratique, on observe le bras d'un chromosome 22 plus court et un des bras long du chromosome 9 de dimension plus importante. Lors de cet examen, l'interprétation se base uniquement sur des anomalies chromosomiques clonales qui doivent être retrouvées à l'identique sur plusieurs mitoses (Figure 3) (14).

- **L'hybridation par fluorescence in situ (FISH) :**

C'est une technique particulière à la détection des fusions BCR-ABL non vues au caryotype ou en cas d'échec du caryotype (FISH interphasique)(24).

En revanche, elle ne permet pas de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques additionnelles. Par contre, elle peut être utile pour rechercher une délétion du chromosome 9, reconnue comme facteur pronostic péjoratif (25).

L'avantage de cette technique est de détecter les remaniements BCR-ABL sans chromosome Philadelphie et d'être plus sensible que le caryotype. Les résultats de la FISH interphasique ne sont pas superposables à ceux de la FISH métaphasique. La FISH métaphasique explore, comme le caryotype, le compartiment des cellules en division alors que la FISH interphasique explore aussi le compartiment des cellules quiescentes (28)(29).

- Dans une cellule normale, deux couleurs distinctes sont observées à deux points différents du génome. Cependant, en raison de la fusion de la séquence chromosomique appartenant aux gènes lors de la translocation t(9 ; 22), les deux sondes se rencontrent côte à côte. On observe alors une superposition de couleur tirant vers le jaune (Figure 5) (26).

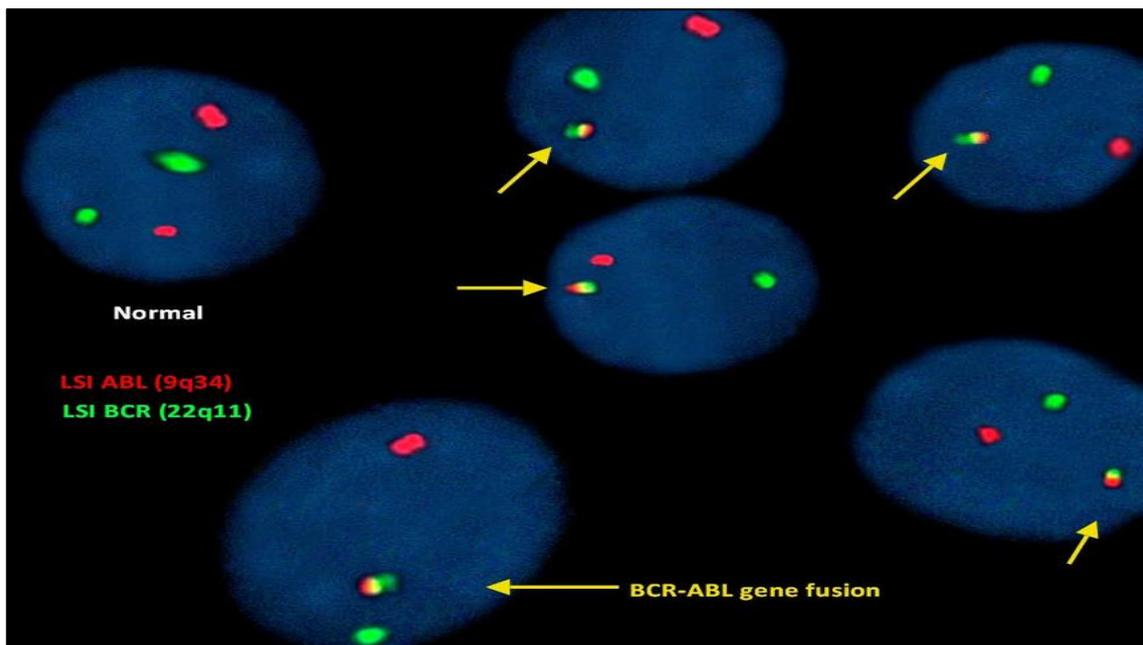


Figure 5 : FISH raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (23).

10.5. Biologie moléculaire :

Il convient d'effectuer les examens de biologie moléculaire doivent être pratiqués sur sang périphérique.

- **Le Southern-blot :**

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

Cette technique consiste dans un premier temps à digérer l'ADN par des enzymes de restriction, le fragmenter puis le colorer.

On effectue une électrophorèse afin de séparer les fragments, une dénaturation de l'ADN bicaténaire, puis on réalise le transfert de l'ADN sur une membrane en nitrocellulose. On place l'échantillon au contact avec une sonde marquée (composés radioactifs, fluorescents) spécifique, ici le gène BCR. Après hybridation, la sonde dans l'excédent est éliminée et l'hybridation est visualisée sur un film autoradiographique .

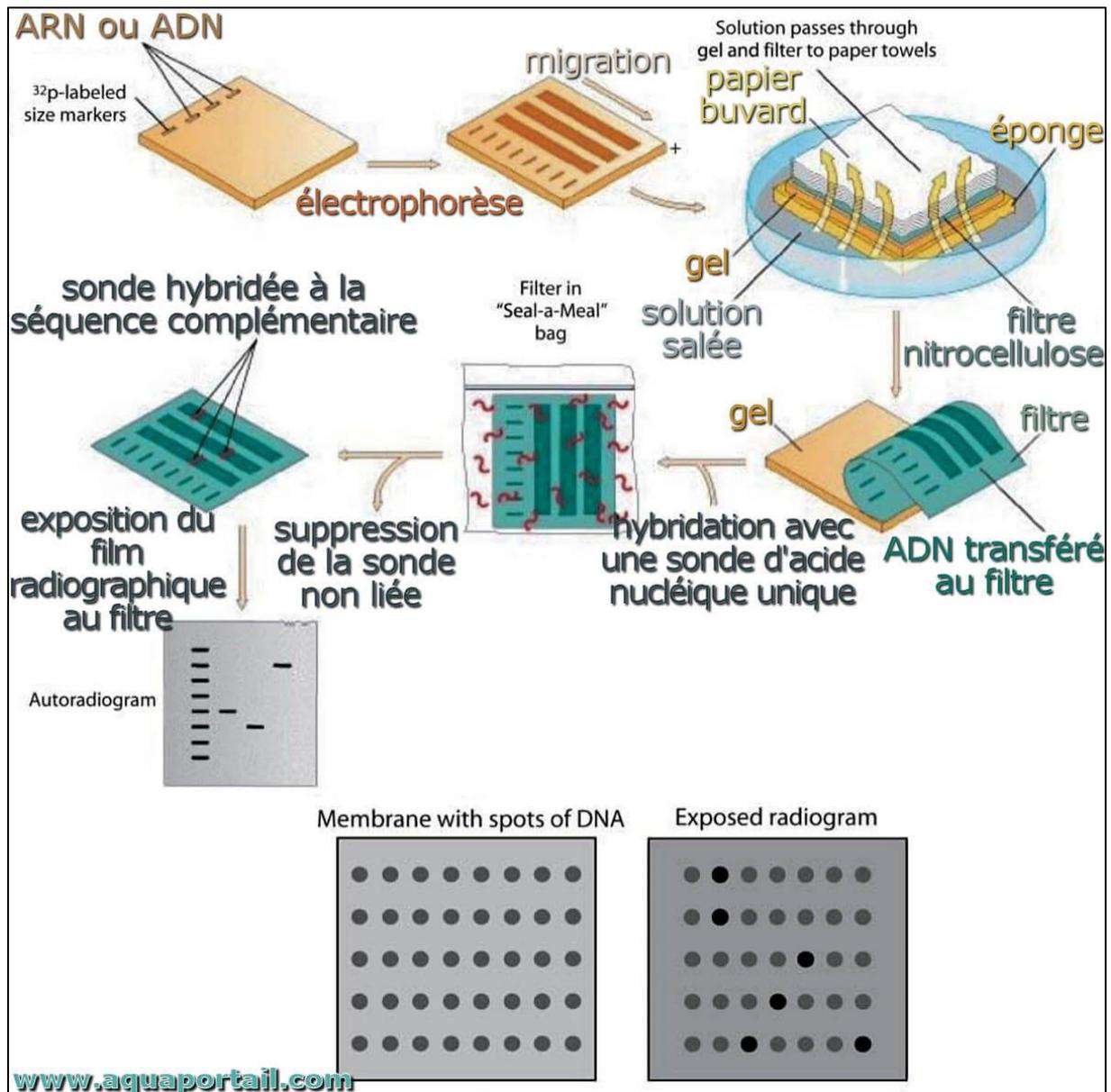


Figure 6 : La technique du Southern Blot (27) .

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

La RT-PCR multiplex et la QR-PCR en temps réel sont devenues les techniques les plus sensibles et les plus standardisées actuellement disponibles pour la caractérisation du réarrangement BCR-ABL1 ainsi que pour sa quantification (32).

La recherche du transcrite de fusion BCR-ABL1, dans le sang, est indispensable au diagnostic et permet de définir le type de transcrite. Elle représente indirectement le nombre de cellules leucémiques présentes dans l'organisme. Elle nécessite une étape préalable d'extraction des

ARN à partir des globules blancs totaux et une étape de rétrotranscription de l'ARN en ADNc. La recherche du transcrit se fait ensuite par PCR multiplex (utilisant plusieurs couples d'amorces) en point final permettant d'amplifier tous les types de transcrits BCR-ABL1 quel que soit leur point de cassure. La visualisation de la taille du transcrit amplifié sur gel d'agarose permet de définir les points de cassure. Le type de transcrit supposé sera confirmé par PCR simplex avec le couple d'amorce adéquat. Le typage du transcrit au diagnostic est fondamental afin de choisir le bon couple d'amorces pour la quantification du transcrit BCRABL1 qui se fait par PCR en temps réel sur l'ADNc obtenu après les étapes d'extraction et de rétrotranscription (RT-QPCR) (retrotranscription quantitative real time polymerase chain reaction).

La RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction) met en évidence le transcrit BCR-ABL à partir de cellules médullaires ou plus facilement, à partir d'un prélèvement sanguin **(28)** .

C'est une variante de la PCR classique qui permet de visualiser en temps réel l'augmentation du taux de transcrit que l'on cherche à quantifier, après avoir synthétisé de l'ADN complémentaire à partir d'ARNm.

CHAPITRE 2 : LMC ET BIOLOGIE MOLECULAIRE**1. Chromosome PHILADELPHIA :**

Il s'agit d'une anomalie chromosomique causée par une translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22, désignée selon la nomenclature internationale par t(9 ; 22) (q34 ; q11). Cette translocation standard est observée dans plus de 95% des LMC. L'analyse moléculaire montre que l'effet de cette translocation est la juxtaposition du proto-oncogène ABL du chromosome 9 sur le gène BCR du chromosome 22, produisant un gène de fusion codant pour une protéine chimérique fonctionnelle P210 bcr/abl, qui a la propriété d'être leucémogène (**Figure 5**) (29).

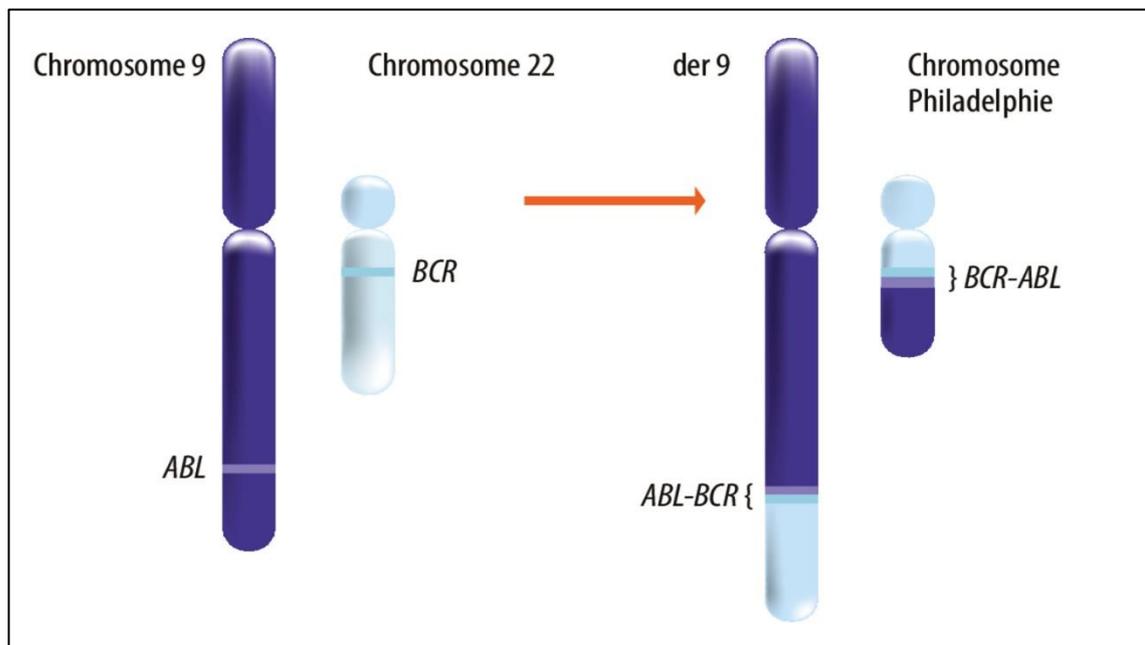


Figure 7 : chromosome Philadelphia (30).

2. Le gène ABL et sa protéine :

Le gène ABL1 est nommé en hommage au virus Abelson de la leucémie murine. Chez l'homme, l'oncogène ABL est localisé sur le bras long du chromosome 9 (q34), et il est exprimé dans une grande variété de types cellulaires dont les lignées hématopoïétiques, la rate, le thymus, le testicule. Ce gène prend place de 230 kb et comporte 12 exons dont 2 alternatives de l'exon 1 (1A et 1B). Il est transcrit en deux ARNm de 6 ou 7 kb selon que l'exon 1A ou 1B soit alternativement transcrit, et code pour une protéine de 145 KD tel que la tyrosine kinase. Les

cassures chromosomiques sur le gène ABL1 se font en des points variables de la région 5' du gène mais le plus souvent au niveau de l'intron 1 (5).

La région N-terminale de la protéine comporte deux domaines d'interaction SH2, SH3, ainsi que le domaine catalytique SH1 qui présente l'activité tyrosine kinase. Un domaine central riche en prolines permet des interactions avec des protéines possédant des domaines SH3, à l'exemple de la protéine Crk. La région C-terminale présente un domaine de liaison à l'ADN (DNABD), trois signaux de localisation nucléaire NLS et un site de liaison à l'actine 5 (Figure 6) (31).

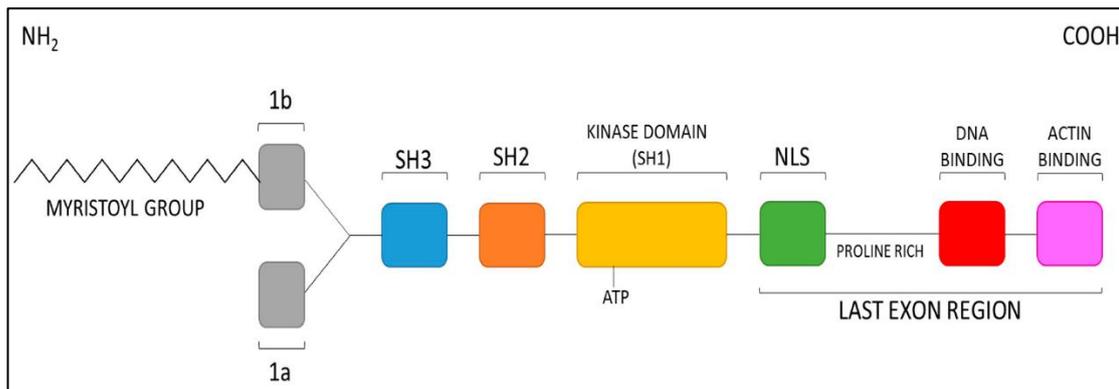


Figure 8 : Représentation schématique de la protéine Abl.

La forme 1b possède un groupement myristoyl (MYR), ayant un rôle important dans l'auto-inhibition de la protéine. NLS est un domaine de localisation nucléaire, DB (DNA binding) est un domaine de fixation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et AB (actin binding) est un domaine de fixation de l'actine (22).

3. La gène BCR et sa protéine :

Le nom du gène BCR provient de la détermination du point de cassure du chromosome 22 dans la LMC, qui intéresse une région très limitée, dénommée « breakpoint cluster région». Le gène BCR occupe un locus de 135kb et comprend 23 exons. Les 5 exons à l'intérieur de la zone de cassure M-bcr (major breakpoint cluster région) correspondent aux exons 12 à 16. Ils sont aussi appelés b1, b2, b3, b4 et b5. Il est transcrit en ARNm de 4,5 ou 6,7 kb et code une protéine cytoplasmique de 160 kb d'expression ubiquitaire (37).

