

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLCULAIRE ET CELLULAIRE



Laboratoire : de Recherche sur les Hémopathies Malignes et les Hémoglobinopathies

Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER II

Filière : Biologie

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème :

**Biologie moléculaire automatisée : Avantages et limites du
GeneXpert BCR-ABL Ultra dans la LAL ph+ de l'adulte.**

Présenté par :

Mlle : Feddak Yousra

Mlle : Bouharket Lina

Soutenu le : 17/07/2018 Devant le jury composé de :

Mme. Abdulhoussein A.S	MCB	U.S.D. Blida1	Présidente
Mme. Chalal N.H.	MCB	U.S.D. Blida1	Examinatrice
Mme. Benazouz F	MAA	U.S.D.Blida1	Promotrice
Mme.Taoussi S	MCA	E.H.S ELCC Blida	Co-promotrice

Promotion : 2018/2019

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre Co-encadreur Mme Taoussi Souad pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements et son assistance moral durant toute la période du travail.

Sincèrement vous nous faites l'honneur d'être notre encadreur.

Nos remerciements s'adressent également à notre encadreur Mme Benazouz Fella pour ses précieux conseils, sa sympathie et son aide.

Nos remerciements vont également aux membres du jury Mme la presidente Abdulhussein A.S et Mme l'examinatrice Chalal N.H. pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions particulièrement et profondément tout le personnel de service d'hématologie d'hôpital Frantz-fanon Blida spécialement Mme Rekab, Mme Naziha, Mme Naouel et Mlle Khadidja.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Yousra.

Je dédie ce travail à mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon frère Mouhamed et mes sœurs : Fatiha et Kaouthar, qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A ma famille : Mon oncle Mouhamed, sa femme Atika et leurs enfants.

A mon amie et mon binôme : Bouharkat Lina , une vraie amie qui a fait de ce travail une joyeuse expérience et un grand merci pour sa mère la femme merveilleuse Mme Abid Yassina.

Merci.

Lina.

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Abid Yassina

Aucune dédicace et autant de phrases aussi expressives ne sauraient montrer le degré de mon respect, d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection depuis mon enfance et tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait et j'espère que ta bénédiction m'accompagnera toujours. Je ne pourrais exprimer ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être. Puisse dieux le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

Je dédie ce travail à mes deux sœur Sarah et Manel En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu vous protège et vous garde.

Je dédie aussi mon travail à mes amis en particuliers mes très chères amies Bessma et Yousra pour tout leur aide et leur amour. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Merci.

الملخص

ما يقارب 25% من البالغين الذين يعانون من سرطان الدم اللمفاوي الحاد لديهم نوع فرعي لهذا المرض يسمى **LALph1**، يتميز هذا النوع الفرعي بخلل كروموزومي يؤدي إلى ظهور جينة دمج خاصة **BCR-ABL**. إن المتابعة الجزيئية للمرضى المصابين بالـ **LAL ph1** مهمة للإستراتيجية العلاجية، تتمثل هذه المتابعة الجزيئية في القياس التسلسلي (القياس الكمي) لمستويات المستسخ **BCR ABL1** بواسطة آلة **GeneXpert BCR-ABL Ultra** النتائج المتحصل عليها الدراسة قمنا بمتابعة 8 مرضى **LAL ph1** بواسطة آلة **GeneXpert BCR-ABL Ultra** النتائج المتحصل عليها قسمت على 3 حالات تحمل المتغير **M-BCR** والتي تمت فيها متابعة المرض المتبقي (**MRD**)، حالتان (2) ليست **M-BCR** و3 حالات باطلة. عن طريق هذه الدراسة تمكنا من الكشف على محاسن ونقائص **GeneXpert BCR-ABL Ultra** في تشخيص و متابعة **LALph1**. بالنسبة لـ **M-BCR** فإن الآلة ذات فائدة كبيرة وأداء عال التقنية خاصة فيما يتعلق بمتابعة المرض المتبقي (**MRD**)، ومع ذلك فإنه من المهم تطوير عدة (kit) لنقاط الكسر الأخرى الخاصة بالـ **BCR-ABL (μ et m)**.

الكلمات المفتاحية:

سرطان الدم اللمفاوي (**LAL**)، **LALph1**، المستسخ، **BCR-ABL**، **RT-qPCR**، **GeneXpert BCR-ABL**

LALph1، **Ultra** إيجابي، محاسن، نقائص، تشخيص، متابعة.

Résumé

Environ 25 % des adultes qui souffrent d'une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) sont atteints d'un sous-type de la maladie appelée LAL Ph1. Ce sous-type de la LAL se caractérise par une translocation chromosomique qui entraîne la formation d'un gène de fusion caractéristique **BCR-ABL**. Le suivi moléculaire des patients atteints de LAL Ph1, est essentiel à la stratégie thérapeutique. Ce suivi moléculaire consiste en la mesure séquentielle (quantification) des niveaux de transcrits **BCR-ABL** par une des techniques de la biologie moléculaire la **RT-qPCR**. Dans cette étude nous avons évalué 8 patients avec une LAL Ph1 par l'automate **GeneXpert BCR-ABL Ultra**, les résultats obtenus se répartissent en 3 cas présentant le variant **M-BCR** et chez qui un suivi de la maladie résiduelle a été assuré, 2 cas non **M-BCR** et 3 cas invalides. Pour le **M-BCR**, l'automate est d'une grande utilité et d'une haute performance notamment pour le suivi de la maladie résiduelle minimale (**MRD**). Néanmoins il est nécessaire de développer d'autres kits pour les autres points de cassures du **BCR-ABL(μ et m)**.

Mots clés :

Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), LAL Ph1, transcrits BCR-ABL1, RT-qPCR, GeneXpert BCR-ABL Ultra, LAL Ph1 positif, avantages, inconvénients, diagnostic, suivi.

Abstract

Approximately 25% of adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL) have a subtype of the disease called ALL Ph1. This subtype of ALL is characterized by chromosomal translocation which leads to the formation of a characteristic fusion gene BCR-ABL. Molecular monitoring of patients with ph1 ALL, is essential to the therapeutic strategy. This molecular follow-up consists of the sequential measurement (quantification) of the BCR-ABL1 transcript levels by one of the molecular biology techniques the RT-qPCR. In this study we evaluated 8 ALL Ph1 patients by the GeneXpert BCR-ABL Ultra automate. The results obtained being divided into 3 cases presenting the M-BCR variant and in which a follow-up of the residual disease was ensured, in 2 cases no M-BCR and 3 invalid results. For the M-BCR, this instrument is of great utility and of a high performance notably for the follow-up of the minimal residual disease (MRD). Nevertheless, it is necessary to develop other kits for the other BCR-ABL breakpoints (μ et m).

Keywords:

Acute lymphoblastic leukemia (ALL), LAL Ph1, transcript BCR-ABL1, RT-qPCR, Gene Xpert BCR-ABL Ultra, LAL Ph1 positive, advantages, disadvantages, diagnosis, follow-up.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du développement physiologique des cellule sanguines à partir d'une cellule souche hématopoetique (hématopoïèse).....	5
Figure 2 : Diagramme du Taux d'incidence en fonction de l'âge (2009-2013).....	6
Figure 3 : Schéma d'un chromosome Philadelphie issu d'un caryotype.....	10
Figure 4 : Gène BCR et les différents points de cassure.....	10
Figure 5 : Schéma présentant la protéine ABL.....	11
Figure 6 : Schéma présentant la protéine BCR.....	12
Figure 7 : Schéma des caractéristiques structurales des variants Bcr-Abl.....	13
Figure 8 : Schéma des voies de signalisation des substrats phosphorylés par Bcr-Abl.....	14
Figure 9 : Schéma de l'effet compétitif de l'inhibiteur tyrosine kinase (ITK).....	15
Figure 10 : Etapes de réalisation d'un myélogramme.....	16
Figure 11 : Représentation schématique du Principe de la PCR.....	18
Figure 12 : Schéma des trois parties principales de la cartouche Xpert BCR-ABL Ultra.....	20
Figure 13 : Représentation schématique du module I-Core.....	20
Figure 14 : Les différentes étapes de la préparation d'échantillon.....	27
Figure 15 : Schéma du test Xpert BCR-ABL Ultra.....	28
Figure 16 : Cas d'un résultat avec présence d'un transcrit bcr-abl à un taux de 25%.....	30
Figure 17 : Cas d'un résultat avec une rémission complète.....	30
Figure 18 : Résultat d'un patient à LAL Ph1 par GeneXpert Ultra.....	33
Figure 19 : Résultats d'un patient (Ana-Bra) par GeneXpert Ultra.....	35
Figure 20 : Résultats d'un patient (Che-Ah) par GeneXpert Ultra.....	36
Figure 21 : Résultats d'un patient (Aou-Aic) par GeneXpert Ultra.....	37

Liste des figures

Figure 22 : Résultats des patients non détectés par le GeneXpert Ultra au diagnostic.....38

Figure 23 : Résultats des patients non détectés par le GeneXpert Ultra au diagnostic.....39

Figure 24 : Résultat d'un patient (Sal-Dja) par GeneXpert Ultra.....40



Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification OMS 2016 des LAL.....	8
Tableau 02 : Classification immunophénotypique des LAL B selon le groupe EGIL.....	9
Tableau 03 : Tableau récapitulatif des caractéristiques épidémiologiques et hématologiques des 8 patients LAL Ph1 EHS ELCC, CAC Blida.....	24



Liste des abréviations

ABL	Gène Abelson
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	une serine/thréonine kinase ou Protéine kinase B
ARN	Acide ribonucléique
BCR	Break point Cluster Region; gène BCR
CMF	Cytométrie en flux
CSH	Cellule souche hématopoiétique
CT	Cycle threshold (seuil de cycle)
DNTP	Désoxynucleotides triphosphates
DOK	Docking protein
EBV	Virus d'Epstein-Barr
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGIL	European Group for the Immunological characteriation of Leukemias
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ETV6	Translocation Ets -leukemia virus
FAB	Franco-Américano- Britannique
FAM	6-carboxyfluorescein ou 6-FAM
FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma
FISH	Fluorescent in situ hybridation
GB	Globules blancs

Liste des abréviations

GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
HB	Hémoglobine
HCK	Hematopoietic cell kinase
ITK	Inhibiteurs des tyrosines kinases
JNK	C-jun N terminal kinase
KMT2A	Lysine N méthyltransférase 2A (la lettre K symbolisant la lysine)
K-RAS	Kristen-RAS
LA	Leucémie aiguë
LAL Ph1	Ph1 leucémie aiguë lymphoblastique à chromosome Philadelphie
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LY	Réactif de lyse
MAPK	Mitogene activated protein kinase
M-BCR	Major Breakpoint Cluster
MO	Moelle osseuse
MRD	Minimal residual disease
MTOR	Mechanistic target of rapmycin
MYC	C-myelocytose
NFKB	Nuclear factor –kappa B
OD	Oligomerization domain
OMS	Organisation mondiale de la santé

Liste des abréviations

PAX5	Paired box protein -5
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PK	Protéinase K
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
QPCR	Quantitative polymerase chaine reaction
QSY21	Carboxylic acid succinimidyl ester
Qsy7	Carboxylic acid succinimidyl ester
Ras	Rat Sarcoma
RC	Rémission complète
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chaine reaction
RUNX1	Run –related transcription factor 1
SH	Src homology domain
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TxRd	Texas Red
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

Chapitre 2 :

Etude expérimentale

Chapitre 3 :

Résultats et discussion générale

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Table des matières

Introduction

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des proliférations clonales malignes des cellules souches engagées dans la différenciation lymphoïde B (LAL-B) ou T (LAL-T). Les cellules leucémiques (blastés) se développent dans la moelle osseuse et envahissent le sang et les organes hématopoïétiques (**Lafage-Pochitaloff et Charrin, 2003**).

Les trois-quarts des cas surviennent chez l'enfant où l'incidence est de 30 cas par million d'habitants/an. Chez l'adulte, la fréquence augmente avec l'âge avec un pic d'incidence à 70 ans. Des anomalies chromosomiques clonales sont retrouvées dans la majorité des cas : 80 % chez l'enfant et 70 % chez l'adulte (**Heim et Mitelman, 1995**). En Algérie, la leucémie aigue lymphoblastique (LAL) représente 20% des cas de LA de l'adulte avec une incidence restée stable à 0.32 et ce jusqu'aux derniers résultats de l'enquête nationale effectuée de 1994 à 2010 (**Bekadja et al., 2012**).

De nombreuses anomalies génétiques sont décrites dans la LAL, la fréquence des deux principales anomalies de structure varie selon l'âge et sont la translocation (9;22)(q34;q11), la plus fréquente chez l'adulte et la translocation (12;21), plus fréquente chez l'enfant (**Mullighan,2012**).

Le chromosome Philadelphie (Ph1+) est une anomalie chromosomique acquise associée à un type d'hémopathie, découverte dans les cellules de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en 1960 par Nowell et Hungerford, fut identifiée comme translocation (9 ; 22) (q34 ; q11) par Janet Rowley grâce aux techniques de « banding » (**Pui et al.,1990**). Sur le plan moléculaire, elle provoque la fusion des gènes BCR localisé dans le chromosome 22 (breakpoint cluster region) et ABL (Abelson) situé sur le chromosome 9 et induit l'expression d'un transcrite chimérique BCR-ABL (**Secker-Walker et al.,1991**). Ce transcrite génère 3 protéines différentes selon le point de cassure sur le gène BCR survenant en M-BCR (Bcr-Abl^{p210}), pour Major Break point Cluster, ou en m-BCR (Bcr-Abl^{p190}) pour minor Break point Cluster, ou en μ -BCR (Bcr-Abl^{p230}) (**Pane et al., 2002 ;Kurzrock et al., 2003 ; Score et al., 2010**).

Traditionnellement le diagnostic et le monitoring d'une LAL ph1 positif est assuré par une PCR classique et une RTQ PCR en mode manuel. Cela implique une méthodologie et une rigueur analytique drastiques. En effet, seuls quelques laboratoires de référence peuvent communiquer des résultats fiables,40% des laboratoires américains pouvaient donner des résultats standardisés en estimant aussi, que seuls 200 laboratoires dans le monde sur 500 existants dans ce domaine sont normalisés (**Hofman et al, 2010**)

Introduction

La biologie moléculaire est longtemps restée une discipline dépourvue de solutions d'automatisation. Cependant pour pallier à tous ces inconvénients ; une méthodologie automatisée a été développée. Toute fois les efforts conduits par les industriels du domaine ont contribué au développement d'une offre instrumentale étoffée et à même de satisfaire un large nombre d'utilisateurs. L'un des nombreux principaux contributeurs dans ce domaine est la société américaine Cepheid. C'est une société américaine fondée en mars 1996, est une société de diagnostic moléculaire qui développe, fabrique et commercialise des systèmes intégrés de test sur les marchés cliniques et non cliniques. Les systèmes de la société permettent des tests moléculaires rapides et sophistiqués des organismes et des maladies d'origine génétique en automatisant des procédures manuelles compliquées. **(Reuters, 2014)**.

Cepheid a présenté l' Xpert BCR-ABL Ultra en 2015 , réalisé sur les systèmes d'instrument GeneXpert LMC, qui est un test de diagnostic in vitro destiné à la détection quantitative des transcrits d'ARNm de translocation chromosomique BCR-ABL1 (types e13a2/b2a2 ou e14a2/b3a2) et les transcrits d'ARNm du contrôle endogène ABL1 dans les échantillons de sang périphérique chez les patients ayant une leucémie myéloïde chronique (LMC) ,et chez des patients ayant des Leucémies aiguës lymphoblastiques à chromosome Philadelphie (LAL Ph+) de génotype M (Major break point). Le réarrangement qui se produit dans le point de cassure majeur (M-BCR) générant la protéine de fusion p210, peut être détecté par le test Gene Xpert BCR –ABL, l'instrument automatise et intègre toutes les étapes analytiques, des résultats de l'échantillon aux résultats de la RQ-PCR **(Dufresne et al, 2007; Jobbagy et al, 2007)**

Dans notre étude, nous appliquerons ce test afin de mettre en évidence à la fois les avantages et les limites du test automatisé GeneXpert BCR-ABL Ultra pour le diagnostic de la LAL Ph+ et la surveillance de la maladie résiduelle.

Notre expérimentation s'est déroulée au niveau du laboratoire de cytogénétique, service d'hématologie, CAC Blida.

1-Materiels

1-1-Population d'étude

Durant notre période de stage, d janvier à Juin 2019, nous avons réalisé de manière prospective des manipulations sur l'automate GeneXpert avec des cassettes Ultra, dont 8 sur la pathologie LAL Ph1 (Tableau 3) préalablement diagnostiqués pour la fusion BCR-ABL par FISH.

Etude expérimentale

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des caractéristiques épidémiologiques et hématologiques des 8 patients LAL Ph1 (EHS ELCC, CAC Blida).

Nom	Ana.	Lar.	Tal.	Che.	Sal.	Tad.	Ouc.	Aou.
Prénom	Bra.	Kar.	Haf.	Ahm.	Dja.	Che.	Tay.	Aic.
Sexe	M	F	F	M	M	F	M	F
Age	50	42	43	16	60	56	47	66
Origine	Blida	Blida	Alger	Medea	Blida	Medea	Tipaza	Tissm
Antécédents F	RAS	Cousine DCD neo sein.	RAS	Neo sein tante, oncle neo cerveau	RAS	Frere, sœur ur néo	RAS	RAS
Date diag	30/4/17	6/5/18	22/5/18	6/9/18	1/10/18	4/11/18	31/1/19	25/2/19
Globules B	3120	23620	2890	48400	44010	5960	94100	3E +05
Hgb	7,2	6,2	8,2	8,4	9,2	7,2	12	7,8
Plaquet x1000	35	267	37	41	237	59	163	44
Blastes MO	59%	51%	94%	92%	87%	***	69%	***
CMF	LAL B calla+	LALbiclonale : LAL B+T	LALB+ calla+	LALB+ calla+	LALB+ calla+	LALB+ calla+	LALB+ calla+	LALB+ calla+
FISH bcr-abl	21%	88%	52%	48%	78%	19% 2 ph,80%	43%	14% 2 ph,74%
Biologie mol.	-25/05/17: PCR 3,7% -14/06/17: PCR 2,8%	9/05/18 M neg	4/07/18 M neg	-16/9/18: PCR 68% -17/10/18: PCR 16% -22/11/18: PCR 0,2% -20/2/19: PCR 0,35%	11/10/18 Invalide	7/11/18 M neg	12/8/18 M neg	-10/3/19: PCR110% -15/4/19: PCR3,9%
Evaluation cyto (MRD1)		RCyC	RCyC		RCyC	FISH bcr- abl88% échec	RCyC	

1-2-Conditions du prélèvement sanguin (matériel biologique)

Les échantillons de sang périphérique sont analysés avec le test Xpert BCR-ABL Ultra. Il faut utiliser des tubes EDTA (tubes pour numération et formule sanguine (NFS) à bouchon violet), une quantité de 4 ml de sang total est requise.

