

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



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER
Option : biologie moléculaire et cellulaire

Université BLIDA1, Laboratoire de Recherche sur les Hémopathies Malignes et les Hémoglobinopathies, Faculté de Médecine, B.P 270, Route de Soumaa, BLIDA, ALGERIE.

Thème

La délétion de (5) (q31 q33) dans un syndrome 5q- :
Intérêt diagnostique et thérapeutique

Présenté par :

Mme Keddala Rihab

Soutenu le :17/07/2019

Devant le jury composé de :

<i>Mme Ghuessaibia N</i>	<i>MCB</i>	<i>USDB1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme Mokrane A</i>	<i>MCA</i>	<i>USDB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme Taoussi S</i>	<i>MCA</i>	<i>CHU</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme Abdullhusein AS</i>	<i>MCB</i>	<i>USDB1</i>	<i>co promotrice</i>

2018/2019



Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents

qui sont toujours dans mon cœur, Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour ce que vous faites pour moi, vos prières et vos sacrifices.

Que cette thèse soit pour vous le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux

A mes très chers grands-parents,

Que dieu les garde et les protège pour nous.

A mon frère **Yacine**, ma petite chère sœur **Meriem** ma tante **Ibtissam** Puisse dieu vous procurer bonheur et prospérité

A mon marie Farouk

tu m'as soutenu et comblé tout au long de la période de préparation de ce mémoire.

A mes amis et collègues

Amira ,Rim ,Rima, Manel et Nora A tous les moments qu'on a passé ensemble, à tous nos souvenirs Je vous souhaite à tous longue vie pleine de bonheur et de prospérité.

A ma famille

Mes tantes et ses enfants, khalto **Nabila** et ses filles, mes oncles.
A l'hommage de mes beaux parents. Puisse Dieu, les tout puissant, l'avoir
Dans sa sainte miséricorde.



REMERCIEMENTS

*A ma Maitresse et le chef d'option **Dr Saadi L.**, maitre de conférences à l'université de Blida-1, j'ai pu apprécier la clarté et la rigueur de votre enseignement au cours de mes études, Que ce travail soit le gage de mon respectueuse considération.*

*A ma Maîtresse et Président du jury, M **Ghissaibia** maitre assistante à l'université de Blida-1, Vous me faites l'honneur et le plaisir de présider les jury.*

*à ma promotrice **Pr Taoussi S** je suis touchés par l'honneur que vous me avez fait en Acceptant de me confier ce travail. Veuillez accepter, cher professeur, dans ce travail l'assurance de mon estime et mon profond respect.*

*Je remercie également **Dr Mokrane A.**, maitre de confiance à l'université de Blida-1, pour avoir accepté de juger notre travail et de l'apporter ses critiques constructives.*

*Je tenu à exprimer mon affectueuse reconnaissance à **Mme Abdullhussein A.**, pour son aide et ses précieux conseils.*

*A tout le personnel infirmier du service d'hématologie
Hôpital Frantz Fanon.*

A toute personne qui a contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail.

RESUME

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des syndromes préleucémiques du sujet âgé caractérisés par des cytopénies persistantes et la présence d'une hématopoïèse clonale dérégulée. Le syndrome 5q- est une catégorie à part dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) en raison de ses caractéristiques hématologiques et cytogénétique, de sa physiopathologie. Dans le but de mieux cerner les particularités de ce syndrome dans notre service, nous sommes fixés comme objectif de déterminer les aspects épidémiologiques, diagnostics et Thérapeutiques des SMD suivis dans le service.

Il s'agit d'une étude rétrospective de type descriptif portant sur les dossiers Des dix neuf malades hospitalisés dans le service d'hématologie de CHU Frantz Fanon de Blida entre 2015 et Juin 2019 soit une durée de 4ans. Ont été inclus dans notre étude les patients présentant un syndrome 5q- documentée par un myélogramme, hémogramme et étude de frottis sanguin et aussi par des analyse cytogénétique moléculaire (FISH) et analyse cytogénétique conventionnelle (caryotype) .

Cent (100) patients suivis pour SMD ont bénéficié d'un examen cytogénétique par FISH et caryotype, 19 patients (19 %) ont présenté une del (5q)-5, isolée ou associée.

L'âge moyen des patients est de 67 ans avec des extrêmes de 45 ans et de 85 ans; le sex-ratio était de 0.46 (6 hommes et 13 femmes).

La deletion 5q- est isolée dans 58 % des cas et associée à des anomalies cytogénétiques additionnelles dans 42 % des cas.

En observe que La del(5q) isolée a un pronostic et une médiane de survie très bon avec un pourcentage de transformation en LAM faible. Par contre la del(5q) associées à d'autres anomalies cytogénétiques ont des taux de survie médianes avec pourcentage de transformation en LAM très important

mot clés : syndromes myélodysplasique, syndrome 5q- .FISH ,caryotype

ملخص

متلازمات خلل التنسج النقوي (MDS) هي متلازمات ما قبل الإصابة بسرطان الدم تصيب كبار السن، يتميز هذا المرض بخلل التوتر الخلوي المستمر ووجود دموي نسيلى غير منظم. المتلازمة q5- هي فئة خاصة من متلازمات خلل التنسج النخاعي (MDS) بسبب خصائصها الوراثية والبيولوجية الخلوية ، وعلم وظائف الأعضاء. من أجل فهم خصوصيات هذه المتلازمة بشكل أفضل في قسمنا ، وضعنا الهدف المتمثل في تحديد الجوانب الوبائية والتشخيصية والعلاجية لـ MDS المتبعة في الخدمة.

هذه دراسة هي دراسة رجعية من النوع الوصفي لملفات المرضى في قسم أمراض الدم في مستشفى فرانس فانون بالبلدية بين عامي 2015 و يونيو 2019 لمدة 4 سنوات. شمل في دراستنا المرضى الموثقين و الخاضعين لدراسة النخاع ، تعداد الدم ودراسة لطاخة الدم وكذلك عن طريق التحليل الجزيئي الخلوي (FISH) والتحليل الخلوي التقليدي (النمط النووي).

خضع مائة (100) مريض بمتلازمات خلل التنسج النقوي لفحص الوراثة الخلوية بواسطة التحليل الجزيئي الخلوي و النمط النووي ، قدمت النتائج 19 حالة (19%) لمتلازمة del(5q) ، معزولة أو مرتبطة.

متوسط عمر المرضى هو بين 45 سنة و 67 سنة كانت نسبة الجنس 0.46 (6 رجال و 13 امرأة) .

متلازمة الحذف q5 معزولة في 58% من الحالات ويرتبط مع تشوهات خلوية إضافية في 42% من الحالات.

لوحظ أن متلازمة (5q) المعزول له بقاء جيد جدًا وبقاء متوسط مع نسبة تحول الى سرطان الدم النخاعي الحاد منخفضة. من ناحية أخرى ، فإن del(5q) المرتبطة بتشوهات خلوية أخرى لها معدلات بقاء متوسطة مع نسبة تحويل عالية للغاية إلى سرطان الدم النخاعي الحاد.

الكلمات المفتاحية: متلازمات خلل التنسج النخاعي ، متلازمة 5q التحليل الجزيئي الخلوي، (النمط النووي).

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are pre-leukemic syndromes of the elderly subject characterized by persistent cytopenias and the presence of deregulated clonal hematopoiesis. The syndrome 5q- is a category apart in myelodysplastic syndromes (MDS) because of its hematological and cytogenetic characteristics, its physiopathology. In order to better understand the peculiarities of this syndrome in our department, we have set the objective of determining the epidemiological, diagnostic and therapeutic aspects of MDS followed in the service. This is a retrospective study of descriptive type hospitalized patients in the hematology department of CHU Frantz Fanon de Blida between 2015 and June 2019 for a duration of 4 years. Included in our study were 5q- documented patients with myelogram, blood count and blood smear study and also by molecular cytogenetic analysis (FISH) and conventional cytogenetic analysis (karyotype).

One hundred (100) patients followed for SMD underwent cytogenetic examination by FISH and karyotype, 19 patients (19%) presented with del (5q) / - 5, isolated or associated.

The average age of patients is 67 years with extremes of 45 years and 85 years old; the sex ratio was 0.46 (6 men and 13 women).

The 5q- deletion is isolated in 58% of cases and associated with additional cytogenetic abnormalities in 42% of cases.

Observe that isolated del (5q) has a very good survival and median survival with a low AML transformation percentage. On the other hand, del (5q) associated with other cytogenetic abnormalities have median survival rates with a very high conversion percentage to AML.

Key words: myelodysplastic syndromes, 5q- syndrome .FISH, karyotype

LISTE DES ABREVIATIONS

AR : anémie réfractaire

AREB : anémie aréginirative avec excès de blastes

Bcl : (B-cell lymphoma)

CRMD : cytopénie réfractaire multiligné

CSH : cellule souche hématopoïétique

DED : death domain (domaine de mort)

EGR 1 : early growth réponse protéine 1

Hb : taux d'hémoglobines

IL : interleukine

LAM : leucémie aigue myéloïde

miARN : micro acide ribonucléique

NK : naturel killer

RPS : ribosomal protéines S

SPARC : secreted protéines acid and rich in cysteine

SMD : Syndrome myélodysplasique

TNF α : facteurs de nécrose tumoral α

Treg : cellule T régulatrice

VGM : volume globulaire moyenne

GLOSSAIRE

Apoptose : (ou mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. (Lauriane et al, 2013)

Cytopenie : est un déficit quantitatif d'un certain type de cellule du sang.(**Efira et al .,2013**)

Dysérythropoïèse : est une anomalie de la maturation des érythroblastes au niveau de la moelle osseuse, entraînant une insuffisance de production des érythrocytes ou globules rouges, et une anémie arégénérative

GATA :Les facteurs de transcription GATA sont une famille de protéine à doigt de zinc se fixant sur la séquence ADN « GATA » et ayant un rôle de facteur de transcription (**Patient ., 2002**)

Leucopenie : est une baisse du nombre de leucocytes totaux (c'est-à-dire de globules blancs) dans le sang. (**Grandvullemin et al .,2009**)

Thrombopenie : ou hypoplaquettose) est une diminution du nombre de plaquettes sanguines en dessous du seuil de 150 000 plaquettes par millimètre cube ou une diminution de 50 % par rapport au niveau de référence (**Grandvullemin et al ,2009**)

Thrombocytose : (ou hyperplaquettose, ou encore thrombocytémie, thrombocythémie) est une anomalie de l'hémogramme caractérisée par une augmentation du nombre de plaquettes circulantes (**Cheminant .,2003**)

La myélopoïèse : est le processus de génération, de développement et de maturation des composants myéloïdes du sang .(**Junqueira, Carneiro.,2005**)

Les sidéroblastes : sont des cellules de la moelle osseuse, de la lignée des globules rouges, dont le cytoplasme contient des inclusions ferriques qui ne sont liées à l'hémoglobine. (**Pagon ., 1997-2006**)

Dysplasie : est une malformation ou déformation résultant d'une anomalie du développement d'un tissu ou d'un organe, qui survient au cours de la période embryonnaire ou après la naissance.(**Canu .,1993**)

haplo insuffisance : Situation dans laquelle le produit d'un seul allèle, bien qu'actif, est synthétisé en quantité insuffisante pour permettre le fonctionnement normal de la cellule

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	titre	page
Tableau I	Critères de la classification OMS (2008) des syndromes myélodysplasiques (Hellstrom-Lindberg E et <i>al</i> , 2008)	11
Tableau II	Données épidémiologiques et hématologiques des patients	23
Tableau III	Données normal de l'hémogramme	24

LISTE DES FIGURES

figures	titre	Pages
Figure 1	Schéma général de l'hématopoïèse	4
Figure 2	régions communes délétées dans les SMD avec del 5	11
Figure 3	le role de RPS14 dans l'éxes d'apoptose au cours de Syndrome 5q-	12
Figure 4	Image de fish de 1 ^{er} malade	25
Figure 5	Image de caryotype de 1 ^{er} malade	26
Figure 6	Image de fish de 2 ^{eme} malade	26
Figure 7	Image de caryotype de 2 ^{eme} malade	27
Figure 8	Image de fish de 3 ^{eme} malade	27
Figure 9	Image de caryotype de 3 ^{eme} malade	28
Figure 10	Image de fish de 4 ^{eme} malade	28
Figure 11	Image de caryotype de 4 ^{eme} malade	29
Figure 12	Image de fish de 5 ^{eme} malade	29

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
I.1. Généralité sur l'hématopoïèse	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Déroulement de l' hématopoïèse	3
I.1.3. Hématopoïèse pathologique au cours des SMD	4
I.2. Généralités sur les syndromes myélodysplasiques	5
I.2.1. Historique	5
I.2.2. Physiopathologie	5
I.2.2.1 Anomalies d'apoptose et de différenciation dans les SMD.....	5
I.2.2.2. Anomalie du micro environnement médullaire	6
I.2.2.3. Dysfonctionnement de système immunitaire	6
I.2.2.4. Anomalies génétiques.....	6
I.2.2. 5. Epigénétique et SMD	7
I.2.3. Epidémiologie et facteurs étiologique	8
I.2.4 Classification 2008 De l'Organisation mondiale de la santé	8
I.3 Syndrome myélodysplasique avec délétion 5 q	10
I.3.1. Définition	10
I.3.2 Signes cliniques	10
I.3.3 Caractéristique cytogénétique de syndrome 5 q-	10
I.3.3.1 La région 5q33.1	11
I.3.3.2 La région 5q31.1.....	11
I.3.4. Physiopathologie de syndrome 5 q-	12
I.3.4.1Le gène RPS14	12
I.3.4.2 Le gène SPARC.....	13
I.3.4.3 L'haploinsufisance de miRNA-145 et miRNA-146.....	13
I.3.4.4 Le gène EGR1 et APC.....	14
I.3.4.5 Mutation de TP53 et la progression de la maladies.....	14
I-4 Traitements	14