La protéine Bcr est constituée de plusieurs domaines. Dans la partie N-terminale, le domaine 1B constitue une région importante puisqu'il permet la dimérisation de la protéine BcrAbl

conduisant à l'ouverture de l'activité kinase et le domaine 2B comprend deux sites de liaison aux domaines SH2 comme ceux portés par la protéine Abl et la protéine Grb2. Indépendamment, la région centrale présente un domaine d'homologie avec les protéines Dbp (facteur d'échange guanosine triphosphate [GTP]/guanosine diphosphate [GDP]). Sa partie C-terminale est absente dans la protéine de fusion Bcr-Abl, ayant une fonction GAP (GTPaseactivatingprotein) pour les protéines G de type Rac. Cette deuxième partie, qui n'intéresse pas la protéine chimérique BcrAbl, joue en réalité un rôle dans la bactéricidie des polynucléaires. Néanmoins, les fonctions réelles de la protéine Bcr sont peu connues (Figure 6) (22) .

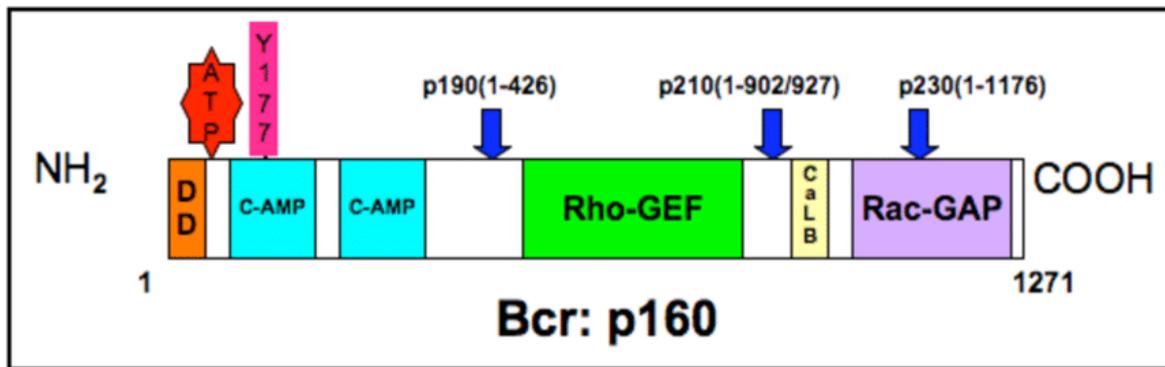


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine Bcr(32).

4. Gène fusion BCR_ABL et la protéine de fusion :

Les réarrangements les plus fréquemment retrouvés au cours de la LMC sont les produits de fusion du gène ABL rompu entre les exons 1 et 2 et du gène BCR fracturé dans une région où les points de cassure sont variables, appelée M-BCR (Major BCR). Cette région correspondant aux exons 12 à 16 du gène BCR, est subdivisée en cinq bandes, de b1 à b5, analogues aux cinq exons impliqués (exons 12 = b1, exon 13 = b2 jusqu'à l'exon16 = b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4 (Figure8) (39).

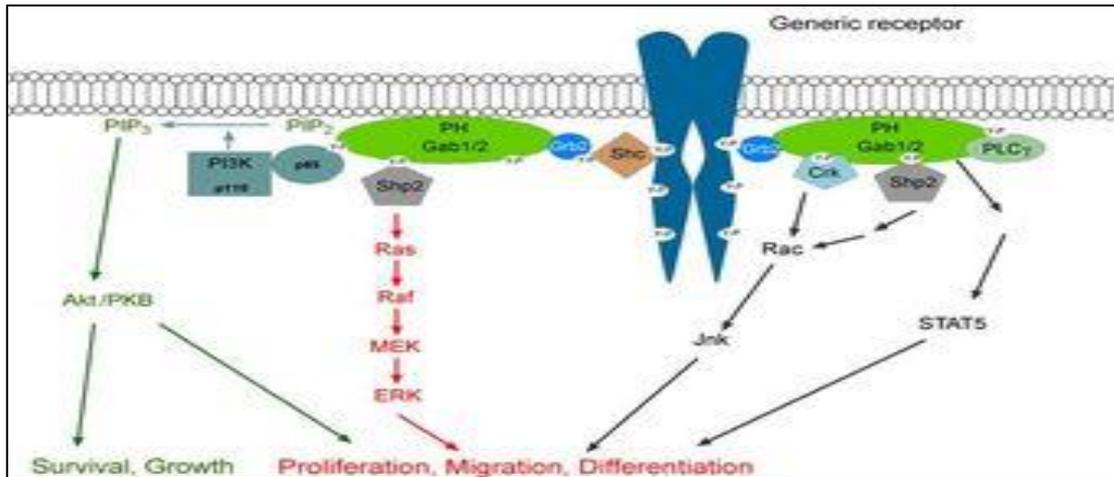


Figure 10 : Translocation 9/12 fusion gène (abl-bcr)(26).

5. Autre gènes impliqués dans la LMC :

5.1 Implication d 'AML1/EVI1 :

Le gène AML1 code pour le complexe régulateur de la transcription CBF, localisé sur le chromosome 21, code pour une protéine qui est impliquée dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules sanguines matures. Le gène EVI1 code pour un facteur de transcription à " doigt de zinc " qui joue un rôle important pour une protéine impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation. La fusion de ces deux gènes peut perturber le fonctionnement normal des cellules sanguines. La fusion est souvent associée en la phase de transformation blastique est la translocation

T (3 ; 21) (q26 ; q22) dont les effets pathogènes sont associés à l'expression de la protéine de fusion Aml-1/Evi-1 et en a été observée dans environ 2% des cas de LMC en crise blastique .

5.2. Implication de gène AXL :

Un gène localisé sur le chromosome 19 en q 13.2.11, code pour une protéine appelée récepteur AXL, qui appartient à la famille des récepteurs de type tyrosine kinase. Cette protéine est représentée à la surface de nombreuses cellules, notamment les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses. Les inhibiteurs de la kinase AXL ont été développés pour cibler cette voie de signalisation et améliorer l'efficacité de la thérapie dans la LMC. Les résultats préliminaires de ces arrêtés ont prouvé qu'ils pourraient être une option

thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de LMC résistant aux traitements actuels. Le récepteur AXL joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques, tels que la prolifération cellulaire, la migration, la survie cellulaire, l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Il a également été impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire et la progression tumorale.

Des études récentes ont montré que le récepteur AXL est souvent surexprimé dans de nombreux types de cancer.

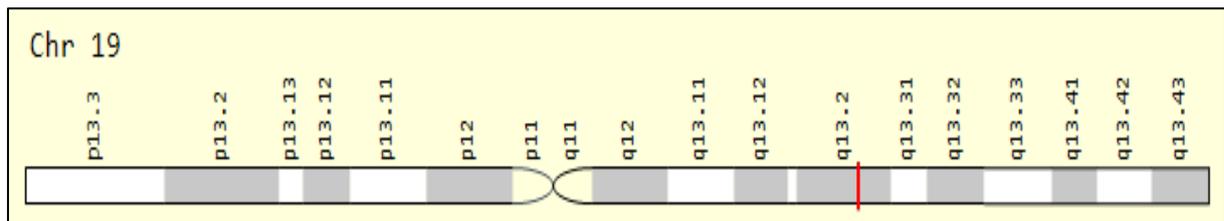


Figure 11 : Translocation 9/12 fusion gène (abl-bcr)(26).

Il est situé sur le chromosome 8 en position 8q24 est un gène impliqué dans la régulation de la croissance et de la division des cellules codée pour des facteurs de transcription régulés lors du cycle cellulaire. Ils sont indispensables pour la prolifération et la division cellulaire ainsi que pour inhiber la différenciation des cellules. La trisomie 8 soit associée à la surexpression de c-Myc et à la pathogénicité de l'évolution de la LMC. Des études ont montré que le gène MYC est surexprimé dans les cellules de la LMC, ce qui peut contribuer à la progression de la maladie. En effet, la surexpression de MYC peut augmenter la prolifération cellulaire et la résistance à la mort cellulaire programmée, ce qui favorise la croissance des cellules cancéreuses. En outre, des études récentes ont suggéré que la surexpression de MYC pourrait être un marqueur précoce de la transformation de la LMC en phase aiguë, une forme plus agressive de la maladie.

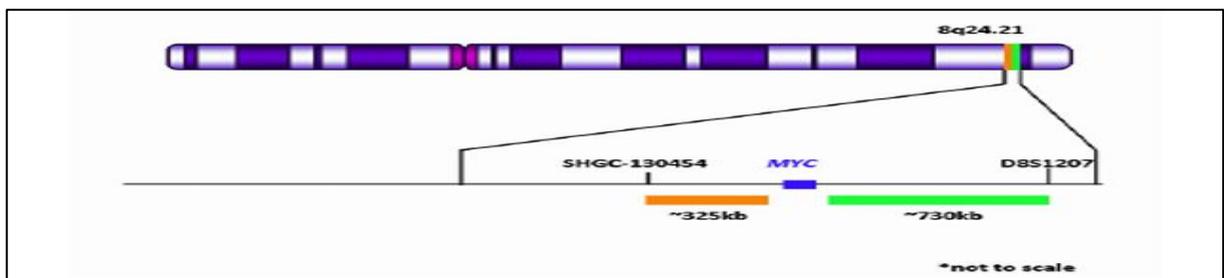


Figure 12 : positionnement du gène MYC(34) .

5.3. Implication de RB :

Il est également connu sous le nom de gène du rétinoblastome, est un gène suppresseur de tumeur qui joue un rôle qui inhibe la prolifération cellulaire en contrôlant le cycle cellulaire par l'intermédiaire du facteur transcriptionnel E2F. . Ce facteur E2F stimule la transcription de gènes conduisant à la synthèse d'enzymes impliquées dans la division cellulaire cellulaire telles que la thymidine kinase, la DNA polymérase. Ce facteur E2F stimule la transcription de gènes conduisant à la synthèse d'enzymes impliquées dans la division cellulaire cellulaire telles que la thymidine kinase, la DNA polymérase. Le gène suppresseur de tumeurs RB est trouvé inactivé par mutation, délétion ou perte d'expression dans environ 18% des cas de patients atteints de LMC en crise accélérée ou blastique, spécialement dans des crises lymphoblastiques ou mégacaryocytaires. Des altérations du gène RB apparaissent avec une Fréquence de 10% environ chez les patients en crise blastique La relation entre le gène RB et la LMC n'est pas directe. La mutation du gène RB n'est pas une caractéristique courante dans la LMC. Cependant, il est important de noter que le gène RB et les voies qu'il régule peuvent être impliqués dans d'autres types de leucémies ou dans la progression de la LMC.

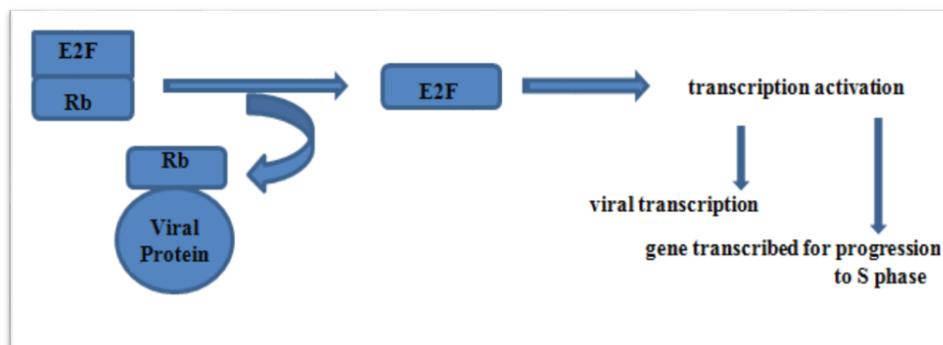


Figure 13 : Le gène suppresseur de tumeur RB(35).

CHAPITRE 3 : LMC ET TRAITEMENT

1. Historique du traitement :

Lorsqu'un patient est présumé être atteint d'une LMC, il s'est toujours adressé à un hôpital spécialisé en hématologie ou en cancérologie. Une fois le diagnostic confirmé, le docteur choisit le traitement qui convient le mieux pour le stade de la maladie et au patient.

Hors de la greffe de moelle osseuse, à laquelle l'indication reste limitée, la LMC a longtemps été une pathologie sans traitement curatif, la chimiothérapie n'étant qu'à visée symptomatique.

La splénectomie et l'arsenic étaient les tout premiers traitements. Le busulfan en 1953 puis l'hydroxyurée (HYDREA®) dans les années 1970 ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique. Le traitement était donc basé sur une cytoréduction à l'aide de ces agents alkylants. La durée moyenne de la phase chronique était de l'ordre de 3 ans et la LMC était un état potentiellement mortel.

Ce n'est qu'en 1980 que l'interféron-alpha (IFN-G) a permis une amélioration de la survie globale des patients avec obtention de rémissions cytogénétiques complètes et durables(36) .

Au début des années 1980 également, il a été établi que la greffe de moelle allogénique était un traitement curatif permettant au chromosome Ph de disparaître mais utilisable chez une minorité de patients à cause de leur âge avancé ou de l'absence de donneur. La possibilité de retirer le chromosome Ph a permis alors d'envisager des stratégies d'autogreffe avec ou sans mobilisation de cellules souches avec une amélioration de la survie démontrée dans une méta-analyse (démarche consistant à rassembler les résultats de plusieurs essais cliniques conduits séparément). Néanmoins le taux de rechute étant plus important, l'allogreffe classique ou non-myéloablative ou encore à conditionnement d'intensité réduite est aujourd'hui la référence (36) en matière de greffe.

La démonstration de l'effet synergique entre l'IFN-G et l'aracytine par le groupe d'études de la LMC en France a représenté, jusqu'à l'introduction des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), le traitement standard hors greffe.

Chapitre 3 : LMC et Traitement

La découverte récente des ITK, plus spécifiques, tel que le mésylate d'imatinib (IM) a réellement perturbé les traitements des patients en modifiant leur médiane de survie mais également la surveillance du traitement. Néanmoins certains patients sous IM présentent des résistances ou une absence de réponse thérapeutique en dépit de l'expression avérée de la molécule cible. Bien que cette proportion reste faible, celles-ci font actuellement l'objet de recherches, ce qui a mené à la seconde génération d'ITK : dasatinib et nilotinib, et de bien d'autres molécules encore à l'essai (37).

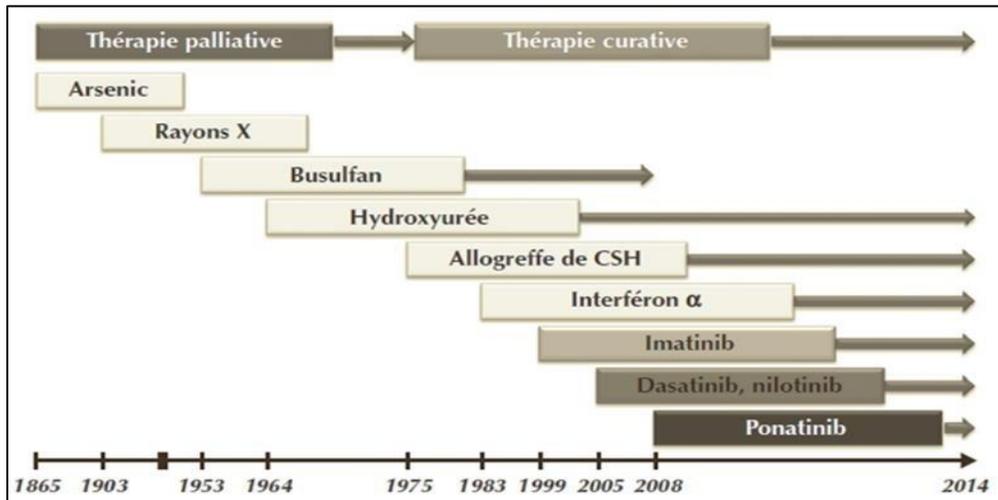


Figure 14 : Evolution des traitements de la LMC(45).

2. Score pronostic :

Les patients atteints de LMC ont une moyenne de survie environ 5 ans et même plus depuis l'avènement des inhibiteurs de tyrosine kinase qui ont amélioré le pronostic, et on constate des variations concernant la durée des différentes phases de la LMC et également la différenciation de l'évolution de la maladie entre les individus. Le pronostic est utilisé avant la mise en route d'un traitement afin de choisir la thérapeutique la mieux adaptée au patient et pour comprendre comment un individu réagira avec le traitement (46)(17).

Il existe plusieurs types de scores pour classer les patients en plusieurs groupes de risques différents, mais les plus utilisés sont le score de Sokal et le Score de Hasford.

Chapitre 3 : LMC et Traitement

2.1. Le score de sokal :

Ce score a été défini à partir de résultats cliniques réunis en 1984 par Sokal. Comme un index de risque relatif, il est toujours utilisé comme reflet de la masse tumorale et du potentiel évolutif de la maladie. Il doit être effectué au diagnostic et avant tout traitement. Les paramètres biologiques et cliniques pris en compte sont : l'âge (exprimé en année), la taille de la rate(en centimètres du rebord costal), le taux de plaquettes (en G/L) et les pourcentages des blastes (38) .

