



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Étude moléculaire des Leucémies Aigues Myéloïdes (LAM) (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*)

Présenté et soutenu par : *KEBBOUS SALSABILA RAYEN*

Le : 29/06/2015

MAIDOUCHE AMINA

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA DALILA* (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE MOHAMED LARBI* (MA.A - UFM Constantine).

Examineurs : *BENLATRECHE MOUFIDA* (MA.A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

** Au professeur SATTI D: Honorable maitre, nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement à la faculté. Femme de rigueur et de fermeté dans l'esprit scientifique, vos grandes qualités humaines et scientifiques, votre disponibilité et surtout votre dévouement forcent l'admiration et le respect. Veuillez bien, au-delà de nos insuffisances et de nos lacunes, considérer ce modeste travail comme un hommage, très faible à notre gré, à votre personnalité.*

** Au professeur ABADI N directeur du laboratoire de Biochimie et du laboratoire de Biologie et Génétique (CHU Constantine) qui nous ont ouvert les portes des structures dont ils avaient la responsabilité et qui ont tous mis à notre disposition pour nous permettre de travailler dans les meilleures conditions.*

** À Madame REZGOUNE : Chère maitre, vous nous faites un grand honneur en acceptant d'être là ce jour, pour juger notre travail. Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement à la faculté. Travailleuse acharnée, votre simplicité, votre gentillesse, votre promptitude, votre disponibilité, alliées à vos connaissances et votre rigueur scientifique resteront pour nous un bel exemple. Veuillez trouver ici chère maitre, l'expression de notre profonde gratitude.*

** À Madame BENLATRACHE : Chère maitre, permettez-nous de vous traduire toute notre gratitude pour avoir accepté de siéger dans ce jury, pour juger notre modeste travail. Nous avons bénéficié de vos connaissances scientifiques et de votre expérience, nous sommes très touchées par votre simplicité, votre rigueur au travail, votre gentillesse et votre amour du travail bien fait. Trouvez ici, chère maitre, l'expression de notre profond respect.*

** À Madame CHAOUI : Chère maitre, nous tenons à vous remercier chaleureusement pour nous avoir transmis toutes vos connaissances. Votre simplicité et gentillesse sont pour nous un bel exemple. Merci d'avoir accepté d'être aujourd'hui présente pour juger ce modeste travail. Veuillez trouver ici notre profonde gratitude.*

** À Madame YOUSFI : Pour qui les mots sont faibles pour exprimer notre affection et notre profond respect.*

Et enfin, A notre cher maitre Monsieur REZGOUNE : Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail. Votre simplicité, votre contact facile, votre disponibilité, votre patience, la qualité de votre enseignement forcent notre admiration. Nous vous sommes très reconnaissantes pour l'attention toute particulière que vous avez accordée à chacune des étapes de ce travail. Vos critiques, combien riches, ont été d'un apport inestimable pour l'élaboration de ce travail. Nous vous prions d'accepter, cher maitre, l'expression de notre profonde gratitude. Merci et mille mercis à vous.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

- *Mes chers parents qui m'ont soutenu le long de mon parcours, pour leur confiance, leur aide morale, leur amour, leurs encouragements, leurs sacrifices ainsi que leurs précieux conseils.*
- *mon adorable frère « Zaki » à qui je souhaite un avenir radieux incha'allah*
- *Mes deux chères sœurs : lissa et maya que j'aime profondément et à qui je souhaite une réussite et plein de sucées dans leurs études et leur vie.*
- *Mes deux grand-mères et mama Hanifa (défunts) qui étaient et seront toujours dans ma mémoire et dans mon cœur.*
- *Je tiens à rendre hommage à mon amie « binôme » amina pour les efforts qu'elle a fourni, pour sa bonté, son dévouement, son abnégation, pour la patience et le pragmatisme dont elle a fait preuve pour la consolidation de notre travail.*
- *ma chère tante fahima, et ma cousine rima ainsi que tonton rachid pour leur dévouement et leur présence à mes côtés.*
- *mes chères tantes guamoura et nawel et nora dont leur réconfort a illuminé mon chemin.*
- *ma chère cousine et sœur ibtissem, celle qui m'écoute, me comprend et a été toujours à mes côtés que j'aimerai pour l'éternité.*
- *mes adorables amies avec qui j'ai partagé les meilleurs moments de mes trois ans : Amina, Khadidja, Lina, Louiza, Ikram, Narimene et Sara.*
- *Toutes personnes que je n'ai pas citées et qui m'ont aidé de près ou de loin, je les en remercie.*

Rayene

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce travail de master :

- *À mes parents et mes grands-parents, pour qui les mots sont faibles pour exprimer tout mon affection et mon amour pour eux.*
- *À mon frère bien aimé pour son soutien et ses encouragements.*
- *À mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mon profond respect.*
- *À mes collègues de promotions dont l'entraide intellectuelle nous a permis d'affronter les difficultés durant notre cursus étudiant et de tisser de très bonnes relations amicales, en particulier mon binôme qui m'a accompagnée avec patience durant la période du travail.*
- *À mes amies, qu'elles trouvent ici ma profonde affection.*
- *À une personne très chère, pour tout ce qu'elle m'a apportée au cours de ces mois pénibles ! Avec toute mon affection.*
- *Je ne saurai terminer en remerciant tous mes enseignants et mes enseignantes de génétique moléculaire.*

Amina

Abréviations

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique
Akt: v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog
AML1: Acute Myeloid Leukemia 1
AGM: Aorte-Gonade-Mésonéphros
ARF: ADP Ribosylation Factor
ARN: Acide Ribo Nucléique
ARNm: Acide Ribo Nucléique messenger
ASXL1: Additional SeX Comb-Like
ATP: Adénosine Tri Phosphate
ATRA: All-Trans Retinoic Acid
BAALC: Brain And Acute Leukemia Cytoplasmatic
BBP: Bleu de Bromo-Phénol
BET: Bromure d'Éthidium
BFU: Burst Forming Unit
BOM: Biopsie Ostéo-Médullaire
CBF β : Core Binding Factor β
CBL: Casitas B-cell Lymphoma
CD: Cluster de Différenciation
CEBP α : CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha
c-fms: McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog
CFU: Colony Forming Unit
CFU-E: CFU-Erythrocyte
CFUG: CFU-Granulocyte
CFU-GM: Colony Forming Unit-Granulocyte Monocytes
CFUL: Colony Forming Unit-Leukemia
CFU-M: CFU-Monocyte
CFU-Meg: CFU-Megakaryocyte
CFU-S: Colony Forming Unit-Spleen
CIVD: Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CGH: Comparative Genome Hybridization
c-Kit: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CLP: Commun Lymphoid Progenitor
CMA: Comprehensive Meta-Analysis V3.1
CMP: Commun Myeloid Progenitor
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique
CSL: Cellule Souche Leucémique
CSM: Cellule Souche Mésoenchymateuse
del: Délétion
Dnmt: DNA méthyltransférases
dNTP: deoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate
DO: Densité Optique

EDTA: Ethylene Diamino Tetracetic Acid
EPO: ÉrythroPOïétine
ERG: Ets-related gene
Erk: Extracellular signal-regulated kinase
ETO: Eighth Twenty One
ETV6: ETS (E Twenty Six) Variant gene 6
EVII: Ecotropic viral integration 1
EVII (MECOM): MDS1 and EVII complex locus
FAB: French-American-British Cooperative Group
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
FLT3: Fms-Like Tyrosine kinase-3
FLT3-ITD: FLT3-Internal Tandem Duplication
FLT3-TKD: FLT3-Tyrosine Kinase Domain
GATA1: GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
G-CSF: Granulocytic Colony Stimulating Factor
GM-CSF: Granulocytic-Monocytic Colony Stimulating Factor
Hb: Hémoglobine
Hinf 1: Enzyme extraite de la bactérie *Haemophilus influenzae*
HLA: Human Leucocyte Antigen
HOX: HomeobOX
HTLV-1: Human T-Cell Leukemia Virus-1
HWE: *Hardy-Weinberg* Equilibrium
ICAM: Inter-Cellular Adhesion Molecule
IC: Intervalle de Confiance
IDH: Isocitrate DésHydrogénase
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
INF γ : INterFéron γ
inv: Inversion
JAK2: JAnus Kinase 2
K-RAS: Kirsten- RAAt Sarcoma viral oncogene
LAL: Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM: Leucémie Aiguë Myéloïde
LAM-CM: LAM avec Caractéristiques Myélodysplasiques
LAP: Leucémies Aiguës Promyélocytaires
LIF: Leukemia Inhibitory Factor
LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC: Leucémie Myéloïde Chronique
LRF: Leukemia Research Found
LTC-IC: Long Term Culture- Initiating Cell
LT-HSC: Long Term-Hematopoietic Stem Cell
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MEDLINE: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online
MGG: May-Grunwald-Giemsa
miARN: microARN

MIC: Morphologie, Immunologie, Cytogénétique
MLL: Mixed Lineage Leukemia
MN1: MeNingioma1
MPO: MyéloPerOxydase
Mono: Monocytes
MTHFR: 5,10-MéthylèneTétraHydroFolate Réductase
MTRR: Methionine Synthase Reductase
MYH11: Myosin heavY cHain 1
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate H
NCBI: National Center of Biotechnologies Information
NF-κB: Nuclear Factor κB
NMP: Néoplasmes Myélo Prolifératifs
NPM1: Nucléophosmine 1
N-RAS: Neuroblastoma- RAt Sarcoma viral oncogene
NUP214: NUcleoPorin 214kDa
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ONS: Office National des Statistiques
OR: Odds Ratio
ORL: Oto-Rhyno-Laryngologie
p: bras chromosomique court
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3K: Phospho-Inositides 3-Kinases
PLCγ: Phospho Lipase C, gamma 1
PML: Pro Myelocitic Leukemia
PNB: PolyNucléaires Basophiles
PNEo: PolyNucléaires Éosinophiles
PNN: PolyNucléaires Neutrophiles
PPi : Préparation Pour injectable
Pq: plaquettes
PTEN: Phosphatase and Tensin Homologue deleted chromosome 10
PTPN11: Protein Tyrosine standard Phosphatase Nonrecepteur11
q: bras chromosomique long
PECAM : Platelet Endothelila Cell Adhesion Molecule
RARA: Retinoic Acid Receptor α
RBM15: RNA binding motif protein 15
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RPN1: RiboPhoriN I
RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RUNX1: RUNt related transcription factor 1
RXR: Retinoid X Receptor
SCF: Stem Cell Factor
SDS: Sodium Dodécyle Sulfate
SEER: Surveillance Epidemiology and End Results Program
SHP-2: Src Homology Phosphatase 2
SMD: Syndrome Myélo Dysplasique

SMMHC: Smooth Muscle Myosin Heavy Chain
SMP: Syndromes Myélo Prolifératifs
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SPI1/PU1: 5' Un-Translated Region regulatory element
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
ST-HSC: Short Term-Hematopoietic Stem Cell
t: Translocation
Taq Polymerase: *Thermus aquaticus* Polymerase
TBE: Tris-Borate EDTA
TE: Tris-EDTA
TET2: Tet oncogene family member 2
TGF β : Tumor Growth Factor β
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TMP: Thymidine Mono-Phosphate
TPO: Thrombopoïétine
UV: Ultra-Violet
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
WT1: Wilm's Tumor 1

Table des matières

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Sang, moelle et hématopoïèse

I- Le sang	Page 03
1-1- Le plasma	Page 03
1-2- Les éléments figurés (cellules)	Page 03
a- Les globules rouges	Page 03
b- Les polynucléaires neutrophiles (PNN)	Page 04
c- Les polynucléaires éosinophiles (PNEo)	Page 04
d- Les polynucléaires basophiles (PNB)	Page 04
e- Les Monocytes (Mono)	Page 04
f- Les Lymphocytes	Page 04
g- Les plaquettes (Pq)	Page 05
II- La moelle osseuse	Page 05
III- Hématopoïèse	Page 06
3-1- Définition	Page 06
3-2- Les compartiments de l'hématopoïèse	Page 06
a- Les CSH	Page 06
b- Les progéniteurs	Page 07
c- Les précurseurs	Page 07
d- Les cellules et particules anucléées matures	Page 07
3-3- Régulation de l'hématopoïèse	Page 09
a- Les facteurs de croissance	Page 09
b- Régulation négative de l'hématopoïèse	Page 10
c- Le microenvironnement médullaire	Page 10
IV- Mécanismes moléculaires de la leucémogénèse	Page 11

Chapitre II : Classification des LAM

I- Notion de classification des leucémies	Page 13
1-1- Historique	Page 13
1-2- Classification des LAM	Page 13
a- Classification FAB	Page 13
b- Classification OMS	Page 14

Chapitre III : Aspect cliniques et biologiques des LAM

I- Épidémiologie	Page 17
II- Étiologie	Page 21

2-1- Les LAM secondaires	Page 21
a- Les LAM induites par les agents alkylants	Page 22
b- Les LAM liées à l'utilisation d'inhibiteurs de topoisomérase II	Page 23
2-2- Les LAM <i>de novo</i>	Page 23
a- Les facteurs constitutionnels (génétiques)	Page 23
b- Les facteurs acquis	Page 23
c- Les facteurs environnementaux	Page 24
III- Aspects cliniques des LAM	Page 25
3-1- Syndrome d'insuffisance médullaire	Page 25
3-2- Syndrome tumoral	Page 25
IV-Aspects biologiques des LAM	Page 26

Chapitre IV : Aspect génétique des LAM

I- Altération géniques rencontrées dans les LAM	Page 28
1-1- Les mutations de type 1	Page 28
a- <i>N-RAS</i> et <i>K-RAS</i>	Page 29
b- <i>FLT3</i>	Page 29
c- <i>C-KIT</i>	Page 30
d- <i>CBL</i>	Page 30
e- <i>PTPN11</i>	Page 30
f- <i>JAK2</i>	Page 30
1-2- Les mutations de type 2	Page 30
a- Translocation concernant CBF	Page 31
b- <i>PML/RARα</i>	Page 31
c- <i>MLL</i>	Page 32
1-3- Les mutations non classées	Page 32
a- <i>DNMT</i>	Page 32
b- <i>TET2</i>	Page 32
c- <i>IDH1/IDH2</i>	Page 33
d- <i>NPM1</i>	Page 33
e- <i>ASXL1</i>	Page 34
f- <i>WT1</i>	Page 34
g- <i>BAALC</i>	Page 34
h- <i>ERG</i>	Page 34
i- <i>P53</i>	Page 35
1-4- L'expression des miARN (microARN)	Page 35
II- Cytogénétique des LAM	Page 36
2-1- Les anomalies génétiques récurrentes	Page 37
2-2- Les anomalies chromosomiques de nombre	Page 37
a- Les délétions	Page 37
b- Les trisomies	Page 37
III- Biologie Moléculaire des LAM	Page 38
IV- Polymorphisme de la <i>MTHFR</i>	Page 38

Partie pratique

Patients et méthodes

I- Étude statistique (Méta-analyse)	Page 41
1-1- Principe	Page 41
1-2- Stratégie de recherche	Page 42
1-3- Sélection des études	Page 42
1-4- Extraction des données	Page 43
1-5- Tests statistiques	Page 43
II- Étude moléculaire	Page 43
2-1- Extraction d'ADN à partir de sang total	Page 43
a- Le prélèvement sanguin	Page 43
b- L'extraction de l'ADN	Page 43
2-2- Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN	Page 44
2-3- Génotypage de la <i>MTHFR</i>	Page 45
2-3-1- Amplification de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i>	Page 45
2-3-2- Digestion et migration sur gel d'agarose	Page 46
2-4- Analyse statistique	Page 48

Résultats

I- Étude statistique (Méta-analyse)	Page 49
1- Recherche des publications	Page 49
2- Caractéristiques des études incluses	Page 49
3- Résultats de la méta-analyse	Page 53
4- Biais des publications	Page 54
II- Étude moléculaire	Page 54
Discussion	Page 57
Conclusion et perspectives	Page 63
Références bibliographiques	Page 64

Annexes

Résumés

Liste des figures

Figure 01 : Modèle général de l'hématopoïèse	Page 08
Figure 02 : Représentation schématique de la structure du gène <i>MTHFR</i> et de la protéine avec des indications des polymorphismes les plus communs	Page 40
Figure 03 : Représentation schématique du site de restriction <i>HinfI</i> sur l'amplicon de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i>	Page 46
Figure 04 : Représentation graphique des fréquences génotypiques (génotypes CC, CT et TT) dans les différentes études recueillies dans la méta-analyse.....	Page 51
Figure 05 : Représentation graphique des fréquences alléliques (allèles C et T) dans les différentes études recueillies dans la méta-analyse.....	Page 52
Figure 06 : Représentation graphique de l'effet de l'allèle T (Polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i>) dans la survenue de LAM (OR et intervalle de confiance à 95 %)......	Page 53
Figure 07 : Test de biais des études incluses dans la méta-analyse (représentation graphique en "Funnel Plot").....	Page 54
Figure 08 : Répartition des différents génotypes de la <i>MTHFR</i> pour les patients et les témoins.....	Page 56
Figure 09 : Répartition des deux allèles de la <i>MTHFR</i> pour les patients et les témoins.....	Page 56
Figure 10 : Prévalence de l'homozygotie de l'allèle 677T par régions	Page 62

Liste des photos

Photo 01 : Analyse par RFLP du polymorphisme C677T sur un fragment PCR de 198 pb digéré avec <i>HinfI</i> . Ce polymorphisme (allèle T) fait apparaître un site de restriction <i>HinfI</i> et génère un fragment de 175 pb.....	Page 47
Photo 2 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène de la <i>MTHFR</i> par <i>HinfI</i> de nos patients.....	Page 55

Liste des tableaux

Tableau I : Marqueurs de surface ou cytoplasmiques détectés par cytométrie en flux permettant d'établir le caractère myéloïde de la leucémie aiguë	Page 26
Tableau II : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i>	Page 45
Tableau III : Identification des amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i> ...	Page 46
Tableau IV : Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'amplification de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i> (durée 105 minutes)	Page 46
Tableau V : Tableau de contingence croisé pour une étude cas-témoins.....	Page 48
Tableau VI : Recensement des études publiées sur Pub Med menées sur l'impact de la <i>MTHFR</i>	Page 49
Tableau VII: Présentation des données des études sélectionnées pour la méta-analyse.....	Page 50
Tableau VIII : Effet de l'allèle T (Polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i>) dans la survenue de LAM (OR et IC à 95 %).....	Page 53
Tableau IX: Étude des différents effets possibles de l'allèle T (Polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i>) par OR (IC 95 %) et valeur <i>p</i>	Page 54
Tableau X : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> chez la population témoin et chez les patients.	Page 55
Tableau XI : Étude des différents effets possibles du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> par calcul de l'OR (IC 95 %) et la valeur <i>p</i>	Page 56
Tableau XII : Conclusions des études (C677T de la <i>MTHFR</i> /LAM) incluses dans notre méta- analyse	Page 59

Introduction

Les leucémies sont des hémopathies malignes caractérisées par l'accumulation et/ou la prolifération de cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse et le sang ; il existe des leucémies chroniques et des leucémies aiguës. Les leucémies chroniques sont caractérisées par une évolution lente et par la prolifération et l'accumulation de cellules originaires de la moelle osseuse à un stade avancé de leur différenciation. Dans le cas où cette prolifération concerne des cellules lymphocytaires (cellules lymphoïdes de la lignée B) on parlera de Leucémies Lymphoïdes Chroniques (LLC), s'il s'agit de cellules myéloïdes (lignée granulocytaire essentiellement) de Leucémies Myéloïdes Chroniques (LMC). Les leucémies aiguës sont, elles, caractérisées par une évolution rapide et par la prolifération dans la moelle osseuse et dans le sang de cellules immatures. Suivant l'origine des blastes, lymphoblastes ou myéloblastes, on parle de Leucémies Aiguës Lymphoblastiques ou Myéloblastiques (LAL ou LAM). Les leucémies doivent être distinguées des lymphomes qui sont aussi des hémopathies mais se développant dans les aires lymphoïdes secondaires et des myélomes dont le foyer initial de la maladie est aussi la moelle osseuse mais dont le passage dans le sang est faible ou nul [1].

Les LAM correspondent à un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisé par la prolifération anormale et excessive de cellules hématopoïétiques immatures généralement localisées dans la moelle osseuse et le sang. Ces cellules, communément appelées blastes, sont bloquées dans leurs différenciation à un stade précoce et inhibent le fonctionnement de la moelle osseuse normale (soit par un encombrement physique de l'espace médullaire, soit par une inhibition de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques normaux soit par l'association des deux mécanismes). Même si l'ensemble des LAM présentent de nombreuses similitudes cliniques et biologiques, la variabilité des réponses à la chimiothérapie et du pronostic atteste de l'hétérogénéité de ces hémopathies [2, 3].

Le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des LAM font aujourd'hui une large place aux techniques de cytogénétique (conventionnelle et moléculaire) et de biologie moléculaire en complément de techniques usuelles (hémogramme, myélogramme et cytochimie). La thérapeutique reste difficile à cause des résistances et des rechutes aux traitements chimiothérapeutiques classiques. Des thérapies ciblées basées sur les connaissances de la physiopathologie des LAM sont en cours de développement [2, 3].

L'étiologie des LAM demeure, en grande partie, inconnue. Les facteurs étiologiques reconnus sont génétiques endogènes (constitutionnels ou acquis) ou environnementaux. Les facteurs de risque bien établis accréditent l'idée d'une hétérogénéité étiologique sous-jacente à cette diversité. Ceci n'exclut pas que plusieurs hémopathies puissent partager des facteurs de risque, notamment environnementaux [2, 3].

Introduction

De nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires de leucémogénèse. La part de la génétique, même si cela n'est pas simple à déterminer, est de plus en plus étudiée. De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle de facteurs génétiques dans la survenue de LAM. Initialement axés vers l'identification de mutations rares à forte pénétrance (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs), cependant, et au cours de la dernière décennie, un nombre considérable d'études qui prospectent l'implication de polymorphismes génétiques a été menée (gènes impliqués dans diverses voies métaboliques qui peuvent avoir un impact important au niveau de la population). Les polymorphismes génétiques pourraient expliquer, partiellement, l'étiologie des LAM [4].

Le concept de susceptibilité génétique au cancer n'est pas nouveau. De nombreux exemples ont montré que la transmission héréditaire de certaines mutations était associée à un très haut risque de cancers tels que le rétinoblastome, le syndrome de Li-Frauméni, la polypose adénomateuse ou certains cancers du sein. Cependant, ces mutations sont très rares dans la population générale et leur contribution à l'incidence des cancers est faible. Par ailleurs, on sait qu'un grand nombre de cancers est due à des facteurs environnementaux. De nombreuses études épidémiologiques ont montré le rôle des expositions professionnelles (hydrocarbures aromatiques polycycliques, amiante, amines aromatiques, benzène, chlorure de vinyle) dans le développement de cancers. Les interactions entre facteurs génétiques et environnementaux constituent un axe de recherche en plein essor [5].

Les LAM représentent un modèle privilégié des mécanismes de cancérogenèse chez l'homme, par la présence récurrente d'anomalies génétiques impliquées dans leur processus oncogénique, et par la disponibilité de matériel tumoral. Il est probable que l'évolution des capacités d'analyse, de la grande quantité de résultats obtenus lors des études globales des transcrits et des protéines (génomique et protéomique) des échantillons leucémiques, permettra de dégager de nouvelles pistes dans la compréhension du processus tumoral et une prise en charge thérapeutique plus efficace [6].

Notre travail de recherche vise à :

- Faire une recherche bibliographique bien documentée sur l'aspect biologique des LAM avec une synthèse exhaustive sur l'épidémiologie, l'étiologie et la génétique de ces pathologies complexes (gènes impliqués et altérations géniques rencontrées).
- Prospector, par une méta-analyse et une étude cas-témoins, l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR* (5,10-Méthylène TétraHydroFolate Réductase) dans l'incidence des LAM.

Partie Bibliographique

Chapitre 1

Sang, moelle et hématopoïèse

Sang, moelle et hématopoïèse

I- Le sang :

Le sang est un tissu conjonctif spécialisé, constitué d'un liquide, le plasma, dans lequel des cellules diverses (éléments figurés) circulent en suspension. C'est un liquide rouge et épais, légèrement alcalin (pH entre 7,35 et 7,45). Le sang contient différents types de cellules, ayant des caractéristiques et fonctions biologiques distinctes ; un rôle dans le transport de l'oxygène pour les globules rouges, dans l'inflammation et la phagocytose pour les granulocytes et les monocytes, dans l'hémostase pour les plaquettes et dans l'immunité spécifique pour les lymphocytes (**voir annexe I**).

Un dysfonctionnement quantitatif ou qualitatif de l'un des composants du tissu sanguin est susceptible d'entraîner diverses pathologies avec une symptomatologie clinique et biologique très contrastée [7, 8].

1-1- Le plasma : ou phase liquide du sang, est composée à 90 % d'eau chargée de sels minéraux. Il est également très riche en protéines, notamment en albumine, qui contribue au transport de divers constituants au sein de l'organisme. Les Immunoglobulines (Ig), également en suspension dans le plasma, participent dans la lutte contre les agents infectieux. Le plasma contient également des facteurs de coagulation (ou anti-hémophiliques) [11].

1-2- 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) et des fragments de cytoplasme, les plaquettes (ou thrombocytes). Leur origine est médullaire, provenant 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 [9].

a- Les globules rouges : cellules anucléées de forme biconcave, produites dans la moelle osseuse.

L'érythropoïèse c'est-à-dire la synthèse des hématies, est régulée par des hormones notamment l'ÉrythroPOïétine (EPO). Après plusieurs étapes de différenciation, les érythrocytes passent dans la circulation sanguine où leur rôle est le transport de l'oxygène. Elles se composent d'une membrane et d'un cytoplasme [21]. Cette membrane permet les échanges entre plasma et cytoplasme. À sa surface, des charges électronégatives assurent une certaine force répulsive empêchant les globules rouges de s'agglomérer. Le cytoplasme qui contient, outre de l'eau, des ions minéraux (K^+ , Na^+ et Ca^{++}) et du glucose en provenance du plasma, deux constituants protéiques essentiels : l'Hémoglobine (Hb) et les enzymes érythrocytaires [10].

- b- Les PolyNucléaires Neutrophiles (PNN) :** les PNN sont des cellules spécialisées dans la destruction des agents pathogènes par phagocytose et bactéricidie. Dans la circulation sanguine, les PNN ne sont qu'en transit (en 12 heures on estime que 50 % des PNN produits par la moelle, ont quitté le système vasculaire). Leur objectif est les tissus qu'ils gagnent pour y' remplir leur rôle de défense antibactérienne non spécifique). En cas de chiffre supérieur à la normale, on parle de polynucléose neutrophile, et dans le cas inverse, de neutropénie [9, 10].
- c- Les PolyNucléaires Éosinophiles (PNEo) :** ils sont de structure comparable aux PNN. Ils en diffèrent par leurs granulations spécifiques éosinophiles. Leur nombre s'élève dans certaines parasitoses et en cas d'allergie [9, 10].
- d- Les PolyNucléaires Basophiles (PNB) :** ce sont les acteurs majeurs de la réaction allergique et de divers événements immuns et inflammatoires (réactions d'hypersensibilité). Ils agissent par la libération de composés vasoactifs (histamine) et immuno-modulateurs contenus dans leurs granules, après stimulation, faisant intervenir ou non des IgE [3i].
- e- Les Monocytes (Mono) :** les monocytes naissent au niveau de la moelle puis circulent dans le sang. Ils ne séjournent que peu de temps dans le sang où leur nombre varie de 200 à 1000/mm³ dans les conditions physiologiques. Après leur séjour intra vasculaire, les monocytes se rendent vers les différents tissus (moelle osseuse, rate, ganglions, tissus conjonctifs, tissus sous-cutanés, poumons et séreuses) où ils deviennent des macrophages. On peut donc dire que les monocytes sanguins sont une forme circulante "intermédiaire" du système des phagocytes mononucléés encore appelé système réticulo-endothélial [4i].
- f- Les lymphocytes :** issus de la moelle osseuse, les cellules lymphoïdes occupent pour leur maturation les organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse pour les lymphocytes B, thymus pour les lymphocytes T). Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire, les lymphocytes B de l'immunité humorale. Ils migrent ensuite vers les organes lymphoïdes périphériques (la rate et les ganglions). À partir des ganglions, les lymphocytes vont recirculer dans le sang périphérique, via les vaisseaux lymphatiques, pour revenir aux ganglions ce qui assure une recirculation permanente des lymphocytes entre systèmes sanguin et lymphatique. Les lymphocytes B circulants sont des cellules au repos, capables de se transformer pour jouer leur rôle dans la défense de l'organisme. Ils se transforment alors en plasmocytes synthétisant des anticorps. Seules des études immunologiques spécialisées des marqueurs membranaires permettent de différencier les lymphocytes B et T. En cas de numération supérieure à la normale (1000 à 4000 lymphocytes/mm³ chez l'adulte et plus du double chez l'enfant), on parle d'hyperlymphocytose, en cas de chiffre inférieur de lymphopénie [4i].

g- Les Plaquettes (Pq) : entités acellulaires qui proviennent de la fragmentation du cytoplasme d'une très grande cellule médullaire, le mégacaryocyte. Elles ne possèdent donc pas de noyau. Chaque mégacaryocyte libère plusieurs milliers de plaquettes dans le sang. La membrane qui entoure les plaquettes comporte des phospholipides et des glycoprotéines au rôle fondamental dans les phénomènes de l'hémostase primaire et de la coagulation. Son organisation intérieure avec un cytosquelette, des granulations de différents types, un système de communication avec l'extérieur, est très complexe [4i].

II- 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. C'est un tissu "mou", par conséquent il est protégé par de l'os qui est un tissu dur. Si on rassemblait toute la moelle osseuse chez un adulte, la masse obtenue pèserait 1,6 à 3 kg [11, 12]. Cet "organe" est très spécial, car 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") [13].

La moelle hématopoïétique, anatomiquement dispersée dans de multiples pièces osseuses est enfoncée à l'intérieur d'un cadre osseux. L'examen d'une coupe de moelle d'os spongieux hématogène permet de reconnaître différentes structures en disposition concentrique, composé 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, véritable structure hématogène, mais qui serait, non fonctionnelle sans les autres structures citées précédemment [14, 15].

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 osseuse hématopoïétique assure plusieurs fonctions : hématogène, immunologique et ostéogène (assurant la formation, la croissance et le modelage du tissu osseux avec des ostéoblastes et des ostéoclastes) [16, 17].

III- L'hématopoïèse :

3-1- Définition :

L'hématopoïèse est un processus physiologique ayant pour but la production continue et régulée des cellules du sang. Ces dernières ayant une durée de vie limitée (environ 7 jours pour les plaquettes, 120 jours pour les globules rouges et 24 heures pour les polynucléaires), environ 10^{13} cellules qui sont produites chaque jour pour garder un nombre constant de cellules sanguines en situation physiologique. Ce renouvellement permanent est soumis à une régulation fine au sein de la niche hématopoïétique. Toutes les cellules du tissu sanguin sont produites à partir des CSH ; cellules capables à la fois d'autorenouveaulement (permettant de maintenir constant le pool de CSH multipotentes) et de différenciation (en progéniteurs non multipotents en réponse à un signal exogène). L'hématopoïèse normale est donc un processus qui permet l'équilibre entre l'autorenouveaulement des cellules et leur différenciation.

Au sein de l'hématopoïèse, on distingue la myélopoïèse, permettant la production des cellules myéloïdes (hématies, polynucléaires, monocytes et plaquettes), et la lymphopoïèse permettant la production des lymphocytes. La régulation de l'hématopoïèse est sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance. Les progéniteurs seront capables de donner, après différenciation, tous les types de cellules sanguines (**voir figure 01**).