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

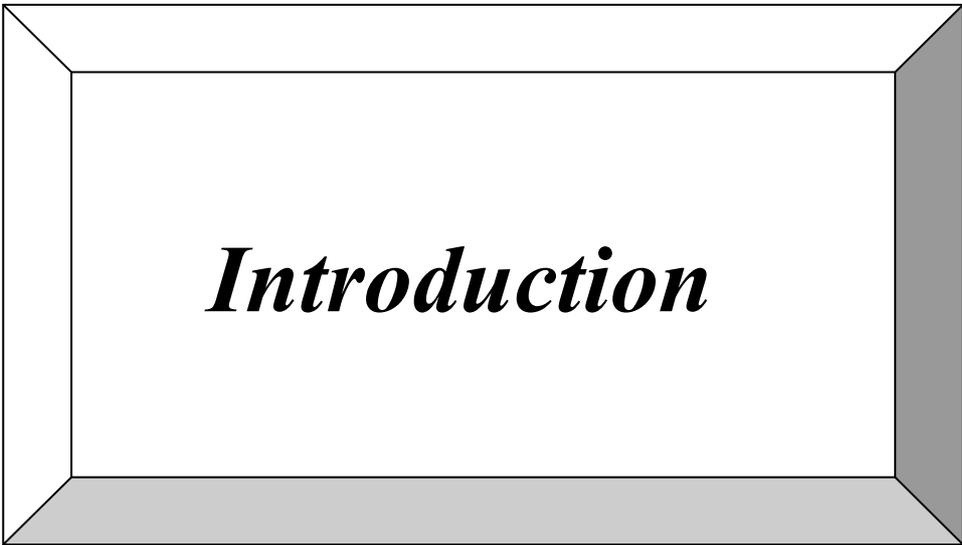
II.1. Matériel	16
II.1.1 Patients	16
II.1.2. Matérielles biologique	16
II.1.3. Matérielles non biologique	16
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Prélèvement médullaire	17
II.2.2. Mise en culture cellulaire	17
II.2. 3. Sortie de culture et étalement cellulaire	18
II.2. 4. Caryotype	19
II.2. 5. Hybridation In Situ Fluorescente (FISH)	20

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats	23
III.1.1. Etude prospectif	23
III.1.1.1. description des cas	23
III.1.2. résultats des cas	24
III.2. Discussion	30
III.3 Etudes rétrospectives	33
CONCLUSION	38

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES



Introduction

INTRODUCTION

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) représentent un groupe d'affections malignes hétérogènes des cellules souches hématopoïétiques. Ils sont caractérisés par un trouble de la maturation médullaire myéloïde responsable d'un excès de cellules immatures (blastes) et d'une hématopoïèse inefficace et dysplasique conduisant à une ou plusieurs cytopénies périphériques associées à des signes de dysmyélopoïèse des éléments figurés du sang et de la moelle au niveau des Différentes lignées (granuleux, érythrocytes et plaquettes). (**Boyer et al .,2006**)

Les SMD évoluent dans 30 % des cas en leucémie aigue myéloblastique (LAM) et constituent d'ailleurs le plus fréquent des états pré leucémiques. La gravité d'un SMD est liée d'une part à la profondeur des cytopénies sanguines et à leurs conséquences, et d'autre part à la fréquence de la transformation en LAM.

Le risque de transformation en leucémie aiguë augmente avec le pourcentage de blastes médullaires, et avec la présence de certaines anomalies cytogénétiques.

L'existence d'anomalies chromosomiques est fréquente dans les SMD. En effet, plus de 40 % des patients présentent une ou plusieurs anomalies cytogénétiques clonales.(**Beyne-Rauzy ., 2007**)

À la différence des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) dans lesquelles les translocations réciproques prédominent, les SMD sont caractérisés, le plus souvent, par des déséquilibres génomiques à type de délétion. Aucune anomalie cytogénétique n'est spécifique des SMD mais certaines d'entre elles sont impliquées plus fréquemment telles qu'une délétion partielle ou totale des chromosomes 5, 7 et 20 ou une trisomie 8.(**Martinaud et al ., 2011**)

Une délétion interstitielle du chromosome 5, del (5q), est l'anomalie structurelle la plus courante (**Stoddart .A et al ., 2014**), est une entité clinique et morphologique particulière. Il apparait généralement après 60 ans, avec une plus grande fréquence chez la Femme (ratio femme/homme d'environ 3/1). Biologiquement, il associe une anémie réfractaire macrocytaire, un taux de plaquettes normal ou élève, une discrète leucopénie et de Nombreux mégacaryocytes de petite taille ayant un noyau hypolobule. Le nombre de blastes dans le sang et la moelle osseuse est inferieur a 5 %.(**Raynaud et al .,2008**).

Notre travail comporte trois chapitres. Dans le premier , nous rapportons des rappels bibliographiques sur l'hématopoïèse ,les syndromes myélodysplasique et le syndrome 5q-.

Nous décrivons le matériel et la technique utilisée dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième chapitre. A la fin, une conclusion est présentée. dont l'objectif est de Réaliser une cytogénétique conventionnelle et moléculaire pour des cas de SMD type syndrome 5q- et de Préciser l'intérêt diagnostique et thérapeutique du syndrome 5q- à travers une étude rétrospective de cas index réalisée dans le service hématologie CAC Blida.

-

CHAPITRE I :

DONNEES

BIBLIOGRAPHIQUES

I.1 .L'hématopoïèse

I.1.1. -Définition

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des diverses cellules sanguines a partir de la cellule souche hématopoïétique (**Orkin ., 2008**)

I.1.2. -Déroulement de l'hématopoïèse :

Dans la moelle osseuse les hémangioblastes peuvent se différencier d'une part en angioblastes puis en cellules endothéliales, et d'autre part en cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Les CSH sont classe en deux catégories :

- LT-CSH (CSH a long duré) :CD33⁺,CD34⁻,CD38⁻ ces dernies se différencié en ;
- ST-CSH (CSH a courte duré) : CD 133⁺,CD34⁺,CD38⁻

Les ST-CSH se différencie en des progéniteurs multipotentes (MP) qui a leur tour différencie en deux types de progéniteurs primitifs ; progéniteurs commun myéloïdes (CMP) et progéniteurs commun lymphoïdes (CLP)

Les SMP appelée aussi CFU-GEMM (colony.forming unit grannulocyte-erythroblaste – megacaryocyte –monocyte) se différencie en : progéniteurs commun granulocytaire monocytaire (CFU) et progéniteurs commun mégacaryocytaire érythroblastique (MEP).

Les CFU donne naissance a des progéniteurs tardifs ou différenciés ; (CFU-M,CFU-G ,CFU-basophiles , CFU-dendritique)

Les MEP produisent les BFE par l'érythropoïèse qui donne naissance aux globules rouges, les MEP produisent aussi des CFE-MK qui donne après différenciation des plaquettes. **(figure 1) .(Udomsakdi et al .,1992)**

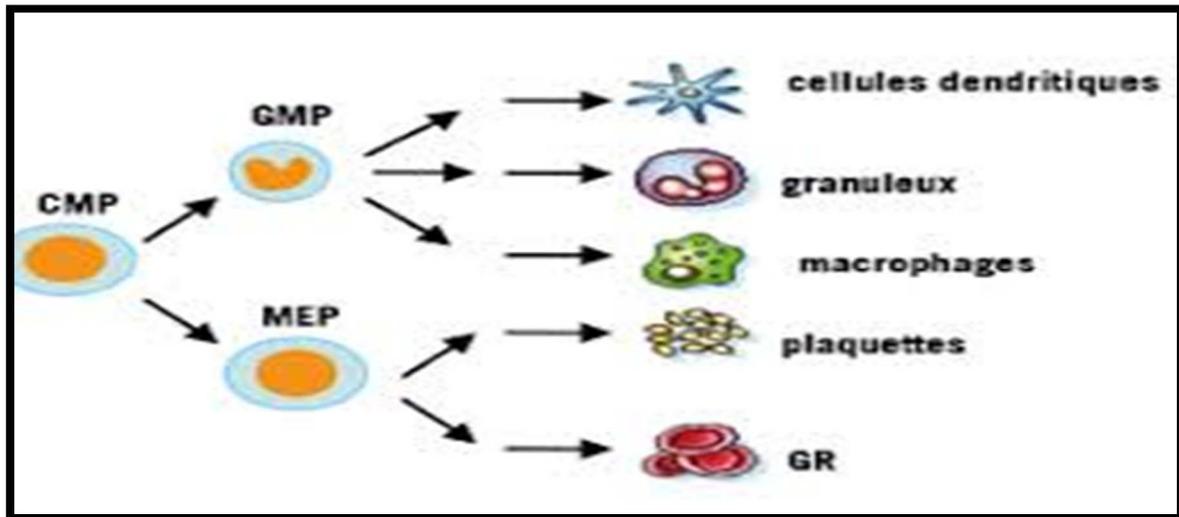


Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse

I.1.3. Hématopoïèse pathologique au cours des SMD

La mise en évidence de la délétion 5q (del[5q]) dans la grande majorité des cellules appartenant au compartiment immature CD34+/CD38- chez des patients atteints de syndrome 5q-, a permis d'incriminer la cellule souche hématopoïétique comme cellule d'origine des SMD (Woll PS et al., 2014)

Des travaux récents ont identifié chez des patients atteints de SMD une population de « cellules souches myélodysplasiques » d'immunophénotype CD34+CD38-CD90+, avec capacité d'auto renouvellement et une capacité de différenciation distincte des CSH normales. Ces cellules souches myélodysplasiques constituent par l'acquisition de nouvelles anomalies génétiques ou épigénétiques, le réservoir de la transformation en LAM. (Claessens Y-E et al., 2002)

Plusieurs mécanismes favorisent l'apparition d'une myélopoïèse clonale ; mécanismes propres à la cellule souche myélodysplasique et mécanismes liés au microenvironnement. Les anomalies de différenciation érythroblastique semblent liées à un excès de clivage de GATA-1, favorisées par une délocalisation de sa protéine chaperonne, HSP70 (Frisan et al., 2012)

I.2. Les syndromes myélodysplasiques

I.2.1 Historique

Les syndromes myélodysplasiques ont été décrits dès le début du 20^{ème} siècle ; il a fallu attendre l'année 1938 pour voir apparaître le terme « anémie réfractaire ». Les cadres nosologiques que nous connaissons actuellement n'ont été précisés qu'à partir des années 1980 avec les classifications successives de l'OMS. (**Rose ., 2001**)

I.2.2 Physiopathologie :

Les évènements précoces des SMD Sont : Une hématopoïèse inefficace qui est le résultat d'un excès d'apoptose, cette inefficacité est contrebalancée par une augmentation de la prolifération hématopoïétique (**Fenaux et al ., 2004**)

Ces deux processus inversé sont traduit par un paradoxe entre la présence de cytopénies dans le sang périphérique et une richesse médullaire (**Faderl et al ., 2004**)

Ces anomalies favorisent ensuite la survenue d'évènements secondaires aboutissant à la transformation leucémique. les travaux récents suggèrent que différents anomalies sont participe dans le développement des SMD.

I.2.2.1. Anomalies d'apoptose et de différenciation dans les SMD

Aux stades précoces de la maladie l'équilibre de l'ensemble Bcl2/Bax agir sur la perméabilité mitochondrial, l'équilibre est en faveur de Bax ce qui induit des protéines mitochondrial pro-apoptotique .

Dans le cas des SMD en progression l'équilibre se modifie, est l'expression de Bcl2 devient en faveur et de Bax diminue , ce qui favorise la prolifération. (**Parker et al ., 2000**)

Le TNF α et le FAS L avec son récepteur FAS et leur vois de signalisation en aval sont mis en jeu aussi au cours des SMD (**Gyan et al ., 2008**)

I.2.2.2 Anomalie du micro environnement médullaire (niche hématopoïétique) :

la synthèse des facteurs pro-apoptotique ou cytokine inhibitrice de l'hématopoïèse : facteurs de nécrose tumorale α (TNF α) , interféron γ (INF γ) , interleukine 1 β (IL1 β) semblent être à l'origine d'excès d'apoptose .(**Gelsi-Boyer et al .,2006**)

La sécrétion accrue des cytokines crée un environnement médullaire inflammatoire ce qui favorise le stress oxydatif des cellules hématopoïétique, et donc la survenue d'événements oncogénique au cours de la progression de la maladie.

L'excès d'apoptose est diminué durant cette phase et les signaux anti apoptotique augmente et alors la prolifération qui domine. (**Parker et al .,2000**)

I.2.2.3. Dysfonctionnement de système immunitaire

10-20 % des SMD sont associés à des pathologies auto immunes.

On observe une augmentation des lymphocytes Th17 sécrétant des cytokines pro inflammatoire, on observe aussi la présence des cellules T CD8⁺ oligoclonales et des cellules NK dans la moelle osseuse qui sont responsables de l'élimination des précurseurs érythroïdes et myéloïdes.