Etabli à partir de cohortes traitées par Busulfan et Hydroxyurée, le score de Sokal permet de séparer les patients en trois groupes selon le taux de survie globale, afin d'appréhender l'évolution de patients traités par chimiothérapie conventionnelle.

Les patients sont classés en fonction de ce score en faible risque, risque intermédiaire et risque élevé (Tableau 2).

Risque	Indice calculée	Survie médiane
Faible risque	Inférieure à 0,8	60 mois
Risque intermédiaire	Entre 0,8 et 1,2	44 mois
Haut risque	Supérieure à 1,2	32 mois

Tableau 2 : score pronostic de Sokal (48).

2.2. Score de Sokal modifié :

Etabli 1 an après (1985) pour les patients de moins de 45 ans. L'étude princeps avait pour but de déterminer dans une population de patients plus jeune (625 patients âgés de 5 à 45 ans), les patients candidats à une greffe de moelle osseuse en fonction du risque associé au traitement conventionnel. La répartition en trois groupes en fonction du calcul de l'indice est similaire au score de Sokal initial.

Pour les 42 groupes à risque faible et intermédiaire, le taux de survie global à 2 ans était de 89 % et de 74 % à 3 ans. Pour le groupe à risque faible, il a été observé une mortalité à 2 ans de 9 % et une

Chapitre 3 : LMC et Traitement

survie médiane de 5,5 ans. Pour le groupe à risque élevé, un risque de mortalité de 30 % a été observé dans les 2 ans suivant le diagnostic.

Ces indices fournissent une indication sur le potentiel évolutif spontané de la maladie et comme reflet de la masse tumorale mais ils sont moins performants pour donner un pronostic pour les patients traités par Interféron α (IFN α).

2.3. Score de Hasford :

Le score de Sokal n'était pas suffisamment adapté au traitement par l'interféron. Hasford et al ont donc proposé un nouvel indice (Indice de Hasford ou Euro-score) permettant de distinguer mieux les patients traités par les (INF)- α en terme de survie (5) . Cet indice est calculé à partir de : l'âge, la taille de la rate, le pourcentage de blastes circulants, le pourcentage d'éosinophiles circulants, la basophilie et ainsi que le taux de plaquettes.

Il permet de séparer, à nouveau, les malades en trois groupes statistiquement différents en ce qui concerne la survie globale.

Il permet de séparer, à nouveau, les malades en trois groupes statistiquement différents en ce qui concerne la survie globale (**Tableau 3**).

Risque	Indice calculé	Survie médiane
Faible risque	Inférieure à 780	98 mois
Risque intermédiaire	Entre 780 et 1 480	65 mois
Haut risque	Supérieure à 1 480	42 mois

Tableau 3 : score pronostic de Hasford(48).

2.4. Score ELTS :

Ce score a été défini en 2015, à partir des données au diagnostic de 2205 patients adultes atteints de LMC en phase chronique. Ainsi, ce score sert de référence pour l'évaluation prospective de l'efficacité anti-leucémique à long terme et de la survie globale des patients traités par l'Imatinib en

Chapitre 3 : LMC et Traitement

première ligne. Ce score établi pour la population adulte inclut les paramètres accentuant significativement la probabilité de décès imputable à la LMC. Parmi les facteurs de risque de progression et décès on retrouve un âge plus avancé, un fort pourcentage de blastes circulants, un faible taux de plaquettes et une augmentation de la taille de la rate. Ce score classe les patients en trois groupes (**Tableau 4**).

Risque	Indice calculé
Faible risque	Inférieure à 1,5680
Risque intermédiaire	Entre 1,5680 et 2,2185
Haut risque	Supérieure à 2,2185

Tableau 4 :Score ELTS de Hasford(48).

Ces trois scores pronostiques ont donc été élaborés dans le contexte de traitements différentes leur significativité dépend du traitement institué. Cependant, le score de Sokal reste le plus utilisé en pratique, bien qu'il soit antérieur aux thérapeutiques actuelles (49).

3. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase :

En oncologie, il existe plus d'une centaine de thérapies anticancéreuses par voie orale disponibles sur le marché. Parmi celles-ci, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) représentent une soixantaine de molécules. Les ITK interagissent particulièrement avec les récepteurs de tyrosine kinase, situés sur la membrane des cellules. En interagissant avec ces récepteurs, l'inhibiteur bloque la transmission des différents signaux permettant la prolifération anarchique des cellules, qui sont utilisées dans les trois phases de la maladie et se sont réparties à leur tour en trois (3) générations à savoir :

- 1^{ère} génération : Imatinib.
- 2^{ème} génération : Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib.
- 3^{ème} génération : Ponatinib.

3.1. Imatinib (Gleevec®) :

Est un inhibiteur compétitif de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) qui bloque l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL en se fixant à son domaine catalytique, ce qui va maintenir BCR-ABL sous forme inactive(50). et aura pour conséquence d'inhiber la prolifération des cellules présentant le chromosome Ph, lesquelles vont mourir par apoptose) (51)(52)(53)(54) .Il est indiqué dans le traitement des patients adultes et enfants atteints de LMC chromosome Philadelphie (bcr-abl) positive (Ph+) nouvellement diagnostiquée lorsque la greffe de moelle osseuse ne peut être envisagée comme un traitement de première intention.

3.2. Dasatinib (Sprycel®) :

Le dasatinib, fait partie d'un groupe de médicaments qui inhibent les enzymes appelées protéines kinases. Le dasatinib agit essentiellement en bloquant la protéine kinase Bcr-Abl également des kinases de la famille SRC, d'un certain nombre d'autres kinases oncogènes sélectives dont le c-KIT, des récepteurs de l'éphrine (EPH), et du récepteur β du PDGF. Il se lie aussi bien à la forme active qu'à la forme inactive de l'enzyme BCR-ABL. Cette enzyme est produite par les cellules leucémiques et provoque leur multiplication incontrôlée. En bloquant la kinase Bcr-Abl, ainsi que d'autres kinases, il est contribué à réduire le nombre de cellules leucémiques. Il est indiqué chez l'adulte dans le traitement LMC en phase chronique, accélérée ou blastique, en cas de résistance ou intolérance à un traitement antérieur incluant l'imatinib.

3.3. Nilotinib (Tasigna®) :

Agit de manière très semblable à l'imatinib, c'est à dire est très proche structurellement de l'Imatinib et provoque une inhibition de BCR-ABL entre 20 et 50 fois plus efficace que ce dernier Intérêt clinique important dans le traitement des patients adultes et pédiatrique atteints de LMC à chromosome Philadelphie positive (Ph+) en phase chronique en cas de résistance ou d'intolérance à l'imatinib, et progrès thérapeutique mineur dans la stratégie thérapeutique.

3.4. Bosutinib (bosulif®) :

Se fixe aux sites Ponatinib actifs et inactifs de la protéine Bcr-Abl pour bloquer les signaux de prolifération cellulaire. Il est utilisé pour le traitement de trois phases de la LMC : « phase chronique», «phase accélérée» et «crise blastique», chez les patients qui ont déjà été traités par un ou plusieurs inhibiteurs de la tyrosine kinase (des médicaments indiqués pour la LMC, qui agissent d'une manière similaire à celle de Bosulif) et quand les inhibiteurs de la tyrosine kinase appelés dasatinib, imatinib et nilotinib ne sont pas appropriés. Il est également utilisé pour le traitement des patients chez qui une LMC en phase chronique vient d'être diagnostiquée.

3.5. Ponatinib(Iclusig®) :

Est le dernier ITK approuvé en clinique à l'heure actuelle pour cibler BCR-ABL. Il est actuellement utilisé en seconde ligne après échec avec un premier ITK ou en première ligne si le patient est diagnostiqué avec une mutation T315I) (54) Cette molécule a été fabriquée à partir d'une stratégie dite de structure-based drug design qui a consisté à utiliser la structure protéique de BCR-ABL pour fabriquer une molécule capable d'inhiber à la fois la forme native de BCR-ABL mais également les isoformes portant des mutations responsables des résistances observées en clinique après utilisation d'autres ITKs. Le Ponatinib est ainsi capable de se lier à l'isoforme réfractaire aux autres ITK BCR-ABL T315I par une liaison triple carbone-carbone ce qui permet de minimiser l'encombrement stérique généré par l'isoleucine en position 315 (39).

4. Réponses au traitement :

La surveillance et le traitement de la LMC sont essentiels pour assurer des résultats optimaux et l'objectif principal du traitement est d'obtenir une réponse hématologique, une réponse cytogénétique, une réponse moléculaire et une rémission complète. La surveillance régulière est nécessaire pour évaluer l'efficacité du traitement et détecter les signes de progression de la maladie et le traitement à long terme nécessite une surveillance continue pour minimiser les effets secondaires et assurer une réponse durable (40) .

L'efficacité du traitement se fait à travers des analyses de sang, de la moelle osseuse et des examens radiologiques. Les analyses sanguines sont utilisées pour évaluer les fonctions globulaires, les paires de chromosomes et la quantité de protéines BCR-ABL circulant dans le sang. Les examens radiologiques sont nécessaires pour détecter tout changement dans les organes internes du patient (41).

4.1. La réponse hématologique :

La réponse hématologique complète (RHC) de la LMC est définie comme la normalisation du nombre de globules blancs dans le sang, avec une numération plaquettaire normale et une diminution de la taille de la rate et du foie et elle doit être obtenue en trois mois.

La RHC est un objectif important dans le traitement de la LMC car elle est associée à une meilleure survie des patients et elle est devenue un objectif thérapeutique accessible grâce aux inhibiteurs de tyrosine kinase.

4.2. Réponse cytogénétique :

La réponse cytogénétique de la LMC est caractérisée par la présence d'une anomalie chromosomique spécifique (Philadelphie Ph). La détection de ce gène est importante pour le diagnostic et le traitement Elle peut être effectuée par diverses techniques cytogénétiques, telles que la cytogénétique conventionnelle, la FISH (Fluorescent In Situ Hybridation) ou la PCR (Polymerase Chain Reaction) (39).

Les critères de réponse cytogénétique sont :

- Pas de mitoses Ph+ = réponse complète (CCyR) ;
- De 1 à 35 % de Ph+ = réponse partielle.
- De 35 à 65 % de Ph+ = réponse mineure.
- Au-dessus de 65 % de Ph+ : pas de réponse (42).

Les derniers cas qui présentent échec du traitement doivent motiver un nouveau linge thérapeutique. L'importance de la réponse cytogénétique est confirmée par les études de cohortes : 78 % des patients ayant atteint une CCyR sont en vie dix ans après le diagnostic. La CCyR est donc considérée comme l'objectif du traitement. Jusqu'à son obtention, un caryotype médullaire doit être réalisé tous les trois à six mois, puis sa persistance et une éventuelle évolution clonale doivent être évaluées par caryotype tous les 12 à 24 mois.

4.3. Réponses moléculaires :

L'examen du sang par PCR, une technique extrêmement sensible, permet de détecter même des quantités résiduelles infimes de cellules porteuses d'un gène BCR-ABL. Cette méthode est si précise que même un seul et unique gène BCR-ABL pourra être identifié parmi un million de cellules normales. On parle de bonne réponse génétique moléculaire lorsque le paramètre BCR-ABL a atteint des valeurs inférieures à 0,1% lors de deux tests PCR successifs. Si cet objectif a pu être atteint grâce au traitement, on peut formuler un bon pronostic et espérer avec raison une durée de vie longue sans maladie. L'illustration ci-après décrit la méthode de la PCR (43).

La réponse moléculaire majeure (MMR) a été définie comme un rapport d'expression de BCR-ABL et d'un gène de contrôle inférieur ou égal à 0,1 % (15). La MMR doit être atteinte en 18 mois de traitement dans le cadre d'une réponse optimale.

Cependant, les patients qui n'obtenant pas de réponse moléculaire majeure ne sont pas considérés en échec du traitement :

Il s'agit d'une alerte nécessitant un suivi rapproché. La perte de la MMR est en revanche considérée comme un échec du traitement. Une réponse moléculaire dite complète (CMR) a été définie comme l'indéteçtabilité de BCR-ABL en RT-PCR.

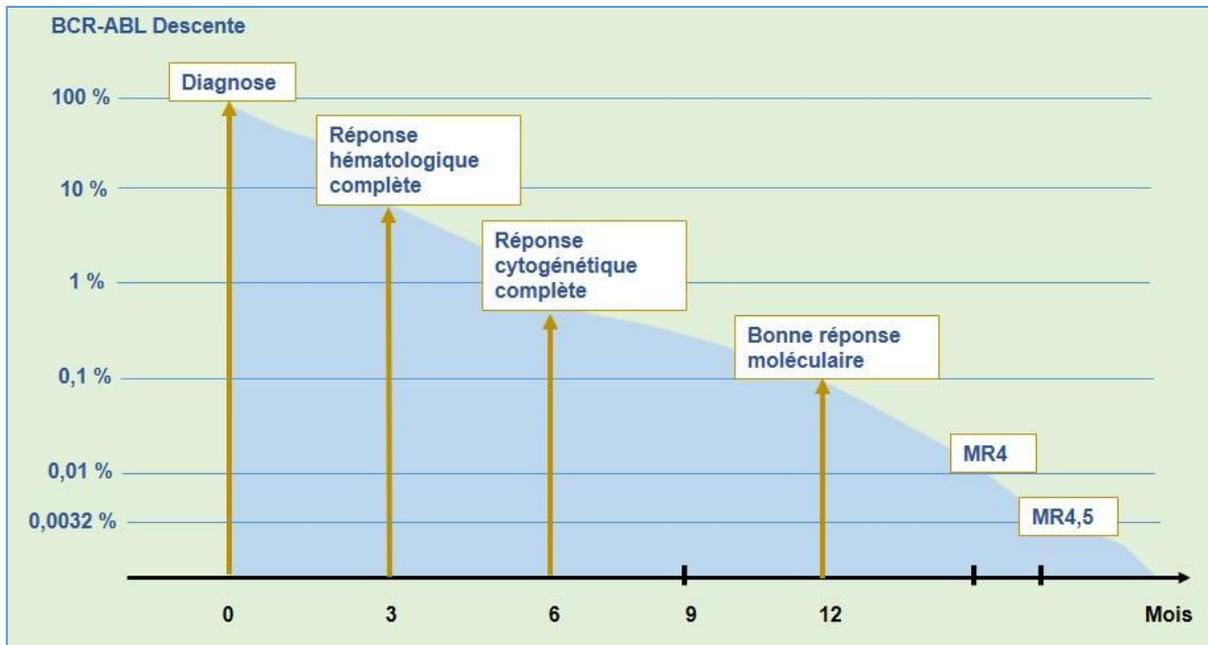


Figure 15 : Les pourcentage du BCR-ABL aux réponse du traitement (21).

PARTIE PRATIQUE

1. METHODOLOGIE

La signification pronostique de l'évolution clonale dans la LMC est variable et dépend de nombreux facteurs, dont le type des changements cytogénétiques, le moment et la phase d'émergence de l'évolution clonale. Bien que la preuve cytogénétique de l'évolution clonale dans la LMC est fréquente à mesure que la maladie progresse pour s'accélérer .phase de déflagration ou de dynamitage, son impact dépend de la spécificité anomalies chromosomiques.

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes anomalies chromosomiques de la leucémie myéloïde chronique en la phase chronique et la phase blastique (accutisation). Nous avons présenté l'apport de la cytogénétique et la cytogénétique moléculaire de la LMC, nous basant sur des résultats et des études différentes dans l'objectif est de comprendre les différents techniques de cytogénétique et cytogénétiquemoléculaire utiliser dans le diagnostic et le suivie de la LMC dans les différents stades de la maladie, chronique, accélération et surtout la phase blastique (accutisation).

Pour cela nous avons utilisé les résultats des études suivantes :

-Etude 1 : Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.

-Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs .

2. MATERIEL ET METHODE UTILISES :

Etude 1: Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (Sawcène Hazourli, 2012).

1. Échantillons de lignées et de cellules étudiés dans ce projet :

Tous les échantillons de patients proviennent de la BCLQ et ont été obtenus avec un consentement du patient. Les échantillons des quatre patients qui ont été utilisés pour ce projet ont été sélectionnés en tenant compte de la morphologie et du pourcentage de blastes (représentatif d'une transformation de la LMC), de leurs anomalies cytogénétiques (translocations chromosomiques additionnelles à la t(9;22), ainsi que de la résistance des patients au traitement.