Au stade embryonnaire, l'hématopoïèse "primitive" se déroule dans le sac vitellin puis dans la région Aorte-Gonade-Mésonéphros (AGM). Les CSH vont ensuite coloniser le foie fœtal, le thymus, la rate et enfin la moelle osseuse où elles s'installent de manière définitive. Celle-ci est localisée dans tous les os chez l'enfant puis, chez l'adulte, principalement dans les os plats et courts : le sternum, les os iliaques et les corps vertébraux. Après la naissance, l'hématopoïèse se déroule chez l'homme, dans la moelle des os, et en particulier chez l'adulte dans l'os sternal, les os iliaques et la tête du fémur, ce sont donc des lieux de ponctions en cas de soupçon de problèmes hématopoïétiques (myélogramme et Biopsie Ostéo-Médullaire (BOM)) [5i].

3-2- Les compartiments de l'hématopoïèse :

a- Les CSH : cellules souches adultes multipotentes, elles ne représentent qu'un très faible pourcentage des cellules médullaires (0,01 à 0,05 %). Elles se caractérisent par :

- L'auto-renouveaulement, permettant un maintien du pool de CSH tout au long de la vie ;
- La multi-potence, leur conférant la possibilité de générer les différents types cellulaires hématopoïétiques ;
- La capacité de différenciation, permettant leur engagement vers une lignée hématopoïétique.

Ces cellules possèdent la capacité de reproduire une hématopoïèse lorsqu'elles sont greffées dans des souris immunodéprimées. Le phénotype des CSH humaines est classiquement le suivant : CD (Cluster of Differentiation) 34+Thy1+CD38-HLA (Human Leukocyte Antigen)-DR-CD33-.

- b- Les progéniteurs :** plus nombreux que les CSH, les progéniteurs restent cependant minoritaires et non identifiables sur un myélogramme (1 progéniteur pour 1000 cellules médullaires). Ces cellules perdent la capacité d'auto-renouvellement mais possèdent des capacités de prolifération importante. On distingue les progéniteurs immatures et les progéniteurs dits "clonogéniques" possédant la capacité à produire des colonies. Ils sont mis en évidence par des techniques de culture cellulaire en milieu semi-solide ou liquide en présence de facteurs de croissance. On classe alors les progéniteurs clonogéniques suivant le temps pour obtenir des colonies cellulaires, les types cellulaires qui composent les colonies, leur aspect et leur taille. On distingue classiquement grâce aux techniques de culture cellulaire : Les LTC-IC (Long Term Culture Initiating Cells), les CFU-GEMM (Colony Forming unit - Granulocyte Erythrocyte Monocyte Mégacaryocyte), les CFU-GM (Colony Forming Unit - Granulocyte Monocytes), les CFU-G et CFU-M, les BFU-E (Burst Forming Unit - Erythrocyte) et les CFU-E (Colony Forming Unit - Erythrocyte), les CFU-Meg (Colony Forming Unit - Megakaryocyte).
- c- Les précurseurs :** les précurseurs sont des cellules identifiables sur un myélogramme car ils présentent des caractères morphologiques spécifiques de lignées. Ils ne sont pas capables d'auto-renouvellement. Ce sont des cellules différenciées en cours de maturation. Ces cellules sont capables d'un nombre limité de mitoses et sont normalement localisées dans la moelle osseuse. On distingue :
- Pour la lignée érythroïde : les proérythroblastes, les érythroblastes basophiles, les érythroblastes polychromatophiles et les érythroblastes acidophiles.
 - Pour la lignée mégacaryocytaire : les mégacaryoblastes, les mégacaryocytes basophiles, les mégacaryocytes granuleux et les mégacaryocytes matures.
 - Pour la lignée granuleuse : les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes.
 - Pour la lignée monocyttaire : les monoblastes et les promonocytes.
- d- Les cellules et particules anucléées matures :** les cellules matures (terminales et fonctionnelles) du sang sont composées des polynucléaires granuleux (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), des lymphocytes et des monocytes. Les particules anucléées matures sont les réticulocytes, les hématies et les plaquettes. Une fois matures, ces éléments passent la barrière médullo-sanguine, composée essentiellement des cellules endothéliales des capillaires sanguins.

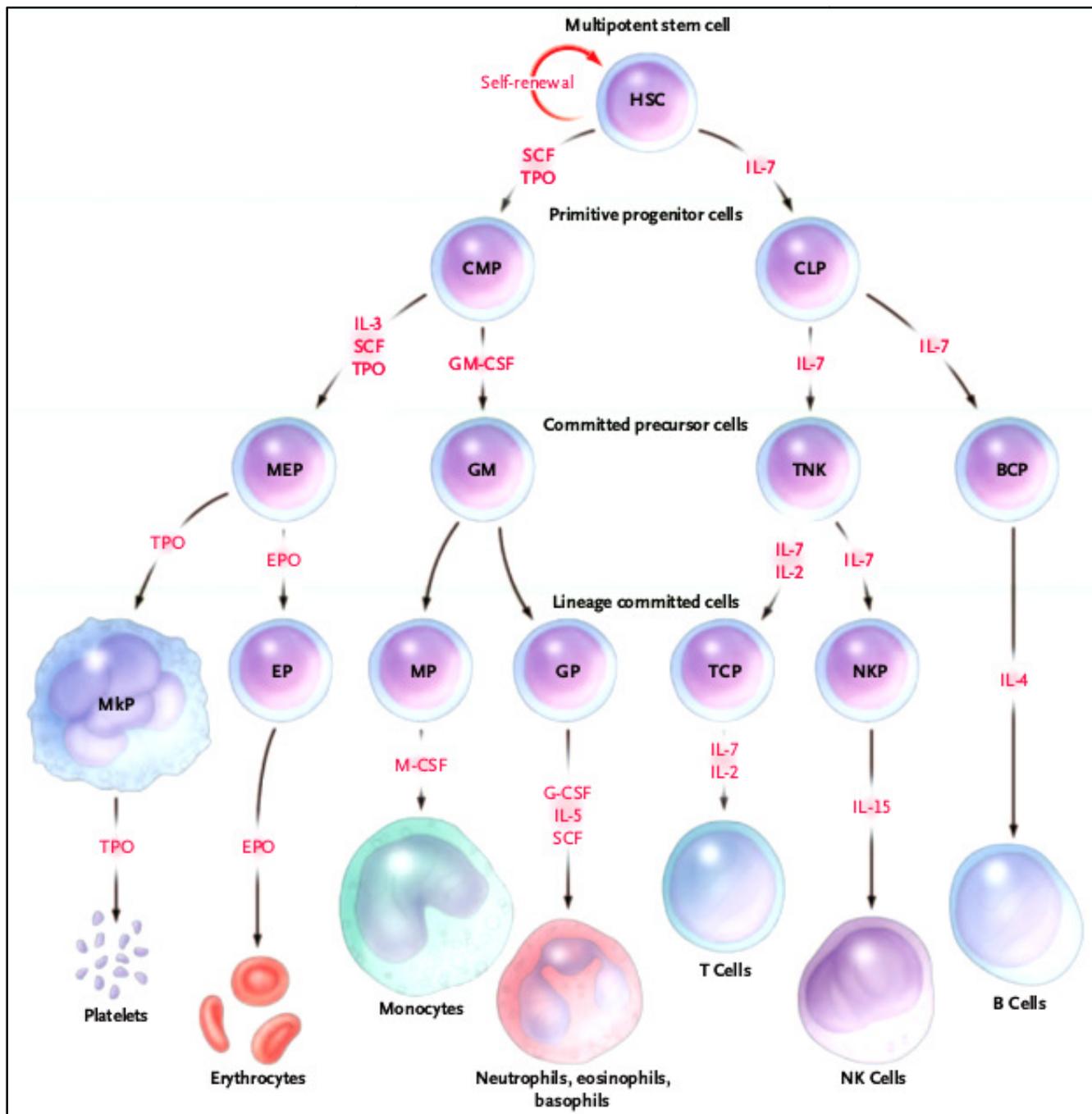


Figure 01 : Modèle général de l'hématopoïèse (Kaushansky et al., 2006).

Le développement des cellules sanguines débute à partir d'une CSH, qui peut subir soit auto-renouvellement ou la différenciation en une lignée des cellules Progénitrices Communes Myéloïdes (CMPs) ou Lymphoïdes (CLPs) qui donnent naissance à d'autres progéniteurs plus différenciés. De ces dernières descendent les cellules terminales matures. Les cytokines et facteurs de croissance favorisant la survie, la prolifération et/ou la différenciation de chaque type de cellule sont indiqués en rouge.

3-3- Régulation de l'hématopoïèse :

La régulation de l'hématopoïèse est complexe. Elle dépend essentiellement de facteurs de croissance et de l'existence d'un microenvironnement médullaire (matrice extracellulaire et cellules stromales : fibroblastes, cellules endothéliales et adipocytes). Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation de toute l'hématopoïèse, en agissant principalement au niveau des progéniteurs primitifs, comme l'InterLeukine 1 (IL1), l'IL6 et le SCF (Stem Cell Factor). D'autres sont plutôt spécifiques à une lignée, en agissant sur des progéniteurs plus tardifs, comme l'EPO, le M-CSF (Myeloid - Colony Stimulating Factor) et le G-CSF (Granulocyte - Colony Stimulating Factor). Cette régulation spécifique est importante étant donné la différence de durée de vie et la diversité de fonctions des cellules sanguines. Le rôle de ces cytokines et de l'environnement de la cellule dans son engagement de différenciation n'est pas encore bien élucidé. Ces signaux pourraient être déterminants dans l'engagement en différenciation de la cellule ou autoriseraient uniquement la survie, la prolifération et la différenciation de la cellule, en offrant un environnement permissif et sélectif, n'ayant pas ainsi de responsabilité dans le destin de la cellule (renouvellement versus détermination). Cette décision est probablement dictée par des facteurs de transcription, dont les mécanismes de contrôle sont loin d'être totalement connus [18, 19].

a- Les facteurs de croissance : les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des glycoprotéines secrétés principalement en mode paracrine (par les cellules du stroma médullaire) agissant comme des hormones hématopoïétiques. Ces facteurs peuvent être soit activateurs, soit inhibiteurs du processus hématopoïétique : ceux qui activent l'hématopoïèse peuvent être classés en 3 groupes :

- **Facteurs synergiques :** ces facteurs agissent sur les cellules souches primitives en augmentant leur nombre en cycle cellulaire, en assurant leur survie et en les sensibilisant aux autres facteurs par l'augmentation du nombre de récepteurs transmembranaires [20]. Sont principalement les : SCF, IL1, IL6, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), FLt-3 (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand), et même la Thrombopoïétine (TPO). Bien que fût initialement considérée comme un facteur agissant sur les cellules engagées vers une différenciation mégacaryocytaire [21, 22], il a été récemment démontré qu'elle pouvait induire une prolifération des CSH [23].
- **Facteurs multipotents :** ce sont principalement les : IL-3, GM-CSF (Granulocyte Monocyte - Colony Stimulating Factor). Les IL-3 dont la synthèse est extra-médullaire (lymphocyte T, mastocytes et cellules gliales) ; agissent sur toutes les lignées hématopoïétiques ; ils induisent une prolifération des progéniteurs et favorisent une différenciation de toutes les lignées (sauf érythroblastiques). Le GM-CSF est produit par plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes T, les monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les ostéoblastes.

Il agit principalement sur la prolifération et la différenciation des lignées granulocytaires et macrophagiques [24, 25] mais est aussi capable d'induire la différenciation des mégacaryocytes, des éosinophiles et en présence d'érythropoïétine, des érythrocytes [24].

➤ **Facteurs restreints** : agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont principalement le G-CSF (assure la différenciation et l'activation des granulocytes), le M-CSF (inactif seul, dépendant du GM-CSF, assure l'activation et la survie des monocytes et macrophages), l'EPO (agit tardivement sur la différenciation érythroblastique), le TPO (joue un rôle dans la maturation des mégacaryocytes, la libération et la production des plaquettes) et l'IL-5 (assure la différenciation des éosinophiles) [26].

b- Régulation négative de l'hématopoïèse : il existe également un certain nombre de facteurs capable d'inhiber l'hématopoïèse [27], par la régulation négative de l'auto-renouveaulement, de la prolifération et de la différenciation des CSH. Ils peuvent agir directement sur les CSH ou indirectement en modulant la sécrétion de facteurs de croissance par d'autres populations cellulaires. Parmi ces inhibiteurs on peut citer le TGF β (Transforming Growth Factor β) (qui inhibe l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs primitifs et des cellules leucémiques ainsi que la mégacaryopoïèse) et le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) [28, 29].

c- Le microenvironnement médullaire : les cellules souches ont des interactions directes et relativement spécifiques avec la matrice extracellulaire et les cellules stromales présentes dans la moelle osseuse [27]. Ces interactions sont principalement responsables du maintien des CSH dans la moelle osseuse. Néanmoins, elles permettent également la transmission de signaux qui modulent la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les progéniteurs hématopoïétiques expriment plus de 20 récepteurs d'adhésions différents [30]. Parmi ces molécules, on trouve des intégrines responsables de l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine ou le collagène [25]. Des molécules d'adhésion cellule-cellule telles que l'ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecule), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) et PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) [26].

En résumé, le fonctionnement normal du système hématopoïétique est basé sur l'équilibre entre l'auto renouvellement, la différenciation et l'apoptose de cellules sanguines ; c'est l'homéostasie.

Si cet équilibre est rompu, il peut amener à des situations pathologiques, plus au moins graves, essentiellement des hémopathies malignes [29, 31].

IV- Mécanismes moléculaires de la leucémogénèse :

Au cours de la leucémie aigüe, il y'a une transformation maligne d'une cellule devenue incapable de se différencier en réponse aux stimuli physiologiques normaux, et qui se multiplie indéfiniment donnant naissance à un clone leucémique, avec blocage de la différenciation cellulaire, source d'une accumulation de cellules blastiques dans la moelle osseuse entraînant ainsi une défaillance de l'hématopoïèse normale responsable du tableau clinique révélateur de cette hémopathie [32]. Ce phénomène de leucémisation peut survenir à n'importe quel stade de l'hématopoïèse, depuis la CSH jusqu'aux précurseurs déjà bien engagés dans une lignée. Quel que soit le stade où survient la leucémisation on aura une prolifération de cellules monomorphes [33].

L'hématopoïèse leucémique se développe en parallèle de l'hématopoïèse normale, tout en conservant des caractéristiques comparables à cette dernière, notamment au niveau de l'organisation hiérarchique du clone leucémique ou Cellule Souche Leucémique (CSL), CFU-L (Colony Forming Unit - Leukemia). Les CSL partagent beaucoup de similitudes avec les CSH normales à l'origine du développement des LAM. En effet, à l'instar de sa contrepartie normale, le clone leucémique est organisé de façon hiérarchique en 3 compartiments distincts :

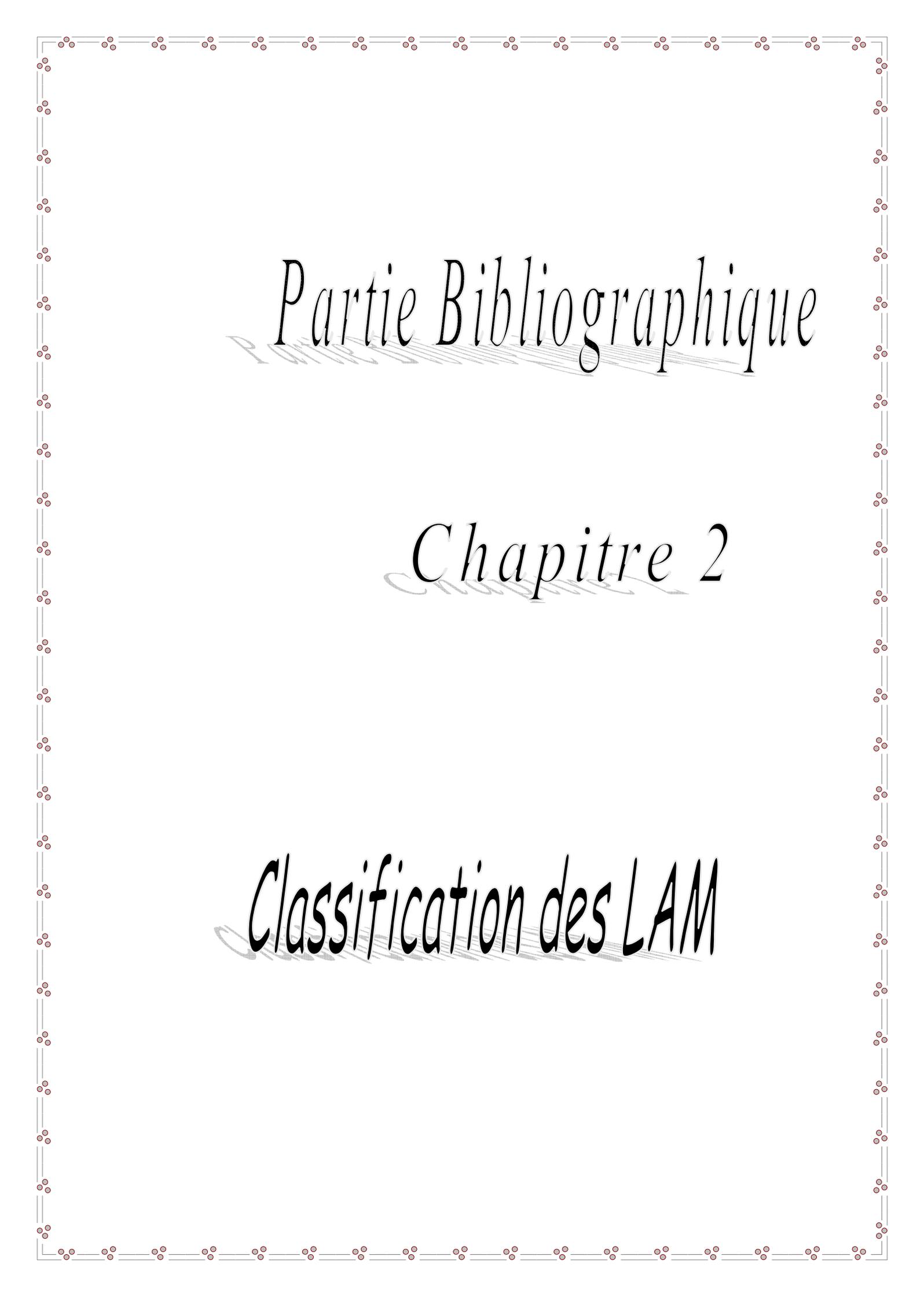
- 1) Un compartiment minoritaire de CSL de phénotype CD34+ CD38- CD123+, pour la plupart quiescentes, très résistantes aux agents conventionnels de chimiothérapie mais capable d'auto-renouveaulement ou d'engagement dans un processus de prolifération/maturation.
- 2) Un compartiment plus mature de progéniteurs leucémiques CFU-L ayant perdu les capacités d'auto-renouveaulement mais dotés d'un fort pouvoir clonogénique.
- 3) Un compartiment majoritaire de cellules leucémiques avec des capacités de différenciation limitées à un stade de différenciation granulo-monocytaire [34].

L'hématopoïèse leucémique est associée à une inhibition de l'hématopoïèse normale par des mécanismes mal connus conduisant à un état d'insuffisance médullaire majeure qui fait la gravité de cette maladie. L'étude des mécanismes moléculaires aboutissant au phénotype leucémique a permis de mettre en évidence un processus à plusieurs étapes nécessitant la coopération d'au moins deux événements oncogéniques [35]. Ces deux événements mutationnels seraient nécessaires et suffisants pour induire la leucémie selon la théorie des deux coups ou "Two hits model" (publiée par **Warner et coll** en 2005).

Selon ce postulat l'émergence de la LAM est le résultat de deux types d'évènement mutationnel :

- **Des mutations de classe II** ; induisent un blocage de la différenciation. C'est le cas de la plupart des translocations chromosomiques récurrentes observées dans les LAM. On citera par exemple les translocations $t(8;21)(q22;q22)$, les inversions du chromosome 16, $inv16(p13;q22)$ / $t(16;16)(p13;q22)$, la translocation $t(15;17)(q22;q21)$ ou encore les translocations multiples impliquant le gène *MLL* (Mixed Lineage Leukemia) en 11q23. Des mutations de gènes de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation myéloïde (*CEBP α* (CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha), *MLL* et *GATA1* (Globin Transcription factor 1)) peuvent également expliquer ce blocage [35, 36].
- **Des mutations de classe I** ; confèrent aux cellules leucémiques un avantage de prolifération et de survie. C'est le cas par exemple du récepteur membranaire FLT3 muté et constitutivement actif dans 30 à 40 % des LAM. Des mutations activatrices du récepteur *c-Kit* (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog), du récepteur *c-fms* (Mc Donough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog) et des protéines *RAS* (RAt Sarcoma viral oncogene) sont également décrites. Toutes ces mutations, présentent dans environ 60 % des LAM, aboutissent à l'activation constitutive de voies de survie/prolifération cellulaire comme la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases), des PI3K (Phospho-Inositides 3- Kinases), Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog), des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) ou du NF- κ B (Nuclear Factor κ B) [37, 38].

Toutefois, ce modèle n'intègre pas d'autres caractéristiques des processus néoplasiques comme l'instabilité génétique, l'échappement à la réponse immune, la néo-angiogenèse ou les interactions avec le microenvironnement médullaire qui jouent également un rôle important dans la leucémogénèse et la réponse aux agressions génotoxiques. Les mécanismes moléculaires régissant cette transformation demeurent en grande partie inconnus [39].



Partie Bibliographique

Chapitre 2

Classification des LAM

I- Notion de classification des leucémies :

1-1- Historique :

Au XIX^{ième} siècle, le terme leucémie ne désignait qu'une seule maladie mortelle. Le sang extrait des patients atteints par cette affection était d'aspect blanchâtre [40]. Parmi les premiers observateurs qui décrièrent les leucémies, figure le médecin et microscopiste *Alfred Donne* en France [41, 42]. Les leucémies rencontrées en 1845 étaient chroniques, *Bennett* proposa le nom de leucocytémie, et *Virchow*, celui de leucémie. *Virchow* les définit comme des perturbations du développement des cellules sanguines, et distingua des formes spléniques et lymphatiques, mais il dut également reconnaître des formes mixtes, et souligna la difficulté de définir les limites du concept de leucémie [40, 43].

La découverte de la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse par *Ernst Neumann* en 1869, conduisit au concept de leucémie myélogène et à une classification en trois formes : myélogène pure, splénique ou lymphatique avec trouble de la moelle. Ce fut seulement en 1889 que *Wilhelm Ebstein* discuta des cas d'évolution rapide qu'il nomma leucémies aiguës et distingua une transformation aiguë des leucémies chroniques [41]. Une preuve importante du caractère néoplasique des leucémies fut donnée en 1934 par *Jean Bernard*, qui provoqua une érythro-leucémie expérimentale par l'injection intra-médullaire de goudron chez le rat [41, 42].

Au début des années 1970, un groupe international constitué de chercheurs français, américains et britanniques a travaillé sur une nouvelle classification des leucémies aiguës en compulsant des centaines de dossiers médicaux de malades leucémiques. Il en a résulté la classification Franco-Américano-Britannique (FAB), toujours utilisée aujourd'hui pour classer les leucémies aiguës. On distingue aujourd'hui de nombreux types de leucémies qui exigent chacun un protocole thérapeutique adapté [40].

1-2- Classification des LAM :

a- Classification FAB : le groupe Franco-Américano-britannique élaborait en 1976 la première classification consensus des LAM portant le nom FAB, elle tenait compte des critères cytologiques et permettait de classer les LAM en sept entités (LAM0 à 6) puis dès 1985 en huit entités [44, 45]. Ainsi les cellules leucémiques, ou blastes, de type M0 à M3 appartiennent à la lignée granulocytaire avec un blocage au stade myéloblaste pour les M0, M1 et M2 ou un blocage au stade promyélocyte pour les M3. Les blastes de type M4 et M5 appartiennent à la lignée monocyttaire et sont bloqués au stade monoblaste. Les blastes M6 appartiennent à la lignée érythrocytaire et sont bloqués au stade proérythroblaste. Enfin, les blastes de type M7 appartiennent à la lignée des plaquettes et sont bloqués au stade mégacaryoblaste.

- **LAM0** : Indifférenciée,
- **LAM1** : Myéloblastique sans maturation,
- **LAM2** : Myéloblastique avec une maturation granulocytaire,
- **LAM3** : Promyélocytaire,
- **LAM4** : Myélo-monocytaire,
- **LAM4Eo** : Myélo-monocytaire avec éosinophilie,
- **LAM5** : Monoblastique (sans différenciation : M5a, avec différenciation : M5b),
- **LAM6** : Érythroleucémie (M6a) ou Érythroblastique (M6b),
- **LAM7** : Mégacaryoblastique [46].

Les sous-types morphologiques de LAM comprennent également des entités rares qui ne figurent pas dans le système FAB, tels que la leucémie basophile, qui a été proposée comme un neuvième sous-type, M8, en 1999 [47]. Elle tenait donc compte des critères qualitatifs morphologiques et cytochimiques, et des critères quantitatifs par dénombrement des blastes dans le sang et dans la moelle osseuse [45]. (voir annexe II).

b- Classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) : élaborée à la fin des années 90, cette classification se basait sur la présence ou non d'anomalies cytogénétiques récurrentes [48]. En 2001, la classification OMS apportait un complément à la classification FAB en intégrant les critères génétiques et cliniques. À ce stade, une LAM est définie dès que le taux de blastes est à 20 %, alors qu'auparavant la FAB la définissait à un taux de 30 %. De plus, pour certaines LAM associées aux anomalies $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13;q22)$ ou $t(16;16)(p13;q22)$ et $t(15;17)(q22;q12)$ le nombre de blastes dans le sang ou dans la moelle n'est plus pris en considération pour le diagnostic de LAM, ces anomalies suffisent à cette définition [49]. (voir annexe III).

En 2008, une révision de la classification des LAM, tenant compte des caractéristiques moléculaires, est apportée. Elle regroupe donc sous la dénomination LAM avec Caractéristiques Myélodysplasiques (LAM-CM) les entités suivantes : les LAM survenant au décours d'un Syndrome Myélo-Dysplasique (SMD) connu, les LAM sans phase de SMD connue mais présentant une dysplasie multilignée et les LAM sans phase de SMD connue mais présentant une anomalie cytogénétique évocatrice de SMD [50, 51].

Par ailleurs, l'observation que les LAM avec antécédents de SMD ou avec antécédents de traitements chimiothérapeutiques ont des caractéristiques particulières à entrainer la création de deux nouveaux types de LAM : les LAM avec myélodysplasie "multilignée" et les LAM ou SMD secondaires à des thérapies.

Cette création repose sur l'importante dysplasie caractéristique de ce type de LAM, leur pronostic plus sévère que les LAM sans antécédent, et leur association fréquente à des anomalies génétiques particulières (3q, -7/del(7q), -5/del(5q), +8, 12p-, -18, +19, del(20q)) et des anomalies caryotypiques complexes.

L'OMS a donc défini 4 grands groupes de LAM : les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, les LAM avec signes de dysplasie touchant plusieurs lignées, les LAM secondaires à des traitements chimiothérapeutiques et les LAM n'entrant pas dans les autres catégories [52]. En effet, si l'évaluation idéale des patients se base sur les anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires, ces informations ne sont pas toujours disponibles ou identifiées. Dans ces cas, la classification cyto-morphologique garde son importance et les critères de classement restent basés sur la classification FAB, exception faite de la catégorie M3 qui disparaît et rejoint le groupe des LAM avec anomalies génétiques récurrentes puisqu'il s'agit de LAM associée à une anomalie caryotypique spécifique t(15;17)(q22;q12).

En 2008, l'OMS a révisé cette classification en ajoutant de nouveaux critères pour la définition de certains types de LAM et de nouvelles sous-catégories notamment à partir de caractéristiques génétiques récemment découvertes [53].

Dans le type LAM avec anomalies génétiques récurrentes, aux 4 sous-groupes précédemment définis, trois anomalies génétiques ont été ajoutées : LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; correspondant à la protéine de fusion *DEK-NUP214*, LAM avec inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; *RPN1-EVII* et LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; *RBM15-MKLI*. Ces anomalies sont associées à des caractéristiques cliniques et morphologiques qui les identifient comme des entités à part entière.

Mais le challenge de la classification de 2008 est d'inclure des anomalies moléculaires telles que *FLT3*, *NPM1* (NucléoPhosMine ou NucléoPlasMine) et *CEBPα* qui ont de fortes valeurs pronostiques mais qui ne définissent pas un groupe homogène avec des caractéristiques propres et qui se retrouvent très souvent associées à d'autres anomalies. Les LAM avec *NPM1* et *CEBPα* muté ont donc été ajoutées dans la classification comme entités provisoires. Pour ce qui est du *FLT3* muté, celui-ci étant très souvent associé à d'autres anomalies, il n'a pas été possible de définir une entité en tant que telle mais à cause de sa forte valeur pronostique une détection de cette anomalie est fortement recommandée notamment dans les cas de caryotypes normaux.

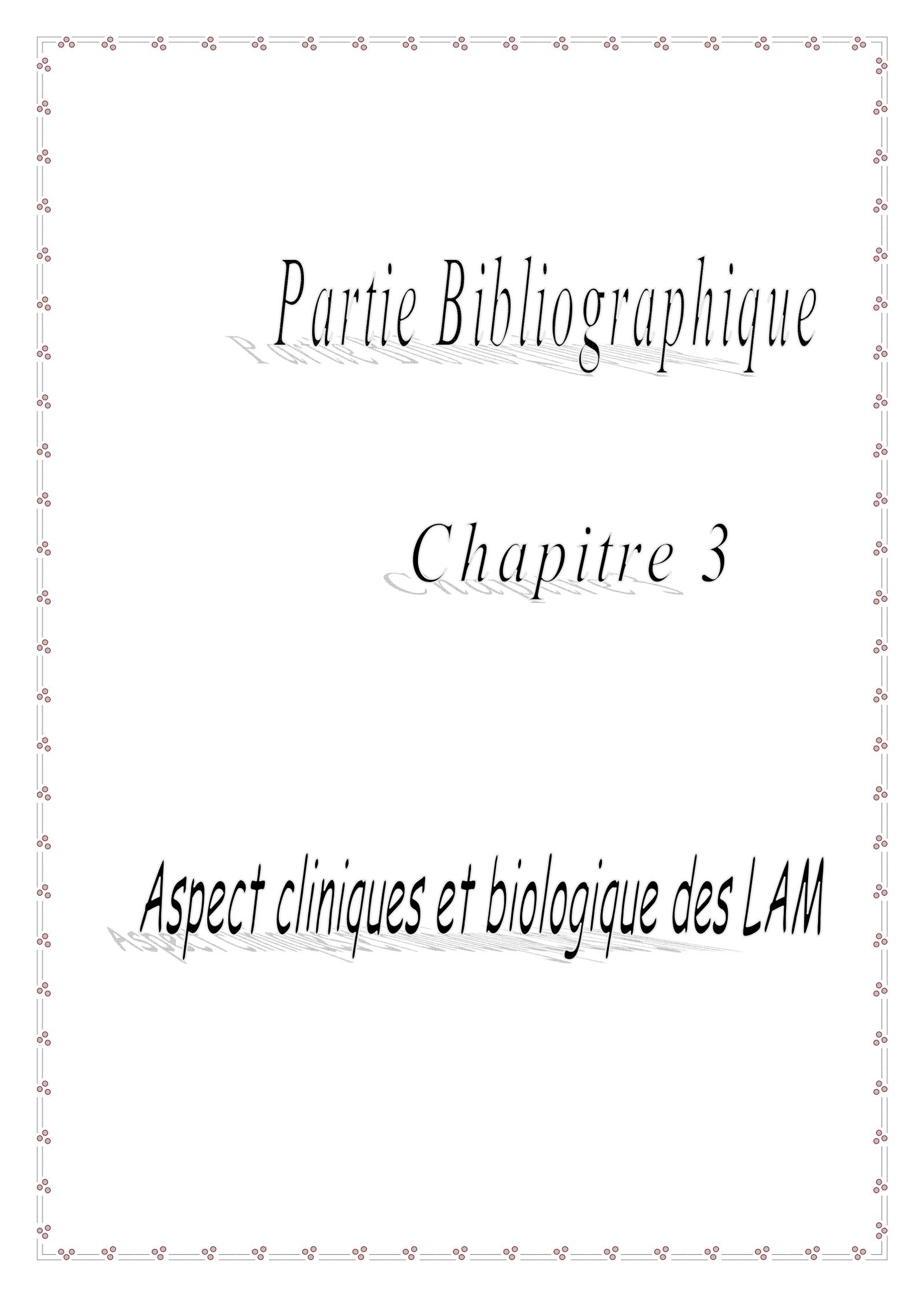
Le type LAM avec signes de dysplasie touchant plusieurs lignées s'élargit en devenant LAM associées à une myélodysplasie. Les LAM associées à cette catégorie sont les LAM avec histoire de SMD ou SMD/NMP (Néoplasmes Myélo-Prolifératif), les LAM avec anomalies génétiques caractéristiques des myélodysplasies et enfin les LAM avec au moins 50 % de cellules dysplasiques dans au moins deux lignées.