1-3-Matériels non biologique

Nous avons utilisé pour ce travail un automate GeneXpert BCR-ABL Ultra et des kits contenant les réactifs suivants : (Annexe 01et 02).

- **Réactif protéinase K (PK)** : est utilisée en biologie moléculaire pour digérer les protéines et enlever les contaminants de la préparation d'acides nucléiques (ADN ou ARN), elle inhibe aussi les DNase et les ARnase.
- **Réactif de lyse (LY)** : (chlorure de guanidine) : sa formule brute est CH_6CIN_3 , est un dénaturant de protéine.
- **Réactif de lavage** : Le thiocyanate de guanidinium est utilisé pour lyser des cellules afin d'extraire l'ARN et l'ADN, en plus de son action de lyse, il empêche en les dénaturant l'activité d'enzymes RNases et DNases qui pourraient endommager l'extrait.
- **Cartouche BCR-ABL Ultra** : contient des tubes réactionnels intégrés et quatre billes (lyophilisées), ces billes contiennent les réactifs de la réaction qRT-PCR - Les amorces avant et inverse), l'ADN polymérase (Taq polymérase), la reverse transcriptase, $MgCl_2$, tampon, les dNTPs, l'eau et les sondes TaqMan marquées.

Le kit a été fourni par la PCH (pharmacie centrale des hôpitaux : Référence de kit : GXBCRABL-CE-10).

2-Méthodologie

2-1-Réalisation d'un hémogramme

L'hémogramme est un examen quantitatif des éléments figurés du sang : numération des globules blancs, globules rouges et les plaquettes. Un nombre de GB < 50G/l est requis pour ce test ; si le taux de GB est supérieur à 50G/l, il faut procéder à une dilution.

2-2-Méthodes GeneXpert

L'essai est réalisé sur un automate GeneXpert Dx System, en utilisant des cartouches à usage unique contenant les réactifs de PCR et « abritant » la réaction de PCR.

2-2-1-Préparation de l'échantillon

Dans un tube conique de 50 ml, 4 ml de sang total sont lysés selon les recommandations du fabricant. Le lysat est ajouté dans la cartouche Gene Xpert puis analysé sur l'instrument GeneXpert. Dans un nouveau tube conique de 50 ml, ajouter 100 µl de protéinase K (PK)(Fig. 14B). Après avoir bien mélangé le sang en retournant le tube 8 fois, ajouter les 4 ml d'échantillon de sang (Fig.14a,c).Mélanger l'échantillon dans un mélangeur vortex pendant 10 secondes (Fig.14d,e).Puis, Incuber à température ambiante pendant 1 minute. Dans le même tube, ajouter 2,5 ml de réactif de lyse (LY) (Fig.14f). Mélanger l'échantillon à l'aide d'un vortex de façon continue pendant 10 secondes ensuite, incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Transférer 1 ml du lysat préparé dans un nouveau tube conique de 50 ml (Fig. 14g). Ajouter 1,5 ml du réactif de lyse (LY) (Fig.14h). Mélanger l'échantillon dans un mélangeur vortex pendant 10 secondes et incuber à température ambiante pendant 10 minutes. Dans le même tube conique ajouter 2 ml d'éthanol absolu (fourni par l'utilisateur) (Fig.14i). Ensuite, mélanger l'échantillon avec un mélangeur vortex pendant 10 secondes et mettre l'échantillon decôté. Enfin, éliminer les réactifs PK et LY restants dans une poubelle pour produits toxiques.

2-2-2-Préparation de la cartouche

En premier, retirer la cartouche de l'emballage en carton et vérifier qu'elle n'est pas endommagée car si elle est endommagée, on ne pas l'utiliser. Ouvrir le couvercle de la cartouche et transférer la totalité du contenu de l'ampoule de réactif de lavage dans la chambre pour réactif de lavage (petite ouverture), (Fig.14j). Puis, pipeter la totalité du contenu de l'échantillon préparé dans la chambre pour échantillon (grande ouverture S), (Fig.14k). En fin fermer le couvercle de la cartouche, ainsi la cartouche est prête à l'emploi (Fig.14).

Etude expérimentale



Figure 14 : Les différentes étapes de la préparation d'échantillon (photo originale, 2019).

A : Sang prélevé 4ml. **B :** Prpteine kinase (PK). **C :** Pipeter le sang. **D :** Vortexer. **E :** le sang+PK. **F :** réactif de lyse (LY). **G :** Transférer 1 ml du lysat dans un nouveau tube. **H :** Réactif de lyse (LY). **I :** Ethanol. **J :** Ajouter contenu de l'ampoule de réactif de lavage dans petite ouverture. **K :** Pipeter la totalité de l'échantillon dans la grande ouverture s. **L :** Fermer le couvercle, cartouche est prête à l'emploi.

2-3-Procédure automatisée

L'automate GeneXpert réalise une extraction des ARN totaux, une reverse transcription des ARN extraits et une PCR quantitative en temps réel : il s'agit d'une Nested PCR avec deux couples d'amorces et deux sondes marquées, spécifiques des gènes BCR-ABL et ABL.

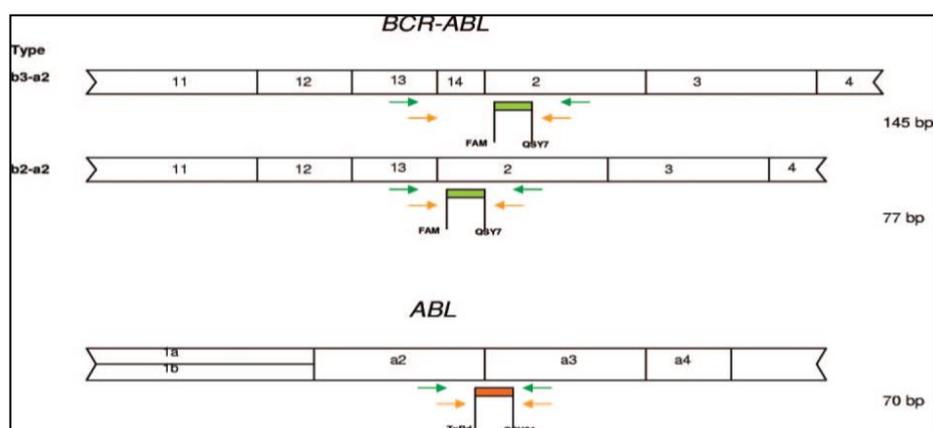


Figure 15 : Schéma du test Xpert BCR-ABL Ultra (Harieche et al., 2017).

Les emplacements des amorces RT-PCR et des amorces nichées (Nested) sont respectivement indiqués par des flèches vertes et orange. Amplicon BCR-ABL niché (Nested) de 145 pb (b3a2 breakpoint) ou 77 pb (b2a2 breakpoint) est généré en fonction de la translocation de la cible p210. La sonde TaqMan BCR-ABL en temps réel (verte) marquée avec un rapporteur 5' un fluorophore (FAM) et un agent quencher 3' (QSY7) s'hybrident à la région a2 du gène ABL à proximité du point de rupture BCR-ABL. La sonde TaqMan pour ABL (orange) marquée avec Le fluorophore rapporteur Texas Red (TxRd) à l'extrémité 5' et un extincteur 3' (QSY21) s'hybride à la jonction exon entre les exons a2 et a3.

2-3-1-Démarrage du test

Mettre l'automate GeneXpert Dx sous tension, puis allumer l'ordinateur, le logiciel GeneXpert démarrera automatiquement. Se connecter au logiciel du GeneXpert System en saisissant le nom d'utilisateur et le mot de passe, dans la fenêtre du GeneXpert System. Cliquer sur Create Test et Commander un test et la fenêtre Create Test s'affiche. Lire ou saisir le n° ID du patient (facultatif). S'assurer, le cas échéant, de saisir correctement le n° ID du patient car le n° ID du patient est associé aux résultats du test et indiqué dans la fenêtre Afficher les résultats (View Results). Scanner le code barre de la cartouche du test Xpert BCR-ABL Ultra (grâce aux informations du code-barres, le logiciel remplit automatiquement les cases des champs suivants : Sélectionner un test (Select Assay), N° du lot de réactifs (Reagent Lot ID), N° de série de cartouche (Cartridge SN) et Date d'expiration (Expiration Date). Ensuite, cliquer sur Start Test. Si un mot de passe est demandé, entrer le (Annexe 3).

2-3-2-Chargement du GeneXpert :

Ouvrir la porte du module de l'automate et placer la cartouche déjà préparée dans un module vide. Ensuite, fermer la porte, et attendre le temps nécessaire pour l'analyse automatisée (Annexe 3).

2-4-Fonctionnement de l'automate chargé de la cartouche GeneXpert

Lorsque l'automate démarre, une tige de plongée s'abaisse et le corps de la valve pivote dans la première position, il active le piston qui laisse tomber l'échantillon dans le tube central, le corps de la valve tourne en position 2 et dépose l'échantillon ; grâce à la zone active les éléments seront piégés sur le filtre, lorsque le fluide restant sera déposé dans une chambre de déchets, le corps de la valve tourne à nouveau en position 3 puis il aspire le premier réactif dans le tube central et passe à travers la zone active, le piston tourne ensuite vers la position 4 pour aspirer le second réactif dans la zone active. À ce stade, une sonication aura lieu contre la base du corps de la valve qui sépare les éléments et libère le matériel génétique, une fois la sonication est terminée, le piston pousse le matériel génétique libéré dans la chambre contenant les deux premières billes de réaction. Ces billes se dissolvent en solution avec le matériel génétique. Le piston pivote à nouveau vers la position 5 et pompe la solution dans le tube de réaction à l'arrière de la cartouche. Après thermocyclage, le piston retourne la solution dans le tube central, fait pivoter le corps de la valve et pompe la solution dans une autre chambre où des billes de réaction seront dissoutes. Le piston absorbe à nouveau la solution dans le tube central, tourne, puis dépose la solution dans le tube de réaction et effectue un deuxième cycle de thermocyclage. Enfin il y aura une détection de six couleurs en cours au moment où l'essai est terminé (Annexe 04) (Cepheid, 2019).

2-5-Déchargement du GeneXpert

Attendre que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir et retirer la cartouche usagée dans un conteneur à déchets (Annexe 03).

2-6-Expression des résultats

Après en moyenne 1 h 45 mn que le test est réalisé, les résultats peuvent alors être affichés. D'abord, cliquer sur l'icône View Results pour afficher les résultats, après on crée un fichier de format PDF (Pour l'archivage) (Annexe 03).

2-6-1-Exemples de résultats

Cas 1 : présence du transcrit de fusion M BCR ; dans ce cas au seuil de 25%

Assay Information					
Assay	Assay Version	Assay Type			
Xpert BCR-ABL Ultra	1	In Vitro Diagnostic			
Test Result: BCR-ABL has been detected at a level of 25% (IS)					
Test and Analyte Result					
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result	Target Delta Ct
BCR-ABL	12.8	761.0	POS	PASS	-2.1
ABL	10.7	478.0	PASS	PASS	

Figure 16 : Cas d'un résultat avec présence d'un transcrit bcr-abl à un taux de 25%
(Photo originale, 2019).

Patient X, EHS ELCC, CAC Blida, LAL Ph1 M BCR.

Cas 2 : Rémission moléculaire complète dans une LAL Ph1 MBCR

Dans ce cas, détection du MBCR au seuil de 0,0075 (IS) correspondant à une rémission moléculaire majeure (RMM).

Assay Information					
Assay	Assay Version	Assay Type			
Xpert BCR-ABL Ultra	1	In Vitro Diagnostic			
Test Result: BCR-ABL has been detected at a level of 0.0075% (IS)					
Test and Analyte Result					
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result	Target Delta Ct
BCR-ABL	26.2	609.0	POS	PASS	-14.3
ABL	11.9	408.0	PASS	PASS	

Figure 17 : Cas d'un résultat avec une rémission complète (Photo originale, 2019).

Une LAL Ph1 M BCR après 6 mois de traitement par Imatinib et polychimiothérapie. Patient X, EHS ELCC, CAC Blida.

Références bibliographiques

- Advani AS., Pendergast AM., (2002)** - *Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects*, Leuk. Res., 26(8): 713-720.
- Anonyme, (2007)**, Laboratoire Pasteur Cerba - *Guide des analyses spécialisées*, 5ème édition, Elsevier Masson, p : 616.
- Arber DA., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz MJ., Le Beau MM., Bloomfield CD., Cazzola M., Vardiman JW., (2016)** - *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*, .Blood,127(20): 2391-2405.
- Baldi I., Bard D., Barouki R., Benhamou S., Bénichou J., Bernier M-O., Bouchot O., Carayon P., Ceraline J., Charafe-Jauffret E., et al., (2008)** - *Cancer et environnement : expertise collective*, Rapport de Recherche, Inst. Natio. De la santé et de la rech. Médic. (INSERM), Paris, 237-312 pp.
- Bekadja MA., Talhi S., Mesli N., et al.,(2012)** - *Myélome Multiple du sujet âgé*, revue algérienne d'hématologie n°6-7.
- Bene MC., Castoldi G., Knapp W., Ludwig WD., Matutes E., et al., (1995)** -*Proposals for the immunological classification of acute leukemias:European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*, Leukemia, 9(10): 1783-1786.
- Bernt KM., Hunger SP., (2014)** - *Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia*, Front. Oncol., 4 : 54.
- Berrington A., Darby S., Weiss H., Doll R., (2001)** - *100 years of observation on British radiologists: Mortality from cancer and other causes 1897–1997*, British J. Radiol., 74(882): 507–519.
- Boissel N.,Llopis L., Nibourel O., Wemeau M., Renneville A., Dombret H., Preudhomme C., (2009)** - *Place de la biologie moléculaire dans l'évaluation pronostique des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde*, Hémato., 15(6) : 426-443.
- CD., (2018)**- Fichier de définition du test, Cephied® ., Réf : GXBCRABL-CE-10.
- Cepheid.,(2014)** le profile d'entreprise [enligne] disponible sur : <http://mobile.reuters.com/finance/stocks/overview/CPHD.F>
- Cepheid.,(2013)** -brochure de technologie GeneXpert [enligne] disponible sur :www.cephid.com.
-

Références bibliographiques

- Chang BH., Willis SG., Stork L., Hunger SP., Carroll WL., Camitta BM., et al., (2012)** - *Imatinib resistant BCR-ABL1 mutations at relapse in children with Ph+ ALL: a Children's Oncology Group (COG) study*, Br. J. Haematol. 157(4):507–510.
- Chekroun A., (2016)** - *Contribution à l'analyse mathématique d'équations aux dérivées partielles structurées en âge et en espace modélisant une dynamique de population cellulaire*, Mém., Doc., Mathématiques, Univ. Université Claude Bernard Lyon 1, 208 p
- Chiarella P., Summa V., De Santis S., Signori E., Picardi E., Pesole G., Saglio G.; M.Fazio V., (2012)** - *BCR/ABL1 fusion transcripts generated from alternative splicing: implications for future targeted therapies in Ph+ leukaemias*, Curr. Mol. Med., 12(5): 547-565.
- Chu S., Li L., Singh H., Bhatia R., (2007)** - *BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia*, Cancer Res., 67(14):7045–53.
- Cilloni D., Saglio G., (2012)** - *Molecular pathways: BCR-ABL*, Clin.Cancer. Res., 18(4): 930-937.
- Coster L., (2018)** - *Utilisation de la CGH/SNP array dans les leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques : perspectives et limites*, Mém., Doc., Biologie médicale, Univ. Toulouse III – Paul Sabatier, 90 p.
- Dominik D., Pamela M., Mandel J., Kelsh M., (2006)** - *A meta-analysis of occupational trichloroethylene exposure and multiple myeloma or leukaemia.*, Occupat. Med., 56 (7): 485-493.
- Dufresne SD, Belloni DR., Levy NB., et Tsongalis GJ., (2007)** - *Quantitative Assessment of the BCR-ABL Transcript Using the Cepheid Xpert BCR-ABL Monitor Assay*, Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 131(6): 947-950.
- Faderl S., Jeha S., Kantarjian H., (2003)** - *The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia*, Cancer, 98(7): 1337–1354.
- Fava C., Morotti A., Dogliotti I., Saglio G., and Rege-Cambrin (2015)** - *Update on emerging treatments for chronic myeloid leukemia*, Expert Opin. Emerg. Drugs, 20(2): 183-196.
- Fava C., Rege-Cambrin G., Saglio G., (2015)** - *The choice of first-line chronic myelogenous leukemia treatment*, Ann. Hemato., 94 (2): 123-131.
-

Références bibliographiques

Harieche F., Abdennebi N., Boukhemia F., Assouak W., Belhimer R., Zerhouni F., Hamladji RM., Ahmed Nacer R., (2017) - Quantification du transcrit BCR-ABL1 avec la XPERT BCR-ABL monitor ASSAY ET XPERT BCR-ABL ULTRA(CEPHEID). Rev. Algér. Hématol. SAHTS, N° 13-14, 14-21.

Hassan AQ., Sharma SV., Warmuth M., (2010) - *Allosteric inhibition of BCR-ABL*, Cell Cycle, 9(18): 3734-3738.

Heim S, Mitelman F., (1992) - *Quantitative acute leukemia cytogenetics*, Genes Chrom.Cancer, 5(1): 57-66.

Herlet S., (2010) -*Les inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique chez l'adulte : Du Glivec® aux traitements de deuxième génération. Conséquence de la sortie de la réserve hospitalière pour le pharmacien d'officine*, Mém., Doc., Pharmacie, Univ. Henri Poincare -Nancy 1. 158 p.

Hofman V., Ilie M., Gavric-Tanga V., Lespinet V., (2010) -*Rôle du laboratoire d'anatomie pathologique dans l'approche pré-analytique des examens de biologie moléculaire réalisés en pathologie tumorale*, Anna. Pathol., 30(2) : 85-93.

Inaba H., Greaves M., Mullighan CG., (2013) -*Acute lymphoblastic leukaemia*, Lancet., 381(9881):1943-1955.

Infante-Rivard C., Labuda D., Krajinovic M., Sinnett D., (1999) - *Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms*, Epidemiology, 10(5): 481-487.

Jabbour E., O'brien S., Konopleva M., Kantarjian H., (2015) - *New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia*, Cancer, 121(15): 2517-2528.

Jobbagy Z., Van Atta R., Murphy KM., Eshleman JR and Gocke CD., (2007) - *Evaluation of the Cepheid GeneXpert BCR-ABL Assay*, J Mol Diagn. 9(2): 220–227.

Kelliher M., Knott A., McLaughlin J., Witte ON., Rosenberg N., (1991) - *Differences in oncogenic potency but not target cell specificity distinguish the two forms of the BCR/ABL oncogene*, Mol. Cell Biol. 11(9):4710–6.

Kharas MG., Janes MR., Scarfone VM., Lilly MB., Knight ZA., Shokat KM., et al., (2008) -*Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR*

Références bibliographiques

inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells, J. Clin. Invest., 118(9):3038–50.