Pour l'étude d'expression de PRDM16, 105 échantillons ont été étudiés comprenant des échantillons de 90 patients incluant 14 patients avec syndrome myélodysplasique (SMD) et SMD transformés en LAM, 7 avec LMC-PB incluant le cas 02-H056 avec la translocation t(1;21), l'échantillon de la même patiente en phase chronique de la LMC sans la t(1;21), 68 avec LAM de différents types morphologiques (FAB M0, M1, M2, M4, M5) et de différents groupes cytogénétiques avec les translocations chromosomiques t(11q23), t(15;17), t(8;21) et l'inversion 16, inversion (16) (Tableau 5). Dans notre étude, nous avons également utilisé des échantillons de 4 moelles normales (MN), un échantillon de cellules CD34 positives de donneur normal, 5 échantillons de sang périphérique normal (PB), ainsi que des cellules de la lignée HCT-116 et de quatre lignées cellulaires de LMC-PB (K562, KU812, MC3, MEG-01). La lignée HCT116 est une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome colorectal et ces cellules de type épithélial à haute capacité proliférative sont couramment utilisées dans de nombreuses études. Le caryotype de cette lignée est complexe avec un nombre modal de 45 chromosomes. Les lignées K562 et MC3 nous ont été fournies par les Dr Denis-Claude Roy et C. Gambacorti-Passerini respectivement. La lignée K562 a été établie à partir des cellules d'une patiente de 53 ans en transformation blastique de la LMC. Le nombre des chromosomes est triploïde avec une quinzaine de marqueurs chromosomiques. La lignée MC3 est pseudo diploïde et possède deux chromosomes Ph. Les deux lignées KU812 (CRL-2099) et MEG-01 (CRL-2021) ont été fournies par ATCC . La lignée KU812 a été établie à partir du sang

Matériel et Méthode Utilisés

périphérique d'un patient en LMC-PB et le caryotype de cette lignée est à 58 chromosomes avec trois chromosomes Philadelphie ainsi que l'addition de plusieurs chromosomes. La lignée MEG-01 est issue des cellules d'un patient ayant eu une transformation mégacaryoblastique de la LMC avec un caryotype hyper diploïde de 56 à 58 chromosomes. Huit échantillons de patients surexprimant PRDM16 dans notre étude ont ensuite été investigués par FISH afin de vérifier si l'augmentation de l'expression de PRDM16 était liée à la présence d'une translocation chromosomique impliquant PRDM16 ou d'une amplification génique. Neuf échantillons de patients avec des pourcentages de blastes élevés supérieur à 35%, dont quatre patients en LMC-PB, 5 avec des LAM de types morphologiques différents (M1, M2 et M4) et une MN ont été utilisées pour l'étude d'expression des gènes HOXA6, HOXA7 et HOXA9 par RT-PCR (**Tableau 5**). Les échantillons utilisés dans les différentes études dans ce projet sont décrits dans le Tableau 5 .

Code BCLQ	Diagnostic	Investigation par FISH	Investigation moléculaire
00-H059	LMC-PC	FISH pour alteration de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
02H037	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR
02H052	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR, RACE-PCR
02H056	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR
03H054	LMC-PB	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
04H027	LMC-PB	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i> , RT-PCR <i>HOXA</i>
04H049	LMC-PB	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i> , RT-PCR <i>HOXA</i>
06H006	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR, qPCR
08H037	LMC-PB		RT-PCR <i>HOXA</i>
02H003	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
03H030	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
03H039	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
04H096	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
02H009	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
02H025	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H028	M1		qPCR <i>PRDM16</i>

Matériel et Méthode Utilisés

02H041	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H045	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H053	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H060	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H066	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H075			qPCR <i>PRDM16</i>
03H024	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H033	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
03H081	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H094	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H116	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H119	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H001	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H006	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
04H112	M1		RT-PCR <i>HOXA</i>
04H024	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H025	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H048	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H055	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H103	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H120	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
08H053	M1		RT-PCR <i>HOXA</i>
09H002	M1		RT-PCR <i>HOXA</i>
01H002	M3 t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
02H046	M3V t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H070	M3 t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H123	M3 t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H067	M5t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H041	M5B t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H080	M5A t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
05H066	M4 t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H065	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H083	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
05H001	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
05H042	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H141	M2		RT-PCR <i>HOXA</i>
03H109	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H112	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H030	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H061	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H091	M4 inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>

Matériel et Méthode Utilisés

05H050	M4		RT-PCR <i>HOXA</i>
03H017	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
03H060	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
03H097	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H011	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H037	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
04H050	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H063	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H070	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H079	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H134	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
05H005	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
05H009	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
02H004	M6		qPCR <i>PRDM16</i>
02H026	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
02H033	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
03H016	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
03H028	M6B		qPCR <i>PRDM16</i>
03H041	M5		qPCR <i>PRDM16</i>
03H052	M5B	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
04H006	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H054	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H068	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H084	M5B		qPCR <i>PRDM16</i>
04H107	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H118	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
04H132	M4		qPCR <i>PRDM16</i>
04H140	M4		qPCR <i>PRDM16</i>
04H141	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
05H033	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
05H050	M4		qPCR <i>PRDM16</i>
09H027	MN1		RT-PCR <i>HOXA</i>
10H025	MN2		RT-PCR <i>HOXA</i>
07H140	MN3		RT-PCR <i>HOXA</i>

Tableau 5 : Liste des échantillons étudiés dans ce projet et technique utilisée.

Chaque patient a un numéro d'identification de la BCLQ pour codifier l'échantillon de sang ou de moelle. Les patients avec réarrangements de la bande 11q23 (gène *MLL*), translocations t(15;17)/fusion *PMLRARA*, et inversion du chromosome 16, inv(16)/fusion *CBFβ/MYH11*, ont été confirmés par FISH. Le type morphologique de la leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans la 66 classification FAB est noté (M0 à M6). LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique ; LMC-PC, leucémie myéloïde chronique en phase chronique ; SMD, syndrome myélodysplasique ; MN1 2 3, moelles normales 1, 2, 3.

2. Caryotype en bandes G obtenu suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa :

La découverte de Hsu T.C en 1952 permettant la distinction des chromosomes a marqué le début de la cytogénétique standard (le caryotype) .Des améliorations ont ensuite été apportées à la technique, favorisant une augmentation du nombre et de la qualité des métaphases)(37) (38). Malgré sa faible résolution, le caryotype est devenu un outil important utilisé en recherche et en clinique, permettant une analyse globale des anomalies chromosomiques numériques et structurales des cellules. Le marquage chromosomique en bandes GTG (bandes G obtenues suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa) est la technique de marquage chromosomique la plus utilisée dans l'investigation des réarrangements chromosomiques dans les cancers.

- **Culture cellulaire**

Dans notre laboratoire, 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. no. 12260-014) ou le RPMI 1640 (Invitrogen; cat no.11875-093). Le MarrowMax est un milieu complet spécifique pour la culture des cellules hématopoïétiques. Il est composé de sérum de veau fœtal, 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 fœtal, 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

Matériel et Méthode Utilisés

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

- **Récolte :**

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.

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 (dans notre laboratoire : CytoVision, Leica Microsystems). 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) (41) .

3. Caryotype spectral :

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. Les sondes obtenues commercialement (Applied Spectral Imaging) ont été préparées suite à la séparation des chromosomes par cytométrie en flux. (40) Ou par microdissection (43). Par la suite, grâce aux amorces aléatoires dégénérées, des amplifications ont été réalisées pour chaque chromosome par la réaction DOP-PCR (43). Le marquage des sondes de peinture spécifique à chaque chromosome est

Matériel et Méthode Utilisés

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. Le principe du SKY est le même que celui de l'hybridation in situ en fluorescence « FISH » (voir paragraphe suivant). Quatre étapes principales sont nécessaires pour réaliser la technique de SKY :

- Préparation des lames
- Dénaturation de l'ADN double brin de la sonde et de la cible sur lame (métaphases pour le SKY, cellules interphasiques et métaphases pour le FISH)
- Hybridation de la sonde à l'ADN cible et lavages
- Détection des sondes et analyse des images.

- **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.

Matériel et Méthode Utilisés

- **Dénaturation de l'ADN cible et de la sonde :**

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).

- **Hybridation et lavage :**

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 ul) 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/Tween 20 0,1% à 45°C pendant 3 minutes. Puis, 80 ul 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. L'analyse est effectuée dans notre laboratoire avec le 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 CUBETM, Applied Spectral Imaging) permettant l'identification des chromosomes.

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

Matériel et Méthode Utilisés

interphasiques ou des chromosomes métaphasiques. Trois étapes principales sont nécessaires pour réaliser la technique du FISH :

- Dénaturation de la sonde et de la lame.
- Hybridation et lavages.
- Visualisation des sondes et analyse des images.

- **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.

- **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 : sondes commerciales généralement de grande taille, ou sondes préparées au laboratoire à partir de vecteurs de type BACs ou PACs. Un deuxième lavage se fait à température pièce dans une solution 2X SSC/0,1% NP-40 pendant quelques secondes à une minute dépendamment de la sonde utilisée. Dans le but de maximiser le signal d'hybridation spécifique et de minimiser les signaux générés par une hybridation non spécifique (bruit de fond), une optimisation des conditions de lavages nécessaire pour chaque sonde utilisée. En général, pour les sondes BACs/PACs, de plus petites tailles que les sondes commerciales, les conditions de lavage sont moins astringentes. De plus, une validation de la localisation de ces sondes en les hybridant sur des préparations métaphasiques de sujets normaux est nécessaire.

Matériel et Méthode Utilisés

- **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) dans notre laboratoire.

Nom de la sonde	Localisation	Genes /locus	Caracteristiques	Utilisation dans le projet
<i>ES-BCR-ABL1</i> (<i>extra signal BCR-ABL1</i>)	9q34.1	<i>ABL1</i>	<u>Sonde LSI <i>ABL1</i> :</u> - spectrum orange - taille 650 Kb - couvre les gènes <i>ABL1</i> et <i>ASS</i>	Confirmation de la fusion <i>BCR-ABL1</i> chez les patients atteints de LMC
	22q11	<i>BCR</i>	<u>Sonde LSI <i>BCR</i> :</u> - spectrum vert - taille 300 Kb - couvre la majorité du gène <i>BCR</i> (exons 1 à 14).	
<i>RUNX1/RUNXIT1 DF</i> (<i>double fusion</i>)	8q21.3	<i>RUNXIT1</i>	<u>Sonde LSI <i>RUNXIT1</i> :</u> - spectrum orange - taille 655 Kb - couvre le gène et une région adjacente	Investigation du réarrangement de <i>RUNX1</i> dans la t(1;21) ainsi que chez les patients qui surexpriment <i>PRDM16</i>
	21q22	<i>RUNX1</i>	<u>Sonde LSI <i>RUNX1</i> :</u> - spectrum vert - taille 1,4 Mb - couvre le gène et une région adjacente	
<i>ETV6/RUNX1</i> « <i>ES Dual Color</i> »	12p13	<i>ETV6</i>	<u>Sonde LSI <i>ETV6</i> :</u> - spectrum vert - taille 350 kb - couvre la partie 5' <i>ETV6</i> (exons 1 à 4) et une région adjacente	Investigation du réarrangement de <i>RUNX1</i> dans la t(1;21) et du réarrangement de <i>ETV6</i> dans la t(2;12)
	21q22	<i>RUNX1</i>	<u>Sonde <i>RUNX1</i> :</u> - spectrum orange - taille 500kb - couvre tout le gène et une région adjacente	
<i>ETV6 Dual Color</i> « <i>Break Apart</i> »	12p13	<i>ETV6</i>	- couvre les deux parties 5' et 3' de <i>ETV6</i> , de deux couleurs différentes. <u>Sonde 3' d'<i>ETV6</i> :</u>	Investigation du réarrangement de <i>ETV6</i> dans la

Tableau 6 : Liste des sondes Abbott utilisées dans ce projet (58).

Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs (CohortStudy)(Turk J Hematol ,2022).

Cette étude a été menée selon les directives présentées dans la Déclaration d'Helsinki, et il a été approuvé par le Comité d'éthique de la pratique clinique concerné (2021-49).

Il s'agit d'une étude rétrospective basée sur les données cytogénétique de 450 patients Turqui (213 femmes et 237 hommes), nouveaux et anciens, diagnostiqué par LMC dans la période de 2005 à 2020.

Le caryotype standard, l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) et la réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse (RT-PCR quantitative), techniques de diagnostic cytogénétique et moléculaire, qui ont été utilisée pour le diagnostic et le suivi.

Dans cette étude, ils ont comparé, les patients avec ACAs et les patients avec CCAs et leurs effets sur le pronostic de LMC. De plus, ils ont évalué uniquement les patients Ph(+) (n=50) en termes de CCyR, MMR, OS et stades de la maladie.

3. RÉSULTATS DES ETUDES :

Etude 1 : Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (Sawcène Hazourli, 2012).

1. La translocation $t(1;21)(p36.3;q22.1)$ en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H056) :

Une patiente de 60 ans LMC avec présence d'un chromosome Philadelphie Ph(+), dans toutes les mitoses analysées, ainsi que la fusion *BCR-ABL1* (transcrit b3a2) par RT-PCR. La formule chromosomique est la suivante : $46,XX,t(9;22)(q34;q11.2),?del(21)(q22)$ (64).

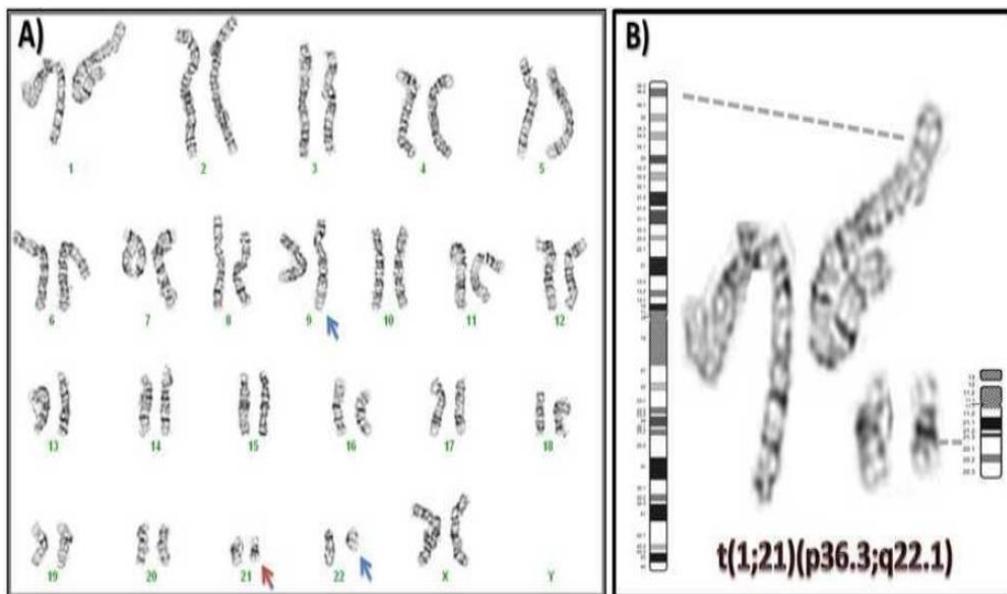


Figure 16 : caryotype bande G montre une translocation chromosomique $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (flèches bleues) ainsi qu'une asymétrie au niveau des bras longs du chromosome 21 (flèche rouge) suggérant une délétion ou une translocation chromosomique cryptique



Figure 16 : Le caryotype spectral (SKY)

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).

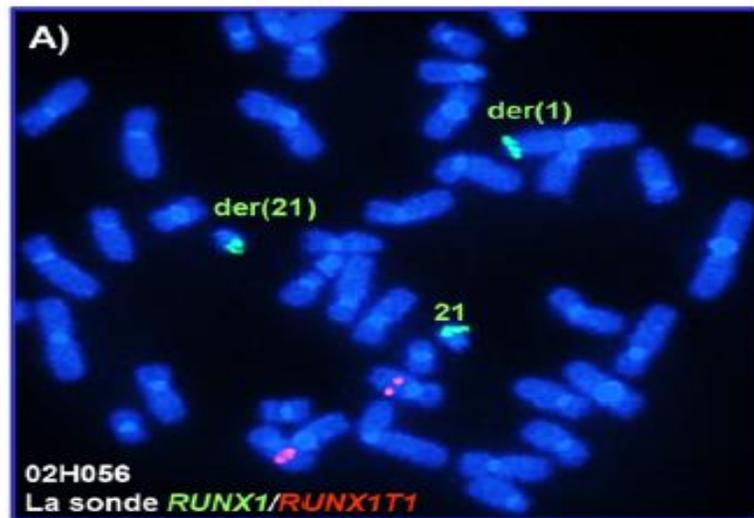


Figure 17 : Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur métaphases,

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

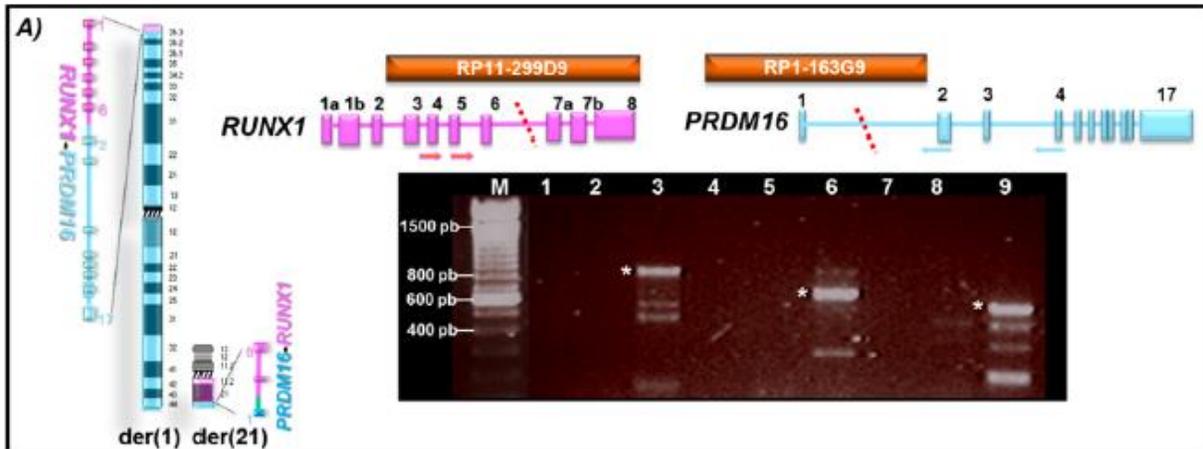


Figure 18 : Les résultats de l'analyse FISH suggèrent une fusion

De la partie 5' de *RUNX1* avec la partie 3' de *PRDM16* sur le chromosome dérivé, der (1) et une fusion potentielle de la partie 5' de *PRDM16* avec la partie 3' de *RUNX1* sur le chromosome dérivé, der(21).