Le type LAM/SMD "secondaires" à des traitements chimiothérapeutiques n'est plus subdivisé selon le type de traitement incriminé, la plupart des patients recevant à la fois des agents alkylants et des inhibiteurs de topoisomérases. Ces LAM ne sont pas associées à des anomalies génétiques particulières mais le fait que les patients aient des pronostics significativement moins bons que les patients avec LAM *de novo* laissent penser que d'autres différences biologiques entrent en jeu, ainsi cette catégorie a été maintenue [54].

Le type de LAM n'entrant pas dans les autres catégories à lui aussi évolué. Les cas de leucémies avec différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire ont été reclassés dans la catégorie des LAM associées à une myélodysplasie et les cas de LAM mégacaryocytaires associées avec des anomalies génétiques particulières sont reclassés dans le type LAM avec anomalies génétiques récurrentes.

Enfin, deux nouveaux groupes ont été créés : les syndromes prolifératifs dus au syndrome de Down et leucémies à cellules dendritiques blastiques plasmocytoides. Les études moléculaires d'anomalies génétiques associées aux leucémies ont contribué à caractériser les protéines impliquées dans la leucémogénèse. Cependant, les études morphologiques restent importantes en raison d'une forte corrélation avec des anomalies cytogénétiques et moléculaires associées aux LAM. L'identification d'entités homogènes permettrait le développement et le perfectionnement des stratégies de traitement [54].

Malgré le développement de nouvelles technologies pour la caractérisation des différentes entités de LAM [55, 56 et 57], on continue à utiliser dans beaucoup de pays en voie de développement les recommandations anciennes de la classification FAB, mise au point en 1976 et basée sur des caractéristiques morphologiques et cytochimiques [58]. Cette nouvelle classification OMS est moins une remise en cause de la classification FAB qu'une évolution réaliste dans laquelle la morphologie demeure l'outil central de première intention ; cet outil, s'il reste absolument nécessaire, s'associe aux nouvelles approches complémentaires dont l'importance est maintenant démontrée sur le plan diagnostique et parfois même plus encore sur celui du pronostic. Les classifications des LAM sont en pleine évolution du fait de la caractérisation de plus en plus fine des événements cytogénétiques et moléculaires et ainsi de nouvelles classifications vont apparaître [59]. (voir annexe III).



Partie Bibliographique

Chapitre 3

Aspect cliniques et biologique des LAM

I- Épidémiologie :

Les hémopathies malignes regroupent des entités très distinctes issues du tissu lymphoïde ou myéloïde. Les connaissances en termes de phénotype immunologique et d'avantage encore en termes de génétique ou de mécanismes moléculaires sont relativement récentes. Les classifications épidémiologiques n'ont pas pu les prendre en compte depuis un laps de temps assez long pour permettre d'avoir, à partir des registres généraux de cancer, des données précises d'incidence et de mortalité pour chaque entité. Les données publiées regroupent ces entités par grandes catégories. Les leucémies aiguës représentent moins de 3 % des cancers, et les LAM environ 25 % de l'ensemble des leucémies. L'incidence globale des LAM est d'environ 3,5 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an. Cette incidence augmente progressivement avec l'âge, surtout après 50 ans (de 1 cas avant 30 ans jusqu'à plus de 20 cas pour 100 000 habitants par an après 80 ans) [60]. Selon le dernier rapport du programme américain de surveillance épidémiologique, l'âge médian au diagnostic est de 67 ans, avec une légère prédominance masculine et une prédominance chez les noirs américains par rapport à la race blanche [61]. On compte aux États-Unis 31 500 nouveaux cas de leucémies aiguës par an, et bien qu'elles ne comptent que pour 3 % des cancers, elles constituent la première cause de mortalité par cancer chez les moins de 40 ans [62].

Les LAM représentent 80 % des leucémies aiguës de l'adulte et leur incidence a été estimée à 3,6 cas pour 100 000 habitants aux États-Unis sur la période 2001 à 2005 [63]. Cette incidence est maximale aux États-Unis, en Australie, et en Europe occidentale. Elle est croissante avec l'âge puisqu'aux États-Unis entre 2000 et 2003, l'incidence était de 1,8 cas pour 100 000 avant l'âge de 65 ans, mais de 17 pour 100 000 au-delà [63]. L'âge médian au diagnostic est donc estimé entre 65 et 69 ans aux États-Unis [63], comme en Europe [64, 65]. Les LAM du sujet âgé représentent d'autant plus un problème de santé publique qu'une augmentation récente d'incidence a été observée, potentiellement du fait du vieillissement des populations occidentales et de l'accroissement de l'administration d'agents cytotoxiques leucémogènes dans le traitement des différents cancers (recrudescences de l'incidence des LAM dites "secondaires" à une chimiothérapie [66].

En France, les leucémies occupent le 11^{ième} rang du classement des cancers et représentent 2,2 % de l'ensemble des cas. Les taux d'incidence standardisés sont estimés à 8,9 pour 100 000 chez les hommes et 5,5 pour 100 000 chez les femmes. En ce qui concerne les leucémies aiguës, elles représentent 41,5 % des cas de leucémies, avec des taux d'incidence standardisés à 4,3 pour 100 000 chez les hommes et 3,2 pour 100 000 chez les femmes [67].

L'incidence des leucémies aiguës augmente depuis 20 ans (taux annuel moyen d'évolution de +1,48 % chez les hommes et 0,92 % chez les femmes). Dans le même temps, la mortalité observée pour les leucémies aiguës tend à diminuer régulièrement de la même façon chez les hommes et chez les femmes (- 0,61 % et -0,17 % respectivement) [67]. Les LAM, avec une incidence globale de 3 pour 100 000 habitants par an en France, sont pour la majorité des pathologies de l'adulte. Leur incidence augmente régulièrement avec l'âge. Par exemple, l'incidence annuelle à 70 ans est de 20 pour 10 000 habitants [68, 69 et 70]. Les LAM se répartissent selon la classification FAB comme suit : M1 20 %, M2 30 %, M3 10 %, M4 15 à 20 %, M5 10 à 15 %, M6 5 % et M7 2 % [71]. Selon la classification OMS, la répartition des LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes est la suivante : LAM t(8;21) 5 % des LAM, LAM inv(16) 5 à 8 %, LAM t(15;17) 5 à 8 %, LAM t(6;9) 0,7 à 1,8 %, LAM inv(3) 1 à 2 % et LAM t(1;22) < 1 % [71].

Les fréquences d'apparition des cancers et des leucémies sont sensiblement différentes chez les enfants et chez les adultes. En effet, environ un tiers des adultes sont atteints de cancer une fois dans leur vie, contre seulement un enfant sur 500 atteint d'une tumeur maligne avant l'âge de 15 ans dans les pays occidentaux. Cette différence de distribution reste marquée pour les leucémies. En effet, les leucémies représentent le cancer le plus fréquent chez l'enfant (environ un tiers des cas de cancers sont des leucémies) alors qu'elles ne représentent qu'une faible proportion des cas diagnostiqués chez les adultes. Au vu de ces caractéristiques de distribution très différentes, il importe que les études sur les leucémies différencient les enfants des adultes [72]. Plus de la moitié des leucémies aiguës de l'enfant surviennent avant l'âge de 5 ans [73]. Les LAM représentent 4,6 % des cancers et 15 % des leucémies aiguës chez l'enfant de moins de 15 ans. On observe un pic dans la première année de vie. Le taux d'incidence standardisé sur l'âge est de 0,7 pour 100 000 personnes par an en France chez les enfants de moins de 15 ans [74, 75]. Il n'y a pas de prédominance en fonction du sexe [76, 61]. D'après les données du registre national français des hémopathies malignes de l'enfant, la survie à 5 ans des LAM est d'environ 60 %. Au sein des LAM, la survie à 5 ans des entités apparentées à la LAM3 est relativement bonne (environ 80 %), alors que celle des LAM6 et 7 est de l'ordre de 40 % [77, 78].

Les données épidémiologiques concernant les leucémies aiguës de lignée ambiguë sont rares. Ces leucémies dites bi-phénotypiques sont estimées entre 3 à 4 % de l'ensemble des leucémies aiguës en France. Elles sont observées aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant [79, 80].

En Algérie, les données disponibles sur les cancers font apparaître une augmentation isolée des taux d'incidence, et ce depuis 1990. Environ 30 000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chaque année et avec une augmentation de plus de 50 % du nombre de cas depuis une décennie. Cette incidence est à confronter aux évolutions parfois importantes des conditions d'enregistrement [81, 82 et 83].

Une étude de l'incidence pour 100 000 habitants, effectuée en Algérie pour l'année 2002 fait apparaître que les leucémies aiguës (LAM et LAL de l'adulte) occupent la première place des hémopathies malignes avec une incidence cumulée de 1,17 cas par 100 000 habitants, les LAM étant plus fréquents chez l'adulte que les LAL (et inversement chez l'enfant), avec une incidence respective de 0,69 et de 0,48. L'âge médian des patients est, respectivement, de 39 ans pour les LAM et inférieur à 30 ans pour les LAL de l'adulte [81, 82 et 83].

Une autre étude multicentrique et rétrospective menée sur une période de 10 ans (de 1995 à 2005) a été réalisée en Algérie. Les données ont été recueillies à partir d'un questionnaire préétabli, qui a été adressé à l'ensemble des services d'hématologie et de pédiatrie du pays. 1877 cas de LAM ont été recensés dans cette étude, sur une période de 10 ans, au niveau de 10 services d'hématologie. Ces patients se répartissent entre 978 (52,1 %) de sexe masculin et 899 (47,9 %) de sexe féminin avec un sex-ratio de 1,08. L'âge médian est de 39 ans, la répartition par tranche d'âge montre une prédominance du sujet jeune en accord avec la pyramide des âges en Algérie. La répartition géographique des patients en fonction de leur lieu de résidence montre qu'une grande majorité d'entre eux originaire du Nord du pays en particulier du Centre (42,8 %) et de l'Est (31,5 %). Les patients issus du Sud représentent seulement 6,6 %. Tous les taux d'incidences ont été calculés en fonction des données de l'Office National des Statistiques (ONS) en Algérie [81, 82 et 83].

En Algérie, l'incidence des diverses hémopathies malignes a été, depuis de nombreuses années, difficile à estimer en raison du nombre insuffisant des centres spécialisés d'hématologie. Aujourd'hui, la prise en charge des LAM se fait dans 14 hôpitaux universitaires (au Nord du pays) et nous a permis de disposer de données épidémiologiques suffisantes, pertinentes et exploitables pour dresser un tableau cohérent sur l'épidémiologie des LAM en Algérie [84, 85].

Dans ce contexte, une autre étude épidémiologique sur la LAM chez les adultes a été menée afin de déterminer sa fréquence et de son impact clinique dans le pays (l'étude épidémiologique la plus complète concernant l'incidence des LAM en Algérie). Il s'agit d'une étude nationale, rétrospective de tous les cas de LAM adultes (> 16 ans) diagnostiqués entre le 1 Janvier 2006 et le 31 Décembre 2010. Durant la période d'étude, un total de 1426 patients adultes a été diagnostiqué avec une LAM, avec une moyenne de 285,2 cas par an pour l'ensemble du pays, une moyenne de 19 cas par service d'hématologie par année.

Il y avait une très grande variation du taux entre les centres (de 2,2 à 34,2 cas/an) avec une moyenne de 24 cas/an [86]. Cette étude a montré une tendance à l'augmentation annuelle et continue de l'incidence des LAM où 246 cas avaient été enregistrés en 2006, 265 en 2007, 292 en 2008, 303 en 2009 et 320 en 2010, augmentation du taux de 7,7 %, 10,2 %, 3,7 % et 5,6 %, respectivement, avec un taux moyen d'augmentation de 6,8 % pour toute la période de l'étude faisant passer l'incidence annuelle de 0,7 en 2006 à 0,9 en 2010 pour 100 000 habitants [86]. En fonction de l'âge, une tendance nette à l'augmentation continue a été observée ; l'incidence varie entre 0,41 pour la tranche des 16-20 ans, 2,65 après l'âge de 60 ans, pour atteindre le taux le plus élevé de 3,38 après 80 ans. L'âge médian du diagnostic rapporté par cette étude est de 42 ans, inférieur à celui cité dans l'étude précédente, et qui est relativement bas comparé à la tendance mondiale ; ce fait peut être aisément expliqué par la jeunesse relative de la population Algérienne [86].

Les caractéristiques cytologiques ont montré une prédominance d'une hyperleucocytose lors de la présentation, associée à une anémie et une thrombocytopénie sévère, ce qui pourrait refléter un retard dans la prise en charge des patients au niveau des structures hospitalières spécialisées [87]. Les proportions des sous-types de LAM (selon la classification FAB) sont sensiblement les mêmes que ceux décrits dans la littérature, mais avec un très faible taux de M7 (0,5 % versus 1,5 %), et des formes indéterminées (1 % versus 7 %) [88].

Cette étude a révélé une nette tendance à l'augmentation de l'incidence annuelle des LAM durant la période d'étude ; cela ne peut être expliqué par l'augmentation annuelle prévue dans le recensement de la population Algérienne, mais également, en partie, par une amélioration des connaissances médicales, des soins et l'enregistrement dans les services d'hématologie. Cependant, une augmentation réelle des nouveaux cas liés au vieillissement de la population et de meilleurs diagnostics devraient également être envisagés. L'incidence annuelle brute pour 100 000 personnes montre une augmentation de 0,7 en 2006 à 0,91 en 2010 [89]. Toutefois, un tel taux est encore faible par rapport à celui des pays occidentaux, qui est de 3 cas pour 100 000 habitants en France [90] et de 3,7 aux États-Unis [66].

Il est important de souligner que l'inconvénient majeur de cette étude réside dans le fait que les données sur les antécédents de désordres hématologiques ou de chimiothérapies et/ou radiothérapies antérieures n'ont pas été incluses.

II- Étiologie :

Les hémopathies malignes regroupent un ensemble hétérogène de pathologies cancéreuses des cellules sanguines et de leurs précurseurs. Les facteurs de risque bien établis accréditent l'idée d'une hétérogénéité étiologique sous-jacente à cette diversité. Ceci n'exclut pas que plusieurs hémopathies puissent partager des facteurs de risque, notamment environnementaux. De façon très schématique, les facteurs de risque (en particulier environnementaux) établis à l'heure actuelle opposent les hémopathies myéloïdes et lymphoïdes. Les expositions au benzène, aux radiations ionisantes à forte dose et aux chimiothérapies anticancéreuses sont des facteurs de risque bien établis et particulièrement bien décrits dans les hémopathies myéloïdes tandis que les déficits immunitaires congénitaux ou acquis et les infections virales ou bactériennes favorisent le risque d'hémopathies malignes lymphoïdes [91].

L'étiologie des LAM demeure en général inconnue. Cependant, un certain nombre de facteurs de risque ont pu être clairement identifiés comme augmentant le risque alors que d'autres facteurs ne sont que suspectés. De nombreux facteurs environnementaux sont maintenant bien établis dans l'étiologie des LAM. L'effet leucémogène du benzène et de certains solvants organiques, des radiations ionisantes à forte dose, est particulièrement bien décrit. De nombreuses études soulignent l'importance possible d'autres facteurs comme les radiations électromagnétiques, les pesticides, le radon et le tabac. Les déficits immunitaires congénitaux ou acquis favorisent également le risque de LAM [92].

En général, dans une approche étiologique des LAM, il faut faire la distinction entre deux types :

- **Les LAM *de novo*** qui surviennent d'emblée, sans qu'on puisse mettre en évidence un facteur de risque précis. Les facteurs de risque suspectés peuvent être objectivés en trois grands groupes : constitutionnels, acquis et environnementaux.
- **Les LAM secondaires** qui surviennent soit après une exposition à des facteurs prédisposants tels que des agents toxiques ou thérapeutiques soit dans l'évolution d'une autre hémopathie maligne (SMD ou SMP (Syndromes Myélo Prolifératifs)).

2-1- Les LAM secondaires :

L'introduction et la large utilisation de certains traitements dans la prise en charge des néoplasies et d'autres pathologies primaires ont conduit à une augmentation de la survie des patients. Cependant dans certaines situations, les thérapeutiques agressives génèrent autant de risques que de bénéfices. Actuellement 4 % des patients survivant à un premier cancer auront un second cancer dans les 20 ans qui suivent le diagnostic [93].

La plupart des leucémies aiguës induites sont myéloblastiques. On estime qu'environ 5 à 10 % des leucémies aiguës et 10 à 20 % des LAM sont induites par une chimiothérapie et/ou radiothérapie préalable [94]. Les LAM post-chimiothérapie sont plus fréquemment observées après traitement pour une tumeur solide (86 % des cas). Cette complication étant fréquente, elle a été isolée dans la classification OMS 2008 comme une entité à part entière [95].

Le risque leucémogène est surtout le fait des agents alkylants tels que le cyclophosphamide, des inhibiteurs de topoisomérase II comme les épipodophyllotoxines, et des anthracyclines. D'autres traitements comme l'hydroxy-urée, la L-asparaginase, et les facteurs de croissance hématopoïétiques sont suspectés d'induire des anomalies médullaires mais leur rôle n'est pas démontré [96]. Le risque leucémogène dépend de la dose et du schéma d'administration. L'exposition aux alkylants et aux inhibiteurs de la topoisomérase II est retrouvée dans 50 à 75 % des cas, avec pour 45 % des cas, une radiothérapie associée [97, 98]. Le risque de LAM après exposition aux épipodophyllotoxines est de 2 à 12 %. La combinaison de la chimiothérapie à la radiothérapie augmente le risque de leucémie induite [99]. Les leucémies aiguës post-thérapeutiques se déclenchent généralement entre 5 et 8 ans après l'exposition à des chimiothérapies ou à des radiations ionisantes. Le risque de leucémies aiguës est quasi nul 10 ans après l'exposition au traitement [97, 98].

Des anomalies cytogénétiques sont trouvées dans 90 % des cas de LAM post-chimiothérapie. Le type d'anomalie chromosomique est relié à la famille de produits incriminés et secondairement à la localisation du premier cancer [98]. Environ 5 à 10 % des LAM à réarrangement *MLL* sont induits par une thérapeutique. Les translocations portant sur la région 11q23 représenteraient 32 % des translocations équilibrées des LAM induites [100].

Des facteurs de prédisposition génétiques ont été également identifiés. Certains polymorphismes concernant les gènes impliqués dans la réparation de l'Acide Désoxyribo Nucléique (ADN) ou la détoxification sont significativement associés au risque de LAM post-chimiothérapie [101, 102].

a- Les LAM induites par les agents alkylants : ces LAM surviennent entre 2 et 10 après la chimiothérapie d'une maladie de Hodgkin, d'un cancer du sein ou de l'ovaire, et sont fréquemment précédées d'une phase de pancytopenie ou myélodysplasie. Le risque dépend du type d'alkylants (plus important avec le melphalan qu'avec le cyclophosphamide, mais moins qu'avec une association d'alkylants). Dans ces LAM, le sous-type FAB est souvent M6 ou M7 et des signes de dysplasie multilignée sont fréquents en cytologie. Sur le plan cytogénétique, ces LAM sont associées à la présence d'anomalies cytogénétiques dans plus de 90 % des cas, concernant le plus souvent les chromosomes 5 et 7 [103].

Les leucémies secondaires aux traitements alkylants et/ou radiothérapie s'accompagnent souvent d'anomalies non équilibrées des chromosomes 5 ou 7 (délétions ou pertes) dans un caryotype complexe. Le pronostic des LAM post-thérapeutiques est péjoratif. La survie à 5 ans de ces patients est de moins de 10 %. Les cas associés à une anomalie des chromosomes 5 ou 7 ou à un caryotype complexe sont particulièrement sévères, avec une médiane de survie de moins de 1 an [96].

b- Les LAM liées à l'utilisation d'inhibiteurs de topoisomérase II : ces LAM surviennent plus rapidement (1 à 3 ans après une chimiothérapie pour cancer du sein (traité par épirubicine), cancer du testicule, LAL de l'enfant (traitée par étoposide) voire sclérose en plaques (traitée par novantrone)) et généralement sans phase cytopénique. Il s'agit le plus souvent de LAM4 ou M5, auxquelles sont associées des anomalies de la région 11q23, sous la forme de translocations impliquant le gène *MLL* qui a un rôle fondamental dans la leucémogénèse [103]. *In vitro*, il a été démontré que l'étoposide provoque des cassures en 11q23 s'il est ajouté à des cultures de progéniteurs CD34+ [104].

2-2- Les LAM *de novo* : on connaît de nombreux facteurs favorisants, qu'on différencie classiquement en facteurs génétiques et acquis d'une part et facteurs environnementaux d'autre part.

a- Les facteurs constitutionnels (génétiques) : la trisomie 21 constitue un facteur de risque majeur de leucémie chez l'enfant. Parmi les autres pathologies génétiques constitutionnelles, on peut citer le syndrome de Klinefelter, le syndrome de Bloom, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Schwachman-Diamond, la maladie de Kostman, le syndrome de Wiskott-Aldrich, l'ataxie-télangiectasie, la neurofibromatose de Recklinghausen, l'ostéogénèse imparfaite et le syndrome de Li-Fraumeni [61, 105]. Certains déficits immunitaires congénitaux favorisent la survenue d'hémopathies malignes dès l'enfance. Certains traitements immunosuppresseurs pourraient également être en cause dans le développement de LAM mais aussi de LAL [106]. Les antécédents familiaux sont rarement évoqués dans les LAM. En effet, le risque est augmenté d'un facteur de 2 à 4 en cas de leucémie aigüe dans la fratrie. Il devient très élevé pour le jumeau vrai d'un enfant atteint de leucémie aigüe : 20 % si l'hémopathie est apparue avant l'âge de 6 ans et 100 % si elle est apparue avant 1 an. Le risque est majeur pendant l'année qui suit le diagnostic [61, 105].

b- Les facteurs acquis : la présence d'antécédents d'hémopathie maligne peut être évoquée dans la recherche d'une étiologie des LAM. En effet, les LAM secondaires surviennent parfois à la suite de l'évolution d'un état pré-leucémique (SMP ou SMD). Dans l'histoire naturelle de certaines hémopathies chroniques l'accutisation est fréquente.

L'accutisation traduit l'évolution même du clone malin initial et l'accumulation d'anomalies cytogénétiques. Cependant la part respective de la maladie et des traitements reçus (chimiothérapie, radiothérapie) reste à préciser dans le processus de leucémogénèse. Le rôle des agents infectieux a très souvent été évoqué et parfois confirmé dans l'apparition des LAL (HTLV-1 (Human T-Cell Leukemia Virus-1) et leucémie/lymphome T de l'adulte, le virus d'Epstein-Barr et les lymphomes de Burkitt) mais aucun virus spécifique n'a jamais été mis en cause dans les LAM [107]. Même si une association entre l'exposition à certains virus et le développement des LAM a été suggérée, aucun virus n'a été mis en évidence dans leur étiologie. Le parvovirus B19 pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse des LAM [108].

c- Les facteurs environnementaux : concernant les agents carcinogènes toxiques, la classique exposition au benzène, décrite dès 1928, peut entraîner diverses hémopathies et notamment des LAM. Ces dernières sont reconnues comme maladies professionnelles si l'exposition au benzène (usines de production de vernis, peintures, émaux, plastiques, encres, pneus, lubrifiants, colorants, détergents, explosifs...etc) est supérieure à un an. L'exposition aux radiations ionisantes est également reconnue comme facteur étiologique, notamment depuis l'étude de 82 000 personnes suite aux explosions nucléaires d'Hiroshima et Nagasaki [61]. Il est désormais admis que le tabagisme et l'utilisation de pesticides peuvent être des cofacteurs de la leucémogénèse. L'augmentation du risque de LAM chez les fumeurs, évoquée dès les années 1970, a été récemment confirmée par une étude américaine, avec un risque relatif de 1,4 à 2 selon la consommation de tabac [109], et une prédominance de certains sous-types cytogénétiques notamment la t(8;21) [110]. Le lien entre utilisation de pesticides et la survenue de lymphomes est bien argumenté ; pour ce qui est des LAM, il semble que le risque soit lié plus précisément à l'usage d'insecticides organochlorés et organophosphorés [111]. Une exposition prénatale à différents pesticides est associée au développement de leucémies avec t(8;21) chez l'enfant [112], et une étude Belge a mis en évidence une augmentation d'incidence de LAM (avec un sur-risque évalué à plus de 6) chez des agriculteurs utilisateurs de pesticides et plus particulièrement de dibenzodioxines et dibenzofuranes polychlorinés [113].

Un autre facteur environnemental est l'exposition aux rayonnements électromagnétiques : une étude a montré qu'une exposition supérieure à 0,4 μ Tesla multiplie par deux le risque de survenue d'une leucémie [92] ; une autre étude, Suisse, met en évidence une relation directe entre le risque leucémique et la quantité d'exposition aux champs électromagnétiques de basse fréquence [114]. En revanche, il n'a pas été retrouvé de sur-risque chez des travailleurs exposés aux émissions diesel [115]. Un autre facteur favorisant est le niveau socio-économique élevé [116]. Des études ont rapportées qu'un surpoids ou une obésité entraîne un risque relatif de 1,52 [117].

III- Aspects cliniques des LAM :

La symptomatologie clinique est très polymorphe, parfois très riche, parfois très réduite. Elle est représentée par des signes d'insuffisance médullaire traduisant le retentissement de la prolifération tumorale sur les lignées myéloïdes et lymphoïdes normales, et par des manifestations tumorales traduisant l'infiltration leucémique des organes hématopoïétiques et, éventuellement, d'autres organes [118].

3-1- Syndrome d'insuffisance médullaire : il est presque toujours présent, et associe :

- **Syndrôme anémique :** en rapport avec l'érythropénie, souvent important et d'apparition rapide (en quelques semaines). Il se traduit par une pâleur cutanéomuqueuse, des manifestations cardiaques (dyspnée d'effort et tachycardie) et une asthénie [118].
- **Syndrôme infectieux :** il est lié à l'importance de la neutropénie. La fièvre est présente dans la moitié des cas. Des foyers infectieux doivent être recherchés par l'examen clinique et des prélèvements bactériologiques orientés ou systématiques (hémoculture, prélèvements cutanés et orificiels, de gorge, d'urines, de selles). Ces examens sont réalisés à l'entrée du malade et sont répétés périodiquement pendant le traitement [118]. Les foyers les plus fréquents sont la sphère Oto-Rhino-Larynx (ORL) ou cutanés (angine, stomatite, pneumopathie et/ou lésions surinfectées), répondant mal aux antibiotiques habituels. Les infections sont plus souvent bactériennes, rarement virales ou fongiques [1].
- **Syndrôme hémorragique :** il est lié à l'importance de la thrombopénie. Il s'agit habituellement d'un purpura cutané (pétéchial ou ecchymotique), d'épistaxis et de gingivorragie. Le danger est celui d'une hémorragie cérébro-méningée. De vastes hématomes, des saignements au niveau des points de piqûre doivent faire rechercher une coagulopathie de consommation [118].

3-2- Syndrôme tumoral : il se voit surtout dans les leucémies aiguës avec composante monocyttaire et les LAL T [1] et traduisent l'infiltration blastique qui s'exprime par :

- L'hypertrophie des organes hématopoïétiques se manifeste par la splénomégalie qui est fréquente, de volume modéré, parfois associée à une hépatomégalie, et des adénopathies diffuses, symétriques et indolores [1].
- L'atteinte neuro-méningée qui est rare au début. C'est une méningite leucémique découverte par une ponction lombaire en présence des signes méningés ou de la paralysie d'un nerf crânien [119, 120].
- L'hypertrophie gingivale et l'atteinte cutanée (infiltrats ou nodules enchâssés dans le derme, indolores, rouges violacés) sont inconstantes mais très évocatrices des LAM [119].

IV- Aspects biologiques des LAM :

Selon la classification de l'OMS, le diagnostic de LAM repose sur la mise en évidence dans la moelle osseuse ou le sang périphérique de plus de 20 % de blastes. Il sera donc nécessaire dans le cadre du bilan diagnostique de réaliser un myélogramme (voire une Biopsie Ostéo-Médullaire (BOM) en cas d'échec du myélogramme). Le taux de blastes sur le sang et la moelle osseuse (colorés par le May-Grünwald-Giemsa (MGG)) est évalué après avoir compté un minimum de 200 et 500 cellules nucléées respectivement. Les blastes sont des cellules plus ou moins arrondies, de taille variable (15 à 30 µm) avec un rapport noyau/cytoplasme élevé. Le noyau présente un contour régulier, une chromatine fine et un ou plusieurs nucléoles. Le cytoplasme, quant à lui, est basophile et peut contenir des granulations, voire un ou plusieurs corps d'Auer (fins bâtonnets azurophiles). Cette description ne s'adapte toutefois pas aux monoblastes.

Une fois l'excès de blastes mis en évidence, il sera nécessaire d'affirmer le caractère myéloïde de ces cellules. L'examen cytologique pourra apporter une réponse par la mise en évidence de grains azurophiles ou mieux de corps d'Auer dans le cytoplasme des blastes. L'examen cytochimique va rechercher une activité myéloperoxydasique des cellules blastiques. Si la MyéloPerOxydase (MPO) est retrouvée dans plus de 3 % des blastes, le diagnostic de LAM pourra être retenu. À l'inverse, une activité myéloperoxydasique négative ne permet pas d'éliminer certains sous-types de LAM (LAM peu différenciées, monoblastiques, érythroblastique, mégacaryoblastiques ou bi-phénotypiques) et l'on pourra s'aider d'autres techniques de cytochimie (estérases).

L'immunophénotypage des blastes par cytométrie en flux est devenu l'examen de référence, en association à l'examen cytologique et cytochimique, pour établir la nature myéloïde ou lymphoïde de la leucémie aiguë. Cette technique permet de quantifier l'expression d'antigènes spécifiques d'une lignée présents sur les blastes (en surface ou en intra-cytoplasmique). Selon le type de marqueurs retrouvés (**voir tableau I**), on pourra affirmer le caractère myéloïde de la leucémie aiguë.

Tableau I : Marqueurs de surface ou cytoplasmiques détectés par cytométrie en flux permettant d'établir le caractère myéloïde de la leucémie aiguë.

