

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER en sciences biologiques

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème :

**Intérêt de l'étude de la mutation JAK2-V617F et du gène
de fusion BCR-ABL dans le diagnostic biologique des
malades atteints d'un Syndrome Myéloprolifératif
Chronique.**

Présenté par : Melle IKHLEF Hafsa
Melle REBIAI Nessrine

Devant le jury:

Mr. MOKRAN K.	MCB	USDB1	Président
Mme KESKASS.	MCA	USDB1	Examinatrice
Mme ABDUL HOSSAIN A.S.	MCA	USDB1	Promotrice
Mme HAMEL H.	MAA	CACB	Co-promotrice

2021/2022

Remerciements

C'est avec beaucoup d'efforts et de sacrifices que ce travail de recherche tend aujourd'hui à sa fin et en ce moment précis, nous tenons à nous attarder à juste raison pour exprimer nos remerciements à tous ceux qui nous ont aidés à le mener à terme.

Nos reconnaissances, notre haute considération et notre profond respect à notre encadreur, **Mme Abdul hossain .A** qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience. et pour son partage de son savoir au cours de notre parcours et de nous avoir inspiré par sa passion envers la science ainsi que de nous avoir poussé à travailler très dur. Nous vous remercions pour vos conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous remercions notre co-promotrice **Dr. Hamel. H** pour toute l'aide qu'elle nous a apportée. Nous étions très touchés pour votre modestie, votre patience et votre générosité. Nous vous remercions infiniment pour tout le temps que vous avez consacré pour nous. Le partage de vos connaissances et votre expérience scientifique en toute circonstance nous ont permis de bien avancer et d'être optimistes. Vous nous avez inspiré.

Nos remerciements s'adressent aussi à Mr **MOKRAN Kheir** d'avoir accepté de présider ce jury.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Mme **KESKAS. R** nous sommes honorées et nous vous remercions d'avoir accepté de faire partie du jury.

Nous tenons à remercier profondément **Pr. BOUCHDOUB .Y** professeur en immunologie, le chef service de laboratoire centrale de l'EHS LCC, Hôpital Frantz Fanon Blida, La réalisation de ce travail n'aurait pas vu le jour sans votre acceptation dans votre laboratoire Merci beaucoup. Nous vous sommes très reconnaissantes.

Et nous tenons à remercier toutes les personnes de laboratoire de CAC y compris **Mme BAHRIA Bouchra** et **Mme HAMMA Rime** pour leurs aides, leurs explications et leurs patiences.

C'est avec une grande marque d'estime que nous tenons à remercier le chef d'option de Biologie Moléculaire **Mme SAADIL** pour son partage de son savoir au cours de notre parcours ; nous vous remercions d'avoir été très compréhensive, merci beaucoup pour votre disponibilité, ainsi que vos conseils judicieux,

C'est avec une grande marque d'estime que nous tenons à remercier le chef de département de Biologie **Mme BOUJEMA.N.**

Nous exprimons en premier lieu nos sincères remerciements à Mr **MIGATLI. S** le doyen de notre faculté.

A la fin, nous aimerions remercier toute personne et professeurs de notre université qui ont contribué à notre instruction ainsi que celle de milliers d'étudiants. De nous avoir poussés, nous faire rêver à regarder plus haut.

Dédicace

La louange est à **Allah**, celui qui glorifie ce qui dans les cieux et dans la terre, c'est Allah, le pur le puissant le sage et qui la prière et le salut de mon seigneur soient sur son prophète.

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour.

A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour incessible. À la mère des sentiments fragiles qui m'a bénie par ces prières. **Ma mère Yamina**

A ma très chère sœur **Rofaida** et mon cher frère **Hammam**

A mon père **Ibrahim**

A ma chère grand-mère Fatima El Zahra DJELAL

A mes chères oncles **Adel; Omar; Madjid; Hammza; Mohamed; Ahmed**

A toute ma famille maternelle **Belhanniche** et ma famille paternelle.

Puisse dieu vous donner santé bonheur courage et surtout réussite

A mes très chères amis **BOUBKER Zineb, Fella, Khaoula, Amira, Sara, Ibtiseme, Rayane** et **Warda** Je vous remercie pour votre amitié.

A mon adorable amie et modèle la Doctorante **KADER Inès**, je te remercie pour ton amitié chère à mon coeur, et je te souhaite tout le bonheur du monde.

A mon binôme et ma chère collègue de parcours **Nessrine**, je te souhaite une vie pleine de réussite, de santé et de bonheur

Merci à toute **la promotion master BMC 2021 /2022**. Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées ; vous êtes pour moi des frères, soeurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A tous les amis qui j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements

A tous ceux et celles qui m'ont aidé et encouragé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, par leur patience, leurs compétences et leurs interventions adéquates aux plans technique et moral. Il me serait difficile de les citer tous. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma reconnaissance.

Hafsa

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents **Mohamed** et **Fatiha** qui ont comblé ma vie de tendresse, d'affection et de compréhension, à ceux qui se sont sacrifiés pour mon bonheur et ma réussite, qui m'ont épaulée et encouragée durant ces dernières années. Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard afin que je puisse poursuivre mes études dans les meilleures conditions qui soient. Que Dieu leur procure santé, bonheur et longue vie Je vous aime.

Mes adorables sœurs **Nour El houda** et **Chaima**, A mon frère **Ameur**.

Toutes les familles **REBIAI** et **BAHLOULI**.

A ma chère amie **Inès KADER**, merci pour ton aide précieuse et ta générosité.

A ma très chère binôme **Hafsa**, merci pour ton sérieux et ta patience pour réaliser ce travail ensemble. Je te souhaite que le bonheur et la réussite dans ta vie.

Merci à toute **la promotion master BMC 2021 /2022**.et plus spécialement à **Farah, Lydia, Nessrine, kaouther, Meryem** et **Yasmine**.

Tous mes amis en particulier, **Akila SAHI**. Tous ceux qui me connaissent et à tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce projet.

Je dédie ce modeste travail à toutes ceux et celles que j'aime de près ou de loin.

Nessrine

Résumé

Les SMP sont définies comme des hémopathies malignes, de faible incidence, résultant de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) myéloïde par un événement moléculaire, lequel procure un avantage prolifératif au clone.

Ce groupe du syndrome comporte : LMC, PV, TE, MFP.

Ce travail est pour l'objectif de connaître l'intérêt de biologie moléculaire (RT-Q-PCR) dans le diagnostic biologique et suivi des malades atteints d'un syndrome Méyloprolifératifs chronique.

Nous avons effectué une étude prospective portant 14 patients atteints de SMP (10 patients diagnostiqués avec une LMC et 4 patients suspecte d'une PV) aux niveaux de laboratoire central de l'EHS LCC Blida ;

En utilisant des techniques de biologie moléculaire pour détecter les transcrits BCR-ABL et la mutation JAK2V617F, et pour déterminer l'efficacité de traitement ;

Dans les 10(100%) patients atteints de LMC sont diagnostiqué en phase chronique, nous avons un prédominance féminine de sex-ratio de 0,6, 6(60%) femmes et 4(40%) hommes ;et pour les autres 4(100%) patients suspectes d'une PV, nous avons 2(50%) femmes et 2(50%) hommes, avec sex-ratio de 1.

Nous avons détectée un taux élevé de transcrit M-bcr-abl que le M-mbcr-abl et nous n'avons pas trouvés le µbcr-abl chez nos patients.

Et une mutation JAK2V617F chez 2(50%) patients de population suspecte d'une PV.

Cliniquement, la splénomégalie était les principaux symptômes chez nous patients atteints de LMC. Et l'érythrose, la thrombose étaient les principaux signes présent chez nous patients atteints de PV. Biologiquement, l'hémogramme et le frottis sanguin permettent la détermination de taux des GR, GB, PLQ et HB.et le taux des blastes sanguins et la myélémie ;

En conclusion, la PCR en Temps Réel est la technique plus fiable et efficace pour le diagnostic et le suivi des patients attient des SMP.

Mots clés : SMP, PV, TE, MFP, LMC, JAK2V617F, BCR-ABL, RT-Q-PCR

الملخص

يتم تعريف SMP على أنه أمراض دموية خبيثة منخفضة الحدوث ناتجة عن تحول الخلية الجذعية المكونة للدم النخاعية (HSC) عن طريق حدث جزيئي، مما يوفر فائدة تكاثيرية للاستنساخ.

تشمل هذه المجموعة من المتلازمة: CML، PV، TE، MFP.

يهدف هذا العمل إلى معرفة اهتمام علم الأحياء الجزيئي (RT-Q-PCR) بالتشخيص البيولوجي ومتابعة المرضى الذين يعانون من متلازمة Myeloproliferatifs المزمنة.

أجرينا دراسة مستقبلية مع 14 مريضاً من SMP (10 مرضى تم تشخيص إصابتهم بـ CML و 4 مرضى يشتبه في إصابتهم بـ PV) على مستويات المختبر المركزية لـ EHS LCC Blida؛

استخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية للكشف عن محاضر BCR-ABL والطفرات JAK2V617F، ولتحديد فعالية المعالجة؛

في 10 (100%) مرضى مصابين بـ CML يتم تشخيصهم في مرحلة مزمنة، لدينا نسبة الإناث إلى الجنس هي 0,6، 6 (60%) نساء و 4 (40%) رجال؛ وبالنسبة للمرضى الأربعة الآخرين (100%) المشتبه في إصابتهم بالأمراض الكهروضوئية، لدينا 2 (50%) امرأة و 2 (50%) رجل، بنسبة جنس 1.

اكتشفنا معدل مرتفع من نسخ Mbc-abl من M-mbc-abl ولم نعثّر على bcr-abl في مرضانا.

وظفرة JAK2V617F في 2 (50%) من المرضى المشتبه في إصابتهم بالأمراض الكهروضوئية.

سريرياً، كان التضخم الطحالي هو الأعراض الرئيسية لمرضى CML لدينا. وداء الحمر، التخثر كان العلامات الرئيسية في مرضى الكهروضوئية لدينا. من الناحية البيولوجية، يسمح عدد الدم ومسحة الدم بتحديد مستويات GR و GB و PLQ و HB. ومستويات انفجارات الدم ونخاع الدم؛

في الختام، PCR في الوقت الفعلي هو الأسلوب الأكثر موثوقية وفعالية لتشخيص ومراقبة المرضى SMP.

الكلمات الرئيسية (كلمات مفتاحية): SMP، PV، TE، MFP، LMC، JAK2V617F، BCR-ABL، RT-Q-PCR

Abstract

SMP is defined as low-incidence malignant hematologic resulting from the transformation of a myeloid hematopoietic stem cell (HSC) by a molecular event, which provides a proliferative benefit to the clone.

This group of syndrome includes: CML, PV, TE, and MFP.

This work is for the objective of knowing the interest of molecular biology (RT-Q-PCR) in the biological diagnosis and follow-up of patients with chronic Myloprolifiratifs syndrome.

We conducted a prospective study with 14 SMP patients (10 patients diagnosed with CML and 4 patients suspected of PV) at the central laboratory levels of the EHS LCC Blida;

Using molecular biology techniques to detect BCR-ABL transcripts and JAK2V617F mutation, and to determine treatment effectiveness;

In the 10(100%) patients with CML are diagnosed in chronic phase, we have a female sex-ratio predominance of 0.6 , 6(60%) women and 4(40%) men; and for the other 4(100%) patients suspected of PV, we have 2(50%) women and 2(50%) men, with sex ratio of 1.

We detected a high rate of M_{bcr}-abl transcript than M-m_{bcr}-abl and we did not find μ_{bcr}-abl in our patients.

And a JAK2V617F mutation in 2(50%) population patients suspected of PV.

Clinically, splenomegaly was the main symptoms in our CML patients. And erythrosis, thrombosis were the main signs in our PV patients. Biologically, the blood count and the blood smear allow the determination of the levels of GR, GB, PLQ and HB; and the levels of blood blasts and myelemlia.

In conclusion, Real-Time PCR is the most reliable and effective technique for diagnosing and monitoring patients attaint SMP.

Keywords: SMP, PV, TE, MFP, LMC, JAK2V617F, BCR-ABL, RT-Q-PCR

Sommaire

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Rappel sur l'hématopoïèse

- 1.1 Définition 01 **Error! Bookmark not defined.**
1.2 Régulation de l'hématopoïèse 02 **Error! Bookmark not defined.**

Chapitre II : Les Syndromes Myéloprolifératifs

- 1 Les syndromes myéloprolifératifs 07 **Error! Bookmark not defined.**
- 1.1 Définition 07 **Error! Bookmark not defined.**
- 1.2 Classification 07 **Error! Bookmark not defined.**
- I. La Leucémie myéloïde chronique 08 **Error! Bookmark not defined.**
- Généralités 08.
 - Epidmiologie 09 **Error! Bookmark not defined.**
 - Etiologie 10 **Error! Bookmark not defined.**
 - Mécanisme moléculaire 10.
 - Pathogénèse 11 **Error! Bookmark not defined.**
 - Clinique 13 **Error! Bookmark not defined.**
 - Examens para-clinique 14 **Error! Bookmark not defined.**
 - Evolution et complication 15 **Error! Bookmark not defined.**
 - Traitements 15 **Error! Bookmark not defined.**
- II. Le polyglobulie de vaquez 17 **Error! Bookmark not defined.**
- Généralités 17 **Error! Bookmark not defined.**
 - Epidmiologie 18.
 - Etiologie 18 **Error! Bookmark not defined.**
 - Clinique 18.
 - examens para-cliniques **Error! Bookmark not defined.**
- III. Myélofibrose primitif 19.
- Définition 20.
 - Epidmiologie 20.
 - Etiologie 21.
 - Clinique 21 **Error! Bookmark not defined.**
 - examens para-cliniques 21 **Error! Bookmark not defined.**
 - Aspect moléculaire 21 **Error! Bookmark not defined.**
 - Critaire de diagnostiques 21 **Error! Bookmark not defined.**
- IV. Thrombocytémie essentielle 22 **Error! Bookmark not defined.**

•	Définition.....	22	Error! Bookmark not defined.
•	Epidmiologie.....	22	Error! Bookmark not defined.
•	Critaire de diagnostics	22	Error! Bookmark not defined.
2	Physiopathologie moléculaire des SMP classique.....	23	Error! Bookmark not defined.
	JAK2 JUNAS KINASE 2	23	
	Définition de JAK2.....	23	Error! Bookmark not defined.
	Structure de JAK2.....	23	Error! Bookmark not defined.
	Localisation de gène JAK2	23	Error! Bookmark not defined.
	Mécanismes d'action de JAK2	23	Error! Bookmark not defined.
	Fonctions de JAK2	23	Error! Bookmark not defined.
▪	Dans la signalisation des récepteurs tyrosine kinase	24	Error! Bookmark not defined.
▪	Dans la voie JAK/STAT canonique	24	Error! Bookmark not defined.
▪	Dans la voie PI3K/AKT	24	
▪	Dans la voie MAPKs	25	Error! Bookmark not defined.
	La mutation JAK2V617F.....	26	
	Mutations du récepteur à la thrombopoïétine (MPL) ...	27	Error! Bookmark not defined.
	Mutation de calréticuline « CALR »	27	Error! Bookmark not defined.
3	Traitement des SMP Classiques	27	Error! Bookmark not defined.

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

	Objectif de ce travail.....		Error! Bookmark not defined.
I.	Matériel	30	Error! Bookmark not defined.
I.1	Biologique	30	Error! Bookmark not defined.
I.1.1	Population d'étude	30	Error! Bookmark not defined.
I.1.2	Information sur les patients	30	Error! Bookmark not defined.
I.1.3	Le prélèvement.....	30	
I.2	Non-biologique :.....	Annexe	Error! Bookmark not defined.
I.2.1	Appareillage.....	Annexe	Error! Bookmark not defined.
I.2.2	Petit matériel et consommables	Annexe	Error! Bookmark not defined.
I.2.3	Réactifs et solutions	Annexe	
II.	Méthodes	31	
II. 1	Extraction des acides nucléiques	31	
II.1.1	Extraction d'ADN.....	31	Error! Bookmark not defined.
II.1.2	Extraction d'ARN	31	Error! Bookmark not defined.

II.2	Dosage des acides nucléiques	37
II.3	Réverse transcription d'ARN	37
II.4	PCR en Temps Réel	38
II.4.1	RT-PCR Qualitatif.....	38
II.4.2	RT-PCR Quantitatif.....	39
II.4.3	Lecture et interprétation.....	40

Chapitre II : Résultats

I	Caractéristique démographique	43
I.1	La population diagnostiqué avec une LMC	43
I.2	La population suspecte d'une PV	43
II	Caractéristique clinico-biologique au moment de diagnostic	44
II.1	la population diagnostiqué avec une LMC	48
II.2	la population suspecte d'une PV	53
III	Résultats de PCR en Temps Réel.....	56
III.1	Recherche de transcrit BCR-ABL	56
III.2	recherche de mutation JAK2V617F	58
IV	Cas cliniques	59

Chapitre III : Discussion

1	Discussion	68
2	La difficulté de travail	72
Conclusion		75
Référence		76
Annexe		85

Liste des figures

Figure 01 :	L'hématopoïèse humaine selon le modèle classique pyramidal.....	01
Figure 02 :	le gène <i>Abl</i> et les deux points de casseur possibles (break points).....	11
Figure 03 :	la structure de la protéine ABL.....	12
Figure 04 :	Le gène BCR et les différents points de cassure.....	12
Figure 05 :	La structure de la protéine BCR	13
Figure 06 :	Variante protéine de transcrite BCR-ABL.....	14
Figure 07 :	Structure de la protéine JAK2	25
Figure 08 :	Localisation de gène JAK2 dans le chromosome 9.....	26
Figure 09 :	Mécanismes d'actions de la protéine JAK2 (James C <i>et al</i> , 2005).....	27
Figure 10 :	la voie des MAPKs... ..	29
Figure 11 :	Mutation JAK2 V617F dans un échantillon de PV (Levine R <i>et al</i> , 2005)...	30
Figure 12 :	Représentation du gène MPL et de ces mutations (Gong <i>et al</i> , 2013)...	31
Figure 13 :	Rôle des récepteurs aux cytokines dans la signalisation CALR (W. Vainchenker&R. Kralovics, 2016).....	32
Figure 14 :	L'assemblage de filtre LeukoLOCK.....	32
Figure 15:	Résumé des étapes d'extraction d'ARN.....	36
Figure 16 :	Exemple des courbes d'amplifications, de classeur Excel utilisé	42
Figure 17 :	répartition des patients diagnostiqués avec une LMC selon le sexe.....	44
Figure 18 :	Histogramme montrant la répartition des patients diagnostiqué avec une LMC en fonction de l'âge	45
Figure 19 :	Histogramme montrant la répartition des patients diagnostiqué avec une LMC en fonction de l'origine géographique.....	45
Figure 20 :	répartition des patients suspects d'un des SMP classique selon le sexe	46
Figure 21 :	Histogramme montrant la répartition des patients suspect d'un SMP classique en fonction de l'âge.	47
Figure 22 :	Histogramme montrant la répartition des patients suspect d'un des SMP classique en fonction de l'origine géographique.....	48
Figure 23 :	: un graphique représenté la dimension de rat (cm)	49
Figure 24 :	Répartition des patients en fonction de taux des globules blancs.....	49
Figure 25 :	distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine.....	50

Figure 26 :	distribution des patents en fonction de taux de plaquette	51
Figure 27 :	la distribution des patents en fonction de taux de myélémie.....	42
Figure 28 :	Représentation de pourcentage des blastes	52
Figure 29 :	le taux des globules rouge ($\times 10^6$)/ μl	54
Figure 30 :	Distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine.	54
Figure 31 :	taux des plaquettes et des globules blanc / μL	55
Figure 32 :	pourcentage des cas positifs et négatifs pour LMC.....	56
Figure 33 :	répartition des patients atteints de LMC selon le sexe.....	57
Figure 34 :	répartition des patients atteints de LMC selon l'âge.....	57
Figure 35 :	pourcentage des cas positifs et négatifs pour SMP classique.....	58
Figure 36 :	Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System.....	85
Figure 37 :	le spectrophotomètre QuikDrop Molecular Devices	86
Figure 38 :	vortex NEUATION iswix.....	87
Figure 39 :	Micro-centrifugeuse.....	87
Figure 40 :	bain-marie.....	88
Figure 41 :	petite matériels et consommables.....	89
Figure 42 :	Nuclease-free H ₂ O.....	89
Figure 43 :	Ethanol absolu 99,9° et propanol	90
Figure 44 :	TaqMan universal PCR Master Mix.....	90

Listedes tableaux

Tableau 01	Epidémiologie de LMC.....	07
Tableau 02	les signes cliniques de la LMC....	12
Tableau 03	épidémiologie de polyglobulie de vaquez	14
Tableau 04	Données épidémiologiques synthétiques de Myélofibrose primitive (Marc Maynadié ; 2017).....	17
Tableau 05	critères de diagnostic de MFP selon l’OMS 2016.....	18
Tableau 06	Données épidémiologiques synthétiques de thrombocytémie essentielle.....	19
Tableau 07	les critères de diagnostic de la TE selon l’OMS 2016.....	19
Tableau 08	JAK2 réactifs d’extraction d’ADN	37
Tableau 09	protocole de RT master mix.....	38
Tableau 10	plan de Template de PCR	38
Tableau 11	Mélange réactionnel de la PCR en temps réel qualitative.....	45
Tableau 12	moyenne d’âge des patients diagnostiqué avec une LMC.....	47
Tableau 13	Moyenne d’âge et écart-type et valeur P.....	48
Tableau 14	répartition des patients selon le type et le % de SPMG	50
Tableau 15	la moyenne des GB chez les patients diagnostiqués par une LMC	50
Tableau 16	la moyenne d’hémoglobine chez les patients diagnostiqués avec une LMC	51
Tableau 17	la moyenne des PLQ des patients diagnostiqué par une LMC	52
Tableau 18	la moyenne de taux de myélémie	52
Tableau 19	la moyenne des blastes chez les patients diagnostiqués avec une LMC.....	53
Tableau 20	résultats de comparaison des données épidémiologiques et les signes	54

	cliniques.....	
Tableau 21	La moyenne, écart-type, valeur P des GR	55
Tableau 22	moyenne, écart-type, valeur P des HB.....	55
Tableau 23	la moyenne, écart-type, valeur P des GB	56
Tableau 24	la moyenne, écart-type, valeur P des PLQ.....	56
Tableau 25	résultats de dosage de l'acide nucléique (dosage d'ARN).....	58
Tableau 26	résultats de dosage de l'acide nucléique (dosage d'ADN)	59
Tableau 27	cas clinique LMC	64
Tableau 28	cas cliniques des SMP Classique	68
Tableau 29	illustre une comparaison entre la sex-ratio dans différents pays.....	69
Tableau 30	comparaison d'âge des différentes séries rapportées.....	90
Tableau 31	réactifs de dépistage de mutation JAK2.....	91
Tableau 32	réactifs de dépistage de mutation JAK2 V617F	91
Tableau 33	réactifs d'extraction d'ARN.....	93
Tableau 34	: réactifs de reverse transcription.....	93
Tableau 35	réactifs de dépistage de type de mutation BCR-ABL	94
Tableau 36	réactifs de quantification dont La mutation M-bcr (ipsogen BCR-ABL1 M bcr IS-MMR Kit).....	94
Tableau 37	réactifs de quantification dont La mutation m-bcr (ipsogen BCR-ABL1 mbr Kit).....	95

Liste des abréviations :

ABL : Abelson.

ADN: Acide Désoxyribonucléique

Akt: cellular homolog of the V-aktoncogene ou protéine kinase B

ARN: Acide Ribonucléique

BAD: Bcl-2 associated Agonist of Cell Death/Biotin Acceptor Domain

BAF3: immortalized murine bone marrow-derived pro-B-cell line

Bcl-2: B cell leukemia protein 2

BCR-ABL1: Breakpoint Cluster Region – Abelson tyrosine kinase homolog 1

BCR: Break point Cluster Region.

BOM: Biopsie Ostéomédullaire

CALR : Calréticuline

c-Myc: Avianmyelocytomatosis virus oncogene cellular homolog

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

DNMT3A : DNA (cytosine 5) méthyl-transférase 3A

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EPO-R : Récepteur à l'Erythropoïétine

ERK: Extracellular Regulated Signal

ELN: European Leukemia Net.

ETV6: ETS translocation variant 6

EZH: Enhancer of Zest Homolog 2

EUTOS: European Treatment and Outcome Study of CML.

FAM: Fluorescence Amplification

FERM: 4-1 Ezrin, Radixin, Moesin

FISH : Fluorescence In Situ par Hybridation.

FNS : Formule de Numération Sanguine.

GAP: GTPases-activating protein.

GDP: Guanosine Diphosphate.

GTP: Guanosine Triphosphate.

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor

GSK3: Glycogène Synthase Kinase 3

IFN- α : interféron-alpha.

ITK: Inhibiteur de Tyrosine Kinase.

JAK2 : Janus kinase de la protéine 2

JH: Jak Homology domain

JNK: C-Jun N-terminal kinase

LNK : Lymphocyte Adapter protein ou « linker »

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MPL: Myeloproliferative Leukemia protein

M BCR-ABL: Major BCR-ABL.

m BCR-ABL: Minor BCR-ABL.

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

NCCN: National Comprehensive Cancer Network.

NMP : Néoplasmes myéloprolifératifs

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDK1: Phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1

PI3K: Phosphatidylinositol-3 kinase

PIAS: Protein Inhibitor of Activated STAT

PTP: Protein Tyrosine Phosphatases

PV : Polyglobulie de Vaquez

Ph.: chromosome de Philadelphia.

PN: Polynucléaires Neutrophils

SH: Src Homology Domain.

STAT: Signal Transducer and Activators of Transcription

RQ-PCR : Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.

SMP : Syndromes myéloprolifératifs

Src: Sarcoma

t(9;22): translocation entre le chromosome 9 et 22

TE : Thrombocytémie Essentielle

Tyk2: Tyrosine kinase 2

V617F : substitution de la Valine à la Phénylalanine dans la position 617

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

Introduction

Le concept des syndromes myéloprolifératifs a été introduit pour la première fois en 1951, par l'hématologue américain William Dameshek. (**William Dameshek ; 1951**) ; Dans son éditorial, il décrit, hyper prolifération des précurseurs myéloïdes et Surproduction de cellules sanguines matures.

En 2008, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a introduit le terme "néoplasie" afin de classer les néoplasies myéloïdes, plus précisément néoplasies myéloprolifératives (NMP) (**A. Tefferi & J. W. Vardiman ; 2008**)

Les NMP sont définies comme des hémopathies malignes hétérogènes, de faible incidence, résultant de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) myéloïde par un événement moléculaire, lequel procure un avantage prolifératif au clone (**A. Tefferi, J.et al ; 2009**) Les NMP sont classées en 9 sous-types par l'OMS ; mais dans notre étude seuls les 4 principaux sous-types seront traités, lesquels étant classés en fonction du chromosome Philadelphie (Ph +) et/ou du gène de fusion BCR-ABL1. On distingue (1) la leucémie myéloïde chronique (LMC) qui est « Ph + », (2) la polyglobulie de Vaquez (PV) « Ph -», (3) la thrombocytémie essentielle (TE) « Ph -» et (4) la myélofibrose primitive (MFP) « Ph -»

Les NMP dites « classiques » aussi appelées BCR-ABL1 négatives sont les pathologies myéloprolifératives les plus fréquentes. Elles sont caractérisées par une production excessive de cellules sanguines différenciées et fonctionnelles (**W. Vainchenker & R. Kralovics ; 2016**) .