2. Investigation de la translocation t(7;17)(p15;q22) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 06H006) :

Un patient âgé de 37 ans, l'analyse FISH a démontré une fusion *BCR-ABL1* et chromosome Philadelphie Ph(+)

La formule chromosomique a été établie comme suit :

46,XY,t(7;17)(p15,q2?2),t(9;22)(q34.1;q11.2)[9]/47,idem,+der(22)t(9;22)(q34.1;q11.2)[14]

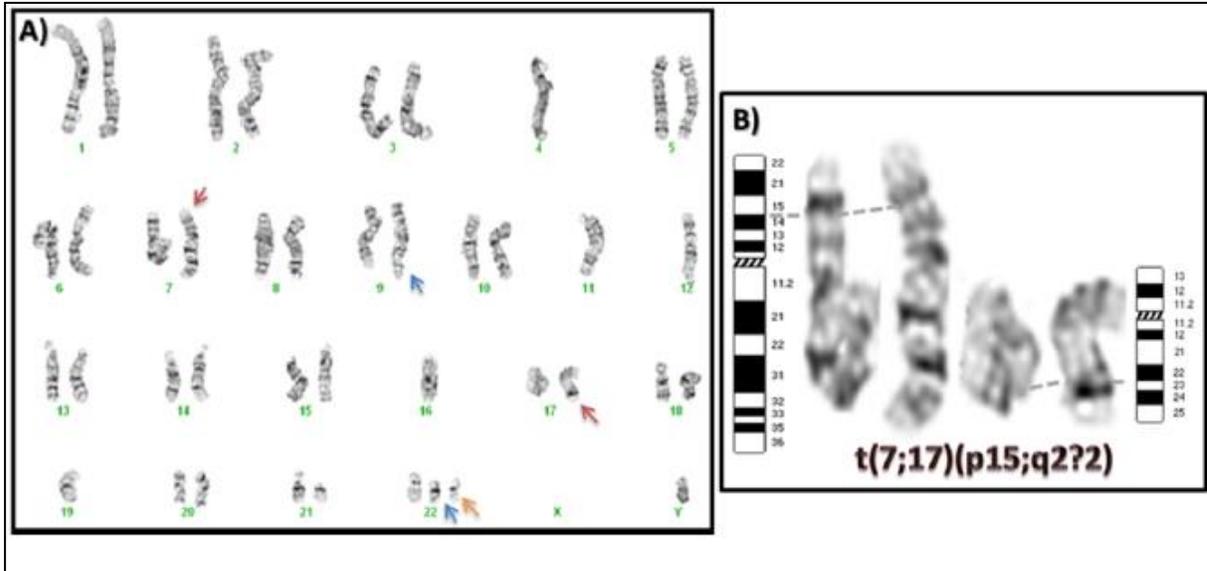


Figure 19 : translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$

(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)
 $t(7;17)(p15,q2?2)$

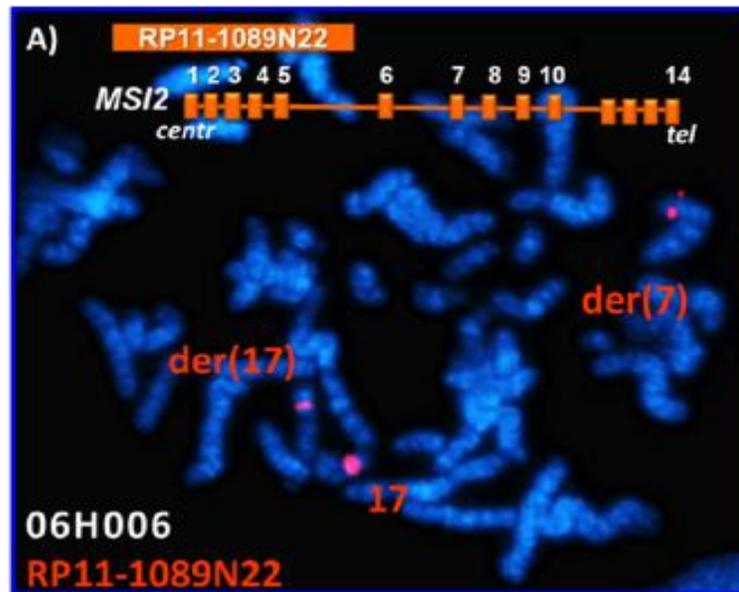


Figure 20 : Identification du réarrangement du gène MSI2 dans la translocation $t(7;17)(p15;q22)$ par hybridation in situ en fluorescence.

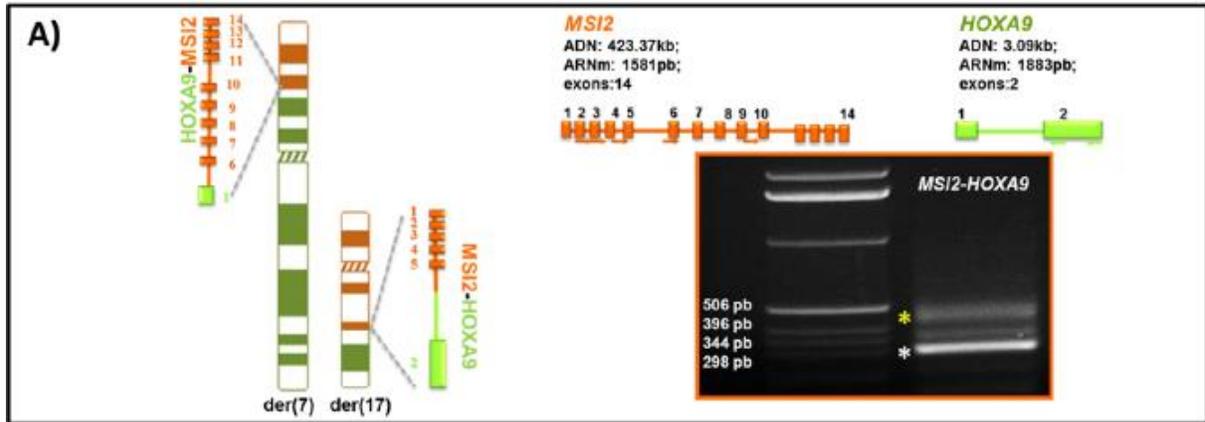


Figure 21 : Identification des transcrits de fusion MSI2-HOXA9 dans la translocation.t (7;17).

3. Investigation de la translocation t(8;17)(q11;q22) en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H037) :

un patient de 40 ans, le caryotype standard a montré la formule chromosomique suivante :

47,XY,t(8;17)(q1?1;q2?2),t(9;22)(q34.1;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34.1;q11.2)[21]

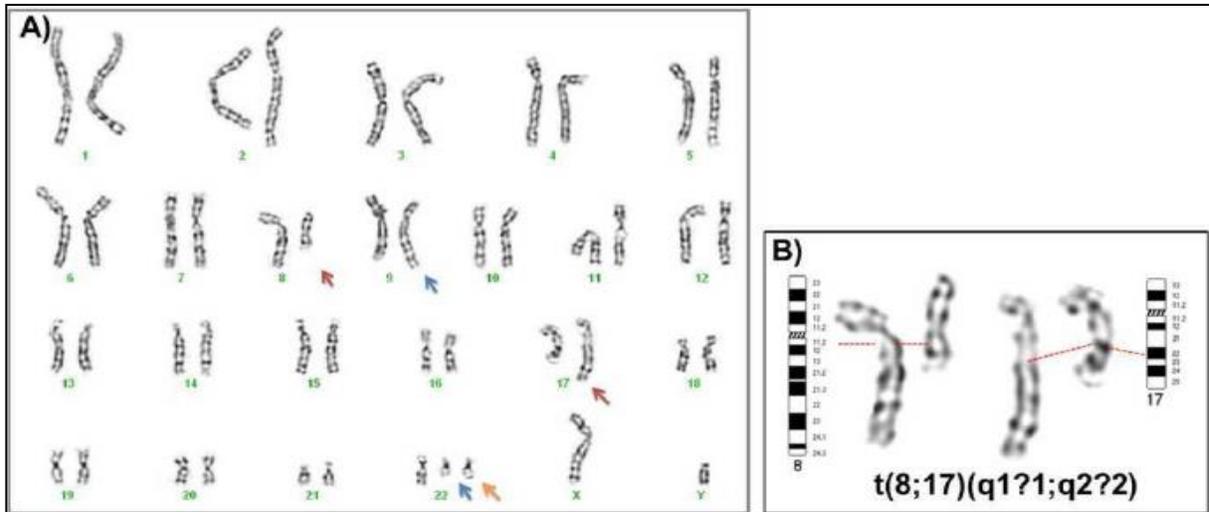


Figure 22 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(8,17) t(9;22) et t(8;17) chez le patient 02H037 : une translocation t(9;22)(q34.1;q11.2) (flèches bleues), un deuxième Ph (flèche orange), ainsi qu’une translocation chromosomique entre les bras longs des chromosomes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

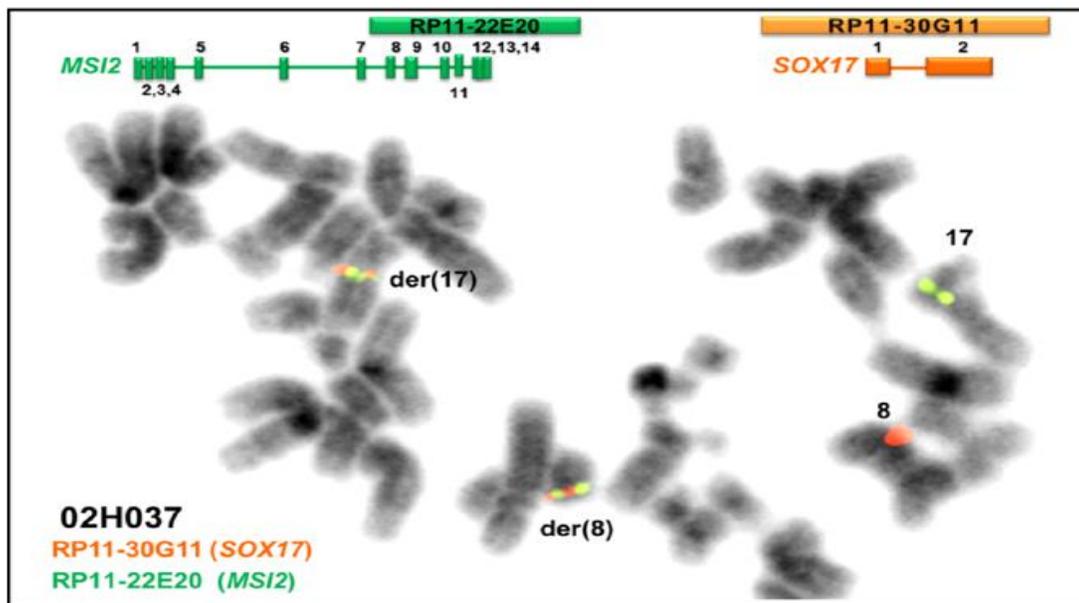


Figure 23 : Identification de la fusion *MSI2-SOX17* dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.

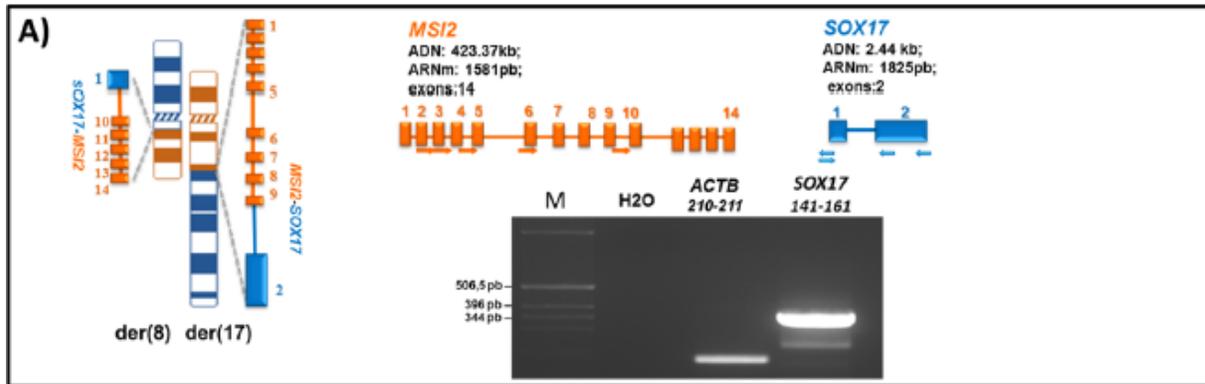


Figure 24 : Les résultats de l'analyse FISH suggèrent une fusion *MSI2-SOX17* sur le chromosome dérivé 17, der(17), et une fusion potentielle *SOX17-MSI2* sur le chromosome dérivé 8, der(8).

4. Investigation de la translocation t(2;12) dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H052)

Il s'agit d'un patient de 49 ans avec la formule chromosomique :

45,XY,t(2;12)(q31;p13),der(9)t(9;22)(q34;q11.2),-22[3]/47,XY,t(2;12)(q31;p13),

t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[15]/46,XY[3].

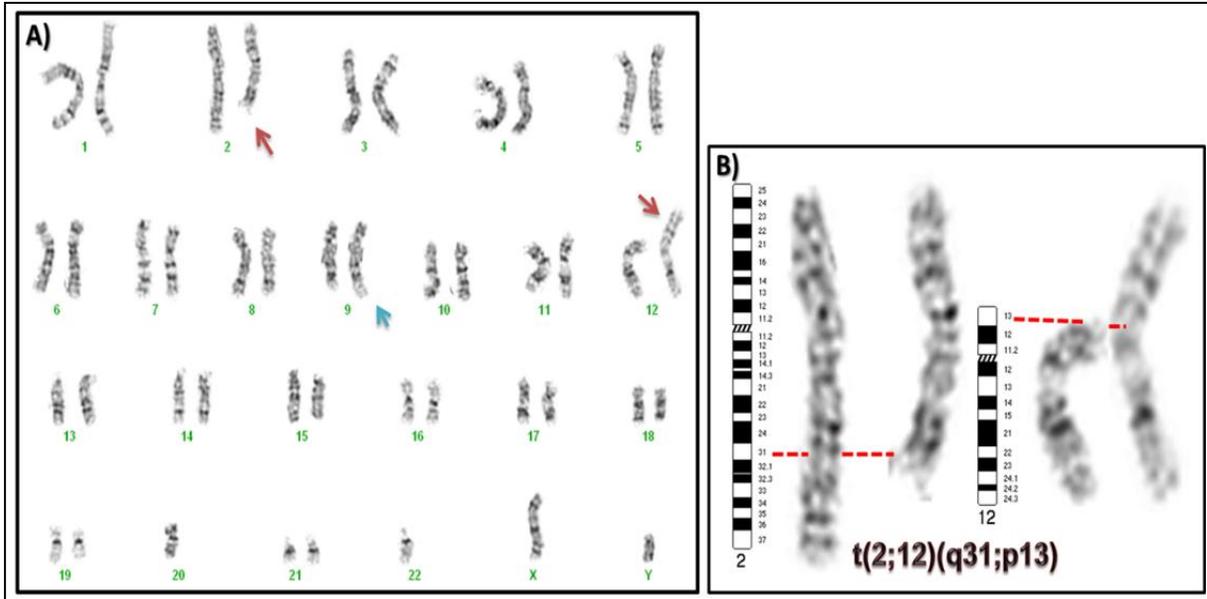


Figure 25 : Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(2;12) chez le patient 02H052.