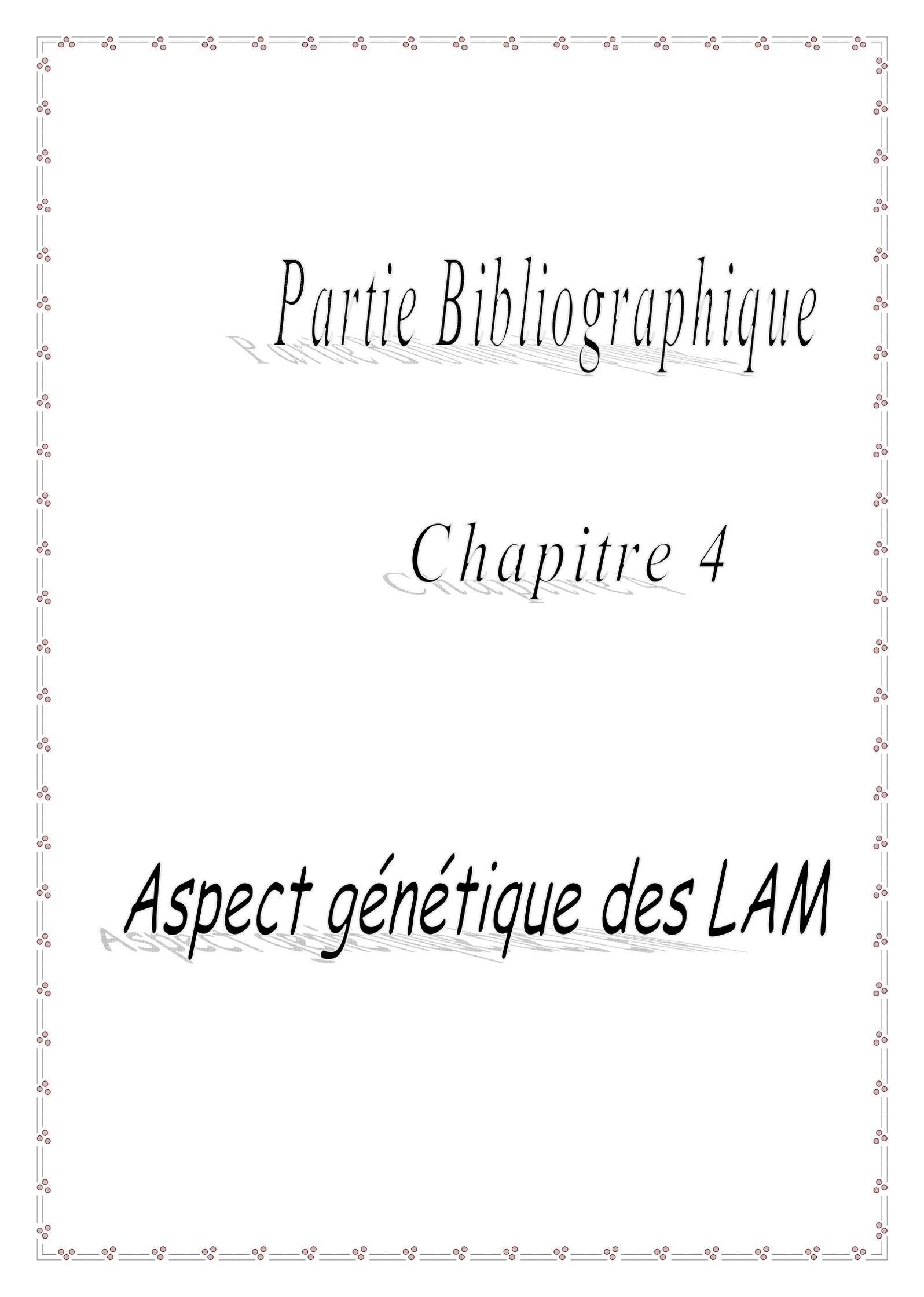
Type de marqueur	Marqueurs positifs
Marqueurs de précurseurs immatures	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Marqueurs granuleux	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, MPO cytoplasmique
Marqueurs monocytaires	Estérase non spécifique (NSE), CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologue
Marqueurs mégacaryocytaires	CD41 (glycoprotéine IIb/IIIa), CD61 (glycoprotéine IIIa), CD42 (glycoprotéine 1b)
Marqueurs érythrocytaires	CD235a (glycophorine A)

Depuis l'instauration de la nouvelle classification diagnostique de l'OMS, les analyses cytogénétiques et moléculaires sont devenues des outils diagnostiques et non plus seulement pronostiques. Ainsi, le diagnostic de LAM peut être retenu en l'absence d'un taux de blastes >20 % si le caryotype retrouve l'une des anomalies cytogénétiques suivantes : la $t(15;17)(q22;q12)$, la $t(8;21)(q22;q22)$, l'inversion du chromosome 16 $inv(16)(p13.1q22)$ ou la $t(16;16)(p13.1;q22)$. Il en est de même pour l'analyse en cytogénétique moléculaire et la recherche des gènes de fusion correspondant en biologie moléculaire (*PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11*). En l'absence d'anomalie cytogénétique ou moléculaire caractéristique d'un sous-type de LAM, le terme de "LAM sans spécificité" sera retenu et l'examen cytologique standard permettra de classer la LAM selon la classification FAB.

L'ensemble de ces analyses réalisées sur les blastes médullaires et/ou sanguins (cytologie, cytochimie, cytogénétique conventionnelle ou moléculaire, biologie moléculaire), associées aux caractéristiques du patient, permet ainsi d'établir le diagnostic de LAM selon la classification OMS 2008. [121, 122].

Le recours à la cytogénétique et la biologie moléculaire permet de mieux cerner les entités cytomorphologiques (définies par la classification FAB), à identifier de nouvelles entités et à une meilleure compréhension des événements oncogéniques à l'origine de cette pathologie.

Les anomalies chromosomiques et moléculaires rencontrées dans les LAM (**voir chapitre 04**) contribuent à définir le type de LAM et présentent aussi l'intérêt d'être des facteurs pronostiques indépendants, essentiels pour les choix thérapeutiques permettant aussi la surveillance de la maladie résiduelle (rechutes). [123].



Partie Bibliographique

Chapitre 4

Aspect génétique des LAM

I- Altérations géniques rencontrées dans les LAM :

Dès le début du siècle, il a été observé une relation entre anomalies chromosomiques et cancers. Dans les années 1970, de nombreuses études ont montré que les cellules tumorales possédaient des formules chromosomiques différentes des cellules normales. *Gilliland et al* ont proposés en 2001 le postulat que le mécanisme de leucémogénèse se fasse en plusieurs étapes par l'accumulation de mutations de type 1, apportant un avantage prolifératif, et de type 2, bloquant le processus de différenciation des cellules myéloïdes. Les deux types de mutations forment des groupes de complémentation et il est rare de trouver deux mutations du même groupe dans une LAM (excepté le cas particulier pour *AML1 (RUNX1)* et *MLL* qui appartiennent au même groupe de complémentation mais dont la co-occurrence est observée) [125].

Les mutations de type 1 seules entraînent une maladie ressemblant à une LMC caractérisée par une prolifération accrue de globules blancs mais ces cellules sont matures et fonctionnelles. L'apparition de mutations de type II en plus de ces mutations de type 1 entraîne une LAM. Les mutations de type 2 concernent les capacités de différenciation et d'apoptose et entraînent, seules en absence de mutation de type 1, une hémopathie de type SMD [124].

Certaines mutations récemment identifiées ne sont pas encore classées dans l'un ou l'autre des groupes puisque leurs conséquences ne sont pas encore bien identifiées. Par ailleurs, 55 % des patients ont des anomalies au niveau chromosomique et 45 % ont un caryotype normal mais une très grande variabilité de mutations au niveau génomique. L'identification de ces anomalies est importante pour la compréhension de la physiopathologie, l'identification de facteurs pronostiques et le développement de traitements plus ciblés [126].

Les anomalies génétiques retrouvées dans les LAM sont diverses et concernent à la fois des translocations chromosomiques, des mutations ponctuelles, des duplications et des inversions. On remarque également l'implication de mécanismes épigénétiques dans la leucémogénèse. L'apparition d'un si grand nombre d'anomalies est très probablement reliée à des instabilités dans le génome des blastes et ces perturbations pourraient résulter de dérégulations de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome et dans sa réparation [127].

1-1- Les mutations de type 1 : les mutations de type 1 sont des mutations apportant des avantages prolifératifs et/ou de survie aux progéniteurs hématopoïétiques en dérégulant certaines voies de signalisation telles que celles impliquant *N-RAS* et *K-RAS* (Neuroblastoma- et Kirsten-RAS), *FLT3* et *c-KIT*.

a- ***N-RAS* et *K-RAS*** : les voies de signalisation impliquant les gènes *RAS* sont activées par une large gamme de cytokines et jouent un rôle important dans la prolifération et la survie de progéniteurs hématopoïétiques en activant la voie des MAPK. Des mutations activatrices du proto-oncogène *RAS* sont retrouvées dans différents types de tumeurs et dans 15 à 25 % des LAM. Ces mutations ne sont pas associées à des anomalies caryotypiques particulières, ni aux caractéristiques cliniques ou évolutives de la LAM [128].

b- ***FLT3*** : le gène *FLT3* code pour un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques normaux de la moelle osseuse et notamment des CSH. Son ligand est exprimé et sécrété par les cellules du microenvironnement médullaire entraînant son activation et ainsi la stimulation de la croissance et la survie des cellules progénitrices dans la moelle et dans le sang. *FLT3* est exprimé de façon importante dans les LAM (entre 70 % et 100 % des LAM de tous types de FAB) et cette surexpression joue un rôle dans la survie et la prolifération des blastes leucémiques. De plus, il existe deux types de mutations activatrices de ce récepteur retrouvés dans les LAM ; des duplications internes en tandem d'une séquence palindromique présente dans la région juxta-membranaire du récepteur (*FLT3-ITD* : *FLT3-Internal Tandem Duplication*), et des mutations ponctuelles au niveau de la boucle d'activation du domaine kinase (*FLT3-TKD* : *FLT3-Tyrosine Kinase Domain*) [129]. La mutation du gène *FLT3* est l'altération la plus fréquente dans les LAM.

➤ ***FLT3-ITD*** : mutations retrouvées entre 25 et 30 % des cas, les duplications retrouvées sont très variables, mais toujours dans le cadre de lecture et entraînent une perte de fonction du domaine inhibiteur. Ces mutations sont associées à un mauvais pronostic [130].

➤ ***FLT3-TKD*** : mutations ponctuelles retrouvées chez 7 % des patients qui entraînent une conformation active de la boucle et donc une meilleure fixation de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) et du substrat. La relation entre ces mutations et l'incidence au niveau du pronostic reste encore en débat [130].

Les deux types de mutations conduisent à la dimérisation, à l'activation et l'autophosphorylation du récepteur de façon constitutive. Cette altération se traduit par une activation des voies PI3K/AKT, PLC γ (Phospho Lipase C gamma), STAT5 et les voies RAS/ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire [131].

- c- ***KIT*** : le gène *KIT* code pour un récepteur de type tyrosine kinase qui a pour ligand le SCF. Des mutations activatrices dans le domaine extracellulaire ou la boucle d'activation sont retrouvées dans 20 à 30 % des patients ayant des aberrations chromosomiques spécifiques telles que t(8;21) et inv(16). Ces mutations entraînent une hyperactivation des voies MAPK et PI3K en aval du récepteur [132].
- d- ***CBL (Casitas B-cell Lymphoma)*** : le gène *CBL* code pour une ubiquitine ligase qui cible une grande variété de tyrosine kinase et entraîne leur dégradation. Les mutations de ce gène entraînent l'inhibition de l'internalisation et l'ubiquitination de FLT3 et ainsi augmente l'amplitude et la durée du signal de ce récepteur [133].
- e- ***PTPN11 (Protein Tyrosine standard Phosphatase Non récepteur 11)*** : le gène de *PTPN11* code pour une phosphatase cytoplasmique appelée SHP-2 (Src Homology Phosphatase 2). Cette phosphatase, très exprimée dans les cellules hématopoïétiques, participe à la transduction du signal en aval des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones et des molécules d'adhérence en partie via la voie RAS/MAPK. Ces mutations entraînent une anomalie dans la transition forme active/forme inactive de la phosphatase mais leurs rôles dans la pathogénicité des LAM reste à déterminer. Elles ne semblent pas avoir de valeur pronostique [132].
- f- ***JAK2 (JANus Kinase 2)*** : il s'agit d'une tyrosine kinase cytoplasmique impliquée dans la transduction de signaux initiés par plusieurs récepteurs de facteurs de croissance et de cytokines, requis pour l'hématopoïèse. Les mutations de ce récepteur entraînent une augmentation de son activité kinase et l'activation de voies en aval telles que STAT5, PI3K/AKT, ERK. La mutation de *JAK2* est retrouvée chez 70 % des patients ayant une LAM précédée d'une maladie myéloproliférative mais est rare dans les LAM *de novo* [127].

1-2- Les mutations de type 2 : ces mutations correspondent essentiellement à des aberrations chromosomiques de type translocations. De nombreuses translocations chromosomiques sont retrouvées dans les LAM ; elles conduisent à la formation de protéines chimériques (de fusion) impliquées dans la pathogénèse. Certaines anomalies chromosomiques ont été identifiées comme entités à part entière, au vu de leurs caractéristiques cliniques et biologiques spécifiques, dans le sous-groupe des LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes (classification OMS, 2008). Les plus fréquentes sont les suivantes :

a- Translocation concernant *CBF* : facteur de transcription avec deux sous-unités, *CBF α* (appelé aussi *AML1* ou encore *RUNX1*) et *CBF β* . *RUNX1* interagit directement avec l'ADN et *CBF β* interagit avec *RUNX1* et permet l'activation de la transcription. *CBF* régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique (*IL-3* et *GM-CSF*) et la maturation des lymphocytes T et B [125]. *CBF* est critique pour l'hématopoïèse normale et est la cible de plusieurs remaniements dans les LAM, deux sous-groupes sont caractérisés dans la classification OMS 2008 : *RUNX1/ETO* et *CBF β /MYH11*. Ces translocations concernent 10 % à 15 % des LAM [134] et sont de bon pronostic [130].

➤ ***RUNX1/ETO* (nommé aussi *AML1/ETO*, *AML1*)** : correspond à la translocation t(8;21). *RUNX1* est un des gènes les plus fréquemment dérégulés dans les LAM à la fois par des remaniements chromosomiques mais aussi par des mutations ponctuelles ou des amplifications [125]. *ETO* est un répresseur de la transcription. Ainsi la protéine chimérique *RUNX1/ETO* recrute des corépresseurs et inhibe l'expression des gènes normalement régulés par *RUNX1* [135].

➤ ***CBF β /MYH11* (nommé aussi *CBF β /SMMHC*, *SMMHC* : Smooth Muscle Myosin Heavy Chain et *MYH11*)** : correspond à la translocation chromosomique inv(16)/t(16;16) qui fusionne les 165 premiers acides aminés de *CBF β* avec la région C-terminale de la chaîne lourde de la myosine musculaire. La protéine chimérique interagit avec *RUNX1* et inhibe la transcription des gènes cibles de ce dernier en recrutant des corépresseurs [136]. Ces *CBF/AML* sont fréquemment associées à des mutations dans les gènes *KIT* (1/3 des *CBF/AML*), *N-RAS*, *K-RAS* et *FLT3* [137].

b- *PML/RAR α* : correspond à la translocation t(15;17) caractéristique de la leucémie aigue promyélocytaire qui conduit à la synthèse d'une protéine chimérique entre *RAR α* (Retinoic Acid Receptor alpha), un récepteur nucléaire aux hormones et *PML* (Pro-Myelocytic Leukemia) une protéine nucléaire (facteur de transcription à doigt de zinc). En absence de l'acide rétinoïque, *RAR α* interagit avec *RXR* (Retinoid X Receptor), lie ses gènes cibles impliqués dans la différenciation, l'apoptose et l'auto-renouveaulement et inhibe leur expression en recrutant des corépresseurs. Cette inhibition est renversée par la présence d'Acide Tous-Trans Rétinoïque (ATRA) qui induit un changement de conformation et entraîne la dissociation des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs. Des doses pharmacologiques d'ATRA sont utilisées pour le traitement des patients présentant cette translocation [136].

c- **MLL** : le gène *MLL*, situé en 11q23, code pour un facteur de transcription de 431 kDa et qui présente de nombreux modules : trois domaines de fixation et de courbure de l'ADN, un domaine d'homologie aux méthyl-transférases et plusieurs domaines d'activation ou de répression de la transcription. Il est exprimé dans toutes les cellules hématopoïétiques notamment dans les CSH et impliqué dans l'activation de plusieurs promoteurs notamment ceux régulant l'expression des gènes *HOX* (HomeobOX). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui participent au développement de multiples tissus et notamment du système hématopoïétique. *MLL* est une des plus fréquentes cibles dans les leucémies aussi bien dans les LAM que dans les LAL et les leucémies aiguës bi-phénotypiques.

En effet, il existe plus de 50 translocations affectant ce gène et ces translocations sont retrouvées dans environ 10 % de l'ensemble des LAM [138].

1-3- Les mutations non classées : la liste des gènes probablement impliqués dans les LAM s'étoffe de plus en plus grâce à de nouvelles technologies telles que le criblage de gènes haut débit. Voici quelques-uns de ces nouveaux gènes candidats dont l'implication dans la leucémogénèse LAM est de plus en plus évoquée.

a- **DNMT (DNA Méthyl Transférases)** : des mutations de ce gène ont été identifiées par séquençage haut débit d'ADN de patients atteints de LAM et retrouvées chez 22 % d'entre eux [139]. Les Dnmt sont des enzymes qui catalysent l'addition d'un groupement méthyle sur les cytosines des îlots CpG. Les mutations *DNMT* n'altèrent pas de façon très importante la méthylation globale de l'ADN mais la méthylation de certains gènes, tels que les gènes *HOX*, sont affectés. Ces mutations sont associées avec les mutations *FLT3*, *NPM1* et *IDH* et confèrent un mauvais pronostic [140].

b- **TET2 (TET oncogene family member 2)** : ce gène a été récemment identifié comme un gène candidat en tant que suppresseur de tumeur dans les SMD, SMP et dans les LAM grâce à un séquençage haut débit d'ADN de cellules de patients. Dans cette étude, des mutations de ce gène ont été retrouvées chez 27 % des patients atteints de LAM. Les protéines *TET* sont impliquées dans la régulation épigénétique [141]. Elles sont capables de convertir des méthyl-cytosines en hydroxy-méthyl-cytosines, formes intermédiaires de déméthylation des cytosines, et ainsi ont un rôle dans la déméthylation de l'ADN. Les mutations de *TET2* dans les LAM entraînent un taux moindre d'hydroxy-méthyl-cytosine ainsi ce gène pourrait être associé à la leucémogénèse en participant à l'hyperméthylation souvent observée dans les cancers. Ces mutations sont mutuellement exclusives avec les mutations *IDH1/IDH2* (Isocitrate DésHydrogénase 1/2) et leur implication pronostique n'est pas encore claire [140].

- c- *IDH1/IDH2* : ce gène a été identifié par séquençage du génome entier de patients atteints de LAM. Ce criblage a révélé des mutations déjà identifiées mais aussi des mutations *IDH1* qui n'avaient jamais été observées. De plus, les IDH sont une nouvelle classe de protéines mutées dans la leucémogénèse puisqu'il s'agit d'enzymes métaboliques [142]. Ces protéines catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate avec formation de NADP(H) (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate(H)). Elles sont impliquées dans le métabolisme cellulaire au niveau de la synthèse lipidique, la protection contre le stress oxydant et la transduction du signal médiée par l'oxygène. Les patients ayant des mutations dans ces gènes ont des hyperméthylations aberrantes de leur génome, cela s'explique par une production d'un métabolite anormal : 2- hydroxy-glutarate qui inhibe la déméthylation amorcée par TET2. Les mutations *IDH* et *TET2* sont d'ailleurs mutuellement exclusives [132]. Deux études ont analysé la fréquence et la valeur pronostique de ces mutations. Ces études montrent qu'elles touchent entre 11 % et 16 % des patients, qu'elles sont associées très souvent avec un caryotype normal et avec des mutations *NPM1* et *MLL* et enfin qu'elles sont corrélées à un haut risque de rechute et une survie moindre [143, 144].
- d- *NPM1* : la Nucléophosmine est une phosphoprotéine ubiquitaire qui transite entre le noyau et le cytoplasme avec une localisation nucléaire prédominante. Des mutations de ce gène sont retrouvées chez 46 % à 62 % des patients LAM avec un caryotype normal [145] et 25 % à 35 % de toutes les LAM [140]. Ces mutations entraînent l'apparition d'une séquence d'export vers le cytoplasme et entraîne une localisation cytoplasmique aberrante [146]. Toutes les mutations de ce gène entraînent une altération de sa distribution cellulaire laissant penser que celle-ci a un rôle dans la leucémogénèse et qu'elle interfère probablement avec les fonctions de la nucléophosmine [147]. Cette dernière joue un rôle de protéine chaperonne dans le noyau permettant d'établir de multiples interactions protéine-protéine. Elle a un rôle critique dans la cellule ; elle empêche l'agrégation des protéines nucléaires, elle régule l'assemblage des protéines ribosomales et est nécessaire pour la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Elle est aussi impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation telles qu'ARF (ADP Ribosylation Factor) et p53 [148]. La façon dont la nucléophosmine contribue à la leucémogénèse est encore floue mais de plus en plus d'éléments suggèrent que les LAM mutées pour *NPM1* pourraient constituer un sous-type distinct de LAM avec des caractéristiques pathologiques, immunologiques et pronostiques spécifiques. Les LAM mutées *NPM1* ont d'ailleurs été ajoutées comme entité provisoire dans le classement OMS de 2008 [147].

De plus, les mutations dans *NPM1* sont mutuellement exclusives avec d'autres anomalies récurrentes classées dans la catégorie LAM avec anomalies génétiques récurrentes mais sont significativement retrouvées avec la mutation *FLT3-ITD*. Cela suggère que les altérations de *NPM1* pourrait faire partie des mutations de type 2 [127]. Les mutations *NPM1* sans anomalie *FLT3-ITD* sont classées dans le groupe des anomalies génétiques avec pronostic favorable [142].

e- *ASXLI (Additional SeX comb-Like)* : ce gène code pour une protéine impliquée dans la régulation du remodelage de la chromatine [147]. La fonction de cette protéine dans les LAM est inconnue mais une étude a révélé une fréquence de 10 % de mutations de ce gène chez les patients testés [149].

f- *WT1 (Wilms Tumor 1)* : le gène *WT1* code pour un facteur de transcription exprimé dans les progéniteurs CD34+ du système hématopoïétique mais pas dans les leucocytes matures. Il est fortement exprimé dans les LAM, son implication dans la leucémogénèse a donc été fortement étudiée. Mais bien que les mutations du gène *WT1* aient été découvertes dans les hémopathies malignes il y a plus de 10 ans, le rôle précis de *WT1* dans l'hématopoïèse normale et maligne n'est pas encore clairement défini. Il a été impliqué dans la régulation de la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation et il a été montré comme à la fois suppresseur de tumeur et oncogène. Ces différences pourraient s'expliquer par la variabilité des tissus étudiés et des différents transcrits possibles de *WT1* [150].

Les mutations de *WT1* sont retrouvées dans 10 % à 13 % des LAM avec caryotype normal mais son impact pronostic n'est pas établi (certaines études rapportent un pronostic défavorable tandis que d'autres ne rapportent pas d'impact) [142].

g- *BAALC (Brain And Acute Leukemia Cytoplasmatic)* : gène qui code pour une protéine dont la fonction est inconnue mais dont le taux d'expression est particulièrement haut chez certains patients atteints de LAM. Plusieurs études ont démontré sa valeur pronostique avec une baisse de la survie globale pour ces patients [132].

h- *ERG (Ets-Related Gene)*, *EVII (Ecotropic viral integration 1)*, *MNI (MeNingioma1)* : une expression augmentée de ces trois gènes implique un pronostic défavorable selon plusieurs études. *ERG* est un effecteur en aval de plusieurs voies de régulation concernant la prolifération, l'apoptose et la différenciation. *EVII* entraîne des néoplasmes hématopoïétiques chez des modèles murins et enfin *MNI* est un activateur de la transcription. Leurs rôles précis dans la leucémogénèse sont inconnus [130].

i- **P53** : le gène *P53* est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une protéine impliquée dans la surveillance de l'intégrité du génome. En effet, un dommage à l'ADN active ce facteur de transcription qui à son tour active la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. *P53* est inactivée dans les LAM par des délétions et des mutations ponctuelles. Ces mutations entraînent une instabilité du génome et une inhibition de l'apoptose. Elles sont retrouvées dans moins de 10 % de LAM *de novo* [132].

1-4- L'expression des miARN : les miARN (microARN), en s'hybridant sur leur ARNm (Acide Ribo-Nucléique messenger) cibles, sont capables d'inhiber l'expression des protéines codées par ces ARNm en induisant leur dégradation ou en inhibant de leur traduction. Ces miARN sont capables de réprimer des centaines de gènes et ainsi de réguler les processus cellulaires normaux. Leurs expressions aberrantes ou leurs dérégulations contribuent donc à la transformation maligne en interférant avec les voies de prolifération, de survie, de différenciation et d'apoptose. Il a d'ailleurs été montré que des profils particuliers d'expression de ces miARNs étaient retrouvés selon les cancers [151].

Une étude en 2007 [152], a réussi à distinguer une LAL d'une LAM uniquement sur le profil d'expression des miARN. La plupart des miARNs dérégulés joueraient un rôle dans la différenciation myéloïde et dans ses fonctions spécifiques. En ce qui concerne les LAM, on peut même discriminer entre plusieurs LAM avec anomalies caryotypiques uniquement par le profil miARN [153].

Les mêmes anomalies génomiques (telles que les arrangements chromosomiques, les délétions et les mutations ponctuelles) qui modifient l'activité des gènes codant pour des protéines, sont responsables des modifications d'activité des miARN. En effet, l'expression des miARN est corrélée à la présence de plusieurs anomalies récurrentes dans les LAM. Par exemple, les mutations dans *NPM1* sont associées à l'augmentation de miR-10a, miR-10b et miR196a et tous résidents dans la même partie du génome que les gènes *HOX*, eux aussi surexprimés dans les LAM avec *NPM1* muté. De même, la mutation *FLT3-ITD* a été associée avec l'augmentation de miR-155, or la surexpression de miR-155 a été montrée comme entraînant l'expansion des granulocytes et des monocytes et causant des symptômes caractéristiques des hémopathies myéloïdes. Ces données qui relient l'expression des miARN à la pathogénicité laissent penser que ces miARNs pourraient agir comme suppresseurs de tumeurs ou comme oncogènes et contribuer à la leucémogénèse [153].

II- Cytogénétique des LAM :

Les anomalies chromosomiques sont précieuses dans le diagnostic et le pronostic des différents types de leucémies et de lymphomes. Bon nombre de ces anomalies sont uniquement associés à des sous-types histologiques ou immunologiques spécifiques d'hémopathies malignes [154]. Au cours des deux dernières décennies l'importance clinique de la cytogénétique, de l'analyse génétique et moléculaire est devenue de plus en plus évidente dans le diagnostic, le pronostic, le choix et le suivi thérapeutique des leucémies en général et des leucémies aigues en particulier. L'identification des anomalies chromosomiques spécifiques (récurrentes) et leur corrélation avec des caractéristiques cliniques, cyto-morphologiques et immunophénotypiques ont conduit à une nouvelle compréhension de ces maladies hétérogènes. Récemment dans la nouvelle classification des hémopathies malignes établie par l'OMS, des anomalies cytogénétiques spécifiques ont été utilisées pour aider à définir les entités morbides distinctes dans les pathologies myéloïdes et lymphoïdes [155]. Les techniques cytogénétiques contribuant au diagnostic des entités les plus fréquentes de LAM identifient des anomalies cytogénétiques récurrentes telles les hyperdiploïdies > 50 chromosomes, la $t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1(ETV6-CBFA2)$ et l'inv $(16)(p13q22)/CBFB/MYH11$ sont développées [156].

La signification clinique de ces aberrations chromosomiques est devenue de plus en plus appréciée. Certains changements sont fortement corrélés avec des sous-groupes particuliers de LAM, comme respectivement les $t(8;21)$ et M2, $t(15;17)$ et M3, M4 et inv16 Eo, $t(19;11)$ et M5a, et $t(1;22)$ et M7 [157]. Ces anomalies récurrentes ont un impact important et indépendant sur le pronostic, et elles peuvent influencer la gestion de la maladie. Les différentes techniques de la cytogénétique et de biologie moléculaire utilisées telles que la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), le Southern Blot, la PCR (Polymerase Chain Reaction) et la CGH (Comparative Genome Hybridization) ont également ajouté des informations importantes pour le regroupement plus sophistiqué des différents types d'hémopathies malignes [158]. Avec une application optimale de ces techniques dans le diagnostic des LAM, les stratégies de traitement peuvent être plus spécifiquement orientées et de nouvelles approches thérapeutiques peuvent être évaluées de manières plus efficaces.

L'étude des anomalies chromosomiques associées aux hémopathies malignes en général et aux leucémies aigues en particulier possède un triple intérêt :

- **Diagnostique** ; anomalies primaires, spécifiques et récurrentes de certaines entités,
- **Pronostique** ; anomalies, primaires ou secondaires, étroitement liées à la probabilité de survie,
- **Fondamental** : contribue à l'identification des gènes impliqués dans la leucémogénèse [154].

1-4- Les anomalies génétiques récurrentes :

- **LAM avec t(8;21)(q22;q22) :** 5 à 10 % des LAM adultes, 6 à 19 % de l'enfant, spécifique des LAM2, ayant pour conséquence la fusion des gènes *ETO/AML1*
- **LAM promyélocytaire avec t(15;17)(q22;q12) :** associée à la LAM3 qui représente 5 à 8 % des LAM ayant pour conséquence la fusion des gènes *PML/RAR α* .
- **LAM avec inv 16(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22) :** spécifique des LAM4 à éosinophiles. Le résultat est la juxtaposition des deux gènes *CBF β /MYH11*.
- **LAM avec anomalies du gène MLL (11q23) :** spécifique des sous-types M4 et M5 et implique le gène *MLL* dont deux réarrangements assez fréquents ; t(11;19)(p22;q23) et t(11;19)(q23;p31.1) [159, 160].

1-5- Les anomalies chromosomiques de nombre :**a- Les délétions :**

- **del(5q)/-5 :** anomalie cytogénétique fréquente chez les patients atteints de SMD et de LAM *de novo*. Souvent secondaire, elle peut être retrouvée également dans les LAM0 [161].
- **del(7q)/-7 :** souvent retrouvées dans les LAL, mais peuvent apparaître *de novo* dans les SMD et les LAM, ou être secondaires à l'exposition aux agents alkylants [162].
- **del(17p)/-7 :** anomalies cytogénétiques relativement fréquentes dans les SMD et les LAM. Ces anomalies représentent environ 4,3 % des anomalies cytogénétiques des SMD et des LAM et, dans un nombre important de cas, il s'agit de formes induites.
- **del(9q) :** anomalies secondaires fréquentes dans les LAM2, avec souvent la t(8 ;21) comme anomalie primaire. Isolée, elle peut être retrouvée dans tous les sous-types de LAM 2 %.
- **del(12p) :** moins fréquente dans les LAM 5 % que dans les LAL. Elle est observée dans 20 à 55 % des LAM à composante monocytaire (M4 et M5), et est souvent associée à des caryotypes complexes avec anomalies du chromosome 5 et une trisomie 8 [163].

b- Les trisomies :

- **La trisomie 8 :** la plus fréquente des trisomies dans les LAM, représente 10 à 15 % de toutes les anomalies observées dans ces hémopathies. Rencontrée dans les différents sous-types, elle représente également l'anomalie secondaire la plus fréquente dans les LAM (1/3 des cas).
- **La trisomie 21 :** représente 1 % des anomalies cytogénétiques rencontrées dans les désordres hématopoïétiques et 2,5 % de l'ensemble des anomalies rencontrées dans les LAM. La trisomie 21 est souvent associée à une inversion du chromosome 16. Ainsi que d'autres trisomies comme la trisomie 13, 14, 15 et 19 [163].