Les NMP classiques sont classées en trois entités : la PV, la TE et la MFP. Les complications comprennent : thromboses, hémorragies ou des transformations blastiques de mauvais pronostic (**R. Kralovics & R. C. Skoda ; 2005**). Les NMP sont classées dans les cancers rares du fait de leur faible incidence, elles toucheraient 6 personnes sur 100 000 h par an (**E. Rumi & M. Cazzola ; 2016**)

En 2014, une méta-analyse épidémiologique regroupant de nombreuses publications européennes a évalué l'incidence des différents NMP en Europe. Les incidences de la PV et la TE varient respectivement entre 0,4-2,8 et 0,38-1,7 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an. La MF est à la fois la plus grave des NMP avec une médiane de survie de 2-5 ans et la plus rare des NMP avec une incidence qui varie entre 0,1 et 1 nouveau cas pour 100 000 personnes par an. (**O. Moulard, J.et al., 2014**)

Dans notre travail, nous avons entrepris l'optimisation et la validation de technique de RT-PCR afin d'améliorer le diagnostic, faciliter ainsi le suivi de la maladie. Aussi, de rechercher de la mutation JAK2 V617F et la translocation BCR- ABL chez les patients atteint de syndromes myéloprolifératifs.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre I

Rappel sur

l'hématopoïèse

I.1 Définition :

Hématopoïèse (du Grec, hémato : le sang, poièse : faire, fabriquer)

L'hématopoïèse est un processus physiologique hautement et finement contrôlé permettant un renouvellement cellulaire pour maintenir constant le nombre de cellules sanguines, indispensables à la survie de l'individu ou de l'organisme vivant. Chez l'adulte, l'hématopoïèse ne se produit que dans la moelle osseuse. (Chang Y, *et al* ; 2007)

Ce processus génère les différents types cellulaires sanguins à partir des cellules souches hématopoïétiques CSH et à travers des étapes de différenciation successives. On dénombre au moins 8 lignages hématopoïétiques subdivisés en 2 grands lignages. Le lignage myéloïde permet la production des globules rouges, des plaquettes, des macrophages et des granuleux alors que le lignage lymphoïde permet la production des lymphocytes T (LT), des cellules tueuses naturelles (NK), et des lymphocytes B (LB). Les cellules dendritiques peuvent être d'origine lymphoïde et myéloïde. **Figure (1)**

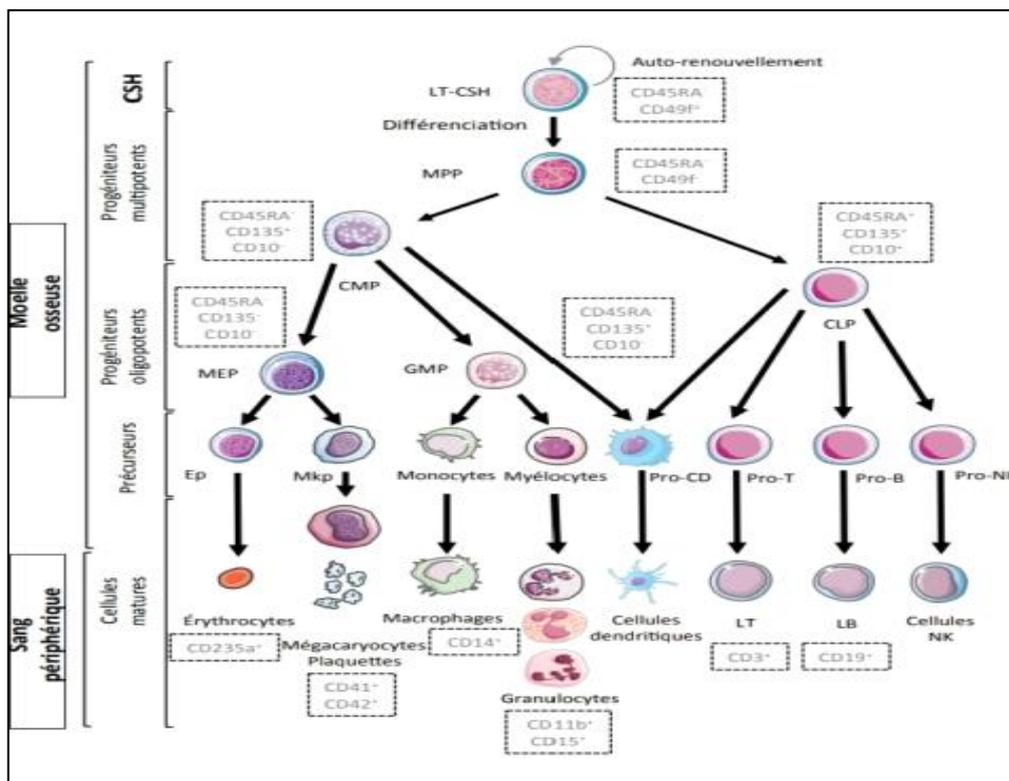


Figure (01) :L'hématopoïèse humaine selon le modèle classique pyramidal. ((Chang Y, *et al* ; 2007)

I.2 Régulation de l'hématopoïèse :

Homéostasie et microenvironnement

Les cellules matures du système hématopoïétique ont une durée de vie très courte, nécessitant des mécanismes efficaces de contrôle de l'homéostasie. Pour maintenir et produire des progénitures, les CSH conservent une balance entre auto-renouvellement et différenciation à travers des divisions cellulaires asymétriques. Néanmoins, les mécanismes qui régissent ces processus sont peu compris.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'auto-renouvellement des CSH, comme les voies **Notch**, **Hox**, **Sonic Hedgehog (SHH)** et **Wnt** qui sont aussi associées à l'oncogenèse, ce qui suscite une capacité commune à l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules souches cancéreuses (CSC).

La plupart des CSH sont dites quiescentes et résident en phase G0 du cycle cellulaire (**Bradford, G. B ; 1997**)

En effet, la très faible pression proliférative les protège des mutations lors de la réplication de l'ADN et des dommages induits par des produits du métabolisme. En entrant en différenciation, les CSH deviennent de plus en plus actives et développent un avantage prolifératif au fil des mitoses, ce qui conduit à un besoin de mise-au-point fine de l'homéostasie des cellules matures.

Comme d'autres types cellulaires, les CSH sont sujettes à la mort cellulaire programmée et à l'apoptose. En effet, la surexpression de gène oncogène BCL-2 induit une augmentation de la fréquence des LT-CSH et une résistance aux irradiations (Domen .J ; 1998) suggérant une implication de l'apoptose dans l'homéostasie hématopoïétique.

D'autre part, les besoins de l'organisme sont variables dans le temps et font intervenir de nombreux acteurs qui vont permettre d'induire une certaine adaptation de la production de cellules sanguines. Cette régulation est assurée en grande partie par des facteurs de croissance appartenant à la famille des cytokines : les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de nécrose (TNF), les facteurs de croissance comme le CSF, les chimiokines et certaines hormones comme la thrombopoïétine (TPO) produite par le foie et l'érythropoïétine (EPO)

produite par le rein, qui sont aussi des cytokines. Les cytokines sont une grande famille de ligands extracellulaires. Glycoprotéines membranaires ou sécrétées suite à une stimulation, elles provoquent un signal de cascade de phosphorylation par leur liaison à des récepteurs spécifiques situés à la membrane plasmique, ce qui peut induire des réponses biologiques de survie, de prolifération, de différenciation, de maturation, et d'activation de fonction (Robb, L ; 2007) en modifiant l'activité de facteurs de transcription, ou du fait de modifications transcriptionnelles ou épigénétiques directes.

Il existe une soixantaine de facteurs de croissance, que l'on peut scinder en trois groupes de par leur homologie de structure et leur site d'action au cours de l'hématopoïèse :

- Les facteurs de compétence tels que les interleukines 1, 4, 6 (IL-1, IL-4, IL-6), le Stem Cell Factor (SCF), et le ligand de Fms-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3- L) permettent la mise en cycle des CSH quiescentes et les sensibilisent à l'action des facteurs multipotents.
- Les facteurs multipotents tels que l'Interleukine 3 (IL-3) et le Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF) induisent la survie et la différenciation des CSH et sont retrouvés à tous les stades de la différenciation myéloïde.
- Les facteurs spécifiques de lignée tels que le Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) mais aussi l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'EPO et la TPO agissent de manière plus tardive sur les cellules engagées dans une lignée cellulaire en favorisant la multiplication cellulaire et la maturation de précurseurs spécifiques.

Néanmoins, cette classification est biaisée du fait que certains facteurs, comme le SCF ou la TPO, ont des rôles multiples à la fois dans les stades précoces et tardifs de l'hématopoïèse. L'hématopoïèse est assurée par des interactions complexes entre ces différentes cytokines, qui peuvent favoriser la différenciation myéloïde (SCF, IL-3), érythroïde (SCF, IL-3, EPO), mégacaryocytaire (SCF, IL-3, TPO) ou bien encore granulo-monocytaire (SCF, IL-3, GM-CSF). Les IFN et le TNF- α mettent en cycle les CSH tandis que le TGF- β permet leur mise en quiescence par blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Le déséquilibre de ces différents signaux, tantôt stimulateurs, tantôt inhibiteurs, peut générer une myélosuppression et une défaillance de la moelle osseuse.

L'hématopoïèse est aussi régulée par un système complexe de composants non-cytokiniques liés au microenvironnement médullaire : les niches hématopoïétiques telles que les niches sinusoidale, péri-artériolaire ou endostéale. Elles sont composées de cellules stromales réparties dans la matrice extracellulaire et sont importantes dans le maintien des propriétés souches des CSH, leur engagement dans un lignage et leur progression dans la différenciation. (Boulais, P. E. & Frenette, P. S.2015)

Le stroma se compose entre autres de fibroblastes, de cellules épithéliales, endothéliales, d'ostéoblastes, d'adipocytes, de cellules d'origine hématopoïétique (ostéoclastes, macrophages, mégacaryocytes, cellules lymphoïdes) et de médiateurs du système nerveux sympathique sécrétant des facteurs solubles (angiopoïétine, noradrénaline). L'interaction entre le stroma médullaire et les cellules hématopoïétiques se fait par liaison directe ou par le biais de molécules sécrétées et peut assurer une régulation positive (prolifération et survie induites par les facteurs de croissance) ou une régulation négative (arrêt du cycle induit par TGF- β 1). D'autres cellules souches sont présentes dans la moelle osseuse -les cellules souches mésenchymateuses (MSC)- et permettent aussi la régulation de l'hématopoïèse en étant à l'origine de la plus grande partie des cellules de la niche hématopoïétique : les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les myoblastes. (Wang, X. *et al.*2006)

Les MSC permettent à la fois l'émergence de ces cellules stromales, et la sécrétion de la quasi-totalité des cytokines nécessaires à l'auto-renouvellement ou la différenciation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. (Dazzi, F. *et al* ; 2006)

Finalement, l'hématopoïèse est avant tout un processus hautement orchestré de production et de maintien de tous les types cellulaires sanguins matures à partir d'une CSH et sous le contrôle de *stimuli* internes et externes au système hématopoïétique. Certaines hémopathies malignes ou aplasies peuvent résulter d'une altération de ces *stimuli* et contribuer au vieillissement du système hématopoïétique, processus important dans l'émergence de ces maladies.

Chapitre II

**Les syndromes
myéloprolifératifs**

1. Les syndromes myéloprolifératifs

1.1. Définition :

C'est un groupe de maladies caractérisées par la prolifération clonale et maligne d'une ou plusieurs lignées cellulaires myéloïdes. Il s'agit d'une pathologie de la cellule souche hématopoïétique (CSH), ayant pour conséquence une surproduction des cellules myéloïdes matures due à une hypersensibilité aux cytokines. Ce sont des maladies proches qui ont été regroupées sur la base de leurs caractéristiques cliniques et biologiques communes,

Le fait constant est l'hyperplasie d'une ou de plusieurs lignées myéloïdes, avec différenciation terminale des cellules.

Il s'agit de maladies chroniques, mais dont l'évolution terminale peut se faire (pas nécessairement) sous la forme d'une transformation en leucémie aiguë. Il s'agit de maladies actuellement incurables, sauf lorsqu'une allogreffe est réalisée avec succès.

Une hyperplasie secondaire des populations fibroblastiques de la moelle est très souvent observée et conduit à l'évolution vers la fibrose médullaire.

Il existe souvent une hématopoïèse extra médullaire responsable d'une métaplasie myéloïde (foie, rate).

Elles connaissent une dérégulation de la prolifération myéloïde, par l'intermédiaire fréquent de tyrosines kinases dérégulées.

1.2. Classification :

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) ou néoplasies myéloprolifératives (NMP), constituent un groupe de 7 entités bien différenciées depuis la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2016. (Arber DA, et al. 2016)

- Leucémie myéloïde chronique (LMC)
- Polyglobulie de Vaquez (PV)
- Thrombocytémie essentielle (TE)
- Myélofibrose primitive (MFP)
- Leucémie chronique à éosinophiles
- Leucémie chronique à neutrophiles
- Syndromes myéloprolifératifs chronique inclassables.

Un groupe distinct appelé plus couramment les NMP classiques « BCR-ABL négatifs » ou « Philadelphie négatifs », qui est constitué par la PV, la TE, la MFP (ces trois pathologies n'ont pas d'anomalie génétique récurrente); qui les sépare de la LMC. Contrairement à cette dernière qui possède le chromosome Philadelphie.

Cette nouvelle classification des tumeurs hématologiques est une révision de la classification OMS 2008 avec intégration de données phénotypiques, morphologiques, génétiques et moléculaire ; et même des évaluations cliniques et pronostiques, c'est suite à cette classification que les NMP ont été considérées comme des cancers (Vardiman JW *et al* ; 2009).

I. La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

1) Généralités :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un Syndrome myéloprolifératif chronique caractérisé par une prolifération maligne prédominante de la lignée granuleuse associée à une anomalie cytogénétique spécifique, la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs de chromosome 9 et 22 t (9 ; 22) (q 34 ; q11) ; appelée chromosome Philadelphie, la présence de ce chromosome caractérise plus de 90% des cas atteints de LMC ou la présence de son transcrit moléculaire (**Ruffer, 2003**)

2) Epidémiologie :

Tableau 01 : Epidémiologie de LMC

	En général	En Algérie
Incidence	De 1 à 1.5/100000 par an	0.53/100000 par an Avec une prévalence de 1030 en 2014.
Moyenne d'âge	entre 50 et 60 ans	48 ans
Sexe ratio (H/F)	1,3	1,2
Référence	Hughes, T. P., Ross, D. M., & Melo, J. V. (2014). Castagnetti, F., <i>et al.</i> (2014).	Djouadi, K., Harieche, F., <i>et al</i> (2016).

NB : Mortelle, sauf chez les sujets allogreffés, mais les traitements récents l'ont transformé en une maladie chronique qui semble bien contrôlée chez la majorité des patients.

3) Etiologie :

L'étiologie est inconnue mais certains cas sont secondaires à l'exposition au benzène ou à des radiations ionisantes qui sont reconnues comme des facteurs prédisposant de LMC dont le rôle de ces dernières a été le premier à être décrit à partir de la Cohorte des survivants de la bombe atomique de Hiroshima et Nagasaki, chez lequel un excès de leucémie a été retrouvé. Il s'agit alors d'une maladie professionnelle reconnue dans ce cadre précis.

De plus, une étude publiée entre 1984 et 2004 a permis de confirmer une association possible entre une exposition aux pesticides (herbicides phénoxyatiques) et le développement d'une LMC chez les agriculteurs ou fermiers

Des facteurs génétiques héréditaires ont été incriminés dans la survenue de la translocation. En effet, plusieurs SNP (Single Nucléotide Polymorphismes) ont été identifiés comme pouvant être associés à une prédisposition à développer une LMC

4) Mécanisme moléculaire :

Sur le plan moléculaire, la translocation (9;22)(q34;q11) déplace le proto-oncogène *C-ABL* depuis le chromosome 9 sur le chromosome 22, à proximité d'un point de cassure appelé BCR. et conduit à la formation d'un gène de fusion chimérique *BCR-ABL1*, ce gène hybride, est transcrit sous la forme d'un ARNm de 8,5 kb, avec deux variants de jonction, b2a2 (dans 40% des cas) et b3a2 (55% des cas); traduit en protéine de fusion la protéine P210 BCR-ABL qui a une activité enzymatique constitutive de type tyrosine kinase qui peut être incluse dans plusieurs voies de signalisation et ainsi cette anomalie moléculaire très particulière : joue un rôle primordial dans leucémogénèse car elle confère aux cellules où cette protéine est exprimée un avantage prolifératif qui semble être à l'origine de la maladie; la LMC constitue un modèle d'étude des phénomènes de l'oncogénèse; peut être détectée avec une très grande sensibilité par la réaction de PCR, ce qui autorise la détection d'une cellule leucémique parmi 10⁶ cellules normales ; et permis la mise au point de traitements ciblés sur cette anomalie qui ont révolutionné le traitement et le pronostic des patients.

Enfin, cette anomalie cytogénétique est présente dans toutes les cellules hématopoïétiques nucléées dérivées du clone malin, y compris les lymphocytes. Elle va permettre de distinguer les populations de progéniteurs médullaires pathologiques des populations normales. La réponse au traitement va pouvoir être évaluée par la cytogénétique et la biologie moléculaire.

5) Pathogénèse :

La protéine BCR/Abl active différentes voies de signalisation cellulaire.

Les conséquences vont être multiples au niveau hématologique : augmentation de la prolifération cellulaire, altérations des propriétés d'adhésion cellulaire, inhibition de l'apoptose, dégradation des protéines de régulation, altération de la réparation de l'ADN.

Gène *ABL* et sa protéine :

Le gène *ABL* ou l'oncogène *Abelson* (*c-ABL*) est situé sur le bras long du chromosome 9 en position q34, et code pour une protéine sans récepteur de 145 kDa à ATK. Il tire son nom de son homologue viral, le gène *Abelson* (**v-ABL**), responsable d'une leucémie chez la souris. Le gène *ABL* s'étend sur 230 Kb et comporte 11 exons avec un site alternatif d'initiation de la transcription entre les exons 1a et 1b. Deux types d'ARNm peuvent donc être transcrits, 1a et 1b mesurant respectivement 6 et 7 kb, et donnant naissance à deux isoformes protéiques respectivement de 1130 et 1149 acides aminés (Costello, 1999)

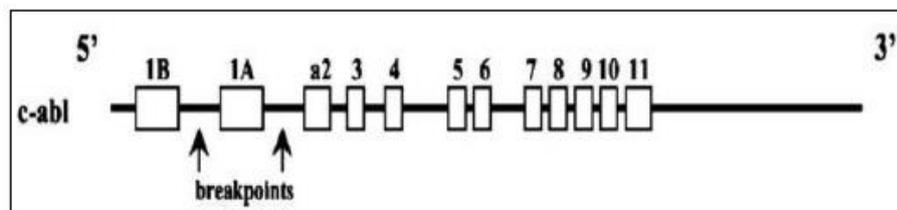


Figure 02 : le gène *Abl* et les deux points de casseur possibles (break points). (CHOMEL, J. C.1995)

Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire et retrouvée tant dans le noyau que dans le cytoplasme. (Deininger ; 2000)

Et sa structure est hautement conservée, induisant un signal intracellulaire, possède des domaines SH (Src homology), un domaine SH3 est le régulateur négatif du domaine SH2, qui est pour sa part un régulateur positif du domaine SH1, support de l'ATK de la protéine Abl; dans sa partie C-terminal il existe une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) de localisation nucléaire, et les domaines lui permettant de se fixer aux filaments d'actines de l'ADN. (Leguay, 2005) (Bhamidipati ; 2013)

Dans le compartiment nucléaire, Abl joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire, et un rôle important dans la croissance de la prolifération cellulaire, participant à la translocation du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance.

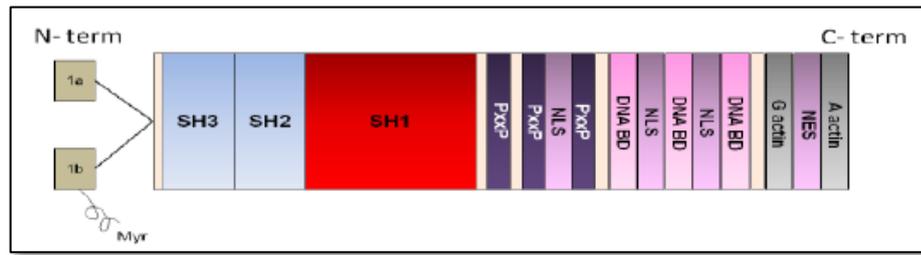


Figure 03 : la structure de la protéine ABL. (Leguay, 2005)

Gène *BCR* et sa protéine :

Le gène *BCR* est situé sur le bras long du chromosome 22, en position q34, Le gène *BCR* s'étend sur 135 Kb et comporte 23 exons. Deux types d'ARNm peuvent donc être transcrits, code pour deux protéines de 160 et de 130 kDa, mesurant respectivement 4,5 et 6,7 kb, et code pour une protéine sérine thréonine kinase cytoplasmique de 160 kD, exprimé de façon ubiquitaire avec des quantités élevées au niveau des cellules hématopoïétiques et du cerveau.

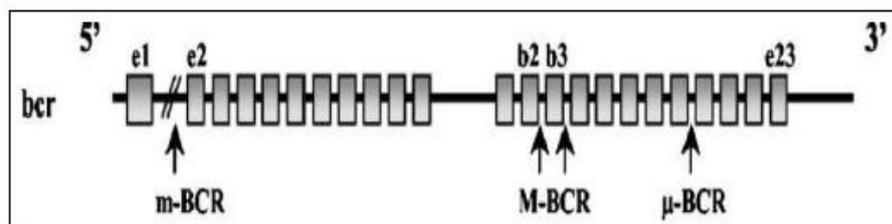


Figure 04 : le gène *BCR* et les différents points de cassure. (CHOMEL, J. C.1995)

La protéine BCR possède plusieurs domaines importants, dont lesquel un domaine d'activité sérine thréonine kinase et un domaine d'oligomérisation dans la partie N-terminale, ainsi que un domaine DBL-like, homologue à la pleckstrine, qui a un rôle de stimulateur de l'échange GTP-GDP par la protéine Rho-GEF (guanine nucleotide exchange factor) qui se retrouve au niveau de la partie central de la protéine. Ainsi que la partie C-terminale a une fonction GAP (GTPase activating protein) pour des protéines G-Rac, et joue un rôle dans la bactéricidie des polynucléaires. (Figure 05)

Cette protéine est semblable qu'il est impliqué dans le phénomène de transduction du signal, mais sa fonction biologique précise reste encore mal connue.

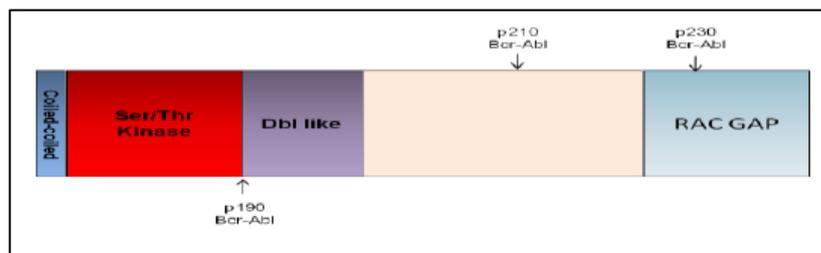


Figure 05 : la structure de la protéine BCR. (Leguay ; 2005)

Gène de fusion *BCR-ABL* et sa protéine:

La translocation t (9;22) entraîne un réarrangement des gènes situés au voisinage des points de cassure et la constitution sur le chromosome 22, d'un gène de fusion hybride composée de la partie 5' N-terminal de gène *BCR* et la partie 3' C-terminal de gène *ABL*; la fusion se fait entre l'exon b2 ou b3 de *BCR* et l'exon a2 d'*ABL*. Entraînant une jonction, b2a2 (dans 40% des cas) et b3a2 (55% des cas) ; les transcrits b2a3 et b3a3 représentent moins de 5% des cas. Ce gène hybride transcrit en ARNm et ce traduit a une protéine chimérique P210.

La protéine P210 est responsable de la majeure partie des phénomènes qui mènent à la transformation leucémique. Elle possède une activité tyrosine kinase ; enzymes qui catalysent la réaction d'attachement d'un groupement phosphate sur une protéine (Tulliez, 2007). La P210 est composée des acides aminés de *BCR* du côté N- terminal et des acides aminés d'*ABL* du côté C-terminal. Elle comporte des domaines homologues avec les protéines de la famille Src (**figure 06**) (Duployez *et al.* 2015).

En fonction de la localisation des points de cassures sur le gène *BCR*, plusieurs types de leucémies peuvent être générées selon l'oncogène transcrit : p190 *BCR-Abl*, p210 *BCR-Abl* ou encore p230 *BCR-Abl*.

Région μ BCR (pour micro BCR) : entre les exons 19 et 20, permet la synthèse d'une protéine chimérique de 230 kDa. Cette région est impliquée dans < 0.1 % des LMC.

Région m-BCR (pour minor BCR) : le point de cassure se localise entre les exons 1 et 2 de *BCR* et génère un transcrit e1a2 qu'il se traduit en p190 KDa. Cette région est impliquée dans 0.4 % des LMC. (Leguay ; 2005)

Région M-BCR (pour major BCR) : majoritairement impliquée dans la LMC qui correspond aux exons 12 à 16 du gène *BCR* (b1 à b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4. (Deininger, M ; 2000)

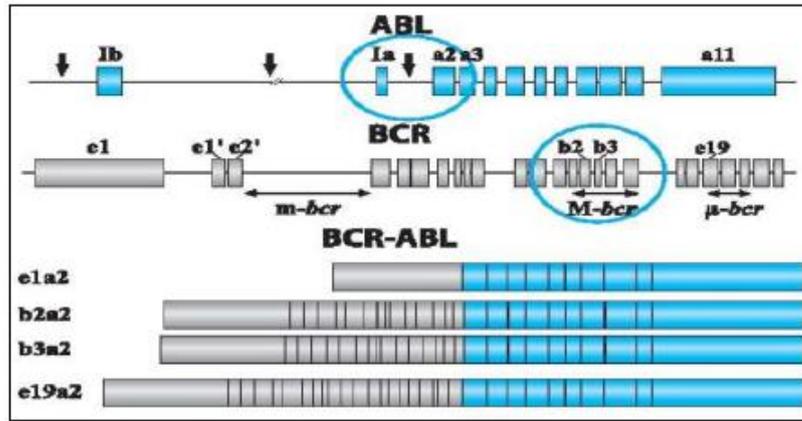


Figure 06 : variant protéine de transcrit BCR-ABL (Deininger, M ; 2000)

6) Clinique :

Le plus souvent, découverte fortuite sur un hémogramme « NFS » de routine, Sachant que dans 50% des cas : absence de symptômes. Peut aussi se révéler par son symptôme cardinal, la splénomégalie ; qu'est quasi constante 50% des cas de LMC-PC (phase chronique), ou par d'autres signes généraux inconstants non spécifiques à la maladie. (SALHANE, H ; 2013).