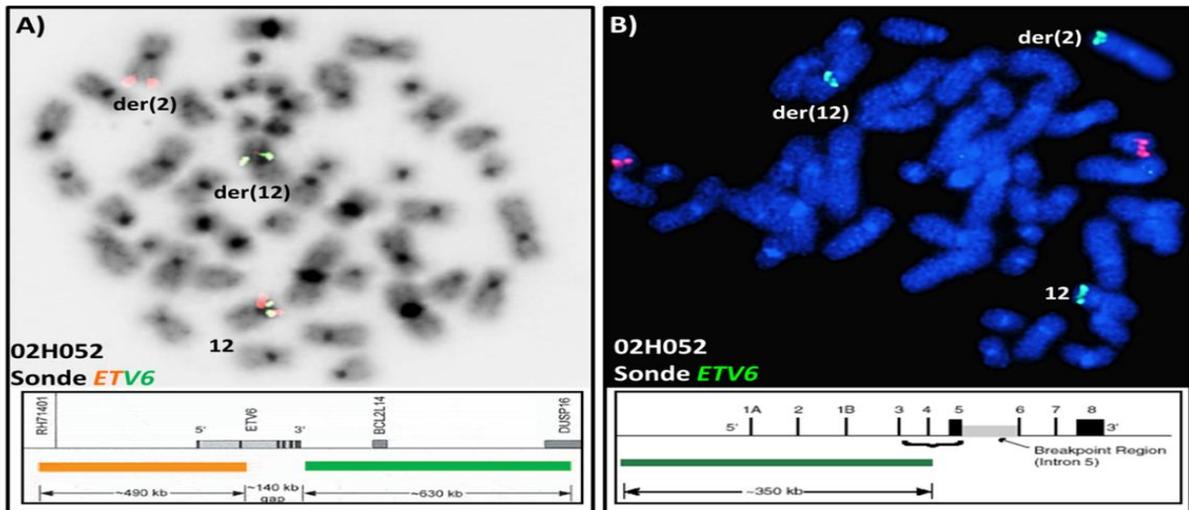


Figure 26 : Identification d'un réarrangement du gène *ETV6* par hybridation in situ en fluorescence dans la t(2;12)(q31;p13) chez le patient 02H052.

Résultats

Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs (CohortStudy)(Turk J Hematol ,2022).

Dans l'analyse cytogénétique et FISH, les ACAs et les CCAs ont été détectés dans 41 cas sur 450 (9,11 %). Ils ont détecté les CCAs chez 12 patients et les ACAs chez 29 patients.

L'âge moyen de ces patients était de $55 \pm 16,18$ ans, et 15 (37 %) étaient des femmes tandis que 26 (63 %) étaient des hommes.

Chez les 12 patients avec CCAs, deux patients à la phase blastique (BP) et le reste à la phase chronique (CP), ont été traité par : imatinib (n=5), dasatinib (n=1), nilotinib (n=2), and azacitidine (n=2). La MMR est observée chez 3 cas parmi 9 cas et la CCyR est observée chez 1 cas parmi 8 cas.

Parmi les 29 patients présentant des ACAs :

- Quatorze cas ont traité par imatinib, 5 avec dasatinib, 7 avec nilotinib, and 1 avec azacitidine.
- Vingt-deux cas, ont été à la phase chronique (CP) et 5 patients à la phase blastique (BP) représentant une leucémie aiguë.
- MMR est détecté chez 8 parmi 26 cas,
- CCyR est détecté chez 10 parmi 23 cas.

Les résultats de cytogénétique conventionnelle ont été très distincts entre les patients ayant des ACAs et les patients ayant CCAs parmi les 41 patients :

- 41/450 cas possèdent des anomalies soit de type MRAs et de type MiRAS
- L'anomalie chromosomique la plus commun était +8 (la trisomie 8), qui a observé chez 16/41 patients (39.02%), dont 5 patients parmi 16 (31.25%) ayant CCAs (Ph(-)).
- LOY, délétion du chromosome Y, est identifiée chez 4 les patients ayant ACAs parmi les 41 patients, dont un cas portant une trisomie 8 en plus.
- Un chromosome de Philadelphie dupliqué est retrouvé chez 9/41 patient (21.95%)
- Des caryotypes complexes sont observés chez 2/41patients (4.87%)

DISCUSSION

La présence du chromosome Philadelphie a un rôle important dans le diagnostic et le pronostic de LMC. Actuellement, la thérapie par les inhibiteurs tyrosines kinases est très bien réussissent.

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) (67).

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 le 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**(68).

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)

Etude 01 :Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (Sawcène Hazourli, 2012).

1. Caractérisation de la translocation t(1;21) et identification des fusions *RUNX1-PRDM16*, des formes tronquées de *RUNX1* et activation de *PRMD16* :

Dans la translocation chromosomique cryptique t(1;21)(p36.3;q22), nous avons identifié et rapporté un réarrangement des gènes *RUNX1* (antérieurement nommé *AML1*) et *PRDM16* (antérieurement nommé *MEL1*) (53).

Le facteur de transcription *RUNX1* « runt-related transcription factor 1 » est la sous-unité alpha du CBF « Core Binding Factor ». Le complexe protéique CBF α /CBF β se lie à l'ADN cible aux séquences *enhancer* (TGTGGT) au niveau des régions régulatrices de plusieurs gènes importants pour la différenciation hématopoïétique, dont *CSF1R*, *CSF2* (54), *CD4* (55), *IL3* (19) et *BLK* (22).

RUNX1 est fréquemment altéré dans les leucémies par des remaniements chromosomiques, des mutations ponctuelles ou une amplification associées à différents types de leucémie dont la LAM, la LAL, ainsi que la LMC en phase blastique(56).

Quant à *PRDM16* (PR domain containing 16), il code pour une protéine en doigts de zinc avec un domaine PR (PRDI-BF1-RIZ1 homologous), qui est capable de se lier à l'ADN pour faire la régulation de la transcription. Cette famille de gènes comprend aussi *MDS1-EVII/MECOM* (3q26), *RIZ1/PRDM2* (1p36), *BLIMP-1/PRDM1* (6q21) et *PFM1/PRDM4* (12q23). Cette famille serait impliquée dans les cancers humains de deux façons différentes dépendamment de la présence ou de l'absence du domaine PR (25).

Dans l'étude 01, la translocation t(1;21) est la fusion des exons 5 et 6 de *RUNX1* avec le gène partenaire, suggère que le point de cassure génomique est localisé au niveau de l'intron 5 et/ou 6 du gène *RUNX1*, un des points de cassure communs de plusieurs translocations *RUNX1* dans les leucémies. En effet, il a été identifié dans les translocations chromosomiques les plus fréquentes, soit la t(8;21)(q22;q22) et la t(3;21)(q26;q22).

Discussion

Cette région a été associée à des sites de fixation de l'enzyme topoisomérase II ou des sites d'hypersensibilité à la DNase.

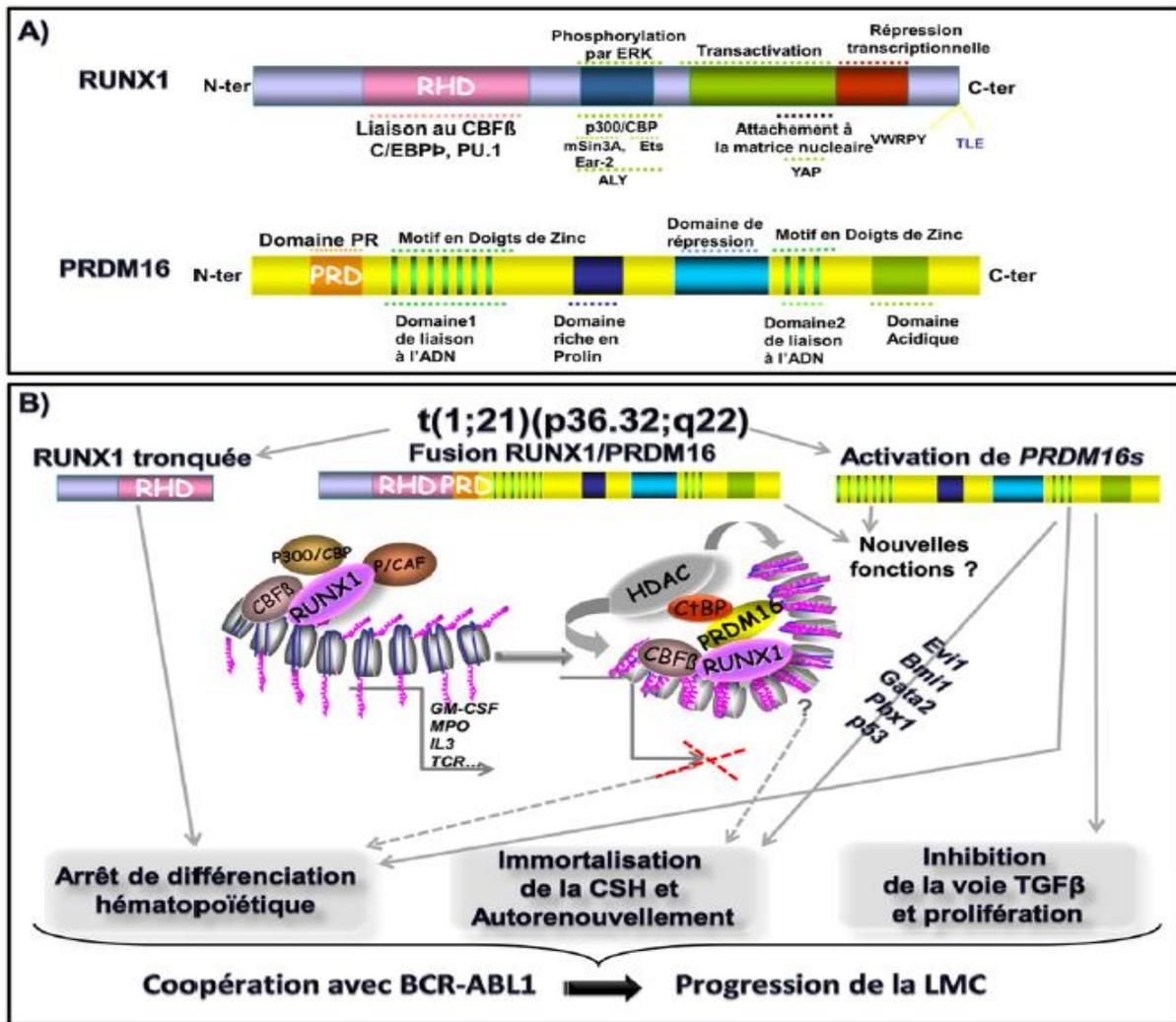


Figure 27 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(1;21) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (58).

Les protéines de fusions prédites RUNX1-PRDM16, contiennent le domaine RHD de RUNX1 qui est le site de liaison à l'ADN des gènes cibles de RUNX1, et le site d'hétérodimérisation avec CBFβ (Figures). Une hypothèse possible est que le rôle de RUNX1 dans la différenciation hématopoïétique pourrait être affecté suite à l'interaction de RUNX1 (allèle transloqué) avec CBFβ. En effet, si CBFβ a plus d'affinité avec RUNX1 muté, le fonctionnement de RUNX1 normal pourrait être perturbé.

Discussion

L'effet oncogénique de la fusion *RUNX1-PRDM16* n'est été pas bien étudié, soit celui de l'activation de la forme courte de *PRDM16*, la surexpression de *PRDM16s* pourrait bloquer la différenciation des cellules immatures (CSHs/progéniteurs), et/ou augmenter la survie et l'autorenouvellement de ces cellules. D'autres mécanismes potentiels, détaillés dans la figure 39, sont aussi possibles. Des études fonctionnelles seront nécessaires pour étudier les effets oncogéniques de cette nouvelle fusion(56).

2. Caractérisation de la translocation t(7;17) et identification des fusions *MSI2-HOXA*, des formes tronquées de *MSI2* et activation de plusieurs gènes du cluster *HOXA* :

L'investigation de la t(7;17) a révélé l'implication de quatre gènes, dont *MSI2* au niveau de la bande chromosomique 17q22 et trois gènes du cluster *HOXA*, *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11*, au niveau de la bande chromosomique 7p15 dans la phase blastique de la LMC.

Chez l'humain, les études d'expression ont démontré que *HOXA9* est surexprimé dans plusieurs LAM et est un marqueur de mauvais pronostic (57).

Suite au réarrangement du locus *HOXA* et au positionnement des gènes *HOXA* en aval de *MSI2* l'effet des éléments régulateurs en *cis* et en *trans* du locus *HOXA* pourrait être altéré.

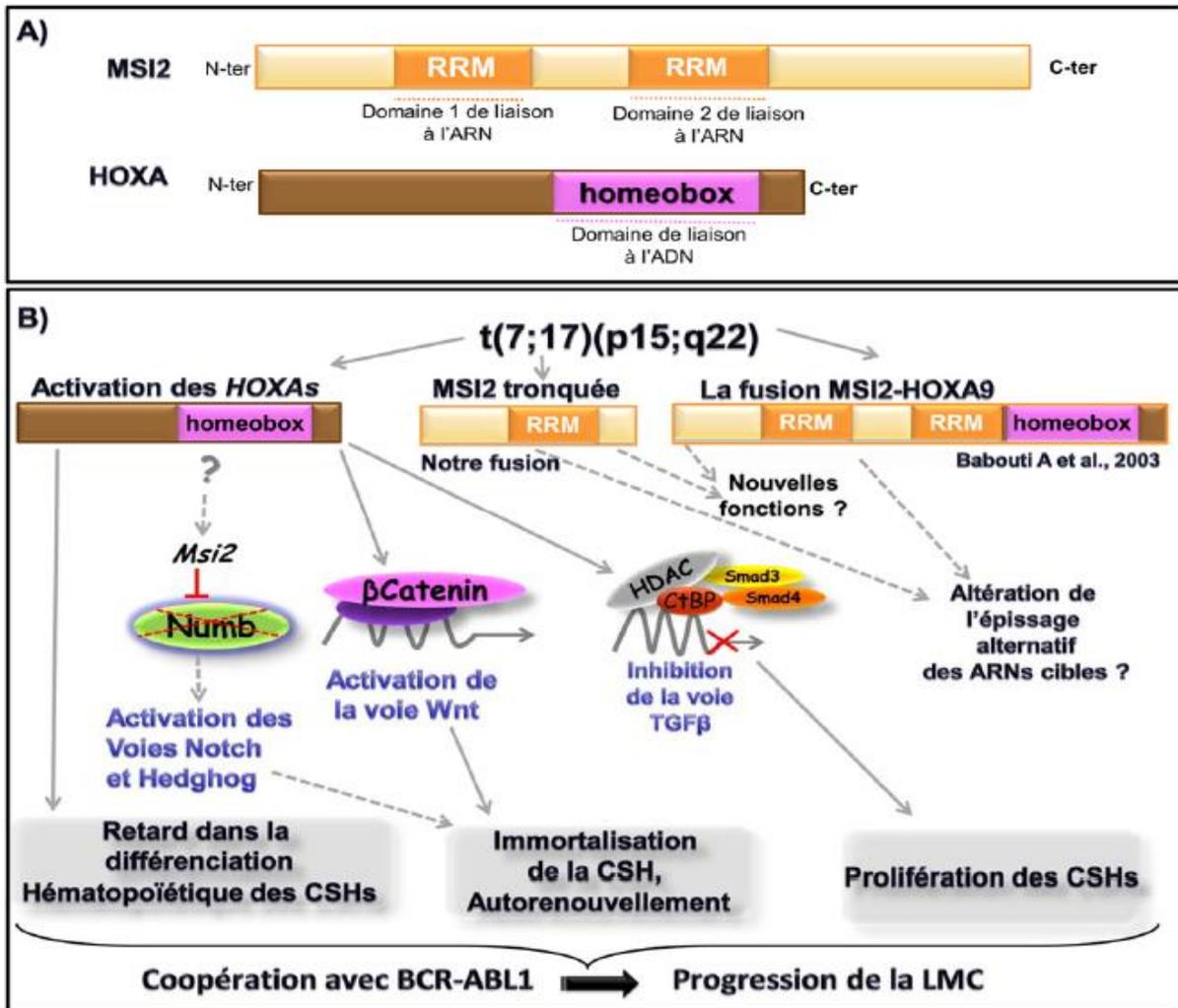


Figure 28 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(7;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (58).

La protéine MSI2 possède deux domaines de liaison à l'ARN, les domaines RRM (RNA recognition motif). Les protéines HOXA possèdent un domaine de liaison à l'ADN, le domaine homéobox.