III- Biologie Moléculaire des LAM :

En complément de la cytogénétique conventionnelle, les progrès récents et continus de la biologie moléculaire, par technique FISH et/ou RT-PCR (Reverse Transcription-PCR), permettent actuellement de démembrer les différentes anomalies moléculaires associées aux LAM. La FISH permet de confirmer les remaniements *PML-RAR α* , *CBF α -ETO* et *CBF β -MYH11*, dont la présence est parfois difficile à affirmer en cytogénétique conventionnelle. La biologie moléculaire sur sang ou sur moelle met en évidence les transcrits de fusion : il n'y en a qu'un seul type pour *CBF α -ETO* alors que 10 transcrits *CBF β -MYH11* différents ont été décrits. Le type de transcrit n'a pas d'impact pronostique, l'intérêt de la biologie moléculaire dans ce cas de figure comporte donc la confirmation diagnostique et l'évaluation de la maladie résiduelle après traitement. C'est sans aucun doute le groupe des LAM à caryotype normal qui a le plus bénéficié des avancées moléculaires récentes, puisque la caractérisation d'une LAM à caryotype normal est désormais décisionnelle [164, 165 et 166].

Les anomalies moléculaires recherchées sont :

- Les mutations *FLT3* comme la duplication interne en tandem (*FLT3-ITD*),
- Les mutations de l'exon 12 du gène *NPM1*,
- Les mutations de *CEBP α* présentes dans 9 % des LAM,
- D'autres anomalies étudiées non actuellement décisionnelles sont en cours d'évaluation. Ces anomalies sont l'hyper-expression de *BAALC* qui serait un facteur de mauvais pronostic en terme de rechute et de survie globale dans les LAM à caryotype normal, l'hyper-expression de *WT1* présente dans 90 % des LAM et utilisée comme marqueur de maladie résiduelle, et l'hyper-expression de *ERG* qui serait un facteur indépendant de mauvais pronostic en terme de rechute et de survie globale.

IV- Polymorphisme de la *MTHFR* :

La *MTHFR* est une enzyme clé du métabolisme des folates qui catalyse la conversion irréversible du 5,10-méthylènetétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate en utilisant le NADPH. Elle permet ainsi de maintenir le pool de folates et de méthionine circulants et de prévenir une éventuelle augmentation de la concentration en homocystéine. La *MTHFR* joue également un rôle dans les processus de méthylation de l'ADN, de protéines, de neurotransmetteurs et de phospholipides. La méthylation de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes et le maintien de la stabilité génomique.

La MTHFR est également impliquée dans la production de dTMP (désoxy Thymidine Mono-Phosphate) via la synthèse de purines. La MTHFR est donc un élément essentiel à la provision de nucléotides nécessaires à la synthèse d'ADN, sa réparation [167].

La voie enzymatique des folates est ainsi impliquée dans la stabilité de l'ADN et toute altération sur cette voie peut induire des cassures d'ADN simple ou double brin dans et/ou modifier le taux d'expression de certains gènes voire induire des anomalies de la ségrégation chromosomique. Par ce biais, les folates jouent un rôle essentiel dans les régulations épigénétiques de l'expression des gènes. Un déficit en folates, par carence d'apport ou en rapport avec des polymorphismes nucléotidiques, se traduit par une hypométhylation de l'ADN et d'autres molécules, ainsi que par une accumulation d'homocystéine [168].

Le gène de la *MTHFR* (OMIM : 607093) fut localisé par **Goyette et al** en 1994, dans le chromosome 1 (1p36.22) et comprend 11 exons [169]. Plus tard, **Gaughan et al**, en 2000, ont montré que le gène ne contient pas TATA box, mais contient plusieurs îlots CpG très importants pour les sites d'union pour les autres facteurs de transcription. L'enzyme MTHFR a deux isoformes de 77 KDa et 70 KDa. Ce dernier est retrouvé uniquement au niveau du tissu hépatique et rénal chez l'enfant [170].

L'expression de l'ADN complémentaire humain de 2,2 Kb donne une protéine de 70 kDa comportant 656 acides aminés [171]. Elle est subdivisée en deux domaines : le premier catalytique (N terminal) de 40 KDa et le deuxième régulateur (C terminal) de 37 KDa. À l'union de ces deux domaines se trouve une région hydrophobe avec une séquence d'acides aminés : Lys-Arg-Arg-Glu-Glu, qui représente le site de clivage de la trypsine. La MTHFR est un homodimère cytoplasmique, localisé dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Son expression est plus intense dans le testicule, intermédiaire dans le cerveau et rein, et inférieure dans d'autres tissus [172]. Pour le gène codant pour la *MTHFR* une soixantaine de polymorphismes ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont été décrit (**voir figure 2**), le plus commun étant le polymorphisme C677T (rs1801133) (substitution d'une alanine pour une valine dans la séquence protéique), identifié par **Frosst et al** en 1995, sur l'exon 4 dans le domaine catalytique de l'enzyme qui la rend thermolabile avec une diminution de 50 % de son activité [173, 174]. Une baisse de l'activité enzymatique de l'ordre de 30 à 40 % pour les hétérozygotes et de 60 à 70 % pour les homozygotes a été décrite [175]. La prédominance du polymorphisme C677T est relativement élevée dans la population générale ; la prédominance des homozygotes 677TT de cette mutation autosomique récessive, est de 5 à 15 % et 50 % d'hétérozygotes dans les populations caucasienne et asiatique ; il existe une faible incidence dans les populations africaine et américaine [176].

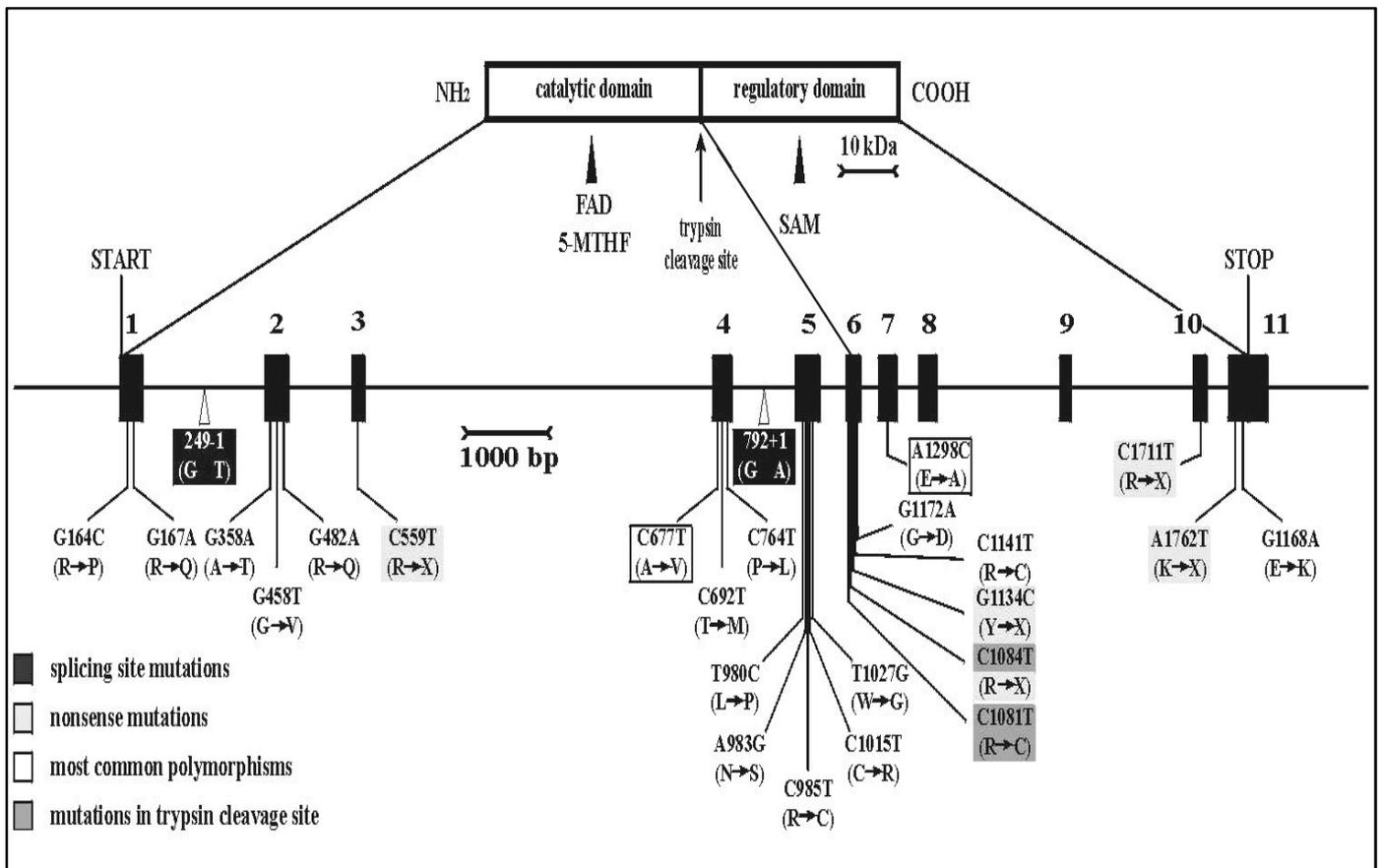


Figure 02 : Représentation schématique de la structure du gène *MTHFR* et de la protéine avec des indications des polymorphismes les plus communs (Szpecht-Potocka A et al., 2002).

Ce polymorphisme a été décrit comme un facteur de risque établi de maladies cardiovasculaires, de cancers colorectaux et de défauts de fermeture du tube neural. Vu son rôle dans la physiologie cellulaire, de nombreuses recherches sont menées pour prospecter l'association possible entre ce polymorphisme et nombre de pathologies cancéreuses (dont les LAM). Certaines d'entre elles se sont révélées assez concluantes.



Partie Pratique

Patients et méthodes

I- Étude statistique (Méta-analyse) :

1-1- Principe :

L'objectif d'une méta-analyse est de synthétiser, de manière exhaustive (le plus possible), rigoureuse, reproductible et quantifiée, les résultats provenant de différentes études. Ce type d'analyse est particulièrement utile dans deux cas de figure :

- Lorsque de nombreuses études ont été publiées concernant une même problématique mais que, faute d'effectifs suffisants, peu d'entre elles font apparaître un résultat statistiquement significatif ;
- Lorsque des études concernant une même problématique montrent des résultats apparemment contradictoires.

En effet, une méta-analyse permet d'augmenter la puissance statistique car le nombre de sujets considérés est plus important, mais aussi d'expliquer la variabilité des résultats entre les différentes études. Une méta-analyse se réalise en plusieurs étapes :

- Définir l'objectif,
- Établir les critères d'inclusion et de non inclusion des études dans la méta-analyse,
- Extraire de la littérature, les publications concernant *a priori* la méta-analyse,
- Éliminer les publications dont les résultats sont visiblement biaisés,
- Faire le tri des publications en utilisant les critères d'inclusion,
- Faire l'analyse statistique pour estimer l'effet recherché,
- Tester la robustesse des résultats (analyse de sensibilité),
- Rechercher l'hétérogénéité.

Une méta-analyse peut être sujette à principaux biais :

- Biais d'estimation ; toutes les études réalisées ne sont pas publiées,
- Biais de publication ; lorsque les résultats ne sont pas statistiquement significatifs, ils ont tendance à ne pas être publiés,
- Biais de détection ; la recherche des études peut ne pas être exhaustive,
- Biais de sélection ; les critères de sélection peuvent ne pas être adaptés.

1-2- Stratégie de recherche :

Notre travail de recherche consiste en une méta-analyse regroupant des études tirées de la littérature électronique (en ligne) sur notre thématique en utilisant la base de données PubMed (publications parues avant le 01 Mai 2015). PubMed est le principal moteur de recherche de données bibliographiques de l'ensemble des domaines de spécialisation de la biologie et de la médecine. Il a été développé par le centre américain pour les informations biotechnologiques (National Center of Biotechnologies Information : NCBI), et est hébergé par la bibliothèque américaine de médecine des instituts américains de la santé. PubMed est un moteur de recherche gratuit donnant accès à la base de données bibliographiques MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), rassemblant des citations et des résumés d'articles de recherche biomédicale. Cette base de donnée est gérée et mise à jour par la bibliothèque américaine de médecine.

Dans la présente méta-analyse, nous avons pris les résultats provenant de différentes études afin de prospecter l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans l'apparition d'une LAM. Nous avons procédé à une recherche en utilisant les mots clés suivants : *MTHFR* polymorphism, C677T, Acute Myeloid (Myeloblastic, Myelogenous) Leukemia.

1-3- Sélection des études :

Les études ainsi trouvées sur la base de données PubMed ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- Une exploration de l'association du polymorphisme C677T *MTHFR* et le risque d'occurrence d'une LAM.
- Une étude de type cas-témoins établie selon des critères définis (construction de deux groupes indépendants; patients et témoins, avec des critères bien définis de chaque groupe).
- La disponibilité dans la publication de la taille des deux cohortes (patients et témoins) avec les fréquences génotypiques (CC, CT et TT) et/ou alléliques (C et T) permettant le calcul de l'Odds Ratio (OR) et de la valeur *p*.

Ont été exclues :

- Les études prospectant l'effet d'un polymorphisme de la *MTHFR* autre que le C677T.
- Les études prospectant l'effet du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans la réponse à une thérapeutique particulière d'une LAM.
- Les études prospectant l'implication de ce polymorphisme dans la survenue des leucémies ou leucémies aiguës de manière générale (sous-groupe des LAM non défini)
- Les études seraient exclues de la méta-analyse si la distribution des génotypes n'est pas conforme à l'équilibre de *Hardy-Weinberg* (HWE : *Hardy-Weinberg* Equilibrium) (mentionné dans la publication).

1-4- Extraction des données :

De chaque étude incluse dans notre méta-analyse, nous avons extrait les informations suivantes : nom de(s) auteur(s), année de la publication (référence bibliographique), pays, ethnie de la population d'étude, la valeur de HWE, répartitions génotypiques et alléliques (effectif brut ou fréquences en rapport avec l'effectif de la cohorte).

1-5- Tests statistiques :

Pour prospecter l'association entre le polymorphisme de la C677T de la *MTHFR* et les LAM dans cette méta-analyse, nous avons étudié précisément l'effet de l'allèle T dans le groupe des patients et témoins. Il s'agit d'une étude statistique basée sur le calcul de l'OR à Intervalle de Confiance (IC) et la valeur p dans le but de déterminer s'il existe une association significative entre le polymorphisme étudié et l'hémopathie maligne ; ceci se fait par la comparaison du nombre de fois où l'allèle est observé chez les patients par rapport au nombre de fois où il est présent chez les témoins. Si la valeur de p est inférieure au seuil de 0,05 ; la différence de distribution est statistiquement significative entre patients et témoins avec un effet probable de l'implication de l'allèle T dans l'apparition des LAM. La méta-analyse a été faite avec le logiciel Comprehensive Meta-Analysis V3.1 (CMA[®]). Le biais des publications utilisées est déterminé par le logiciel. Selon les mêmes critères nous allons prospecter l'effet de l'allèle T sous trois modèles : Le modèle homozygote (TT vs CC), le modèle récessif TT vs CC + CT et le modèle dominant TT + CT vs CC. Pour ces modèles le calcul des OR et de la valeur p s'est fait par le logiciel EPI-info 7.0TM.

II- Étude moléculaire :**2-1- Extraction d'ADN à partir de sang total :**

- a- Le prélèvement sanguin :** le prélèvement sanguin est recueilli dans des conditions stériles par ponction veineuse, dans un tube vacutainer contenant de l'EDTA (Ethylene Diamino Tetracetic Acid) comme anticoagulant, en quantité de 5 à 10 ml. L'EDTA est un chélateur de cations bivalents (Mg^{++} , Ca^{++}) nécessaires au fonctionnement des ADNase. Il est donc utilisé également comme inhibiteur indirect des nucléases. L'extraction de l'ADN est lancée immédiatement ou (si les conditions ne le permettent pas) dans les 3 à 5 jours qui suivent le prélèvement conservé à +4°C.
- b- L'extraction de l'ADN :** Les leucocytes représentent la source d'ADN la plus facilement exploitable. Plusieurs techniques d'extraction peuvent être utilisées (au chlorure de guanidine, au phénol-chloroforme). Celle employée dans le laboratoire de Biologie Génétique du CHU Ben-Badis est une approche qui se fait sur un prélèvement de sang total et en utilisant un solvant inorganique, le NaCl. L'extraction se fait en trois étapes ; la préparation des leucocytes, l'extraction de l'ADN proprement dite et enfin la solubilisation.

- **Préparation des leucocytes** : les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique des érythrocytes dans un tampon Tris-EDTA (TE) 20:5 pendant 10 minutes dans la glace (**voir annexe IV**). Après lavage, le culot est remis en suspension dans le TE 20:5.
- **Extraction de l'ADN** : se fait par ajout d'un tampon de lyse (**voir annexe IV**), du Sodium Dodécyle Sulfate (SDS) à 10 % (détergent à action lytique sur les membranes cellulaires qui dénature les protéines et inhibe l'action des nucléases) et de la protéinase K à 10 milligramme (mg)/ millilitre (ml) (enzyme qui dénature et dégrade les protéines). Les tubes tournent sur une roue à 27°C une nuit et sont refroidis le lendemain dans la glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 1 ml de NaCl 4M pour permettre la libération de l'ADN nucléaire dans le lysat ainsi que la digestion et l'élimination des protéines qui lui sont associées par précipitation avec le NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur. Une fois la pelote d'ADN récupérée avec une pipette Pasteur[®], elle est rincée deux fois dans l'éthanol à 70 % et mise dans un tube Nunc[®] de 1,5 ml.
- **Solubilisation** : l'ADN ainsi obtenu est solubilisé en phase aqueuse (on ajoute 300 à 1000 microlitre (µl) d'eau Préparation Pour injectable (PPI) selon la grosseur de la pelote). On laisse 2 à 3 jours sur agitateur-rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

2-2- Détermination de la concentration, la pureté et de la qualité de l'ADN extrait :

La pureté ainsi que la concentration de l'ADN sont déterminées par spectrophotométrie à Ultra-Violet (UV) avec un Nanodrop[®] (spectrophotomètre qui ne nécessite pas l'utilisation de cuvette). Un volume de 2 µl de l'échantillon est déposé directement à l'extrémité d'un câble de fibre optique. Lorsque celui-ci est mis en contact avec un second câble par fermeture de l'appareil, l'échantillon est maintenu par une tension de surface et traversé par un signal lumineux. Il est possible ainsi de mesurer et de quantifier l'ADN double ou simple brin. L'un des inconvénients majeurs de ce type de mesure réside dans le fait que toute molécule parasite qui absorbe la lumière est prise en compte dans la mesure de la concentration. L'analyse de l'absorbance se fait par un logiciel (Nanodrop[®] 1000 v3.7) installé sur un ordinateur relié à l'appareil. L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines qui représentent les témoins de contamination absorbent à 280 nm. L'absorption, absorbance ou Densité Optique (DO) est mesurée à 2 longueurs d'ondes différentes (260 et 280) et un rapport est établi (260/280) est calculé automatiquement par le logiciel. En effectuant le rapport de DO 260 nm/ DO 280 nm, la pureté de l'ADN est déterminée en vérifiant une éventuelle contamination par les protéines ou par les ARN. On considère que : L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260} / DO_{280}$ est compris entre 1,6 et 2 ($1,6 < R \leq 2$), l'ADN est contaminé par les protéines si $R < 1,6$ et que l'ADN est contaminé par les ARN si $R > 2$. La concentration de l'ADN est donnée directement en nanogramme (ng) par µl et doit être idéalement supérieure à 50 ng/µl pour optimiser la réalisation d'une PCR.

2-3- Génotypage de la *MTHFR* :2-3-1- Amplification de l'exon 4 de la *MTHFR* :

a- Principe :

Pour prospecter le polymorphisme C677T (Ala222Val) (rs1801133) du gène de la *MTHFR* (OMIM : 607093), nous avons amplifié par PCR l'exon 4 (ENSE00001225832) en utilisant une paire d'amorces spécifiques.

b- Matériel :

- Micropipettes et pointes,
- Eppendorfs[®],
- Vortex,
- Petite centrifugeuse,
- Tubes de PCR,
- Thermocycleur (Techne[®] iCycler).

c- Réactifs :

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau ci-dessous. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait dans la glace.

Tableau II : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 4 de la *MTHFR*.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN (~50ng)	1
Tampon 10X (Sans MgCl ₂)	5
deoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate (dNTP) 2Mm	5
MgCl ₂ 50Mm	3
<i>Thermus aquaticus</i> (Taq) Polymérase (Bioline [®] 250U)	0.4
H ₂ O distillée (PPi)	35.2
Amorces (F)	0.2
Amorces (R)	0.2
	50

Les références des amorces utilisées pour l'amplification sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Identification des amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 4 de la *MTHFR*.

Amorces	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de la région amplifiée (pb)
Forward (F)	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	770	198
Reverse (R)	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	968	

Tableau IV : Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 4 de la *MTHFR* (durée 105 minutes).

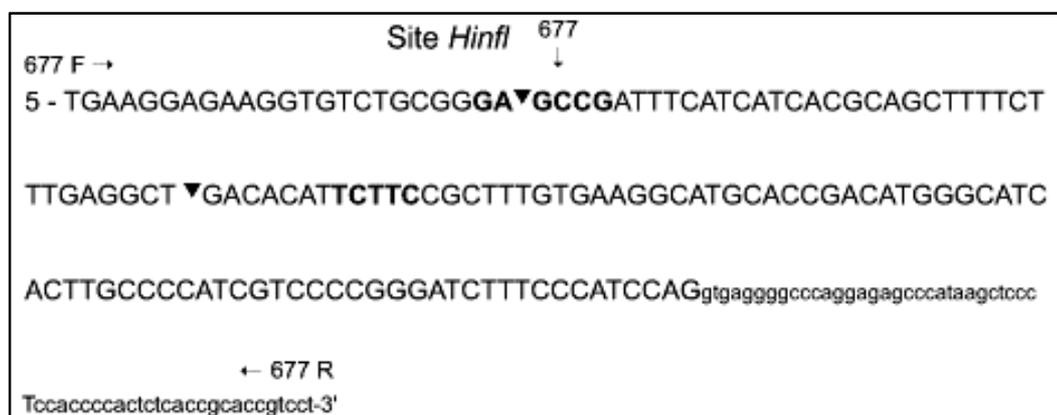
Processus	Température (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94	05 minutes	1
Dénaturation	94	30 secondes	30
Hybridation	65	30 secondes	
Elongation	72	40 secondes	
Élongation finale	72	10 minutes	1

2-3-2- Digestion et migration sur gel d'agarose :

a- Principe :

Pour la mise en évidence du polymorphisme recherché, les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique en clivant les molécules à des points précis appelés sites de restriction. Une modification par mutation dans la séquence du site de restriction pourrait entraîner ou empêcher l'action de l'enzyme ; autrement dit : faire disparaître ou apparaître un site de restriction spécifique. Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique. Cette technique est connue sous l'appellation de polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), le profil électrophorétique ainsi obtenu est appelé profil de restriction.

Le polymorphisme C677T de la *MTHFR* fait apparaître un site de restriction *HinfI* (Enzyme extraite de la bactérie *Haemophilus influenzae*).

**Figure 03 :** Représentation schématique du site de restriction *HinfI* sur l'amplicon de l'exon 4 de la *MTHFR*.

b- Matériel :

- Support pour le moulage,
- Étuve,
- Erlenmeyer[®],
- Micro-onde,
- Cuve d'électrophorèse et peigne,
- Plaques pour coloration,
- Pipette,
- Générateur de courant,
- Chambre avec lampe UV munie d'un système de photographie-impression.

c- Réactifs :

- Enzyme de restriction *HinfI* (Kit BioLabs[®]),
- Tampon de digestion 1X (CutSmart[®] Buffer) (Kit BioLabs[®]),
- Gel d'agarose (UltraPure[™] Agarose) (3 %),
- Tris-Borate EDTA (TBE) 1X (100 ml par gel),
- BET (Bromure d'Éthidium),
- BBP (Bleu de Bromo-Phénol) (dilué au ½ dans le TBE1X),
- Marqueur de taille (100 à 600 pb).

d- Mode opératoire :

Après préparation du milieu réactionnel de la digestion (**voir annexe V**), les produits de PCR sont mis en incubation pendant 5 heures à 37°C dans l'étuve. La digestion est stoppée par immersion dans un bain marie à 80°C pendant 20 minutes. La migration se fait à 100V et pendant 2 heures. Cette migration génère des profils de 1 (homozygote) ou deux bandes (hétérozygote) (**voir photo 01**).

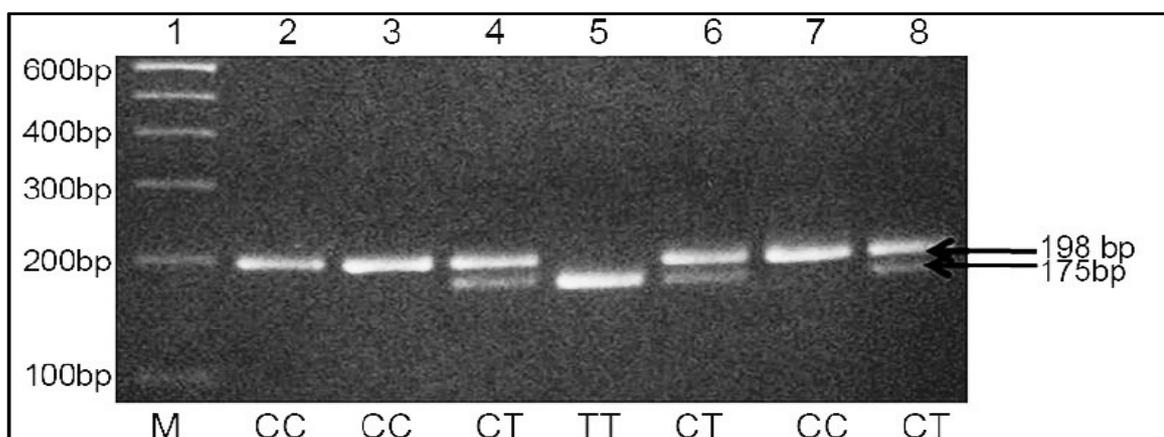


Photo 01 : Analyse par RFLP du polymorphisme C677T sur un fragment PCR de 198 pb digéré avec *HinfI*. Ce polymorphisme (allèle T) fait apparaître un site de restriction *HinfI* et génère un fragment de 175 pb.

2-4- Analyse statistique :

Dans ce travail nous avons effectué une étude statistique d'association entre le polymorphisme de la *MTHFR* C677T et les LAM. L'étude statistique est basée sur l'OR et la valeur p dans le but de déterminer s'il existe une association significative entre le polymorphisme étudié (voir **tableau V**). Les calculs ont été faits en utilisant le logiciel EPI-info 7.0TM.

Pour le calcul de l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne. L'IC est de 95 % (ou 0,95).

Tableau V : Tableau de contingence croisé pour une étude cas-témoins.

	Malades	Témoins	Total
Exposés (Présence du facteur préssumé de risque de maladie)	A	B	a + b
Non-exposés (Absence du facteur préssumé de risque de maladie)	C	D	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

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

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

Partie Pratique

Résultats

I- Étude statistique (Méta-analyse) :

1- Recherche des publications :

En effectuant une recherche bibliographique exhaustive et rigoureuse sur PubMed en utilisant les mots clés sélectionnés nous avons recensé :

Tableau VI : Recensement des études publiées sur Pub Med menées sur l'impact de la *MTHFR*

	Etudes sur PubMed
Polymorphisme de la <i>MTHFR</i> dans l'apparition des cancers (C677T, <i>MTHFR</i> , Cancer)	621
Polymorphisme de la <i>MTHFR</i> dans l'apparition des leucémies (C677T, <i>MTHFR</i> , Leukemia)	115
Polymorphisme de la <i>MTHFR</i> dans l'apparition des LAM (C677T, <i>MTHFR</i> , AML)	15
Etudes retenues pour la méta-analyse	13

2- Caractéristiques des études incluses :

Après lecture détaillée des 15 publications visibles sur la base de données PubMed trouvées en utilisant une recherche avec les mots clés sélectionnés. Nous avons rejeté deux études :

- **Huang L et al., 2015** du fait que les fréquences génotypiques et/ou alléliques ne sont pas mentionnées. Seul l'OR et la valeur *p* sont indiqués.
- **Jiang N et al., 2014** ; dans cette étude menée sur l'impact de ce polymorphisme dans l'apparition des hémopathies malignes sur une grande cohorte de patients, les fréquences génotypiques et/ou alléliques dans les différentes entités d'hémopathies malignes (LAM, LAL, LMC, etc.) ne sont pas mentionnées et ne peuvent être déduites à partir de ce qui est cité dans la publication.

Il est à noter que dans deux des 13 études sélectionnées ; **Skibola et al., 1999** et **Hur et al., 2006** les populations d'étude ne sont pas en équilibre de *Hardy-Weinberg* (valeur de *p* inférieure au seuil de 0,05 ; respectivement de 0,0042 et 0,018). Cependant, ces valeurs n'ont pas été jugées comme significatives par leurs auteurs respectifs et ont même été incluses dans d'autres méta-analyses publiées sur le sujet (**Yu-Tao Qin et al., 2014** et **Hairong He et al., 2014**).

L'effectif de notre population d'étude pour cette méta-analyse est de 6552 ; 1657 patients et 4995 témoins (voir tableau VII).

Tableau VII : Présentation des données des études sélectionnées pour la méta-analyse.