Les SMD à haut risque sont caractérisés par des anomalies des cellules NK et une présence accrue des cellules T Reg fonctionnelles qui inhibent les réactions auto immunes vers les cellules anormales et favorise l'échappement de ces blastes à l'immuno surveillance ce qui induit la progression de ces SMD vers des LAM (**Fain et al ., 2010**)

Mais dans la phase précoce des SMD les cellules Treg sont incapable d'inhiber le système immunitaire et sont donc responsable de l'induction d'une réponse auto-immune dirigée contre les cellules clonales de ces SMD.(**Itzykson et al .,2009**)

I.2.2.4. Anomalies génétiques

Dans certains cas de SMD des mutations peuvent être mises en évidence : gènes du complexe de la telomerase, RUNX1, GATA2, DDX41 .

D'un point de vue moléculaire, les études ont permis de différencier 3 classes de mutations génétiques participant à la leucémogénèse ;

- Classe 1 : Les mutations impliquant la voie tyrosine kinase/RAS (activant le cycle et donc la prolifération cellulaire) sont retrouvées dans environ 20% des SMD .
- classe 2 : Les anomalies des gènes de facteurs de transcriptions de l'hématopoïèse comme AML1 touchant la différenciation cellulaire, concernent 10 à 15% des SMD .
- classe 3 : Les mutations ponctuelles de P53 sont relativement rares et tardives présentes dans 5 à 10 % des cas (Pedersen-Bjergaard et al , 1995)

I.2.2.5. Epigénétique et SMD :

Dans les SMD et les leucémies aiguës ; les mutations touchent la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les mécanismes d'épissage d'ARN.

On trouve dans les SMD et les LAM une hypo méthylation et la répression de nombreux gènes, des mutations de DNMT3A observées dans 3 à 8% des SMD, cette mutation est responsable à la réduction de l'activité catalytique de la méthyl transférase, les mutations touchant aussi les isocytate déshydrogénases 1 et 2 (IDH1 et IDH2), le résultat est une diminution de taux d'alpha-cétoglutarate et une hyper méthylation des promoteurs dans les cellules souches hématopoïétiques.

La capacité d'auto renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et son augmentation s'accompagnent de mutations de type perte de fonction du gène TET2 ; ce TET2 est modifié au niveau de l'histone 2B en recrutant une B-D-N acétylglucosaminase dépendante de l'action des IDH1/2. (Beyne-Rauzy 2012)

Le SRSF2 et SF3B1 sont des gènes codant des enzymes implique dans les mécanismes de l'épissage d'ARN, la mutation de SF3B1 est corrélée avec la présence des sidéroblastes en couronne dans les SMD , cette mutation est associée à un faible risque de transformation

leucémique , le mutant P95H de SRSF2 agirait particulièrement sur des gènes impliqués dans l'hématopoïèse expliquant leur rôle de mutations fondatrices attribue dans les SMD.

(Roux et al .,2016)

➤ L'haploinsufisance de miRNA-145 et miRNA-146

Des études récentes ont démontrée que l'expression de miRNA-145(5q33.1) et miRNA-146 (5q33.3) diminuait chez les patients avec del 5q ce qui entraine une délétion accrue de leur gènes cibles.

Vamey et al ont également trouvé que TIFAB et miRNA-146 sont Co-supprimés chez environ 80% atteints des SMD avec del 5q.

La voie de signalisation en aval des récepteurs du TNF et notamment le gène TRAF 6 dans des CSH est réguler par les 2 miR.

La suppression de TIFAB et miR-146 et l'expression élevé de TRAF6 induit un phénotype myélodysplasique avec anémie neutropénie et thrombocytes avec mégacaryocyte (Varney ME et al ., 2016)

I.2.3. Epidémiologie et facteurs étiologique

I.2.3.1. Épidémiologie

Les syndromes myélodysplasiques atteignent surtout les sujets âgés avec une prédominance masculin, le médiane d'âge est de l'ordre de 70 ans, leur incidence est de 4 à 5 pour 100 000 personnes par an. (Fenaux .,et al ,1996)

Ils sont rares (10%) avant l'Age de 50 ans, , le vieillissement de la population mondial et l'utilisation croissante des traitements médullotoxiques sont autant d'éléments permettant d'expliquer l'augmentation de leur incidence.(Martinaud et al ., 2011)

En Algérie, l'incidence est plus faible (0,07 pour 100000 habitants) (Belakhal ., (1995-2005))

I.2.3.2 Facteurs étiologiques

Près de 90% des SMD apparaissent comme primitif sans cause décelable. Dans 10% des cas, ils sont secondaires et liés à des expositions multiples aux radiations ionisantes, à la chimiothérapie, aux facteurs environnementaux (benzène, pesticides, métaux lourds, dérivés aromatiques) aux maladies hématologiques acquises (aplasie médullaire, hémoglobinurie

paroxystique nocturne), aux facteurs génétiques (syndrome de Down, syndrome de Fanconi, syndrome de Kostmann et la neurofibromatose) aux maladies auto-immunes (polychondrite atrophiante, vascularites et arthrites séronégatives).

L'augmentation de l'incidence avec l'âge souligne également le caractère probablement multifactoriel des causes, et l'impact du vieillissement dans leur survenue. (**Duchmann et al, 2015**)

I.2.4 Classification 2008 De l'Organisation mondiale de la santé :

la classification OMS 2008 (**Tableau I**) révisé en 2016 permettent de définir plus précisément les sous-groupes. Ainsi, les paramètres suivants interviennent maintenant dans la classification :

- le nombre de cytopénies sanguines qui sépare les cytopénies réfractaires « uni lignées » des SMD inclassables
- le pourcentage de blastes circulants qui devient discriminant, pour identifier les anémies réfractaires avec excès de blastes de type 1, ou de type 2 ou les SMD

inclassabl (**Hallström-Lindberg et al ., 2008**)

Tableau I. Critères de la classification OMS (2008) des syndromes myélodysplasiques

Type	Sang	Moelle
Cytopénie réfractaire avec dysplasie unilignée (CRDU) Anémie réfractaire (AR) Neutropénie réfractaire (NR) Thrombopénie réfractaire (TR)	Cytopénie isolée ou bicytopénie* Pas ou peu de blastes (< 1 %)	Dysplasie unilignée > 10 % des cellules de la lignée touchée sont dysplasiques Blastes : < 5 % < 15 % des précurseurs érythroïdes sont des sidéroblastes en couronne (SC)
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS)	Anémie Pas de blastes	Dysplasie érythroïde isolée > 15 % SC Blastes : < 5 %

Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée (CRDM)	Cytopénie(s) Pas ou peu de blastes (< 1 %) Pas de corps d'Auer*** Monocytes < 1.109/L	Dysplasie dans > 10 % des cellules dans 2 ou plus de lignées myéloïdes Blastes : < 5 % Pas de corps d'Auer SC : < 15 %
Anémie réfractaire avec excès de blastes-1 (AREB-1)	Cytopénie(s) Blastes < 5 % Pas de corps d'Auer*** Monocytes < 1.109/L	Dysplasie unilignée ou multilignée 5 % < blastes < 9 % Pas de corps d'Auer
AREB-2	Cytopénie 5 % < Blastes < 19 % Corps d'Auer +/-*** Monocytes < 1.109/L	Dysplasie unilignée ou multilignée 10 % < Blastes < 19 % Corps d'Auer : +/-***
SMD non classables (SMD-I)	Cytopénie Pas ou peu de blastes (< 1 %)	Dysplasie évidente dans moins de 10 % de cellules dans une ou plusieurs lignées myéloïdes Blastes : < 5 %
SMD avec délétion 5q isolée	Anémie Plaquettes : normales ou élevées Pas ou peu de blastes (< 1%)	Mégacaryocytes avec noyau hypolobé : normal ou élevé Blastes : < 5 % Pas de corps d'Auer*** del(5q) isolée

I.3. Syndrome myélodysplasique avec délétion 5 q

I.3. 1. Définition

Le syndrome 5q est un paradigme unique des SMD en raison de ses caractéristique hématologique représente 5-10% des SMD , il constitue une entité a part dans la classification d'OMS. il décrit en 1974 par Van den Berghe et Coll comme première anomalie

récurrente dans un type d'anémie réfractaire (**Van den Berghe H ., et al,1985**).

ont un pronostic favorable avec une survie médiane de 58 mois et un risque faible de transformation en LAM. (**Jung-hoon1 Lee et al .,2018**)

Selon la classification de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) de 2016, les MDS avec délétion du chromosome 5q représentent un trouble hématologique distinct. et sous-groupe pathologique caractérisé par une délétion 5q isolée ou del (5q) avec une anomalie cytogénétique supplémentaire (**Maynadié ., 2017**)

I.3. 2. Signes cliniques

Le syndrome 5 q- est un forme rare d'anémie aregénérative avec thrombocytose et moelle osseuse riche en mégacaryocytes

Les caractéristiques cliniques d'installation chronique de syndrome 5q- sont :

- anémie profonde
- absence de neutropénie et thrombopénie
- thrombocytes modérée
- macrocytose (VGM augmenté) (**Van den Berghe ., et al,1985 ; Harris et al .,1999**)

I.3. 3. Caractéristique cytogénétique de syndrome 5 q-

Plusieurs types de délétion sont décrits au niveau de chromosome 5 variant par la taille et la localisation, les bandes chromosomiques les plus fréquemment impliqués sont 5q 31-33 au niveau distal.

Des études récents identifient la région critique de la délétion interstitielle récurrente sur 5 q en une région déletée commune (CDR) (figure2) de 1.5 mégabases contenant 40 gènes (**Boulwood et al ., 2002**)

Les patients avec del 5q ont rarement une suppression des deux allèles ou une mutation ponctuelle donc il a été supposé que les SMD sont les résultats de l'haploinsufisance des gènes spécifiques dans la CDR. (**Ebert BL et al ., 2008**)

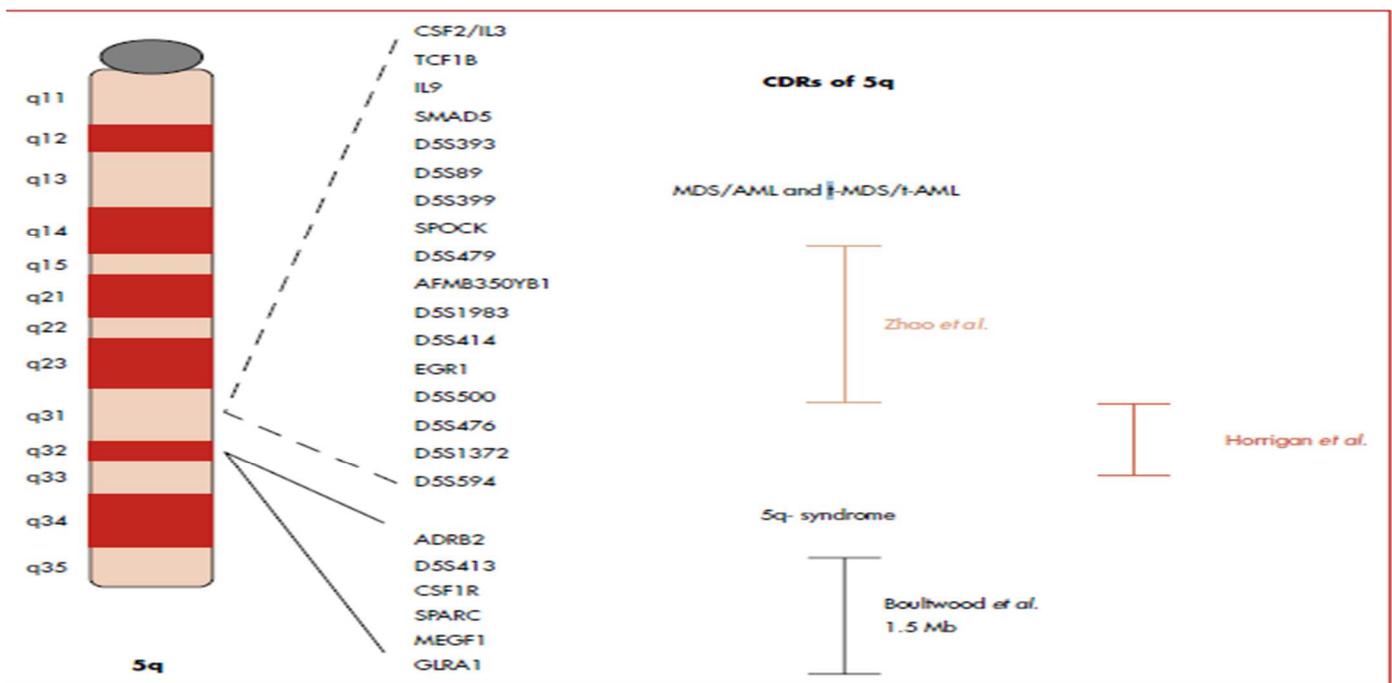


Figure 2 : régions communes délétées dans les SMD avec del 5 (Boulwood J et al , 1994)

I.3.3.1. La région 5q33.1

est communément délétée, et cette zone contient le gène RPS14, qui code pour la protéine ribosomale S14, et le gène SPARC qui a une activité anti prolifératif .cette zone est trouvé communément délétée chez les patients atteint des syndromes myélodysplasiques avec délétion 5 q isolée (Stoddart et al ., 2014)

I.3.3.2. La région 5q31.1

La région 5q31.1, de localisation plus centromérique, délétée dans les SMD avec caryotype complexe ou LAM avec del(5q), contient notamment des gènes impliqués dans la croissance (EGR1), et le cycle cellulaire (CDC25C), le gène codant pour l'alpha-caténine 1 (CTNNA1) (Duchmann et al ., 2015). ce segment (CDS) de 970 Ko 5q31.2 est trouvé communément supprimé chez tous les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LAM). (Stoddart et al .,2014).