Tableau 02: les signes clinique de la LMC.

Signes d'appel plus spécifiques:	Signes non spécifiques
- en rapport avec la splénomégalie : troubles digestifs, douleur ou tumeur de l'hypochondre gauche - en rapport avec une complication : infarctus splénique, crise de goutte, thrombose veineuse...	perte de poids, asthénie, sueurs nocturnes, et plus rarement des complications thrombotiques inaugurales

L'état général est habituellement bien conservé.

7) Examens para-cliniques :

Le diagnostic est alors établi à partir de plusieurs examens :

- Une numération formule sanguine(NFS) « **Hémogramme** ».
- Un prélèvement de moelle osseuse « **myélogramme** ». Réalisé sous anesthésie locale, cet examen consiste à insérer une aiguille creuse dans un os. Il s'agit généralement du sternum (os plat situé au milieu de la poitrine) ou de la partie saillante de la hanche. Une petite quantité de moelle est alors aspirée, ce qui permet ensuite de réaliser **un caryotype**, c'est-à-dire une étude des chromosomes, et de rechercher le chromosome Philadelphie.

Le prélèvement permet également de quantifier les globules blancs anormaux présents dans la moelle osseuse.

- Des examens sanguins de **biologie moléculaire** : détection de l'ARN messager (transcrit) du gène réarrangé BCR-ABL par PCR quantitative en temps réel (**RQ-PCR**) : qui visent à mesurer la quantité de cellules qui le porte (ce que l'on appelle la « charge BCR-ABL »), et a ainsi quantifier le nombre de cellules leucémiques.

Le diagnostic est établi lorsque le chromosome Philadelphie et le gène BCRABL sont retrouvés. Les différents examens réalisés permettent également de déterminer le stade de la maladie, de suivre l'évolution de la réponse au traitement et de la maladie résiduelle (infra-clinique) chez les patients

Et la **RT-PCR** la reverse transcription (Société française d'hématologie, 2009)

Autres examens biologiques: (non indispensables au diagnostic, peu d'intérêt)

- Hyperuricémie et hyperuraturie sont fréquentes.
- La vitaminémie B12 est élevée, corrélée à l'hyperleucocytose, élévation du taux des LDH.
- Le lysozyme sérique et urinaire peut être élevé.
- L'exploration fonctionnelle des plaquettes montre une thrombopathie acquise.
- Les cultures des progénitures hématopoïétiques montrent une augmentation des précurseurs pluripotents et granulomonocytaires. On trouve également ces progénitures en nombre élevé dans le sang.(plus de détails dans Annexe)

8) Évolution et complications :

L'histoire naturelle de la LMC comprend trois phases évolutives : une première phase dite «chronique», pauci symptomatique, suivie d'une deuxième phase, dite «d'accélération», et enfin une troisième phase, de transformation aiguë appelée «phase blastique», prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient (Leguay T et Mahon F ; 2005).

9) Traitement:

-Chimiothérapie conventionnelle :

L'hydroxyurée (Hydréa), inhibiteur de la synthèse de l'ADN, est le plus souvent prescrite. Son action est rapide et sa toxicité est faible (Sébahoun, 2005)

Le busulfan (Myleran®) est un agent alkylant qui est également utilisé mais son maniement est plus délicat du fait de sa myélotoxicité (Sébahoun, 2005).

-Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques :

L'allogreffe conventionnelle ou à conditionnement atténué, reste toujours le seul traitement curatif démontré de la LMC (Benakli M et al, 2013).

-Interféron alpha :

L'INF- α est une cytokine possédant une action antiproliférative sur les cellules normales et tumorales. L'INF « interfère » dans le système immunitaire mais son mécanisme d'action dans la LMC demeure largement inconnu. (Guilhot F et al ; 2004)

-Les inhibiteurs de la tyrosine kinase :

L'imatinib (Glivec®) est un inhibiteur compétitif de l'ATP, actif sur la protéine Bcr-Abl. Cette molécule se lie au site de fixation de l'ATP du domaine kinase uniquement lorsque la protéine est dans sa forme inactive (Druker et al, 1996).

D'autres inhibiteurs de la tyrosine kinase BCR-ABL, tels que le nilotinib (Tasigna®) ou le dasatinib (Sprycel®) sont maintenant aussi utilisés (Roufosse R et Beguin Y, 2010)

II. polyglobulie primitive de vaquez :

1) définition :

Ce SMP prédomine sur la lignée érythroblastique et se traduit par une augmentation du taux d'hémoglobine, souvent accompagnée d'une polynucléose neutrophile et d'une thrombocytose. Sur le plan clinique, on observe un syndrome d'hyperviscosité sanguine, une splénomégalie, une érythrose faciale. L'évolution est marquée par un risque accru de complications thromboemboliques, de transformation myélofibrotique ou en leucémie aiguë secondaire. Le diagnostic positif repose sur des critères majeurs et des critères mineurs.

2) épidémiologie :

Tableau 03 : épidémiologie de polyglobulie de vaquez

	Dans le monde	En Algérie
Incidence	De 0,6 /100 000 par an	0.14/100000 par an Affection rare A doublé : passe de 0,07 en 2002 à 0,15 en 2011.
Moyenne d'âge	64 ans, rare avant 40 ans (6%)	60ans
Sexe ratio (H/F)	1,2	1,3
Référence	Belakehal, <i>et al.</i> (2014).	SE Belakehal, (2012)

3) Etiologie :

En 2005, la mutation V617F de la tyrosine kinase JAK2 (associée au récepteur de l'EPO) a été décrite dans les polyglobulies primitives (et les autres syndromes myéloprolifératifs classiques « ph- »). Cette mutation a été découverte par quatre équipes indépendantes menées par Gary Gilliland, William Vainchenker, Radek Skoda et Anthony Green. (Guillemette ; 2018) .

4) clinique :

- Erythrose : coloration pourpre du visage, des muqueuses et des extrémités
- Prurit exacerbé à l'eau chaude
- Syndrome d'hyperviscosité : céphalées, vertiges, acouphènes, paresthésies, troubles visuels
- Splénomégalie
- Thromboses artérielles et veineuses : touchent tous les territoires, en particulier, les membres, le SNC, les Coronaires.
- Le syndrome de Budd-Chiari peut être révélateur d'une PV
- Hémorragies viscérales et cutanéomuqueuses, avec ulcères gastro-intestinaux souvent associés

5) Examens para-cliniques:

➤ Hémogramme:

Augmentation du nombre de GR

Augmentation du taux d'hémoglobine (chez les hommes >170g/L, chez les femmes >160g/L)

Augmentation du taux d'hématocrite (chez les hommes >50%, chez les femmes >45%)

Hyperleucocytose modérée et inconstante

Hyperplaquettose modérée

➤ Myélogramme:

Riche en mégacaryocytes.

➤ Biopsie de moelle osseuse :

Hypercellularité pan-myéloïde, et notamment mégacaryocytaire permet d'évaluer le degré de fibrose

➤ Examens isotopiques: masse sanguine isotopique

Le volume globulaire total mesuré par des hématies marquées au Cr 51 ou au Tc 99 affirme le diagnostic de la PV et en apprécie l'importance chez la femme >32ml/kg, et >36ml/kg chez l'homme

- **Dosage de l'Erythropoïétine** : peu spécifique et peu sensible normal ou bas
- **La biologie moléculaire** : mutation de JAK2 dans >90% des cas, et plus c'est mutation de l'exon 12.
- **Autres:**

Diminution de la VS

Score de PAL augmenté

Augmentation du taux de la vitamine B12

Hyperuricémie

III. Myélofibrose primitif :

1) Définition :

La myélofibrose primitive (MFP) est également anciennement appelée « myélofibrose idiopathique chronique » ou « splénomégalie myéloïde » ou encore « métaplasie myéloïde avec myélofibrose ». (Mesa RA. *et al*, 2007)

Ce néoplasme myéloprolifératif est caractérisé par la prolifération d'une cellule souche hématopoïétique clonale, qui se diffère en cellules hématopoïétiques myéloïdes, ce sont mégacaryocytaires et après une prolifération de cellules stromales non clonales à l'origine de l'apparition d'une fibrose médullaire (Jacobson RJ. *et al* ; 1978). La fibrose réactionnelle altère l'environnement des cellules de la moelle et perturbe l'hématopoïèse médullaire. Les cytokines et les chimiokines libérées participent à la mobilisation des progénitures hématopoïétiques des niches médullaires vers les niches spléniques, en les conduisant à l'hématopoïèse splénique. (Le Bousse-Kerdiles M. *et al* ; 2002)

En 1879, décrit la MFP comme une splénomégalie massive, des globules rouges nucléés circulants, un nombre élevé de leucocytes morphologiquement anormaux, une fibrose médullaire, une ostéosclérose ainsi qu'une intense hématopoïèse extra-médullaire (Tefferi, A. & Vardiman, J. W. ,2008).

La myélofibrose est rare. Elle peut se développer seule (myélofibrose primitive) ou accompagner un autre trouble (myélofibrose secondaire) (Jane Liesveld MD, James P, 2020)

D'une part, les patients de plus de 60 ans ceux qui présentent une leucocytose ou la mutation JAK2V617F, ont de forts risques de développer des événements thrombotiques (Barbui, T. *et al*. ,2010). D'autre part, environ 15 à 30% des MFP se transforment en LAM (Beer, P. A. *et al*. ,2010).

2) Epidémiologie :

Tableau 04 : Données épidémiologiques synthétiques de Myélofibrose primitive (Marc Maynadié ; 2017)

Taux d'incidence standardisé sur la population mondiale (/100000h/an)		Age médian		Sex-ratio
Homme	Femme	Homme	Femme	H/F
0.4	0.2	65	68	2

3) Etiologie :

Etiologie inconnue mais certains cas secondaires radiations ionisantes ou aux solvants organiques (benzène)

4) Examens clinique :

- une splénomégalie de taille variable. (95%)
- Hépatomégalie dans 50% des cas.
- Parfois un syndrome anémique et/ou hémorragique.
- Signes généraux** : asthénie, amaigrissement, altération de l'état général.

5) Examens paraclinique :

➤ Hémogramme

- Anémie normochrome normocytaire avec anisocytose, poïkilocytose, dacryocytose (hématies en larmes)
- Erythroblastose
- Hyperleucocytose avec myélémie
- Taux de plaquettes variable, avec plaquettes géantes

➤ Myélogramme :

Le plus souvent un échec en raison de la myélofibrose - Sang médullaire pauvre

➤ Biopsie de moelle :Montre 3 stades:

- Fibrose réticulinique avec hyperplasie des trois lignées

-Fibrose collagène mutilante avec diminution de la cellularité et présence de mégacaryocytes abondants et dystrophiques

-Ostéomyélolossclérose avec disparition du tissu hématopoïétique

6) Aspect moléculaire :

-Mutation JAK2 : ~50 %

- Mutations MPL : ~11

7) Critères de diagnostic:

Le diagnostic de MFP repose sur la découverte d'une splénomégalie et/ou d'anomalies de l'hémogramme. Il Ya des signes généraux notamment l'asthénie, l'amaigrissement, les sueurs nocturnes significatives peuvent être à l'origine du diagnostic. (Mesa RA,. 2007)

Tableau 05: les critères de diagnostic de MFP selon l'OMS 2016

Critères majeurs	Critères mineurs
<p>1-prolifération de mégacaryocytes atypiques, accompagnée soit d'une fibrose réticulinique, soit d'une fibrose collagénique.</p> <p>2-absence des critères suivants : TE, PV, LMC avec mutation BCR-ABL, SMD ou autre néoplasies myéloïdes</p> <p>3-présence de mutation JAK2, CALR ou MPL ou si ce n'est pas le cas, d'un autre marqueur clonal ou absence de MF réactionnelle</p>	<p>Présence d'au moins un des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anémie • Leucocytose • Splénomégalie palpable • LDH élevée • Leucoérythroblastose

IV. Thrombocytémie essentielle :

1)Définition :

La thrombocytémie essentielle est un néoplasie myéloproliférative caractérisée par une augmentation excessive du nombre de plaquettes ainsi une hyperplasie mégacaryocytaire et une tendance thrombotique hémorragique ou microvasculaire.

2)Epidémiologie :

Tableau 06 : Données épidémiologiques synthétiques de thrombocytémie essentielle.

	Taux d'incidence standardisé sur la population mondiale (/100000h/an)		Age médian		Sex ratio
	Homme	Femme	Homme	Femme	H/F
Thrombocytémie essentielle	1.5	1.8	70	72	1.8

3)Critères de diagnostic : (selon l'OMS 2016) (Arber et al. 2016)

Tableau 07: les critères de diagnostic de la TE selon l'OMS 2016

Critères majeurs	Critères mineurs
1-Numération plaquettaire élevée 2-Prolifération de grands mégacaryocytes matures 3-Absence des critères suivants : LMC avec mutation BCR-ABL1, PV, MFP, SMD ou autres néoplasies myéloïdes 4-Présence de mutation JAK2, CALR ou MPL	<ul style="list-style-type: none"> Présence d'un marqueur clonale ou absence de signe de thrombocytose réactionnelle

2) Physiopathologie moléculaire des SMP Classiques à Ph- :

Le gène JAK2 et sa protéine :

1 Définition :

JAK c'est un membre de la famille Janus kinase identifiée comme tyrosine-kinases non-réceptrices, composée de quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2

Janus kinase 2 (JAK2) est une protéine de type tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation (JAK-STAT), notamment celle de la prolifération cellulaire de l'hématopoïèse. JAK2 est lié aux récepteurs de la famille des cytokines, ceux-ci pouvant être activés par des cytokines et des facteurs de croissance, tels que l'EPO-R, TPO-R, GM-CSF-R, GH-R, PRL-R. (Biomini ; 2013)

2 Structure :

Chez l'Homme, JAK1 est situé sur le chromosome 1 (1p31.3), JAK2 sur le chromosome 9 (9p24), JAK3 et TYK2 sur le chromosome 19 (19p13.1 et 19p13.2 respectivement). Ce sont des protéines de 120 à 140 KDa qui sont localisées sous la membrane plasmique, au niveau des endosomes et à proximité de leur récepteur d'intérêt. JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimées de manière ubiquitaire tandis que JAK3 est réduit à une expression purement hématopoïétique. Concernant leur structure, les JAKs possèdent sept régions d'homologie bien définies : JH1-JH7 (**Figure 07**)

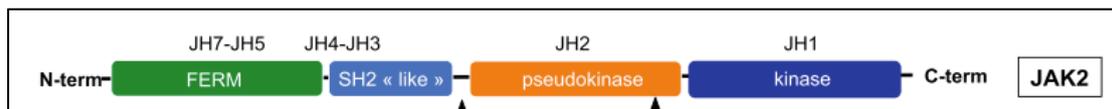


Figure 07 : Domaines de la protéine JAK2.

Dans la partie C-terminale de JAK2, la région JH1 possède toutes les caractéristiques des tyrosine-kinases catalytiques : les résidus tyrosines dans la région de la boucle d'activation, le motif GXGXXG canonique dans la boucle de liaison à l'ATP, ainsi qu'un résidu conservé d'acide aspartique impliqué dans la réaction de phosphotransfert de la boucle catalytique. La région JH1 s'active après phosphorylation de la tyrosine 1007 (Y1007) située sur la boucle d'activation de la protéine JAK2. (Feng, J. *et al.* 1997)

Hautement homologue et attenante à JH1, la région JH2 est par nature catalytiquement inactive du fait du manque de résidus nécessaires à l'activité tyrosine-kinase : il s'agit du domaine pseudo-kinase de la protéine. Les études d'interaction de JH1 et JH2 révèlent un mécanisme d'autorégulation dans lequel JH2 inhibe l'activité tyrosine-kinase de JH1. (Lindauer, K ; 2001)

Néanmoins, il a été montré que ce domaine possédait une activité kinase qui phosphoryle deux résidus régulateurs négatifs de JAK2 : Ser523 et Tyr570. Les mutations activatrices localisées dans la région JH2, telles que JAK2V617F, réduisent en fait la phosphorylation de Tyr570 chez les patients, suggérant que la perte d'activité de JH2 contribuerait à la pathogénèse des NMP. (Ungureanu, D. *et al.* 2011)

De plus, la structure cristalline de JH2 révèle un changement de structure induit par JAK2V617F: JH2 adopte une conformation de protéine kinase prototypique qui se lie au Mg-ATP, ce qui aide à la transphosphorylation de JH1, mimant ainsi la structure de JAK2 en présence de cytokine. Toutes ces observations ont pointé JH2 comme cible thérapeutique prioritaire dans le traitement des NMP56. (Bandaranayake, R. M. *et al* ; 2012)

Au niveau N-terminal de la protéine, les régions d'homologie JH3 et JH4 forment le domaine d'homologie SH2 (Src-homology-2) et les régions JH5 à JH7 forment le domaine FERM (Band-4.1, ezrin, radixin and meosin), tous deux impliqués dans la médiation des interactions avec les récepteurs cytokiniques ainsi que dans la localisation de MPL et d'EPO-R à la surface cellulaire. (Huang, L. J. *et al* ; 2001) (Royer, Y. *et al* ; 2005)

3 La localisation du gène « JAK2 »:

Le gène JAK2 est localisé sur le bras court du chromosome 9 en position 9p24. Il s'étend sur environ 140 kb d'ADN génomique et comporte 25 exons (Tefferi A ; 2010)

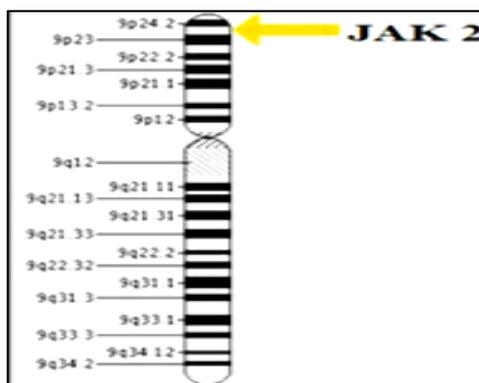


Figure 08 : localisation de gène JAK2 dans le chromosome 9.

4 Mécanisme d'action de JAK2 :

Dans les conditions physiologiques normales, l'EPO, la TPO ou le G-CSF se fixent à leur récepteur sur la membrane cellulaire, mobilisant la protéine tyrosine kinase cytoplasmique JAK2 qui se fixe à la partie sous membranaire du récepteur: elle se transphosphoryle, activant la dimérisation du facteur de transcription STAT5 (signal transducer and activator of transduction). Ce dernier peut alors se transloquer au noyau, pour activer la transcription de gènes régulateurs de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes et/ou mégacaryocytaires. La phosphorylation de la protéine JAK2 active également les voies MAP kinase et PIK3K/AKT qui sont impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. (Figure 09)

Dans les conditions physiopathologiques, La mutation V617F provoque une activation constitutive de JAK2, stimulant constamment la dimérisation de STAT5 même en l'absence de fixation d'EPO et TPO sur leurs récepteurs. Cela conduit à une stimulation permanente de la prolifération érythrocytaire et/ou mégacaryocytaire. (James C *et al* ; 2005)

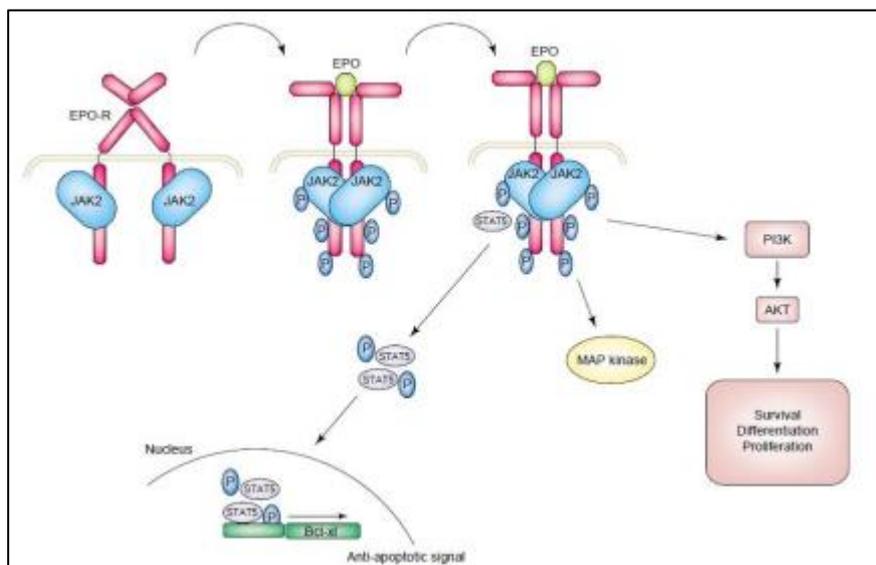


Figure09 : Mécanismes d’actions de la protéine JAK2 (James C *et al* ; 2005)

5. Fonction :

5.1 Dans la signalisation des récepteurs aux cytokines :

Les récepteurs de type I partagent tous un résidu cystéine conservé ainsi que le motif WSXWS dans leur domaine extracellulaire. Ils sont ensuite subdivisés en quatre groupes sur la base de l’architecture de leur complexe activé : les homodimères (EPO-R, MPL, GCSF-R, GH-R, etc.), les hétérodimères ayant leur chaîne β en commun (GM-CSF, IL-3, IL-5), les récepteurs multimériques qui possèdent la chaîne de signalisation gp-130 (IL-6R, IL-11R, etc.) et les hétérodimères ayant leur chaîne γ en commun (IL-2R, IL-4R, IL7R, etc.). Les récepteurs de type II sont activés à la manière d’hétérodimères (IFN-R, IL-22R, IL-24R, IL-29R, etc.)

5.2 La voie JAK/STAT canonique :

La voie JAK2/STAT est une étape clé dans la voie de signalisation de nombreuses cytokines, telles que l’EPO, les facteurs de croissance, la prolactine, la thrombopoïétine, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), l’IL -3 et l’IL -5. (Nelson, ME., Steensma, DP ; 2006).

La famille protéique des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) est composée de sept membres : STAT1 à 4, STAT5-A, STAT5-B, et STAT6, qui sont impliqués dans différentes voies de survie cellulaire, de différenciation et de prolifération. Ils comportent plusieurs domaines fonctionnels conservés. Dans la région N-terminale, le domaine d’oligomérisation permet l’interaction avec d’autres protéines et la formation de tétramères de STATs. Le domaine de liaison à l’ADN (DBD) permet à ces facteurs de se lier spécifiquement à

l'ADN. Le domaine SH2 permet le recrutement des STATs aux tyrosines phosphorylées du récepteur cytokinique activé, ou aux JAKs phosphorylées, et participe à la formation des dimères de STATs activées. Les éléments nécessaires à la régulation de l'activité des STATs se trouvent dans la région C-terminale : le domaine de transactivation (TAD) et le résidu tyrosine (Y) conservé pour la phosphorylation par les protéines JAKs. Ainsi, la stimulation par un facteur de croissance extracellulaire d'un récepteur cytokinique active JAK2 et ce complexe récepteur-JAK2 recrute les STATs via leur domaine SH2 et induit leur phosphorylation. Par exemple, les résidus tyrosine Y368, Y426, et Y56 d'EPO-R permettent l'activation de STAT3/5, STAT5 et STAT1/3, respectivement. Une fois phosphorylés, les STATs forment des complexes d'homodimères ou d'hétérodimères stables grâce aux interactions domaine SH2/résidu tyrosine phosphorylé et transloquent au noyau où ils induisent la transcription de différents gènes cible en se liant à des séquences consensus de régulation spécifique.

5.3 La voie PI3K/Akt :

La PI3K (Phosphoinositide-3-Kinase) joue un rôle pivot dans la prolifération, la différenciation, la chimiotaxie, la survie, le trafic et l'homéostasie glucidique. Ces enzymes sont composées d'une sous-unité catalytique (p110) et régulatrice (p85) qui sont activées grâce au recrutement à la membrane via le domaine SH2 de p85 sur des motifs consensus YXXM phosphorylés après activation du récepteur cytokinique et produisent des lipides 3'-phosphoinositides comme le PIP3 qui vont servir à recruter et à activer des protéines à domaine PH (AKT, PDK). Les modèles murins déficients en Ship (SH2-containing 5'-phosphoinositol phosphatase) et en Pten (phosphatase with tensin homolog), deux phosphatases de PIP3, développent de nombreuses anomalies hématologiques comme l'anémie, la thrombocytopénie, la leucocytose, une hématopoïèse extra-médullaire et une altération de la fonction des progéniteurs, et ont permis la mise en avant de cette voie dans la pathogénèse des NMP182, 183. En effet, une activation anormalement forte de la voie PI3K-AKT induit une érythropoïèse dérégulée et une résistance à l'apoptose, caractéristiques de la PV.

5.4 La voie des MAPKs :

Trois grands groupes de MAPK activés en aval de JAK2 ont été mentionnés chez les mammifères : ERK1/2, JNK et p38MAPK. Chaque ensemble de MAPK se compose de différentes cascades de kinases dans lesquelles la phosphorylation de MAP3K (ou MEKK) et active MAP2K (ou MEK), qui à son tour stimule l'activité MAPK.

Lors de cette activation, MAPK phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans la prolifération, différenciation et survie cellulaire (Gautier ; 2011).