N°	Référence	Ethnie	p-value HWWE	Patients											Témoins										
				Cohorte	CC	CC (%)	CT	CT (%)	TT	TT (%)	C	C (%)	T	T (%)	Cohorte	CC	CC (%)	CT	CT (%)	TT	TT (%)	C	C (%)	T	T (%)
1	Skibola et al., 1999	Royaume-Uni	0,0042	223	134	60,09	66	29,60	23	10,31	334	74,89	112	25,11	369	196	53,12	130	35,23	43	11,65	522	70,73	216	29,27
2	Deligezer et al., 2003	Turquie	0,5010	49	23	46,94	25	51,02	1	2,04	71	72,45	27	27,55	161	74	45,96	73	45,34	14	8,70	221	68,63	101	31,37
3	Chen et al., 2006	Chine (Asiatique)	0,5220	40	16	40,00	16	40,00	8	20,00	48	60,00	32	40,00	157	72	45,86	66	42,04	19	12,10	210	66,88	104	33,12
4	Da-Costa et al., 2006	Brésil (Brésilienne)	0,5300	182	93	51,10	67	36,81	22	12,09	253	69,51	111	30,49	315	156	49,52	128	40,63	31	9,84	440	69,84	190	30,16
5	Hur et al., 2006	Corée du sud (Asiatique)	0,0180	55	18	32,73	30	54,55	7	12,73	66	60,00	44	40,00	200	80	40,00	80	40,00	40	20,00	240	60,00	160	40,00
6	Kim et al., 2006	Corée du sud (Asiatique)	0,3480	399	121	30,33	202	50,63	76	19,05	444	55,64	354	44,36	1700	540	31,76	863	50,76	297	17,47	1943	57,15	1457	42,85
7	Bolufer et al., 2007	Espagne	0,7410	163	54	33,13	80	49,08	29	17,79	188	57,67	138	42,33	331	106	32,02	160	48,34	65	19,64	372	56,19	290	43,81
8	Moon et al., 2007	Corée du Sud	0,0780	200	61	30,50	107	53,50	32	16,00	229	57,25	171	42,75	434	144	33,18	196	45,16	94	21,66	484	55,76	384	44,24
9	Barbosa et al., 2008	Brésil	0,2700	27	17	62,96	8	29,63	2	7,41	42	77,78	12	22,22	100	65	65,00	29	29,00	6	6,00	159	79,50	41	20,50
10	Lightfoot et al., 2010	Royaume-Uni	0,2690	79	47	59,49	21	26,58	11	13,92	115	72,78	43	27,22	760	359	47,24	317	41,71	84	11,05	1035	68,09	485	31,91
11	Vahid et al., 2010	Iran (Caucasienne)	0,4870	106	58	54,72	39	36,79	9	8,49	155	73,11	57	26,89	97	56	57,73	37	38,14	4	4,12	149	76,80	45	23,20
12	Hussain et al., 2012	Inde (Asiatique)	0,1060	112	75	66,96	26	23,21	11	9,82	176	78,57	48	21,43	251	180	71,71	61	24,30	10	3,98	421	83,86	81	16,14
13	Zeng et al., 2013	Chine (Asiatique)	0,5470	22	14	63,64	4	18,18	4	18,18	32	72,73	12	27,27	120	56	46,67	54	45,00	10	8,33	166	69,17	74	30,83
TOTAL				1657	731	44,12	691	41,70	235	14,18	2153	64,97	1161	35,03	4995	2084	41,72	2194	43,92	717	14,35	6362	63,68	3628	36,32

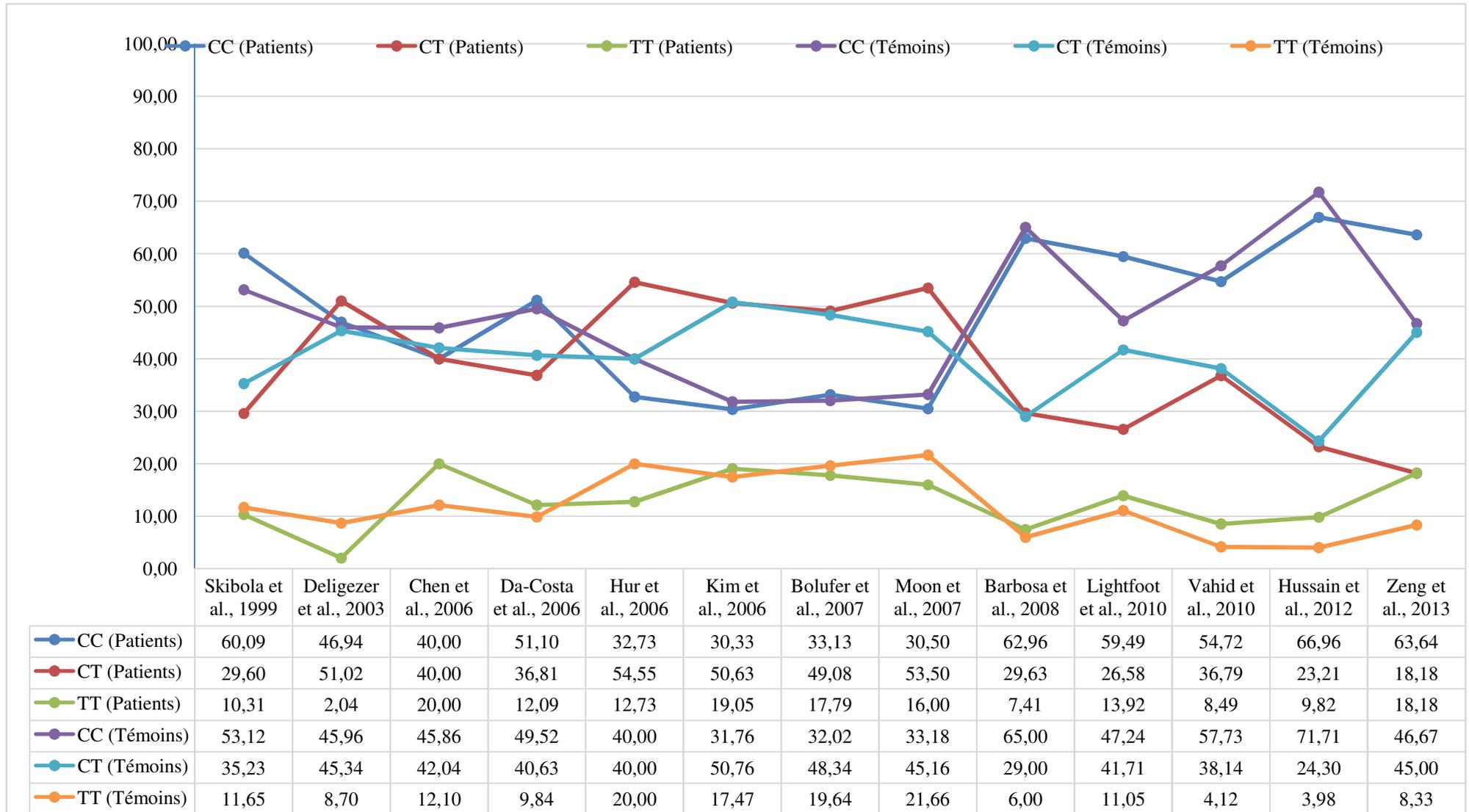


Figure 04 : Représentation graphique des fréquences génotypiques (génotypes CC, CT et TT) dans les différentes études recueillies dans la méta-analyse.

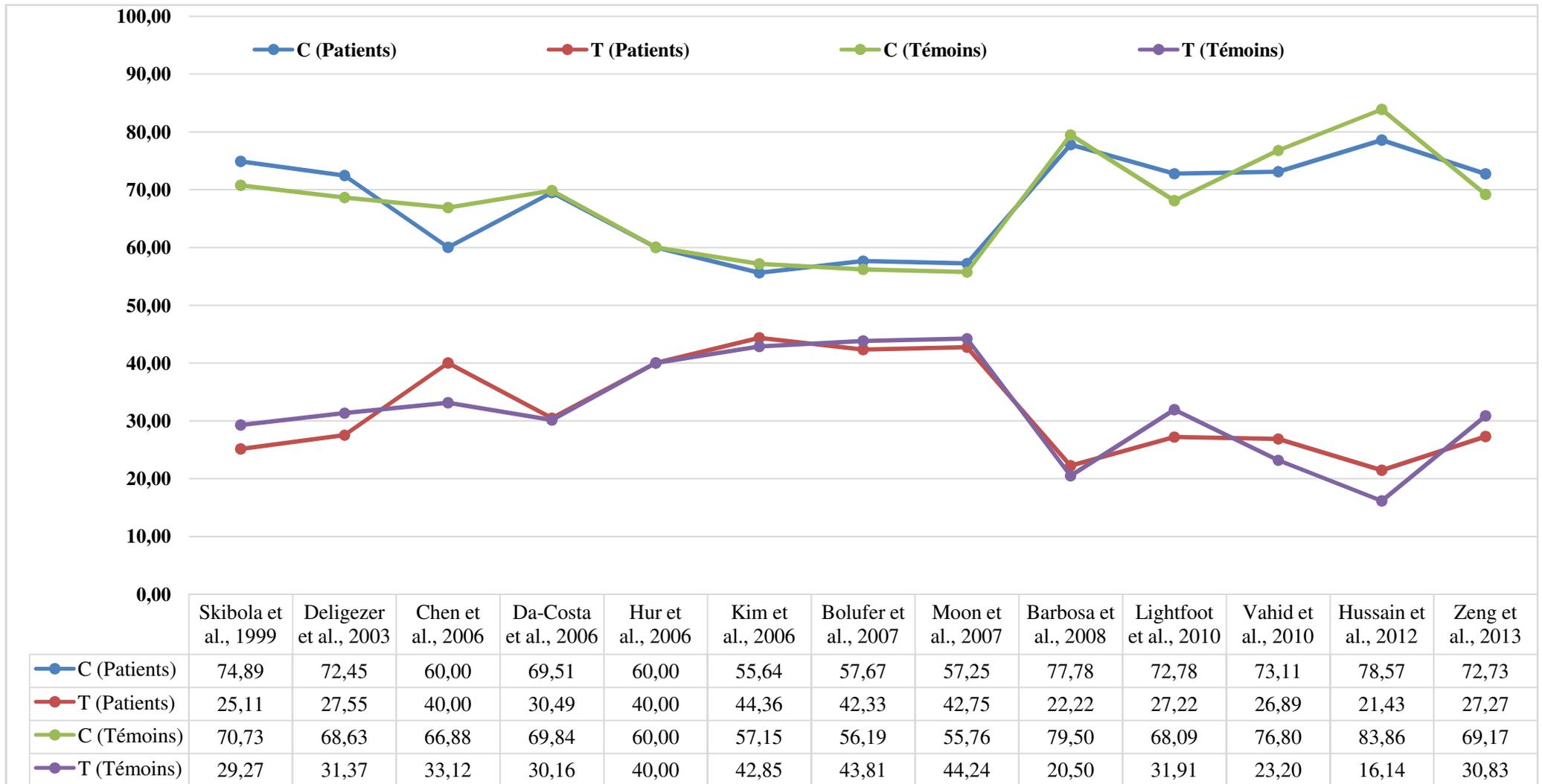


Figure 05 : Représentation graphique des fréquences alléliques (allèles C et T) dans les différentes études recueillies dans la méta-analyse.

3- Résultats de la méta-analyse :

Tableau VIII : Effet de l'allèle T (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*) dans la survenue de LAM (OR et IC à 95 %).

N°	Référence	Odds ratio	Lower limit	Upper limit	p-value	Weight
1	Skibola et al., 1999	0,81	0,62	1,06	0,122	14,22
2	Deligezer et al., 2003	0,83	0,50	1,37	0,473	4,01
3	Chen et al., 2006	1,35	0,81	2,23	0,249	3,95
4	Da-Costa et al., 2006	1,02	0,77	1,35	0,912	12,81
5	Hur et al., 2006	1,00	0,65	1,54	1,000	5,44
6	Kim et al., 2006	0,88	0,57	1,38	0,587	5,19
7	Bolufer et al., 2007	0,94	0,72	1,23	0,660	14,04
8	Moon et al., 2007	0,94	0,74	1,20	0,619	17,64
9	Barbosa et al., 2008	1,11	0,54	2,29	0,782	1,91
10	Lightfoot et al., 2010	0,80	0,55	1,15	0,227	7,51
11	Vahid et al., 2010	1,22	0,78	1,91	0,392	4,96
12	Hussain et al., 2012	1,42	0,95	2,11	0,086	6,37
13	Zeng et al., 2013	0,84	0,41	1,72	0,637	1,96
		0,97	0,87	1,07	0,490	

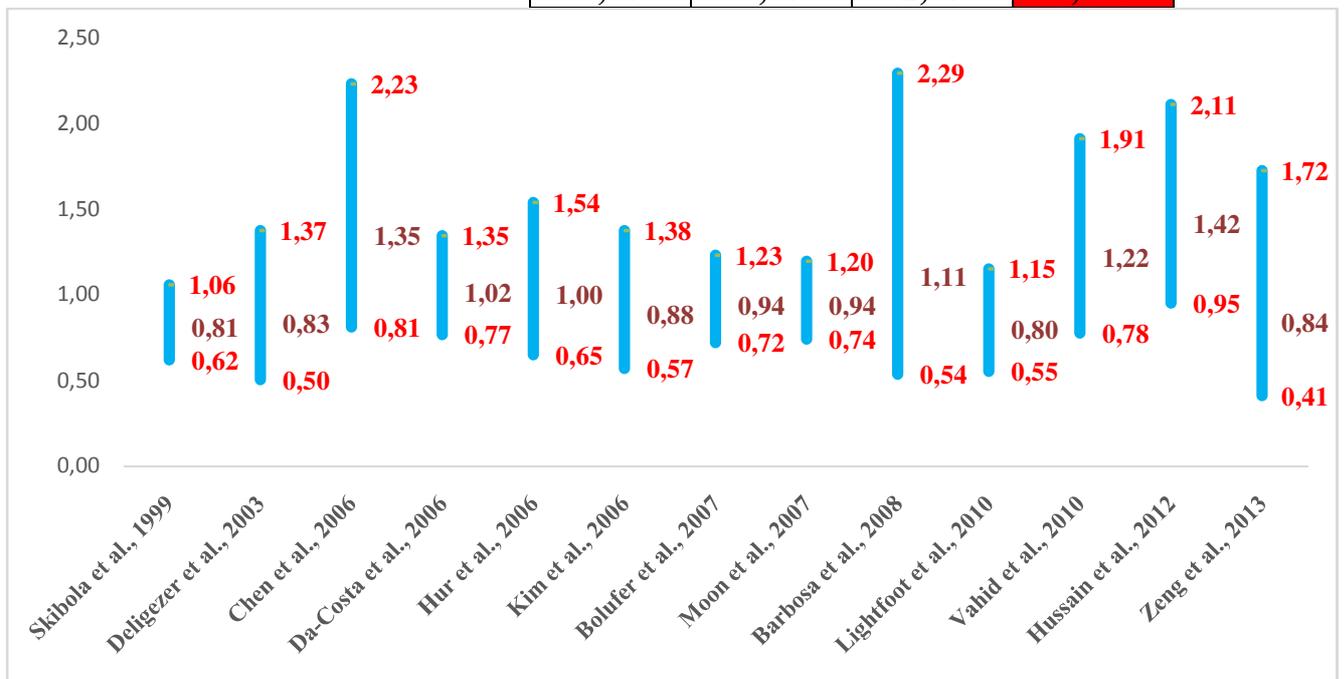


Figure 06 : Représentation graphique de l'effet de l'allèle T (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*) dans la survenue de LAM (OR et intervalle de confiance à 95 %).

Tableau IX : Étude des différents effets possibles de l'allèle T (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*) par OR (IC 95%) et valeur *p*.

Effet recherché	Odds Ratio		Conclusion
	Odds Ratio (IC 95%)	Valeur <i>p</i>	
Allèle T (T vs C)	0,97 (0,87 - 1,07)	0,49	Non significative
Modèle homozygote (TT vs CC)	1,08 (0,84 - 1,38)	0,55	
Modèle récessif TT vs CC + CT	1,05 (0,84 - 1,32)	0,66	
Modèle dominant TT + CT vs CC	0,97 (0,83 - 1,14)	0,74	

4- Biais des publications :

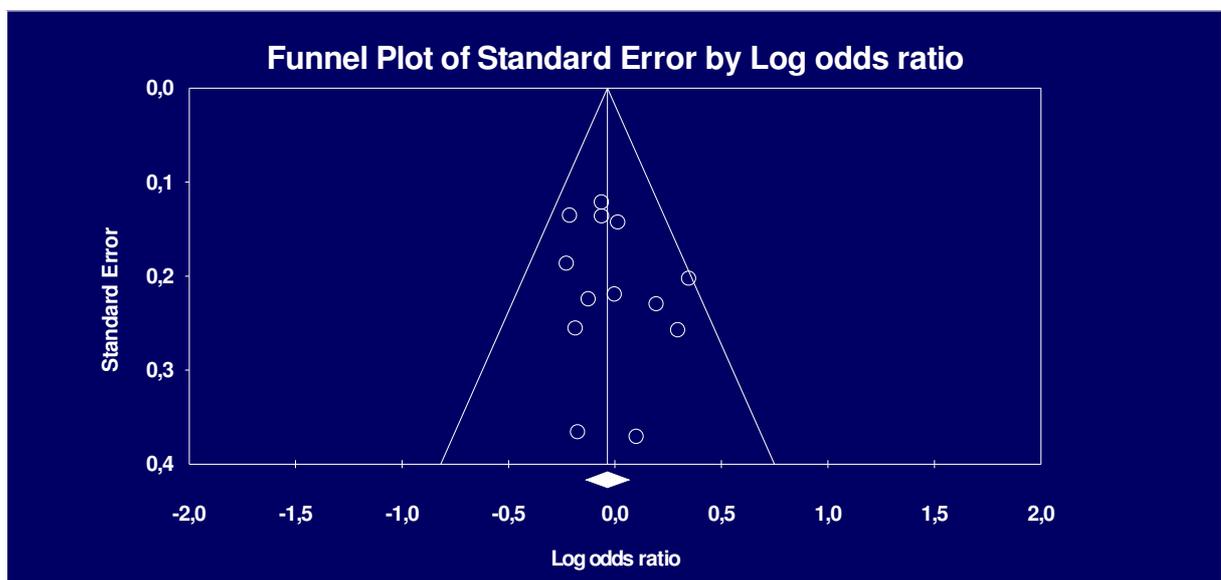


Figure 07 : Test de biais des études incluses dans la méta-analyse (représentation graphique en "Funnel Plot").

D'après ce test le biais des publications pouvant fausser les résultats de notre méta-analyse est jugé non significatif.

II- Étude moléculaire :

Nous avons procédé au génotypage de la *MTHFR* pour 12 patients recrutés au niveau du service d'hématologie du CHU Ben-Badis entre 01 Avril 2015 et 30 Mai 2015. Une partie des résultats de cette analyse est mentionnée dans la photo ci-dessous (**voir photo 02**).

Pour notre étude cas-témoins, nous avons confronté les résultats du génotypage de la *MTHFR* de nos patients avec ceux d'un pool de témoins (16 individus en bonne santé apparente) de génotypes définis (pour le polymorphisme étudié) et recrutés également au niveau du même laboratoire.

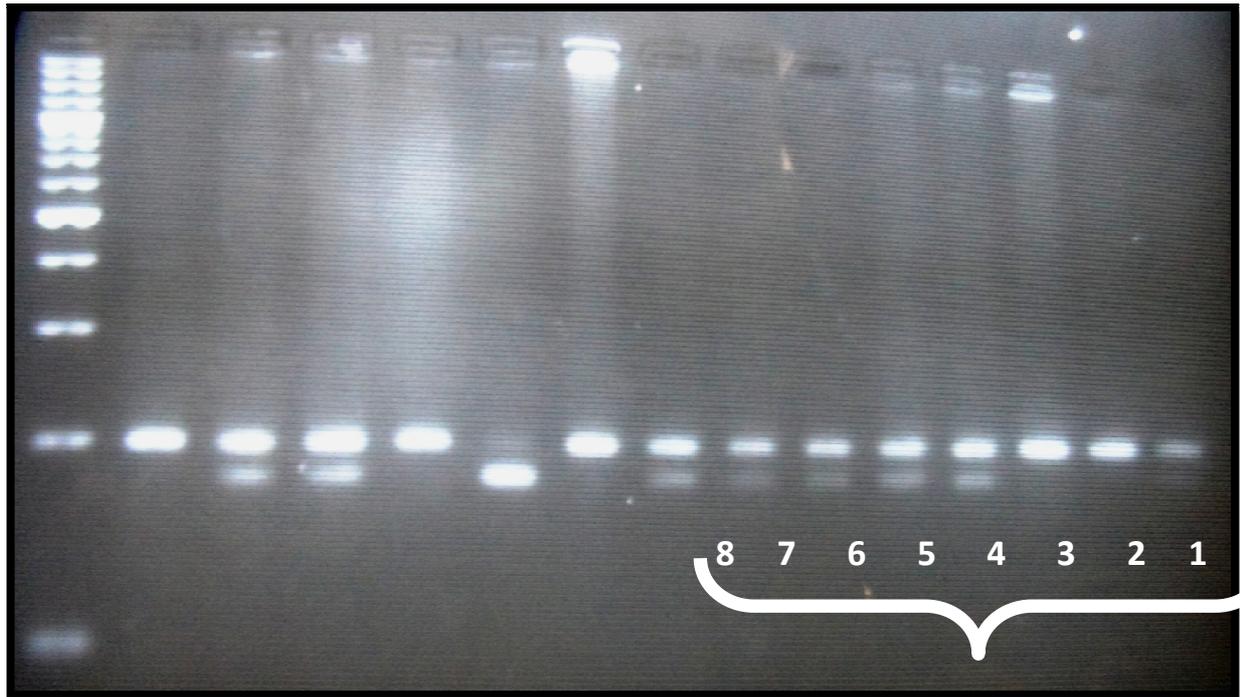


Photo 2 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène de la *MTHFR* par *HinfI* de nos patients.

La lecture des profils d'électrophorèse nous a permis de définir le génotypage de la *MTHFR* pour tous nos patients. La répartition des différents génotypes et allèles, pour nos patients et témoins, est mentionnée ci-dessous. (voir tableau X, figures 08 et 09).

Tableau X : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T de la *MTHFR* chez la population témoin et chez les patients.

Génotype	Patients		Témoins	
	n	%	n	%
CC	02	17 %	08	50 %
CT	10	83 %	07	43,75 %
TT	00	00 %	01	6,25 %
TOTAL	12	100 %	16	100 %
Allèle C	14	58 %	23	71,87 %
Allèle T	10	42 %	09	28,13 %

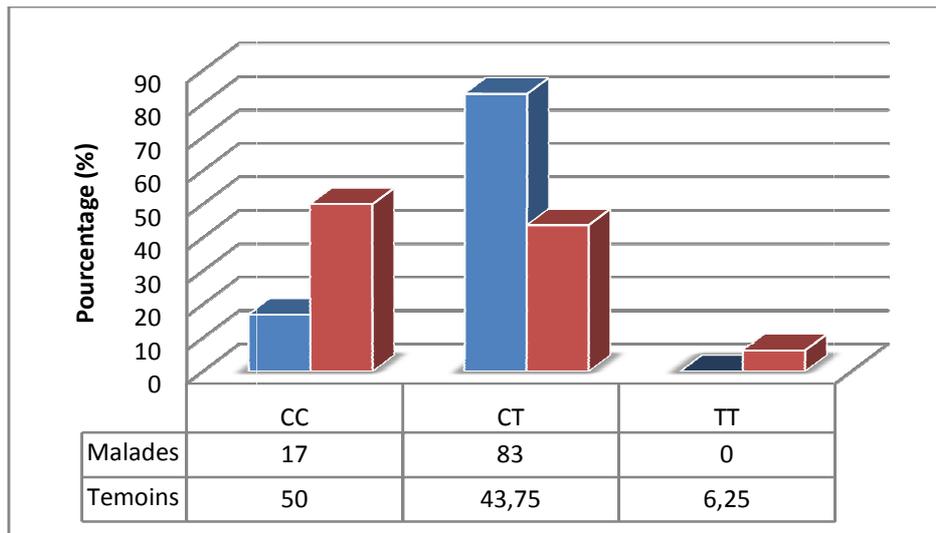


Figure 08 : Répartition des différents génotypes de la *MTHFR* pour les patients et les témoins.

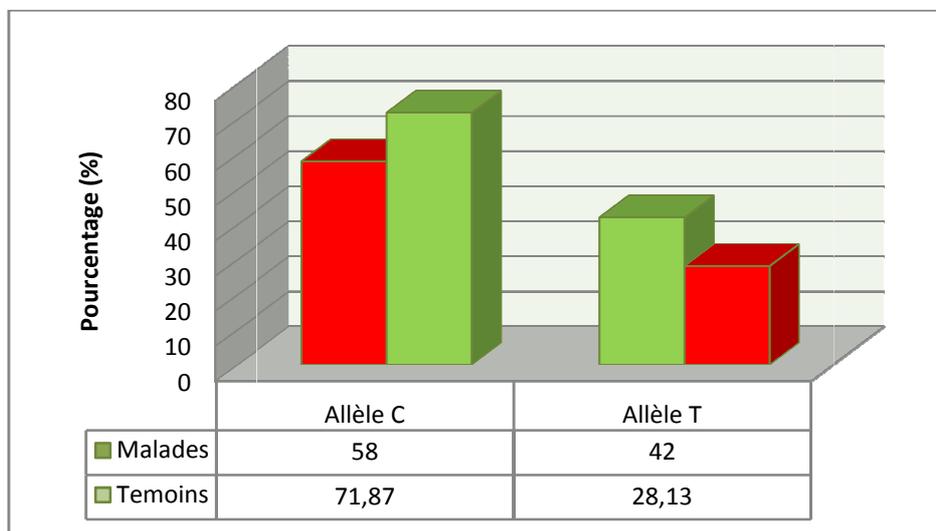


Figure 09 : Répartition des deux allèles de la *MTHFR* pour les patients et les témoins.

Les résultats ainsi obtenus ont été traités avec le logiciel EPI-info 7.0TM dans le but de prospecter l'association possible entre le facteur de risque étudié (polymorphisme C677T de la *MTHFR*). Les résultats de l'analyse statistique sont mentionnés ci-dessous. (voir tableau XI).

Tableau XI : Étude des différents effets possibles du polymorphisme C677T de la *MTHFR* par calcul de l'OR (IC 95%) et la valeur *p*.

Effet recherché	OR		Conclusion
	OR (IC 95%)	Valeur <i>p</i>	
Allèle T (T vs C)	1,82 (0,51 - 6,47)	0,43	Non significative
Modèle homozygote (TT vs CC)	-	0,38	
Modèle récessif (TT vs CC + CT)	-	0,88	
Modèle dominant (TT + CT vs CC)	5,00 (0,66 - 57,97)	0,11	

Partie Pratique

Discussion

Discussion

L'étude des mécanismes moléculaires de la cancérogenèse dresse aujourd'hui vers une étiologie à double origine des LAM ; génétique et environnementale. Cependant, la part relative des deux composantes n'est pas simple à déterminer [177]. L'étiopathie demeure en grande partie inconnue ; des facteurs de risque actuellement reconnus sont essentiellement iatrogènes, tels que certaines chimiothérapies anticancéreuses (inhibiteurs de topoisomérase II et agents alkylants) et les radiations ionisantes à forte dose (radiothérapie ou irradiation accidentelle rare), ces dernières étant particulièrement délétères lors du développement fœtal intra-utérin [178].

Des maladies génétiques sont également des facteurs de risque identifiés de leucémie aiguë. La trisomie 21 multiplie par environ 50 le risque de LAM et par environ 10 le risque de LAL [179]. Les leucémies surviennent aussi, exceptionnellement, dans le cadre de syndromes génétiques identifiés (Li-Fraumeni, anémie de Fanconi, ataxie téléangiectasie, syndrome de Bloom ou une neurofibromatose de Von Recklinghausen) [180]. Ajoutés à ces facteurs, les radiations ionisantes, le sexe et l'ethnie expliquent moins de 10 % des cas de leucémies [181]. Par ailleurs, il est maintenant prouvé que la forte concordance du risque de leucémie de l'enfant entre jumeaux monozygotes résulte de la transmission trans-placentaire de clones pré-leucémiques [182].

La comparaison de la séquence d'ADN de deux humains montre une identité de 99,9 %. Dans la fraction restante (0,1 %) réside le degré de risque d'apparition de certaines maladies à hérédité complexe (comme l'asthme, le diabète et le cancer) ou la susceptibilité individuelle à certains médicaments. On estime qu'il existe dans le génome plus de dix millions de variations communes (Fréquence de plus de 5 % dans la population), la plupart étant des variations d'une seule base d'une séquence d'ADN entre individus d'une même espèce, soit les SNP [183]. Un gène est considéré comme polymorphe s'il existe au moins deux allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1 %. Ils représentent plus de 90 % de toutes les différences entre individus. En moyenne un SNP est rencontré tous les 300 à 1 200 nucléotides et il y en a de l'ordre de 10 millions dans le génome humain. Dans une population déterminée, l'allèle ayant la fréquence la plus petite est appelé allèle mineur. Des gènes de susceptibilité génétique codant pour des enzymes ayant un rôle dans le métabolisme des xénobiotiques et le transport membranaire ont été associés aux leucémies [184]. De nombreuses études d'association gène-candidat ont été publiées sur des polymorphismes situés dans des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des carcinogènes, du métabolisme des folates et de la réparation de l'ADN et certains polymorphismes (*CYP1B1*, *CYP3A5*, *GSTT1* et *SULT1A1*) semblaient associés positivement au risque de LAM [185].

Discussion

La *MTHFR* fait aujourd'hui office de candidat idéal à l'étude du polymorphisme génétique associé avec un risque accru de développer une pathologie cancéreuse. En effet, la *MTHFR*, enzyme clé du métabolisme des folates, est impliquée dans la synthèse d'ADN, sa réparation et sa méthylation. De part ces fonction, on peut aisément concevoir le fait que de nombreuses recherches ont été orientées dans ce sens [186].

Deux polymorphismes communs pour le gène *MTHFR*, C677T et A1298C, modifiant l'activité de l'enzyme ont été identifiés et largement étudiés. La variation C677T (Ala222Val) affecte le domaine catalytique de la *MTHFR*, créant une enzyme thermolabile dont l'activité catalytique est réduite, par rapport à l'enzyme de génotype thermostable, d'environ 60 à 70 % pour les homozygotes et à un niveau intermédiaire pour les hétérozygotes (35 à 40 %) [187]. Ce polymorphisme entraîne une diminution des niveaux de 5-méthyl THF, une accumulation de 5,10-méthylène THF, d'où une augmentation des niveaux d'homocystéine plasmatique et des changements dans la composition cellulaire des dérivés des folates mono-carbonés avec apparition de polyglutamates THF formylés [188]. Cette perte d'activité entraîne une diminution des niveaux de 5,10-méthylène-THF, substrat de *MTHFR* nécessaire à la synthèse de thymidylate, ce qui entraîne la mésincorporation d'uracile dans l'ADN, une diminution de l'efficacité du système de réparation de l'ADN et une accumulation de cassures et de lésions au niveau des chromosomes [189]. Elle entraîne également une hypo-méthylation de l'ADN due à la baisse des niveaux de S- adénosyl-méthionine. À l'état homozygote, ce polymorphisme prédispose au développement d'une hyper-homocystéinémie (augmentation d'environ 25 %) [190], particulièrement lors d'une carence en folates [191]. Cependant, en l'absence de carence en folates, les niveaux d'homocystéine plasmatique seraient bas et indépendants du génotype.

L'autre polymorphisme A1298C (Glu429Ala) affecte le domaine régulateur en remplaçant un glutamate par une alanine au codon 429. L'activité de l'enzyme est diminuée mais de façon moins marquée que pour C677 et les individus homozygotes pour l'allèle A1298 ne semblent pas avoir des taux plasmatiques d'homocystéine plus élevés, sauf en présence de l'allèle C677 [192].

À la lumière de tous ce qui a été mentionné ci-dessus, nous avons entrepris un travail de recherche visant à prospecter, par une méta-analyse et une étude cas-témoins, l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans l'apparition des LAM.

Après une recherche bibliographique approfondie, nous avons recueilli 13 études (1657 patients et 4995 témoins) ayant exploré l'effet de ce SNP. Ces études ont apporté des résultats très contrastés ; une association statistiquement positive ou négative a été mise en évidence (**voir tableau XII**).

Discussion

Tableau XII : Conclusions des études (C677T de la *MTHFR* et LAM) incluses dans notre méta-analyse.

Polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> et le risque de LAM	
Association significative	Association non significative
<i>Lightfoot et al., 2010</i> <i>Hussain et al., 2012</i> <i>Zeng et al., 2013</i>	<i>Skibola et al., 1999</i> <i>Deligezer et al., 2003</i> <i>Chen et al., 2006</i> <i>Da-Costa et al., 2006</i> <i>Hur et al., 2006</i> <i>Kim et al., 2006</i> <i>Bolufer et al., 2007</i> <i>Moon et al., 2007</i> <i>Barbosa et al., 2008</i> <i>Vahid et al., 2010</i>

Ces résultats, contradictoires, confirment la pertinence de la réalisation d'une méta-analyse sur le sujet. En effet, la taille relativement faible des populations étudiées (parfois quelques dizaines de cas) diminue la puissance statistique et ne permet pas de mettre en évidence des effets modestes (ORs) attendus inférieurs à 1,5). Rappelons que le gène étudié fait partie d'une catégorie à faible pénétrance (contrairement aux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) dont l'effet, si il est avéré, va être très modeste. Pour pouvoir le mettre en évidence il faut augmenter la puissance statistique, qui est proportionnelle à la taille des échantillons recueillis et l'organiser en deux cohortes sur le modèle patient-témoins.