Klein A., van Kessel AG., Grosveld G., Bartram CR., Hagemeijer A., Bootsma D., et al., (1982) - *A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia*. Nature, 300 (5894) :765–7.

KONE G. (2011) - *LE TRAITEMENT DE LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE PAR L'IMATINIB MESYLATE «GLIVEC»*. A PROPOS DE 16 CAS OBSERVES DANS LE SERVICE D'HEMATOLOGIE-ONCOLOGIE MEDICALE DU CHU DU POINT G DU 1ER JANVIER 2005 AU 31 DECEMBRE 2008, Mém., Doc., Médecine, Univ. Bamako, Mali, 86 p.

Kurzrock R., Kantarjian HM., Druker BJ., Talpaz M., (2003) - *Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics*, Ann. Intern. Med.,138(10): 819-830.

La leucémie lymphoblastique aiguë Henri, survivant de la LLA Révisée en 2017.

Lafage-Pochitaloff M., (2003) - *Notions de base en cytogénétique conventionnelle et moléculaire : application au diagnostic des hémopathies malignes*, Pathol. Biol., 51(6) : 307–311.

Lafage-Pochitaloff M., Charrin C., (1996) -*Cytogenetic Abnormalities in Adult Lymphoblastic Leukemia: correlations with Hematologic features and outcome*, Blood, 87(6): 3135–42. [8]

Lafage-Pochitaloff M., Charrin C., (2003) - *Anomalies cytogénétiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques*, Pathol.Biol., 51(6): 329-336.

Leguay T., Mahon FX., (2005) - *Leucémie myéloïde chronique*, Hématologie, 2 (3) : 187-205.

Letestu R., Valensi F., (2003) - *La ponction aspiration médullaire à vise diagnostique.*, Annal. Biol.Clin., 61(6): 655-665.

Li S., Ilaria RL. Jr., Million RP., Daley GQ., Van Etten RA., (1999) - *The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity*, J. Exp. Med., 189 (9) :1399–412.

Mahon FX., (2001) - *Leucémie myéloïde chronique et inhibiteurs de tyrosine kinase*, Rev. Med. Interne, 22 (9) : 894-899.

Références bibliographiques

- Mathé G., Amiel JL., Schwarzenberg L., Cattan A., Schneider M., (1963)** - *Haematopoietic chimera in man after allogenic (homologous) bone-marrow transplantation*, *Thembj*, 2(5373): 1633–1635.
- Melo JV., (1996)** - *The molecular biology of chronic myeloid leukaemia*, *Leukemia*, 10(5): 751-756.
- Mohanty S., Bilimoria KY., (2014)** - *Comparing national cancer registries: The National Cancer Data Base (NCDB) and the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program*, *J. Surgic.Oncol.*, 109(7): 629-630.
- Moorman AV., (2012)** - *The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia*, *Blood Rev.*, 26(3): 123-135.
- Mrózek K, Harper DP, Aplan PD., (2009)** - *Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia*, *Hemato. Oncol. Clinic. North Ameri.*, 23(5): 991-1010.
- Mullighan CG., Goorha S., Radtke I., Miller CB., Coustan-Smith E., Dalton JD., Girtman K., Mathew S., Ma J., Pounds SB., Su X., Pui CH., Relling MV., Evans WE., Shurtleff SA., Downing JR., (2007)** - *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia*, *Nature*, 446 (7137): 758-764.
- Mullis KB., (1990)** - *The unusual origin of the polymerase chain reaction*, *Scient. America.*, 262(4): 56–61, 64–5.
- Ottmann OG., Wassmann B., (2005)** - *Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia*, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:118-22.
- Pane F., Intrieri M., Quintarelli C., Izzo B., Muccioli GC., Salvatore F., (2002)** - *BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations*, *Oncogene*, 21(56): 8652-8667.
- Patlak M., (2002)** - *Targeting Leukemia: From Bench to Bedside*, *FASEB J.*, 16(3): 273-273.
- Piller G., (2001)** – *Leukemia: A brief historical review from ancient times to 1950*, *British J. Haem.* 112(2): 282-292.
- Preston D., Kusumi S., Tomonaga M., Izumi S., Ron E., et al., (1994)** - *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III: Leukemia, lymphoma and multiple myeloma 1950–1987*, *Radiation Research*, 137(2): 68–97.
- Pui CH, Crist WM, Look AT., (1990)** - *Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia*, *Blood*, 76(8): 1449–1463.
-

Références bibliographiques

- Pui CH., Relling MV., Downing JR., (2004)** - *Acute lymphoblastic leukemia*, N.Engl. J. Med. 350 (15):1535-1548.
- Redig AJ., Vakana E., Platanias LC., (2011)** - *Regulation of mammalian target of rapamycin and mitogen activated protein kinase pathways by BCR-ABL*. Leuk Lymphoma 52(Suppl 1):45–53.
- Rigal C., (2003)** - *Contribution à l'histoire de la recherche médicale : autour des Travaux de Jean Bernard et de ses collaborateurs sur la leucémie aigüe, 1940-1970*, Thèse, Doc., Epistémologie, histoire des sciences et des techniques, Université PARIS 7, Denis diderot, 364 p
- Robert J., (2006)** – De chimiothérapie classique à la chimiothérapie ciblée : les mécanismes de l'oncogénese aux niveau cellulaire et moléculaire, Joh. Lib. Euro., 93 (4) : 5-16.
- Sattler M., Griffin JD., (2003)** - *Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene*, Semin. Hematol., 40(2):4–10.
- Score J., Calasanz M. J., Ottman O., Pane F., Yeh R. F., et al., (2010)** - *Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation*, Leukemia, 24(10): 1742-1750.
- Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV., (1991)** - *Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age, distribution, BCR breakpoint and prognostic significance*, Leukemia, 5(3): 196–199.
- Valensi F., (2002)** – *Classification des leucémies aiguës : nouvelles propositions de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)*, Franç. Labora., 2002(344): 19-24.
- Van Rhee F., Hochhaus A., Lin F., Melo JV., Goldman JM. and Cross NC., (1996)** - *p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias*, Blood, 87(12): 5213-5217
- Van Rhee F., Kasprzyk A., Jamil A., Dickinson H., Lin F., Cross NC., et al., (1995)** - *Detection of the BCR-ABL gene by reverse transcription/polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization in a patient with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukaemia*, British J. Haemato., 90(1): 225–228.
- Verstovsek S., Lin H., Kantarjian H., Saglio G., De Micheli D., Pane F., Garcia-Manero G., Intriери M., Rotoli B., Salvatore F., Guo JQ., Talpaz M., Specchia G., Pizzolo G., Liberati AM, Cortes J., Quackenbush RC., Arlinghaus RB., (2002)** - *Neutrophilic-*
-

Références bibliographiques

chronic myeloid leukemia: low levels of p230 BCR/ABL mRNA and undetectable BCR/ABL protein may predict an indolent course, Cancer, 94(9): 2416-2425.

Wartenberg D., Groves F., Adelman A., (2008) - *Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology*. In: Hematologic Malignancies: Acute Leukemias. Ed. Springer, New York, 77-93pp.

Weier HU., Gray JW., (1988) - *A programmable system to perform the polymerase chain reaction*, DNA, 7(6): 441-447.

Xavier A., Ge Y., Taub J., (2009) - *Down Syndrome and Malignancies: A Unique Clinical Relationship*, J. Molecul. Diag., 11(5): 371-380.

Yang K., Fu L., (2015) - *Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies*, Critic. Rev. Oncol. Hematol., 93(3) : 277-292.

Sites web utilisés :

(<http://fumed.forumactif.org/t2432-realisation-d-un-myelogramme>).

<http://www.cephied.com/fr/solutions-cephied-fr/tests-ce-ivd/oncologie-et-genetique/xpert-bcr-abl-ultra>

<https://mobile.reuters.com/finance/stocks/overview/CPHD.F>

1-Résultats

1-1-Conditions pré analytiques

Tous les patients, chez qui le diagnostic hématologique de LAL a été posé font l'objet d'une étude cytogénétique à la recherche du bcr-abl par FISH.

Le type de sonde utilisé dans la technique FISH du laboratoire du CAC, retrouve le signal bcr-abl dans tous les cas mais elle ne permet pas de discriminer les 3 variants moléculaires de bcr-abl (M, m et μ).

De ce fait, lorsqu'un échantillon de sang est traité par GeneXpert, seul le variant moléculaire M-bcr sera exprimé.

1-2-Expression des résultats du Gene Xpert BCR-ABL Ultra

Le logiciel de l'instrument GeneXpert affiche les résultats directement interprétés comme positif, négatif ou invalide.

La présence du variant M-BCR est exprimé par un taux de bcr-abl $> 0,0032$ (IS).

L'absence du variant M-BCR est exprimé par la mention « indétectable » : cela signifie la possibilité d'avoir un des deux variants (m-BCR ou μ -BCR) qui devront être identifiés par la q-PCR en temps réel conventionnelle.

Lorsque le résultat mentionné est « invalide », cela signifie que la manipulation a été invalidée pour des raisons techniques (présence de bulles dans l'échantillon, quantité de sang insuffisante, hyperleucocytose majeure).

1-3-Interprétation des résultats

Les résultats sont automatiquement interprétés par le GeneXpert Instrument System à partir des signaux fluorescents mesurés et des algorithmes de calcul intégrés.

Les résultats sont affichés sous forme de deux courbes, une pour le transcrite BCR-ABL (la courbe bleue en gras), la seconde est la courbe de référence du transcrite ABL (la courbe bleu clair) (Fig.18).

Résultats et discussion générale

Le terme "courbe d'amplification caractéristique" qualifie une courbe de fluorescence en fonction de cycles de la qPCR, avec une phase appelée ligne de base ou bruit de fond(A), une phase exponentielle(B) et une phase de plateau(C).

- La première phase : est marquée par l'absence de fluorescence.
- La deuxième phase : est la phase exponentielle où la fluorescence est détectée à partir d'un point appelé CT (seuil de cycle). Spécifique à chaque patient (la valeur ct dépend de la charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR, plus la CT est petite plus l'échantillon est concentré).
- La phase finale est la phase où la fluorescence prend un point final constant indiquant la fin de la réaction de PCR due à des facteurs limitants (dNTPs, fluorophore, etc.).

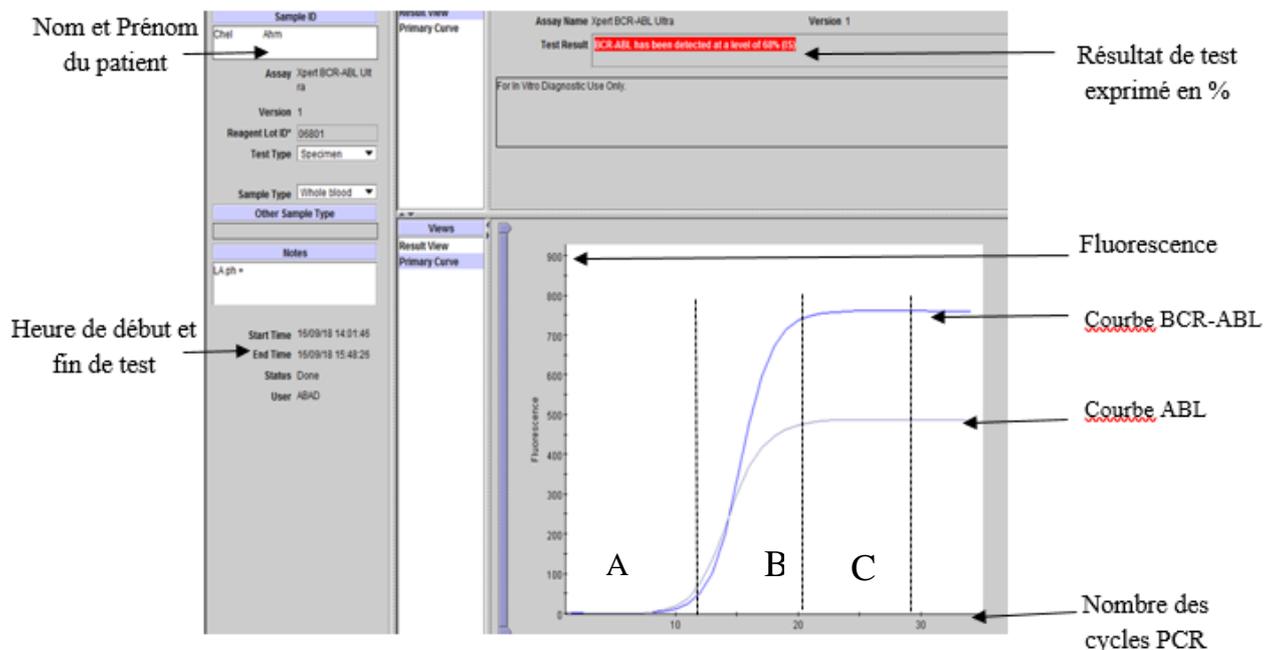


Figure 18 : Résultat d'un patient à LAL Ph1 par GeneXpert Ultra (photo originale, 2019).

On distingue également une autre phase située après la phase exponentielle appelée phase linéaire qui est une phase cinétique utilisée pour calculer la quantité d'amplicons. Cela s'explique par les sondes utilisées, qui sont des sondes d'hydrolyse conçues pour accroître la spécificité des techniques de PCR quantitative. Ces sondes consistent en un fluorophore (Reporter) FAM (est marqué en 5') et du fluorophore (Quencher) QSY7 pour la sonde spécifique de BCR-ABL.

Résultats et discussion générale

La sonde spécifique du gène ABL (en orange) est marquée en 5' par le fluorophore Texas Red (TxRd) et le fluorophore QSY21 (Quencher) en 3'.

Le Quencher inhibe la fluorescence émise par le fluorophore (Reporter) lorsqu'il est excité par la lumière du thermocycleur. Ainsi, le reporter et le Quencher sont très proches l'un de l'autre, le signal fluorescent est inhibé par le Quencher.

Chaque sonde est capable de s'hybrider avec une région d'ADN spécifique amplifiée par une paire d'amorces spécifique (la sonde s'hybride à un ADN simple brin). L'activité exonucléase 5'-3' de la taq polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin matrice.

La dégradation de la sonde libère le fluorophore (reporter), brisant ainsi la proximité existante de quencher et permettant ainsi la fluorescence. Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au fluorophore et donc à la quantité d'ADN présente dans le produit de la PCR.

- Quand le résultat "BCR-ABL est détecté, le logiciel GeneXpert calcule le % BCRABL / ABL (IS) à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ BCR-ABL / ABL IS} = E\Delta Ct^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{facteur d'échelle (SF)}.$$

Précisant l'efficacité de la réaction PCR ($E\Delta Ct$) associée à chaque lot de réactif (cartouche) et établie par Cepheid à partir d'une courbe de calibration ΔCt fx (log de la quantité d'ARN).

- Quand le résultat BCR-ABL est indétectable, le logiciel GeneXpert calcule d'abord un rapport BCR-ABL / ABL théorique en soustrayant 32 du Ct ABL du test (Ct ABL du test - 32). Le logiciel calcule ensuite le taux de BCR-ABL.

$$\% \text{ BCR-ABL / ABL IS} = E\Delta Ct^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{facteur d'échelle (SF)}.$$

1-4-Interprétation des résultats des patients à M-BCR-ABL détectés par le GeneXpert Ultra

Le premier cas : est celui d'un patient à M-BCR détectés par le GeneXpert Ultra de la première et la deuxième évaluation (Fig. 19).

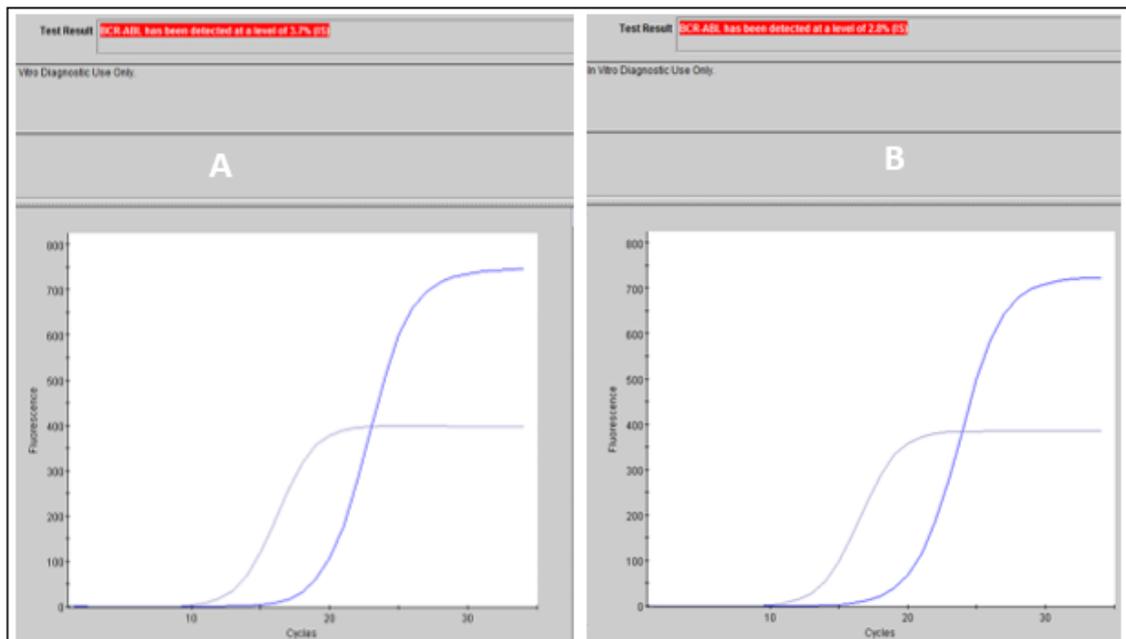


Figure 19 : Résultats d'un patient (Ana-Bra) par GeneXpert Ultra (Photo originale, 2019).

A : Résultat de la 1^{ère} MRD (maladie résiduelle) du patient Ana-Bra.

B : Résultat de la 2^{ème} MRD du patient Ana-Bra.

Une fois le diagnostic était fait par la technique FISH (BCR-ABL = 21%), on a réalisé la première MRD et la deuxième MRD par le GeneXpert qui affiche le résultat suivant :

- La première MRD montre que le M-BCR a été détecté à un niveau de 3.7% (IS). (CT BCR-ABL \approx 17 et une valeur CT ABL \approx 13).
- La deuxième MRD montre que le M-BCR a été détecté à un niveau de 2.8% (IS). (CT BCR-ABL \approx 19 et une valeur CT ABL \approx 13.5). La diminution des taux de transcrite BCR-ABL est dus à une bonne réponse au traitement.

Le deuxième cas : est celui d'un patient à M-BCR détecté par le GeneXpert Ultra au diagnostic, de la première, de la deuxième et la troisième évaluation (Fig.20).