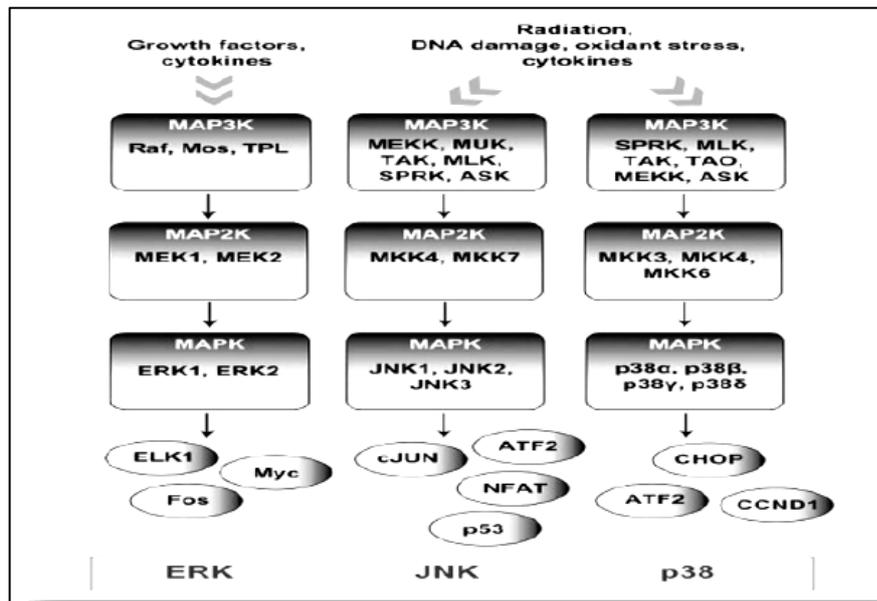


Figure10 : la voie des MAPKs

6 La mutation JAK2V617F :

La mutation JAK2 V617F est une mutation gain de fonction .cette dernière est située dans l'exon 14 du gène JAK2 aboutit à la substitution d'une guanine par une thymine en position 1849. Au niveau protéique, cela se traduit par la substitution d'une valine en phénylalanine au niveau du codon 617

Le codon 617, localisé sur l'exon 14, est une position importante dans l'interface entre les domaines JH1 et JH2. Le changement d'une valine par une phénylalanine à cette position entraîne l'inhibition de JH2 sur le domaine catalytique JH1 et donc une activation constitutive de JAK2. (Bellanné-Chantelot C *et al* ;2006)

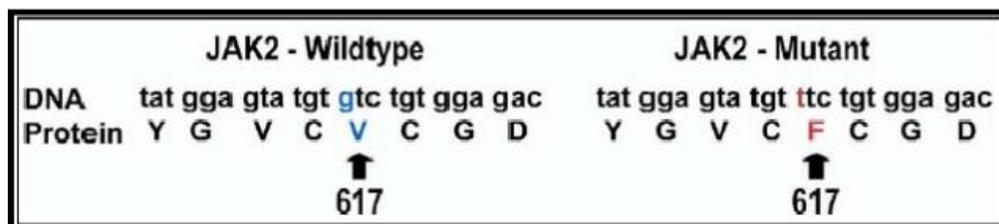


Figure11 : Mutation JAK2 V617F dans un échantillon de PV (Levine *Ret al* ; 2005)

La séquence d'ADN et la traduction des protéines à la fois pour les allèles JAK2 de types sauvage et mutant. La substitution d'une guanine par une thymine qui se traduit par la substitution d'une valine par une phénylalanine au niveau du codon 617 (Levine *Ret al* ; 2005)

7 Mutations du récepteur à la thrombopoïétine (MPL) :

Suite à la découverte de la mutation V617F de JAK2, d'autres mutations ont été recherchées pour les patients JAK2V617F négatifs. La première mutation somatique de MPL, le récepteur à la TPO a été identifié en 2006 (Y. Pikman *et al* ; 2006).

MPL est un récepteur oncogénique génétiquement localisé en 1p34. La traduction de ses 12 exons permet la synthèse d'une protéine d'environ 70 kDa.

JAK2 Co-localise avec MPL dans le RE, permettant le transport de MPL à la membrane plasmique (C. Cleyrat *et al* ; 2014). La TPO va se fixer à la partie extramembranaire de MPL et permettre la phosphorylation de molécules de signalisation telle que STAT3 et STAT5. (J. G. Drachman&K. Kaushansky ; 1997).

La mutation MPL est retrouvée chez environ 10% des patients PMF (F. Passamonti&M. Maffioli ; 2016). Il existe différentes sortes de mutations dont les plus fréquentes sont localisées au niveau de l'exon 10 et plus particulièrement sur l'acide aminé tryptophane en position 515 (W515) ; ce motifs joue un rôle crucial pour le maintien du récepteur dans une conformation inactive en absence de ligand (E. Rumi *et al* ; 2014). On recense 4 substitutions différentes du résidu tryptophane dont les principales retrouvées sont les mutations MPLW515L et MPLW515R (Y. Pikman, *et al* ; 2006). Ces mutations entraînent l'indépendance du récepteur à régulation par la TPO et son activation constitutive. Plus particulièrement, après le recrutement de JAK2 dans le RE, MPLW515L migre à la membrane cytoplasmique et active constitutivement les voies de signalisation JAK2 (C. Marty *et al* ; 2009). La mutation MPLS505N est également décrite dans les thrombocytoses familiales et conduit également à une activation de la voie de signalisation de la tyrosine kinase JAK2 (**figure12**) La voie TPO/MPL avait déjà été identifiée comme pouvant être un mécanisme moléculaire important dans la mise en place de la MF

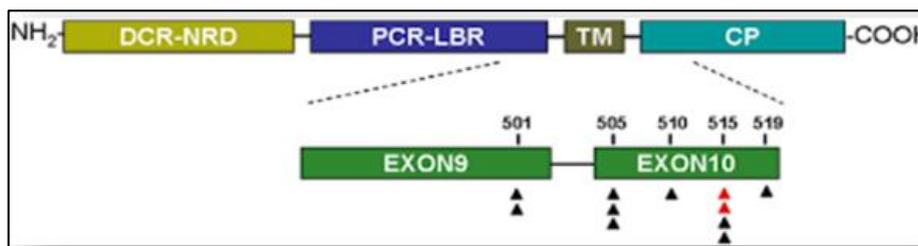


Figure 12: Représentation du gène MPL et de ces mutations (Gong *et al* ; 2013).

8 Mutation de calréticuline « CALR » :

La CALR est une protéine chaperon de 46kDa qui réside dans le lumen du RE. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires incluant la régulation de l'homéostasie calcique et le repliement de glycoprotéines émergentes. (M. Michalak *et al* ; 2009). Elle est localisée en 19p13.2 et code pour 9 exons.

Les mutations CALR activent en leur partie extracellulaire le récepteur MPL et faiblement le récepteur G-CSFR. Ils induisent la dimérisation et l'activation

constitutive de JAK2 ainsi que les voies de signalisation en aval telles que les voies des STAT 1/3/5, de PI3-K et des MAPKs. La structure de la calréticuline et la localisation des mutations sont représentées. (W. Vainchenker & R. Kralovics ; 2016).

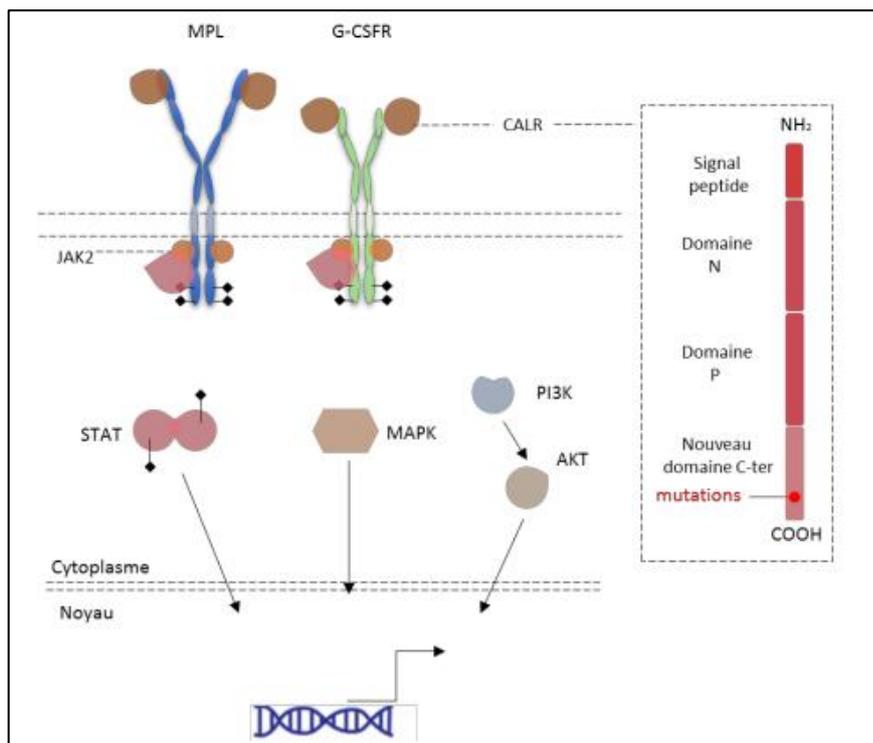


Figure 13 : Rôle des récepteurs aux cytokines dans la signalisation CALR (W. Vainchenker & R. Kralovics ; 2016)

Les autres mutations des voies de signalisation des récepteurs des cytokines qui ont été décrites comme : la mutation de JAK2 au niveau de l'exon 12.

3) Traitement des SMP Classiques:

Le traitement de SMP Classiques repose généralement sur différentes manières que l'on peut distinguer :

➤ Les agents cytoréducteurs :

Plusieurs agents cytoréducteurs ont l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) selon la commission de transparence de la Haute Autorité de Santé HAS, dans les syndromes myéloprolifératifs hors LMC.

1-L'**anagrélide (Xagrid®)** est un médicament pour fonction de réduire le taux de plaquettes élevé en deuxième intention dans les TE, et a obtenu l'AMM en 2004 dans cette indication. Donc c'est un inhibiteur de l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique phosphodiesterase III. (Wagstaff AJ, Keating GM ; 2006)

2- L'**hydroxyurée (Hydréa®)** est un médicament ayant eu l'AMM dans les SMP en 1968. Il est administré per os, gélule de 500mg, en traitement d'attaque, puis d'entretien pour maintenir un hémocrite < 45%. Il agit en interférant sur la synthèse de l'ADN par une action inhibitrice sur la ribonucléotide réductase. (Antonioli ET .*et al* ; 2012)

3-**Le pipobroman (Vercyte®)** est un agent anti néoplasique de la classe des alkylants, qui a obtenu l'AMM dans les PV en 1983. Ce médicament est administré per os, en comprimé de 25 mg. Sa tolérance hématologique est bonne, mais de rares cas il décrit l'insuffisance médullaire (Fabris F, Randi ML ; 2009)

4-**L'interféron alpha 2a-pégylé (Pégasys®)** est un inhibiteur de la prolifération des cellules souches pluripotentes et des progéniteurs hématopoïétiques, indiqué dans la PV. Il est le seul traitement pouvant être utilisé chez la femme enceinte. (Kiladjian J-J. *et al* ; 2011)

Il y a des traitements parfois utilisés, en cas de résistance ou de non réponse en particulier à l'hydroxyurée, n'ont pas obtenu l'AMM dans les SMP. Ceci concerne les interférons, le busulfan, le phosphore 32, le 6-Mercaptopurine (6MP), la thalidomide et la lenalidomide.

➤ **Les thérapies ciblées :**

Une molécule récente a obtenu l'AMM en 2012 : **le ruxolitinib (Jakavi®)**. C'est un inhibiteur sélectif mais non spécifique des protéines kinases JAK1, JAK2 et JAK3. Il est indiqué dans les MF chez l'adulte présentant une splénomégalie et des signes généraux, et en deuxième intention dans les PV résistantes ou intolérantes à l'hydroxyurée. Les patients randomisés dans le bras ruxolitinib ont présenté une survie plus longue par rapport aux patients n'ayant pas reçu le traitement. (Cervantes F.*et al* ; 2013)

➤ **La greffe de moelle osseuse :**

La greffe de moelle osseuse est d'une manière générale réservée à la MFP. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est réservée aux patients jeunes en raison de sa toxicité importante. Généralement proposée aux patients de moins de 55 ans. L'allogreffe à conditionnement réduit peut être proposée aux patients de plus de 55 ans, cependant avec 37% de mortalité et 36% de rechute à un an de la greffe, soit une survie à 1 an de 55%.

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire et Cellulaire, nous avons effectué un stage au service de Laboratoire Centrale de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé en Lutte Contre le Cancer ZABANA-BLIDA, dans l'unité de Biologie moléculaire pendant une période s'étalant de Mars à Septembre 2022.

Partie

Expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

Objectif de l'étude :

Cette étude prospective a pour objectif la recherche de la mutation V617F dans le gène JAK2 et du transcrit BCR-ABL par la PCR en Temps Réel chez les patients avec suspicions d'une des pathologies parmi les Syndromes Myéloprolifératif Chronique (SMP).

I. MATERIEL

I.1. MATERIEL BIOLOGIQUE :

Population d'étude :

Notre étude a porté sur 14 patients chez lesquels une SMP a été suspectée (10 patients suspectées avec une LMC et 4 patients suspectées avec Polyglobulie de vaquez), de différents âges, et de deux sexes, suivis au niveau du service d'hématologie de C.A.C de Blida.

Information sur les patients:

Une fiche de renseignement a été remplie pour chaque patient par le médecin traitant incluant des informations sur son âge, le sexe, région d'origine, la date de prélèvement, les différentes manifestations clinico-biologiques et l'examen demandé (la recherche de la mutation JAK2 V617F et du transcrit BCR-ABL1) (**Annexe**)

L'anonymat et la confidentialité des informations ont été rigoureusement respectés.

Le prélèvement :

On a prélevé deux tubes de sang total sur EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) , pour l'extraction des acides nucléiques:

- L'ADN (pour le dépistage de mutation JAK2) <1semaine. conservation des échantillons des patients à +4°C ou -20°C pour une utilisation ultérieure. Le sang total est décongelé à température ambiante avant l'extraction d'ADN.
- L'ARN (pour le dépistage de mutation BCR-ABL) dans le même jour

On mentionne sur les tubes le nom et prénom de chaque patient, la date du prélèvement ainsi que le numéro attribué par le laboratoire

II. METHODES:

1) Traitement des échantillons:

a)Extraction des acides nucléiques:

- **Extraction de l'ADN:** Le gène JAK2

Protocole d'extraction par kit invitrogène :

- Ajouter 200 µl de sang total, dans un eppendorf stérile ;
- Rajouter 20 µl de protéinase K ;
- Rajouter 20 µl de RNase A (lyses solution) ;
- Vortexer, laisser 2mn à température ambiante ;
- Rajouter 200 µl de pure link genomic lysis / binding buffer, vortexer ;
- Mettre au bain marie pendant 10 min à 55° C ;
- Rajouter 200 µl d'éthanol (96-100 %) au lysat ;
- Vortexer pendant 5 secondes ;
- Transvaser le lysat dans une colonne stérile ;
- Centrifuger à 10000 g pendant 1 min ;
- Placer la colonne dans la première poubelle ;
- Rajouter 500 µl du tampon 1 WASH BUFFER1 ;
- Centrifuge à 10000 g pendant 1 min à une température ambiante ;
- Placer la colonne dans la deuxième poubelle ;
- Rajouter 500 µl du tampon 2 WASH BUFFER2 ;
- Centrifuger à 14000 g (vitesse maximale) pendant 3 min à température ambiante ;
- Placer la colonne dans un eppendorf stérile ;
- Rajouter 25-100 µl de solution d'élution (pure link genomic élution buffer) ;
- Incuber pendant 1 min a température ambiante ;
- Centrifuger à 14000g pendant 1 min à température ambiante ;
- L'eppendorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne).

- **Extraction de l'ARN :** le transcrit BCR-ABL.

Principe:

Le kit «**ivitrogene by thermo fisher scientific LeuKoLOCK Total RNA system**» est optimisé pour une utilisation avec le sang total humain. C'est une méthode de fractionnement du sang total.

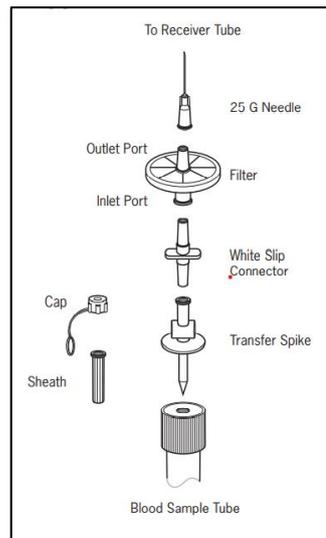
Le système LeukoLOCK intègre une technologie de filtrage qui permet de capturer les leucocytes par affinité entre les membranes de filtre et les globules blancs.

Mode opératoire:**Préparation des réactifs :**

- 1) Solution de lavage 1 : reconstituer avec 10ml de l'isopropanol et bien mixer
- 2) Solution de lavage 2/3 : reconstituer avec 40ml de l'éthanol et bien mixer
- 3) Enlever le bouchon des flacons contenant le tampon PBS et le RNA Later et remplacer le par le Rubber Septum Cap puis placer le Transfer Spike à travers le Rubber.
- 4) Filtrer toutes les solutions à travers LeukoLOCK Filter du « inlet (flared) port to the outlet (tapered) port »
- 5) Préparer la solution pH-adjusted Lysis/Binding Solution .Puis mélangé brièvement au vortex. Préparez seulement la quantité nécessaire pour une utilisation immédiate.

Préparation de l'échantillon :

- 1) Collecter le sang total des maladies dans des tubes contenant de l'EDTA K2.
- 2) Faire l'assemblage comme suit :

**Figure 14 : L'assemblage de filtre LeukoLOCK**

- 3) Filtration du sang total : le LeukoLOCK Filter capturent la totalité des leucocytes alors que les plaquettes le plasma et les GR sont éliminés :
 - a) Faire le montage : Transfer Spike + white Split connecteur + filtre + aiguille.
 - b) Fixer le montage en premier dans le tube contenant l'échantillon sanguin.

- c) Retourner l'ensemble (tube échantillon/filtre LeukoLOCK) et piquer aiguille dans un tube sec sous vide (récepteur tube).
 - d) Laissez tout le sang filtrer à travers le filtre LeukoLOCK. Le processus de filtration prend généralement ~ 2 min.
 - e) Retirez le filtre LeukoLOCK de l'assemblage. L'aiguille peut être laissée dans le tube contenant le filtrat (pauvre en leucocytes).
- 4) Récupérer le filtre du montage
 - 5) Attachez une seringue de 3 ml ou 5 ml au Transfer Spike sur le flacon de PBS, inverser le flacon et prélever 3 ml.
 - 6) Fixez ainsi la seringue de PBS au filtre LeukoLOCK et rincez le filtre avec le PBS à un taux d'environ 3 à 5 gouttes/seconde (cette étape élimine les GR résiduels). Récupérez les PBS dans un conteneur de déchets biologiques
 - 7) Attachez une seringue de 3 ml ou 5 ml au Transfer Spike sur le flacon de RNA Later, inverser le flacon et prélever 3 ml.
 - 8) Fixez ainsi la seringue de RNA Later au filtre LeukoLOCK et rincez le filtre avec le RNA Later à un taux d'environ 3 à 5 gouttes/seconde (cette étape stabilise le RNA)
 - 9) Détachez la seringue du filtre en laissant le filtre saturé de RNAlater : ne pas expulser tout le RNAlater du LeukoLOCK
 - 10) Scellez les ports du filtre LeukoLOCK avec la gaine et le bouchon à vis de la pointe de transfert.
 - 11) Conserver le filtre LeukoLOCK avec des leucocytes stabilisés à température ambiante jusqu'à 3 jours, ou à -20°C ou -80°C pour un stockage de longue durée (plusieurs mois).

Traitement des filtres LeukoLOCK et lyse cellulaire :

- 1) Si le filtre LeukoLOCK avec les cellules capturées a été stocké au congélateur, laissez décongeler à température ambiante pendant ~ 5 min avant de continuer
- 2) Retirez les fermetures du filtre LeukoLOCK.
- 3) Fixez une seringue de 1 ml ou 3 ml, avec le piston rétracté, au port d'entrée du filtre LeukoLOCK, puis appuyez sur le piston pour expulser l'ARNlater résiduel du filtre et des ports.
En règle générale, environ 8 à 10 gouttes de RNAlater sont expulsées du filtre Leuko LOCK.
- 4) Pour lyser les leucocytes et récupérer l'ARN il faut :

- a) Remplir la seringue avec 2,5 ml de pH-adjusted Lysis/Binding Solution..Utilisez une aiguille de gros calibre pour retirer la solution; retirer l'aiguille avant de passer à l'étape suivante.
- b) Fixez la seringue avec la solution de pH-adjusted Lysis/Binding Solution à inlet (flared) orifice du filtre et appuyez sur le piston de la seringue pour passer la solution de pH-adjusted Lysis/Binding à travers le filtre et recueillir le lysat dans un Tube conique de 15 ml.
- c) Le processus devrait prendre 5 à 10 secondes. Déconnectez la seringue, rétractez le piston, puis reconnectez-la au filtre LeukoLOCK. Appuyez sur le piston pour expulser les gouttes résiduelles de lysat cellulaire dans le même tube.

NB : Vous pouvez refaire la même procédure plusieurs fois.

Le lysa cellulaire peut être congelé à -80°C.

5) Pour dégrader les protéines cellulaires il faut :

- a) Ajouter 2,5 ml Nuclease-free Water lysat recueilli et mélanger au vortex.
- b) Ajouter 25 µL de protéinase K.
- c) Agiter le mélange manuellement pendant 5 min à température ambiante.

Isolation de l'ARN :

- 1) Mélanger 50 µL RNA Binding Beets et 2,5 mL100 % d'isopropanol à la solution d'ARN, et incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- 2) Centrifuger à 2000 x g pendant 3 min.
Nombre de tours par minute = racine carrée de (g / (0,00001118 x rayon en cm))
- 3) Eliminer le surnagent.
- 4) Laver avec 1,2 ml de la Solution 1 et transfert la lysa d'ARN dans un Eppendorf (cette étape se fait en deux fois) :
 - a) Ajouter 600µl de la solution 1, vortexer puis mélangé avec la pipette
 - b) Transfert la lysa dans un Eppendorf
 - c) Refaire les étapes 4a et 4b une deuxième fois en ajoutant 600µl de la solution 1 et transfert dans le même Eppendorf
- 5) Centrifuger l'échantillon pendant 15 à 30 secondes dans une microcentrifugeuse à environ 16 000 x g.
- 6) Eliminer le surnagent
- 7) Laver les billes de liaison à l'ARN avec 750 µL de lavage Solution 2/3
- 8) Remettre les billes en suspension à l'aide d'une pipette

- 9) Centrifuger l'échantillon pendant 15 à 30 secondes dans une microcentrifugeuse à environ 16 000 x g
- 10) Eliminer le surnagent et laisser sécher pendant environ 2 à 3 minutes
- 11) Eluer l'ARN en ajoutant 50µl ou 100µl de la solution d'éluion

NB !: le volume de la solution d'éluion ajouté dépend de la quantité d'ARN obtenue : si petit culot ajouter 50µl ; et si un grand culot ajouter 100µl.

- 12) Laisser agir pendant 05 min à T° ambiante.
- 13) Centrifuger l'échantillon pendant 15 à 30 secondes dans une microcentrifugeuse à environ 16 000 x g
- 14) Récupérer le surnageant dans un deuxième Eppendorf
- 15) L'ARN ainsi isolé et soit utilisé immédiatement ou conserver à -20°C

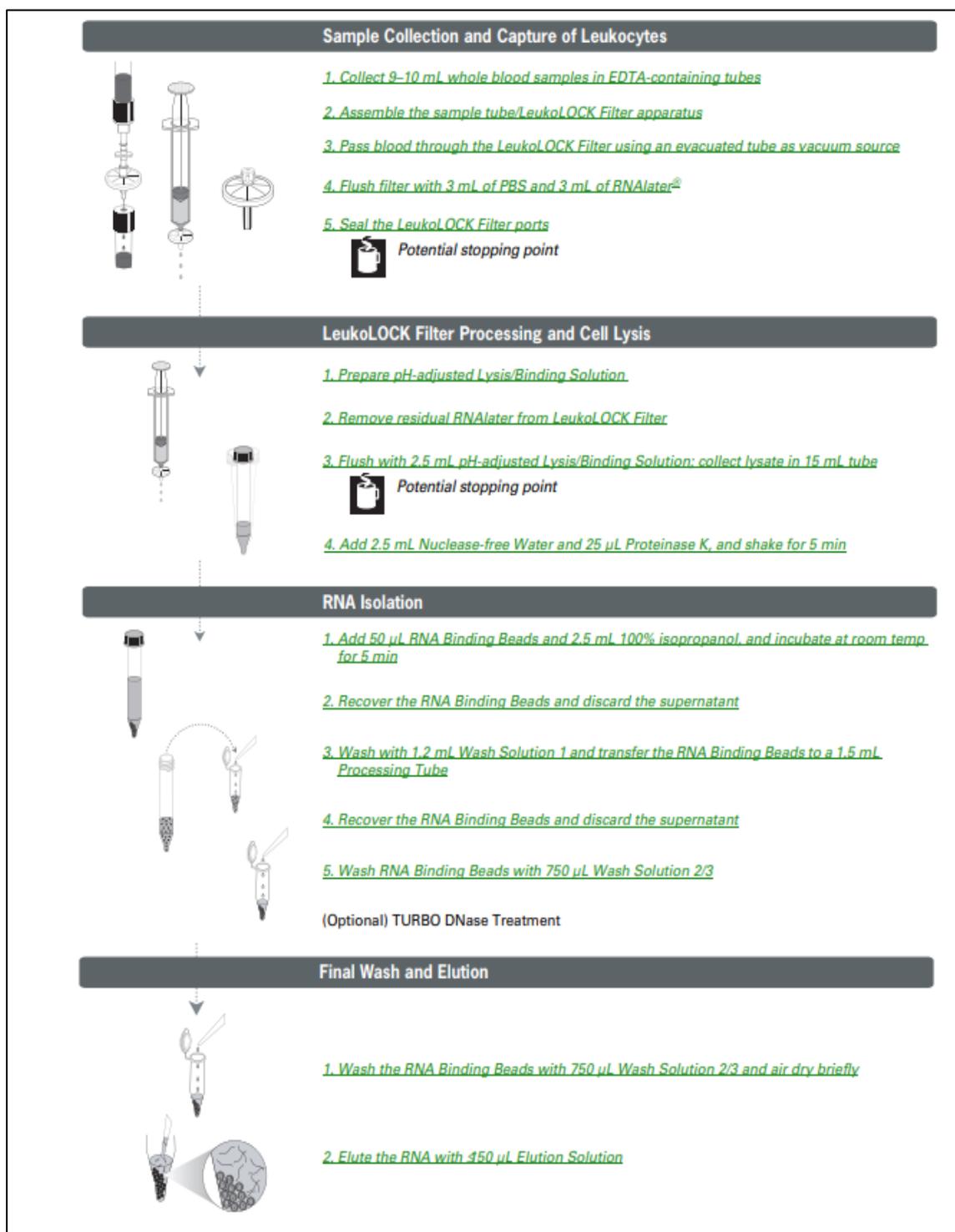


Figure 15 : Résumé des étapes d'extraction d'ARN

b) Dosage des acide nucléiques :

Pour l'évaluation de la quantité suffisent et la bonne qualité de l'ADN/ARN, Après l'extraction d'ADN/ARN, il est nécessaire de mesurer la concentration de l'ADN/ARN obtenu ; ce dosage est effectué sur un spectrophotomètre, QuikDrop Molecular Devices.

L'ADN/ARN est ensuite congelé à -20°C pour être conservé dans des conditions optimales. Un ADN pur doit présenter un dosage compris entre 10 et 50ng/ml, Un ARN pur doit présenter un dosage > 5 ng/ml

B) Reverse transcription : pour la population avec LMC**Principe:**

C'est le processus de conversion de l'ARNm extrait d'échantillon en ADNc en utilisant une enzyme appelée : Reverse Transcriptase.

Mode opératoire:

- Laisser les composants du kit décongeler sur la glace
- Préparer the RTmaster mix dans un bain de glace selon le protocole

Tableau 08 : protocole de RT master mix

Composition (Without RNase Inhibitor)	Volume
10X RT Buffer	2.0µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8µl
10X RT Random Primers	2.0µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0µl
Nuclease-free H2O	4.2µl
Total per reaction	10.0µl

- Placer le master mix 2X RT sur de la glace et mélanger doucement
- Mettre 10µL de RNA des patients dans quelques puits
- Couvrir la plaque avec un film adhésif
- Bien mélanger afin d'éliminer d'éventuelles bulles d'airs
- Placer la plaque dans le thermocycler
- Régler le Template

Tableau 09: plan de Template de PCR

Settings	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temp.	25°C	37°C	85°C	4°C
Time	10 minutes	120 minutes	5 minutes	∞

C) PCR en temps réel:

- **PCR en temps réel qualitatif (le dépistage, Test de présence /absence mutation) :**

Pour la détection de mutation JAK2 V617F on a utilisé le kit (**TaqMan Mutation Detection Assays**) dans des échantillons de l'ADN extraire de sang total des patients.