Les résultats de la méta-analyse, incluant 13 études, a conclue à l'absence d'un possible effet de l'allèle T dans la survenue de cette hémopathies. Ces résultats sont en accord avec ceux de deux méta-analyses ; *Yu-Tao Qin et al., 2014* et *Hairong He et al., 2014*, entreprises et publiées sur le sujet. Il est d'usage de mentionner que nous avons suivi le même modèle de construction de la méta-analyse utilisé dans ces études (critères d'inclusion et d'exclusion, extraction des données, etc). Prises séparément, les données contradictoires de la bibliographie suggèrent que les effets de ce polymorphisme sont très complexes et sont conditionnés, probablement, par nombre d'autres facteurs, tels que les expositions à des facteurs environnementaux, les habitudes alimentaires et le statut d'autres gènes de la voie du métabolisme des folates. Malheureusement, peu d'articles à ce jour, ont étudié des combinaisons de polymorphismes.

Discussion

À l'instar des études sélectionnées, il est à noter que *Skibola et al., 1999*, *Barbosa et al., 2008*, *Hur et al., 2006*, *Moon et al., 2007*, *Vahid et al., 2010*, *Da-Costa et al., 2006* et *Zeng et al., 2013* ont prospecté, sur la même cohorte de patients et de témoins, l'effet du polymorphisme A1298C dans l'apparition des LAM. Seule l'étude de *Da-Costa et al., 2006* a conclu à l'existence d'une association significative.

L'analyse de l'effet statistique de l'association des deux polymorphismes délétères de la *MTHFR* (haplotypes) a été réalisée par deux études. Cependant, des résultats non concluants ne peuvent indiquer l'effet réel de cette association faute d'effectifs suivants. Une conclusion sur un possible effet du polymorphisme étudié (seul ou en association avec d'autres polymorphismes ou altérations géniques) doit impérativement tenir compte de la taille de l'échantillon étudié, la nature des témoins utilisés et l'origine ethnique.

Aujourd'hui, plusieurs méta-analyses ont été effectuées pour clarifier l'effet de la susceptibilité génétique que peut exercer le polymorphisme C677T de la *MTHFR* sur le risque du développement de plusieurs cancers. Par exemple, *You W et al., 2013* ont démontré son association à un risque de cancer de la vessie [193]. *Wei et al., 2013* ont fourni la preuve que le polymorphisme C677T augmente le risque de développer un cancer colorectal [194]. D'autres part, une méta-analyse de *Ding et al., 2012* indique qu'aucune association significative n'a été observé entre le ce SNP et la survenue du cancer de l'ovaire [195]. Par ailleurs, *Niu et al., 2012* suggèrent qu'aucune association significative entre le polymorphisme A1298C de la *MTHFR* et le cancer du col de l'utérus n'a été retrouvée [196]. Ces données inspirent d'une part la complexité de la voie métabolique des folates (Certes la *MTHFR* occupe un rôle central dans ce processus, mais ce n'est pas la seule enzyme) et des mécanismes moléculaires de la cancérogenèse (différent d'une pathologie cancéreuse à une autre). L'influence de l'apport en folates est de plus en plus évoquée dans des études menées sur des polymorphismes d'enzymes du métabolisme des folates. L'apport alimentaire de plusieurs nutriments riches en vitamine B₉ pourrait influencer la distribution du métabolite du folates, et avoir une incidence sur la synthèse d'ADN et sa méthylation, ce qui peut conduire à une insuffisance en acide folique et en vitamine B [197].

Une absence de folates peut introduire des erreurs au cours de la synthèse d'ADN, une rupture des deux brins et peut entraîner également des altérations chromosomiques, une hypo-méthylation de l'ADN activant l'expression de proto-oncogènes en raison d'une diminution de synthèse de S-Adénosyl-Méthionine. Il est intéressant de noter que la supplémentation en acide folique pourrait influencer les niveaux d'homocystéine plasmatique. Une étude suggérait que les individus homozygotes pour l'allèle variant C677T de *MTHFR* tendaient à avoir des niveaux d'homocystéine plasmatique normaux lorsque l'apport de folates était adéquat [198].

Discussion

Un apport suffisant en folates réduirait ainsi l'impact de la baisse d'activité de l'enzyme due au polymorphisme sur la méthylation de l'ADN [199] ou l'incorporation de l'uracile dans l'ADN [200]. Certains auteurs suggèrent que le polymorphisme C677T pourrait ainsi réduire le risque de cancer si la prise de folates est adéquate ou, au contraire, augmenter le risque de cancer si la prise de folates est inadéquate [201].

Malheureusement, aucune étude sur notre thématique de recherche n'a prospecté l'effet de l'apport en folates. En analyse cas-seuls, *Milne et al., 2006* n'ont pas observé d'interaction entre le génotype de *MTHFR* et la supplémentation en folates en association avec les LAL. L'étude de *Metayer et al., 2011* trouvait une interaction entre certains polymorphismes de *MTRR* (Méthionine Synthase Reductase) et la quantité moyenne de folates de l'alimentation maternelle, ces polymorphismes étant positivement associés aux LAL pour des apports en folates inférieurs à la médiane, et négativement pour des apports supérieurs. Il n'y avait pas d'interaction entre la prise de folates et chacun des polymorphismes de *MTHFR* ou du polymorphisme A66G de *MTRR*.

Notre étude cas-témoins, réalisée sur deux cohortes recrutées dans la région de Constantine n'indique aucun effet potentiel du polymorphisme dans la survenue de LAM. Nous avons prospecté cette association avec tous les effets possibles que peut exercer l'allèle supposé délétère et ce à travers le calcul de l'OR de 4 modèles ; effet brut de l'allèle T (T vs C) ainsi que les modèles homozygote (TT vs CC), récessif (TT vs CC + CT) et dominant (TT + CT vs CC). En effet les valeurs *p* étaient supérieures au seuil de 0,05. Il est à noter que nous n'avons pas pu calculer les effets homozygotes et récessifs qui ne peuvent être quantifiés du fait qu'aucun de nos patients ne présente le génotype TT (TT % = 0).

Le calcul de l'OR à IC de 95 % et de sa valeur *p* n'indique aucune association (délétère ou protectrice) entre le polymorphisme étudié et la pathologie en question.

La comparaison des fréquences génotypiques entre la population témoin (CC 50 %, CT 43,75 % et TT 6,25 %) et la population malade (CC 17 %, CT 83 % et TT 00 %) démontre que celles-ci n'en diffèrent pas beaucoup ; elle est marquée en ce qui concerne les fréquences génotypiques de CC et CT. Les fréquences alléliques entre la population témoin (71,87 % pour l'allèle C et 28,13 % pour T) et la population malade (58 % et 42 % respectivement pour C et T) ont été calculées. Là aussi la fréquence de l'allèle C est légèrement plus importante que celle de l'allèle T sans pour autant être statistiquement significative.

La taille relativement faible de notre cohorte de patients (n=12) et de témoins (n=16) ne permet pas de faire la comparaison entre les fréquences génotypiques et alléliques que nous avons obtenues avec celles rapportées dans d'autres études.

Discussion

Dans notre étude sur les LAM, et à notre connaissance, la bibliographie ne rapporte aucune étude mentionnant cet effet protecteur. Il s'avère donc que le rôle de l'activité de la MTHFR dans le développement du cancer, et son importance relative dans la pathogénie tumorale peut varier en fonction de la localisation tumorale et du tissu concerné.

Il est impérative dans une recherche génétique d'association (polymorphisme génique-incidence d'une pathologie) de considérer l'origine ethnique et de tirer, avec prudence, des conclusions à partir d'études cas-témoins. À l'instar d'autres polymorphismes étudiés, les données de la littérature mettent en évidence une très grande hétérogénéité dans la distribution du variant C677T dans la population mondiale (voir figure 10).

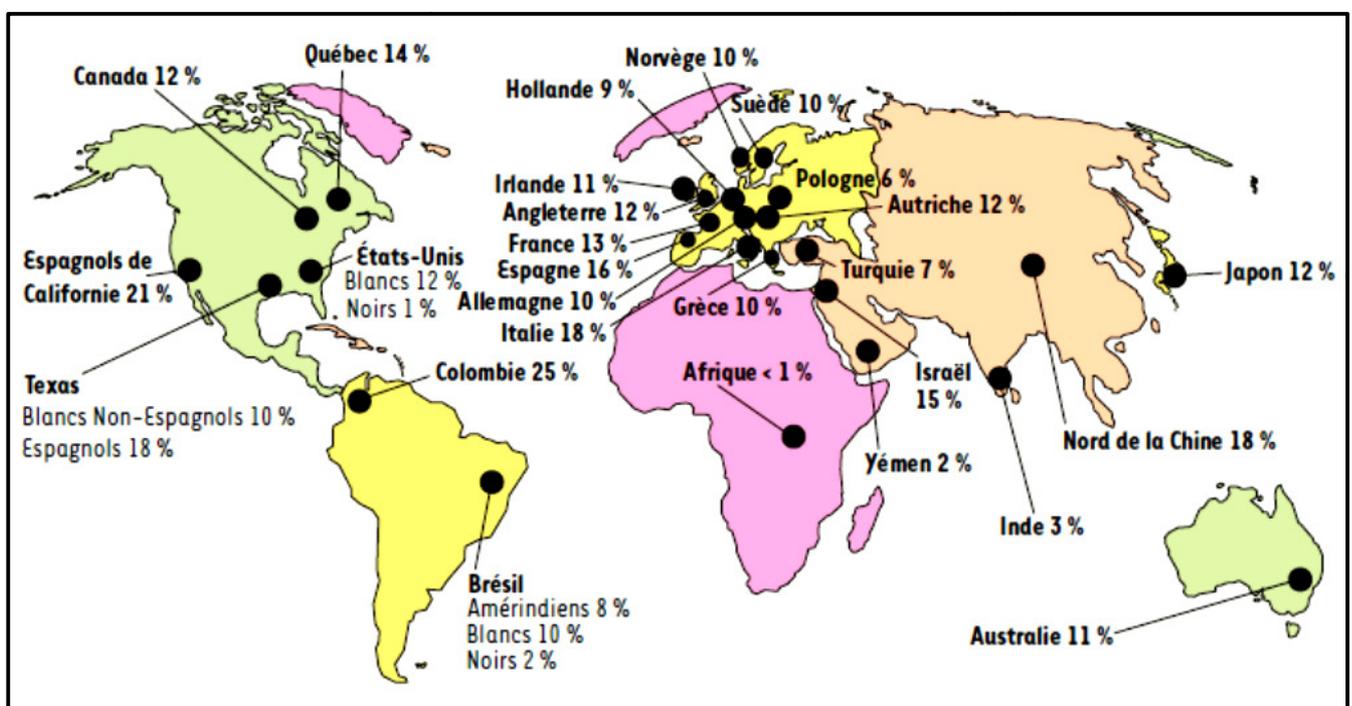


Figure 10 : Prévalence de l'homozygotie de l'allèle 677T par régions (Leclerc D et al., 2007).

Cette figure illustre parfaitement l'extrême hétérogénéité de distribution des génotypes CC, CT et TT en fonction des groupes ethniques. Différentes études réalisées de par le monde ont montré une distribution très hétérogène du polymorphisme C677T de la MTHFR et correspond à des variations ethniques et régionales dans différentes populations et selon un gradient croissant Nord-sud, notamment en Europe et en Amérique du Nord.

La prédominance du polymorphisme C677T est relativement élevée dans la population générale ; la prédominance des homozygotes 677TT est particulièrement commune au nord de la Chine (20 %), le sud de l'Italie (26 %), Mexico (26 %), la population caucasienne (5 à 15 %). Dans les pays Arabes du golfe, les fréquences restent faibles et tournent toutes autour de 2,5 %

Discussion

Il est à noter qu'aucune évaluation globale, même approximative, de la fréquence du polymorphisme C677T dans la population générale originaire de l'Afrique du Nord n'a été faite. De telles données nous permettront dans l'avenir d'interpréter correctement des résultats d'association. Heureusement, l'interaction entre les prédispositions génétiques (677TT) et des paramètres non-génétiques (acide folique alimentaire, suppléments vitaminiques) est susceptible de prévenir certaines manifestations cliniques associées à une légère déficience de la MTHFR [202].

Conclusion

Notre travail de recherche a consisté en étude avec deux volets ; épidémiologique (méta-analyse) et moléculaire (cas-témoins par génotypage de la *MTHFR* pour le polymorphisme C677T). Nos résultats suggèrent l'absence d'un effet quelconque du polymorphisme étudié ce qui concorde avec ce qui est rapporté dans la bibliographie. Cependant, la taille relativement restreintes des cohortes utilisées pour ces études ne permette pas de mettre en évidence l'effet réel de ce polymorphisme sur cette pathologie. En plus l'expression de ce polymorphisme peut être influencée par des interactions subtiles avec d'autres SNPs, l'origine ethnique ainsi que le statut du métabolisme des folates (apport nutritionnel).

Il paraît évident que la constitution génétique d'un individu joue un rôle très important dans la physiopathologie des LAM et pourrait expliquer, même partiellement, l'étiologie de ces hémopathies complexes. À l'avenir ces informations serviront à établir une stratégie thérapeutique adaptée.

À la lumière de ce travail nous voyons comme perspectives :

- La nécessité de création de registre national de cancers spécialisé et la sensibilisation du personnel hospitalier à l'importance du dossier médical qui doit être le plus exhaustif possible. Sans ces deux composantes il sera impossible de mener des études épidémiologiques exploitables,
- Établir, en collaboration avec les laboratoires de biologie moléculaire du pays, une banque de données concernant les polymorphismes de la *MTHFR* pour les patients (diverses pathologies) et témoins. Ces données nous permettront d'avoir une idée sur la constitution génétique (pour ces SNPs) dans la population Algérienne et servira de points de départ pour la réalisation d'autres études.
- Il serait utile de recommander, dans toute étude cas témoins future, menée sur les polymorphismes de la *MTHFR* de préciser le statut du métabolisme des folates en interaction avec des facteurs environnementaux (régime nutritionnel conditionné par les disparités socio-économiques).

Références bibliographiques

1. **Mauvieux.L, Lessard.M, Lioure.B** . Les leucémies aiguës de l'enfant ; Maladies du sang et transfusion. Université Louis Pasteur, Faculté de Médecine. Module 07 ; 2005-2006 ; DCEM3,module 17: 97-110.
2. **Mbensa L, Ngiyulu R, Binda P, Lukuni L.** La leucémie aiguë de l'enfant : indice et manifestation clinique en milieu tropical. Méd Af Noire ; 1993 ; 40(8/9) :555-6.
3. **Naido J, A.Hesseing P.** Common neoplastic disorders in HM coovadia, WEK Loening Eds Paediatrics and child health. Oxford; 1992(2nd edition):420-24.
4. **Deschler B., Lubbert M.** (2006). Acute myeloid leukemia : epidemiology and etiology. Cancer, 107 (9): 2099- 107.
5. **Gisselbrecht S.** (2003).Oncogènes et leucémies : historique et perspectives. M/S : médecine sciences, vol. 19, N° 2, p. 201-210.
6. **Kelly L.M., Gilliland D.** (2002). Genetics of myeloid leukemia's. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 3, p.179-198.
- 7.**Alain Ramé, Sylvie théron** (2007). Anatomie et Physiologie.Elservier Masson Sas.318 p(130-131).
- 8.**Leblanc C.**(2011).Le sang.Cours en ligne.IFSI.Disponible sur: www.fichier-pdf.fr/2011/10/19/cours-ifs...sang.../cours-ifs-le-sang.pd
9. **Binet C.** (Janvier 2003). Le sang. Ed. FMC, Faculté de Médecine de Tours.
10. **Provan D., Gribben J.** (2005). Molecular Hematology, Second edition, Blackwell Publishing, ISBN : 1-4051-1255-7.
11. **Drouet F., Lagrange J.L.** (2010).Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains: la moelle osseuse. Cancer/Radiothérapie, 14, P. 392-404.
12. **Benbahouche N.** Études et examens biologiques et génétiques appliquées au diagnostic des leucémies dans la région de Constantine. Mémoire de Master en Génétique Moléculaire. Constantine : Université Mentouri Constantine, 2011,108P.
13. **Bryon P.** (1998). Anatomie et histologie de la moelle osseuse. Encycl Méd Chir Hématologie (Elsevier, Paris) 1998 ; 13-000-M-80 :1-10.
14. **Ferrant A.** (2004).hématologie. Tome 1. Faculté de Médecine Unité d'Hématologie.
15. **Lévy JP., Clauvel JP., Varet B., et al.** (2008). Hématologie et transfusion. Masson. Paris : 2008, pagination multiple.
16. **Fliedner TM., Graessle D., Paulsen C., et al.** (2002). Structure and function of bone marrow hematopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. Cancer Biother Radiopharm , 17:405–26.
17. **Mauch P., Constine L., Greenberger J., et al.** (1995). Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys,31:1319-39.
- 18.**Waterstrat A,Van Zant G.**(2009).Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells.Current Opinion Immunology,21,408-413.
19. **Miyamoto T,Iwasaki H,Reizis B,et al** (2002).Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment.Development Cell 3,137-147.
20. **LEJONC J.-L, KUNTZ M.**Sémiologie hématologique.1999.p208-238.
21. **LOK S., FOSTER D.** □The structure,biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin □ . Stem Cells.1994.12 (6), p 98-586.
22. **FARESE A.M.,HUNT P.,BOONE T.et al.,** Recombinant human megakaryocyte growth and development factor stimulates thrombocytopoiesis in normal nonhuman primates Blood, 1995,86(1),p 9-54.
23. **KIMURA S., ROBERTS A.W., METCALF D.et al.,** Hematopoietic stem cell Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells throught HIF-1{alpha}. Blood.1998.

Références bibliographiques

24. **NICOLA N .A.,METCALF D.,MATSUMOTO M.et al.**, Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte Colony Stimulating factor J Biol Chem, 1983, 258(14),p 23-9017.
25. **NICOLA N .A.,METCALF D.,MATSUMOTO M.et al.**, Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte Colony Stimulating factor J Biol Chem, 1984, 258(14),p 23-9017.
26. **MOORE M.A. Review:Stratton Lecture 1990.**Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. Blood, 1991, 78(1), p 1-19.
27. **SIMMONS P.J.,ZANNETTINO A.,GRONTHOS S.et al.**, Potential adhesion mechanisms for localization of hematopoietic progenitors to bone marrow stroma.Leuk Lymphoma,1994,12(5-6),p 63-353.
28. **FICHELSON S.** Les cellules souches hématopoïétiques humaines normales :régulation et méthodes d'exploration,17 Juin 2004-5èmes journées du GFM-Rouen.
29. **BAILLET.**Cancérologie DCEM3,Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie.SFPO,Monaco,16 au 18 Octobre 2003.
30. **COULOMBEL L.,AUFFRAY I.,GAUGLER M. H. ET ROSEMBLATT M.** Expression and fuction of integrins on hematopoietic progenitor cells. Acta Hematology,1997,97(1-2),p 13-21.
31. **ATUL-METHA B.,HOFFBRAND V.A.** Hématologie.De Book.2008.(Sciences médicales,Série Claude Bernard) ISBN : 2-7445-9141-7,ISSN :1378-0492.
32. **Larsen C.** (octobre 2007).Physiopathologie des leucémies aiguës : des avancées significatives. Bull Cancer vol. 94, n°10.
33. **Marina Casselyn.** (Février 2006).Un grand pas vers la compréhension des Leucémies aiguës myéloïdes. Biofutur.
34. **Bonnet D,Dick J.**(1997).Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.Nature Medicine 3,730-737.
35. **Chan I.T., Kutok J.L., Williams I.R., et al.** (2004). Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. J Clin Invest 113, 528-538.
36. **Sternberg DW., Gilliland DG.** (2004). The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. J Clin Oncol 22: 361-71.
37. **Recher C., Beyne-Rauzy O., Demur C., et al.** (2005). Anti-leukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. Blood 105, 2527-2534.
38. **Speck N.A., Gilliland D.G.** (2002). Core-binding factors in hematopoiesis and leukemia. Nat Rev Cancer 2, 502-513.
39. **Mullican SE., Zhang S., Konopleva M., et al.** (2007). Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and NR4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. Nature Med , 13: 735.
40. **Debru C, Triadou P.** Acute leukemias: a historical view of classifications. Médecine/ science, 1996; 12(4): 491-5
41. **Degos L.** Un pionnier de la médecine scientifique, **Alfred Donne.** Médecine/Sciences 1995; 10: 1478-8
42. **Bernard J.** Etudes anatomiques sur les syndromes érythro - leucémiques provoqués chez le rat par le goudron. Le sang 1934- 992
43. **Virchow R.** Zur pathologischen physiologie des Blutes. Arch Path Anat Klin Med 1849; 2: 587-98.
44. **Bennet JM., et al.** (1981) : The morphological classification on acute leukemia : concordance among observers and clinical correlation. British Journal of Hematology, 47: 559.
45. **Bennet JM., et al.** (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Annals of Internal Medicine 103 (4): 626-629.
46. **Karen S,Harris J,Christopher D.**(2011).Acute Myeloid Leukemia Staging, American Asoociation for Cancer Research, American College of Physicians, and American Society of Hematology.

Références bibliographiques

47. **Duchayne E, Demur C, Rubie H, et al.** (1999). Le diagnostic de leucémie à basophiles aigue. *Leukemia-Lymphoma* 32(3-4) :269-78.
48. **Mandal A.** (2013). Classification des leucémies. À partir de : <http://www.news-medical.net>
49. **Vardiman J, Harris N, Brunning R.** (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasm 's. *Blood*, 100(7), p.2292-2302.
50. **Valensi F.** Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l’OMS. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 13-018-G-05.
51. **Airlie House.** (1999). Virginia WHO Classification of neoplastic disease of hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. November 1997. *J Clin Oncol*, 17: 3835-3849.
52. **Leymarie V, et al.** (2004). Diagnosis of myeloid hematologic malignancies: contributions of the 2001 World Health Organization (WHO) classification. *Annales de Biologie Clinique*, 62(5), p.513-520.
53. **Vardiman J, et al.** (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm 's and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), p.937-951.
54. **Vardiman J.** (2010). The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemical- Biological Interactions*, 184(1-2), p.16-20.
55. **Jouault H.** (2002). Place de la cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires*, 344: 25-30.
56. **Dastugue N.** (2000). Place de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire dans l'étude des leucémies aiguës. *Pathologie Biologie (Paris)*, 51: 337-45.
57. **Gallagher R.** (2003). Prime time for real-time Q-RT-PCR in good prognosis AML. *Blood*, 102 : 2709-10.
58. **Bennett J, Catovsky D, Daniel M, et al.** (1976). Proposals for the classification of the acute leukemia's. French-American-British FAB cooperative group. *British Journal Hematology*, 47:451-8.
59. **Vardiman J, Thiele J, Arber D, et al.** (2009). The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasm 's and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.
60. **Deschler B, Lubbert M.** Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, 2006; 107 (9): 2099-107.
61. **Deschler B., Lubbert M.** (2006). Acute myeloid leukemia : epidemiology and etiology. *Cancer*, 107 (9): 2099- 107.
62. **Deschler B., et al.** (2006). Treatment decision-making for older patients with high-risk myelodysplasia syndrome or acute myeloid leukemia : problems and approaches. *Haematologica*, 91(11): p. 1513-22.
63. **Ries L.A.G., et al.** (January 2009). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. 2008 (cited 2009 January).
64. **Derolf A.R., et al.** (2009). Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. *Blood*, 113(16): p. 3666-72.
65. **Forman D., et al.** (2003). Cancer prevalence in the UK: results from the EUROPREVAL study. *Ann Oncol*, 14(4): p. 648-54.
66. **Xie Y., Davies SM., Xiang Y., et al.** (2003). Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer*, 97:2229-2235.
67. **Guizard AV, Carli PM, Troussard X.** Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Rapport InVS « Toutes leucémies»; 175-181 (en ligne). C2003 (Consulté le 17/01/2005). Disponible sur : http://www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport_cancer_2003.

Références bibliographiques

68. **Delain M.** Leucémies Aiguës Myéloblastiques (LAM). C2004 (consulté le 17/01/2005). Disponible sur : <http://www.univtours.fr/fmc/Pages/Hemato/LA/LA.html>.
69. **Lessard M.** Cours Leucémies aiguës (en ligne). C2004 (consulté le 17/01/2005). Disponible sur : <http://aloes.u-strasbg.fr/Enseignement/LA.htm>.
70. **Lioure B.** Les leucémies aiguës (en ligne). C2004. (Consulté le 17/01/2005). Disponible sur : http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/cancero/leucemies_aigues.pdf.
71. **Brionne M., Nowoczyn M.** (Avril 2009). Leucémies Aiguës Myéloïdes - Nouvelle classification OMS. Laboratoire Hématologie - CHU Caen.
72. **Elliott P., Wakefield J., Best N., et al.** (2000). *Spatial Epidemiology: Methods and Applications*. Eds. P. Elliott, J. Wakefield, N. Best and D. J. Briggs. Oxford University Press : Oxford, United Kingdom.
73. **Guizard AV., Spira A., Troussard X., et al.** (1997). Incidence des leucémies de 0 à 24 ans dans le Nord-Cotentin. *Revue Épidémiologie Santé Publique* 45: 530-535.
74. **Berger C., Trombert-Paviot B., Mitton N., et al.** (2006). Childhood cancer incidence and survival rates in the Rhone-Alpes regional paediatric registry 1987-1999. *Arch Pediatric*, 13(2): 121-9.
75. **Inserm.** Cancer et environnement. (2008). Collection Expertise collective, 907 pages.
76. **Belson M., Kingsley B., Holmes A. R.** (2007). Risk factors for acute leukemia in children : a review. *Environ Health Perspect*, 115(1): 138-45.
77. **Lacour B., Guyot-Goubin A., Guissou S., et al.** (2010). Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev*, 19(3): 173-81.
78. **Clavel J., Goubin A., Auclerc M.F., et al.** (2004). Incidence of childhood leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev*, 13(2): 97-103.
79. **Troussard X., Maarouf N.** (2006). Biphenotypic leukemia (BAL): myth, reality, prospects. *Spectra biology*, 152: 34-38.
80. **Weinberg O.K., Arber D.A.** (2010). Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia*, 24(11): 1844-51.
81. **Benakli M.** (Mars 2009) Approches épidémiologiques des Leucémies aiguës myéloïdes en Algérie. *Revue Algérienne d'Hématologie*, N°00, p.22-24.
82. **Boudjerra N.** (Septembre 2009). Aspects épidémiologiques des leucémies aiguës lymphoblastiques en Algérie. *Revue Algérienne d'Hématologie*, N°1, p.13-15.
83. **Djouadi-Lahlou K.** (Mars 2009). Approche épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique en Algérie. *Revue Algérienne d'Hématologie*, N° 00, p.18-20.
84. **Boudjerra N.** (mars 2009). Approche épidémiologique des lymphomes malins non hodgkiniens ganglionnaires de l'adulte. Portant sur 1723 cas (1993-2002). *Revue Algérienne d'Hématologie*, n°00, p 4-7.
85. **Saidi M.** (2011). Epidemiology and clinical features of multiple myeloma in Algeria : Report of the Algerian myeloma study group (GETMA). Abstract p-404, *Haematologica*, 96(s1).
86. **Bekadja M., Hamladji R., Belhani M. et al.** (2011). Acute myeloid leukemia in Algeria. *Haematol Oncol Stem Cell Therapy* 4(4) Fourth Quarter, 6p, hemoncstem.edmgr.com.
87. **Sekeres MA., Elson P., Kalaycio ME., et al.** (2009 Jan1). Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 113(1):28-36.
88. **Kenneth B., Millerand G.,** (2009). Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. In *Hematology Basic principles and Practice*. By: Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein L., Mc Glave P. Fifth Edition. Churchill Livingstone. Philadelphia, PA, USA.
89. Démographie de l'Algérie. Office national des statistiques (Algérie). Editeur : Wikipédia : <http://fr.wikipedia.org/w/index.php>.

Références bibliographiques

- 90. Sant M., Allemani C., Tereanu C., et al.** (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116, 19: 3724-3734.
- 91. Glass DC., Gray CN., Jolley DJ., et al.** (2003). Leukemia risk associated with low-level benzene exposure. *Epidemiology*, 14: 569-577.
- 92. Ahlbom A., Day N., Feychting M., et al.** (2000). A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukemia. *Br J Cancer*, 83 (5): 692-8.
- 93. Buchner T., Hiddemann W., Wormann B., et al.** (1999). Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6- thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood*, 93 (12): 4116-24.
- 94. Byrd JC., Mrozek K., Dodge RK., et al.** (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 100 (13): 4325-36.
- 95. Charlson ME., Pompei P., Ales KL., et al.** (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*, 40 (5): 373-83.
- 96. Vardiman J.W., Arber D.A., Brunning R.D., et al.** (2008). Therapy-related myeloid neoplasms. In : Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al. Fourth Ed. WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 127-9.
- 97. De Botton S.** (2010). Leucémies aiguës myéloblastiques et syndromes myéلودysplasiques induits. *Hématologie*, 16 (n° spécial 2) : 16-20
- 98. Leone G., Pagano L., Ben-Yehuda D., et al.** (2007). Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Hematologica*, 92(10): 1389-98.
- 99. Felix C.A.** (1998). Secondary leukemia's induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1400(1-3): 233-55.
- 100. Bloomfield C.D., Archer K.J., Mrozek K., et al.** (2002). 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment-related myelodysplasia syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*, 33(4): 362-78.
- 101. Allan J.M., Smith A.G., Wheatley K., et al.** (2004). Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood*, 104(13): 3872- 7.
- 102. Larson R.A., Wang Y., Banerjee M., et al.** (1999). Prevalence of the inactivating 609C->T polymorphism in the NAD (P)Quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*, 94(2): 803-7.
- 103. Rowley JD, Golomb HM, Vardiman JW.** (1981). Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood*, 58 (4): 759-67.
- 104. Libura J., Slater D.J., Felix C.A., et al.** (2005). Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by étoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood*, 105(5): 2124-31.
- 105. Pui CH.** (1995). Childhood leukemia's. *N Engl J Med*, 332 (24): 1618-30.
- 106. Breems DA., Van Putten WL., Huijgens PC., et al.** (2005). Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*, 23 (9): 1969-78.
- 107. Buchner T., Berdel WE., Schoch C., et al.** (2006). Double induction containing either two courses or one course of highdose cytarabine plus mitoxantrone and postremission therapy by either autologous stem-cell transplantation or by prolonged maintenance for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 24 (16): 2480-9.
- 108. Buchner T., Hiddemann W., Schaefer UW., et al.** (1992). Combined effect of very early intensification and prolonged post-remission chemotherapy in patients with AML. *Leukemia*, 6 Suppl 4: 68-70.