Résultats et discussion générale

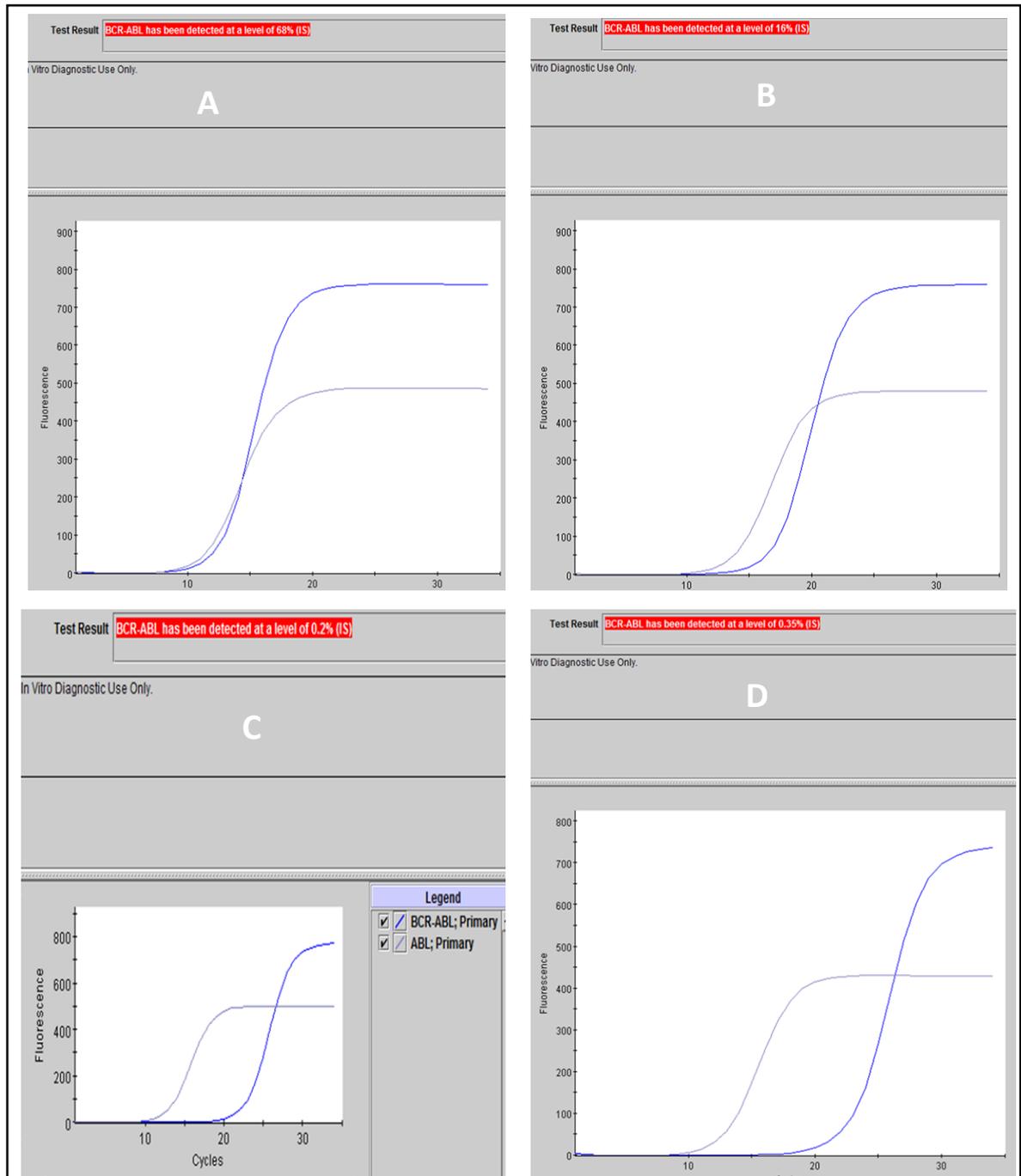


Figure 20 : Résultats d'un patient (Che-Ah) par GeneXpert Ultra (Photo originale, 2019).

A : Résultat au diagnostic du patient Che-Ahm.

B : Résultat de la 1^{ère} MRD de patient Che-Ahm.

C : Résultat de la 2^{ème} MRD de patient Che-Ahm.

D : Résultat de la 3^{ème} MRD de patient Che-Ahm.

Résultats et discussion générale

Chez ce patient, le taux du bcr-abl retrouvé par FISH = 48%, le résultat au diagnostic du M-BCR du patient Che-Ahm était de 68% (IS). (CT BCR-ABL \approx 11 et une valeur CT ABL \approx 12).

- Le résultat de la MRD1 montre que le M-BCR a été détecté à un niveau de 16% (IS). (CT BCR-ABL \approx 13 et une valeur CT ABL \approx 9). On note une diminution importante du transcrit M-BCR chez ce patient ; cela signifie une bonne réponse thérapeutique.
- Le résultat de la MRD2 montre que le M-BCR a été détecté à un niveau de 0.2% (IS). (CT BCR-ABL \approx 23 et une valeur CT ABL \approx 12). Le taux du transcrit continu à baisser ; indiquant le processus d'éradication progressif de la maladie sous traitement
- Le résultat de la MRD3 montre que le BCR-ABL a été détecté à un niveau de 0.35% (IS). (CT BCR-ABL \approx 24 et une valeur CT ABL \approx 12). Le taux de transcrit BCR-ABL a augmenté par rapport au dernier contrôle ; cela peut signifier soit une mauvaise observance du traitement ou une vraie résistance acquise au traitement proposé. Pour ce patient ; l'interrogatoire a révélé un non-respect des dates prévues et des durées du traitement convenu, c'est la responsabilité du patient d'adhérer au protocole pour avoir la meilleure réponse possible.

Le troisième cas : est celui d'un patient à M-BCR détecté par le GeneXpert Ultra au diagnostic et la première évaluation (Fig. 21)

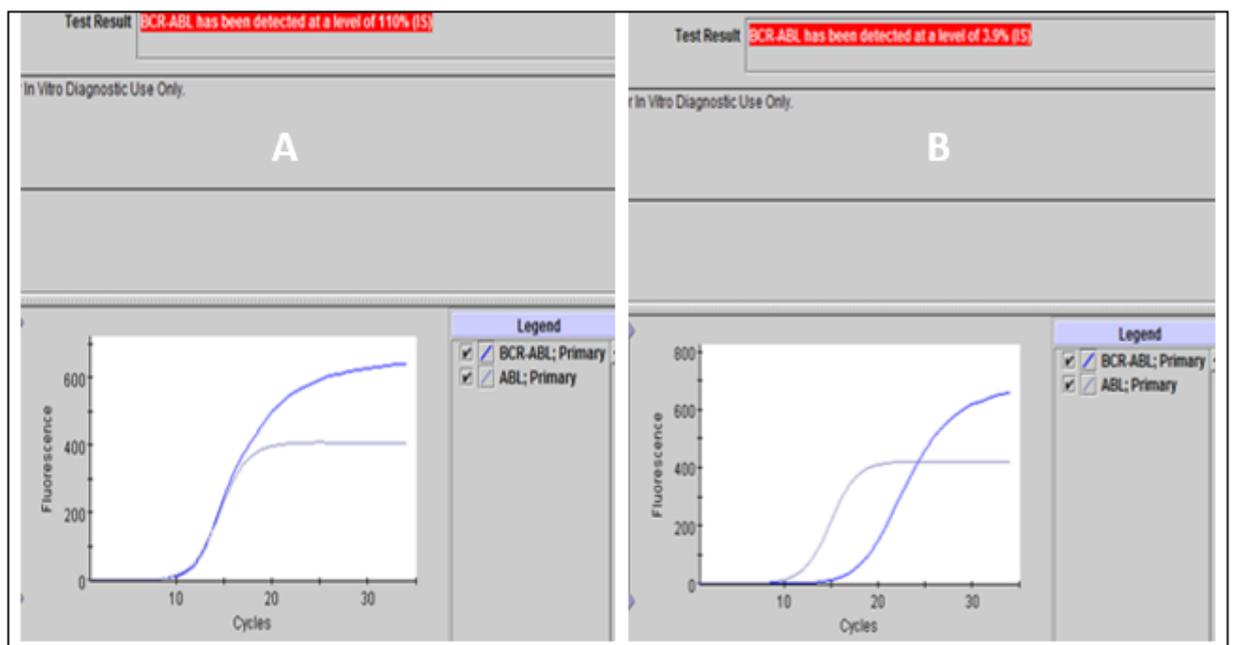


Figure 21 : Résultats d'un patient (Aou-Aic) par GeneXpert Ultra (Photo originale, 2019).

Résultats et discussion générale

A : Résultat du diagnostic du patient Aou-Aic.

B : Résultat de la 1 ère MRD du patient Aou-A ic.

- Le résultat au diagnostic du patient Aou-Aic réalisé par le GeneXpert montre que le BCR-ABL a été détecté à un niveau de 110% (IS). (CT BCR-ABL \approx 12 et une valeur CT ABL \approx 12). Le résultat en FISH était : simple signal = 14 %, signal dupliqué = 74%. Le signal dupliqué indique une maladie agressive.
- Le résultat de la MRD1 montre que le BCR-ABL a été détecté à un niveau de 3.9% (IS). (CT BCR-ABL \approx 18, et une valeur CT ABL \approx 11). La diminution du taux du transcrit BCR-ABL est le témoin d'une bonne réponse au traitement.

1-5-Interprétation des résultats des patients non détectés par le GeneXpert Ultra

Le **premier cas** est celui des patients non détectés par le GeneXpert Ultra au diagnostic (Fig. 22).

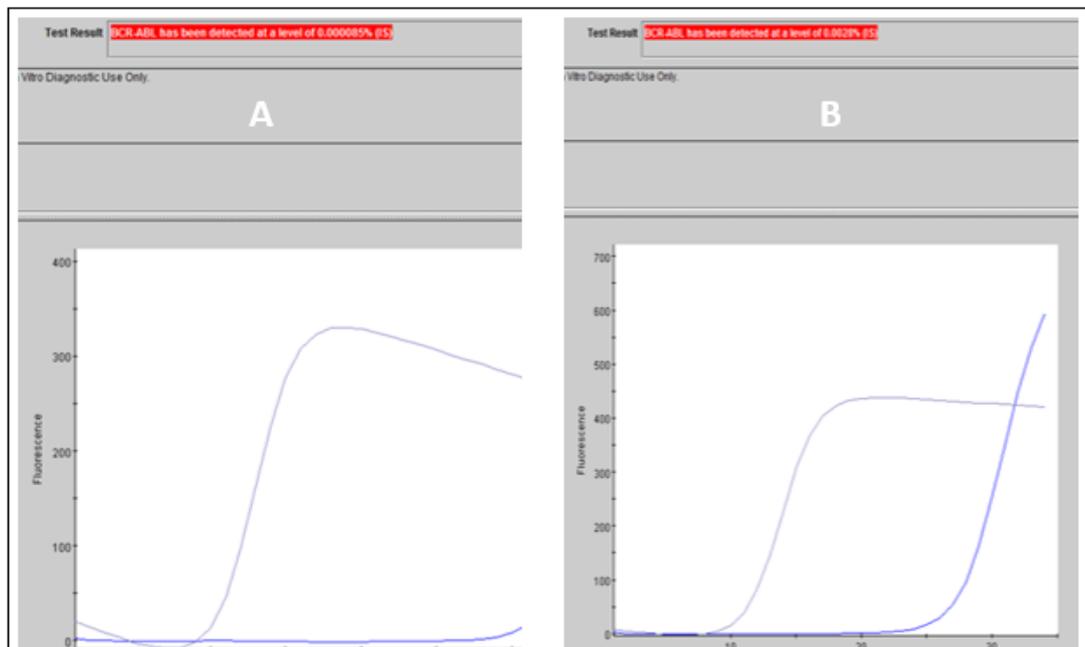


Figure 22 : Résultats des patients non détectés par le GeneXpert Ultra au diagnostic
(Photo originale, 2019).

A : Résultats au diagnostic du patient Ouc-Tay.

B : Résultats au diagnostic du patient Tad-Che.

Résultats et discussion générale

- Pour le premier patient le taux de transcrit BCR-ABL au diagnostic = 0,00085%, il traduit un taux pratiquement indétectable alors que le patient n'a reçu aucun traitement, par ailleurs la FISH concomitante a révélé un taux de bcr-abl de 43% ; plus conforme à la réalité. Ce résultat moléculaire est de ce faite considéré comme invalide.
- Pour le deuxième patient le taux du transcrit BCR-ABL au diagnostic = 0,0028, résultat qui correspondrait à une rémission moléculaire profonde alors que le patient n'a pas encore reçu de traitement, de ce fait ; ce résultat est en contradiction avec le résultat obtenu par la FISH = 99% (19% un signal simple, et 80% double signal). Ce résultat donc est considéré comme invalide.

Le deuxième cas est celui des patients non détectés par le GeneXpert Ultra au diagnostic (Fig. 23).

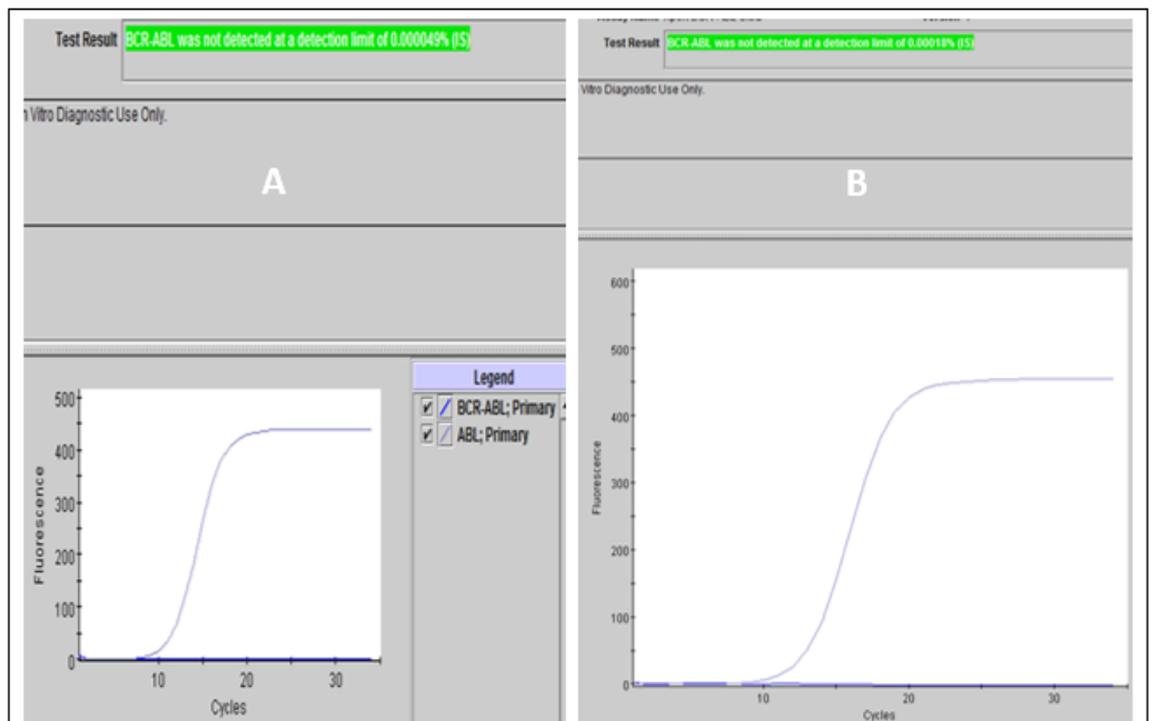


Figure 23 : Résultats des patients non détectés par le GeneXpert Ultra au diagnostic (**Photo originale, 2019**).

A : Résultats au diagnostic du patient Lar-Kar.

B : Résultats au diagnostic du patient Tal-Haf.

Résultats et discussion générale

- Pour le premier patient le transcrit BCR-ABL n'a pas été détecté seulement la courbe de transcrit ABL est affichée avec une valeur CT ≈ 13 indiquant le début de la phase exponentielle, le signal augmente jusqu'au 19ème cycle de PCR là où la phase plateau commence et le signal détecté reste dans le même niveau jusqu'à la fin de test. Le résultat montre que le M-BCR n'a pas été détecté(e) à une limite de détection de 0.000049 % (IS). La FISH a retrouvé un signal bcr-abl à 88% ; cela indique que ce patient a une LAL ph1 positif (m) ou (μ) puisque le M-BCR est indétectable.
- Pour le deuxième patient la courbe du transcrit ABL est la seule à être affichée avec une valeur : CT ≈ 14 qui indique le début de la phase exponentielle. Après le 22ème cycle la phase plateau commence avec un signal de fluorescence stable indiquant la fin de test. Le résultat montre que le M-BCR n'a pas été détecté(e) à une limite de détection de 0.00018 % (IS). L'absence de la courbe BCR-ABL est expliqué par le type de cassure qui est dans ce cas le (m) ou (μ) BCR puisque la FISH a retrouvé un signal bcr-abl = 52%

Le troisième cas : est celui d'un patient invalide par le GeneXpert Ultra au diagnostic (Fig. 24).

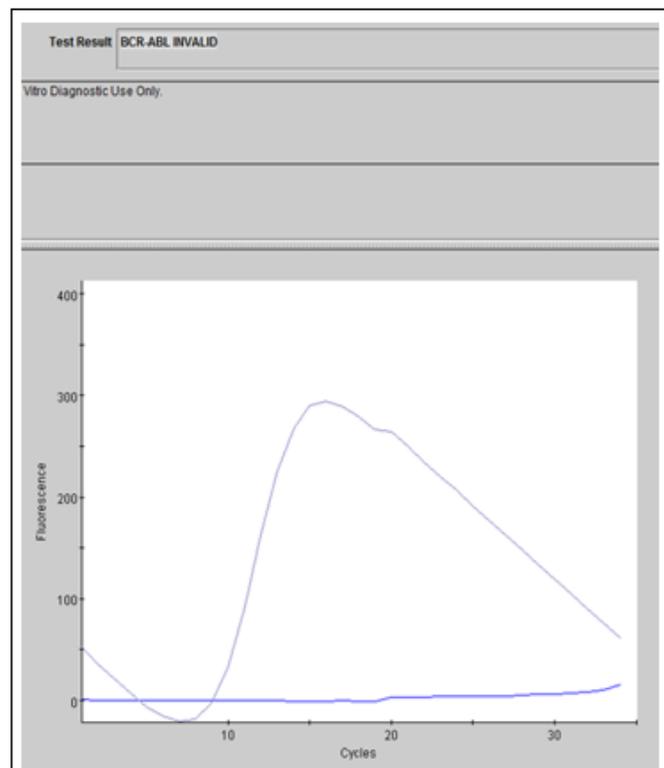


Figure 24 : Résultat d'un patient (Sal-Dja) par GeneXpert Ultra (Photo originale, 2019).

Résultats et discussion générale

Le taux du bcr-abl par FISH au diagnostic = 78%. Le GeneXpert affiche un résultat « invalide ». Sur le graphe on remarque que la courbe ABL1 est instable et le plateau n'a pas été atteint, alors que la courbe du BCR est complètement plate, il s'agit très probablement d'une erreur technique.