I.3.4. Physiopathologie de syndrome 5 q-

Des études bpermis de mieux comprendre les mécanismes responsables de phénotype clinique qui caractérise les SMD a del (5q) , ils ont identifié des gènes qui sont supprimé au cours des SMD

I.3.4.1.Le gène RPS14

par l'inhibition très méthodique par shRNA de tous les gènes contenus dans la région minimale délétée, l'équipe de Golub à Boston a montré que l'inactivation partielle d'expression du gène RPS14 reproduit in vitro les caractéristiques cytologiques du syndrome 5q- La restauration à un taux normal de l'expression du gène RPS14 dans les cultures cellulaires de SMD avec syndrome 5q- corrige le défaut d'érythropoïèse. (**Ebert BL et al ., 2008**)

Le gène RPS14 code pour la protéine S14 qui est un composant de la sous unité ribosomal 40S donc le gène RPS14 serait nécessaire pour le traitement du pré ARN 18S.

L'haploinsufisance de RPS14 entraine une accumulation d'espèces de prés ARNr de 30S . avec une diminution de taux d'ARNr de 18s donc une augmentation de rapport 30S/18S.(**Ferreira-Cerca S et al .,2005**)

Comme le RPS14 est indispensable à la biogénèse des ribosomes , une biogénèse altérée du ribosomes due au déficit en RPS14 conduit à une augmentation des protéines ribosomales libres qui se lient à MDM2 un ubiquitine ligase de p 53 ; sa inhibition entraine une accumulation de p53 qui contribue au phénotype appoptotique observé principalement dans la lignée érythroïdes .(**Lohrum et al .,2003**)

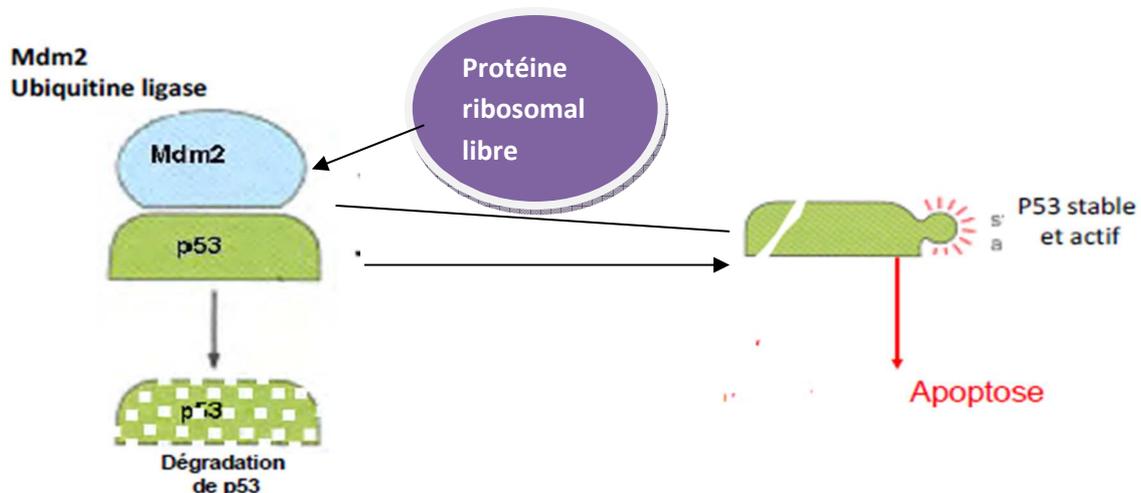


Figure 3 : le rôle de RPS14 dans l'excès d'apoptose au cours de Syndrome 5q-

I.3.4.2. Le gène SPARC

un autre gène est impliqué dans la pathogénèse des SMD ,c'est le gène SPARC (secreted protéines acid and rich in cysteine), est une protéine matricielle qui régule la composition de la matrice extracellulaire ainsi que celle des cellules (prolifération, différenciation, migrationect).(**Bradshaw et al .,2001**) , leur rôle dans la physiopathologie au cours des SMD est encoures méconnue, mais des effets possibles de son haploinsufisance pourrait être une adhésion accrue à une niche de soutien de la moelle osseuse menant à un avantage clonal (**Jung-Hoon Lee et al ., 2018**)

I.3.4.3. L'haploinsufisance de miRNA-145 et miRNA-146

Des études récentes ont démontrée que l'expression de miRNA-145(5q33.1) et miRNA-146 (5q33.3) diminuait chez les patients avec del 5q ce qui entraine une délétion accrue de leur gènes cibles.

Vamey et al ont également trouvé que TIFAB et miRNA-146 sont Co-supprimés chez environ 80% atteints des SMD avec del 5q.

La voie de signalisation en aval des récepteurs du TNF et notamment le gène TRAF 6 dans des CSH est réguler par les 2 miR.

La suppression de TIFAB et miR-146 et l'expression élevé de TRAF6 induit un phénotype myélodysplasique avec anémie neutropénie et thrombocytes avec mégacaryocyte (**Varney ME et al ., 2016**)

I.3.4.4. Le gène EGR1 et APC

Le gène APC est un régulateur essentiel de l' hématopoïèses, il est situé à 5q22.2(en dehors de la CDS) mais il est supprimés chez plus de 95% des patients atteints un délétion 5q (**Qian Z et al .,2008**)

Le gène EGR1 est un gène candidat dans la pathogénie des SMD et des LAM , l'EGR1 est une protéine a doit de zinc nécessaire à la différenciation des précurseurs myéloïdes en monocytes macrophages (**revue française des laboratoires**)

EGR1 et APC sont des acteurs clés dans la progression de SMD avec un délétion 5, ils codent des protéines qui ont une propriété des supresseurs de tumeurs, EGR1 est un régulateur

traductionnel direct de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, y compris TP53, CDKN1A (p21), et PTEN (**Stoddart et al .,2014**).

I.3.4.5. Mutation de TP53 et la progression de la maladie

Il a été récemment montré que des mutations de *TP53* (protéine impliquée dans la machinerie de réparation de l'ADN) étaient plus fréquentes dans les SMD avec délétion 5q et pouvaient précéder la transformation leucémique et induire une résistance au traitement (**Ann Biol Clin .,2016**)

Les données préliminaires présentées lors du Congrès de l'Association européenne d'hématologie de 2018, montraient que La perte de TP53 en tant que telle, combinée à une haplo-insuffisance *EGR1*, a augmenté le taux de développement d'une tumeur myéloïde ils suggère que la perte de TP53 en coopération avec les sources de haplo insuffisance crée un environnement favorable pour le développement de LAM5 (**Jung-Hoon Lee et al ., 2018**)

I-4 Traitements

L'évaluation de l'agressivité du SMD et de son pronostic permet de déterminer le traitement. La prise en charge des SMD de faible risque (en dehors des syndromes 5q-) repose sur les traitements du support, comme les transfusions ou les facteurs de croissance qui ont prouvé leur efficacité sur l'anémie et donnent un avantage de survie (**Park S et al ., 2008**) Pour les syndromes 5q-, le lenalidomide constitue une thérapeutique ciblée particulièrement efficace sur l'anémie (**List et al .,2006**).

A l'inverse, un traitement spécifique est préféré pour traiter les SMD de haut risque (**Larson .,2006**).

Les agents hypométhylants ont montré un gain de survie (**Itzykson et al .,2008**) . D'autres agents sont en cours d'évaluation, comme les inhibiteurs de l'angiogenèse. La greffe de moelle osseuse est également discutable chez les patients les moins âgés, en fonction du pronostique et des autres options thérapeutiques existantes car elle demeure le seul traitement curatif de cette affection.

Les stratégies thérapeutiques en cours de recherche dépendent directement du stade de la maladie. Lors de la transformation leucémique il devient en effet intéressant d'altérer l'inhibition des voies anti-apoptotiques ou les acteurs de résistance à l'apoptose.

Le lenalidomide : est un agent immunomodulateur (ImiD) présentant de nombreuses propriétés biologiques, en particulier la capacité d'inhiber la production de cytokines pro inflammatoires par les monocytes, l'activation du système immunitaire en particulier des cellules T et NK, et l'inhibition de l'angiogenèse (**Bartlett JB et al .,2004**)

Le Vidaza : est un hypométhylant indiqué le traitement des patients présentant : un SMD
Et une leucémie aigue myéloblastique

La 5-azacytidine a obtenu en décembre 2008 une AMM européenne dans les SMD de
risque intermédiaire 2 ou élevé, à la suite d'une étude ayant démontré qu'elle améliorerait la
survie par rapport au traitement conventionnel.(**Zamora-Pérez ., 2015**)

MATERIELES
ET
METHODES

Notre étude a été réalisée au plateau technique de cytogénétique hématologique au laboratoire d'hématologie de l'EHS ELCC, CAC Blida sur des culots congelé de cinq patients.

Le stage s'est déroulé du 1^{er} février au 31 mai 2019.

Le but de notre travail était :

- De réaliser une cytogénétique conventionnelle et moléculaire pour des cas de SMD type syndrome 5q-
- De préciser l'intérêt diagnostique et thérapeutique du syndrome 5q- à travers une étude rétrospective de cas index réalisée dans le service hématologie CAC Blida

I- Matériels

I.1-Matériel biologique

L'étude cytogénétique est faite sur suc médullaire, prélevé par ponction sternale ou iliaque antérieure et transféré dans un tube contenant un milieu de transport (RPMI + héparine).

I.2- Matériel non biologique

✓ Verreries et autres

Il s'agit du matériel de routine utilisé dans les laboratoires de cytogénétique

✓ Appareillage

Il s'agit d'appareillage de routine utilisé dans les laboratoires de cytogénétique

II. Méthodes d'étude

II.1- Prélèvement médullaire

Prélèvement de un à deux ml de suc médullaire par ponction médullaire, puis transférer le suc dans un tube conique 15 ml contenant un milieu de transport (RPMI + héparine). Le tube est rapidement acheminé au laboratoire de cytogénétique pour procéder à la mise en culture.

II.2 -Mise en culture cellulaire

- Faire le comptage des cellules mononuclées dans la moelle. La règle est de mettre 2 millions de cellules par ml de milieu de culture, pour un volume total de 10 ml de RPMI complet.
 - Incrire dans les flasques (nom, prénom, date de jour, techniques : M 24h synchronisation)
 - Mélanger la quantité calculée à mettre dans le flasque avec 10 ml de RPMI complet.
 - Dévisser les bouchons des flasques d'un quart de tour, les mettre dans un plateau en inox désinfecté ; dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂.
 - Mettre 100 µl de synchro A à 16 h le jour même de la culture.
 - ❖ Objectif : faire arrêter les cellules en phase S de cycle cellulaire
 - Mettre 100 µl de synchro B à 8h du lendemain
 - ❖ Objectif : redémarrer le cycle cellulaire
 - Remettre à l'étuve pendant 6 h
 - Mettre 60 µl de colchicine pendant 30 min
 - ❖ Objectif : bloquer les cellules en métaphase ou en pré métaphase
- A la fin du temps de colchicine, faire sortir les flasques de l'étuve

II.3- Sortie de culture et étalement cellulaire

- Transvaser le contenu des flasques dans des tubes coniques 15 ml après avoir inscrit les renseignements du patient
- Centrifuger les tubes pendant 8 minutes à 1300 tours
- Enlever le surnageant (2/3 surnageant, 1/3 culot cellulaire)
- Choc hypotonique : avec du KCL préchauffé à 37°C

Le choc hypotonique se réalise en deux étapes :

- ✓ la 1^{ère} partie avec 1 ml de KCL : homogénéiser le culot cellulaire doucement et après faire progressivement le choc hypotonique
- ✓ la 2^{ème} partie : rajouter du KCL jusqu'à 12 CC et procéder à des aspirations refoulements de ce mélange sur la paroi interne du tube conique, plusieurs fois.
- Laisser reposer sans bouchons dans l'étuve à 37°C pendant 25 minutes
- Préfixation
 - Préparer le fixateur qui contient 1/3 d'acide acétique et 2/3 de méthanol
 - Faire sortir les tubes de l'étuve, une fois le temps du choc terminé.
 - Ajouter 01 ml de solution de fixation
 - Mélanger doucement puis refermer
 - Centrifuger les tubes à 1300 tours pendant 8 minutes
 - Enlever surnageant (garder 1/3 de culot et 2/3 de surnageant).
- Fixation
 - Rajouter 01 ml de fixateur et mélanger doucement
 - Compléter jusqu'à 08 ml avec le fixateur
 - Mélanger délicatement
 - Centrifuger 1300 tours pendant 8 minutes
 - Eliminer le surnageant (garder 1/3 de culot et 2/3 de surnageant).

Refaire cette fixation deux à trois fois maximum pour avoir un culot cellulaire claire

Après l'obtention du culot cellulaire claire garder le à 4°C.

- Etalement cellulaire sur lames

Réaliser des préparations cellulaire (noyaux et mitoses) sur lames, à partir de culot cellulaire fixé ; à partir du lendemain de la sortie de culture sauf en cas d'urgence

Mode opératoire

Centrifuger les tubes 1300 tours pendant 8 min

- Eliminer le surnageant
- Rajouter 2/3 de fixateur pour un 1/3 de culot
- Mélanger délicatement avec une pipette pasteur
- Préparer les lames (inscrire le nom, prénom, type de culture, la date de culture et la technique

NB : si les lames pour caryotype mettre le temps de dénaturation (R12min 10s par exemple).