Références bibliographiques

- 109. Lichtman MA.** (2007). Cigarette smoking, cytogenetic abnormalities, and acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 21 (6): 1137-40.
- 110. Moorman AV., Roman E., Cartwright RA., et al.** (2002). Smoking and the risk of acute myeloid leukemia in cytogenetic subgroups. *Br J Cancer*, 86 (1): 60-2.
- 111. Penel N., Vansteene D.** (2007). Cancers and pesticides : current data. *Bull Cancer*, 94 (1): 15-22.
- 112. Lafiura KM., Bielawski DM., Posecion NC., et al.** (2007). Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated t(8;21). *Pediatric Blood Cancer*, 49 (5): 624-8.
- 113. Van Maele-Fabry G., Duhayon S., Mertens C., et al.** (2008). Risk of leukemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Res*, 106 (1): 121-37.
- 114. Minder CE., Pfluger DH.** (2001). Leukemia, brain tumors, and exposure to extremely low frequency electromagnetic fields in Swiss railway employees. *Am J Epidemiology*, 153 (9): 825-35.
- 115. Boffetta P.** (2004). Risk of acute myeloid leukemia after exposure to diesel exhaust : a review of the epidemiologic evidence. *J Occup Environ Med*, 46 (10): 1076-83.
- 116. Borugian MJ., Spinelli JJ., Mezei G., et al.** (2005). Childhood leukemia and socioeconomic status in Canada. *Epidemiology*, 16 (4): 526-31.
- 117. Larsson SC., Wolk A.** (2008). Overweight and obesity and incidence of leukemia : a meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer*, 122 (6): 1418-21.
- 118. Sébahoun G.** leucémies aiguës. *Hématologie clinique et biologique ; 2ième édition ; 2006.*
- 119. Sébahoun G.** Leucémie aiguë myéloïde. *Hématologie clinique et biologique ; 2ième édition ; 157-166.*
- 120. Sainty D.** Leucémie aiguë lymphoïde. *Hématologie clinique et biologique; 2ième édition ; 2006 : 277-284.*
- 121. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.** Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451-8.
- 122. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al.** Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:460-2.
- 123. Dastugue N.** Place de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire dans l'étude des leucémies aiguës. *Pathologie Biologie. August. 2003;Volume 51, Issue 6Pages337-345.*
- 124. Kelly L.M., Gilliland D.** (2002). Genetics of myeloid leukemia's. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3, p.179-198.
- 125. Dash A., Gilliland D G.** (2001). Molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Best Practice & Research. Clinical Hematology*, 14(1), p.49-64.
- 126. Fröhling S et al.** (2005). Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenic and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*, 23(26), p.6285-6295.
- 127. Renneville A et al.** (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 22(5), p.915-931.
- 128. Thomas X., Elhamri M.** (2005). Farnesyl-transferase inhibitors: preliminary results in acute myeloid leukemia. *Bulletin Du Cancer*, 92(3), p.227-238.
- 129. Gilliland D., Griffin J.D.** (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5), p.1532-1542
- 130. Scholl S. et al.** (2009). Clinical implications of molecular genetic aberrations in acute myeloid leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(4), p.491-505.
- 131. Mrózek K., et al.** (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetic: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2), p.431-448.

Références bibliographiques

132. **Takahashi S.** (2011). Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 4, p.36.
133. **Sargin B., et al.** (2007). Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood*, 110(3), p.1004-1012.
134. **Döhner K., Döhner H.** (2008). Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 93(7), p.976-982.
135. **Licht J D.** (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*, 20(40), p.5660-5679.
136. **Martens J., Stunnenberg H.G.** (2010). The Molecular signature of onco-fusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Letters*, 584(12), p.2662-2669.
137. **Goyama S., Mulloy J.C.** (2011). Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects. *International Journal of Hematology*, 94(2), p.126-133.
138. **Krivtsov A V., Armstrong S A.** (2007). MLL translocations, histone modifications and leukemia stem-cell development. *Nature Reviews. Cancer*, 7(11), p.823-833.
139. **Ley T.J., et al.** (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 363(25), p.2424-2433.
140. **Döhner H., Gaidzik V.** (2011). Impact of genetic features on treatment decisions in AML. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2011, p.36-42.
141. **Delhommeau F., et al.** (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*, 360(22), p.2289-2301.
142. **Marcucci G., et al.** (2003). Phase one and pharmacodynamics studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*, 101(2), p.425-432.
143. **Boissel N., et al.** (2010) Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia : a study by the Acute Leukemia French Association group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(23), p 3717-3723.
144. **Paschka P., et al.** (2010). IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(22), p.3636-3643.
145. **Mrózek K., Bloomfield CD.** (2006). Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, p.169-177.
146. **Falini B., et al.** (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England Journal of Medicine*, 352(3), p.254-266.
147. **Falini B., et al.** (2011). Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood*, 117(4), p.1109-1120.
148. **Colombo E., Alcalay M., Pelicci P.G.** (2011). Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene*, 30(23), p.2595-2609.
149. **Chou WC.** (2011). Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comblike 1 (ASXL1) mutations. *Blood*, 116:4086-4094.
150. **Owen C., Fitzgibbon J., Paschka P.** (2010). The clinical relevance of Wilms Tumours 1 (WT1) gene mutations in acute leukemia. *Hematological Oncology*, 28(1), p.13-19.
151. **Lujambio A., Lowe SW.** (2012). The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385), p.347-355.
152. **Murray M Y., Rushworth SA., McEwan DJ.** (2012). Micro RNAs as a new therapeutic target towards leukemia signaling. *Cellular Signaling*, 24(2), p.363-368.
153. **Mrozek K, et al.** (2009). Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 16(2), p.64-69.

Références bibliographiques

- 154. Grimwade D., Walker H., Oliver F., et al.** The importance of diagnostic *cytogenetic in AML: Analysis of 1612 patients entered into the MRC AML*. *Blood*, 1998, 92, p3-232.
- 155. HARRIS N.L., JAFFE E.S., DIEBOLD J., et al.** World Health Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissue. Report of the clinical advisory committee meeting Airlie House, Virginia, *J Clin Oncol*, 1999, 17, 3835-49.
- 156.** *Revue Pathologie Biologie* (en ligne), 2003, 51, N6. Disponible sur: www.em-consulte.com/article/17087/place-de-la-cytogenetique-conventionnelle-et-moleculaire.
- 157. MARTINEZ-CLIMENT J.A., LANE N.J., RUBIN C.M., et al.,** "Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid Leukemia, 1995, 9, p95-101.
- 158. SCHOCH C., HAFERLACH T.** "Cytogenetics in acute myeloid leukaemia ". *Curr Oncol Rep*, 2002, 4, p7-390.
- 159. BERNARD P., DACHARY D., REIFFERS J., et al.,** *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 1989, 3 (10), p740- 745_
- 160. INGRAM L., RAIMONDI S.C., MIRRO J.R., et al.,** *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 1989, 3 (10), p695-698.
- 161. PEDERSEN B., JENSEN I.M** "Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 high resolution studied patients". *Leukemia*, 1991, 5(7), p73-566
- 162. JOHANSSON B., MERTENS F., HEIM S. et al.,** Cytogenetics of secondary myelodysplasia (SMDS) and acute leukemia. *European journal of haematology*, 1991, 47(1), p 17-27.
- 163. MITELMAN F.** Catalog of chromosome aberrations in cancer, 1988, N3.
- 164. Gale RE., Hills R., Kottaridis PD., et al.** (2005). No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood*, 106 (10): 3658-65.
- 165. Schnittger S., Schoch C., Kern W., et al.** (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106 (12): 3733-9.
- 166. Verhaak RG., Goudswaard CS., van Putten W., et al.** (2005). Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*, 106 (12): 3747- 54.
- 167. Zhou-Cun A, Yuan Y, Si-Zhong Z, Na L, Wei Z.** Single nucleotide polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene might be a genetic risk factor for infertility for Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. *Asian J Androl.* 2007; 9: 57-62.
- 168. Castro R, Rivera I , Ravasco P , Camilo M , Jakobs C , Blom H and Almeida IT.** 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677CRT and 1298ARC mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet.* 2004 ; 41: 454-458.
- 169. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R.** Gene structure of human and mouse MTHFR Mammalian Genome 1998;9: 652-6.
- 170. Mechri A.** 2008. « Étude de la mutation C677T de la MTHFR dans les accidents thromboemboliques veineux ». Thèse de magistère en Génétique moléculaire. Université Mentouri Constantine, Algérie. 87p.
- 171. Daniel Leclerc, Rima Rozen.** Génétique moléculaire de MTHFR : Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *MEDECINE/SCIENCES* 2007 ; 23 : 297-30.
- 172. Benlatreche Moufida.** 2008. « Étude de la relation entre le polymorphisme de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), et la survenue des complications dégénératives chez le diabétique de type 2 (DNID) dans la commune de Constantine ». Thèse de magistère en Génétique des pathologies humaines . Université Mentouri Constantine, Algérie. 118p.

Références bibliographiques

173. Selhub, J. (1999). "Homocysteine metabolism." *Annu Rev Nutr* 19: 217-46), (Martin, Y. N., O. E. Salavaggione, et al. (2006). "Human methylene tetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics." *Pharmacogenet Genomics* 16(4): 265-77.
174. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995;10: 111-3.
175. Sohn, K. J., R. Croxford, et al. (2004). "Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate." *J Natl Cancer Inst* 96(2): 134-44.
176. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr*. 1999;129(5): 919-22.
177. Czene et al., 2002. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer*. 2002 May 10;99(2):260-6.
178. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (200) Ionizing radiation. Part I: X- and Gamma Radiation, and Neutrons. Vol. 75 pp1-491.
179. Ross JA, Spector LG, Robison LL, Olshan AF (2005) Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 44 (1): 8-12
180. Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, Leverger G, Sommelet D, Vilmer E, Hemon D, Clavel J (2004a) Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occup Environ Med* 61 (9): 773-8
181. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY (2005) Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: Appraising the evidence. *Cancer Investigation* 23 (1): 60-75
182. Wiemels J (2012) Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-Biological Interactions* 196 (3): 59-67
183. Kruglyak L, Nickerson DA (2001) Variation is the spice of life. *Nature Genet* 27 (3): 234-236
184. Dorak MT, Owen G, Galbraith I, Henderson N, Webb D, Mills KI, Darke C, Burnett AK (1995) Nature of HLA-associated predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9 (5): 875-8
185. Vijayakrishnan J, Houlston RS (2010a) Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 95 (8): 1405-14
186. Leclerc A., Menvielle G., Chastang J.-F., Luce D., 2006, « Socioeconomic inequalities in premature mortality in France : Have they widened in recent decades? », *Social Science and Medicine*, 62 : 2035-2045.
187. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10 (1): 111-3
188. Bagley PJ, Selhub J (1998) A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22): 13217-13220
189. Sinnott D, N'Diaye N, Labuda D, Krajcinovic M (2006) [Genetic determinants of childhood leukemia]. *Bull Cancer* 93 (9): 857-65

Références bibliographiques

190. Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Trijbels FJM, vanLithZanders HMA, vandenHeuvel L, Blom HJ (1997) A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene. *Biochemical and Molecular Medicine* **62** (1): 23-25
191. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* **93** (1): 7-9
192. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R (2001) The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* **156** (2): 409-15
193. You W, Li Z, Jing C, Qian-Wei X, Yu-Ping Z, et al. (2013) MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms Were Associated with Bladder Cancer Risk and Disease Progression: A Meta-Analysis. *DNA Cell Biol* **32**: 260-7.
194. Teng Z, Wang L, Cai S, Yu P, Wang J, et al. (2013) The 677C.T (rs1801133) polymorphism in the MTHFR gene contributes to colorectal cancer risk: a meta-analysis based on 71 research studies. *PLoS One* **8**: e55332.
195. Ding XP, Feng L, Ma L (2012) MTHFR C677T polymorphism and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**: 3937-42.
196. Niu YM, Shen M, Li H, Ni XB, Zhou J, et al. (2012) No association between MTHFR A1298C gene polymorphism and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 9,952 subjects. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**: 3943-7.
197. Halsted CH (1995) Alcohol and folate intereactions: clinical implications. In: Bailey LB, ed. *Folate in health and disease*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc, 313-27.
198. Rozen R (1997) Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: Deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thrombosis and Haemostasis* **78** (1): 523-526
199. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J (2002) A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (8): 5606-5611
200. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (7): 3290-3295
201. Kim YI (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev* **58** (7): 205-9
202. Leclerc D, Rozen R. Génétique moléculaire de MTHFR. Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Med & Sci*. 2007; 3 (23) : 297-302

Webographie

[1i] <http://www.dondusang.net/rewrite/article/2377/le-sang/les-composants-du-sang/globules-rouges,-plaquettes,-plasma...-quel-role-jouent-ils-dans-l-organisme.htm?idRubrique=951>

Consulté le : 11/03/2015

[2i] <http://bio.m2osw.com/gcartable/hematies.htm>

Consulté le 11/03/2015

[3i] <http://hematocell.univ-angers.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/leucocytes-et-leur-pathologie/95-basophiles-et-mastocytes>

Consulté le : 21/03/2015

[4i] <http://scallion.free.fr/IFSI/S1/2.2%20-%20Cycles%20de%20la%20vie%20et%20grandes%20fonctions/UE%202.2%20-%20Le%20sang.pdf>

Consulté le : 21/03/2015

[5i] <http://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9matopo%C3%AF%C3%A8se>

Consulté le : 25/03/2015

[6i] <http://fmdm.voila.net/1ere/resources1/hematopoiese.pdf>

Consulté le : 25/03/2015

Annexes I

Tableau 1 : Caractéristique des éléments figurés du sang.
 [Elaine N et al., (2010). Anatomie et physiologie humaines - 3e Éd. (p.675)].

Cellule	Illustration	Description*	Nombre de cellules par litre de sang	Durée du développement (D) et de la vie (V)	Fonction
Érythrocytes (globules rouges)		Disques biconcaves, anucléés; couleur saumon; de 7 à 8 µm de diamètre	De $4 \text{ à } 6 \times 10^{12}$	D: de 5 à 7 jours V: de 100 à 120 jours	Transport de l'oxygène et du gaz carbonique
Leucocytes (globules blancs)		Cellules sphériques nucléées	De $4,8 \text{ à } 10,8 \times 10^9$		
<i>Granulocytes</i>					
▪ Granulocytes neutrophiles		Noyau plurilobé; granulations cytoplasmiques difficilement visibles; de 10 à 12 µm de diamètre	De $3 \text{ à } 7 \times 10^9$	D: de 6 à 9 jours V: de 6 h à quelques jours	Phagocytose des bactéries
▪ Granulocytes éosinophiles		Noyau bilobé; granulations cytoplasmiques rouges difficilement visibles; de 10 à 14 µm de diamètre	De $0,1 \text{ à } 0,4 \times 10^9$	D: de 6 à 9 jours V: de 8 à 12 jours	Destruction des vers parasites et des complexes antigène-anticorps; inactivation de certaines substances chimiques allergènes associées à la réaction inflammatoire
▪ Granulocytes basophiles		Noyau lobé; grosses granulations cytoplasmiques bleu violet; de 8 à 10 µm de diamètre	De $0,02 \text{ à } 0,05 \times 10^9$	D: de 3 à 7 jours V: ? (de quelques heures à quelques jours)	Libération de l'histamine et d'autres médiateurs chimiques associés à la réaction inflammatoire; contient de l'héparine, un anticoagulant
<i>Agranulocytes</i>					
▪ Lymphocytes		Noyau sphérique ou échancré; cytoplasme violacé; de 5 à 17 µm de diamètre	De $1,5 \text{ à } 3,0 \times 10^9$	D: de quelques jours à quelques semaines V: de quelques heures à quelques années	Défense de l'organisme par l'attaque directe de cellules ou par l'entremise d'anticorps
▪ Monocytes		Noyau en forme de U ou de haricot; cytoplasme gris bleu; de 14 à 24 µm de diamètre	De $0,1 \text{ à } 0,7 \times 10^9$	D: de 2 à 3 jours V: plusieurs mois	Phagocytose; transformation en macrophagocytes dans les tissus
Plaquettes		Fragments cytoplasmiques discoïdes contenant des granulations violettes; de 2 à 4 µm de diamètre	De $150 \text{ à } 400 \times 10^9$	D: de 4 à 5 jours V: de 5 à 10 jours	Réparation des petites déchirures des vaisseaux sanguins; coagulation

Annexes II

Tableau 1 : La classification FAB des LAM.

[*Bennet JM et al., (1976): Proposals for the classification of acute leukemia: French-American-British (FAB) cooperative group. British Journal of Hematology, 33: 451*], [*Bennet JM et al., (1981): The morphological classification on acute leukemia: concordance among observers and clinical correlation. British Journal of Hematology, 47: 559*], [*Bennet JM et al., (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Annals of Internal Medicine 103 (4): 626-629*].

Sous-type	Caractéristiques
LAM 0	Les blastes ne sont pas classables sur les seuls critères morphologiques et la MPO est négative. Seul, le phénotype permet de classer les blastes dans cette catégorie en montrant, en l'absence de marqueurs lymphoïdes, la présence de marqueurs myéloïdes.
LAM 1	Blastose médullaire de type myéloblastique avec moins de 10 % de la maturation granuleuse.
LAM 2	Blastose médullaire de type myéloblastique avec plus de 10 % de maturation granuleuse présentant ou non des signes de dysgranulopoïèse.
LAM 3 (Promyélocytaire)	Leucémie aiguë. <ul style="list-style-type: none"> • Forme classique : Les blastes sont de taille variable avec un noyau réniforme. Le cytoplasme est basophile et comporte soit de nombreuses granulations azurophiles, soit de volumineuses granulations foncées soit de nombreux corps d'Auer en fagots. • Forme variante : Les blastes sont peu ou agranulaires à noyau en bissac ; quelques blastes à corps d'Auer ou à grosses granulations sont présents en nombre variable.
LAM 4	Elle se définit par la présence conjointe de blastes appartenant à la lignée granuleuse et à la lignée monocytaire (supérieur à 20 % de blastes). Il existe comme dans la LAM2 une maturation granuleuse de plus de 10 % de morphologie normale ou dysplasique. LAM4éosino : se caractérise par une maturation granuleuse constituée par des éosinophiles anormaux ; elle est corrélée à l'existence d'une anomalie cytogénétique caractéristique.
LAM 5	Plus de 90 % des blastes appartiennent à la lignée monocytaire. Ce sont soit des éléments peu différenciés dans LAM5a (monoblastes) soit des éléments plus différenciés dans le LAM5b (promonocytes, monocytes).
LAM 6 (Érythroleucémie)	Elle se définit par une hyperplasie érythroblastique dépassant 50 % et la présence d'au moins 30 % de blastes myéloïdes parmi les cellules granuleuses.
LAM 7	La moelle est souvent hypocellulaire avec des signes de myélofibrose. Les blastes sont parfois identifiables par leur morphologie rappelant la lignée mégacaryocytaire mais souvent, ils présentent un aspect indifférencié ou lymphoïde. Le phénotype est indispensable pour affirmer cette catégorie.

Annexes III

Tableau 1 : Classification OMS des LAM (2001).
 [Ferrant A ., hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004].

Type	Sous-type
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	LAM avec t (8;21)(q22;q22)
	LAM avec t(15;17) (q22;q12) et ses variants.
	LAM avec éosinophiles médullaires anormaux et anomalies sur le chromosome 16 : inv (16) (p13q22) ou t (16;16) (p13;q22)
	LAM avec anomalie chromosomique 11q23
LAM avec dysplasie multi-lignées	Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique
	Sans antécédent de myélodysplasie
LAM post chimiothérapie	Liée aux agents alkylants
	Liée aux inhibiteurs de topoisomérase type II (quelques-unes pouvant être lymphoïdes)
	Liées à d'autres composants
LAM sans catégorisation particulière	LAM avec différenciation minime
	LAM sans maturation
	LAM avec maturation
	LA myélo-monocytaire
	LA monoblastique ou monocytaire
	LA érythroïde
	LA mégacaryo-blastique
	LAM à composante basophile
	LA avec myélofibrose
Sarcome granulocytaire	

Tableau 2 : Classification OMS des LAM (Révisé en 2008).

[Weinberg O et al., Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. Blood, 2009. 113(9): p. 1906-8].

Type	Sous-type
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	LAM avec t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t((16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i>
	leucémie aiguë promyélocytaire avec t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i>
	LAM avec t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
	LAM avec t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i>
	LAM (megacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
	LAM avec mutation <i>NPM1</i> *
	LAM avec mutation <i>CEBPα</i> *
LAM avec caractéristiques myélodysplasiques	
Hémopathies myéloïdes induites par une thérapeutique	
LAM sans spécification	LAM avec différenciation minimale (LAM0)
	LAM sans maturation (LAM1)
	LAM avec maturation (LAM2)
	Leucémie aiguë myélo-monocytaire (LAM4)
	Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire (LAM5a et 5b)
	Leucémie aiguë érythroblastique (LAM6)
	Leucémie érythroblastique pure (LAM6a)
	Erythroleucémie, érythroïde/myéloïde (LAM6b)
	Leucémie aiguë mégacaryo-blastique
	Leucémie aiguë à basophiles
	Panmyélose aiguë avec myélofibrose
Sarcome granulocytaire	
Myélo-proliférations des trisomies 21 constitutionnelles	Myélopoïèse transitoirement anormale
	LAM associée aux trisomies 21 constitutionnelles
Leucémie aiguë à cellules dendritiques plasmocytoïdes	

* Entités provisoires.

Annexe IV

Composition des solutions tampons utilisées pour l'extraction d'ADN.

1- Réparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN.

TE 20:5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) auto clavé :

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1 N

Tampon de lyse :

- NaCl 400 mM
- EDTA 2 mM
- Tris 10 mM
- pH 8,2

2- Préparation du TBE 10X et 1X.

TBE 10X :

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H₂O pour 1L

TBE 1X :

- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml H₂O

Annexe V

Digestion de l'amplicon de l'exon 4 de la *MTHFR* à la recherche de la mutation C677T.

Tableau 1 : Composition du mélange de la digestion.

Mix	Vol (µl)/tube de digestion
Produit de PCR	30
H ₂ O	4
Tampon Enzyme 10X	5
Enzyme de restriction <i>Hinf</i> I	1
BSA	0,2

Tableau 2 : Génotypage de la *MTHFR*.

<i>MTHFR</i>	Génotype	Longueur du fragment en pb
Homozygote sauvage	CC	198
Homozygote muté	TT	175
Hétérozygote	CT	198 +175

Étude moléculaire des Leucémies Aigues Myéloïdes (LAM) (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*)

Les LAM correspondent à un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisé par la prolifération anormale et excessive de cellules hématopoïétiques immatures dites (blastes), localisées dans la moelle osseuse et le sang. Les techniques de cytogénétique (conventionnelle et moléculaire) et de biologie moléculaire occupent aujourd'hui une place croissante dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de ces hémopathies complexes. Leur étiologie demeure en grande partie inconnue (entre facteurs de risque établis et suspectés).

L'étude des mécanismes moléculaires de la leucémogénèse qui s'est focalisée en premier lieu sur l'effet d'altérations de proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, s'intéresse, de plus en plus, à l'impact de polymorphismes génétiques dans la survenue de ces hémopathies. L'un de ces gènes dont l'implication a été prouvée ou suggérée dans la survenue de diverses pathologies cancéreuses est celui de la *MTHFR*, qui code pour une enzyme clé du métabolisme des folates, impliquée dans la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN.

Dans ce sens, nous avons entrepris une prospection de l'association entre le polymorphisme C677T de la *MTHFR* et la survenue de LAM.

Après une recherche bibliographique bien documentée sur l'aspect biologique des LAM avec une synthèse exhaustive sur l'épidémiologie, l'étiologie et la génétique de ces pathologies complexes (gènes impliqués et altérations géniques rencontrées) nous avons essayé d'explorer, par une méta-analyse et une étude cas-témoins, l'impact de ce polymorphisme sur l'incidence des LAM.

Les résultats de notre méta-analyse et étude cas-témoins suggère que le polymorphisme étudié ne constitue pas un facteur de risque dans l'occurrence des LAM. Cependant, et vue la taille réduite de nos deux cohortes (patients et témoins) et des conclusions contradictoires rapportées par la bibliographie, nos résultats ne peuvent confirmer ni infirmer l'existence de cette association.

Il serait donc intéressant dans l'avenir, de poursuivre l'étude de l'influence du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans l'étiologie des LAM en utilisant un échantillon de taille suffisante et en tenant compte de l'origine ethnique, le statut du métabolisme des folates en interaction avec des facteurs environnementaux. Cela peut être objectivé par des études d'interactions (gène-gène, gène-nutriments et gène-environnement).

Mots clés : LAM, *MTHFR*, biologie moléculaire.

Molecular study of Acute Myeloid Leukemia (AML) (C677T polymorphism of *MTHFR*)

The AML corresponds to a group of malicious heterogeneous hemopathy which is characterized by abnormal proliferation and excessive hematopoietic progenitor cells (blasts), localized in bone marrow and blood. Cytogenetic (conventional and molecular) take today is growing up in diagnostic and therapeutic management of this complex hemopathy. This etiology stays largely unknown, (between established risk factors and the suspected ones).

The study of the molecular mechanism of leukemogenesis which has focused on the effect of alteration of proto-oncogene and tumor suppressor gene, is interested, more and more, about the impact of the genetic polymorphism in the onset of hemopathy one of those gene where the implication had been proved or suggested in the onset of several cancerous pathologies, that is *MTHFR*, which encode for key enzymes of folates metabolism. In this way, we have undertaken the prospection of the association between polymorphism C677T of *MTHFR* and the onset of AML.

After bibliographical research well documented in biological aspects of AML with comprehensive synthesis about epidemiology, etiology, genetics of these complex diseases (Implicated genes and encountered gene alterations), we tried to explore, by a meta-analysis and case-control study, the impact of this polymorphism in incidence of the AML.

The result of our meta-analysis and case-control study suggests that the polymorphism studied, doesn't constitute of the risk factor in occurrence of the AML. Meanwhile, since our wasp waist of our two cohorts (patient and witness) and the contradictory conclusions reported by the bibliography, our results could not provide the confirmation or none of the existence of this association.

I will be interesting in the future, to pursue the study about the influence of polymorphism C677T of *MTHFR* in the etiology of the AML by using a sample in sufficient size with the consideration of ethnic origin of the metabolism statue of folates in the interaction of with environmental factors. This can be objectified by studies of interactions (gene-gene, nutriment-gene and environment-gene).

Key words: AML, *MTHFR*, molecular biology.

دراسة جزيئية لابيضااض الدم الحاد تعدد أشكال *MTHFR* (C677T)

إنّ سرطان الدّم النخاعي الحاد يتوافق مع مجموعة غير متجانسة من الأورام الدموية الخبيثة التي تتميز بتكاثر غير عادي و مفرط لخلايا دموية غير ناضجة تسمى بـ "البلاست"، و المتواجدة في النخاع العظمي و الدم. إنّ تقنيات الوراثة الخلوية (التقليدية و الجزيئية) و البيولوجيا الجزيئية تحتلّ في الوقت الراهن مرتبة أكثر تقدّمًا في تشخيص و علاج هذه الأمراض الدموية المعقّدة. و لا تزال أسباب حدوثها مجهولة إلى حدّ بعيد (بين عوامل الخطر الثابتة و المشبوهة).

إنّ دراسة الآليات الجزيئية لسرطان الدم التي تركزت في البداية حول تأثير تعديلات الجينات المسرطنة البدائية و الجينات الكابتة للأورام تتجه لدراسة تعدد المورفيزات الجينية المرتبطة بظهور أمراض الدم الورمية. إحدى هذه الجينات (*MTHFR*) مرشحة بشكل كبير في ظهور هذه الأمراض و التباين في استجابة الفرد للعلاج باعتبارها تتدخل في عديد الوظائف المتعلقة بتلييف الحمض النووي أليبي المنقوص الأكسجين (ADN) ترميمه و اضافة مجموعة المثل.

بهذا الصدد أجرينا بحثًا تقنيًا بغية استكشاف علاقة متعدد المورفيزات C7T67 للمورثة *MTHFR* في حدوث اللوكيميا النخاعية الحادة.

بعد بحوث بيبلوغرافية جد موثقة حول المظهر البيولوجي *MTHFR* مع ملخص شامل لوبائيات، و مسببات و جينات هذه الأمراض المعقّدة (الجينات المتورطة و التغييرات الجينية الملحوظة)، و دراسة تحليلية عرضية نوع شاهد – حالة لتنميط الجينة *MTHFR*، حاولنا استطلاع تأثير هذا التعدد في الأشكال على حدوث سرطان الدم النخاعي الحاد.

في دراستنا لم نتوصل إلى نتيجة ذات دلالة تثبت العلاقة بين متعدد المورفيزات C677T للمورثة *MTHFR* و ظهور اللوكيميا النخاعية الحادة. لكن، و بالنظر إلى الحجم الصغير لمجموعتنا (المرضى و الشهود) و كذا الحصائل المتناقضة التي وجدناها بالبيبلوغرافية، لا يمكن لنتائجنا أن تؤكّد أو تنفي وجود هذا الارتباط.

إنّه سيكون من المهمّ في المستقبل مواصلة دراسة تأثير متعدد المورفيزات C677T للمورثة *MTHFR* في حدوث اللوكيميا النخاعية الحادة. و هذا باستعمال عينّة ذات حجم كافي مع الأخذ بعين الاعتبار الأصل العرقي و حالة استقلاب حمض الفوليك بتفاعله مع العوامل البيئية. و يمكن لهذا أن يكون موضوعًا عن طريق دراسة التفاعلات (الجينات مع الجينات، و الجينات مع المغذيات، و الجينات مع البيئة).

كلمات البحث: ابيضااض الدم الحاد، *MTHFR*، البيولوجيا الجزيئية.

ÉTUDE MOLÉCULAIRE DES LEUCÉMIES AIGUES MYÉLOÏDES (LAM) (POLY MORPHISME C677T DE LA *MTHFR*)

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

Les LAM correspondent à un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisé par la prolifération anormale et excessive de cellules hématopoïétiques immatures dites (blastes), localisées dans la moelle osseuse et le sang. Les techniques de cytogénétique (conventionnelle et moléculaire) et de biologie moléculaire occupent aujourd'hui une place croissante dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de ces hémopathies complexes. Leur étiologie demeure en grande partie inconnue (entre facteurs de risque établis et suspectés).

L'étude des mécanismes moléculaires de la leucémogénèse qui s'est focalisée en premier lieu sur l'effet d'altérations de proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, s'intéresse, de plus en plus, à l'impact de polymorphismes génétiques dans la survenue de ces hémopathies. L'un de ces gènes dont l'implication a été prouvée ou suggérée dans la survenue de diverses pathologies cancéreuses est celui de la *MTHFR*, qui code pour une enzyme clé du métabolisme des folates, impliquée dans la synthèse, la réparation et la méthylation de l'ADN.

Dans ce sens, nous avons entrepris une prospection de l'association entre le polymorphisme C677T de la *MTHFR* et la survenue de LAM.

Après une recherche bibliographique bien documentée sur l'aspect biologique des LAM avec une synthèse exhaustive sur l'épidémiologie, l'étiologie et la génétique de ces pathologies complexes (gènes impliqués et altérations géniques rencontrées) nous avons essayé d'explorer, par une méta-analyse et une étude cas-témoins, l'impact de ce polymorphisme sur l'incidence des LAM.

Les résultats de notre méta-analyse et étude cas-témoins suggère que le polymorphisme étudié ne constitue pas un facteur de risque dans l'occurrence des LAM. Cependant, et vue la taille réduite de nos deux cohortes (patients et témoins) et des conclusions contradictoires rapportées par la bibliographie, nos résultats ne peuvent confirmer ni infirmer l'existence de cette association.

Il serait donc intéressant dans l'avenir, de poursuivre l'étude de l'influence du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans l'étiologie des LAM en utilisant un échantillon de taille suffisante et en tenant compte de l'origine ethnique, le statut du métabolisme des folates en interaction avec des facteurs environnementaux. Cela peut être objectivé par des études d'interactions (gène-gène, gène-nutriments et gène-environnement).

Mots clés : LAM, *MTHFR*, biologie moléculaire.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie génétique du CHUC.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Satta Dalila (Professeur - UFM Constantine),
Rapporteur : Rezgoune Mohamed Larbi (MA.A - UFM Constantine),
Examineur : Benlatreche Moufida (MA.A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 29/06/2015