Dans le cas d'erreur ou résultat invalide, le fabricant de test Xpert BCR-ABL Ultra a précisé les causes d'échec et les codes d'erreurs possibles avec des solutions suggérées pour pouvoir régler les problèmes envisager lors du test.

- **BCR-ABL non valide** : il est impossible de déterminer le niveau de transcrite BCR-ABL due aux nombreux facteurs ; soit l'échantillon contient trop de transcrits BCR-ABL et/ou ABL, échec du contrôle endogène ABL, échantillon de mauvaise qualité, inhibition de la RT-PCR et si la valeur Ct ABL > 18.

On a comme solution suggérée ; la vérification de la qualité de l'échantillon (ne pas utiliser d'héparine comme anticoagulant lors de prélèvement de sang périphérique car elle peut inhiber la réaction PCR), ou la répétition de test avec l'échantillon d'origine (s'il est disponible), ou le lysat gardé et une nouvelle cartouche.

- **Cas d'erreur** : les codes d'erreurs possibles ; soit la pression qui dépasse la limite (Code d'erreur 2008), pour lequel on doit vérifier la qualité de l'échantillon, vérifier si la numération leucocytaire est très élevée et répéter le test avec l'échantillon d'origine et une nouvelle cartouche ou soit un échec de vérification de la sonde (codes d'erreurs 5006, 5007, 5008 et 5009), dans ce cas on doit répéter le test avec l'échantillon d'origine (s'il est disponible) ou le lysat gardé et une nouvelle cartouche.

2-Discussion générale

Traditionnellement le diagnostic et le monitoring d'une LAL ph1 positif est assuré par une PCR classique et une RTQ PCR en mode manuel. Cela implique une méthodologie et une rigueur analytique drastiques. En effet de nombreux facteurs (l'exigence d'une compétence humaine dans la réalisation du protocole accompagnée avec un risque de contamination de personnel, difficultés de standardisation des résultats créés par les exigences de la procédure elle-même), peuvent interférer avec la qualité et la fiabilité de ces examens (**Hofman et al, 2010**). En comparant les résultats des deux techniques classique et l'automatisé, une corrélation linéaire élevée avec les résultats de RT-qPCR conventionnels manuels a été confirmée par plusieurs études (**Winn-Deenet et al., 2007 ; Cayuela et al., 2011 ; Lopez-Jorge et al., 2011 ; 2012 ; Bochicchio et al., 2014**). La sensibilité s'est récemment révélée comparable à celle du RT-qPCR classique jusqu'à des niveaux de réponse de MR 4.5 (**Bochicchio et al 2014**).

Les résultats obtenus nous amènent aux commentaires que le résultat « indétectable » n'élimine pas la présence du ph1 dans une LAL puisque ce résultat ne concerne que le M-BCR et nous renvoie à rechercher par d'autres moyens le BCR-ABL et son variant moléculaire qui peut être le m-BCR ou le μ -BCR, situation assez fréquente dans les LAL Ph1 positif, ceci n'étant actuellement possible que par la PCR manuelle.

Le résultat « invalide » signifie que la rigueur qu'exige l'automate dans l'étape pré analytique et de préparation manuelle des échantillons n'a pas été respectée, un écart dans la préparation à type de présence de bulles ou une quantité de sang insuffisante (moins de 4 ml) ou une hyperleucocytose majeure rendent le résultat invalide. Ce dernier résultat n'est rendu par l'automate qu'après avoir consommé tout le temps d'analyse, ce qui représente du temps perdu et aucune tentative de récupération de l'échantillon n'est possible.

Le résultat invalide ne veut pas dire qu'il est négatif ou indétectable et nous conduit à rechercher la cause pour laquelle l'analyse n'a pu être fructueuse, des codes d'erreurs sont fournis par le producteur d'automate pour amener une réponse dans quelques cas. Dans tous les cas, l'analyse est à reprendre si l'automate nous affiche un code d'erreur pour lequel on peut apporter une solution pour la deuxième tentative d'analyse, sinon la recherche doit se faire par un mode manuel d'analyse de la PCR.

Résultats et discussion générale

Cependant, la leucémie aigue lymphoblastique Ph1 positif est polymorphe dans son expression moléculaire comme cela a été rapporté dans la littérature. Du fait de ce polymorphisme, l'automate GeneXpert ne pouvait détecter que le variant M-BCR comme le confirment les résultats de notre étude. Ainsi, lorsque le variant moléculaire recherché est un M-BCR, le système GeneXpert BCR-ABL est d'un grand apport en terme de gestion du temps où l'automatisation quasi-totale avec des temps de manipulation d'échantillon < 30min et une rapidité d'exécution à savoir durée totale du test 2h30min ; offre la possibilité de rendre un résultat le jour même pour le patient et le médecin traitant. Cette rapidité pourrait réduire l'anxiété des patients et conforter les médecins dans leurs indication thérapeutique si les résultats sont bons ; et procéder à un ajustement thérapeutique si les résultats montrent une augmentation du taux de transcrite BCR-ABL. De plus, une rigueur analytique, fiabilité, reproductibilité : les résultats sont exprimés en ratio BCR-ABL/ABL et alignés à une échelle internationale (IS). Plusieurs modules sont disponibles, possibilité d'évaluer un nombre important d'échantillons de patients par jour. Aussi, la non nécessité d'une droite d'étalonnage, la possibilité de standardisation inter laboratoire (**Cepheid, 2018**). Ajoutant, le cout d'une analyse : actuellement, l'évaluation de la maladie résiduelle n'est faite qu'en sous traitance par certains laboratoires libéraux au plan national et dans des laboratoires essentiellement français, avec un cout rédhibitoire (50000 à 70000 DA). Cependant le prix d'une cartouche d'évaluation est de l'ordre de 20000 DA, même si on y ajoute les couts de prélèvement et de réalisation, cela ne devrait pas dépasser 30000 DA.

Dans le cadre de l'évaluation de la maladie résiduelle, le GeneXpert reste un outil incontournable y compris, lorsque la rémission moléculaire est profonde. Néanmoins, des limites peuvent être avancées tel que :

- Lors des modifications apportées à ces procédures peuvent altérer les performances du test.
- Le test Xpert BCR-ABL Ultra ne détectera pas les translocations e1a2 (p190), e19a2 (p230) ou autres translocations mineures et les translocations aberrantes e13a2 (b2a2) où des parties de la séquence sont supprimés à proximité du point de cassure.
- Ne pas utiliser d'héparine comme anticoagulant car elle peut inhiber la réaction par PCR.
- Les échantillons de sang prélevés sur citrate de sodium ainsi que les prélèvements de moelle osseuse n'ont pas été validés pour ce test.

Résultats et discussion générale

L'incapacité du test Xpert BCR-ABL Ultra à détecter les autres variants m-BCR et μ -BCR (**Cepheid, 2018**), fait de la RT-qPCR manuelle la technique standard de diagnostic et suivie de la MRD.

Conclusion et perspective

La quantification des niveaux de transcrit BCR-ABL dans des échantillons de sang périphérique de patients avec LAL ph1 est un élément crucial qui contribue aux choix thérapeutiques.

Le GeneXpert BCR-ABL Ultra présente l'avantage évident d'une automatisation presque complète par rapport aux méthodes de détection classiques de BCR-ABL ; il atteint la même limite de détection que la q-PCR en temps réel conventionnelle et il est un excellent choix pour la surveillance de la maladie résiduelle (MRD) pour le variant M-BCR.

Cependant, le fait que nous ne puissions identifier qu'un type de points de cassure qui représente le variant M-BCR, cela représente un inconvénient majeur en particulier dans les LAL Ph1 positif où le m-BCR représente le variant le plus fréquent (65%) décrit dans la littérature.

Notre étude nous conduit à conclure que le système GeneXpert BCR-ABL Ultra, en dehors des variants M BCR (30% des cas de LAL Ph1), ne peut pas remplacer les méthodes en temps réel manuelles dans la LAL Ph1 positif et que la PCR quantitative conventionnelle reste la méthode standard pour le diagnostic et le suivi de la maladie résiduelle dans cette pathologie.

En perspective, pour élargir la gamme de détection des variants restants par le GeneXpert BCR-ABL Ultra, il serait souhaitable de disposer d'amorces et sondes TaqMan en temps réel pour la détection des deux variants m-BCR et μ -BCR pour la procédure automatisée. Ça serait une amélioration majeure de l'efficacité de Gene Xpert BCR-ABL Ultra dans le diagnostic et le suivi de la LAL ph1 car cela réduira le temps et augmentera la sensibilité des tests.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique	
Partie 1 : Etude de la pathologie	
1-Historique	4
2-Définition de la leucémie aigue lymphoblastique (LAL).....	4
3-Signes et symptômes.....	5
4-Epidémiologie.....	6
5-Etiopathogénie	6
6-Physiopathologie.....	7
7-Classifications des LAL.....	8
7-1-La classification FAB (Franco-Américano- Britannique)	8
7-2-Classification des néoplasmes lymphoïde OMS 2016.....	8
7-3-Classification immunologique des LAL.....	9
8-LAL à chromosome Philadelphie (Ph1) positif.....	9
8-1-Cibles de la protéine BCR-ABL.....	13
9-Traitement des LAL Ph1 de l'adulte.....	15
Partie 2 : Diagnostic et étude moléculaire	
1-Diagnostic.....	16
1-1-Hémogramme.....	16
1-2-Myélogramme.....	16
1-3-Immunophénotypage.....	17
1-4-Etude cytogénétique.....	17

Table des matières

1-5-Etude moléculaire.....	17
1-5-1-Principe de la PCR : (Polymerase Chain Reaction)	17
2-Automatisation de la biologie moléculaire : exemple du geneXpert BCR-ABL Ultra...	19
2-1-Types d'échantillons appropriés.....	21
2-2-Kit du test Xpert BCR-ABL Ultra.....	21
2-3-Conservation et manipulation.....	21
Chapitre 2 : Etude expérimentale	
1-Matériels.....	23
1-1-population d'étude.....	23
1-2-Conditions du prélèvement sanguin (matériel biologique)	25
1-3-Matériels non biologique.....	25
2-Méthodologie.....	25
2-1-Réalisation d'un hémogramme.....	25
2-2-Méthodes GeneXpert.....	26
2-2-1-Préparation de l'échantillon.....	26
2-2-2-Préparation de la cartouche.....	26
2-3-Procédure automatisée.....	28
2-3-1-Démarrage du test.....	28
2-3-2 Chargement du GeneXpert.....	29
2-4-Fonctionnement de l'automate chargé de la cartouche GeneXpert.....	29
2-5-Déchargement du GeneXpert.....	29
2-6-Expression des résultats.....	29
2-6-1-Exemples de résultats.....	30

Table des matières

Chapitre 3 : Résultats et discussion générale

1-Résultats.....	32
1-1-Conditions pré analytiques.....	32
1-2-Expression des résultats du Gene Xpert BCR-ABL Ultra.....	32
1-3-Interprétation des résultats.....	32
1-4-Interprétation des résultats des patients à M-BCR-ABL détectés par le GeneXpert Ultra.....	35
1-5-Interprétation des résultats des patients non détectés par le GeneXpert Ultra.....	38
2-Discussion générale.....	42
Conclusion et perspectives	46

Références bibliographiques

Annexes

Partie 1 : Etude de la pathologie

1-Historique

Au XIX^e siècle, le terme ‘‘Leucémie’’ désignait une maladie mortelle. Les premières descriptions de la ‘‘Leucémie’’ ont eu lieu en Europe vers 1850 par David Craigie et Alfred Donné (**Piller, 2001**). Le sang extrait des patients atteints par une leucémie était d'aspect blanchâtre et ceci du fait de l'augmentation du nombre de globules blancs, d'où le nom de leucose. Hypertrophie d'organes (rate, foie, ganglions) et excès de globules blancs dans le sang associant cette maladie, présentée comme une maladie nouvelle indépendante de l'inflammation par Alfred Donné, John Bennett et Rudolph Virchow en 1844 et 1845 (**Rigal, 2003**).

- En 1960, Nowell et Hungerford ont découvert les gènes de fusion BCR ABL (**Mahon, 2001**).
- En 1963, Georges Mathé, a réalisé la première greffe de moelle osseuse allogénique chez un malade de 19 ans, en rechute d'une LAL, qui reçoit une irradiation corporelle totale puis de la moelle compatible de son frères (**Maathé et al.,1963**).
- En 1970, l'immunologiste Leonard Herzenberg et ses chercheurs ont développé la cytométrie en flux permettant l'analyse et le tri unicellulaire (**Patlak, 2002**).
- En 1990, l'oncologiste Brian Druker a découvert l'effet du gène BCR ABL sur la division des globules blancs (**Patlak, 2002**).

2-Définition de la leucémie aigue lymphoblastique (LAL)

La leucémie aigue lymphoblastique (LAL) est une hémopathie maligne (cancer) qui prend son origine à partir d'une cellule souche différenciée en cellule lymphoïde de type B ou de type T dite cellule blastique. La prolifération et l'accumulation de ces cellules monoclonales dans la moelle, ont pour conséquences une suppression de l'hématopoïèse polyclonale, aboutissant à l'installation de signes d'insuffisance médullaire : anémie (faible taux des globule rouges), thrombocytopénie (faible taux de plaquettes) et la neutropénie (faible taux de neutrophiles) (**Pui et al., 2004**).

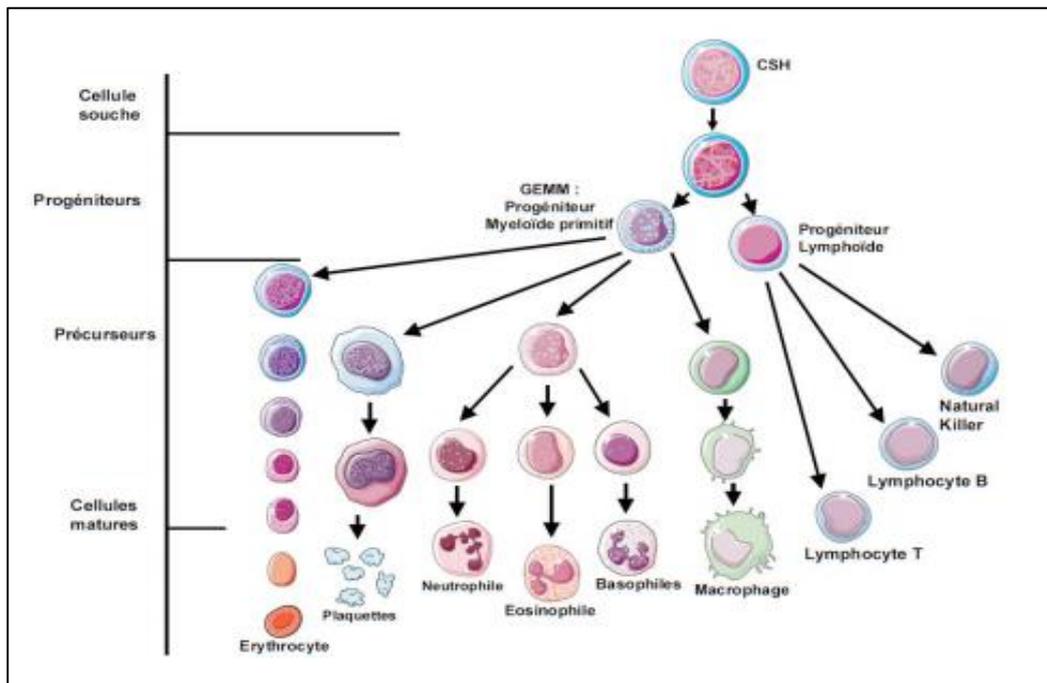


Figure 1 : Schéma du développement physiologique des cellule sanguines à partir d'une cellule souche hématopoïétique (hématopoïèse) (**Chekroun, 2016**)

Les trois-quarts des cas de leucémies aiguës lymphoblastiques surviennent chez l'enfant où l'incidence est de 30 cas par million d'habitants/an. Chez l'adulte, la fréquence augmente avec l'âge avec un pic d'incidence à 70 ans. Des anomalies chromosomiques clonales sont retrouvées dans la majorité des cas : 80 % chez l'enfant et 70 % chez l'adulte (**Heim et Mitelman, 1992**).

3-Signes et symptômes

Selon (**Henri, 2017**) les signes ou symptômes de la LAL sont les suivants :

- * Un syndrome anémique d'intensité variable
- * Un syndrome hémorragique cutanéomuqueux d'intensité variable
- * Un syndrome infectieux de gravité variable
- * Un syndrome tumoral fait de : douleurs osseuses et articulaires, splénomégalie, hépatomégalie, adénopathies, rarement hypertrophie testiculaire ou atteinte neuroméningée (due à l'envahissement de ces organes par les cellules blastiques).

4-Epidémiologie

Les LAL représentent 30 % des leucémies aiguës (LA) chez l'adulte. Ce sont surtout des pathologies de l'enfant. Environ 75 % des cas surviennent chez les moins de 18 ans avec un pic de fréquence entre 2 et 5 ans. Le deuxième pic de fréquence se situe chez l'adulte, autour de 70 ans. Les LAL B représentent 80 % des LAL de l'enfant, chez l'adulte la fréquence des LAL T se situe aux alentours de 15 % (Valensi, 2002).

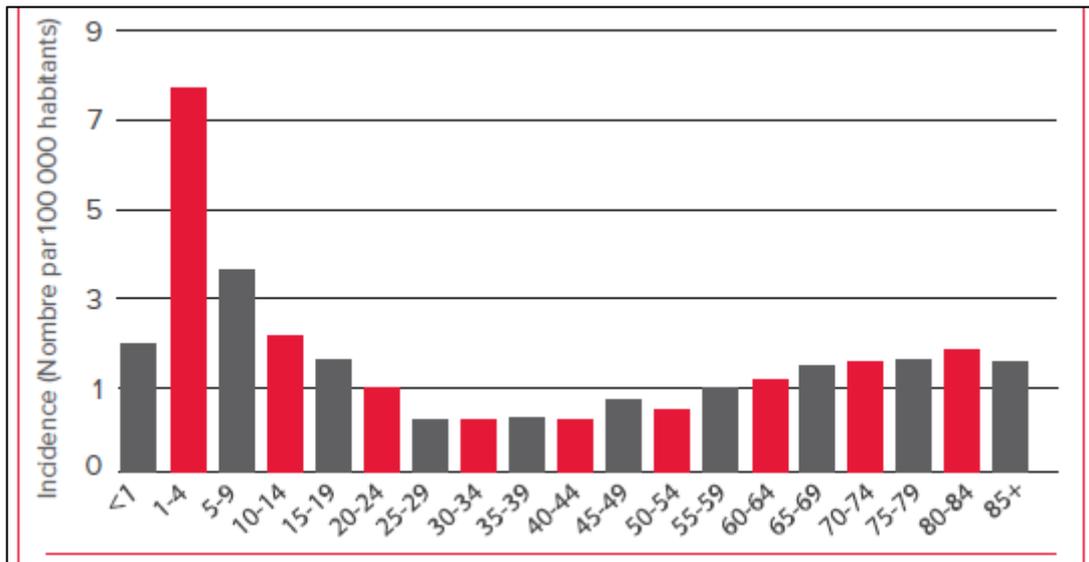


Figure 2 : Diagramme du Taux d'incidence en fonction de l'âge (2009-2013) (Mohanty et Bilimoria , 2014).