Protocole:

Avant la mise en place de la PCR tous les composants doivent être mélangés et centrifugé brièvement pour rassembler la solution au fond;

Pour la réaction PCR on doit préparer pour chaque patient deux mélanges PCR selon les sondes :

Un mélange avec sonde VF

Un mélange avec sonde référence WT

Le gène WT (gène sain) est amplifié en tant que contrôle interne afin de vérifier la pureté des réactifs et le bon fonctionnement de l'amplification.

On prépare le mélange PCR pour $n+1$ échantillon, le mélange contient les composants suivants:

Tableau 10: Mélange réactionnel de la PCR en temps réel qualitative.

réactifs	Volume (en μ l)
PCR reaction mix	Volume per 20
2x TaqMan Gene Expression Master mix	10,0 x $n+1$
20x TaqMan Mutation Detection Assay (*3)	1,0 x $n+1$
ADNc des patients	4x $n+1$
H2O Nucléase Free	5 x $n+1$

Une fois le mélange PCR est préparé, on vortex et on dépose 22 μ l par puits, pour chaque patient on remplit deux puits, l'un correspond à un mélange avec sonde WT, et l'autre

correspond à un mélange avec sonde VF. Après la répartition du mélange on ajoute 1,25 µl d'ADN du patient par puits.

On scelle la plaque par un film adhésif optique puis on élimine les bulles d'air. A la fin on place la plaque dans l'instrument Applied Biosystems Real-Time PCR System. Et on a utilisé (ipsogen JAK2 MutaSearch Kit 24, V1) par le même principe.

- **PCR en temps réel qualitatif pour le dépistage de type de mutation chez les patients suspect d'une LMC :**

Principe de kit :

Le kit (**TaqMAN Gene Expression Assays**) est prévu pour la détection qualitative des transcrits de fusion BCR-ABL p210 dans des échantillons d'ADNc extraire de sang total des patients.

Protocole:

Avant la mise en place de la PCR tous les composants doivent être mélangés et centrifugé brièvement pour rassembler la solution au fond

Pour la réaction PCR on doit préparer pour chaque patient deux mélanges PCR selon les sondes :

Un mélange avec sonde BCR-ABL

Un mélange avec sonde référence ABL

Le gène ABL est amplifié en tant que contrôle interne afin de vérifier la pureté des réactifs et le bon fonctionnement de l'amplification.

On prépare le mélange PCR pour n échantillon(le mélange contient les composants retrouvé dans **(Tableau 10)**).

Une fois le mélange PCR est préparé, on vortex et on dépose 22 µl par puits, pour chaque patient on remplit deux puits, l'un correspond à un mélange avec sonde BCR-ABL, et l'autre correspond à un mélange avec sonde ABL. Après la répartition du mélange on ajoute 1,25 µl d'ADNc du patient par puits.

On scelle la plaque par un film adhésif optique puis on élimine les bulles d'air. A la fin on place la plaque dans l'instrument Applied Biosystems Real-Time PCR System.

- **PCR en temps réel quantitative (La quantification) :**

Le kit BCR-ABL P210 (Mbc) (**ipsogen BCR-ABL1 M bcr IS-MMR Kit**) est prévu pour la détection quantitative des transcrits de fusion BCR-ABL p210 (b2a2 et b3a2), et le kit (m BCR) (**ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit**) est pour la détection quantitative des transcrit de fusion BCR-ABL p190, dans des échantillons de sang périphérique de patients pour lesquels un diagnostic de leucémie Myéloïde Chronique (LMC) a été établi.

Ce kit utilise un jeu d'amorces et des sonde d'hydrolyses marquées, une sonde marquée FAM pour détecter et quantifier la présence du transcrit de fusion BCR-ABL et une sonde marquée VIC pour détecter et quantifier l'amplification d'ABL comme contrôle interne. Cela permet au kit d'utiliser la quantification comparative (méthode Pfaffl) pour déterminer les ratios gène cible /gène de référence, sans recourir à la réalisation d'une gamme de standards avec un nombre de copies connu.

Ce kit a été formulé pour réaliser avec une haute reproductibilité, la synthèse d'ADNc premier brin suivie d'une PCR en temps réel, dans un seul tube.

Avant de procéder à cette étape la surface de travail et l'équipement qui devront être utilisés dans la zone ont été nettoyés et décontaminés par l'éthanol 70%.

On doit retirer les réactifs de leur lieu de conservation, on les Centrifuge pendant 10 s à 2 000.

Un mélange réactionnel pour plusieurs échantillons (y compris les contrôles positifs et négatifs) doit être pré-mélangé en Master mix.

Le Master mix est préparé pour un nombre d'échantillons n en duplicata, il contient les composants comme il est montré dans le protocole (**Annexe**)

- Préparation de mélange : 12,5µL master mix + 6,5 µL de RNAase free H₂O + 1 µL PPC ABL /BCR-ABL
- Dans une plaque de PCR verser 4 µL de standar d'ADN
- Ajouter 4 µL d'ADNc de patient et le mix de mutation positif
- Placer la plaque dans l'automate pendant 1h16 min
- Lire les résultats
- Calculer le ratio : nombre de gène saine/ nombre de gène muté

Lecture et interprétation :

L'analyse des données se fait après affichage des traces d'amplification de l'ensemble de la plaque et définition des valeurs de référence et de seuil

Les résultats qualitatifs sont représentés sous forme d'une courbe d'amplification où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

Pour BCR-ABL :

- Résultats BCR -ABL négative : aucune amplification n'a été détectée ce qui signifie l'absence de gène cible BCR-ABL
- Résultats BCR-ABL positive : se traduit par une courbe d'amplification de gène cible. Cette amplification sera visualisée dès le 20^{ème} cycle.
- Résultats du contrôle interne ABL : le gène ABL est toujours amplifié autant que gène de référence exprimé dans la cellule normal.

Pour JAK2 :

- Résultats JAK2V617F négative : aucune amplification n'a été détectée ce qui signifie l'absence mutation de gène cible JAK2V617F
- Résultats JAK2V617F positive : se traduit par une courbe d'amplification de gène cible. Cette amplification sera visualisée dès le 20^{ème} cycle.
- Résultats du contrôle interne WT : le gène non muté WT est toujours amplifié autant que gène de référence exprimé dans la cellule normal.

Les résultats quantitative comparative pour le gène BCR-ABL, on a utilisé un kit pour la quantification est basé sur « la méthode de pfaffl » qui est un nouveau modèle mathématique a été présenté pour déterminer la quantification relative d'un gène cible par rapport à un gène de référence.

Le ratio d'expression relative est calculé uniquement à partir de l'efficacité (E) de PCR en temps réel et de la différence entre le Ct obtenues à partir des courbes d'amplification du gène cible et celui d'un gène de référence, (méthode du ΔCt).

E= l'efficacité de l'amplification

$C_{Ptarget}$ = Moyenne des Ct M-BCR du PC - moyenne des Ct M-BCR de l'échantillon

C_{Pref} = Moyenne des Ct ABL du PC - moyenne des Ct ABL de l'échantillon ;

Calcul de ratio BCR-ABL/ABL % : Les cycles seuils obtenus à partir des courbes d'amplifications sont utilisés pour calculer la moyenne de cycle seuil (CP) par le logiciel Excel

Nous avons calculé le ratio BCR-ABL/ABL pour chaque échantillon avec Microsoft Excel en utilisant la formule précédente. Afin d'obtenir des données comparables d'un laboratoire à l'autre, les résultats sont désormais exprimés selon une échelle internationale (IS pour international scale) grâce à des facteurs de conversion (FC) propres à chaque laboratoire.

Le ratio obtenu est multiplié par le facteur de conversion (CF) indiqué sur la notice spécifique pour chaque lot de contrôle positif utilisé dans la série, ensuite est multiplié par 100 afin d'obtenir le % ratio et calcule de NCN.



Figure 16: Exemple des courbes d'amplifications, de classeur Excel utilisé

Chapitre II

Résultats

Résultats:

Dans cette partie du mémoire, nous allons présenter, interpréter puis discuter les résultats obtenus concernant les aspects :

- Epidémiologiques (sexe, âge, origine géographique et type de pathologie).
- Moléculaires (mutation JAK2 V617F et BCR-ABL chez la population étudiée)

I. Caractéristiques démographiques de la population étudiée:

I.1. La population diagnostiquée par une LMC:

- Répartition des patients selon le sexe:

Dans notre série, les 10 patients au moment de diagnostic se répartissent en 6 femmes et 4 hommes, soit un sexe ratio (F/H 1,5) H/F 0,6. (**Figure 17**)

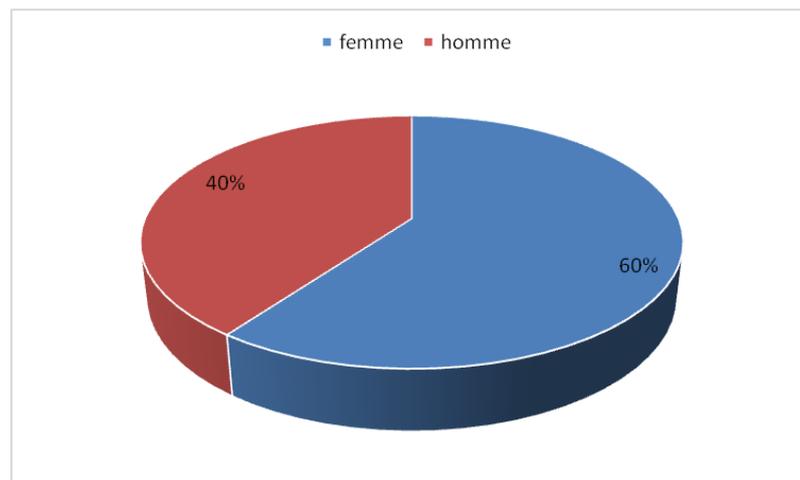


Figure 17: répartition des patients diagnostiqués avec une LMC selon le sexe

- Répartition des patients selon l'âge:

L'âge de nos patients au moment de diagnostic allait de 41 à 75 ans avec un âge moyen de 57 ans. (**Figure 18**)

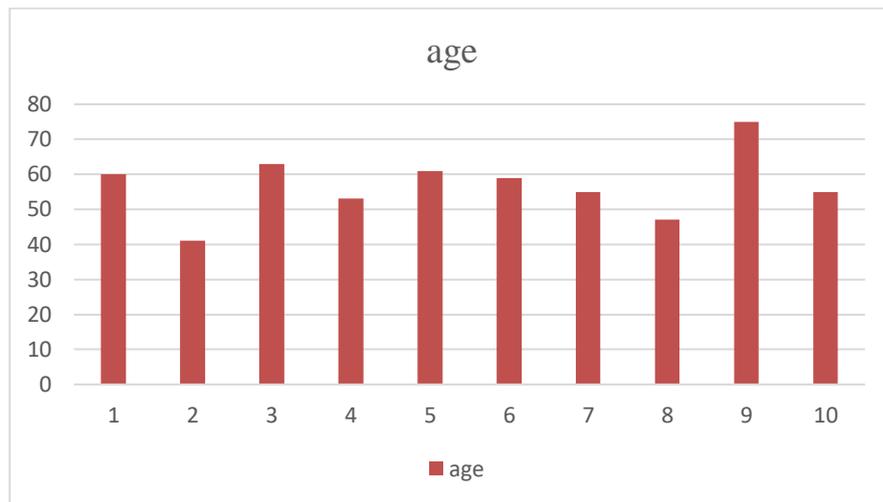


Figure 18 : Histogramme montrant la répartition des patients diagnostiqués avec une LMC en fonction de l'âge.

Tableau 11 : moyenne d'âge des patients diagnostiqués avec une LMC

	Moyenne (ans)	Ecart- type (ans)
Gène de fusion bcr-abl +	55.88	6.91
Gène de fusion bcr-abl -	61	19.8

- Répartition des patients selon l'origine géographique:

Sur l'ensemble des sujets présentant une LMC. 40% proviennent de la wilaya de DJELFA, 20% de la wilaya de MEDIA, 20% de la wilaya de BLIDA, 10% de la wilaya de TIPAZA et 1% de la wilaya de CHLEF. (**Figure 19**)

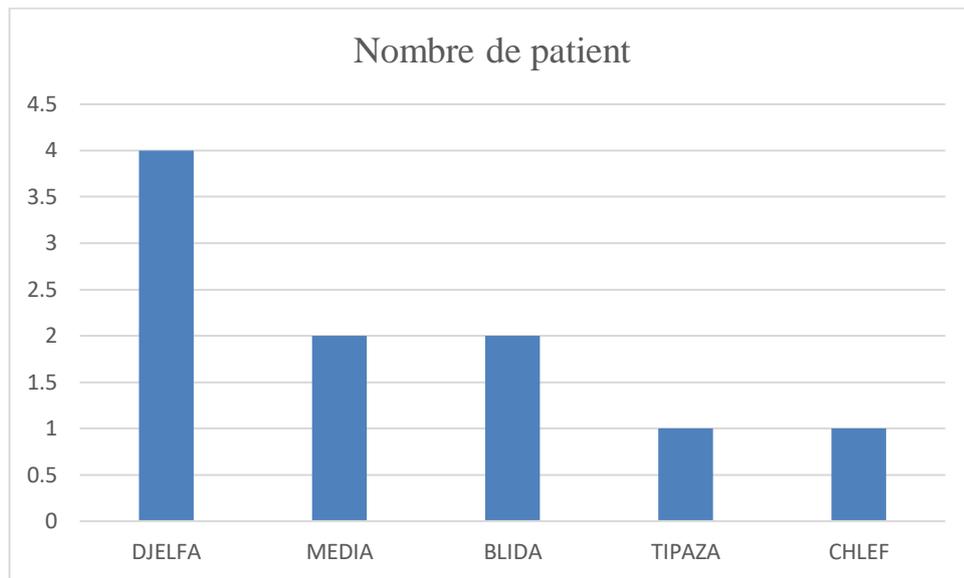


Figure 19 : Histogramme montrant la répartition des patients diagnostiqués avec une LMC en fonction de l'origine géographique.

I.2. La population diagnostiquée par un des SMP classique:

- Répartition des patients selon le sexe:

Dans notre série, les 4 patients au moment de diagnostic se répartissent en 2 femmes et 2 hommes, soit un sexe ratio H/F 1. (**Figure 20**)

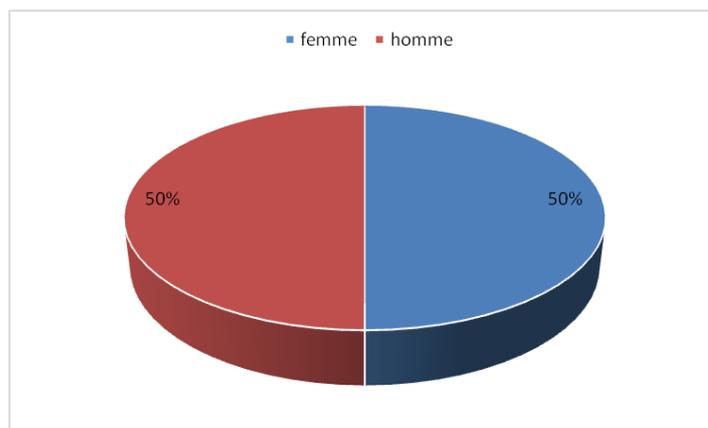


Figure 20: répartition des patients suspects d'un des SMP classique selon le sexe.

- Répartition des patients selon l'âge:

L'âge de nos patients au moment de diagnostic allait de 50 à 75 ans avec un âge moyen de 57 ans. (**Figure 21**)

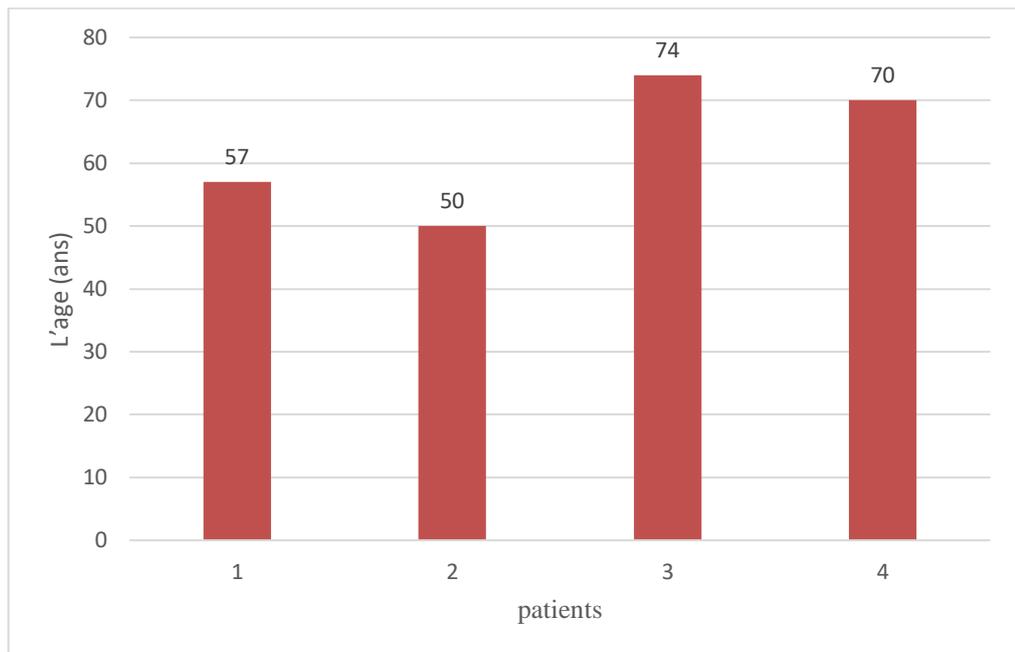


Figure 21 : Histogramme montrant la répartition des patients suspect d'un SMP classique en fonction de l'âge.

Tableau 12: Moyenne d'âge et écart-type et valeur P.

	Moyenne (ans)	Ecart-type (ans)	Valeur P
Mutation JAK2 V617F +	65.5	12.02	P= 0.12
Mutation JAK2 V617F -	60	14.14	

- Répartition des patients selon l'origine géographique:

Sur l'ensemble des sujets présentant SMP Classique suspect d'un PV. 50% proviennent de la wilaya de BLIDA, 25% de la wilaya de LAGHOUAT, 25% de la wilaya de TIMIMOUN.

(Figure 22)

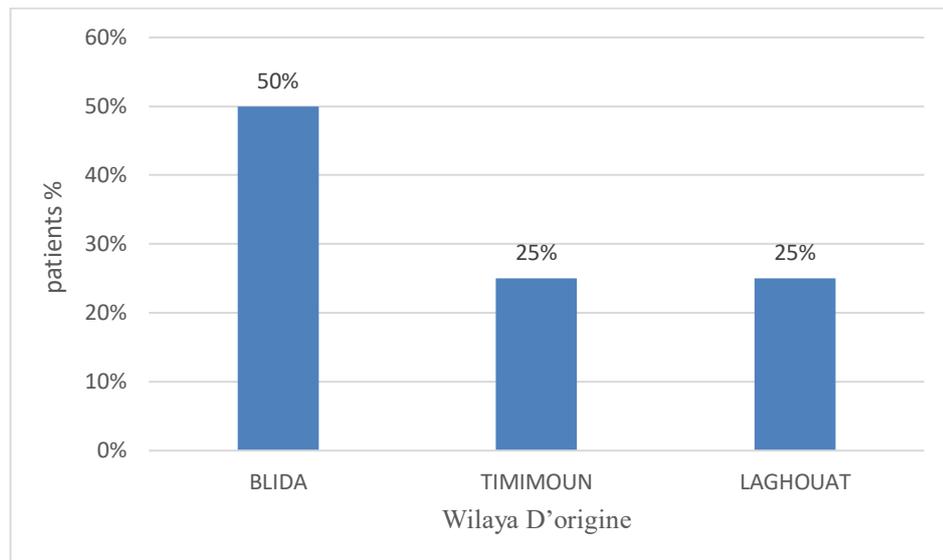


Figure 22 : Histogramme montrant la répartition des patients suspect d'un des SMP classique en fonction de l'origine géographique.

II. Caractéristiques clinico-biologiques au moment de diagnostic:

II.1. La population suspect d'une LMC :

✧ Répartition des patients selon les données cliniques:

La splénomégalie, la pâleur, et l'hypoxie étaient les motifs de consultation les plus élevés,

- La splénomégalie : C'est un critère majeur dans le diagnostiques chez la plus part des patient 80% suspect du LMC

Tableau 13 : répartition des patients selon le type et le % de SPMG.

	Présence de SPMG		Absence de SPMG
	Type III	Type IV	
Nombre des patients	6 patients (75%)	2 patients (25%)	2 patients (100%)
Total	100%		100%

- La taille du rat:

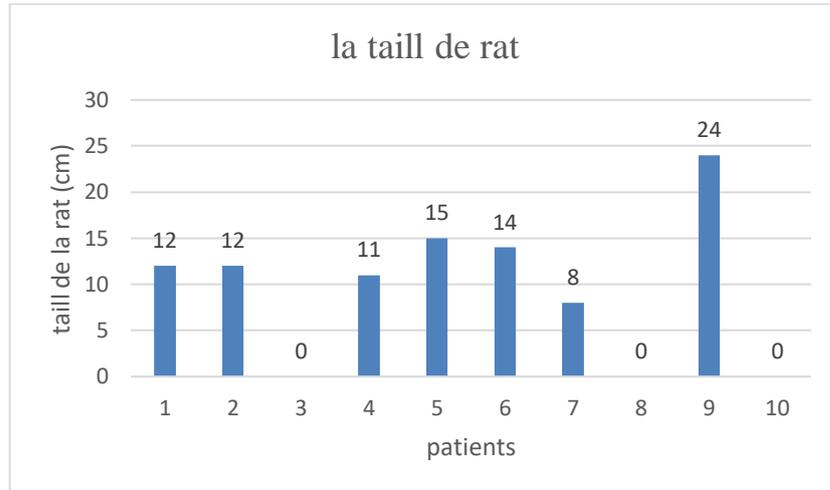


Figure 23 : un graphique représenté la dimension de rat (cm)

- ✧ Répartition des patients selon la donnée biologique:

1. Distribution des patients en fonction des données de l'hémogramme :

- L'hyperleucocytose :

Le taux des globules blancs GB variée entre 60770 et 640600 élément/mm³ avec une moyenne de 284589 élément/mm³ au diagnostic. 80% des patients avaient un taux d'hyperlococytose compris entre 100000 et 600000 élément/mm³.

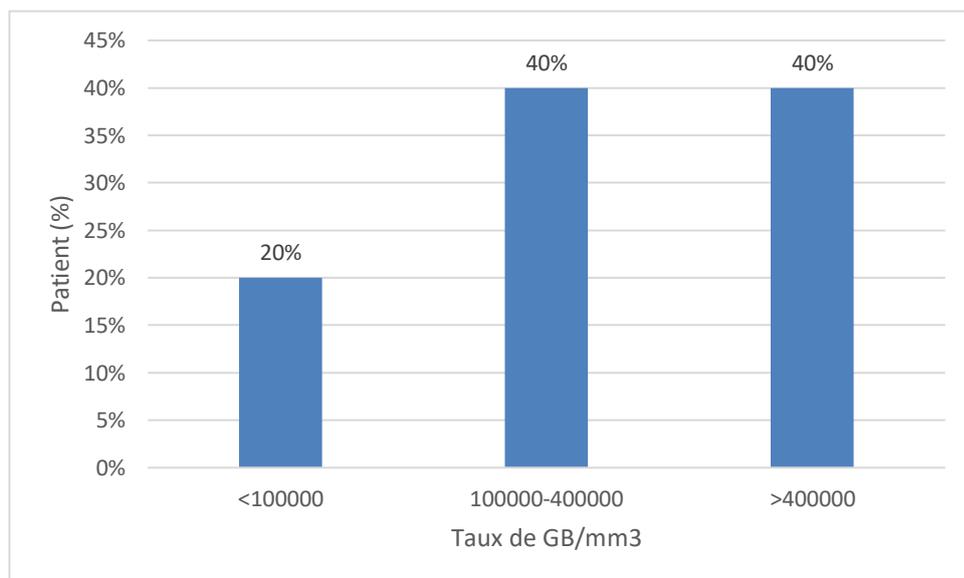


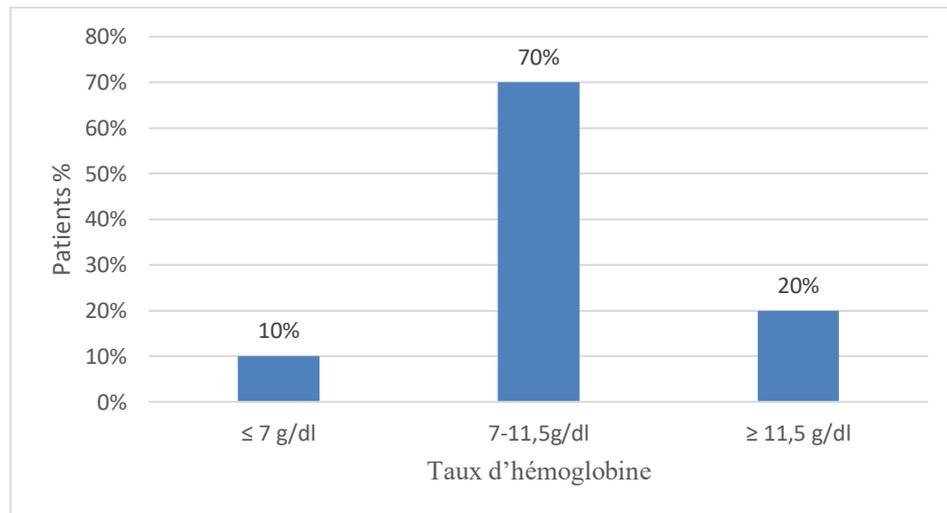
Figure 24 : Répartition des patients en fonction de taux des globules blancs.

Tableau 14: la moyenne des GB chez les patients diagnostiqué par une LMC

	Moyenne (éléments/mm ³)	Ecart-type (éléments/mm ³)
Gène de fusion bcr-abl +	340375	191238.50
Gène de fusion bcr-abl -	103635	60620.26

➤ L'hémoglobine:

Taux d'hémoglobine: la valeur moyenne de HGB est de : 11g/dl avec des extrêmes allant de 7g/dl à 14,1g/dl. L'analyse de nos résultats montre que 70% de nos malades ont une anémie comprise entre 7 et 11,4g/dl;

**Figure 25 :** distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine.**Tableau15 :** la moyenne d'hémoglobine chez les patients diagnostiqués avec une LMC

	Moyenne (g/dl)	Ecart-type (g/dl)
Gène de fusion bcr-abl +	10.43	1.70
Gène de fusion bcr-abl -	11.95	3.04

➤ les plaquettes :

Les taux des plaquettes varient entre 117000 éléments/mm³ et 386000 éléments/mm³ chez les patients de notre série. D'après l'analyse de plaquette 20% ont une thrombopénie, 20% ont un thrombocytose et 60% des patients ont un taux normal entre 130000 et 300000 éléments/mm³.