Si les lames pour FISH mettre la sonde (5q)

Humidifier les lames en les plaçant face à la vapeur du bain marie

- Retirer à l'aide d'une pipette la suspension cellulaire puis étaler une ou deux gouttes sur la lame.
- Si les lames sont pour FISH, verser une goutte du culot sur la lame au centre et laisser sécher à l'air libre, puis mettre à l'étuve sèche à 37° pendant une nuit (facultatif)
- Si les lames sont pour caryotype laisser tomber sur la lame 1 à 2 gouttes aux deux extrémités et laisser sécher les lames 45 min avant la dénaturation
- Vérifier la qualité de l'étalement si besoin diluer ou concentrer le culot.

II.4 -Caryotype

Principe :

des bandes R : technique de marquage qui révèle des bandes sur les chromosomes d'une mitose. Les bandes sont obtenues grâce à l'action de la température (87°c) et la solution saline (tampon phosphate). Les chromosomes sont colorés au Giemsa, qui fait apparaître des motifs de bandes sur les chromosomes avec une résolution de 400 à 650 bandes par lot haploïde de chromosomes.

Objectif :

Les chromosomes et leurs bandes sont examinés au microscope à la recherche d'anomalies, les chromosomes sont photographiés et appariés en vue de leur examen (caryotype).

- Chauffer le bain marie avec une solution tampon NH_2PO_4 jusqu'à 87°C (le bain marie affiche 90°), Dès que cette température est atteinte, commencer la manipulation
 - Plonger la lame dans de l'eau distillée stérile pendant 05 minutes (objectif : réhydratation) à température ambiante
 - Retirer la lame et la plonger dans le tampon phosphate pendant 12 min10s : (objectif : dénaturation)
- Retirer les lames et plonger les dans un bac d'eau distillée à 18°C (objectif arrêter le processus de dénaturation).
- Egoutter puis plonger les lames dans le bac à coloration contenant la solution Giemsa tamponnée à 4% pendant 5 min.
- Rincer sous l'eau de robinet
- Laisser sécher pendant 30 au 45 min

Observer au microscope

L'observation se fait au microscope à lumière blanche couplé à un logiciel de traitement d'image et d'archivage de dossier

La prise d'au moins 20 mitoses par patient est nécessaire pour réaliser un caryotype.

II.5 Hybridation in situ fluorescente : FISH

Principe

La méthode FISH permet de détecter des séquences de 100 kb à 1 Mb. Cette technique implique l'hybridation de sondes de séquences d'ADN spécifiques couplées à un marqueur fluorescent avec de l'ADN du patient, puis la détection ultérieure au microscope de la présence ou de l'absence, du nombre anormal d'exemplaires ou d'emplacements pathologiques d'un signal de fluorescence donné.

Pour notre travail ; la sonde spécifique pour la recherche de la délétion 5q est la sonde *EGR1* située en 5q31

Objectif

Rechercher une délétion 5q de façon précise (au sein d'un caryotype complexe par exemple) et nécessité d'une quantification du clone avec délétion 5q. La FISH à l'aide d'une

sonde localisée spécifiquement dans la région minimale délétée avec contrôle interne (*EGRI*) est particulièrement indiquée dans ce contexte, d'une part pour mettre en évidence le clone au diagnostic, et d'autre part, pour le quantifier lors du suivi en l'absence de méthode de biologie moléculaire

Protocole

✓ **Jour 1 :**

➤ **Prétraitement des lames : à l'abri de la lumière**

- Placer les lames dans des bacs contenant 2 SSC (20 ml SSC complété à 1000 ml d'eau distillée : dilution 1/10^{ème}) pendant 2 minutes.
- Placer les lames dans un fixateur alcool (éthanol) à (70% ,85%,100%) 2 min dans chaque bain à température ambiante.
- Sécher à l'air libre.

➤ **Dénaturation à l'abri de la lumière**

- Retirer la sonde du congélateur -20 °c et la préchauffer à température ambiante
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois
- Aspirer 10 microlitres de la sonde à appliquer et mettre dans un tube Eppendorf
- Poser la lame étalée du malade + tube Eppendorf comportant 10 microL de la sonde sur la plaque préchauffée à 37°C pendant 5 min
- Déposer la sonde sur la lame du malade
- Recouvrir avec une lamelle
- Se débarrasser des bulles d'air
- Placer la lame dans le Thermobrite à 75°C pendant 2 minutes (dénaturation)
- Hybridation : Placer les lames à 37°C (programmer l'appareil) pendant une nuit.

✓ **Jour2 : lavage post hybridation**

- Laver la lame dans du tampon 0.4 SSC (PH 7) à 72 °c pendant 2 min
- Egoutter et mettre la lame dans du tampon 2 SSC pendant 30 secondes à température ambiante (TA)
- Laver les lames dans la solution de Tween 0.05% pendant 30 secondes
- Sécher les lames à températures ambiante
- Appliquer 10 microlitre de DAPI sur chaque échantillon.
- Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles d'air en appliquant une petite pression sur la lamelle

- Laisser pendant au moins 10 min à l'abri de la lumière et à 4 °C
 - Observer au microscope

La lecture se fait au microscope à fluorescence et à l'abri de la lumière.

-

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1-Résultats

Durant notre séjour en stage pratique :

Nous avons réalisé au niveau du plateau de cytogénétique du laboratoire du service Hématologie, EHS ELCC, Blida, sur des culots cellulaires congelés de patients atteints de syndrome myélodysplasique, cinq (5) manipulations de caryotype et de FISH.

Nous exposons les résultats de ces cinq cas

III.1 - Données des patients

Tableau II : Données épidémiologiques et hématologiques des patients

Paramètres	Cas n° 1	Cas n° 2	Cas n° 3	Cas n° 4	Cas n° 5	Données normales de l'hémogramme
Sexe	M	F	F	F	F	-
Age	75	68	72	73	70	-
Origine	Djelfa	Ain Defla	Ain Defla	Blida	Zeralda	-
GB (elt/ μ l)	1870	7320	6500	37170	2720	4000-10000/ μ l.
GR (10^6 / μ L)	2.9	1.81	2.28	3.84	2.84	4,2 à 5,7
Hb (g/dl)	7.2	6.2	6.7	7.9	6.2	12 à 16 g/dl
VGM (fl)	104,1	110.4	93.4	66.1	81.5	80 et 100 fl
Plaquettes (10^3 / μ L)	66	342	153	183	121	150 à 450
Traitement	Revlimid	Revlimid	Revlimid	Vidaza	Vidaza	-
Etat	Vivant	Vivante	Vivante	Vivante	Vivante	-

Nous présentons ci-dessous pour chaque cas :

- Les résultats de l'hémogramme
- Les données du frottis sanguin
- Les données du myélogramme
- Les données iconographiques des examens cytogénétiques : caryotype + FISH

➤ Cas N° 1

Le diagnostic de syndrome myélodysplasique a été posé le 01/02/2017

- ✓ **L'hémogramme** : objective une leucopénie + une anémie+ une thrombopénie (pancytopénie)
- ✓ **Données du frottis sanguin** : présence de macrocytes de microcytes et de globules rouges hypochromes et normochromes.
- ✓ **Données du myélogramme** :

Moelle cellulaire avec mégacaryocytes présents et dysplasiques (dysmégacaryopoïèse) : mégacaryocytes hypo lobés (70%), micro mégacaryocytes. Le pourcentage des blastes dans la moelle osseuse est de 3 %

- ✓ **Données cytogénétiques**



Figure4 : FISH : image de del (5q) (les cellules présenter un signal rouge et deux signaux verts (1R,2V) donc ils comportent une délétion hémizygotique de 5q)

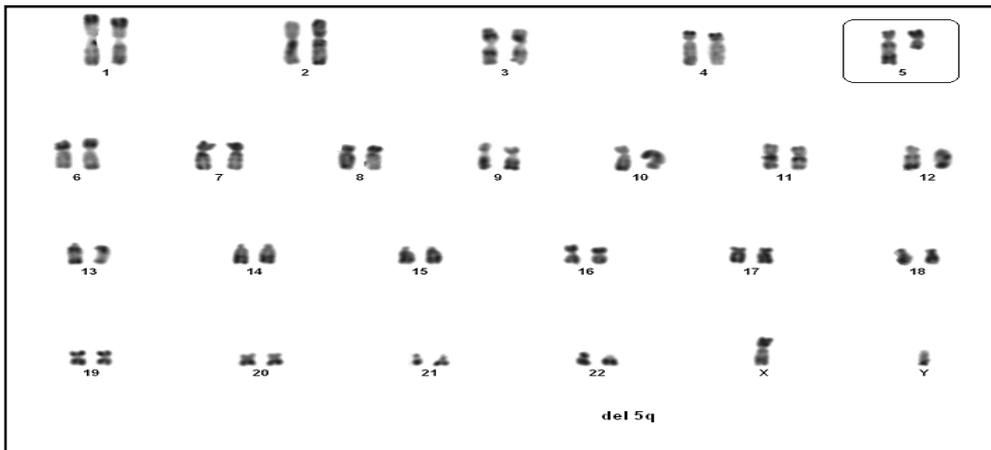


Figure 5 : Caryotype : Caryotype (bandes RHG) montrant la présence d'un chromosome 5 apparemment délété

➤ **Cas n° 2**

Le diagnostic de syndrome myélodysplasique a été posé le 06/06/2018

- ✓ **L'hémogramme** : objective une anémie macrocytaire
- ✓ **Données du frottis sanguin** : présence de normocytes et de macrocytes
- ✓ **Données du myélogramme** : L'étude du frottis médullaire montre une moelle très riche, une dysérythropoïèse et absence de blastes. Micromégacaryocytes avec noyaux hypolobés.
- ✓ **Données cytogénétiques**

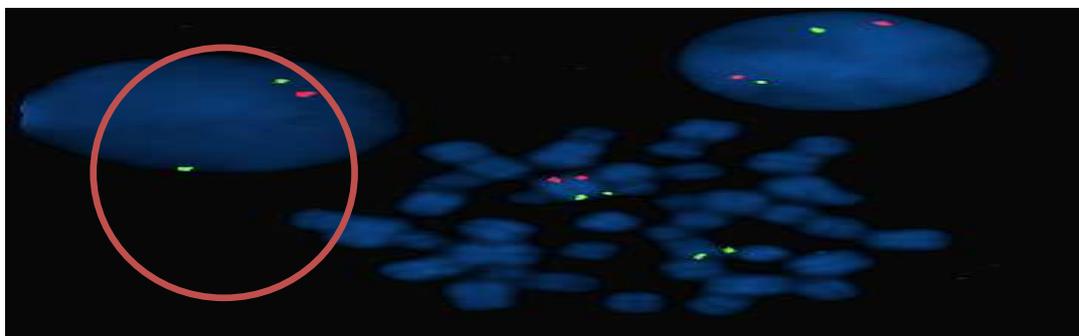


Figure 6 : FISH : image de del (5q) le noyau en cercle rouge présenter un signal rouge et deux signaux verts

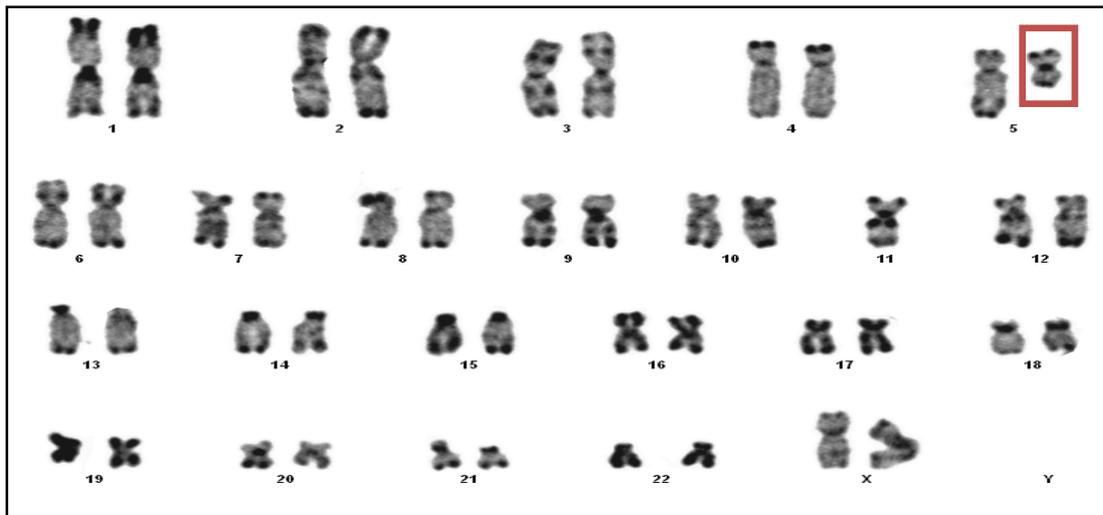


Figure7 : Caryotype : image de del(5q) pour le 2eme patient

➤ Cas n° 3

Le diagnostic de syndrome myélodysplasique a été posé le 13 Septembre 2017

- ✓ **L'hémogramme** : objective une anémie normocytaire.
- ✓ **Frottis sanguin** : présence de normocytes

✓ Données du myélogramme :

L'étude du frottis médullaire montre une moelle très riche, une dysérythropoïèse et absence de blastes. Micromégacaryocytes avec noyaux hypolobés.