L'axe horizontal indique les intervalles d'âge de cinq ans. L'axe vertical indique la fréquence annuelle de nouveaux cas de LAL par 100 000 personnes, selon le groupe d'âge. Il est à noter que l'incidence de la LAL est la plus élevée dans les cinq premières années de vie.

5-Etiopathogénie

Les facteurs étiologiques des LAL restent mal connus, mais d'éventuelles associations ont été décrites avec des facteurs génétiques, parentaux, socioéconomiques et environnementaux. Le rôle du virus d'Epstein-Barr (EBV) et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été reconnu dans les LAL B matures (Thomas, 2007).

Les différents facteurs étiologiques sont :

- **Facteurs physiques :** Exposition aux radiations ionisantes (Berrington et al., 2001). Des études réalisées sur les survivants des bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki confirment cette association (Preston et al., 1994).

Etude bibliographique

- **Facteurs chimiques toxiques** : Hydrocarbures benzéniques (anciennement peinture sur carrosserie, caoutchouc, pétrochimie, tabagisme) (**Dominik et al.,2006**). Cependant, certaines études récentes ont suggéré un lien plus fort entre l'exposition de la mère lors de son travail aux pesticides durant la grossesse et la leucémie chez l'enfant (**Infante-Rivard et al.,1999**)
- **Facteurs viraux infectieux** : On peut les regrouper en deux catégories selon leurs mécanismes d'action : Ceux responsables d'une activation lymphocytaire par le biais du récepteur à l'antigène (*Helicobacter pylori*) ou des virus comme le virus de l'hépatite C, et ceux qui contournent ce récepteur pour activer des mécanismes intrinsèques au lymphocyte (HTLV-1 et l'EBV) qui s'intègrent dans la cellule et qui se répliquent avec elle (**Baldi et al.,2008**).
- **Facteurs génétiques constitutionnels** : Les patients atteints de trisomie 21 (syndrome de Down) (**Xavier et al., 2009**), de syndrome de Klinefelter et de maladies héréditaires avec fragilité chromosomique telle que l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom ou l'ataxie-télangiectasie ont également été associés à la présence d'une LAL (**Faderl et al., 2003**).

6-Physiopathologie

La LAL est déclenchée par une perturbation génique acquise primaire de l'ADN aboutissant à un clone de cellules leucémiques dans la moelle osseuse. Des réarrangements chromosomiques sont probablement acquis très tôt dans la leucémogénèse et conduisent à une dérégulation transcriptionnelle et épigénétiques et à un renouvellement cellulaire anormal (**Henri, 2017**). Un grand nombre d'anomalies génétiques impliquent des facteurs de transcription tel que PAX5, des coactivateurs ou corépresseurs transcriptionnels comme ETV6, des tyrosines kinases comme Kit ou PDGFR, des protéines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire ou des protéines anti-apoptotiques (**Lafage-Pochitaloff et Charrin, 2003**). La leucémogénèse est induite par l'association et l'accumulation de mutations génétiques primaires, d'altérations additionnelles différentes. En effet les LAL avec un réarrangement KMT2A portent en moyenne une seule mutation additionnelle alors que les LAL avec une translocation ETV6-RUNX1 présentent 6 à 8 altérations additionnelles (**Mullighan et al., 2007 ; Moorman, 2012 ; Inaba et al., 2013**). La fréquence des deux principales anomalies de structure varie selon l'âge et sont la translocation (9;22)(q34;q11) plus fréquente chez l'adulte et elle est de très mauvais pronostic et la translocation (12;21), de bon pronostic et elle est plus fréquente chez l'enfant.

Etude bibliographique

La présence de blastes au niveau de la moelle inhibe la production de cellules hématopoïétiques normales. En effet, le nombre de cellules sanguines saines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) est généralement anormal (**Henri,2017**).

7-Classifications des LAL

7-1-La classification FAB (Franco-Américano- Britannique)

Elle est fondée sur des critères morphologiques et cytochimiques (peroxydases et estérases). Le diagnostic de LAL est porté sur la morphologie lymphoïde agranulaire des blastes en cytologie et la négativité de la myéloperoxydase (enzyme spécifique des cellules myéloïdes) à la coloration cytochimique (**Bene et al., 1995 ; Jaffe et al., 2001**).

7-2-Classification des néoplasmes lymphoïde OMS 2016

Cette classification FAB a été revue par l’OMS en 2000, 2008 et 2016. Abandonnant la distinction morphologique pour une classification immunologique et cytogénétique et moléculaire en lien avec la présence récurrente d’anomalies génétiques et moléculaires et permettant une distinction plus précise des sous-groupes de LAL (**Daniel et al., 2016**).

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des LAL (**Daniel et al., 2016**).

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique, NOS « Not Otherwise Specified »

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec anomalies génétiques récurrentes :

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec t (9; 22) (q34,1; q11,2); BCR-ABL1

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec t (v; 11q23.3); KMT2A réarrangé

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec t (12; 21) (p13.2; q22.1); ETV6-RUNX1

Leucémie B-lymphoblastique / lymphome avec hyperdiploïdie

Leucémie B-lymphoblastique / lymphome avec hypodiploïdie

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec t (5; 14) (q31.1; q32.3) IL3-IGH

Leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec t (1; 19) (q23; p13.3); TCF3-PBX1

Entité provisoire : leucémie / lymphome B-lymphoblastique, type BCR-ABL1-like

Entité provisoire : leucémie / lymphome B-lymphoblastique avec iAMP21

Leucémie / lymphome T-lymphoblastique

Entité provisoire : leucémie lymphoblastique précurseur des lymphocytes T précoces

Entité provisoire : leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules NK

7-3-Classification immunologique des LAL

La mise en évidence par cytométrie en flux de marqueurs cellulaires supporte la classification EGIL (European Group for the Immunological characterization of Leukemia), qui reconnaît différents sous-groupes au sein des LAL B et différents sous-groupes au sein des LAL T (Bene et al., 1995).

Tableau 2 : Classification immunophénotypique des LAL B selon le groupe EGIL (Anonyme, 2007).

Type des LAL	Marqueurs de la lignée B(et de la maturité)
LAL Pro B	CD19+ CD79a+/- CD22+ (au moins 2 des 3) TdT+ HLA DR+ CD10-.
LAL commune	CD19+ CD79a+/- CD22+ (au moins 2 des3) TdT+ HLA DR+ CD10+.
LAL Pré-B	CD19+ CD79a+/- CD22+ (au moins 2 des 3) TdT+/- HLA DR+ CD10+ μ Cyto+.
LAL B mature	CD19+ CD79a+/- CD22+ (au moins 2 des 3) TdT- HLA DR+ CD10+/- μ Cyto+ Igs+

8-LAL à chromosome Philadelphie (Ph1) positif

C'est une LAL souvent de type B calla +, rarement T, qui exprime à l'étude cytogénétique conventionnelle un chromosome Philadelphie ou à la cytogénétique moléculaire une fusion *BCR-ABL* ou sa résultante moléculaire à la PCR, la protéine chimérique BCR-ABL.L'appellation « chromosome Philadelphie » provient de la ville où Nowell et Hungerford l'ont découvert en 1960 (Mahon, 2001). Le chromosome Philadelphie (Ph) est une anomalie chromosomique acquise découverte dans les cellules de leucémie myéloïde chronique (LMC), il fut identifié comme translocation (9 ; 22) (q34 ; q11) par Janet Rowley grâce aux techniques de « banding ». Cependant, il n'est pas spécifique de la LMC puisqu'il est présent dans 20 à 30 % des LAL de l'adulte (anomalie la plus fréquente) (Secker-Walker et al., 1991) et 3 à 5 % des LAL de l'enfant (Pui et al., 1990). Sa fréquence augmente avec l'âge jusqu'à 50 ans puis décroît

Etude bibliographique

(Secker-Walker et al., 1991). Sur le plan moléculaire, la t(9;22)(q34;q11.2) entraîne la fusion des gènes BCR (breakpoint cluster region) et ABL (Abelson) situés respectivement sur les chromosomes 22 et 9 et l'expression d'un transcrite chimérique BCR-ABL (Fig.3) (Klein et al., 1982 ; Secker-Walker et al., 1991).

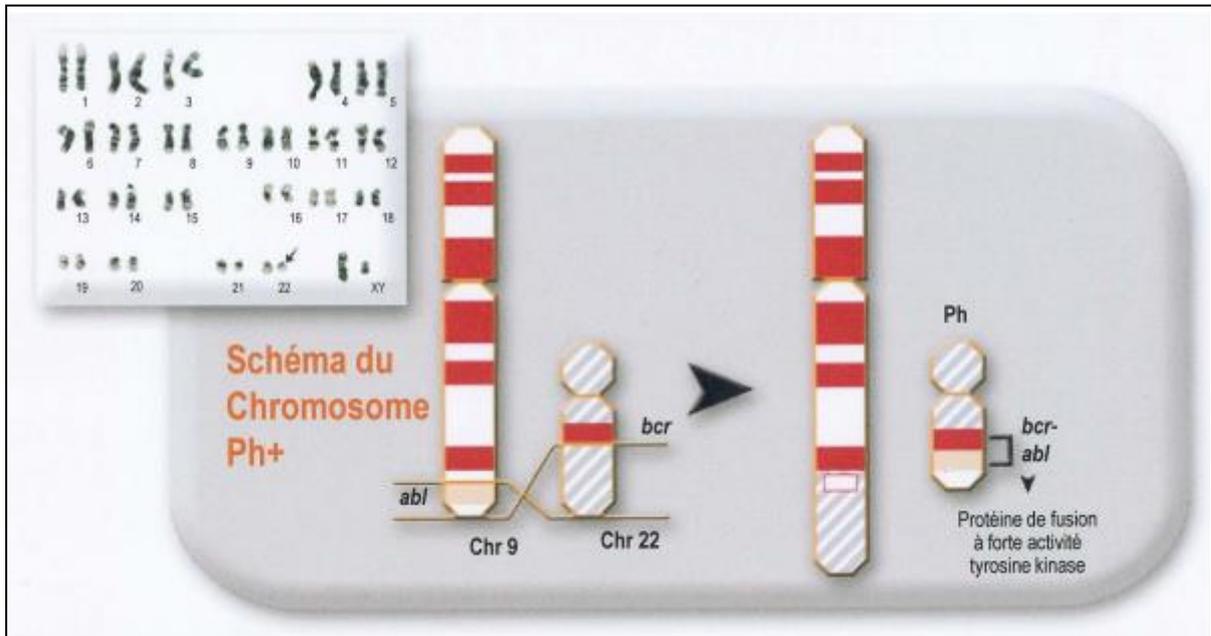


Figure 3: Schéma d'un chromosome Philadelphie issu d'un caryotype (KONE, 2011)

Le point de cassure dans le gène ABL se situe entre les exons 1 et 2 (a2). Dans le gène BCR, les points de cassure surviennent en M-BCR (pour Major Break point Cluster) codant une protéine de 210 kilo daltons (Bcr-Ablp210) ou en m-BCR (pour minor Break point Cluster) codant une protéine de 190 kilo daltons (Bcr-Ablp190) ou en μ BCR codant une protéine de 230 kilo daltons (Bcr-Ablp230) (Fig.4) (Pane et al., 2002 ; Kurzrock et al., 2003 ; Score et al., 2010).

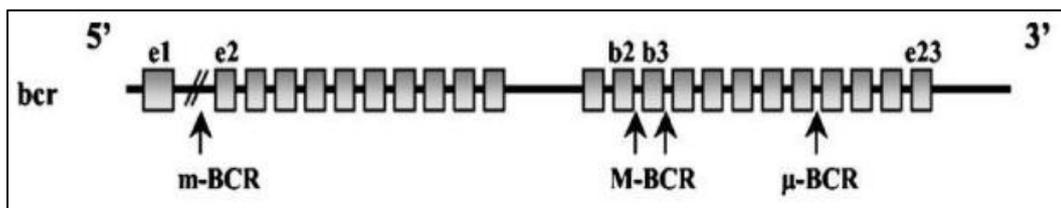


Figure 4 : Gène BCR et les différents points de cassure (Herlet, 2010). Chez la plupart des patients à LAL Ph 1, ils sont localisés en m-BCR.

Etude bibliographique

Les deux types de protéines (P190 et P210) ont une activité tyrosine-kinase très forte par rapport à celle du proto-oncogène ABL (**Li et al., 1999**). Parmi les deux, le type p190 est l'agent de transformation le plus puissant dans les LAL (**Kelliher et al., 1991**). La protéine p190 est principalement associée à la LAL Ph1 (70 %), la protéine p210 est associée plutôt à la LMC et elle est observée dans 25 à 30 % des LAL Ph1 de l'adulte (**Van Rhee et al., 1996**). La protéine p230 est associée à certaines leucémies à neutrophiles, classées comme formes variantes de LMC (**Pane et al., 2002 ; Verstovsek et al., 2002**).

Les techniques de détection moléculaire (RT-PCR et FISH) sont complémentaires du caryotype et permettent de « rattraper » les échecs et les caryotypes considérés comme normaux (**Van Rhee et al., 1995**). De même, il faut rechercher un chromosome Philadelphie « masqué » dans un caryotype anormal car le Ph est associé à d'autres anomalies dans plus de 50 % des cas : monosomie 7, trisomie 8 mais surtout hyperdiploïdie (**Lafage-Pochitaloff, 1996**).

La protéine Abl est une protéine à activité tyrosine kinase (TK), elle a un rôle crucial dans le fonctionnement cellulaire avec des fonctions nucléaires et cytoplasmiques. Sa structure comprend dans la partie NH₂ terminale trois régions SH (SH1, 2 et 3), dans la partie centrale une région riche en proline et dans la partie COOH-terminale des séquences de localisation nucléaire. Le domaine SH1 assure l'activité TK où est localisé le site de liaison à l'ATP, site majeur d'autophosphorylation, et le domaine catalytique phosphotransférase (Fig.5) (**Advani et al., 2002 ; Kurzrock et al., 2003**).

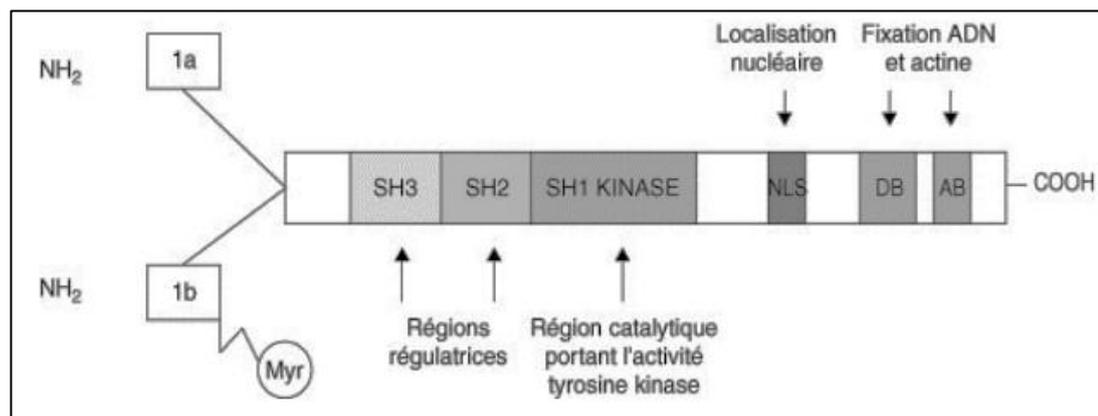


Figure 5 : Schéma présentant la protéine ABL (**Herlet, 2010**).

La protéine BCR possède aussi plusieurs domaines importants. Dans la partie N-terminale, où se situe le domaine 1B, permettant plus tard la dimérisation de la protéine BCR-ABL conduisant à l'ouverture de l'activité tyrosine kinase. Le domaine 2B comprend deux sites de

Etude bibliographique

liaison aux domaines SH2 portés par la protéine ABL et à Gbr2. La partie centrale de BCR comprend un domaine d'homologie avec les protéines Dbl : facteur d'échange GTP (Guanosine Triphosphate)/GDP (Guanosine Diphosphate). Et la partie C-terminale a une fonction GAP (GTPase activating protein) et joue un rôle dans la bactéricidie des polynucléaires mais cette partie est absente dans la protéine de fusion (Fig.6) (**Leguay et Mahon, 2005**).

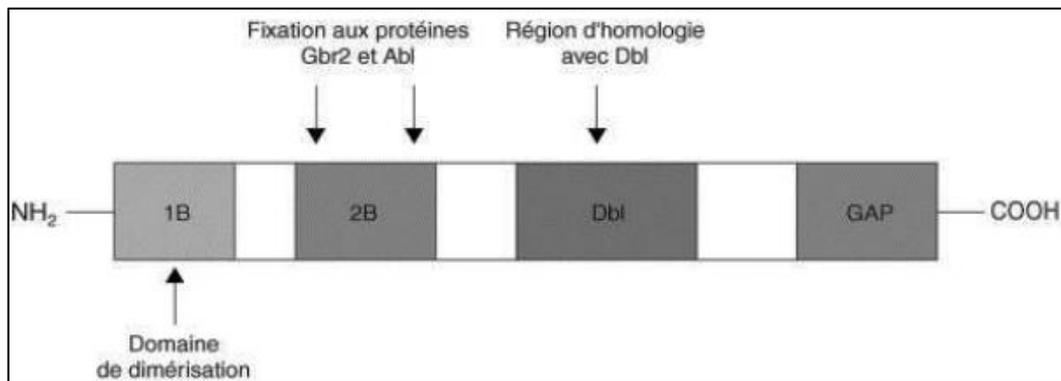


Figure 6 : Schéma présentant la protéine BCR (**Herlet, 2010**).

Au niveau moléculaire, la translocation t(9; 22) provoque la formation d'un gène de fusion BCR-ABL codant une protéine chimérique Bcr-Abl avec trois isoformes (Bcr-Ablp190, Bcr-Ablp210 et Bcr-Ablp230) (**Advani et al., 2002 ; Kurzrock et al., 2003 ; Cilloni et al., 2012**).

La protéine chimérique Bcr-Abl membranaire, possède un domaine cytoplasmique. La dimérisation de Bcr-Abl entraîne l'activation constitutive du site kinase de Bcr-Abl. Cependant l'activité kinase est activée en permanence (**Melo, 1996 ; Kurzrock et al., 2003 ; Hassan et al., 2010 ; Score et al., 2010**).