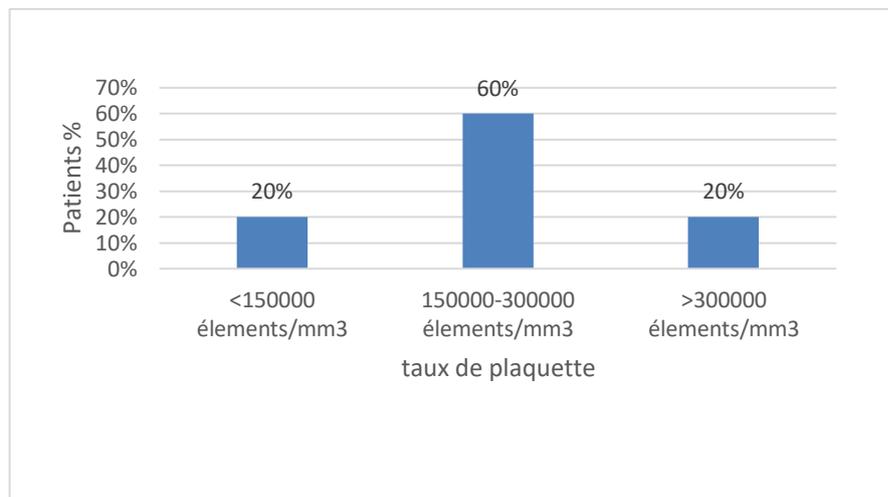


Figure 26 : distribution des patients en fonction de taux de plaquette

Tableau 16: la moyenne des PLQ des patients diagnostiqué par une LMC.

	Moyenne (éléments/mm ³)	Ecart-type (éléments/mm ³)
Gène de fusion bcr-abl +	213250	92340.59
Gène de fusion bcr-abl -	235000	25455.84

2. Distribution des patients en fonction des données de frottis sanguin:

➤ La myélémie :

L'examen de frottis sanguin montre la présence de cellules granuleuses immatures circulantes, le taux de cette myélémie était compris entre 23 et 62%. Dont 50% des patients avaient un taux entre 20 et 40%, et les 50% des patients avaient 40 et 60%.

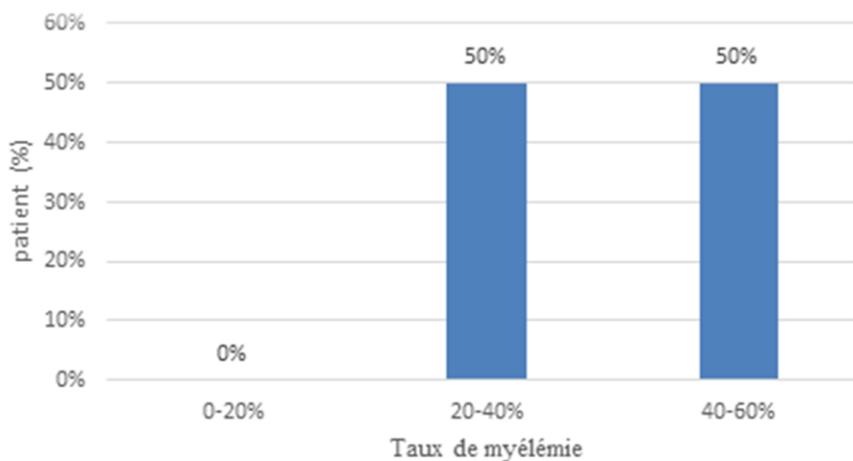
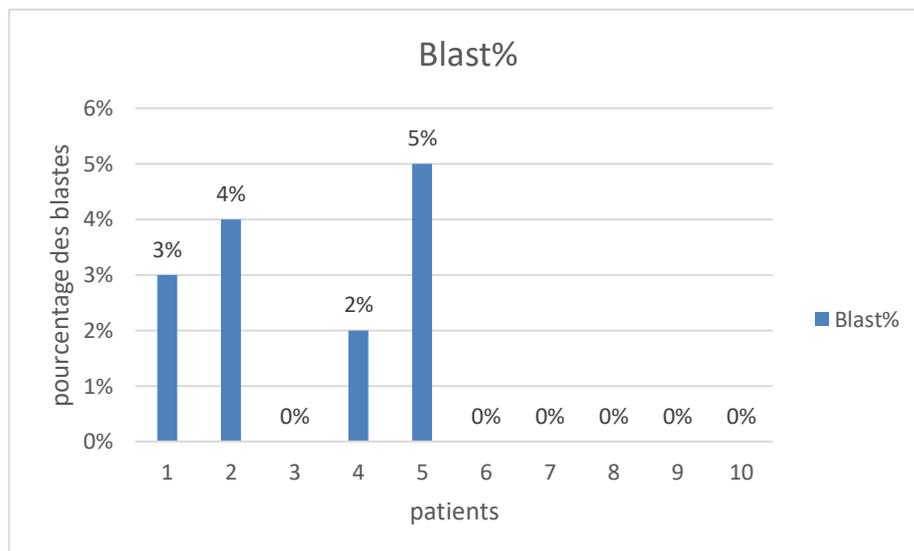


Figure 27 : la distribution des patents en fonction de taux de myélémie**Tableau 17**: la moyenne de taux de myélémie

	Moyenne (%)	Ecart-type (%)
Gène de fusion bcr-abl +	12	6.74
Gène de fusion bcr-abl -	0	0

➤ Taux des blastes :

Le taux des blastes varie de 0 à 5% (phase chronique) , la plus parts des patients avaient un taux de 0% .

**Figure 28** : Représentation de pourcentage des blastes**Tableau 18**: la moyenne des blastes chez les patients diagnostiqué avec une LMC.

	Moyenne(%)	Ecart-type(%)
Gène de fusion bcr-abl +	1.75	2.05
Gène de fusion bcr-abl -	0	0

II.2. La population suspect d'un des SMP classiques :

✧ répartition selon les données cliniques:

Répartition des patients selon les données épidémiologiques et les signes cliniques:

Cette analyse a pour but d'établir la fréquence des données épidémiologiques et les signes cliniques dans les deux catégories (les patients positifs qui présentaient la PV et les patients négatifs qui ne présentaient pas cette mutation). Les résultats sont compilés dans le tableau 30

Tableau 19 : résultats de comparaison des données épidémiologiques et les signes cliniques

MFP	JAK2 V617F positif	JAK2 V617F négatif
Nombre	02	02
Age moyen	65 ,5	60
Sexe ratio	01	01
HTA	2 (100%)	1(50%)
Céphalée	2 (100%)	/
Vertige	2 (100%)	/
Diabète	2 (100%)	1(50%)
Erythrose	2 (100%)	/
Asthénie	2 (100%)	/

✧ Répartition selon les données biologiques:

Distribution des patients en fonction de taux des globules rouges:

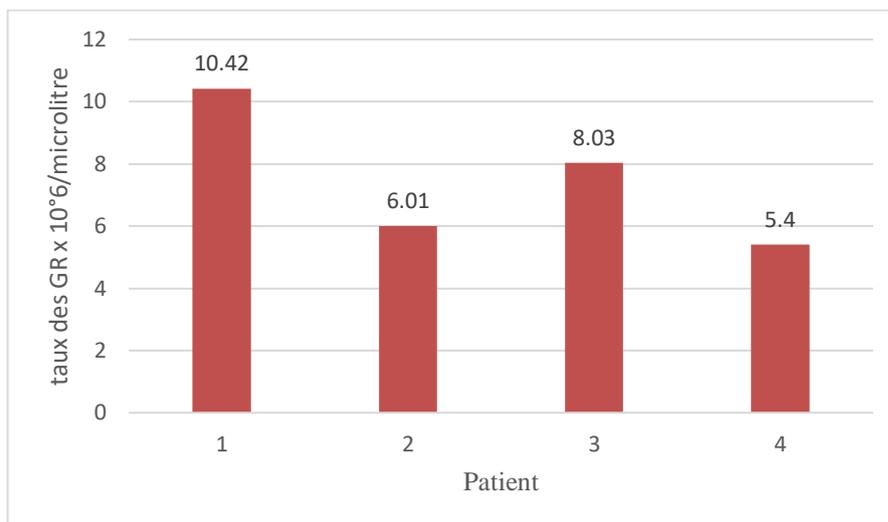


Figure 29 : le taux des globules rouge (x10⁶)/μl

Tableau 20 : la moyenne, écart-type, valeur P des GR

	Moyenne (x10 ⁶)/μl	Ecart-type (x10 ⁶)/μl	Valeur p
Mutation JAK2 V617F +	9.22	1.68	P=0.1
Mutation JAK2 V617F -	5.70	0.43	

La valeur P ne pas significatif

Distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine:

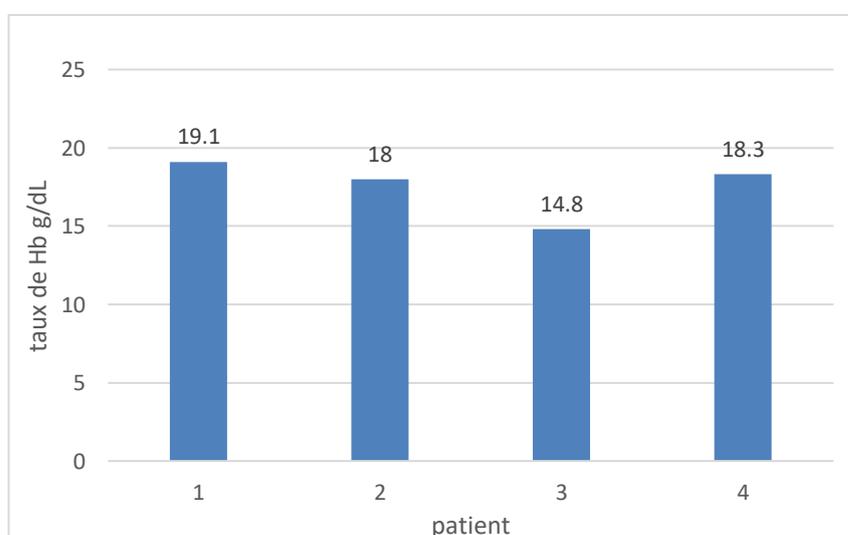
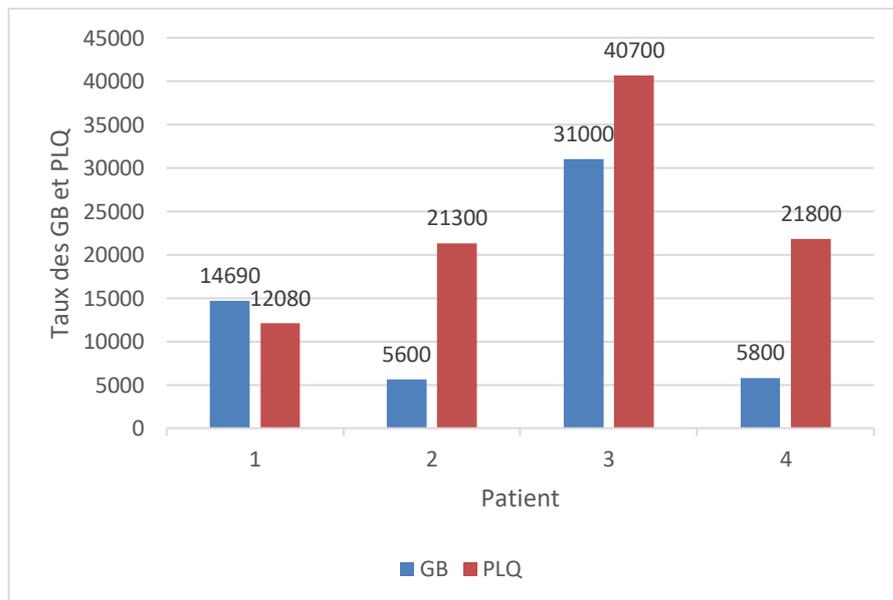


Figure 30 : Distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine.**Tableau 21**: la moyenne, écart-type, valeur P des HB

	Moyenne (g/dl)	Ecart-type (g/dl)	Valeur P
Mutation JAK2 V617F +	16.95	3.04	P=0.63
Mutation JAK2 V617F -	18.15	0.21	

La valeur P ne pas significatif

Distribution des patients en fonction de taux des globules blanc et plaquettes:

**Figure 31** : taux des plaquettes et des globules blanc / μ L**Tableau 22**: la moyenne, écart-type, valeur P des GB

	Moyenne (/ μ L)	Ecart-type (/ μ L)	Valeur p
Mutation JAK2 V617F +	22845	11532.91	P=0.2
Mutation JAK2 V617F -	5700	141.42	

Tableau 23: la moyenne, écart-type, valeur P des PLQ

	Moyenne (éléments/mm ³)	Ecart-type (éléments/mm ³)	Valeur p
Mutation JAK2 V617F +	300677.35	279250.61	P=0.39
Mutation JAK2 V617F -	21550	353.55	

La valeur P ne pas significatif

III. Résultats de PCR en temps réel:

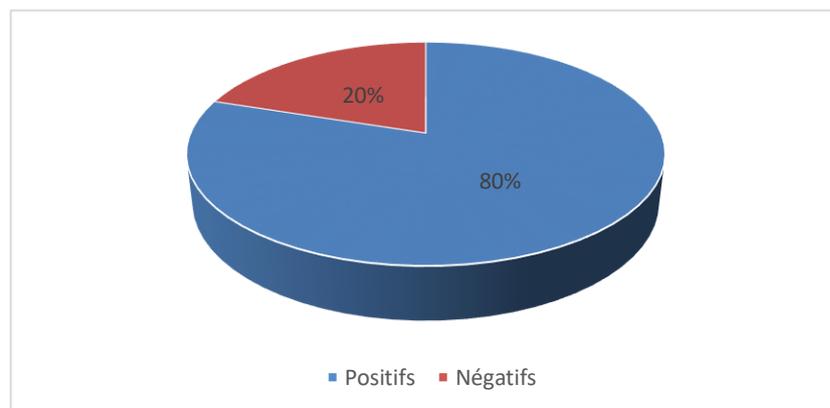
III.1. Recherche du transcrit BCR-ABL par PCR en temps réel:

Résultats de dosage :

Tableau 24 : résultats de dosage des acide nucléiques (dosage d'ARN)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dosage d'ARN (ng/ml)	187,2	186,4	124	88,8	12,8	7,2	20	14,4	22,72	117,6

La recherche du transcrit BCR-ABL par la RT-PCR qualitative a montré que sur les 10 cas reçus pour suspicion de LMC, 8 patients, soit 80%, sont avéré positifs. Dans ce cas on laisse tomber les 2 patients négatifs (20%) et on étudie seulement les 80% patents positifs. (**Figure 32**)

**Figure 32 :** pourcentage des cas positifs et négatifs pour LMC

Répartition des patients selon le sexe:

Sur les 8 cas positifs nous avons noté une prédominance féminine ; en effet, 62,5% de nos patients (5/10) étaient de sexe féminin alors que 37,5% (3/10) étaient de sexe masculin, soit un sexe ratio F/H de 1,6 H/F 0,6.

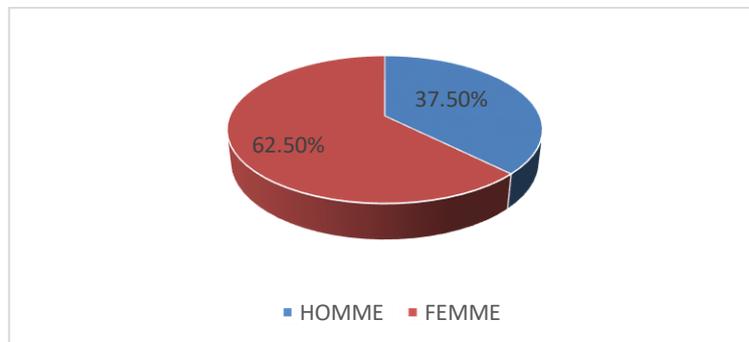


Figure 33: répartition des patients atteints de LMC selon le sexe.

Répartition des patients selon l'âge :

L'âge des patients varie entre 41 à 63 ans avec un âge moyen de 55,8 ans. La survenue était plus élevée chez les sujets âgés de 53 à 63 ans, avec une fréquence de 87,5%.

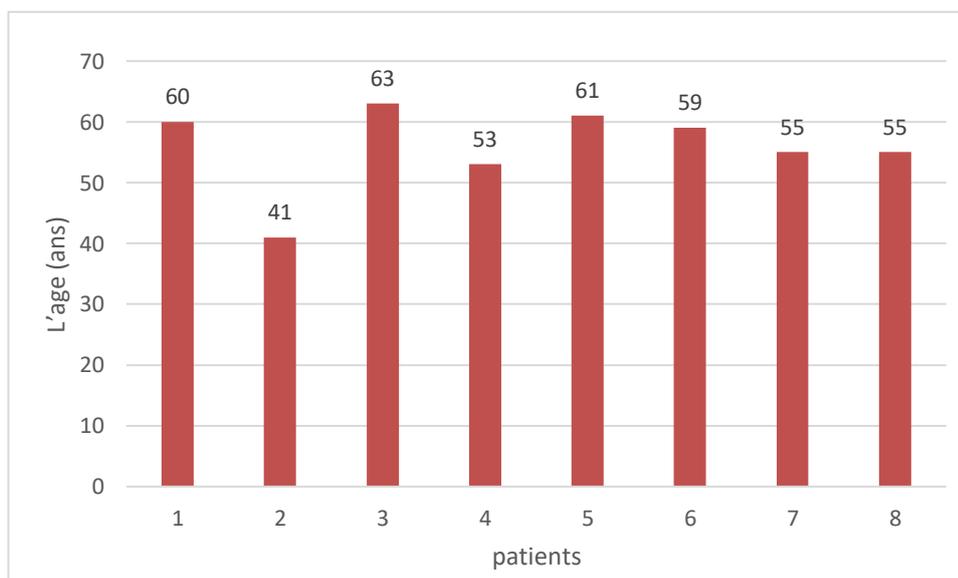


Figure 34 : répartition des patients atteints de LMC selon l'âge.

Répartition des patients selon Le type de transcrit :

Le type de transcrit dans notre population d'étude diagnostiqué par une LMC est reparti en trois groupes :

- Un groupe avaient un transcrit Mbcra-abl : 50% patients
- Un groupe avaient un transcrit M-mbcra-abl : 30% patients
- Un groupe négatif aucun transcrit n'est présent : 20% patients

Répartition des patients selon Les phases de la maladie :

100% des patients diagnostiqué par une LMC en phase chronique.

Répartition des patients selon Le score pronostique de la maladie :

Selon le score de sokal ont repartir en trois groupe :

- Un groupe de risque élevé 10%
- Un groupe de risque intermédiaire 70%
- Un groupe de risque bas 20%

III.2. Recherche du la mutation JAK2 V617F par PCR en temps réel:

Tableau 25 : résultats de dosage des acide nucléiques (dosage d'ADN)

Patient	1	2	3	4
Dosage d'ADN (ng/ml)	31	15	30	16

La recherche de la mutation JAK2 V617F par la RT-PCR qualitative a montré que sur les 4 cas reçus pour suspicion de SMP classique, 2patients, soit 50%, sont avéré positifs. Dans ce cas on laisse tomber les 2 patients négatifs (50%) et on étudie seulement les 2 patents positifs. **(Figure 44)**

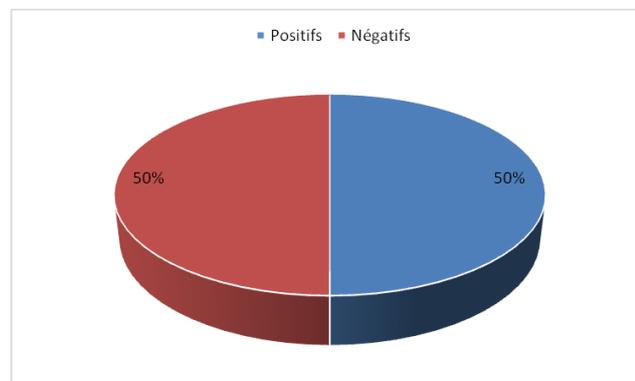


Figure 35 : pourcentage des cas positifs et négatifs pour SMP classique

Mutation jak2 v617f positifs :

Les patients atteints de PV positifs à la mutation JAK2 V617F, étaient 2 cas, avec un âge moyen de 65.5 ans \pm 12,02 ans et un sexe ratio de 1.

Sur le plan clinique les patients présentaient 100% une érythrose, 100% des vertiges, 100% des asthénies, 100% une érythromégalie et 100 % des céphalées, et enfin avaient des troubles de sueur nocturne. D'autres signes cliniques étaient présents tels que l'HTA et le diabète.

Sur le plan biologique les patients atteints de PV avaient des taux anormalement élevés d'hémoglobine et une polyglobulie .De plus, une hyperleucocytose et une thrombocytose ont été observées.

Les résultats du frottis sanguin réalisés chez les 2 patients étaient comme suit :(100%) présentaient une anomalie des plaquettes. (Les deux patients)

Mutation jak2 v617f négatifs :

Les 2 autres cas étaient négatifs pour la mutation JAK2 V617F. La moyenne d'âge est de 60 ans \pm 14,14 ans avec un sexe ratio de 1.

Sur le plan clinique Ces patients présentaient que l'HTA, des problèmes cardiovasculaires ainsi le diabète

Sur le plan biologique ils étaient marqués par des taux d'hémoglobine élevée.

Cas cliniques:**Tableau 26 :** cas clinique LMC.

N°	Aspect clinique	Aspect biologique	PCR en temps réel	Scor de sokal	conclusion
1	Femme, 60ans, de Blida, sans profession, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 19/05/2022, Splénomégalie de type III, traité par l'Hydroxyure, puis l'imatinib le	Hémogramme: GB:498610/ml, HB:7 g/ml PLQ:303000/ml Myélogramme: Myélémie:52% Blastes: 3% Taille du rat:12cm	Type de mutation: M41 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 754,33 Nombre de copies (/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):4228,67 Normalized copy	Un nouveau patient avec un score-sokal bas	Présence de transcrit M BCR-ABL et absence de transcrit m BCR-ABL

	(08/06/2022).		Numbers (NCN%): 17,83		
2	Femme, 41ans, de Media, sans profession, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 04/05/2022, Splénomégalie de type III, traité par l'Hydroxyure 1mois, puis l'imatinib le (27/05/2022).	Hémogramme: GB:84380/ml, HB:9,9 g/ml PLQ:156000/ml Myélogramme: Myélémie:41% Blastes: 04% Taille du rat:12cm	Type de mutation: M41, 52 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 563,69 Nombre de copies(/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):2605,56 Normalized copy Numbers (NCN%): 21,63	Nouveau patient avec un score de sokal intermédiaire	Présence de transcrit M BCR-ABL et absence de transcrit m BCR-ABL
3	Femme, 60ans, de Djelfa, sans profession, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 19/05/2022, traité par l'Hydroxyure, puis l'imatinib le (08/06/2022).	Hémogramme: GB:519300/ml, HB:11 g/ml PLQ:193000/ml Myélogramme: Myélémie:23% Blastes: 00% Taille du rat:0cm	Type de mutation: M41, 52 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 1087,26 Nombre de copies(/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):666,62 Normalized copy Numbers (NCN%): 163,09	Nouveau patient avec un score intermédiaire	Présence de transcrit M BCR-ABL et absence de transcrit m BCR-ABL
4	Femme, 53ans, de Djelfa, sans profession, LMC en phase chronique,	Hémogramme: GB:246950/ml, HB:11 g/ml PLQ:248000/ml	Type de mutation: M41, 52 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 253,11	Nouveau patient avec un score intermédiaire	Présence de transcrit M BCR-ABL et absence de transcrit m

	diagnostiqué le 19/05/2022, Splénomégalie de type III, traité par l'Hydroxyure 08/06/22, puis l'imatinib le (30/06/2022). douleur osseuses	Myélogramme: Myélémie:36% Blastes: 02% Taille du rat:15cm	Nombre de copies (/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):42,88 Normalized copy Numbers (NCN%):590,24		BCR-ABL
5	homme, 61ans, de Chlef, maçon, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 19/05/2022, traité par l'Hydroxyure, puis l'imatinib ITK1°G 26/06/2014 puis ITK2°G Nilotinib 08/02/2015, Splénomégalie de type IV, rechuté par une échec de réponse hématologique et cytologique	Hémogramme: GB:407120/ml, HB:9,3 g/ml PLQ:386000/ml Myélogramme: Myélémie:55% Blastes: 05% Taille de la rat:15cm En2014: GB (35,02,05,04,00) PLQ:+++ En 2017: GB: (36, 00, 00, 68,06)	Type de mutation: M41, 52 et m44 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 2075,19 Nombre de copies(/µl) (m-BCR): dépistage positif Nombre de copies control endogène (/µl):2231,25 Normalized copy Numbers (NCN%):93,00	Ancien patient avec un score de sokale Elevé	Présence de transcrit M BCR-ABL et des traces de transcrit m BCR-ABL
6	homme, 59ans, de Medea, maçon, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 19/05/2022, Splénomégalie de type III, traité par	Hémogramme: GB:640600/ml, HB:11,4 g/ml PLQ:150000/ml Myélogramme: Myélémie:24%	Type de mutation: M41 et m44 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 2075,59 Nombre de copies (/µl) (m-BCR):Dépistage	Ancien patient avec un score intermédiaire	Présence de transcrit M BCR-ABL et des traces de transcrit m BCR-ABL

	l'Hydroxyure de 07/04/2008 au 2009, puis ITK1°G de 13/03/2009 au 2014, puis ITK2°G nilotinib 24/07/2014 jusque aujourd'hui. Un échec en réponse au traitement hématologique et cytogénétique	Blastes: 00% Taille de la rat: 14cm En2009: GB(71. 00. 02. 18. 00), En 2014: GB (85. 04.00.09.00) My:2%	positif Nombre de copies control endogène (/µl):1275,91 Normalized copy Numbers (NCN%):162,67		
7	Homme, 55ans, de Djelfa, journalier, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 19/05/2022, Splénomégalie de type III, traité par l'Hydroxyure, puis l'imatinib 19/10/2017, ITK2°G Nilotinib de 2018 jusque a aujourd'hui, une réponse hématologique et échec au réponse cytogénétique	Hémogramme: GB:119640/ml, HB:12,6 g/ml PLQ:117000/ml Myélogramme: Myélémie:45% Blastes: 00% Taille du rat:8cm En 2017: My:45%, PLQ:++++, GB(45,03,01,07,0.01) En 2019: My:17%, PLQ:+++ , GB(70, 03, 05, 05,00)	Type de mutation: M41 et m44 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 4269,08 Nombre de copies (/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):3050,23 Normalized copy Numbers (NCN%):140,84	Nouveau patient intermédiaire	Présence de transcrit M BCR-ABL et des traces de transcrit m BCR-ABL
8	Femme, 46ans, de Djelfa, sans profession, LMC en phase	Hémogramme: GB:607700/ml, HB:14,1 g/ml	Type de mutation: M Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 1,36	Nouveau patient avec un score de sokal BAS	Absence de transcrit M BCR-ABL

	chronique, diagnostiqué le 16/12/2021, traité par l'Hydroxyure (1 mois) le 16/12/2021 puis l'imatinib.le 15/01/2022 Avec une réponse hématologique.	PLQ:253000/ml Myélogramme: Myélémie:28% Blastes: 00% Taille du rat:0cm	Nombre de copies (/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):423,43 Normalized copy Numbers (NCN%):0,32 REMISSION		Cas négatif
9	Femme, 55ans, de Blida, sans profession, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 05/04/2022, Splénomégalie de type IV, traité par l'Hydroxyure, puis l'imatinib.	Hémogramme: GB:206400/ml, HB:11,3 g/ml PLQ:153000/ml Myélogramme: Myélémie:38% Blastes: 00% Taille du rat:24cm	Type de mutation: M41 Nombre de copies (/µl) (M-BCR): 30229,22 Nombre de copies (/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl):23989,25 Normalized copy Numbers (NCN%):126,27	Nouveau patient avec un score de sokal intermédiaire	Présence de transcrit M BCR-ABL
10	Homme, 75ans, de Tipaza, chef de parc, LMC en phase chronique, diagnostiqué le 28/04/2007, Splénomégalie de type III, traité par l'Hydroxyure, puis l'imatinib. Avec une réponse hématologique	Hémogramme: GB:146500/ml, HB:9,8 g/ml PLQ:217000/ml Myélogramme: Myélémie:62% Blastes: 00% Taille du rat:0cm	Type de mutation Absence de mutation Nombre de copies (/µl) (M-BCR): Nombre de copies (/µl) (m-BCR): Nombre de copies control endogène (/µl): Normalized copy Numbers (NCN%):	ancien patient avec un score de sokal intermédiaire	absence de transcrit M BCR-ABL Cas négatif