✓ Données cytogénétiques

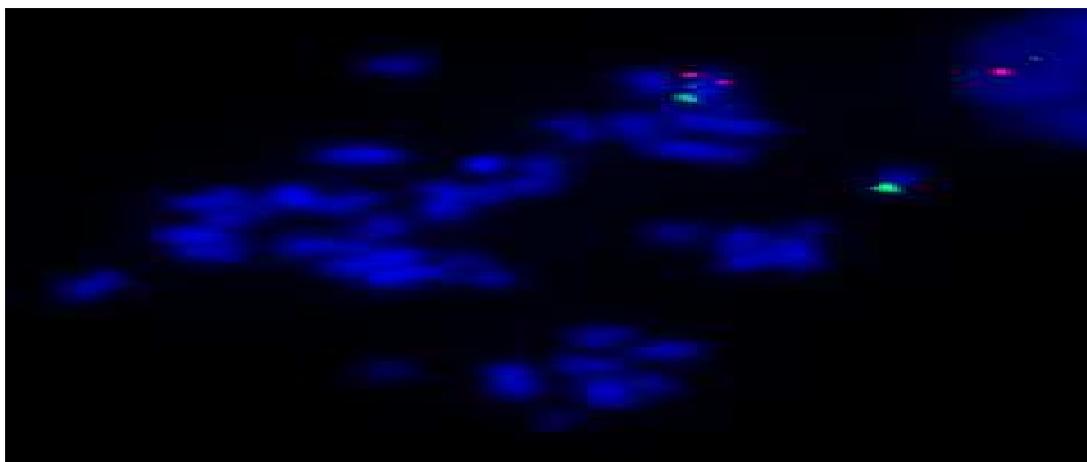


Figure8 : FISH : image de del (5q) de 3eme patient

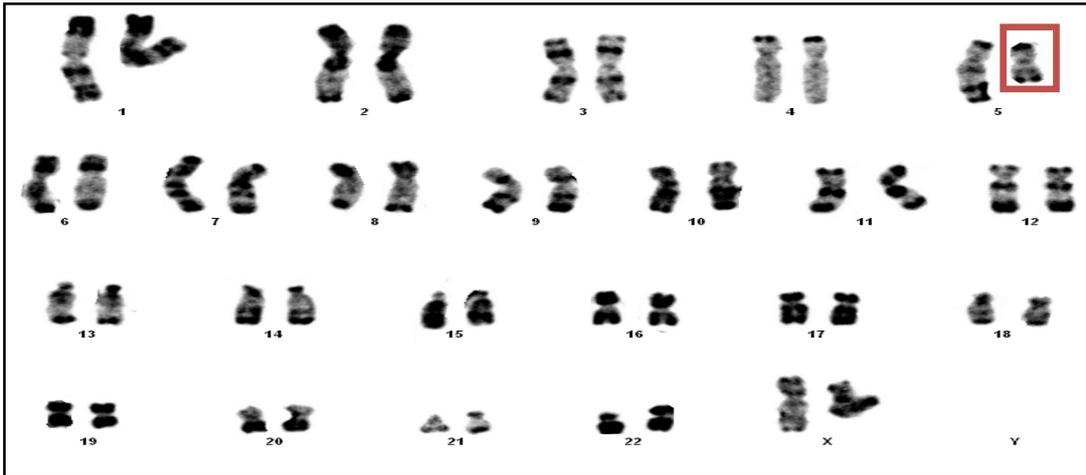


Figure9 : Caryotype : image de del(5q) de 3eme patient

➤ **Cas n° 4**

Le diagnostic de syndrome myélodysplasique a été posé le 7 novembre 2018

✓ **L'hémogramme** : objective une hyperleucocytose nette + anémie microcytaire

✓ **Données du frottis sanguin** : présence de nombreux microcytes + blastes = 7%

✓ **Données du myélogramme** :

L'étude du frottis médullaire montre une moelle très riche, une dysérythropoïèse et présence de blastes de type monoblastique. MDS del(5q) transformé en LAM

✓ **Données cytogénétiques**

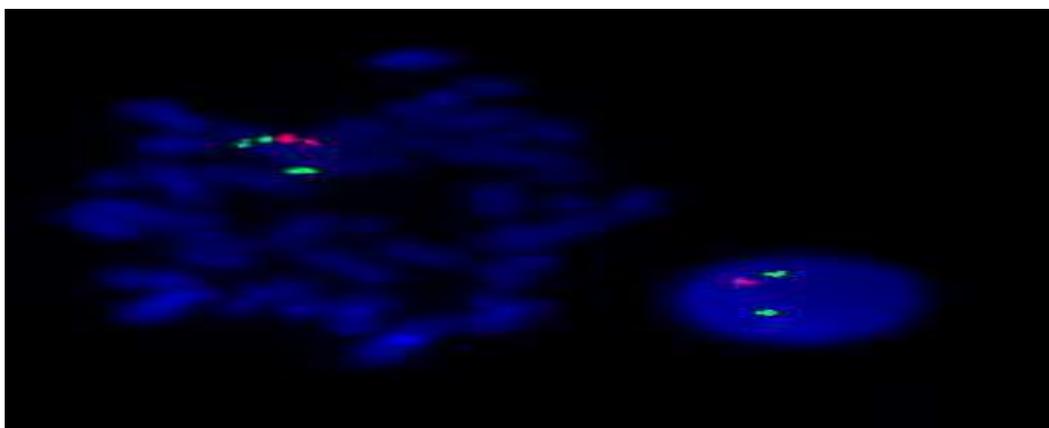


Figure10 : FISH : image de del(5q) de 4eme patient

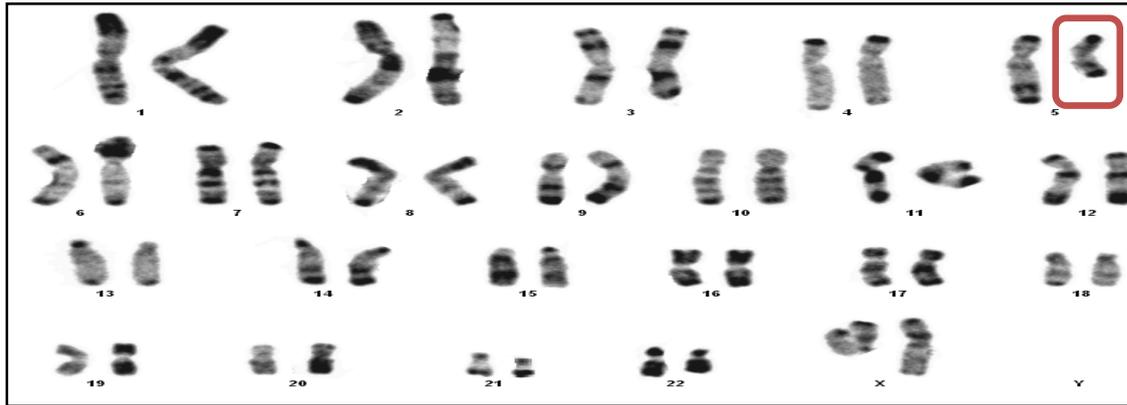


Figure11 : Caryotype : image del(5q) de 4eme patient

➤ **Cas n° 5**

Le diagnostic de syndrome myélodysplasique a été posé le 11 novembre 2018.

✓ **L'hémogramme** : objective une leucopénie + une anémie+ une thrombopénie (pancytopénie)

✓ **Données du frottis sanguin** : présence de normocytes

✓ **Données du myélogramme** :

moelle très cellulaire, un excès d'érythroblastes (%) présence de myéloblastes (13%) et des mégacaryocytes monolobés : MDS transformé en LAM.

✓ **Données cytogénétiques**

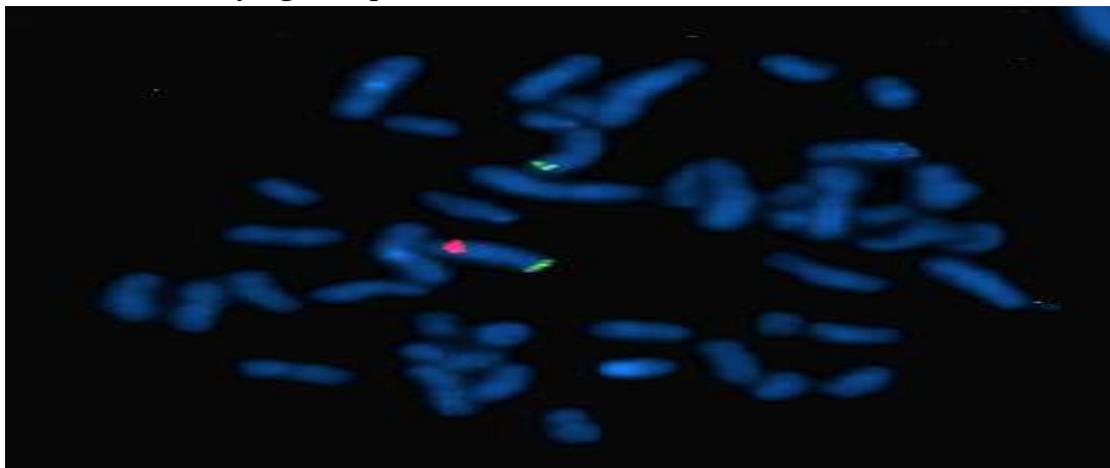


Figure12 : FISH : image de del(5q) de 5eme patient

Echec de caryotype

Caryotype : échec de culture

III.2-Discussion

Dans notre série l'âge médian des patients est de 70.5 ans (68-75) ; il existe une nette prédominance féminine (4 femmes vs 1 homme).

1-selon l'hémogramme

Les SMD sont caractérisés par des anomalies qualitatives et quantitatives portant sur les trois lignées sanguines.

Le signe le plus fréquent est une anémie qui est présente au moment du diagnostic dans plus de 90% des cas ; c'est une anémie en règle macrocytaire, parfois normocytaire.

Une thrombopénie ou une neutropénie peuvent être également observées, elles sont un mode de révélation beaucoup plus rare.

Dans l'étude qui a été réalisée dans notre travail, l'anémie est présente dans la totalité des cas ; elle est macrocytaire dans 2 cas, normocytaire dans 2 cas et microcytaire dans 1 cas.

2- Selon le frottis sanguin

La confection d'un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) est indispensable pour évaluer un syndrome myélodysplasique.

Les anomalies qualitatives des cellules sanguines et les cytopénies peuvent toucher toutes les lignées : érythrocytaires, plaquettaires et granuleuses. L'anomalie la plus fréquente est une macrocytose, c'est-à-dire une augmentation du diamètre apparent de l'hématie (globule rouge), est fréquemment observée sur le frottis et confirme les données de l'automate sur l'augmentation du volume globulaire moyen (VGM).

Les anomalies touchant les cellules granuleuses portent essentiellement sur l'hypogranulation de ces cellules

Dans notre étude, Le frottis sanguin a été réalisé chez tous les malades, il a confirmé les anomalies notées sur l'hémogramme pour les patients n° 1,2 et 3.

Il a montré aussi la présence de blastes dans 1 cas

3-Selon le myélogramme

Le myélogramme est aussi un examen clé dans l'exploration d'un syndrome myélodysplasique. Il met en évidence dans les MDS des anomalies caractéristiques des trois lignées médullaires (cellularité importante contrastant avec un sang périphérique pauvre en cellules ; modifications de la taille et de la forme du noyau des mégacaryocytes). Il met surtout en évidence la présence de leucoblastes, traduisant souvent une évolution péjorative du MDS vers une leucémie aigüe.

Dans notre travail, Le myélogramme a mis en évidence les anomalies décrites dans ces syndromes : cellularité importante (tous les cas), dysplasie érythroblastique (3 cas), dysmegacaryopoïèse avec micromégacaryocytes (3 cas), mégacaryocytes monolobés (4 cas) , et la présence de blastes (2 cas) signant la transformation du syndrome vers une leucémie aigüe.

Il a permis la réalisation du caryotype.

4- Selon le caryotype

Le caryotype est un examen essentiel pour l'évaluation d'un syndrome myélodysplasique. Dans le syndrome 5q-, il précise le caractère isolé ou associé à une autre anomalie en dehors de la del(7q)

Dans notre travail, il a retrouvé dans les cinq cas la del (5q) isolée qui caractérise le syndrome 5q-. Il permet une analyse pronostique : en effet le syndrome 5q- (isolé) est réputé de bon pronostique.

5- Selon l'hybridation in situ en fluorescence (FISH)

La FISH est une technique ciblée qui complète le caryotype surtout en cas d'échec de ce dernier ou de délétion interstitielle de petite taille cryptique au caryotype.

Les données de la FISH chez tous les patients étudiés dans ce travail avec la sonde EGR1 confirment celles qui ont été observées par l'étude des caryotypes de ces patients.

6- Synthèse

Le premier but de notre travail était de réaliser une étude cytogénétique conventionnelle et moléculaire sur des culots cellulaires congelés dans 5 cas de syndrome myélodysplasique type syndrome 5q-

Nous avons atteint ce premier objectif par la reproduction des mêmes résultats que ceux obtenus préalablement chez ces 5 patients par l'équipe du plateau de cytogénétique hématologique de l'EHS Blida.

Etude rétrospective

1. Introduction

Pour préciser l'intérêt pronostique et thérapeutique du syndrome 5q-, nous avons entrepris une étude rétrospective de cas index de patients porteurs de del(5q)/monosomie 5 .

Elle a été réalisée dans le service hématologie CAC Blida

Le recueil des données s'est fait à partir des dossiers médicaux de chaque patient pour lequel le diagnostic a été porté les caractéristiques de chaque patient (âge, sexe,), la présentation clinique (symptômes de découverte), les éléments du diagnostic biologique, l'ancienneté présumée de la maladie si possible, des éventuels antécédents de chimiothérapie ou radiothérapie ont été précisés.