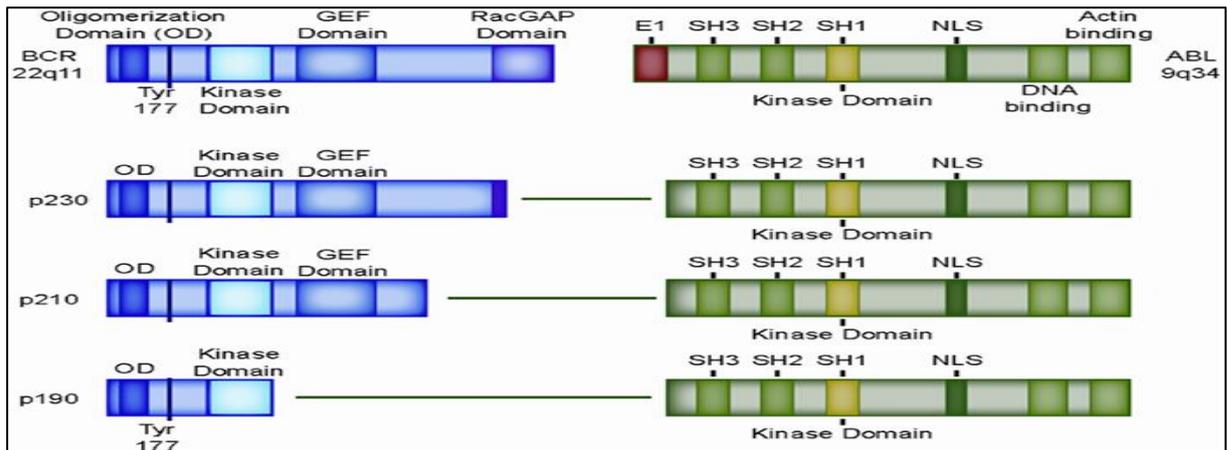


Figure 7 : Schéma des caractéristiques structurales des variants Bcr-Abl (**Bernt et Hunger, 2014**).

OD: oligomérisation régulant le domaine d'oligomérisation (domaine en spirale). **Tyr177:** tyrosine 177, lorsqu'elle est phosphorylée, sert de site d'accueil pour la protéine adaptatrice GRB-2. **Domaine SH2:** homologie SRC 2 (liaison aux résidus tyrosine phosphorylés, y compris l'exon 1 du BCR). **Domaine SH3:** homologie SRC 2 (liaison aux peptides riches en proline). **Domaine SH1:** homologie SRC 1 (domaine catalytique ABL1). **Domaine GEF:** facteurs d'échange de nucléotide guanine (signalisation par la protéine G). **E1:** l'exon 1 de ABL1 contient le «cap» N-terminal inhibiteur qui lie le domaine catalytique (SH1) de ABL1 et empêche l'autophosphorylation. **NLS:** signal de localisation nucléaire

8-1-Cibles de la protéine BCR-ABL

Les kinases sont des enzymes qui catalysent la réaction d'attachement d'un groupement phosphate sur une protéine. Les substrats phosphorylés par Bcr-Abl sont nombreux : GRB-2, SHC, STAT5, DOK, CRK (Fig.8) (**Melo, 1996**). L'activité kinase de la protéine BCR-ABL entraîne l'activation directe et indirecte de plusieurs voies (**Sattler et Griffin, 2003**), notamment la voie PI3 Kinase, AKT, MTOR, RAS, EGFR, MAP-kinase, JNK / SAPK, JAK1-3, les kinases de la famille SRC LYN, HCK et FGR, PTPN11, NF-Kb et phospholipase C (**Chu et al., 2007 ; Kharas et al., 2008 ; Redig et al., 2011**). L'activation de toutes ces différentes voies provoque une prolifération excessive, une inhibition de l'apoptose, des modifications de l'adhésion cellulaire et une instabilité génique (**Kurzrock et al., 2003 ; Score et al., 2010 ; Cilloni et al., 2012**).

Selon (**Kurzrock et al., 2003 ; Score et al., 2010 ; Herlet 2010 ; Cilloni et al., 2012 ;**) les principales voies activées par la protéine BCR-ABL sont :

- **Voie Ras :**

D'abord, il y'a autophosphorylation du résidu tyrosine situé en position 177 de BCR qui permet la fixation de la protéine adaptatrice Grb2 par l'intermédiaire d'un domaine SH2 de Grb2. La signalisation Ras conduit à l'activation de la cascade des MAPK avec une voie de

Etude bibliographique

signalisation RAF/MEK/ERK et une voie de signalisation JNK. L'activation de la voie a comme conséquences, l'expression anormalement élevée de gènes indispensables pour la prolifération cellulaire, tels que c-Fos (un facteur de transcription induisant la réplication de l'ADN), c-Myc (nécessaire pour la transcription de l'ARN ribosomale), ou c-Jun. Et l'activation de la synthèse protéique en favorisant la traduction au niveau des ribosomes.

- **Voie JAK/STAT**

La protéine BCR-ABL utilise cette voie essentiellement de STAT 5, de STAT 1 et 6 et de la voie PI3K/AKT pour influencer sur des gènes favorisant le développement de cellules cancéreuses : c'est une des voies anti-apoptotiques. En réponse à la stimulation par une cytokine, JAK est phosphorylée. Ceci provoque le rapprochement de STAT qui est phosphorylée à son

tour, se dimérise et rentre dans le noyau et joue le rôle d'un facteur de transcription et inhibe l'apoptose.

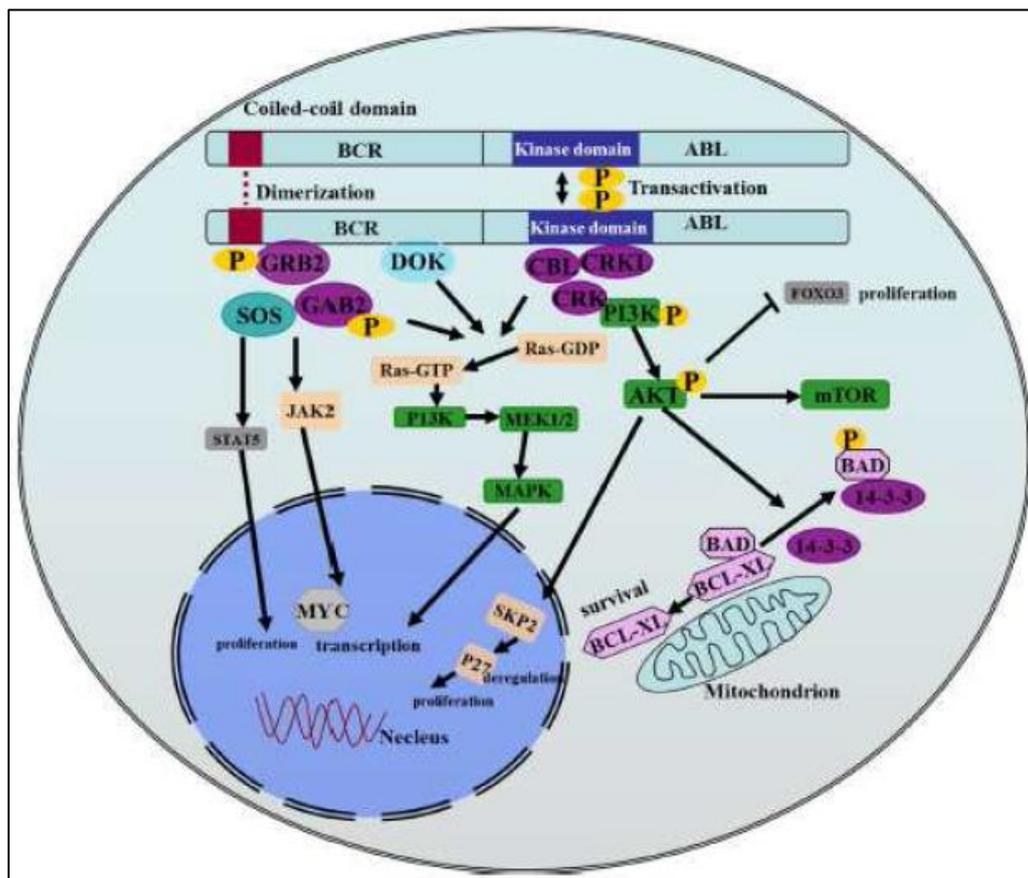


Figure 8 : Schéma des voies de signalisation des substrats phosphorylés par Bcr-Abl (Yang et al., 2015).

9-Traitement des LAL Ph1 de l'adulte

Le traitement repose sur l'utilisation des inhibiteurs de tyrosines kinases de type PDGFR (ITK), dont le principal est celui de la première génération l'Imatinib (STI 571). Il a été associé à la chimiothérapie à toutes les phases du traitement des LAL Ph1. L'introduction de l'Imatinib en induction a permis d'augmenter de façon significative les taux de rémission (de 60–90 % dans les séries historiques à plus de 95 %), de diminuer le taux de rechute et d'améliorer la survie sans toxicité majeure surajoutée (Ottmann et Wassmann, 2005). Les ITK de première génération inactivent les Tyrosines Kinases cytoplasmiques par liaison compétitive au niveau du site ATP du domaine kinase Abl et stabilisent la forme inactive (Fig.9). Les conséquences sont une inhibition de la croissance tumorale et une mort des cellules leucémiques par apoptose (Fava et al., 2015a ; Fava et al., 2015b).

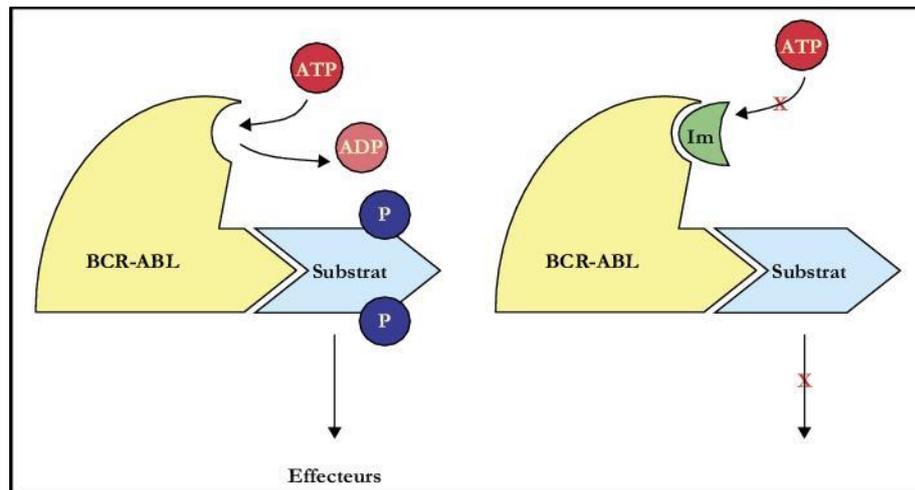


Figure 9 : Schéma de l'effet compétitif de l'inhibiteur tyrosine kinase (ITK) (Robert, 2006).

Les rechutes sont possibles et sont dues au développement de mécanismes de résistance aux ITK par des mutations ponctuelles, amplifications, surexpression protéique du BCR-ABL ou résistance multi drogue par surexpression de glycoprotéine P. A la rechute environ 80% des patients développent une résistance secondaire aux ITK, principalement par mutations du domaine kinase. (Fava et al., 2015 ; Yang et al., 2015).

La réponse optimale au traitement est le reflet d'une élimination des cellules tumorales. La maladie résiduelle (MRD) est évaluée par cytométrie en flux et/ou par biologie moléculaire (suivi du taux du transcrit BCR-ABL) ; c'est un facteur prédictif puissant de rechute quand celle-ci est positive (Coster, 2018).

Partie 2 : Diagnostic et étude moléculaire

1-Diagnostic

Le diagnostic repose sur l'examen morphologique des blastes du sang et de la moelle osseuse, l'immunophénotype et l'étude cytogénétique et moléculaire.

1-1-Hémogramme

Il est toujours anormal (présence de leucoblastes au niveau du sang périphérique) et représente l'examen d'orientation majeure du diagnostic (**Letestu et Valensi, 2003**).

1-2-Myélogramme

Il est indispensable même s'il existe des blastes circulants. Il affirme le diagnostic de LAL en retrouvant au moins 20 % de lymphoblastes. L'étude morphologique des cellules médullaires est faite sur des étalements de frottis colorés au May-Grunwald-Giemsa ou Wright (**Letestu et Valensi, 2003**).

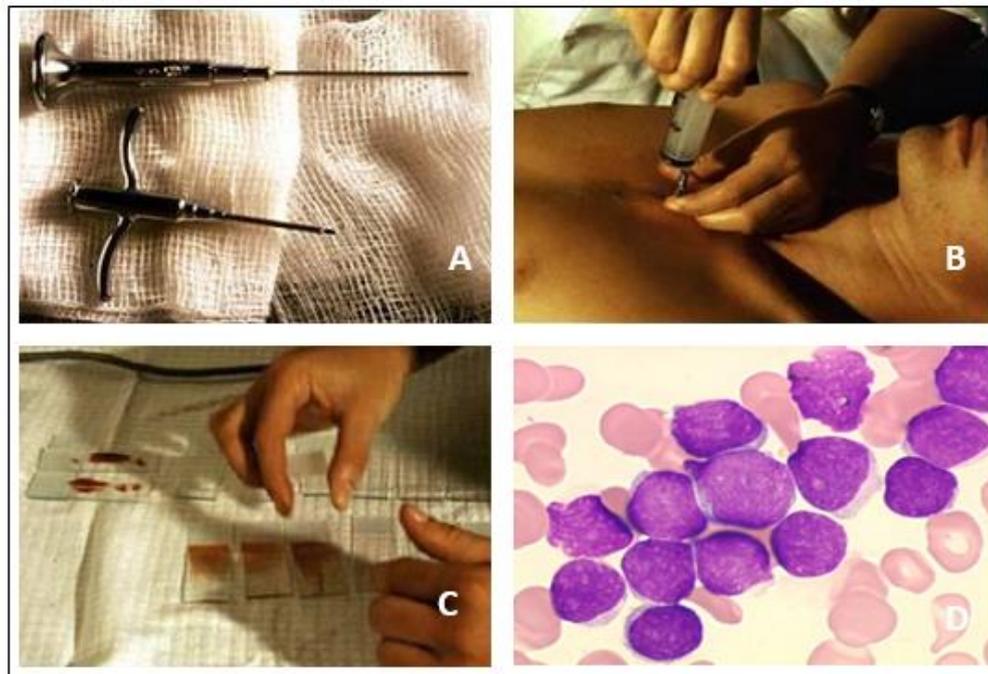


Figure 10 : Etapes de réalisation d'un myélogramme

(<http://fumed.forumactif.org/t2432-realisation-d-un-myelogramme>).

A : Trocart de moelle. **B** : Prélèvement médullaire au sternum. **C** : Etalement de la moelle sur la lame.
D : Lymphoblastes sur frottis médullaire observé au microscope optique (Gr X100).

1-3-Immunophénotypage

L'immunophénotypage des blastes est essentiel dans la classification de la LAL. Cette technique recherche par cytométrie de flux l'expression de divers antigènes de différenciation membranaires ou intra-cytoplasmiques (**Pui et al., 2008**). Il confirme le diagnostic et différencie les LAL de la lignée B de celle de la lignée T ou définit une LAL biphénotypique (BAL) (**Boissel, 2009**).

1-4-Etude cytogénétique

Le caryotype, examen pan génomique, détecte toutes les anomalies de nombre (ploïdie) ou de structure (délétions, translocations). Ces anomalies sont capitales pour définir le pronostic des LAL, en effet la présence du chromosome Philadelphie a un impact pronostique péjoratif. (**Mrózek et al., 2009**). Le caryotype est parfois mis en défaut. Les techniques de FISH (hybridation in situ en fluorescence) sont alors très utiles pour compléter le caryotype conventionnel, grâce aux sondes moléculaires marquées ou révélées par un ou plusieurs fluorochromes qui s'hybrident sur les séquences homologues sur les chromosomes (FISH sur métaphase) et les noyaux (interphase). La détection des signaux spécifiques se fait au microscope à fluorescence équipé de filtres spécifiques de chacun des fluorochromes employés et le plus souvent couplé à une caméra CCD et un logiciel d'analyses d'images (**Lafage-Pochitaloff, 2003**).

1-5-Etude moléculaire

La PCR est un test plus sensible et rapide pour détecter les réarrangements géniques clonaux. La technique de PCR permet de détecter les transcrits de fusion au niveau moléculaire lorsqu'il existe une translocation récurrente et (ou) le réarrangement des gènes des Ig (LAL B) ou des gènes du récepteur T pour l'Ag (LAL T) spécifiques du clone malin. La technique de PCR quantitative permet de suivre l'évolution de la masse leucémique résiduelle sous traitement. C'est le suivi de la « maladie résiduelle » (**Maillard et Buzyn, 2006**). La persistance d'un réarrangement spécifique du clone malin détectable en fin de traitement, ou l'augmentation du signal en PCR quantitative sont des facteurs prédictifs de rechute (**Maillard et Buzyn, 2006**).

1-5-1-Principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique qui permet l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique d'un pool complexe d'ADN. Dr. Kary Mullis, qui a découvert le test PCR, indique qu'il « vous permet de choisir le fragment d'ADN qui vous intéresse et d'avoir autant de copies voulues » (**Mullis,**

Etude bibliographique

1990). La PCR peut être réalisée en utilisant l'ADN source d'une variété de tissus et d'organismes.

Chaque analyse PCR nécessite la présence d'ADN matrice, d'amorces, de nucléotides et d'ADN polymérase. L'ADN polymérase est l'enzyme clé qui lie les nucléotides pour former le produit de PCR. Les nucléotides comprennent les quatre bases (A, T, C, G). Ces composants sont mélangés dans un tube à essai, puis placés dans un thermocycleur qui permet l'amplification de l'ADN après de nombreux cycles. La solution réactionnelle est d'abord chauffée au-dessus du point de fusion des deux brins d'ADN complémentaires de l'ADN cible, ce qui permet aux brins de se séparer (processus appelé dénaturation). La température est ensuite abaissée pour permettre aux amorces spécifiques de se lier aux segments d'ADN cibles (processus appelé hybridation). La température est à nouveau élevée, moment auquel l'ADN polymérase est capable d'étendre les amorces en ajoutant des nucléotides au brin d'ADN en développement (processus appelé élongation) (Fig.11). A chaque répétition de ces trois étapes, le nombre de molécules d'ADN amplifié est doublé (Weier et Gray, 1988).