	Arrêt du protocole imatinib puis prendre traitement 13ans 13/12/2020		AMELIORATION AU TRAITEMENT		
--	--	--	-----------------------------------	--	--

Tableau 27 : cas cliniques des SMP Classique

N°	ASPECT CLINIQUE	Aspect biologique	PCR en temps réel	conclusion
01	Femme, de 57ans de Blida, Diagnostiqué le 18/08/22, ATCD personnel : Diabète +HTA, asthénie, sueur nocturnes, Céphalées, vertige, Erythrose, Erythromégalie	Frottis sanguin : GR : 10.42 HB : 19.1 GB : 14690/ul PN : 12080 PLQ : 437000/ul Frottis médullaire : NF BOM : EN COURS	Ct mean control positif : WT=36.86 VF=27.06 Ct mean control négatif : WT=26.62 VF=36.67 Ct mean patient : WT=31.76 VF=30.32 ΔΔ Ct patient: 08.39	Présence de mutation JAK2 V617F
02	Femme de Laghouat, Diagnostiqué le 14/08/22 à l'âge de 50 ans	Frottis sanguin : HB : 18 GB: 5700 GR: 5. 45 PLQ : 219000 Frottis médullaire : BOM :	Ct mean control positif : Ct mean control négatif : Ct mean patient : WT=27.51 VF=indéterminée	Absence de la mutation JAK2 V617F (a confirmé avec le score de l'OMS 2016)

			ΔΔ Ct patient :	
03	Homme a l'âge de 74 ans de Timimoune Diagnostiqué le 07/08/22 .ATCD personnel : HTA, asthénie, sueur nocturnes, Céphalées, vertige, Erythrose, Erythromégalie	Frottis sanguin : GB: 1500 GR: 10.5 HB: 18 PLQ: 438000 Frottis médullaire: / BOM : /	Ct mean control positif : WT= 36.86 VF= 27.06 Ct mean control négatif : WT= 26.62 VF= 36.67 Ct mean patient : WT= 29.65 VF= 26.24 ΔΔ Ct patient : 10.36	Présence de la mutation JAK2 V617F
04	Homme a l'âge de 70 ans diagnostiqué le 09/08/22 ; ATCD personnel : HTA, cardiopathie, diabète	Frottis sanguin : HB : 18.3 GB: 5800 GR: 5.40 PLQ : 218000 Frottis médullaire : BOM :	Ct mean control positif : Ct mean control négatif : Ct mean patient : WT = 31.66 VF= indéterminée ΔΔ Ct patient :	Absence de la mutation JAK2 V617F (a confirmé avec le score de l'OMS 2016)

Chapitre III

Discussion

Discussion :

Les syndromes myéloprolifératifs chronique SMP ou d'une autre appellation les Néoplasme Myéloïde chronique (Leucémie Myéloïde chronique, Polyglobulie de Vaquez, Thrombocytémie essentielle et Myélofibrose primitive) sont des hémopathie clonales caractérisées par une production excessive de cellules souche hématopoéthiques (CSH) ; entre ces pathologie : la LMC est liée au présence de transcrit BCR-ABL par contre les autres pathologie dits SMP Classiques sont liée au la mutation JAK2 (mutation JAK2V617F)

La méthode utilisé est la détection qualitatif de transcrit BCR-ABL et la mutation JAK2V617F et la quantification par la technologie de la PCR en Temps Réel qui est basé sur détection des sonde d'hydrolyses.

Notre étude à porter sur 14 patients, dont 10 patients sont diagnostiquée avec une LMC ; et 4 patients suspecté d'une polyglobulie de vaquez (PV);

L'objectif principale de notre étude est la mise en place de technique de RT-PCR afin d'améliorer le diagnostic, faciliter ainsi le suivi de la maladie,. Aussi, de rechercher de la mutation JAK2 V617F et la translocation BCR- ABL chez les patients atteint de syndromes myéloprolifératifs.

Sur les 10 patients atteint de LMC en phase chronique, nous avons 6(60%) femmes et 4 (40%) hommes, on note prédominance féminin avec une sex-ratio H/F=0,6.Ce résultat ne concorde pas avec le littérateur de K.djouadi-Lahlou ou d'autres études, car notre population d'étude n'est pas représentatif en fonction de nombre par rapport aux autres études qu'on a constatée.

Tableau 28 : illustre une comparaison entre la sex-ratio dans différents pays.

Pays	Sex-ratio H/F	Références
Notre série (Blida)	0,6	Notre etude
Algérie	1,01	K.djouadi-Lahlou ;2010
Maroc	1,04	Fares et al ;2015
France	1,7	Guyader-Peyrou et al ;2016
Niger	1,67	Bade et al ;2015

L'âge moyenne de notre population d'étude de 57ans \pm 9,8 ce qui fait de la LMC une affection de l'adulte, mais peut se voir dans toutes les tranches d'âge ; nous avons comparé nos résultats avec ceux d'autres séries (**tableau 28**).

Tableau 29 : comparaison d'âge des différentes séries rapportées.

Pays	Age moyen au diagnostic	Tranche d'âge la plus touchée	Références
Notre série (Blida)	57	45-60	Notre étude
Algérie	43,5	36-45	K.djouadi-Lahlou; 2010
Maroc	43	36-45	Fares et al ; 2015
France	63	Non signalé	Guyader-Peyrou et al;2016
Niger	49	Non signalé	Bade et al; 2015

Nos résultats concordent avec celle de série française 2016 ; contrairement à la série algérienne et marocaine.

Sur le plan clinique au moment de diagnostic, la splénomégalie est retrouvée chez la majorité des patients 80%, dont les quelles 71,42% de type III et 28,57% de type IV. Par contre 20% de la population diagnostiquée par une LMC, ne présentent pas de la splénomégalie.

Les résultats qu'on a trouvé proche de ceux que obtenus par (Chemegni et al) et de (MUKIBI, J.M. et al) qui avaient retrouvé respectivement 75,37% et 86,7% de cas de SPMG.

Cette splénomégalie présentée par l'augmentation de la taille de la rate, par une prolifération accrue des cellules leucémiques au niveau du rat, selon l'explication données par le Pr Sanhaji Kamel « les cellules leucémiques peuvent envahir d'autres organes comme les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les testicules ou le système nerveux central ».

Sur le plan biologique, l'hémogramme a montré une hyperleucocytose chez 80% des patients, le taux moyenne des globules blanc est 284589 avec des extrêmes allant 60770 à 640600 élément/mm³, ceci concorde avec les résultats obtenue par l'étude menée de la littérature de Burkina Faso, ou qui notée que la leucocytose moyenne (243000/mm³) est légèrement inférieure à celle observée dans notre série.

Le nombre de plaquettes varie entre 11700 et 386000 élément/mm³ avec une moyenne de 217600 élément/mm³ chez nos patients ; Sango en 2010 rapporté une moyenne de 360800.

Nous avons noté une thrombopénie chez 20%, et une thrombocytose chez 20%, par contre 60% des a un taux de plaquette normal

On peut expliquer la thrombocytose chez les patients par l'activation constitutive de la voie JAK/STAT, qui responsable de la production des mégacaryocytes ; cette voie est responsable de la production excessive des plaquettes et c'est l'une des voies déclenchée par le BCR-ABL.

Le taux d'hémoglobine varie entre 7 et 14,1 avec une moyenne de 10,7g/dl. Nos résultats sont proches de ceux obtenus par SEGBENA. AY en 2012 qui trouvée une moyenne de 10,57 g/dl.

L'anémie a retrouvé chez 70% du patient, ce qui explique la fatigue et la pâleur qui apparaissent chez les patients. Qui on peut l'expliquer soit :

-par un mauvais fonctionnement de la moelle osseuse qui est le centre de la production d'hémoglobine causée par la forte hyperleucocytose entraînant peut être une diminution de taux d'hémoglobine.

-Soit par une instabilité ou un mauvais assemblage de la molécule d'hémoglobine.

L'examen de frottis sanguin permet de déterminer le taux de myélémie et le taux de blaste dans le sang, En effet la myélémie était compris entre 23% et 62% avec une moyenne de $40\% \pm 0,13$.

La totalité de nos patients diagnostiquée par une LMC en phase chronique (100%) avaient un taux supérieur à 20% ; nos résultats sont confirmés par les données de littérature (Rose Marie Hamladji ; 2010).

Dans notre série le taux de blastes sanguins est compris entre 0% et 5%, 10 patients (100%) égal ou inférieure à 5%. Notre résultat concorde avec les données de littérature qui est inférieur à 10%.

Selon le score de sokal, on peut repartir nos patients en trois groupes :

-10% des patients à un score élevé de risque,

-70% des patients avec un score intermédiaire

-et 20% des patients a un risque faible ;

Notre résultat est proche de résultat de littérature de K. DJOUADI-Lhlou ; 75% de leur série avec un risque intermédiaire.

Le diagnostic de LMC a été confirmé par la RT-Q-PCR, dont 40% (nouveau malades) a été effectué dans notre laboratoire alors que 60% (anciens patients) ont été faite précédemment dans d'autre laboratoire et nous avons refait un RT-PCR pour suivi après traitement avec un délai variant entre 1mois et 13ans de traitement,

A partir de l'étude de la biologie moléculaire, nous avons trouvée :

- dont les nouveaux patients, 4(40%) : on a trouvé la totalité 100% avaient le transcrit MbcR-abl positif.
- Alors que les anciennes patients 6 (60%) :
 - 2 (33,33%) patients avaient le transcrit BCR-ABL négatif, répond aux traitements ;
 - 4(66,66%) patients avaient le transcrit BCR-ABL positif ; dont les quelles :
 - ✓ 1(25%) patient avait le transcrit MbcR-abl

- ✓ et 3(75%) des patients à montrer une association entre les deux avaient le transcrit Mbcr-abl et le transcrit mbcr-abl. C'est le double phénotype.

Les résultats de diagnostic moléculaire par la PCR en temps réel quantitative nous permis de répartir les patients sous traitement en 2 groupes pour les anciens patients : bonne réponse, et échec thérapeutique ; par contre les nouveau patients ils sont en phase d'exploration ;

Les patients du premier groupe avaient une bonne réponse aux traitements, qui permet d'obtenir une rémission moléculaire ; c.-à-d. Le traitement est très efficace ; dans cette cas il est recommander de effectuée un contrôle régulière de suivi par RT-PCR chaque mois pendant la première année de cette tentative de rémission et chaque 2mois pendant la deuxième année et tous les 3 mois par la suit ;

Mais ce qui concerne l'échec thérapeutique, il est exigeante que à chaque fois de changer le traitement par d'autres plus puissants ; cet échecs est dû à la résistance aux traitements qui justifié par trois hypothèse selon la littérature :

- l'effet de la présence d'une mutation ponctuelle dans un domaine qui altère la liaison aux médicaments c'est le domaine kinase de BCR-ABL
- ou la présence des autres type de mutations dans le domaine kinase, ou les mutations qui affectent la boucle de liaison de l'ATP et la mutation JAK/STAT, ou de boucle d'activation des kinases en position fermée
- ou une mutation dit la mutation T315I en position de gardien ; situé dans le fameux domaine kinase peuvent provoquer une résistance par encombrement stérique ou élimination des liaisons hydrogène ; cette mutation exceptionnelle confère une résistance complet à tous les ITK, à l'exception du ponatinib. (Michael, W. Deininger, MD.2015)

L'imatinib soit vulnérable à un large éventail de mutations, le spectre est beaucoup plus limité pour le nilotinib et le dasatinib, reflétant leur plus grande puissance et, dans le cas du dasatinib, des exigences de liaison moins strictes. En plus Pour plusieurs mutants, la différence de sensibilité est suffisante pour justifier l'utilisation du dasatinib par rapport au nilotinib.

Concernent la population chez qui on a suspectés la présence de PV selon les données cliniques, dans nos résultats nous avons trouvées : 50% des patients avaient la mutation JAK2 V617F positifs et les 50% des patients restant sont négatifs

L'âge moyen de deux patients positifs est 65.5 ans ± 12,02 ans et un sexe ratio de 1(H/F).

Uniquement les 2 patients qui sa viraient positifs pour les JAK2, présentaient une érythrose, une érythromégalie, des vertiges, des asthénies, des céphalées et des troubles de sueur nocturne. De plus ils avaient des taux très élevés d'hémoglobine et une polyglobulie ainsi qu'une hyperleucocytose et une thrombocytose.

D'autres signes cliniques tels que l'HTA et le diabète étaient présents chez les patients testés positifs et négatifs pour la mutation JAK2V617F.

Notre étude de biologie moléculaire « recherche de la mutation JAK 2 V61F par PCR en temps réel » nous ne permet pas de tirer des résultats et de les comparer avec d'autres études à cause de nombre très réduit de cas reçu au niveau de Laboratoire Central du CAC durant notre stage pratique.

L'âge moyen de deux patients négatifs était 60 ans \pm 14,14 ans et un sexe ratio de 1(H/F) avec un taux élevé d'hémoglobine.

La présence de la mutation JAK2 V617F peut confirmer la présence de maladie de PV

Par contre l'absence de la mutation JAK2 V617F ne signifie pas l'absence de cette pathologie chez ces deux patients. Une recherche d'autres mutations notamment CALR et MPL est recommandée chez ces patients ; ainsi que ça reste à confirmer avec le score de l'OMS de 2016.

La difficulté de ce travail:

- Le manque de réactif.
- La mise en place de la technique.
- Problème d'adaptation de réactif sur l'automate.
- Nombre des patients réduit
- La quantité de réactif été insuffisante pour la recherche de transcrit BCR-ABL
- Et pour la mutation JAK2 cela ont a traite un nombre réduit de patients ; la fréquence de maladie de PV est rare.

Conclusion

Conclusion

Rassembler sous le terme de Néoplasmes Myéloprolifératifs : Leucémie Myéloïde Chronique, la Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocytémie Essentielle et la Myélofibrose Primitive ; sont des hémopathies malignes qui touchent la lignée myéloïde. Il paraît qu'ils résultent des dérégulations profondes impliquant les acteurs des grandes voies de signalisation cellulaire et de la réponse à l'environnement cytokinique.

Dans ce travail nous avons abordé les NMP sous différents points, dans le but d'en comprendre au mieux les mécanismes moléculaires et de mettre en relief l'implication des mutations de JAK2 V617F et gène de fusion BCR-ABL.

La leucémie myéloïde chronique est caractérisée par la présence de marqueur chromosomique spécifique : le chromosome Philadelphie. La présence d'un chromosome Phi, peut être actuellement recherché par trois techniques : Caryotype et FISH, RT-PCR.

La cytogénétique conventionnelle est une technique simple, permettant le diagnostic et le suivi des patients atteints de la LMC. Cependant, 2,5 % des translocations n'est visible uniquement en biologie moléculaire

La recherche de la mutation JAK2V617F et gène de fusion BCR/ABL1 par est la technique (la plus efficace) RT-Q-PCR constituent un nouvel outil de diagnostic important dans les SMP, elles vont aider l'OMS à revoir et à adopter des nouveaux critères. Elle est faite en cas de suspicion d'un NMP et lorsqu'elle est positive, le diagnostic est certain et donc il reste à classer l'hémopathie

A partir de l'ensemble de nos résultats, nous suggérons qu'à l'avenir, pour améliorer le pronostic des patients, il serait souhaitable de mettre en œuvre une stratégie diagnostique par des tests JAK2 en routine dans les services hospitaliers et établir des registres de SMP pour mieux connaître ces pathologies considérées comme rares jusqu'à ce jour.

Il faudrait aussi continuer à identifier et caractériser de nouvelles mutations de JAK2, notamment des doubles mutations (CALR, MPL, EZH), en utilisant des techniques d'imagerie et les molécules thérapeutiques dans les protocoles cliniques, qui nous permettrait de mieux appréhender le rôle complexe de JAK2, et plus précisément de ses mutants, dans la signalisation cellulaire, lors de son association avec les récepteurs aux cytokines.

Enfin, pour améliorer la prise en charge de ces patients, il serait intéressant d'élargir cette étude à la recherche de facteurs de risques pour les SMP par l'augmentation de la population d'étude. Tous ces axes de recherches seraient éventuellement complétés par la création d'un lien avec une prédisposition génétique, ou un événement, qui serait capable d'induire des désordres suffisamment importants dans les progéniteurs hématopoïétiques pour provoquer les dérégulations que nous observons.

Références bibliographiques

A

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia .Blood 2016 ; 127(20) : 2391-405.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Pieri L, Finazzi M, Rumi E, Martinelli V, et al. Hydroxyurea-related toxicity in 3,411 patients with Ph⁻-negative MPN.Am J Hematol.mai 2012;87(5):552-4.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, ... Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.Blood, 127(20), 2391–2405

B

- Bade, M. A., Andia, A., Djibrilla, A., Beydou, S. S., Brah, S., Daou, M., & Adehossi, E. (2015). Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase dans le Traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique: Expérience du Niger. HEALTH SCIENCES AND DISEASES, 16(3).
- Bennett, J. H. (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood.*Edinburgh Med Sug J*, 64, 413-423.
- Beer, P. A. et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm.Blood 115, 2891–2900 (2010).
- Barbui, T. et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. Blood 115, 778– 782 (2010)

C

- Castagnetti, F., Gugliotta, G., Baccarani, M., Breccia, M., Specchia, G., Levato, L., ...&Pregno, P. (2014). Differences among young adults, adults and elderly chronic myeloid leukemia patients.*Annals of Oncology*, 26(1), 185-192..
- CHOMEL, J. C., Guilhot, F., Tanzer, J., & Kitzis, A. (1995).Mécanismes de l'action oncogénique de Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique. MS. Médecine sciences, 11(12), 1669-1678.

- Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovskaya V, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood*. 12 déc 2013;122(25):4047-53.
- C. Cleyrat, A. Darehshouri, M. P. Steinkamp, M. Vilaine, B. Daniela, M. H. Ellisman, S. Hermouet, and B. S. Wilson, “Mpltraffics to the cell surface through conventional and unconventional routes,” *Traffics*, vol. 15, no. 9, pp. 961–982, 2014
- C. Marty, R. Chaligné, C. Lacout, S. N. Constantinescu, W. Vainchenker, and J. L. Villeval, “Ligand-independent thrombopoietin mutant receptor requires cell surface localization for endogenous activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 18, pp. 11781–11791, 2009.
- Cortelazzo, S., Viero, P., Finazzi, G., D’Emilio, A., Rodeghiero, F., Barbui, T. Incidence and Risk factors for Thrombotic Complications in a Historical cohort of 100 patients with Essential Thrombocytemia. *J. Clin Oncol* 1990; 8: 556-620.

D

- Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343-3356
- Djouadi, K., Harieche, F., et al (2016). Approche épidémiologique de la leucémie méloïde chronique: Etude Algéro-Tunisienne. A propos de 1195 cas sur 05 ans (2010 - 2014). *Revue Algérienne D’hématologie*
- Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6(4), 372-375.
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., ...& Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nature medicine*, 2(5), 561.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., ...& Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 344(14), 1031-1037.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343-3356.

E

- E. Rumi and M. Cazzola, “Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms,” *Blood*, vol. 129, no. 6, p. blood-2016-10- 695957, 2016.
- E. Rumi, D. Pietra, V. Ferretti, T. Klampfl, A. S. Harutyunyan, D. Jelena, N. C. C. Them, T. Berg, C. Elena, I. C. Casetti, C. Milanesi, S. Antonio, M. Bellini, E. Fugazza, M. C. Renna, E. Boveri, C. Astori, C. Pascutto, R. Kralovics, M. Cazzola, and E. S. Antonio, “JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes,” *Blood*, vol. 123, no. 10, pp. 1544–1551, 2014

F

- Fares, S. Aniba, M. Qachouh, M. Quessar, A. Rachid, M Madani, A .Lamchahab, M. Cherquaoui, S. Khoubila , N.(2015). Profil épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique au service d’hématologie et oncologie de Casablanca . *John Libbey Eurotext*, 21(1), 202-203.
- Fabris F, Randi ML. Essential thrombocythemia: past and present. *Intern Emerg Med*. oct 2009; 4(5):381-8.
- F. Passamonti and M. Maffioli, “Update from the latest WHO classification of MPNs: auser’s manual,” *ASH Educ. Progr. B.* , vol. 2016, no. 1, pp. 534–542, 2016

G

- Geest .R and Paul J. Coffey. (2009). MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis.
- Gautier.(2011). Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives. Obtention de doctorat de l’université de toulouse III paul sabatier.
- Gong Jerald Z., James R. Cook., Timothy C. Greiner., Cyrus Hedvat., Charles E. Hill., Megan S. Lim., Janina A. Longtine., Daniel Sabath and Y. Lynn Wang. (2013). Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms A Report of the Association for Molecular Pathology

H

- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., & Grosveld, G. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*, 315(6022), 758.
- Hughes, T. P., Ross, D. M., & Melo, J. V. (2014). Management of patients with chronic myeloid leukemia. In *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia* (pp. 35-51). Adis, Cham.
- HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK, and P. M. WILLIAMS. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.

J

- Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978 Feb;51(2):189-94
- Jane Liesveld , MD, James P. Wilmot Cancer Institute, University of Rochester Medical Center. *sep.2020*
- J. G. Drachman and K. Kaushansky, "Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 6, pp. 2350–2355, 1997

K

- Konopka, J. B., Watanabe, S. M., & Witte, O. N. (1984). An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*, 37(3), 1035-1042.
- Kiladjian J-J, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain J-D. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 oct 2011; 29(29):3907-13.
- Kralovics R. and R. C. Skoda, "Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders," *Blood Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, 2005
- K.Djouadi-lahlou. (2010). Approche épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique en Algérie. Travail coopératif et multicentrique *Revue Algérienne d'Hématologie* N° 3. p 6-10

L

- Leguay T., Mahon F.X. 2005Chronic myelogenous leukaemia. EMC-Hématologie.: 2(3), 187-205
- Leguay T., Mahon F-X., Leucémie myéloïde chronique, France.
- Leguay, T., & Mahon, F. X. (2005).Leucémie myéloïde chronique. EMC-Hématologie, 2(3), 187-205.
- Le Bousse-Kerdiles M, Praloran V, Martyre M. La splénomégalie myéloïde : De données récentes à un modèle physiopathologique. Hématologie. 2002 May-Jun; 8:187-96.
- Le Guyader-Peyrou, S., Belot, A., Maynadié, M., Binder-Foucard, F., Remontet, L., Troussard, X., & French network of cancer registries (Francim. (2016). Cancer incidence in France over the 1980–2012 period: Hematological malignancies. Revue d'epidemiologie et de sante publique, 64(2), 103-112.

M

- Mohammedi Kenza., 2015.Etude de l'association entre les polymorphismes génétiques C677T du méthylènetétrahydrofolate réductase et risque de leucémie myéloïde chronique. Thèse de magister. Université de Biskra
- MARRAS, S. A. E., F. R. KRAMER, and S. TYAGI. 2002. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. Nucleic Acids Research 30.myeloproliferative disorders."Lancet 365(9464): 1054-61.
- Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). Leuk Res. 2007 Jun; 31(6):737-40.
- Marc Maynadié, Revue Francophone Des Laboratoires - MAI 2017 - N°492
- Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S, et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internet-based survey of 1179 MPD patients. Cancer. 2007 Jan 1;109(1):68-76 .
- M. Michalak, J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold, and M. Opas, "Calreticulin, a multiprocess calcium-bufferingchaperone of the endoplasmicreticulum," Biochem J, vol. 417, no. 3, pp. 651–666, 2009

N

- Nowell, P., & Hungerford, D. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic. *Science*, 132, 1497.

O

- Osler, W. (1903). "Chronic cyanosis with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity." *Am J Med Sci* 126: 187-201 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- -Osler, W. (1908). "A clinical lecture on erythraemia (polycythaemia with cyanosis, maladie de Vaquez)." *Lancet* 1: 143-146 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- O. Moulard, J. Mehta, J. Fryzek, R. Olivares, U. Iqbal, and R. A. Mesa, "Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union," *Eur. J. Haematol.*, vol. 92, no. 4, pp. 289–297, 2014

P

Q

R

- Rowley, J. D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenousleukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290.

S

- SA, Rueil-Malmaison.ISBN: 2718410531, 9782718410531.
- SALHANE, H. (2013). Anomalies cytogénétiques dans les leucémies aiguës myéloïdes: données récentes (Doctoral dissertation).
- SHERRILL, C. B., D. J. MARSHALL, M. J. MOSER, C. A. LARSEN, L. DAUDE-SNOW, and J. R. PRUDENT. 2004. Nucleic acid analysis using an expanded genetic alphabet to quench fluorescence. *Journal of the American Chemical Society* 126: 4550-4556. signalling causes polycythaemia vera." *Nature* 434(7037): 1144-8.
- Sébahoun, G. (2005). Hématologie clinique et biologique. 2ème édition. Wolters Kluwer, France.

- SE Belakehal, 2012 de IXème Congrès National D'Hématologie se de Transfusion Sanguine. «APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ EN ALGERIE sur une période de 10 ans (2002-2011), Tlemcen,10 au12 mai 2012
- SEBAHOUN G. 2005. Hematologie clinique et biologique. Arnette groupe liaisons
- Speck B, Bortin MM, Champlin R, Goldman JM, Herzig RH, McGlave PB, et al. Allogeneic bone-marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. Lancet 1984;1:665–8.