2. Patients

19 patients suivis pour SMD avec del(5q) à Blida ont été inclus dans cette étude et recrutés parmi 100 syndromes myélodysplasiques diagnostiqués dans ce service .

3. Méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective sur dossier ayant inclus des patients atteints de SMD avec del(5q) et qui disposaient d'un examen cytogénétique par FISH et caryotype.

L'analyse des cas de SMD avec del(5q) est développé dans cette étude par la précision des aspects clinique, biologique, cytologique et pronostique.

4. Résultats

Le motif de consultation a été une anémie dans 89% des cas, une autre cytopénie dans 11% des cas.

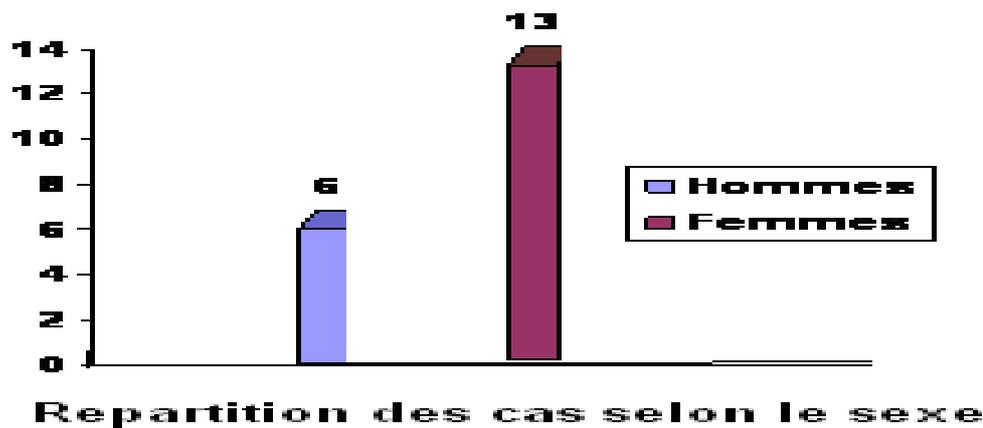
Le délai diagnostique était de 8 mois.

Il existait une comorbidité de type de :

- Hypertension artérielle dans 5 cas
- Diabète non insulino-dépendant dans 3 cas
- Dysthyroïdie dans 2 cas

- Insuffisance rénale dans 1 cas
- Lymphome de Hodgkin dans un cas.

Les 19 patients sont repartis en 13 femmes et 6 hommes soit un **Sex ratio** de 0,46



L'âge moyen était de 67 ans (45-85)

5. A l'étude de l'hémogramme

- Le taux d'hémoglobine était inférieur 8g /dl chez tous les patients.
- L'anémie était macrocytaire chez 42% des patients.
- Une neutropénie (GB < 1600 / μ l) était notée chez 96,2% des patients.
- Une thrombopénie sévère (plaquettes < 50000/ μ L était présente chez 23,6% des patients).
- Une bicytopénie était présente chez 42% des patients.
- Une pancytopénie était notée chez 23,6% des patients.

6-A l'étude du frottis sanguin

- Une macrocytose a été notée chez tous les patients.
- Des polynucléaires neutrophiles hypo segmentés ont été retrouvés chez 47% des patients
- Des PN hypersegmentés dans 11% des cas

- Des PN hypogranulés ont été retrouvés chez 37% des patients
- Des PN avec anomalies de type pseudo-pelgers dans 37% des cas
- Des macrothrombocytes dans 100% des cas

7-A l'étude du myélogramme

- Dysmegacaryopoïèse dans 95%
- Dysgranulopoïèse = 47%
- Dysérythropoïèse = 89%
- Anomalies Multi lignées = 94,7%
- Blastes médullaires :
 - o - < 5% = 26%
 - o (5-10%) = 53%
 - o (11- 19%) = 21%
- Coloration de Perls = Ring Sidéroblastes (RS) :
 - o > 15% = 16%
 - o > 5 < 15 % = 16%

8-Au Caryotype :

La del (5)(q)(31.1) = 16 pts :

- Isolée = 43%
- Associée à 02 anomalies = 12,5%
- Complexe à 03 anomalies = 12,5%
- Complexe > 3 = 31,2%
- 1 échec pour une associée en FISH

La monosomie 5 complexe > 3 anomalies : 3 cas

9-Par FISH

la del (5)(q31.1) = 17 pts (17%) :

- isolée = 10 cas (59%)
- associée à 1 anomalie = 5 cas (29%)
- associée à 2 anomalies = 2 cas (12%)
- monosomie 5 (-5) = 2 cas:

Par caryotype + FISH

- del(5q) isolée/monosomie 5 : 11 cas (58%)
- del(5q) associée/monosomie 5 : 8 cas (42%)

Classification pronostique IPSS

- Favorable = 37%
- Intermédiaire = 10%
- Défavorable = 53%

Classification pronostique IPSS-R

- Bon = 53%
- Mauvais = 16%
- Très mauvais = 31,5%

Traitement

- Support transfusionnel = 17 pts ;
 - EPO = 4 pts
- Chélation du fer = 06 pts
- Lénalidomide = 04 pts
- Aracytine faible dose = 1 pt, 3 +7 =1 pt
- Azacitidine = 5 pts ;

Devenir :

Médiane de survie del(5q) isolée : 80 mois

Taux de transformation en leucémie aigue 9%

Médiane de survie del(5q) associée : 7 à 40 mois

Taux de transformation en leucémie aigue : 16,3%

- Médiane de survie : 6 à 43 mois
- Décès : 100%

Discussion

Dans notre étude :

- La del 5q /-5 représente 19% de l'ensemble des SMD, elle est isolée dans 58 % des cas et associée à des anomalies cytogénétiques additionnelles dans 42 % des cas, ce qui rejoint les données de la littérature.
- Le pronostic de la del(5q) isolée est de loin meilleur (médiane de survie = 80 mois) avec un taux de transformation en leucémie aigue inférieur à 10%.
- Les del(5q) associées à d'autres anomalies cytogénétiques ont des taux de survie médianes qui s'étalent de 7 mois (caryotypes complexes) à 40 mois dans les cas d'associations d'anomalies additionnelles inférieures à 3. Le taux de transformations en leucémie aigüe des del(5q) associées est très important comme cela a été relevé dans la littérature.
- Pour le traitement : il est essentiellement symptomatique (transfusions sanguines pour lutter contre l'anémie quasi constante dans cette pathologie).
- Le traitement à visée physiopathologique a été limité à quelques patients en raison de son cout prohibitif ; de ce fait des conclusions ne peuvent pas être portées pour cette série limitée.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le syndrome 5q- est un syndrome myélodysplasique caractérisé par une délétion (5)(q31q33) isolée ou associée à une anomalie autre que del7q. A travers ce travail, nous avons recherché les intérêts diagnostique et thérapeutique d'un syndrome 5q-

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments clinique, cytologique et cytogénétique.

Le but de notre travail était :

- De réaliser une cytogénétique conventionnelle et moléculaire pour des cas de MDS type syndrome 5q-
- De préciser l'intérêt diagnostique et thérapeutique du syndrome 5q- à travers une étude rétrospective de cas index réalisée au niveau du plateau technique de cytogénétique hématologique au laboratoire d'hématologie de l'EHS ELCC, CAC Blida.

A l'issue de notre travail, nous avons atteint le premier objectif par la reproduction des mêmes résultats que ceux obtenus préalablement chez ces 5 patients par l'équipe du plateau de cytogénétique hématologique de l'EHS Blida et montré que le diagnostic de syndrome 5q- est essentiel pour la classification à visée thérapeutique.

Nous avons aussi montré que le pronostic de la del(5q) isolée est de loin meilleur (médiane de survie = 80 mois) avec un taux de transformation en leucémie aigüe inférieur à 10%, alors que les del(5q) associées à d'autres anomalies cytogénétiques ont des taux de survie médianes qui s'étalent de 7 mois (caryotypes complexes) à 40 mois dans les cas d'associations d'anomalies additionnelles inférieures à 3 et que le taux de transformations en leucémie aigüe des del(5q) associées est très important comme cela a été relevé dans la littérature.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG.2004** . The evolution of thalidomide and its ImiD derivatives as anticancer agents. *Net Rev cancer* 4 : 314-22.
2. **Belakhal S.** (1995-2005) .Approche épidémiologique des syndromes myélodysplasiques en Algérie .travail coopératif et multicentrique SAHTS ; 3ème congrès de la SFH..
3. **Boulwood J, Lewis S, Wainscoat JS .1994.** The 5q-syndrome .*Blood* . 84 : 3253-60.
4. **Bradshaw AD, Sage EH. SPARC.2001.** a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 1.107(9):1049-1054.
5. **Claessens Y-E, Bouscary D, Dupont J-M-.2002.** In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood* . 99 : 1594-601.
6. **Clemence Roux, Louise Roulin.2016.** Syndrome 5q- : caractéristiques hématologiques, physiopathologie et traitement. *Hématologie*. vol. 22 n8 4, 288-296
7. **Martinaud.C , S. Ponsa, G. Ménard, O. Gisserot, J.-P. de Jaureguiberry, P. Brisou .2011.** Syndromes myélodysplasiques érythroblastopéniques. *La Revue de médecine interne* .32 ; 33–38
8. **Cory S, Adams JM .2002.** The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* ; 2: 647-56.
9. **Rose C, Cambier N, Mahieu M, Ernst O .2001.** Transfusion clinique et biologique, Elsevier
10. **Ebert BL, Pretz J, Bosco J. 2008.** Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* .451 : 335-9.

11. **Faderl S, Kantarjian HM .2004.** Novel therapies for myelodysplastic syndromes. *Cancer* .101(2):226–41
12. **Fenaux P .1996.** Myelodysplastic syndromes. *Hematol Cell Ther* .38:363–80
13. **Fenaux P .2004.** Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin Hematol* .41(2):6–12 .
14. **Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A.2012.** Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* . 119 : 1532-42.
15. **G Canu, G Atallah, JP Claudel, D Champagna -** Archives des maladies, 1993 – Huveaux
16. **Gyan E, Frisan E, Beyne-Rauzy O.2008.** Spontaneous and fas-induced apoptosis of low-grade MDS erythroid precursors involves the endoplasmic reticulum. *Leukemia* . 10 :10.
17. **Harris NL, Jaffe ES, Diebold J.1997.**World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues : report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia . 17 : 3835-49.
18. **Hellstrom-Lindberg E, Cazzola M .2008.**The Role of JAK2 Mutations in RARS and Other MDS, *Hematology*. *Am Soc Hematol Educ Program* . 15:52-59.
19. **Itzykson R, Gardin C, Fenaux P .2008.** Meeting report: myelodysplastic syndormes at ASH 2007. *Leukemia*. 22:893-7
20. **Jung-hoon Lee, Alan List and David A. Sallman . 2018**
Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes with deletion 5q
21. **Junqueira, Carneiro.2005.** Basic Histology, Text and Atlas.McGraw-Hill Companies.

22. **Lacombea.** .2009. Physiopathologie des syndromes myélodysplasiques . revue fronchofone
Des laboratoires ; 413 :31-37
23. **Lohrum MA, Ludwig RL, Kubbutat MH, Hanlon M, Vousden KH.2003.**
Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* .3(6):577-587.
24. **Marc Maynadié.2016 .** Révision de la classification des syndromes myéloprolifératifs selon l’OMS en 2016 . REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - N°492 ,25-28
25. **Duchmann M , Fenaux P , Cluzeau T.2015.** Prise en charge des myélodysplasies.
Bull Cancer . p12
26. **M Cheminant, R Delarue** - La Revue de médecine interne, 2013 – Elsevier
27. **Michaela Fontenaya,, Olivier Kosmidera, Emilie Frisana, Sandrine Ettoua, Catherine ,Parker JE, Mufti GJ, Rasool F,Mijovic A,Devereux S, Pagliuca A.2000.** The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplasticsyndormes and actue myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* . 96:3932-8.
28. **O Beyne-Rauzy, G Laurent,** 2007.D Adoue - La Presse Médicale, Elsevier
29. **O. Beyne-Rauzy .2012.** Les syndromes myélodysplasiques. La Revue de médecine interne .33S A21–A23
30. **O. Fain, T. Braun, J. Stirnemann, P. Fenaux.** 2001.Manifestations systémiques et auto-immunes des syndromes myélodysplasiques . La Revue de médecine interne . 552–559
31. **Okada H, Mak TW.2004.** Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* .4: 592-603.

32. **Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A.** 2000. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* .96(12):3932–8.

33. **Pedersen-Bjergaard J, Pedersen M, Roulston D, Philip P.**1995.

Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia.

Blood .; 86 :3542-52.

34. **RK Patient, JD McGhee** .2002. *Current opinion in genetics & development*, Elsevier

35. **Pagon R, Bird T.**1997-2006. X-Linked Sideroblastic Anemia and Ataxia In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle.

36. **SH Orkin, LI Zon** .2008. *Cell*, Elsevier

37. **Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid OS, Eaves AC, Eaves CJ.**1992. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood* . 80 : 2513-21 .

38. **Van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D** .1985. Tricot G. The 5q-anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* . 17 : 189-255.

39. **Varney ME, Choi K, Bolanos L, et al.**2016 Epistasis between TIFAB and miR-146a: neighboring genes in del(5q) myelodysplastic syndrome. *Leukemia* . 31:491.