Suite à la t(7;17), il y a formation d'une forme tronquée de *MSI2* qui pourrait être traduite en une protéine prédite avec un seul domaine RRM. Cette protéine pourrait potentiellement affecter l'épissage alternatif des ARN cibles, avoir de nouvelles fonctions et/ou être impliquée dans l'immortalisation et/ou la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). L'activation des gènes *HOXA* pourrait affecter la différenciation hématopoïétique et être impliquée dans

l'augmentation de la prolifération et de l'autorenouvellement des CSHs par différentes voies comme la voie Wnt ou l'activation des voies Notch et Hedghog. Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCRABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC) (53).

3. Caractérisation de la translocation t(2;12) et identification de la fusion *ETV6-HOXD11*, d'une forme tronquée de *ETV6* et activation de *HOXD9* :

Le gène *ETV6* (ETS variant gene 6) code pour un répresseur de la transcription. Il fait partie de la famille des facteurs de transcription ETS (E-twenty six) essentiels pour l'hématopoïèse adulte. Lorsqu'altéré, il joue un rôle important dans plusieurs types de cancers, incluant les leucémies (Bohlander, 2005). Le rôle de *ETV6* au niveau de l'hématopoïèse adulte a été démontré par Wang et al (58).

Suite à la t(2;12), il y a une activation de *HOXD9* qui pourrait augmenter la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). L'altération d'un des deux allèles de *ETV6* lors d'une translocation chromosomique pourrait induire une différenciation hématopoïétique anormale mais aussi une anomalie du pool des CSHs . Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCR-ABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC) (59)(56) .

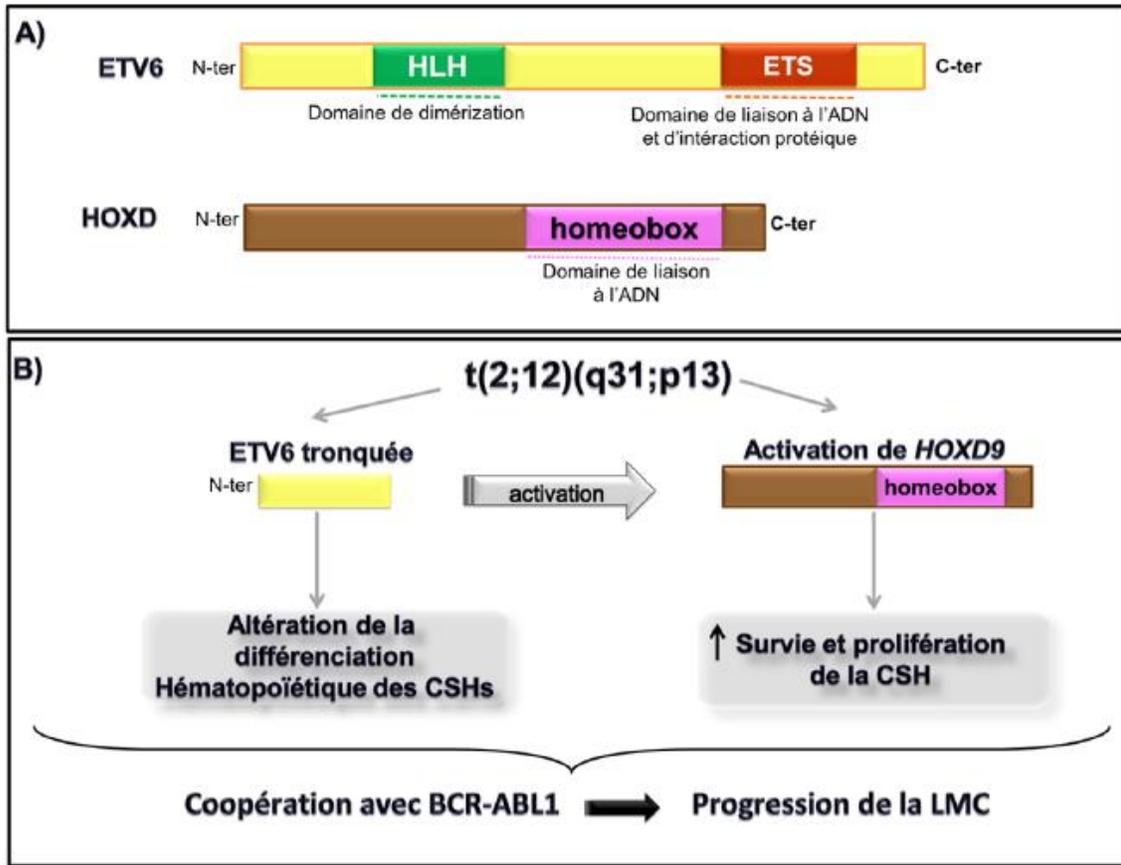


Figure 29 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(2;12) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique(58).

4. Caractérisation de la translocation t(8;17) et identification de l'altération des gènes *MSI2* et *SOX17*

L'investigation de la translocation chromosomique t(8;17)(q11;q22) a révélé une altération du gène *MSI2* et du locus *SOX17*. L'étude 01 présente pour la première fois la caractérisation moléculaire de cette translocation récurrente.

Suite à la t(8;17), il y a la formation d'une forme tronquée de *MSI2* qui peut donner une protéine prédite avec un seul domaine RRM, qui pourrait affecter l'épissage alternatif des ARN cibles, avoir de nouvelles fonctions et/ou être impliquée dans l'immortalisation et/ou la prolifération des CSHs. L'activation de *SOX17* sous forme d'un nouveau transcrit, pourrait activer la voie de signalisation Wnt et augmenter l'autorenouveau et la prolifération des cellules souches

Discussion

hématopoïétiques (CSHs). L'activation de *SOX17* pourrait aussi inhiber la voie de signalisation $TGF\beta$ ce qui va entraîner une augmentation de la prolifération. Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCR-ABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC)(58).

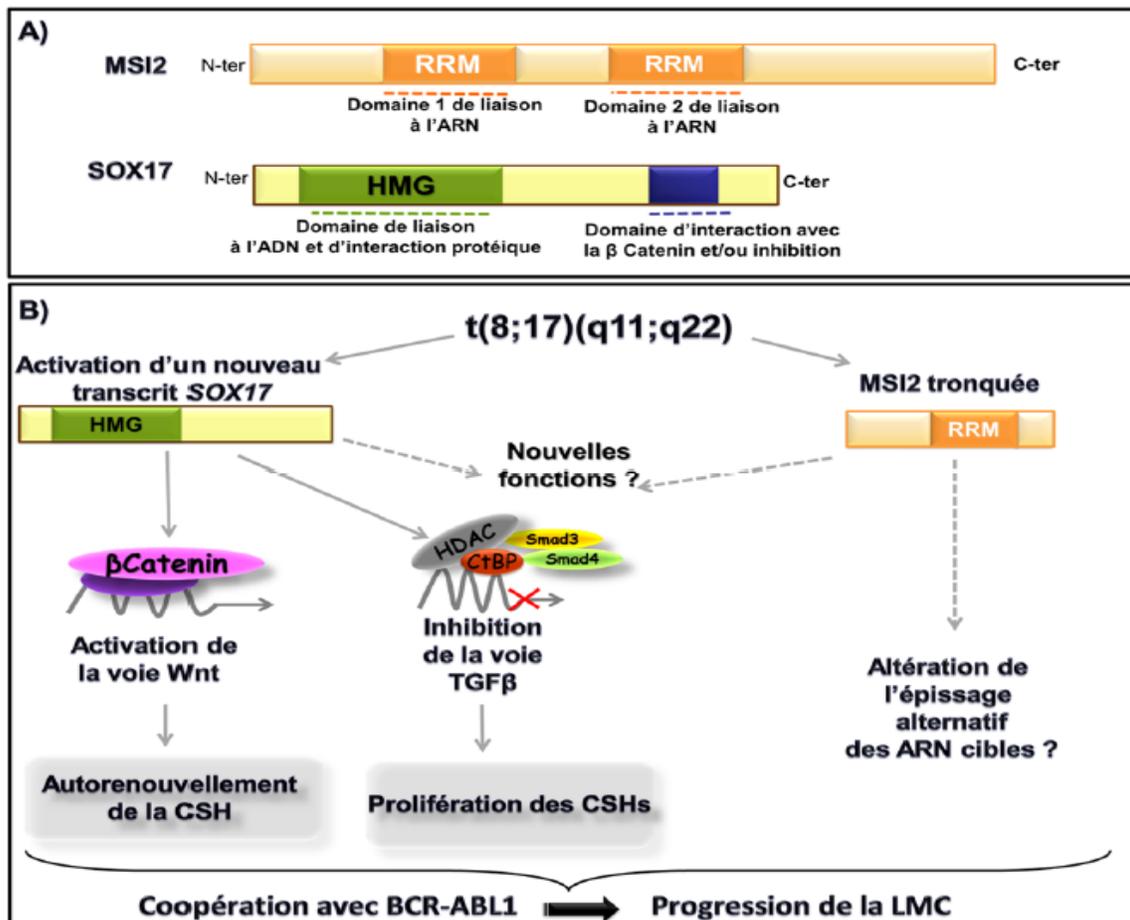


Figure 30 : Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(8;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (58).

Discussion

Etude 2 : L'impact des aberrations cytogénétiques dans l'évolution clonale de la leucémie myéloïde chronique : une expérience monocentrique parmi 450 patients turcs (Cohort Study)(Turk J Hematol ,2022).

Dans l'analyse cytogénétique et FISH, les ACAs et les CCAs ont été détectés dans 41 cas sur 450 (9,11 %), ce qui est conforme à la littérature (entre 5%-12.7%)(73)(74).

L'âge moyen de ces patients ($55 \pm 16,18$ ans) était également conforme aux données de la littérature (entre 30 et 60 ans). De plus, On remarque une prédominance masculine (Hommes : 26 (63 %) et femmes : 15 (37 %)), avec sex ratio : 1.70 conforme à la littérature (1.4 à 2.2) (75).

La majorité des anomalies chromosomiques observées dans cette étude sont à haut risque et qui donne un mauvais pronostic, anomalies « major route » **MRAs** :

- L'anomalie chromosomique la plus commune était **+8** (la trisomie 8), qui a été observée chez 16/41 patients (39.02%) anomalies « major route » **MRAs**, qui représente un mauvais pronostic.
- Un cas portant LOY et une trisomie 8 en plus, ce qui donne un mauvais pronostic et augmente le risque.
- Un chromosome de Philadelphie dupliqué est retrouvé chez 9/41 patients (21.95%), anomalies « major route » **MRAs**, qui représente un mauvais pronostic.
- Des caryotypes complexes, qui sont classés à haut risque, sont observés chez

Cependant, Trois patients LOY, délétion du chromosome Y, anomalies « mineur route » **MiRAs** à faible risque.

Conclusion

CONCLUSIONS :

- L'identification de différents types de transcrits de fusion, d'épissages alternatifs et/ou une expression aberrante des gènes réarrangés dans ces translocations chromosomiques nous a permis de distinguer trois conséquences possibles de ces translocations.

1) la formation de gènes de fusion avec des séquences qui correspondent à des domaines des deux gènes impliqués, générant une possible protéine chimérique avec un gain de fonction ayant un potentiel oncogénique. C'est le cas de la t(1;21)/*RUNX1-PRDM16*.

2) l'activation de l'expression des gènes impliqués dans les translocations, tel que décrit pour la translocation t (1 ; 21) avec activation de *PRDM16*, les translocations t (7 ; 17) et t (2 ; 12) avec activation des gènes *HOXA/D* et la translocation t (8 ; 17) avec activation de *SOX17*.

3) un épissage alternatif aberrant donnant de nouvelles formes tronquées tel que les formes tronquées de *RUNX1*, *ETV6* et *MSI2*.

- Les ACA et les CCA ont des effets négatifs sur MMR, avec un mauvais pronostic

- La détection de ces aberrations cytogénétiques est importante car elles offrent des signaux d'alerte pour le traitement de la LMC et le suivi des patients. De plus, à mesure que de plus en plus d'anomalies chromosomiques sont signalées, leur signification pronostic deviendra plus claire. Enfin, ces anomalies ne peuvent être détectées que par des méthodes cytogénétiques, indiquant que la méthode cytogénétique conventionnelle est toujours considérée comme la norme dorée.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES

1. **TEFFERI A, THIELE J, et VARDIMAN JW.***The 2008 WorldHealthn Organization Classification System for MyeloproliferativeNeoplasms. Cancer.* 2009.
2. **MORÉRE J F, et MORNEX F.***Thérapeutique du Cancer; Spriger Sciences & Business Média.*ISBN : 2817800214, 9782817800219. 2011 .
3. **BRUMMENDORF TH, CERVANTES F, et KIM D.***Bosutinib is safe and active in patients (pts) with chronic phase (CP) chronic myeloid leukaemia (CML) with.* 2008.
4. **DEININGER MW, HODGSON JG, SHAH NP, et al.***Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP- CML patients. Blood.* 127: 703-12. 2016.
5. —. *Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP- CML patients. Blood.* 127: 703-12. 2016.
6. **NORBERT I, et YVESCAHN J.***Hématologie e : Réussir les ECNi ; Elsevier.* 2014.
7. **M, AZZOU.***Histologie (le tissu sanguin). Cours en ligne. Ecole supérieure en science de l'aliment et en industries agro-alimentaires (ESSAIAA).* 2017.
8. **A, CHESNEL.***Dictionnaire de technologie étymologie et définition des termes employés dans les arts et métiers (etc.) : T.S.28-29 : Dictionnaire de technologie ; 1-2.,* 2013.
9. **NICOLAS B D G, DAMIEN P, PHILLIPPER R et al.***Transplantation de cellules souches du sang.thèse en ligne : Université de Genève. Pagination multiple.* 2013.
10. **G, MICHEL.***Anatomie fonctionnel de l'appareille locomoteur os-articulation uscles.-42.*ISBN: 2-7606-1974-5. 2005 .
11. **www.slideplayer.fr.**
12. **Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau.***Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: population-based study.Lancet Haematol* 5(1):e14–24. 2018.
13. **DJOUADI-LAHLLOU, K.***Approches épidémiologiques des aplasies médullaires en Algérie.* 2009.

Références Bibliographiques

14. **A, HAMLADJI.***National epidemiological study of acute myeloid leukemia (AML) in Algeria.* 2014.
15. **Trzcinska-Daneluti, A.M., Gorecki, A., Czuby, A.***RRM proteins interacting with the cap region of topoisomerase I. J Mol Biol* 369, 1098-1112. 2008.
16. **M, TULLIEZ.***Traitement de la leucémie myéloïde chronique en 2007. Rev Francoph Lab,* 25-29, 395. 2007.
17. **LELEU P, et MOREAU.***Précis d'hématologie et d'oncologie. s.l: Springer- Verlag France, Paris.ISBN:978-2-287-99341-1.* 2010.
18. **G, SEBAHOUN.***Hématologie clinique et biologique. Arnette groupe liaisons SA, Rueil-Malmaison.ISBN: 2718410531, 9782718410531.* 2005.
19. **LEGUAY T, et MAHON F X.***Leucémie myéloïde chronique. EMC- Hématologie 2, 187-205.* 2005.
20. **V, BAUNIN.***La leucémie myéloïde chronique de l'enfant et de l'adolescent : réarrangements moléculaires BCR-ABL1 au diagnostic. Thèse en ligne.Université de Poitiers. Pagination multiple.* 2013.
21. **G., EL MOUHDI.***Les aspects cliniques et cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique, Thèse en ligne N° 186/15.Université Sidi Mohammed Ben Abdelah.pagination multiple . .* 2015.
22. **www.santeweb.ch/Leucemie_myelo_de_chronique_LMC/Diagnostic.**
23. **LEGUAY T, et MAHON F X.***Leucémie myéloïde chronique. EMC Hématologie 2, 187-205.* 2005 .
24. **MORÉRE J F, et MORNEX F.***Thérapeutique du Cancer; Spriger Sciences & Business Média.ISBN : 2817800214, 9782817800219.* 2011.
25. **.www.researchgate.net.**
26. **Stefan Faderl, Moshe Talpaz, Zeev Estrov , and Hagop M. Kantarjian.,***Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy . .* 1999 .
27. **HUNTLY BJ, BENCH A, et GREEN AR.***Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia Blood, 102: 1160–8.* 2003.