T

- Tefferi, A. (2008). The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*, 22(1), 3.
- Tefferi, A. & Vardiman, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14– 22 (2008).
- TefferiA., Thiele J., and J. W. Vardiman, “The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: Order out of chaos,” *Cancer*, vol. 115, no. 17, pp. 3842–3847, 2009.

U

V

- Vardiman JW et al. The2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia : rationale and important changes. *Blood* 2009 ; 114 : 937-951.
- Vaquez, L. H. (1892). "Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excesive et persistante." *CR Soc Bio (Paris)* 44: 384-388
%Uhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=Vaquez%20H&sourceid=mozillasearch&db=pubmed&orig_db=PubMed&dispmax=20&dopt=DocSum.

W

- Wagstaff AJ, Keating GM. Anagrelide: a review of its use in the management of essential thrombocythaemia. *Drugs*. 2006;66(1):111-31
William Dameshek, “Some speculations on the myeloproliferative syndromes.,” *Blood*, vol. 6, no. 4, pp. 372–5, 1951

- W. Vainchenker and R. Kralovics, “Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms,” *Blood*, vol. 129, no. 6, p. blood-2016-10- 695940, 2016.

X

- Xagrid, INN-anagrelide hydrochloride - WC500056557.pdf [Internet]. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR -
_Product_Information/human/000480/WC500056557.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000480/WC500056557.pdf)

Y

- Y. Pikman, B. H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B. L. Ebert, M. Gozo, A. Cuker, G. Wernig, S. Moore, I. Galinsky, D. J. DeAngelo, J. J. Clark, S. J. Lee, T. R. Golub, M. Wadleigh, D. G. Gilliland, and R. L. Levine, “MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia,” *PLoS Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 1140–1151, 2006

Annexe

Annexe01 : MATERIEL NON BIOLOGIQUE

1. Appareillage :

Spécifique :

- l'automate de RT-PCR :



Figure 36: Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System

La technique PCR utilisée lors de ce travail est la RT-Q-PCR ou bien la PCR en temps réel d'une méthode quantitative, basé sur le principe des sondes fluorescentes par la technologie de la sonde d'hydrolyse (TaqMan Assay) APPLID BIOSYSTEMS StepOne.

Cette méthode permet la réaction de multiplexe, c.-à-d. la détection spécifique de plusieurs amplicons dans un même milieu réactionnel, cette technologie est basée sur deux principes le premier est le phénomène de FRET (Fluorescence Résonance Energy Transfert), le second est l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde fluorescente fixée sur sa cible située à l'intérieur d'un produit PCR amplifié par deux amorces.

La sonde Taqman est marquée à ces deux extrémités avec deux marqueurs fluorescents possédant des spectres de fluorescence propres. Le premier est un reporter, le second en « quencher » (molécule inhibant la fluorescence du reporter par le phénomène de « quenching »). Quand la sonde est intacte, les deux fluorophores sont à proximité et le transfert d'énergie par fluorescence (FRET) s'effectue. La fluorescence émise par le reporter est alors absorbée par le quencher et

restituée dans la longueur d'onde d'émission de celui-ci. Pendant la phase d'extension du cycle PCR, la sonde hybridée à sa cible est dégradée par l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase, et les fluorophores sont libérés dans le milieu réactionnel. N'étant plus à proximité l'un de l'autre, le transfert d'énergie entre le reporter et le quencher n'a plus lieu, ce qui se traduit par l'augmentation de la fluorescence dans le spectre propre au reporter (Heid *et al* ; 1996).

La spécificité de la réaction est assurée premièrement par les amorces, mais aussi par la sonde, celle-ci étant dessinée de manière à s'hybrider à un produit de manière sélective.

Cette méthode ne nécessite donc pas de validation post-amplification, et permet la discrimination de produits multiples par l'utilisation de sondes portant des fluorophores différents. Toutefois, le signal de fluorescence n'est pas ici strictement relié à la quantité de produits à un instant, mais à l'accumulation successive des produits des sondes hydrolysées à chaque cycle. La méthode de quenching utilisée est dynamique (transfert d'énergie à distance, 40-80% d'inhibition du signal), et ne permet pas d'inhiber le signal aussi efficacement que d'autres chimies de marquage récentes, utilisant des quenchers sombres (non-fluorescent, e.g. Dabcyl) et le phénomène de quenching statique (interaction physique entre le fluorophore et le quencheur ; 90-95% d'inhibition) (Marras, *et al*, 2002; Sherrill *et al*, 2004).

- l'automate de dosage d'AND/ARN:



Figure 37 : spectrophotometer QuikDrop Molecular Devices

- le vortex mixer



Figure 38 : vortex NEUATION iswix

Non spécifiques :

- centrifugeuse



Figure 39: micro-centrifugeuse

- Bain-Marie



Figure 39: bainMarie

- congélateur -20

2. Petit matériel et consommables:

- micropipettes
- embeaux (pointes de pipettes)
- eppindrofs
- microplaque d'échantillons
- bain glacé

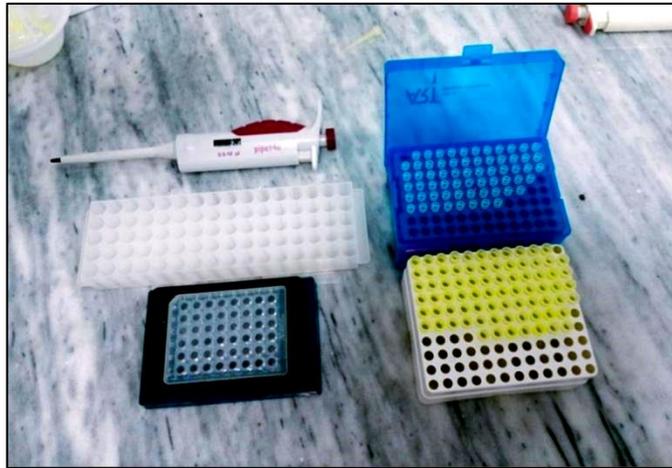


Figure 40 : petite matériels et consommables

3. Réactifs et solution :

H2O Nucléase-free:

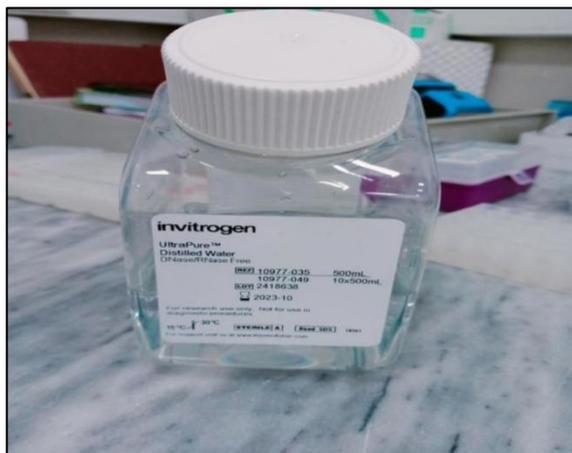


Figure 41: nuclease-free H₂O

Ethanol/propanol:



Figure 42 : Ethanol absolu 99,9° et propanol

Master mixe:



Figure 43: TaqMan universal PCR Master Mix**I. Le gène JAK2:**

- les réactifs d'extraction(**thermo scientific GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit**)

Tableau 30 : réactifs d'extraction d'ADN.

Réactifs					
Nom	Wash Buffer I + ethanol	Wash Buffer II + ethanol	Lysis solution	Proteinase K	Elution Buffer

- les reactifs de détection de mutation

Le kit (**TaqMan Mutation Detection Assays**)

Tableau 31: réactifs de dépistage de mutation JAK2.

Réactifs	Nom
	<ul style="list-style-type: none"> • Hs00000940 mu JAK2 12600 (gene muté) • Hs00001020 rf JAK2 rf (gene de referance)

Et/ou le kit (**ipsogen JAK2 MutaSearch Kit 24 ,V1**)

Tableau 32 : réactifs de dépistage de mutation JAK2 V617F.

Réactifs					
Nom	PC-VF JAK2	NC-VF JAK2	COS-VF JAK2	PPM-JAK2 V617F	PPM-JAK2 WT

II. Le gene BCR-ABL:

Le réactif d'extraction: (ivitrogene by thermo fisher scientific LeuKoLOCK Total RNA system)

Tableau 33: réactifs d'extraction d'ARN.

réactif	nom
	Wash solution 2/3 concentrate
	Nuclease-free Water
	Wash solution 1 Concentrate
	Lysis/Binding Solution

	<p style="text-align: center;">RNAlater</p>
	<p style="text-align: center;">1X PBS PH 7.4</p>
	<p style="text-align: center;">Bution Solution</p>
	<p style="text-align: center;">LeukoLOK PH Adjustment Solution</p>
	<p style="text-align: center;">RNA Binding Beads</p>

Le reactif de reverse transcription (**applied biosystems High Capacity c.DNA Reverse Transcription**)

Tableau 34 : réactifs de reverse transcription.

Réactif				
Nom	10x RT Buffer	10x RT Random Primers	d NTP Mix, 100mM	Multi Scribe Reverse Transcriptase

Le réactif de dépistage du type de mutation (TaqMAN Gene Expression Assays)

Tableau 35 : réactifs de dépistage de type de mutation BCR-ABL.

Réactif	nom
	Hs03205538 ft BCR-ABL
	Hs03043652 ft BCR-ABL
	Hs03024844 ft BCR-ABL
	Hs99999002 m H ABL
	Hs03024541 ft BCR-ABL
	Control endogène

Le réactif de quantification (ipsogen BCR-ABL1)

Tableau 36 : réactifs de quantification dont La mutation M-bcr (ipsogen BCR-ABL1 M bcr IS-MMR Kit)

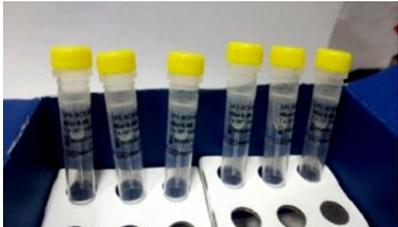
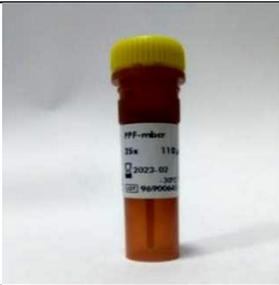
Réactif				III
Nom	SP(SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP6) -BCR-ABL Mbc & ABL	PFF-Mbc	PPC-ABL	High positive RNA control

Tableau 37: réactifs de quantification dont La mutation m-bcr (**ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit**)

Réactif	nom
	<ul style="list-style-type: none"> • F1 -BCR-ABL e1a2 mbc • F2-BCR-ABL e1a2 mbc • F3-BCR-ABL e1a2 mbc • F4-BCR-ABL e1a2 mbc • F5-BCR-ABL e1a2 mbc
	<ul style="list-style-type: none"> • C1-ABL • C2- ABL • C3- ABL
	PPC-ABL

			<p>PPF-mber</p>
--	---	--	------------------------

Annexe :**Examens paracliniques :**

- **Hémogramme ou numération de la formule sanguine NFS**

remarque	Détaille
Anémie modérée (Normochrome normocytaire, non régénérative.)	<ul style="list-style-type: none"> • D'origine centrale par insuffisance de production, et +/- périphérique par hypersplénisme. • le taux d'hémoglobine est normal : 11-13g/dl ou rarement diminué : <10g/dl
Hyperleucocytose franche	500G/L > N° leucocytes > 100G/L (médiane 105G/L)
Polynucléose neutrophile avec myélémie importante	<ul style="list-style-type: none"> • Polynucléose neutrophile : 40-60% • Myélémie : 30-60% , essentiellement des métamyélocytes et myélocytes et quelques promyélocytes ; • Blastes non différenciés et myéloblastes : <3% dans la forme chronique si Nb élevé : envisager une phase accélérée
Absence de dysgranulopoïèse	<ul style="list-style-type: none"> • Excès quasi constant de granulocytes basophiles jusqu'à 10-15% du total leucocytaire • Petit excès d'éosinophiles : pouvant parfois dépasser 10G/L (=5-20% du total leucocytaire) • Lymphocytes : nombre normal • Monocytes : nombre normal
La myélémie augmente avec la leucocytose	<ul style="list-style-type: none"> • nombre plaquettaire : augmentée dans 50% des cas (parfois >1000G/L) • présence de quelques noyaux nus de mégacaryocytes sur frottis sanguin dans 25% des cas

Myélogramme :

Le myélogramme est très important au diagnostic pour définir le % des blastes dans la phase d'accélération ou la phase blastique débutante, et pour l'étude moléculaire et la réalisation de caryotype.

Frottis médullaires richement cellulaire

Hyperplasie de la lignée granuleuse avec excès de formes jeunes sans blocage de la maturation

Hyperplasie associée de la lignée mégacaryocytaire (mégacaryocytes nombreux de taille réduite)

Caryotype :

Présence de la translocation 9-22 dans pratiquement tous les cas ; possibilité de

translocation masquées détectables en FISH (hybridation fluorescente sur chromosome) ; autres anomalies associées éventuelles, associées à un pronostic plus défavorable.

**Annexe N°02 : Etablissement Hospitalier Spécialisé en Lutte contre le Cancer. ZABANA-
BLIDA**

Services hématologie/ Services de laboratoire central CAC

Fiches de renseignements

Detection de la mutation JAK2 V617F par la technique de PCR en temps réel

2tubes sangs total sur EDTA bien remplis / FNS récente (< 1 semaine)

Nom :.....	Date :.....
Prénom :.....	Service :.....
Age :.....	N° d'échantion :
Adresse :.....	Médecin traitant

Renseignements clinico-biologiques:

ATCD personnels:.....

Asthénie		hépatomégalie		
Perte de poids		splénomégalie		Type:.....
Fièvre		Thrombose(s)		Localisation:.....
Sueur nocturnes				
Céphalées		Hémorragie(s)		Localisation:
Vertige		Sd de Budd Chiari		Localisation:
Troubles visuels		Erythrose		Localisation:
Prurit		Erythromégalie		
Dyspnée				
HTA				
Crise de goutte				
Frottis sanguin		LDH		
		Acide urique		
		Fer sérique		
Frottis médullaire:		Vit B12		
		Anomalie(s) du bilan de la coagulation		
Biopsie ostéoméduillaire:		Bilan SAPL		
		Recherche du transcrit BCR-ABL		
		Autres:		

Traitement(s):

Signature et cachet:

Annexe03 : Fiche de renseignement

Services hématologie, CAC Blida <u>Fiches de renseignements</u> <u>Recherche transcrit BCR-ABL</u> 2 tubes sangs total sur EDTA bien remplis		
Nom : Prénom : Age : Adresse : Profession :	Date : Service : Médecin traitant :	
Date de dgc : Patient nouveau : <input type="checkbox"/> Patients ancien : <input type="checkbox"/> 3 mois <input type="checkbox"/> 6 mois <input type="checkbox"/> 1 an <input type="checkbox"/>	Traitement : Hydroxyure <input type="checkbox"/> Dose ITK 1 ^{er} G <input type="checkbox"/> Dose ITK 2 ^{er} G <input type="checkbox"/> Dose	
<u>Renseignements clinico-biologiques</u> SPMG Autre : GB : /ml Hb : g /dl Myelémie : % Blastes : % <u>Score de Sokal :</u> Elevé : <input type="checkbox"/> Intermédiaire : <input type="checkbox"/> Bas : <input type="checkbox"/>	<u>Réponse au traitement :</u> Hématologique : Cytogénétique : Type RC :	
Diagnostic suspecté :		
Accord de laboratoire	Le :	DR :

Annexe 04 : protocole de détection de mutation JAK2

Table 6. Temperature profile for Applied Biosystems 7500 and ABI PRISM 7900HT SDS

Mode of analysis	Standard Curve — Absolute Quantitation
Hold	Temperature: 50°C Time: 2 minutes
Hold 2	Temperature: 95°C Time: 10 minutes
Cycling	50 times 95°C for 15 seconds 63°C for 1 minute 30 seconds with acquisition of FAM fluorescence: Single; quencher: TAMRA

Protocol: qPCR on Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS, and LightCycler 480 instruments

Using 96-well-plate qPCR equipment, we recommend performing all measurements in duplicate, as indicated in Table 6. The kit is designed for testing of eight different cDNA samples in the same experiment three times.

Table 6. Number of reactions using 96-well-plate qPCR equipment

Samples	Reactions
With the ABL primers and probe mix (PPC-ABL) (32 reactions)	
8 cDNA samples	8 x 2 reactions
1 cDNA high positive control	2 reactions
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reactions
Single plasmid standards	2 x 4 reactions (SP3, SP4, SP5, and SP6, each one tested in duplicate)
RT negative control	2 reactions
Water control	2 reactions
With the BCR-ABL Mbc primers and probe mix (PPF-Mbc) (32 reactions)	
8 cDNA samples	8 x 2 reactions
1 cDNA high positive control	2 reactions
1 cDNA IS-MMR Calibrator	2 reactions
Single plasmid standards	2 x 5 reactions (SP1, SP2, SP3, SP5, and SP6, each one tested in duplicate)
Water control	2 reactions

Sample processing on Applied Biosystems, ABI PRISM, and LightCycler 480 instruments

We recommend testing at least 8 cDNA samples in the same experiment to optimize the use of the standards and the primers and probe mixes. The plate scheme in Figure 5 shows an example of such an experiment.

Annexe 05 : Protocole de BCR-ABL

Table 7. Preparation of qPCR mix for Applied Biosystems and ABI PRISM instruments

Component	1 reaction (μl)	ABL: 32+1 reactions (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reactions (μl)	Final concentration
Premix Ex Taq, 2x	12.5	412.5	412.5	1x
Primers and probe mix, 25x	1	33	33	1x
ROX I dye, 50x (ABI PRISM 7900HT) or ROX II dye, 50x (Applied Biosystems 7500)	0.5	16.5	16.5	1x
Nuclease-free PCR grade water	6	198	198	–
Sample (to be added at step 5)	5	5 each	5 each	–
Total volume	25	25 each	25 each	–

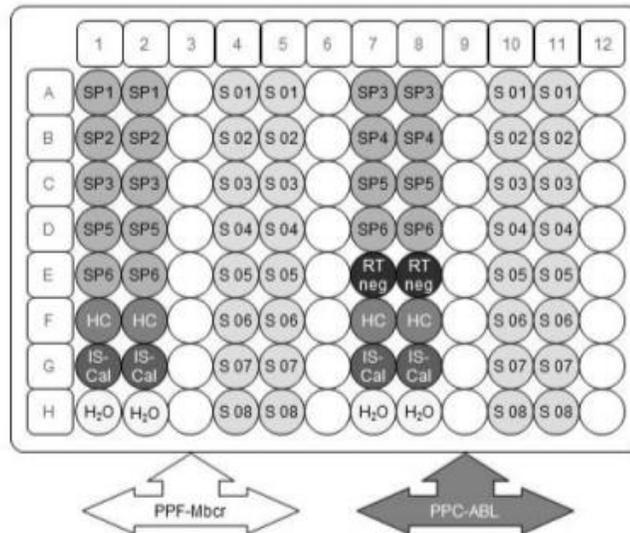


Figure 5. Suggested plate setup for one experiment with the ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit. SP1–SP6: BCR-ABL MbcR and ABL standards; HC: High cDNA positive control; IS-Cal: IS-MMR calibrator; RTneg: RT negative control; S: cDNA sample; H₂O: water control.

qPCR on Applied Biosystems, ABI PRISM, or LightCycler 480 instruments

Note: Perform all steps on ice.

Procedure

1. Thaw all necessary components and place them on ice.
2. Vortex the standards, ROX, PPF-MbcR, and PPC-ABL tubes, and centrifuge briefly (approximately 10 s, 10,000 rpm, to collect the liquid in the bottom of the tube).
3. Prepare the following qPCR mix according to the number of samples being processed. If using 96-well-plate qPCR equipment, we recommend performing all measurements in duplicate.

All concentrations are for the final volume of the reaction.

Table 7 describes the pipetting scheme for the preparation of one reagent mix for Applied Biosystems and ABI PRISM instruments, calculated to achieve a final reaction volume of 25 μ l. Table 8 describes the pipetting scheme for the preparation of one reagent mix for the LightCycler 480 instrument; calculated to achieve a final reaction volume of 25 μ l. A pre-mix can be prepared, according to the number of reactions, using the same primers and probe mix (either PPC-ABL or PPF-MbcR). Extra volumes are included to compensate for pipetting error.

Summary of quality criteria

Table 14 summarizes the various quality criteria and associated values or results.

Table 14. Quality criteria summary

Criteria	Acceptable values/results
Variations in C_T values between replicates	$\leq 2 C_T$ if mean C_T value > 36 $\leq 1.5 C_T$ if mean C_T value ≤ 36
Slope for standard curves	Between -3.0 and -3.9
R^2 for standard curves	At least >0.95 better if >0.98
SP1 standard dilution (BCR-ABL 10 copies plasmid)	Must be detected and included in the standard curve
Quality control on ABL_{CN} value for patient samples, high positive RNA control, and the IS-MMR-Calibrator	$ABL_{CN} > 10,000$ copies of ABL to reach the optimal sensitivity
PCR (water) and reverse transcription (RT negative) controls	For each $ABL_{CN} = 0$ and $Mbcr_{CN} = 0$
NCN obtained for IS-MMR Calibrator (NCN_{cal})	Must be within the interval $0.05-0.3$
High positive RNA control	Must be detected
NCN obtained for the high positive RNA control converted to the international scale (IS- NCN_{HC})	Status: No major molecular response

Troubleshooting

For more information, see the Frequently Asked Questions page at our Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocol in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see "Contact Information", page 41).

Summary of quality criteria

Table 14 summarizes the various quality criteria and associated values or results.

Table 14. Quality criteria summary

Criteria	Acceptable values/results
Variations in C_T values between replicates	$\leq 2 C_T$ if mean C_T value > 36 $\leq 1.5 C_T$ if mean C_T value ≤ 36
Slope for standard curves	Between -3.0 and -3.9
R^2 for standard curves	At least > 0.95 better if > 0.98
SP1 standard dilution (BCR-ABL 10 copies plasmid)	Must be detected and included in the standard curve
Quality control on ABL_{CN} value for patient samples, high positive RNA control, and the IS-MMR-Calibrator	$ABL_{CN} > 10,000$ copies of ABL to reach the optimal sensitivity
PCR (water) and reverse transcription (RT negative) controls	For each $ABL_{CN} = 0$ and $M_{bcr_{CN}} = 0$
NCN obtained for IS-MMR Calibrator (NCN_{cal})	Must be within the interval $0.05-0.3$
High positive RNA control	Must be detected
NCN obtained for the high positive RNA control converted to the international scale (IS- NCN_{HC})	Status: No major molecular response

Troubleshooting

For more information, see the Frequently Asked Questions page at our Technical Support Center: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. The scientists in QIAGEN Technical Services are always happy to answer any questions you may have about either the information and protocol in this handbook or sample and assay technologies (for contact information, see "Contact Information", page 41).

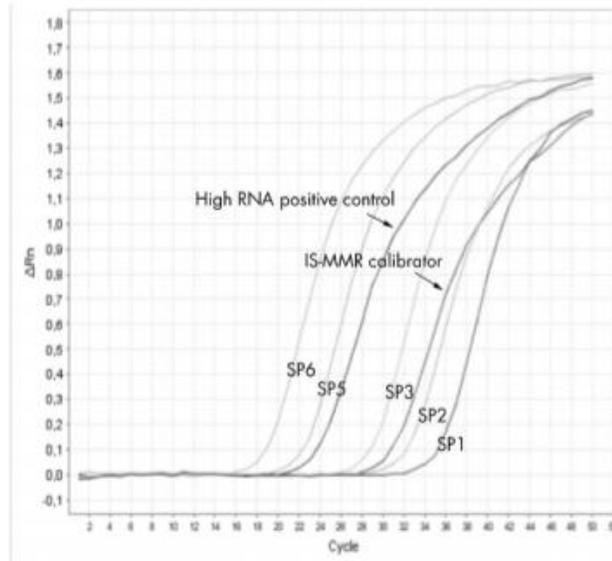


Figure 8. Detection of BCR-ABL Mbc with standards SP1, SP2, SP3, SP5, and SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copies/ $5 \mu\text{l}$.

Standard curves and quality criteria applicable to raw data

Reproducibility between replicates

The variation in C_T values between replicates should be <2 , corresponding to a fourfold change in copy number values.

Variation in C_T values between replicates is generally <1.5 if the mean C_T value of the replicates is <36 (7).

Note: Each user should measure their own reproducibility in their laboratory.

Standard curves

Raw data can be pasted into an Excel® file for analysis.

For each gene (ABL and BCR-ABL), raw C_T values obtained from plasmid standard dilutions are plotted according to the log copy number (3, 4, 5, and 6 for SP3, SP4, SP5, and SP6; 1, 2, 3, 5, and 6 for SP1, SP2, SP3, SP5, and SP6). Figure 9 shows an example of a theoretical ABL standard curve calculated on four standard dilutions. Figure 10 shows an example of a theoretical BCR-ABL standard curve calculated on five standard dilutions.

Interpretation of Results

Data analysis principle

Using TaqMan[®] technology, the number of PCR cycles necessary to detect a signal above the threshold is called the threshold cycle (C_T) and is directly proportional to the amount of target present at the beginning of the reaction.

Using standards with a known number of molecules, one can establish a standard curve and determine the precise amount of target present in the test sample. The *ipsogen* standard curves are plasmid-based. In order to ensure accurate standard curves, we use four standard dilutions for ABL, and 5 standard dilutions for Mbc. The kit also includes an IS-MMR calibrator allowing conversion of results to the international scale. Figures 7 and 8 show examples of TaqMan amplification curves obtained for standards, the IS-MMR Calibrator, and the high positive RNA control with the *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit.

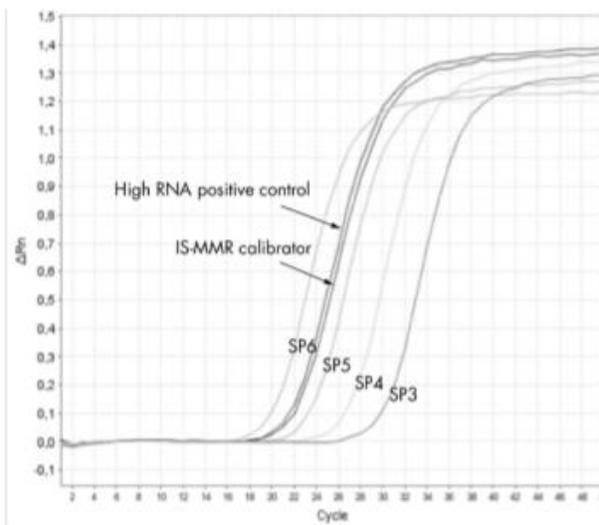


Figure 7. Detection of ABL with standards SP3, SP4, SP5, and SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 copies/ $5 \mu\text{l}$.

Table 9. Temperature profile for Applied Biosystems and ABI PRISM instruments

Mode of analysis	Standard Curve — Absolute Quantitation
Hold 1	Temperature: 95°C Time: 10 s
Cycling	50 times 95°C for 5 s 60°C for 30 s with acquisition of FAM fluorescence: Single; quencher: TAMRA
Hold 2	Temperature: 36°C Time: 1 min