40. **V. Gelsi-Boyer, N. Vey.**2006. Avancées dans la prise en charge des syndromes myélodysplasiques Recent advances in the treatment of myelodysplastic syndromes . *La Revue de médecine interne* .27 ; 600–609

41. **Virginie Eclache** .2014. Une revue sur la place de l'épigénétique dans les syndromes myélodysplasiques. *Hématologie* .vol. 20 n8 5,248-249

42. **Woll PS, Kjallquist U, Chowdhury O 2014.** Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell* . 25 : 794-808.

ANNEXES

ANNEXE MATERIELES ET METHODES

✓ **ANNEXE 1 : VARRERIES ET AUTRE**



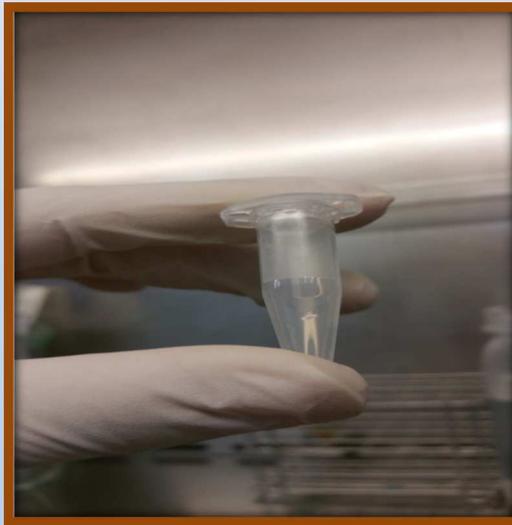
flasque



Kit de prélèvement



seringue



ependorf



Tube conique



Micro pipettes



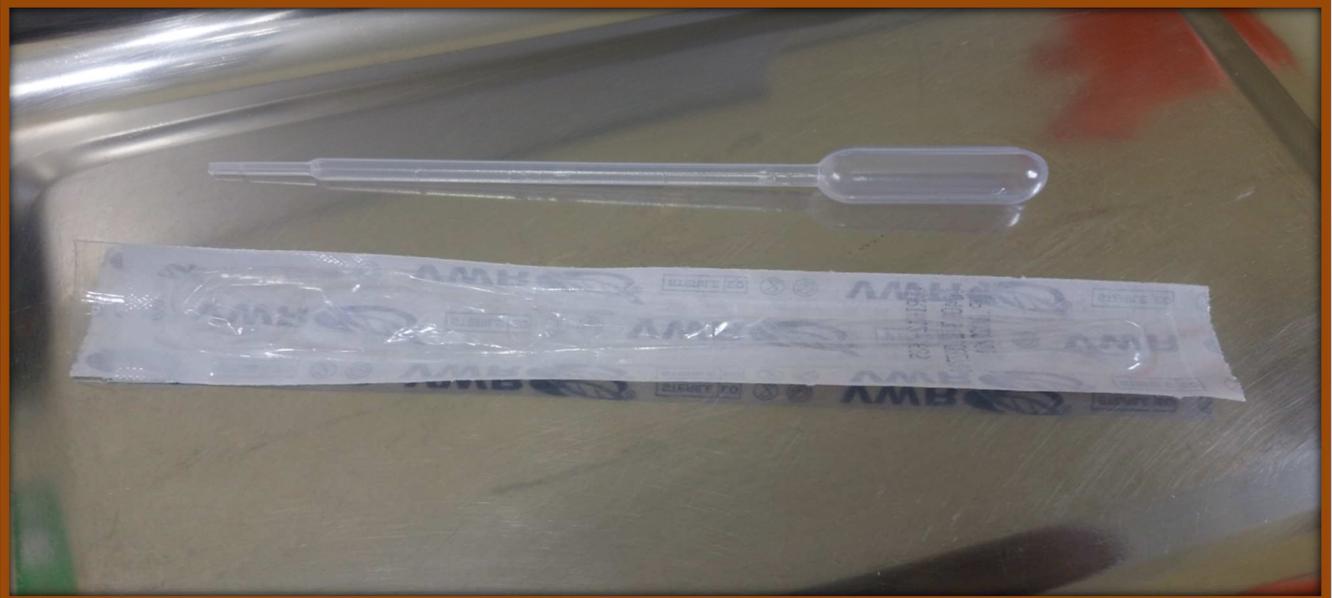
Haricot



plateau



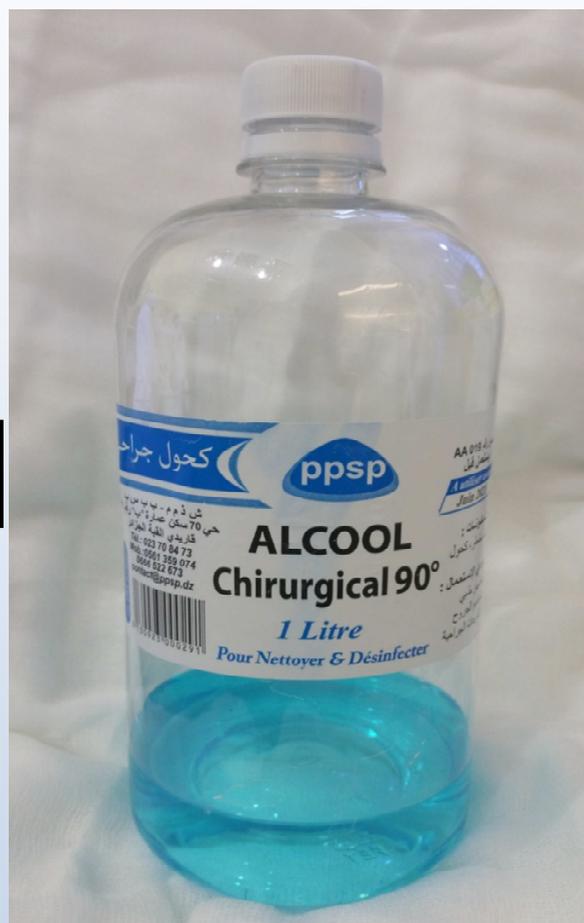
Trocart pour moelle



pipette



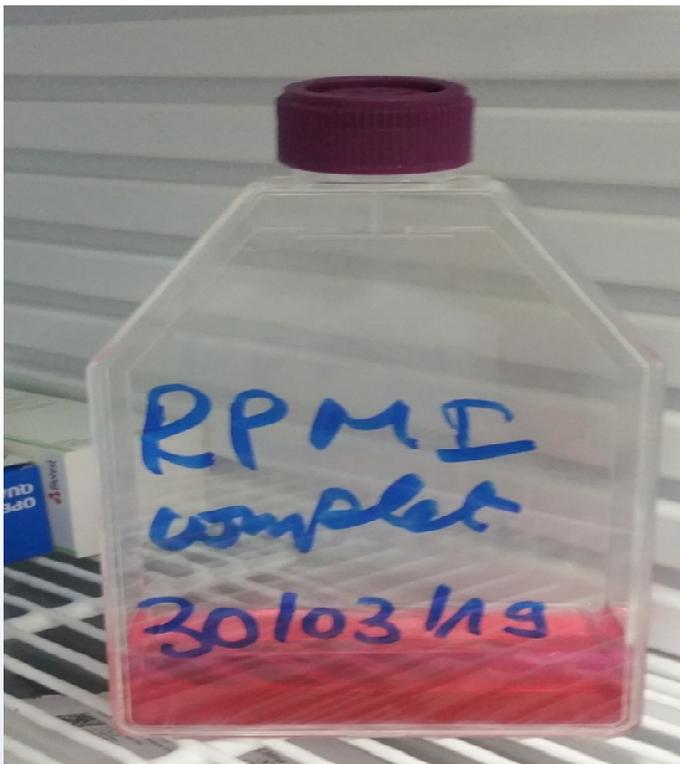
méthanol



alcool



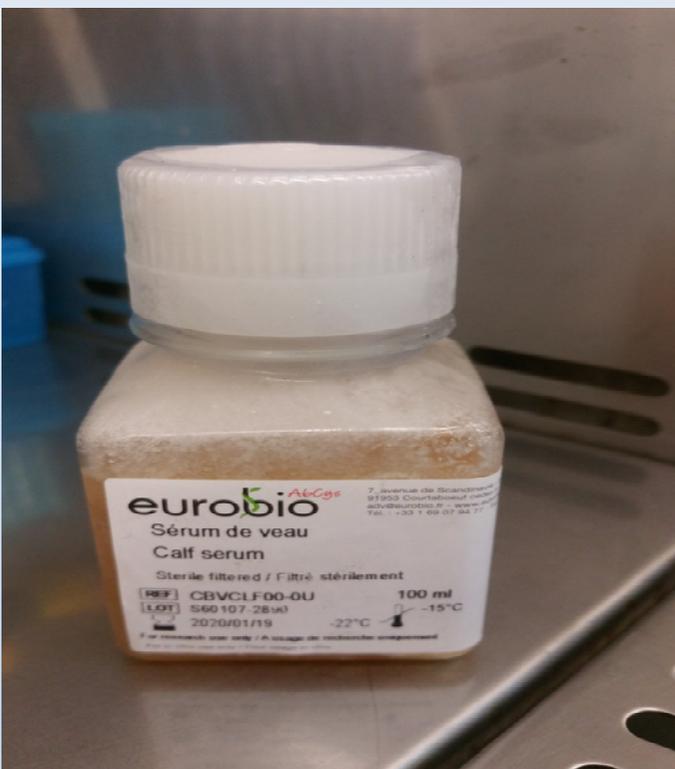
Acide acétique



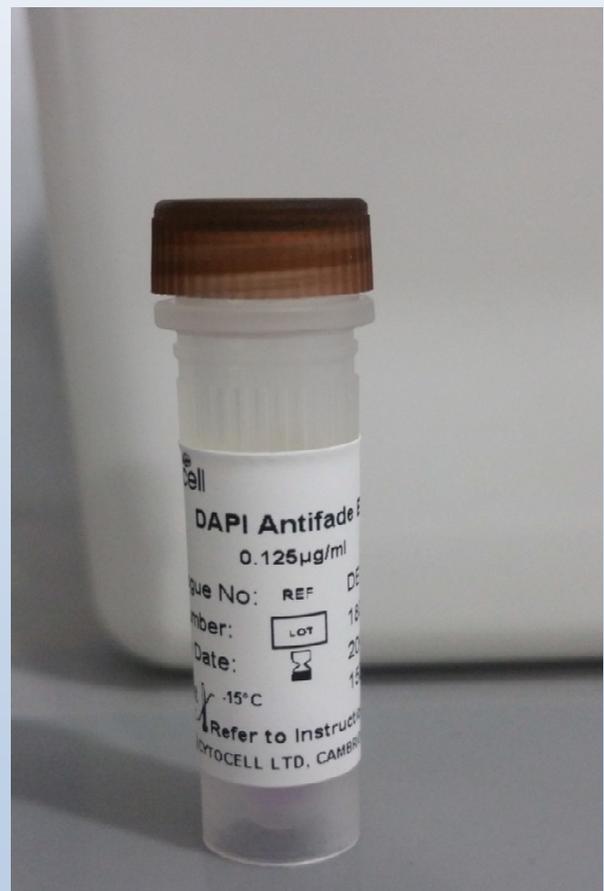
RPMI complet



SONDE DE 5q-



Serum de veau fouetal



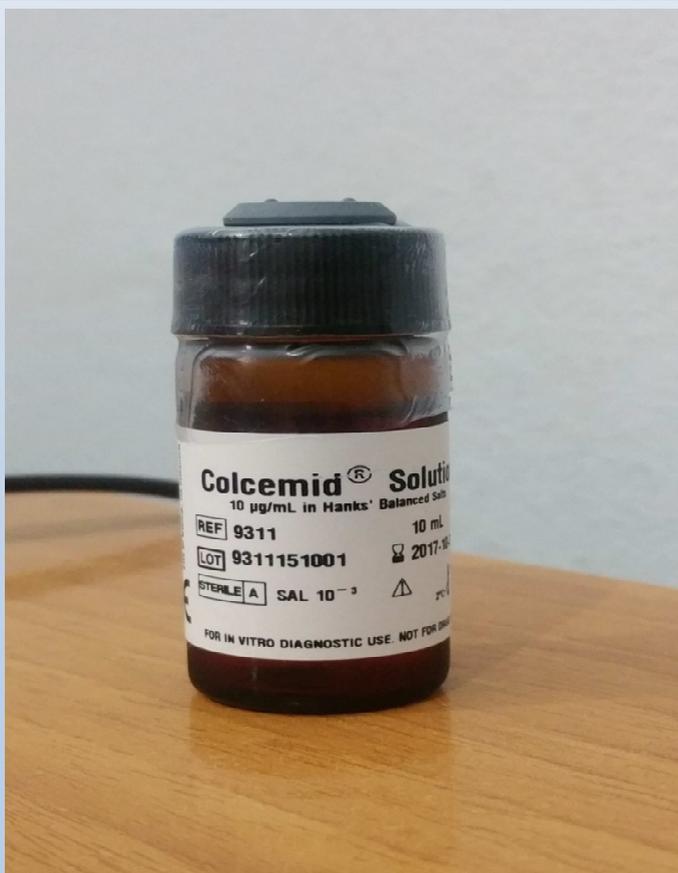
DAPI



KCL



Tampon SSC



Colchicine



Alcool a concentration 70%, 85% et 100 %



Les Ombos



filtre

ANNEXE 2 : appareillage



Hotte laminaire



Haute chimique



étuve



Réfrigérateur à -20 °C



Bain marie



Réfrigérateur à +4 °C



thermobrite



chronomètre



agitateur



centrifugeuse



sysmex



Microscope a fluorescence