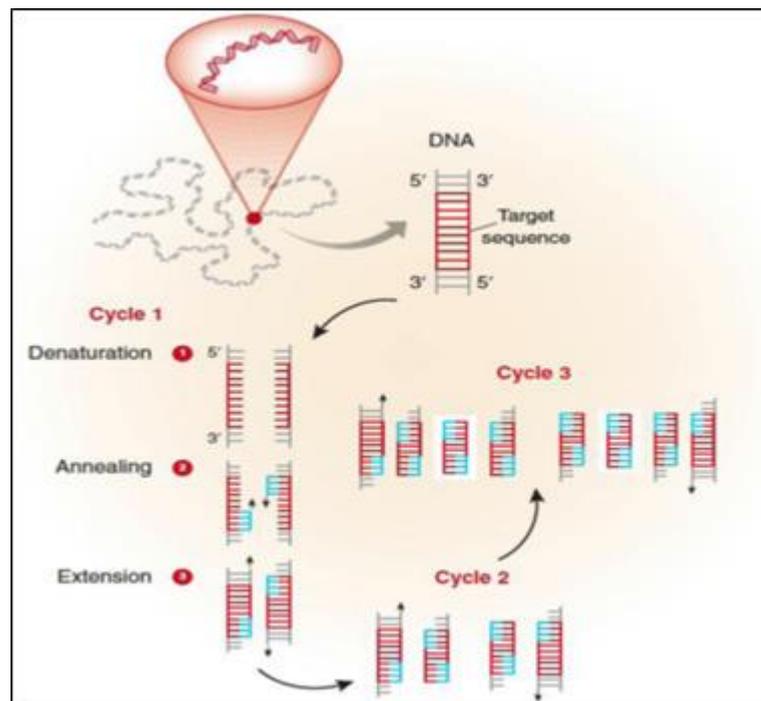


Figure 11 : Représentation schématique du Principe de la PCR (Weier et Gray, 1988).

2-Automatisation de la biologie moléculaire : exemple du geneXpert BCR-ABL Ultra

Cepheid a présenté son test basé sur GeneXpert pour l'identification de la fusion de gènes BCR-ABL à partir d'échantillons sanguins. Il s'agit d'un instrument automatisé autonome qui intègre la préparation d'échantillons micro fluidiques à la détection de signaux fluorescents en temps réel (10) basée sur la RT-PCR. La différence entre les valeurs ABL ct (seuil de cycle) et BCR-ABL ct mesurées ; Le delta ct (ct) est calculé par le logiciel de l'instrument et interprété comme positif, négatif ou invalide. Il représente le rapport entre les deux populations d'ARNm et une fraction non négligeable des cellules néoplasiques présentes. Cette méthode permet une détection reproductible de faibles niveaux de transcrite avec une limite de Détection (L.O.D) et de Quantification (L.O.Q) prouvées de $4.5 \log (<0,0032\%)$. En effet, cet essai est basé sur l'utilisation de cartouches à usage unique, qui intègrent des étapes automatisées d'extraction d'ARN, de transcription inverse et de PCR quantitative pour les transcrits b2a2 et b3a2 BCR-ABL1 et ABL (**Harieche, 2017 ; Cepheid, 2018**).

Le GeneXpert BCR-ABL comprend un Système d'ordinateur, cartouche Xpert BCR-ABL Ultra, module d'analyse, lecteur de code à barres, où chaque module est indépendant, traite un échantillon et gère l'intégralité de l'analyse. Chaque module se compose d'un moteur de la valve qui fait pivoter le corps de la valve de la cartouche afin d'atteindre les différentes chambres de la cartouche, d'un moteur du piston de la seringue qui distribue les liquides dans les différentes chambres de la cartouche, d'un émetteur d'ultrasons qui lyse l'échantillon et d'un module I-CORE qui effectue l'amplification par PCR et la détection (Fig.13) (**Cepheid, 2013**).

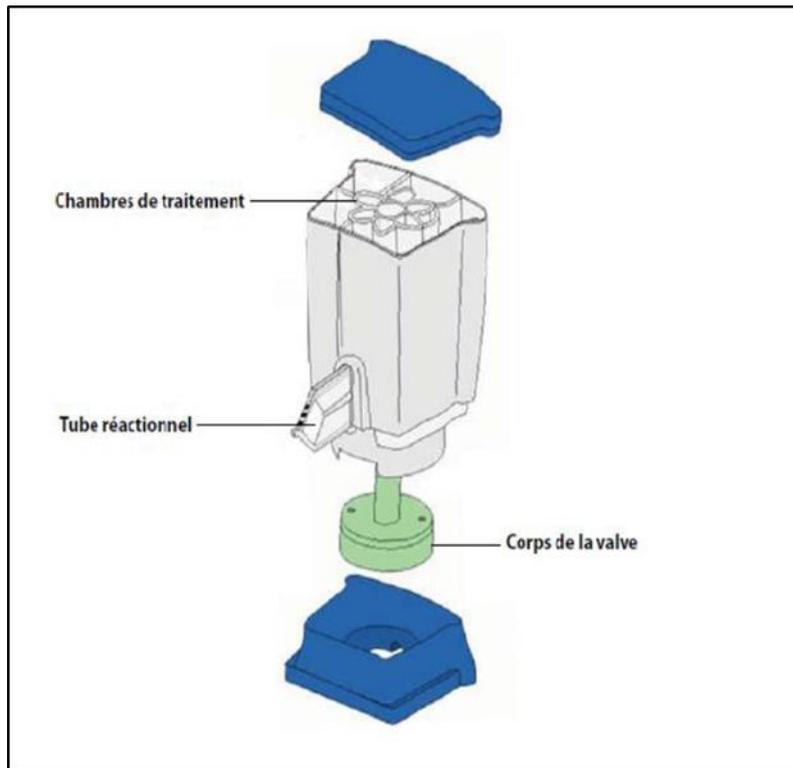


Figure 12 : Schéma des trois parties principales de la cartouche Xpert BCR-ABL Ultra (cepheid, 2013).

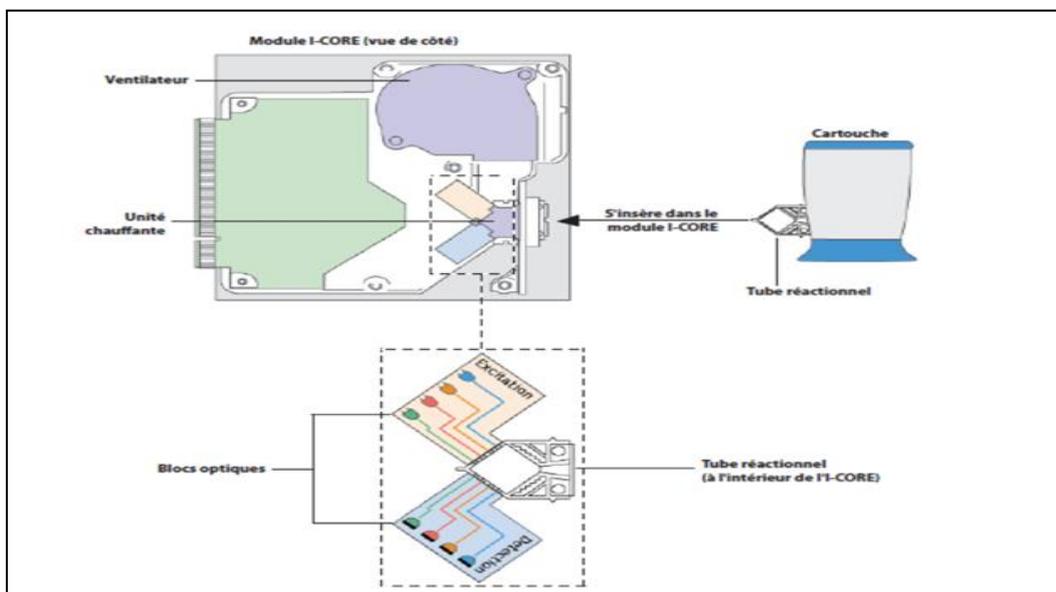


Figure 13 : Représentation schématique du module I-Core (Cepheid, 2013).

2-1-Types d'échantillons appropriés

Les échantillons de sang périphérique analysés avec le test Xpert BCR-ABL Ultra nécessitent des prélèvements sur tubes EDTA (**Cepheid, 2018**).

2-2-Kit du test Xpert BCR-ABL Ultra

Le kit du test Xpert BCR-ABL Ultra contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 échantillons. Chaque coffret de kit contient des réactifs Xpert BCR-ABL Ultra qui sont les suivants : réactif protéinase K (PK), réactif de lyse (LY) et un réactif de lavage. Le kit contient aussi 10 cartouches Xpert BCR-ABL Ultra avec des tubes réactionnels intégrés et un CD qui contient un fichier de définition du test et une notice d'utilisation (**Cepheid, 2018**).

2-3-Conservation et manipulation

Conserver le contenu du kit du test Xpert BCR-ABL Ultra entre 2 °C et 8 °C. Quand les échantillons de sang ne sont pas utilisés, conserver les entre 2 °C et 8 °C pendant 72 heures (trois [3] jours) maximum pour les échantillons sur EDTA (**Cepheid, 2018**).

Annexe

Annexe 01. Eléments de kit Xpert BCR-ABL Ultra

(Cepheid 2018).

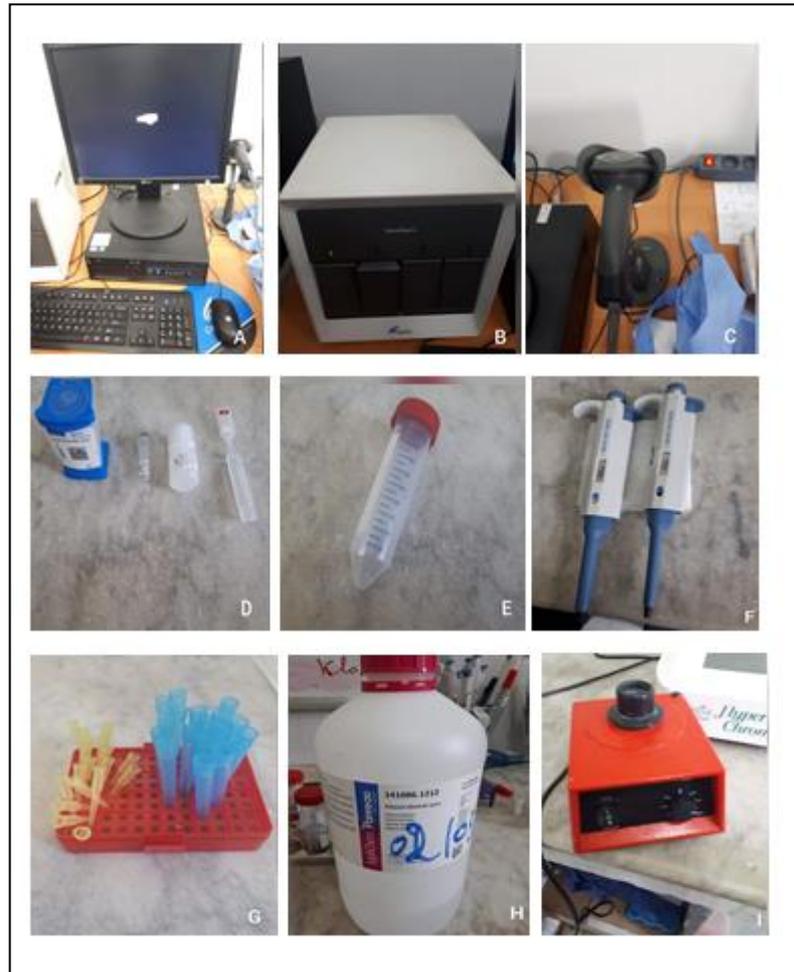
Eléments de kit BCR-ABL Ultra		Quantité par kit (x10)	Risques chimiques
Réactifs BCR-ABL Ultra	Protéinase k (pk)	130 µL par flacon	<p>Mentions de danger : H302 : Nocif en cas d'ingestion, H315 : Provoque une irritation cutanée, H317 : Peut provoquer une allergie cutanée, H320 : Provoque une irritation des yeux, H333 : Peut-être nocif par inhalation</p> <p>• Conseil de prudence :</p> <p>• P210 : Tenir à distance de la chaleur, des étincelles, des flammes nues et des surfaces chaudes.</p> <p>• P273 : Éviter toute libération dans l'environnement.</p> <p>• P264 : Se laver les mains soigneusement après manipulation.</p> <p>• P280 : Porter des gants de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.</p> <p>• P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.</p> <p>• P305+P351+P338 : EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Retirer les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.</p> <p>• P312 : Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.</p> <p>• P501 : Éliminer le contenu/contenant dans un endroit conforme aux règlements locaux et régionaux/nationaux/internationaux.</p>
			<p>• Contient du chlorure de guanidinium</p> <p>• Mentions de danger : H302 : Nocif en cas d'ingestion, H315 : Provoque une irritation cutanée, H319 : Provoque une sévère irritation des yeux</p>

Annexe

	Réactif de lyse (LY) (chlorure de guandine)	5.3 mL par flacon	<ul style="list-style-type: none"> • Contient de l'urée et du dodécylsulfate de sodium • Mentions de danger : H303 : Peut-être nocif en cas d'ingestion, H315 : Provoque une irritation cutanée, H320 : Provoque une irritation des yeux • Contient de l'EDTA • Mentions de danger : H303 : Peut-être nocif en cas d'ingestion, H316 : Provoque une irritation cutanée modérée, H320 : Provoque une irritation des yeux
	Réactif de lavage <ul style="list-style-type: none"> • Éthanol • Thiocyanate de guanidine 	2.9 mL par ampoule	<ul style="list-style-type: none"> • Contient de l'éthanol • Mentions de danger : H226 : Liquide et vapeurs inflammables, H303 : Peut-être nocif en cas d'ingestion, H315 : Provoque une irritation cutanée, H320 : Provoque une irritation des yeux • Contient du thiocyanate de guanidine • Mentions de danger : H302 : Nocif en cas d'ingestion, H316 : Provoque une irritation cutanée modérée, H320 : Provoque une irritation des yeux, H402 : Nocif pour les organismes aquatiques, EUH031 : Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique
Cartouche BCR-ABL Ultra	Billes 1, 2, 3 et 4	1 par cartouche	
	Réactif de rinçage	2,0 mL par cartouche	
	Réactif d'élution	2,5 mL par Cartouche	
Disque compacte (CD)	<ul style="list-style-type: none"> • Fichier de définition du test (ADF, Assay Definition File) • Instructions pour l'importation du fichier ADF dans le logiciel GeneXpert • Mode d'emploi (notice d'utilisation) 		

Annexe

Annexe 02. Matériels et équipements



A : Ordinateur.

B : Module GeneXpert.

C : Lecteur de code-barres.

D : Cartouche du test Xpert BCR-ABL Ultra.

- Réactif protéinase K (PK).
- Réactif de lyse (LY) (chlorure de guanidine).
- Réactif de lavage.

E : Tubes coniques de 50 mL.

F : Micropipettes réglables (500 μ L ,100 μ L).

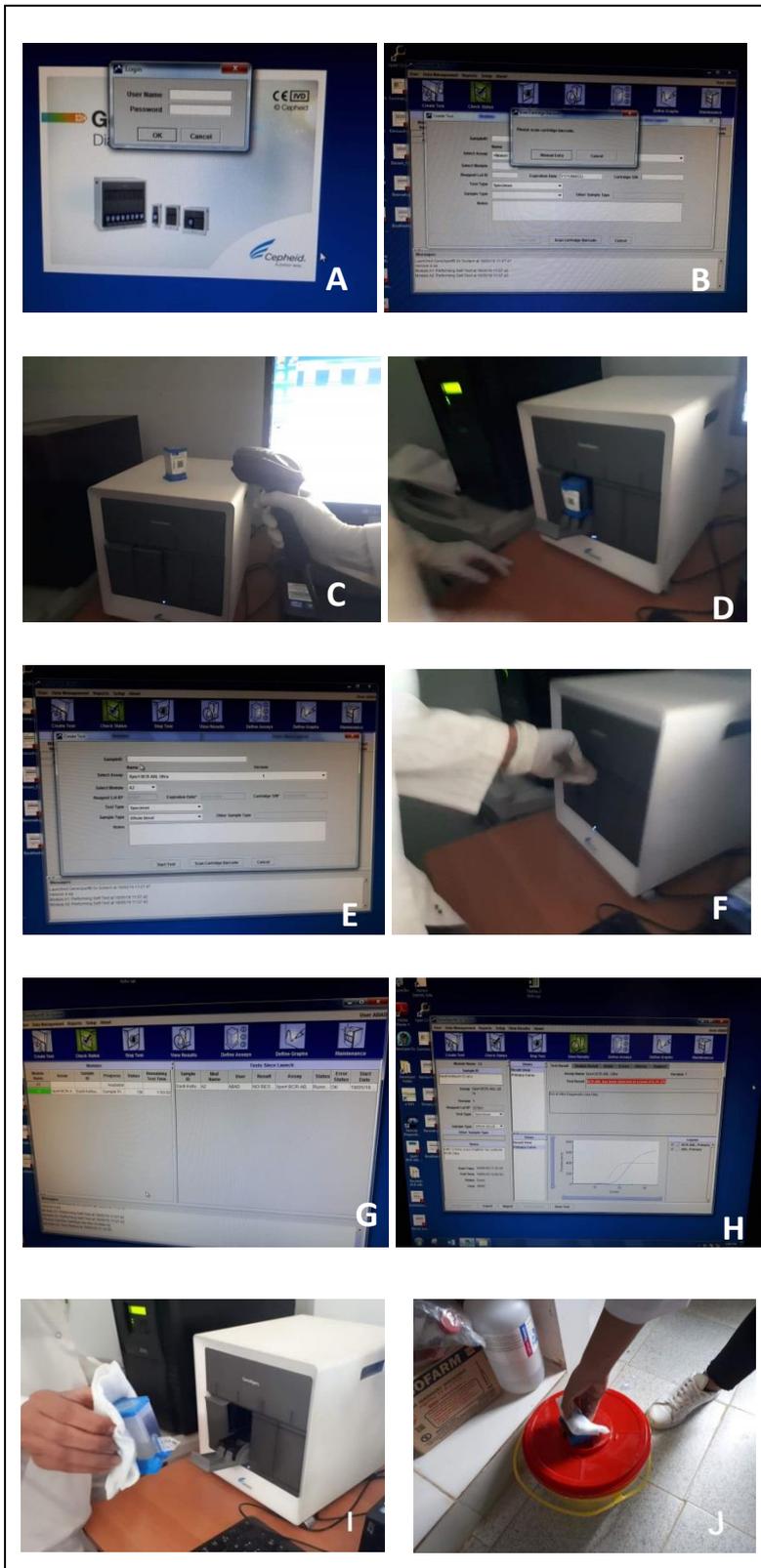
G : Embouts (500 μ L, 100 μ L).

H : Éthanol absolu.

J : Vortex.

Annexe

Annexe 03. Démarrage, Chargement, Déchargement du GeneXpert et expression des résultats.



Annexe

- A. Se connecter au logiciel du GeneXpert System.
- B. Cliquer sur Creat test pour commencer le test.
- C. Scanner le code barre sur la cartouche du test Xpert BCR-ABL Ultra.
- D. Ouverture de la porte du module de l'automate et placer la cartouche déjà préparée dans un module vide.
- E. Saisir les coordonnées du patient.
- F. Fermeture de la porte.
- G. Attente du temps nécessaire pour l'analyse automatisée.
- H. Cliquer sur view result une fois l'analyse automatisé est terminée. (Affichage des resultats Xpert BCR-ABL Ultra).
- I. Faire sortir la cartouche.
- J. Eliminer la cartouche.

Annexe 04. L'intérieure de la cartouche Xpert BCR-ABL Ultra (Cepheid 2013).