Références Bibliographiques

28. **DOMINIQUE B, AGNÈS D, MARTINE G P, et al.** *Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Hématologie. Volume 9, Numéro 6.497-512. Pagination multiple. 2013.*
29. **CHRYSTELE B N, CAROLE B, ALAIN B, et al.** *Recommandations pour la prise en charge cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) établies par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). Pathologie Biologie. 52 238–240.*
30. **N, MESSAOUDI.** *Leucémie Myéloïde Chronique chez l'adulte. thèse en ligne. (Etude rétrospective sur 69 cas au CHU Bejaia) ; thèse en ligne. Pagination multiple. 2016.*
31. **southern-blot, (www.aquaportail.com/.**
32. **theses-algerie.com .**
33. **Fre_Treatment_free_remission_CML_2019, www.lls.org/.**
34. **www.academie-medecine.fr.**
35. **www.mdpi.com.**
36. **www.di.univ-blida.dz.**
37. **Guan, X.Y., Meltzer, P.S., Cao, J., and Trent, J.M.** *Rapid generation of region-specific genomic clones by chromosome microdissection: isolation of DNA from a region frequently deleted in malignant melanoma. Genomics 14, 680-684. 1992.*
38. **www.researchgate.net.**
39. **Melo, J.V.** (1996) *The Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukaemia. Leukemia, 10, 751-756.*
40. **www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AXL.**
41. **biocare.net/product/myc-break-apart-8q24/.**
42. **howmed.net/pathology/oncogenesis-and-oncogenes-role-of-rb-gene-and-p53/.**

Références Bibliographiques

43. **PREUDHOMME C, CAYUELA JM, CHOMEL JC, et al.** *Recommandation du groupe FI-LMC pour la prise en charge des patients présentant des mutations du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL dans les hémopathies malignes à chromosome Philadelphie.* *Hématologie.* 16 : 65-79. 2010.
44. **P, BERGERAT J.** *Onco-hématologie; Heures de France.* ISBN : 2853851699, 9782853851695. 1996.
45. www.researchgate.net/figure/Historique-des-traitements-de-la-LMCGonon-Demoulian-et-al-2014_fig6_330823438.
46. **BORIES D, et DEVERGIE A.** *Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique.* *Hématologie.* 9 : 497-512. 2003.
47. **SAVITZ DA, et ANDREWS KW.** *Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic hematopoietic cancers; Am J Ind Med;* 31:287-95. 1997.
48. **G., EL MOUHDI.** *Les aspects cliniques et cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique, Thèse en ligne N° 186/15.* Université Sidi Mohammed Ben Abdelah. pagination multiple . 2015.
49. **bichet, Pierre marie, 2016 et paysagest.**
50. **Schindler, J.W., Van Buren, D., Foudi, A., et all ... ;** *TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia.* *Cell stem cell* 5, 43-53. 2009.
51. **Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., et all ... ;** *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.* *The New England journal of medicine* 344, 1031-1037. 2001.
52. **Goldman, J.M., and Melo, J.V .** *Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment.* *The New England journal of medicine* 349, 1451-1464. . 2003.
53. **Sawyers, C.L., Callahan, W., and Witte, O.N.** *Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes.* *Cell* 70, 901-910. 1992.
54. **Cortes, J.E., Talpaz, M., O'Brien, S., et all...,** *Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal.* *Cancer* 106, 1306-1315. 2006.

Références Bibliographiques

55. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, et al...., *Chronic myeloid leukemia ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*. 2017.
56. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, et al..., *European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia*. *Leukemia*. 2016.
57. Wang, H., Guo, Z., and Ji, S. *Homoharringtonine Induces Apoptosis of K562 Cells through inhibition of P210(bcr/abl)*. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 8, 287-289. . 2002.
58. Hazourli, sawcen et all., *Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la phase blastique*. Université de Montréal , 2012.
59. Nowell, P.C. *Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes*. *Cancer research* 20, 462-466 . 1960.
60. Tjio, J.H., and Levan, A. *The chromosome number of man*. *Hereditas* 42, 1-6 . . 1956 .
61. Shaffer, L.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J., *An International : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature , Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature (Basel: Karger)*. 2009.
62. Sillar, R., and Young, B.D. *A new method for the preparation of metaphase chromosomes for flow analysis*. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 29, 74-78. 1981.
63. Barnes, D.J., Palaiologou, D., Panousopoulou, E., Schultheis, B., Yong, A.S., Wong, A., Pattacini, L., Goldman, J.M., and Melo, J.V. *Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia*. *Cancer research* 65, 8912-8919. . 2005 .
64. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. *Cytogenetic and molecular genetic. evolution of chronic myeloid leukemia*. *Acta Haematol.*;107:76-94 . 2002 .
65. *Sophie Ottema, et.al.*; *Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)/t(3;3) in acute myeloid leukemia*. *Blood*. Volume 136, Issue 2, 9 July 2020, Pages 224-234.

Références Bibliographiques

66. Heesch S, Neumann M, Schwartz S, Bartram I, Schlee C, Burmeister T, et al. *Acute leukemias of ambiguous lineage in adults: molecular and clinical characterization. Ann Hematol.*92:747–58. <https://doi.org/10.1007/V> . 2013.
67. Hazourli, S., Chagnon, P., Sauvageau, M., Fetni, R., Busque, L., and Hebert, J. *Overexpression of PRDM16 in the presence and absence of the RUNX1/PRDM16 fusion gene in myeloid leukemias. Genes, chromosomes & cancer* 45, 1072-1076. . 2006.
68. Zhang, S.J., Shi, J.Y. Li, J. *GATA-2 L359 V mutation is exclusively associated with CML progression but not other hematological malignancies and GATA-2 P250A is a novel single nucleotide polymorphism. Leukemia research* 33, 1141-1143.
69. Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., et al., *The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. Oncogene* 1, 2667-2674.
70. Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T et ..., et al. *Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing in T lymphocyte development. Cell* 111, 621-633. 2002 .
71. Hromas, R., Shopnick, R., Jumean, H.G., Bowers, C., Varella-Garcia, M., and Richkind, K. *A novel syndrome of radiation-associated acute myeloid leukemia involving AML1 gene translocations. Blood* 95, 4011-4013. 2000.
72. Roulston, D., Espinosa, R., 3rd, Nucifora, G., Larson, R.A., Le Beau, M.M., and Rowley, J.D. *CBFA2(AML1) translocations with novel partner chromosomes in myeloid leukemias: association with prior therapy. Blood* 92, 2879-2885. 1998.
73. Gong J, Li J, Gai Y, Tian X, Feng X, Lin Y, et al. Co-occurrence of t(8).
74. Wang, L.C., Swat, W., Fujiwara, Y., Davidson, L., Visvader, J., Kuo, F., Alt, F.W., Gilliland, D.G., Golub, T.R., and Orkin, S.H. (1998). The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12, 2392-2402.
75. Oikawa, T., and Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303, 11-34.

Références Bibliographiques

- 76. Haferlach C, Bacher U, Schnittger S, et al.,** *Similar patterns of chromosome abnormalities in CML occur in addition to the Philadelphia chromosome with or without tyrosine kinase inhibitor treatment. Leukemia.*24:638–40.2010.
- 77. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, et al.** *Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML study IV. Blood.* 2011;118:6760–8. <https://doi.org/10.1182/blood-373902>. 2011.
- 78. Cortes .J.E, Talpaz M, Kantarrjian H.** Chronique myelogenous leukemia: A review American journal of medicine. 1996 et 555-570., 100 .
- 79. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT et al ...,** *European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia* 2020;34:966-984 . 2020.
- 80. Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J . et al ...,** *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood* 108, 1809-1820. 2016 .
- 81. Oudat R, Khan Z, Glassman AB.** *Detection of trisomy 8 in philadelphia chromosome-positive CML patients using conventional cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization techniques and its relation to c-myc involvement. Ann Clin Lab Sci .* 2001.
- 82. Wang W, Cortes JE, Lin P, Khoury JD, et al.,,** *Impact of trisomy 8 on treatment response and survival of patients with chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors. Leukemia* ;29:226. 2015.
- 83. Zámečníkova A, Al Bahar S, Ramesh P.** *Trisomy 6 in a CML patient receiving imatinib mesylate therapy. Leuk Res ;*32:1454-1457. . 2008.
- 84. Fabarius A, Haferlach C, Müller MC, et al.,,** *Dynamics of cytogenetic aberrations in Philadelphia chromosome positive and negative hematopoiesis during dasatinib therapy of chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure. Haematologica;*92:834-837 . 2007.
- 85. Yamada T, Sasaki M, Kawamura T.** *Trisomy 11 in a patient with Ph-negative chronic myelogenous leukemia. Cancer Genet Cytogenet ;*21:343-345. 1986.

Références Bibliographiques

86. Wafa A, Almedani S, Liehr T, Al-Achkar W. *Masked inv dup(22)(q11.23), tetrasomy 8 and trisomy 19 in a blast crisis-chronic myeloid leukemia after interrupted Imatinib-treatment. Mol Cytogenet ;8:98. 2015.*
87. ML, REZGOUNE. *Contribution à l'étude cytogénétique des leucémies. Mémoire de Magistère. Université des freres menturoi Constantine 1. 2006.*
88. www.researchgate.net.
89. www.theses-algerie.com.
90. Bacher U, Hochhaus A, Berger U, et al.... *Clonal aberrations in Philadelphia chromosome negative hematopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib or interferon alpha. Leukemia ;19:460. 2005.*
91. Giehl M, Fabarius A, Frank O, et al.... *Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. Leukemia 19:1192-1197. 2005.*
92. Yong, A.S., and Melo, J.V. *The impact of gene profiling in chronic myeloid leukaemia. Best practice & research Clinical haematology 22, 181-190 .2009.*
93. Greulich, K.O. *Chromosome microtechnology: microdissection and microcloning. Trends in biotechnology 10, 48-51. 1992.*
94. Barnes, D.J., Palaiologou, D., Panousopoulou, E et ...all, *Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. Cancer research 65, 8912-8919. 2005.*
95. Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., et al...., *Chronic myeloid leukemia: an update of oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 27, 6041-6051. 2009.*
96. Andreasson, P., Johansson, B., Carlsson, M., Jarlsfelt, I., F ,et al... *,BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion. Genes, chromosomes & cancer 20, 299-304. 1997.*
97. Tanaka, T., Tanaka, K., Ogawa, S., et al...., *An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. The EMBO journal 14, 341-350 . 1995.*

Références Bibliographiques

98. Liu, X., Zhang, Q., Zhang, D.E., et al., Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 23, 739-745. 2009.
99. Shing, D.C., Trubia, M., Marchesi, F., R et al., Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice. *The Journal of clinical investigation* 117, 3696-. 2007.
100. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.222>.
101. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, et al., Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML study IV. *Blood*;118:6760–8. 2011.
102. Suzuki K, Sugawara T, Kowata S, et al., Uncommon karyotypic abnormality, t(11;19)(q23;p13.3), in a patient with blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 150:159–63 . 2004.
103. Lee J, Kim DS, Lee HS, Choi SI, Cho YG. A novel t(9;22;11) translocation involving 11q24 in a patient with chronic myeloid leukemia: a case report. *Oncol Lett* ;13:1711–3. 2017.
104. Gutiérrez LG, Noriega MF, Laudicina A, Quatrin M, Bengió RM, Larripa I. An unusual translocation, t(1, et al. 2017.
105. Yin CC, Medeiros LJ, Glassman AB, Lin P. T(8, et al.
106. Najfeld V, Wisch N, Mascarenhas J, Issa L, Tripodi J, Sidhu M, et al., Development of t(8 et pr, 21) and RUNX1-RUNX1T1 in the Philadelphia-positive clone of a patient with chronic myelogenous leukemia: additional evidence for multiple steps involved in disease.
107. Söderhamn J, Kobayashi H, Mathieu C, Rowley JD, Nucifora G. The leukemia-associated gene MDS1/EVI1 is a new type of GATA-binding transactivator. *Leukemia.* 1997 et <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400584>., 11:352–8.
108. Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, et al., Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3).

Références Bibliographiques

- 109. Rogers HJ, Vardiman JW, Anastasi J, Raca G, Savage NM, Cherry AM, et al...**, Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv(3)(q21q26.2)/t(3).
- 110. Park SH, Chi HS, Cho YU, Jang S, Park CJ.** Evaluation of prognostic factors in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2013 et 185–92., 48.
- 111. Cuenco GM, Ren R.** Both AML1 and EVI1 oncogenic components are required for the cooperation of AML1/MDS1/EVI1 with BCR/ABL in the induction of acute myelogenous leukemia in mice. *Oncogene.* 2004 et 79., 23:569.
- 112. Monma F, Nishii K, Shiga J, Sugahara H, Lorenzo FV, Watanabe Y, et al...**, Detection of the CBFβ/MYH11 fusion gene in de novo acute myeloid leukemia (AML): a single-institution study of 224 Japanese AML patients. *Leuk Res.* 2007 et 31:471–6.
- 113. Moreno-Miralles I, Pan L, Keates-Baleeiro J, Durst-Goodwin K, Yang C, Kim HG, et al...**, The inv(16) cooperates with ARF haploinsufficiency to induce acute myeloid leukemia. *J Biol Chem.* 2005 et 280:40097–103.
- 114. Bustamante D, Chan KR, Czuchlewski DR, Saadi AA.** Patterns of BCR breakpoints in patients with coexisting inv(16)(p13.1q22) and t(9, 22)(q34 et Hematol., q11.2). *Int J.*
- 115. Tirado CA, Valdez F, Klesse L, Karandikar NJ, Uddin N, Arbini A, et al...**, Acute myeloid leukemia with inv(16) with CBFβ-MYH11, 3'CBFβ deletion, variant t(9 et 22) with BCR-ABL1, and del(7)(q22q32) in a pediatric patient: case report and literature review. *Canc.*
- 116. Han E, Lee H, Kim M, Kim Y, Han K, Lee SE, et al...**, Characteristics of hematologic malignancies with coexisting t(9, 2014, 22) and inv(16) chromosomal abnormalities. *Blood Res.* et 49:22–8.
- 117. Roth CG, Contis L, Gupta S, Agha M, Safyan E.** De novo acute myeloid leukemia with Philadelphia chromosome (BCR-ABL) and inversion 16 (CBFβMYH11): report of two cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma.* 2011 et 52:531–5.
- 118. Ferro MT, Steegman JL, Escribano L, Heiurichs B, Parada L, García-Sagredo JM, et al...**, Ph-positive chronic myeloid leukemia with t(8).

Références Bibliographiques

119. Merzianu M, Medeiros LJ, Cortes J, Yin C, Lin P, Jones D, et al..., Inv(16)(p13q22) in chronic myelogenous leukemia in blast phase: a clinicopathologic, cytogenetic, and molecular study of five cases. *Am J Clin Pathol.* 2005 et 124:807–14.
120. Wu Y, Slovak ML, Snyder DS, Arber DA. Coexistence of inversion 16 and the Philadelphia chromosome in acute and chronic myeloid leukemias: report of six cases and review of literature. *Am J Clin Pathol.* 2006 et 125:260–6.
121. Golub, T.R., Barker, G.F., Bohlander, S. et al..., *Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4917-4921.1995.
122. Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., and Littman, D.R. (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111, 621-633.
123. *www.Leukemia & Lymphoma Society. Diagnosis of Acute Myeloid Leukemi.*
125. Haferlach C, Bacher U, Schnittger S, Weiss T, Kern W, Haferlach T. Similar. *patterns of chromosome abnormalities in CML occur in addition to the Philadelphia chromosome with or without tyrosine kinase inhibitor treatment. Leukemia*;24:638–40. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.222> . 2010.

Année universitaire : 2022-2023	Présenté par : ALLOUCHE OUAHEM MALEK. FERKOUS SARA NESRINE. GEURABAA ROUMAÏSSA.
---------------------------------	---

Application de la cytogénétique dans la Leucémie Myéloïde Chronique à la phase blastique.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) apparaît lorsqu'une cellule-souche pluripotente subit une transformation maligne et clonale, entraînant une surproduction de granulocytes matures et immatures.

Elle est caractérisée par la translocation $t(9;22)(q34;q11.2)$ qui résulte en la formation du chromosome de Philadelphie et du réarrangement BCR-ABL. Le réarrangement BCR-ABL se détecte de préférence par biologie moléculaire. Initialement asymptomatique, la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC) est insidieuse, avec des manifestations non spécifiques "bénignes" (sensation de malaise, anorexie, perte de poids) aboutissant finalement à une phase d'accélération ou phase blastique avec des signes plus inquiétants tels qu'une splénomégalie, une pâleur, des ecchymoses, des hémorragies, une fièvre, des adénopathies, des lésions cutanées. Les frottis sanguins et médullaires, ainsi que la mise en évidence du chromosome Philadelphie confirment le diagnostic. Le traitement repose sur les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK), tels que l'imatinib, le dasatinib, le nilotinib et le bosutinib, qui améliorent considérablement la réponse et prolongent la survie. Les agents myélosuppresseurs, la transplantation de cellules-souches et l'interféron alpha peuvent aussi parfois être utiles.

Notre travail consiste en une recherche bibliographique concernant les différentes anomalies chromosomiques de la leucémie myéloïde chronique en la phase chronique et la phase blastique (accutisation). Nous avons présenté l'apport de la cytogénétique et la cytogénétique moléculaire de la LMC

Mots-clefs :

LMC; Chromosome Philadelphie ; ITK ; Gène BCR ; Gène ABL Biologie moléculaire. Phase blastique, BCR-ABL1, Cytogénétique, Bande G, Caryotype spectral, FISH.

Laboratoire de recherche :

Président du jury :	Dr. BENHAIZIA.H	(MCA - UFMC 1).
Encadrant :	Mr. LATRECHE.F	(MAA - UFMC 1).
Examineur :	Dr. BECHEKRI.F	(MCA - UFMC 1).
